



TCS-SP5

Ver2.0

Manual

Leica

MICROSYSTEMS

2009/06/08

目次

Leica TCS SP5 について 1

I. Start Up 4

II. 基本操作 10

LAS AF について 10

II-1. 画像の取得 12

II-2. XY 平面の画像取得 23

II-3. XYZ 画像の取得 24

II-4. シーケンシャルスキャン 27

II-4-1. 登録済みの設定を呼び出して使用する場合 27

II-4-2. 新規に設定を登録する場合 30

II-4-3. 終了する場合 34

II-5. 画像の保存 35

II-6. Acquisition タブについて 48

II-7. Beam Path Settings の新規登録 52

III. Viewer について 55

IV. スキャンバリエーション 60

1. TimeLapse(径時変化取り込み) 61

2. Lambda Scan 64

3. Z 方向に強度の補正をしながら Scan する 72

4. ROI Scan(任意エリアのスキャン) 75

5. Live Data Mode(高度なタイムラプス)(*オプションソフト) 78

6. スキャニングステージ使用法(Tile Scan, 多点タイムラプス) 84

Tile Scan 85

多点タイムラプス 88

V.Process	92
Edit	93
Adjust	98
Deconvolution(*オプションソフト)	101
Noise Reduction	104
Segmentation	105
Visualization	107
Dye Separation	112
Topological	115

VI. Quantify	117
Intensity	118
Line Profile	119
Stack Profile	122
Histogram	126
Report ボタンによる結果出力	129
Ratio 測定	130
Colocalization	135

VII.Shut Down	140
---------------	-----

Leica TCS SP5 について

Leica TCS SP5 は、いくつかある共焦点の種類の中で、最も解像度が高いピンポイントタイプのスキャニング方式を採用している製品です。

尚、TCS SP5 のスキャナーには以下3種類の仕様(オプション)があります。

●Conventional Scanner(コンベンショナルスキャナー)

高精細スキャン用スキャナー。

最大 8192x8192pixel で画像取得が可能。

●Resonant Scanner(レゾナントスキャナー)

高速スキャン用スキャナー。

多重染色+透過画像を最大 250frame/sec で取得可能。

ラインスキャン、ディスクスキャンなどの高速スキャン技術に比べ、XYZ の分解能において最も高いパフォーマンスを得ることができます。

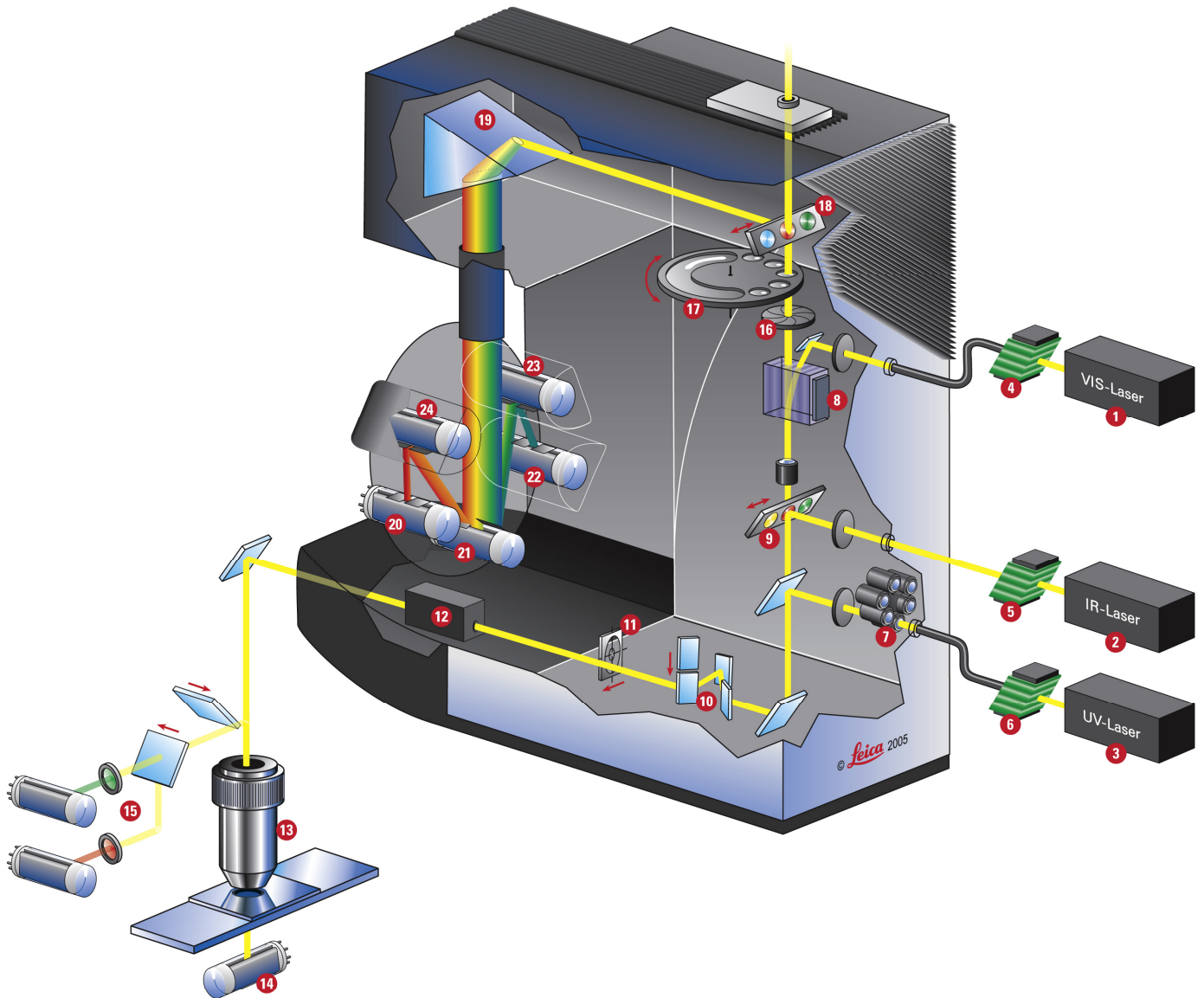
●Tandem Scanner(タンデムスキャナー)

上記2種類のスキャナーを1台に両方搭載しているスキャナー。

高精細+高速スキャナー。

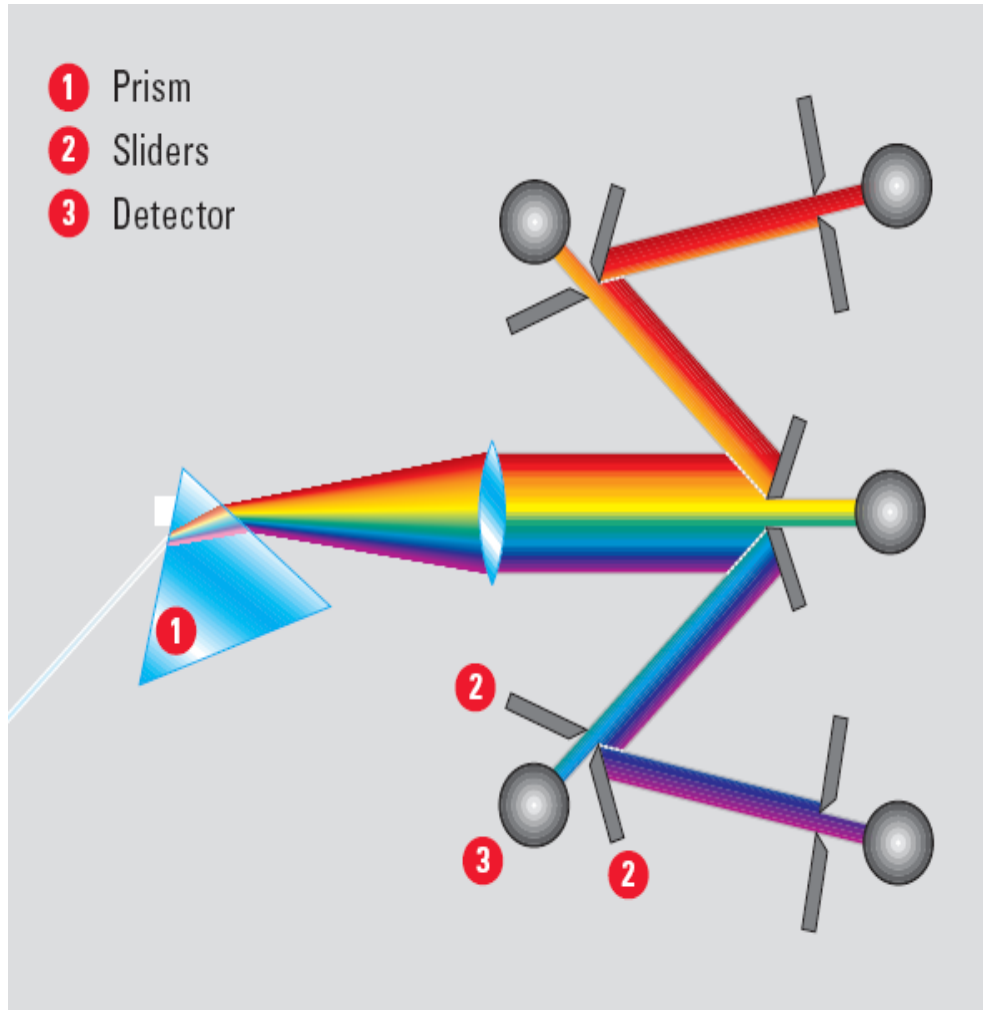
ソフトウェア起動時にどちらのスキャナーを使用するか選択することによって切り替え可能。

TCS SP5 Scanner 光学系



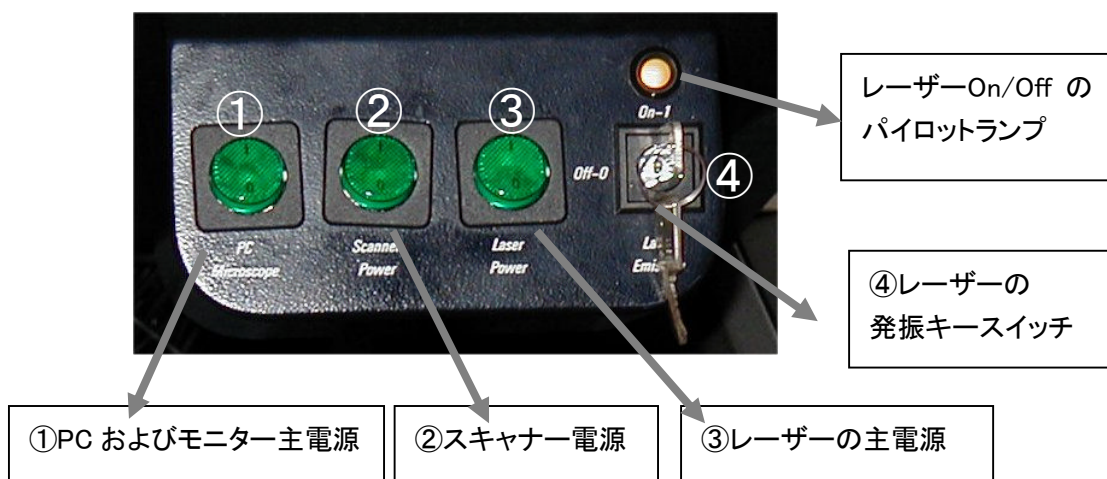
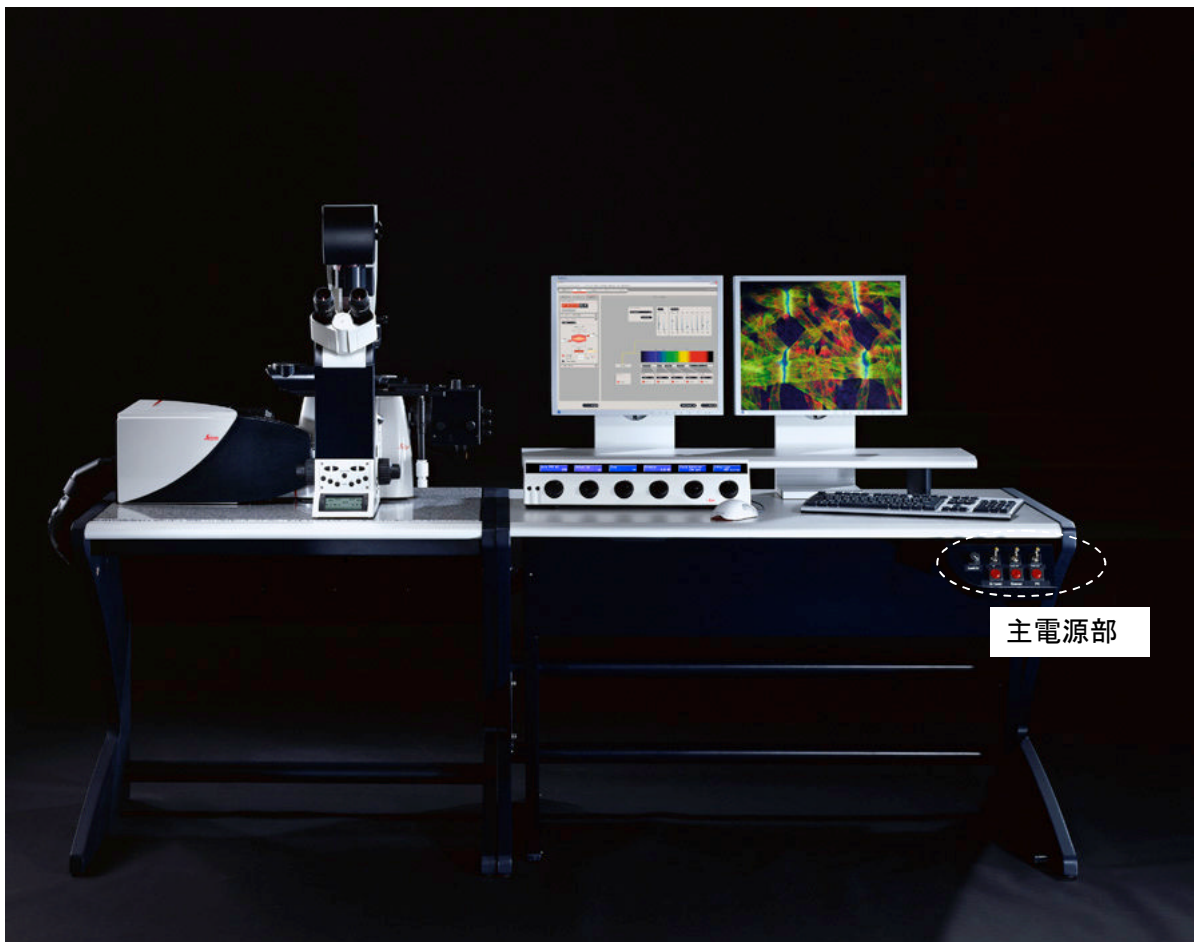
- | | | |
|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| ① Visible range lasers (up to 5) | ⑨ Multi Function Port (MFP) | ⑱ X1-emission port |
| ② IR laser | ⑩ Tandem Scanner | ⑲ Spectrophotometer prism |
| ③ UV laser | ⑪ Calibration target | ⑳ PMT channel 1 |
| ④ Visible range AOTF | ⑫ Field rotation optics | ㉑ PMT channel 2 |
| ⑤ IR EOM | ⑬ Objective lens | ㉒ PMT channel 3 |
| ⑥ UV AOTF | ⑭ Transmitted light dedetector | ㉓ PMT channel 4 (optional FLIM) |
| ⑦ UV optics imaging | ⑮ Reflected light NDD | ㉔ PMT channel 5 (optional FLIM) |
| ⑧ AOBS | ⑯ Confocal detection pinhole | |
| Acousto Optical Beam Splitter | ⑰ Filter- and polarizer wheel | |

TCS SP5 プリズムスリット方式



I . START UP

顕微鏡側からの画像の取り込みを行わない場合は、レーザーや水銀ランプの電源を入れる必要はありません。



① PCおよびモニターの電源 ON (左の緑のボタンをONにする)

② スキャナーの電源ON (真中の緑ボタンを ON にする)

((注意))ライカのアプリケーションソフト「LAS AF」がスキャナーを認識するためには、ソフトが起動される前にスキャナーの電源が入っている必要があります。もし作業の途中でソフトウェアLAS AFのみを立ち上げ直す場合(コンピュータそのものの立ち上げ直しも含む)でも、スキャナーの電源を入れ直してからリスタートしてください。その場合スキャナーの電源を入れてから 20 秒程待つてからソフトウェア「LAS AF」を立ち上げてください。

③ レーザーの主電源ON (右の緑ボタンを ON にする)

④ レーザーの発振スイッチ(セキュリティキースイッチ)ON
黄色のパイロットランプが点灯します。

⑤ 水銀ランプ電源(蛍光観察でない場合には必要ない)白色の電源ボックスのスイッチを ON にする。(下記いずれかのモデルとなります。)

((注意))どちらも頻繁にON/OFFしないこと。



水銀ランプ(100W)

再点灯はランプハウスが冷えてから(15~30分待つて)行う。

またランプハウスは非常に高温となるため、使用後ビニールカバーをかけるときは注意すること。



超高圧水銀ランプ(120W)

再点灯は5分ほど待つてから行う。

(電源内部で点灯しているのでランプハウスは無し)

⑥ 顕微鏡電源ON

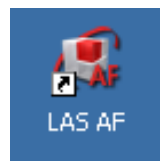
電動顕微鏡のため、フォーカス移動・ハロゲンランプの電源などと連動しているため必ずONにする。アプリケーションソフト起動時にONになっていないと起動できませんので注意してください。
(下記どちらかのモデルとなります)



⑥ ログイン

WindowsXP が立ち上がったら、TCS_User のユーザーアイコンを選択します。

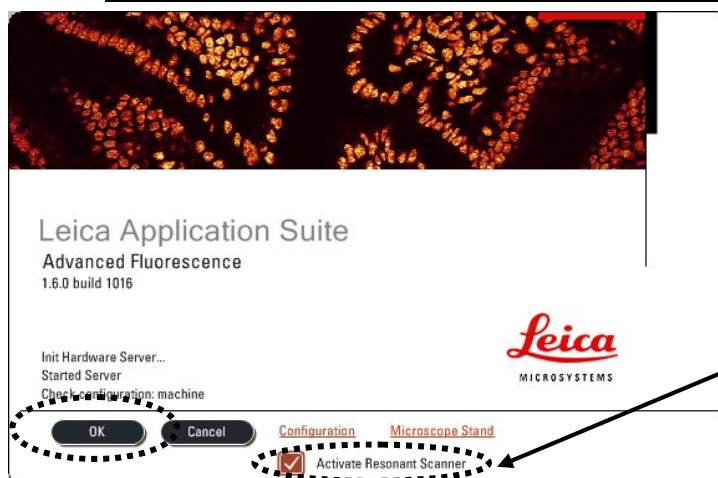
⑦ 左側に並んだショートカットの中より次のアイコン(LAS AF)をダブルクリックする。



⑧ 以下のウィンドウが開く。

OK ボタンを押す。立ち上げには数分かかります(購入時の仕様により時間は異なります)。起動中はスキャナー、顕微鏡、ガルバノステージ(オプション)のイニシャライズを行いますので、焦点・光路が変わります。

サンプルのセッティングは起動が終了するまでお待ちください。



Resonant scanner モード(オプション)で立ち上げる場合にはチェックボックスにチェックをつける。
チェックをつけなければノーマルモードで立ち上がります。

⑨ 電動XYステージが装着されている場合(オプション)はホーミングをするかどうかを聞いてくるのでホーミングをする場合は、Yesをクリックする。

Yes: Tiling(マッピング)、Mark&Find(多点タイムラプス)が可能となります。

No: 上記機能はアクティブとなりませんが、ステージを電動で動かすことは可能です。




⑨ アプリケーションが立ち上がったら、サンプルを顕微鏡上にセットし、フォーカスを合わせる。

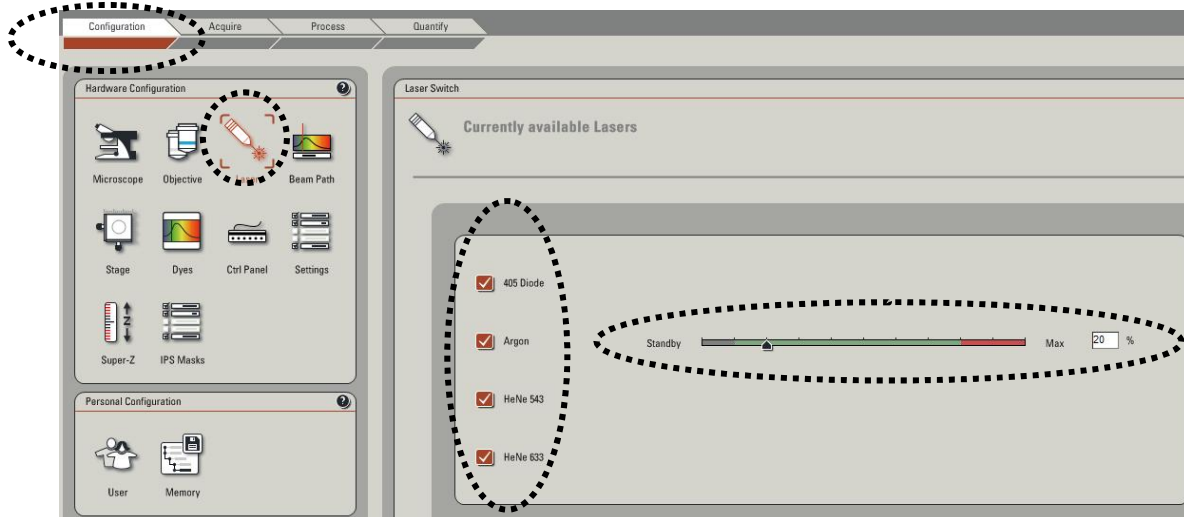
((注意))ガルバノステージが接続されている場合は、ソフトの立ち上げ時にZ軸のキャリブレーションを行うため、フォーカスが変わる。立ち上げが終了してからフォーカスあわせを行うこと。

⑩ レーザー光源のセットアップを行う。

Configuration タブ  を開き、Hardware Configuration の中の

Laser アイコン  をクリックする。使用する各レーザーのチェックボックスをシングルクリックでアクティベートし、チェックを入れる。

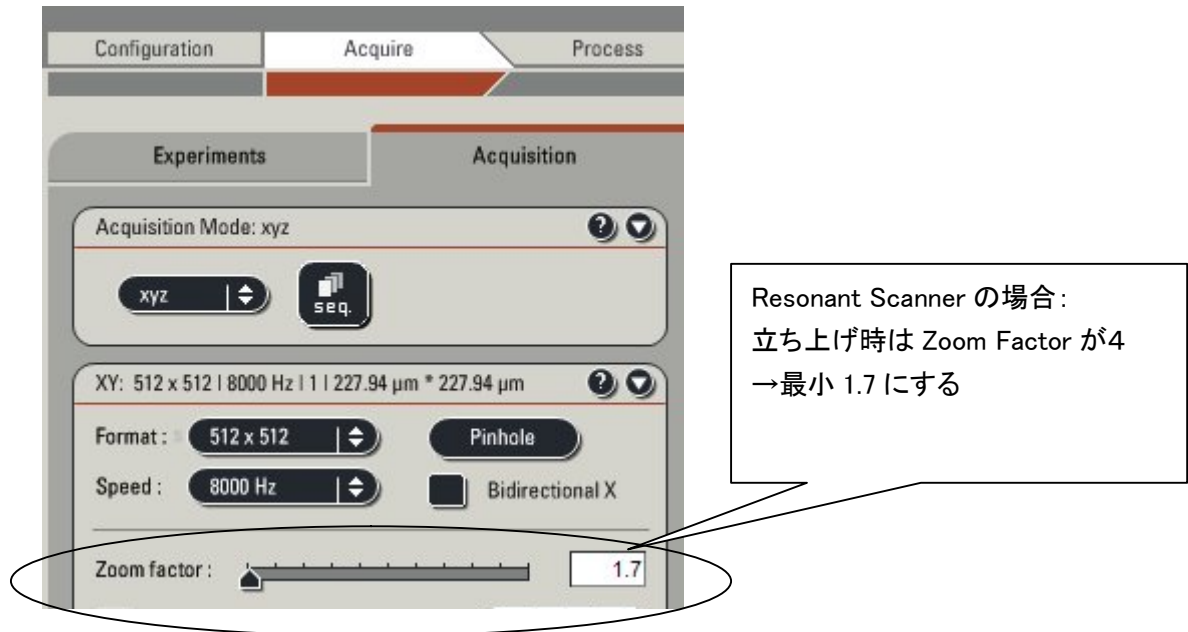
Ar レーザー使用時は、レーザー出力も入力する。(目安として、20-30%)



注意)ダブルクリックすると、レーザーON の直後に OFF にすることとなり、頻繁に繰り返すと故障の原因になりますのでご注意ください。

⑪ (Resonant Scanner モードで立ち上げた場合)

共振ミラーへの負荷を軽減するため、立ち上げ時は Zoom Factor が4倍になっています。Scanning エリアが狭くなっていますので、Zoom factor を最小 (Resonant の場合は 1.7 倍まで) に落としてから使用を開始してください。(Conventional Scanner の場合は最小 Zoom Factor は1.0)



レーザーについて

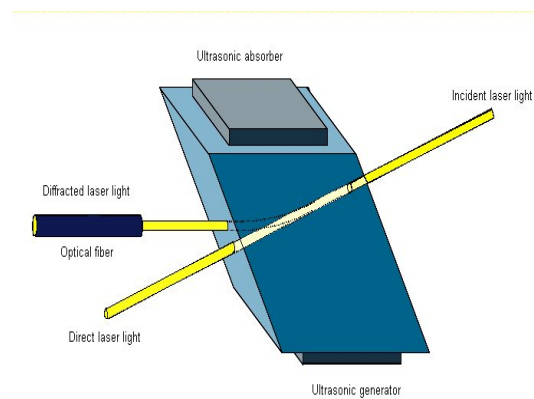
レーザー光源は、下記の光源のいずれかを装備し AOTF (Acoust-Optical Tunable Filter :音響光学偏光素子)を用いてそれぞれの励起波長の選択と使用出力をコントロールしています。

	レーザー	波長	観察できる試薬の例
1	半導体 Blue Diode レーザー	405nm	DAPI など
2	Diode レーザー	442nm	CFP など
3	空冷 Arレーザー	458 nm	CFP, Lucifer Yellow など
4	"	476 nm	特に無し(元々レーザーから出ている)
5	"	488 nm	FITC, Alexa488, GFP, PI, Cy2, Fluo3 など
6	"	496 nm	特に無し(元々レーザーから出ている)
7	"	514 nm	YFP など
8	空冷 Green He-Ne レーザー	543nm	Rhodamine, Alexa546, Cy3 など
9	半導体Green Diode レーザー	561nm	Alexa568, Ds-Red など
10	空冷 Krレーザー	568nm	Alexa568, Ds-Red など
11	空冷 Orange He-Ne レーザー	594nm	TexRed, Alexa594, mCherry など
12	空冷 Red He-Ne レーザー	633nm	TOTO3, Cy5 など

詳しい各蛍光色素の波長などについては、<http://probes.invitrogen.com/>などを参照してください。

<<AOTF の原理図>>

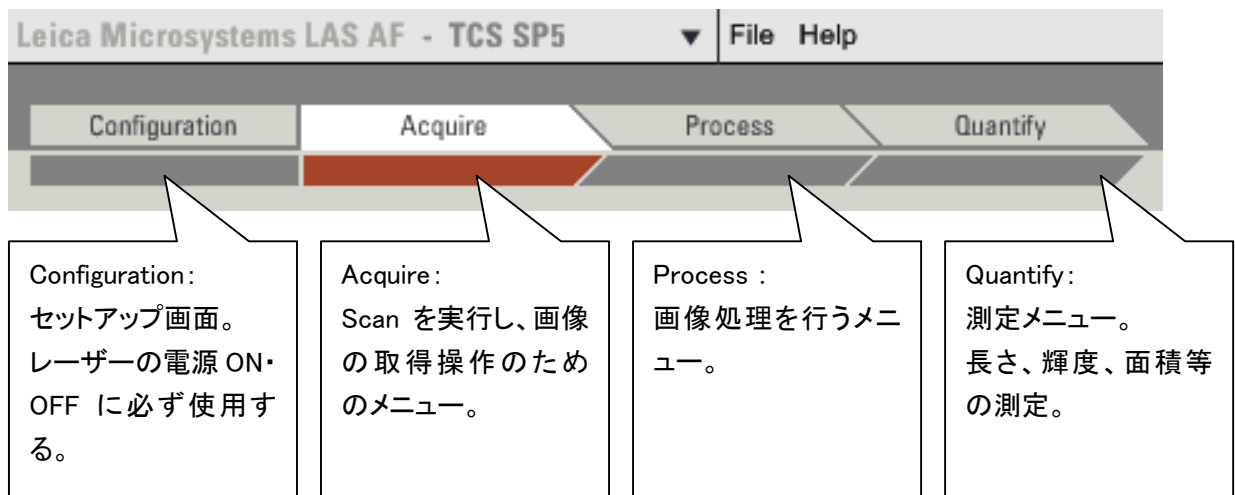
AOTF は音響波 (Radio Frequencies: RF) を加えることで、結晶内の屈折率が変化します。この性質を用いることで、光源から特定の波長を選択することができます。光源から出ているレーザー光は AOTF に対して、角度をもって入光するように設計され、特定の RF を AOTF に与えることで、必要としている波長のレーザー光を光路へと導きます。また、AOTF に与える RF を調整することで、波長の種類、および光量 (パワー) の調節を行うことができます。



II. 基本操作

LAS AF について

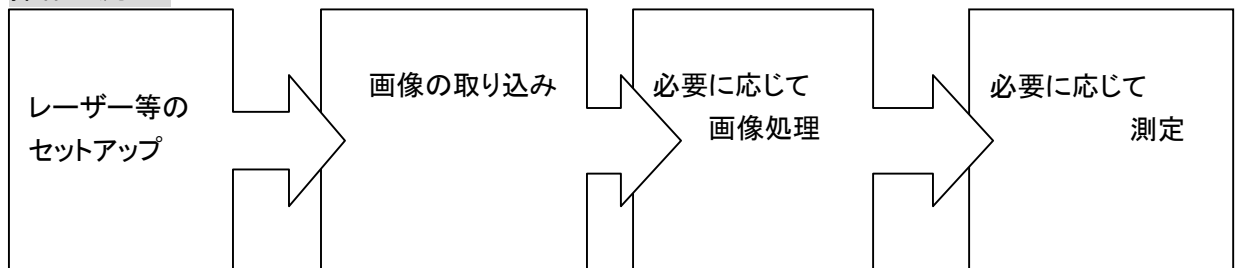
画面左上に以下のようなメニューが表示されています。



Leica Microsystems LAS AF - TCS SP5 File Help

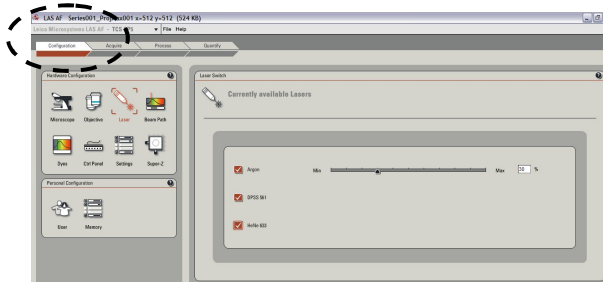
Configuration	Acquire	Process	Quantify
<p>Configuration: セットアップ画面。 レーザーの電源 ON・OFF に必ず使用する。</p>	<p>Acquire: Scan を実行し、画像の取得操作のためのメニュー。</p>	<p>Process: 画像処理を行うメニュー。</p>	<p>Quantify: 測定メニュー。 長さ、輝度、面積等の測定。</p>

操作の流れ:

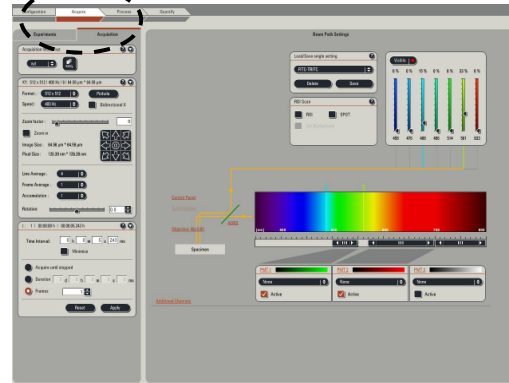


メニューごとに異なる操作画面になりますので、まず、4つのうちのいずれかのメニューを開いて、その下に出てくるプログラムを操作していきます。

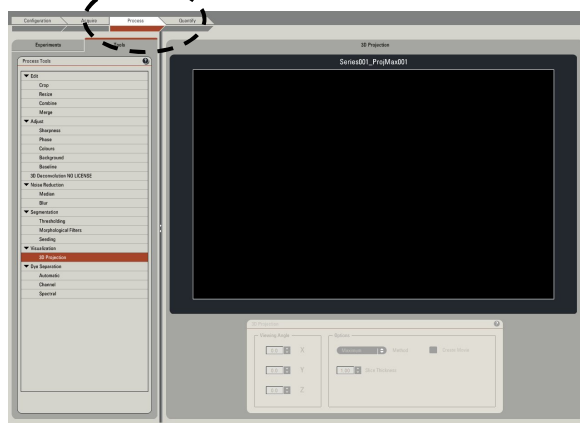
Configuration メニュー:



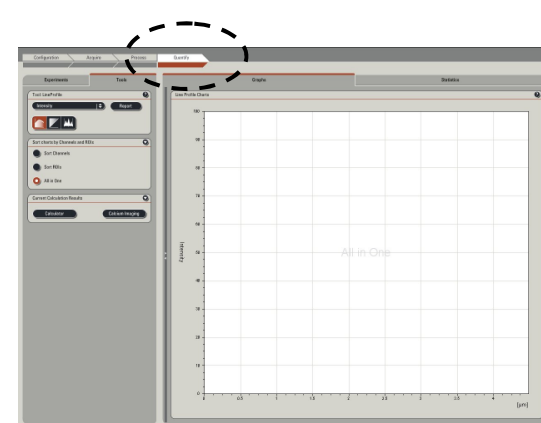
Acquire メニュー:



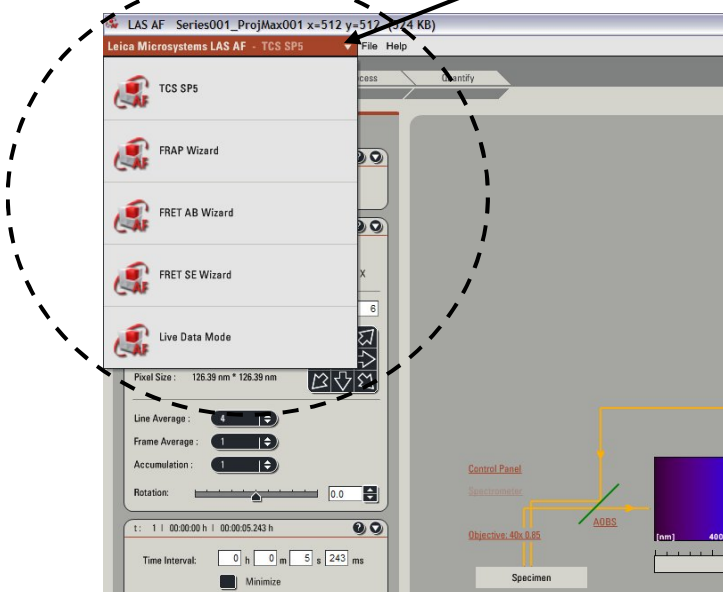
Process メニュー:



Quantify メニュー:



尚、以下のオプションソフトがインストールしてある場合は、以下のように画面左上からアクセスします。ここをクリック



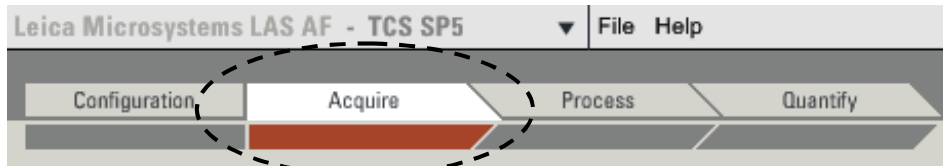
ここからアクセスできるオプションソフト: 以下 4 点

- FRAP
- FRAP XT
- FRET AB
- FRET SE
- Live Data Mode

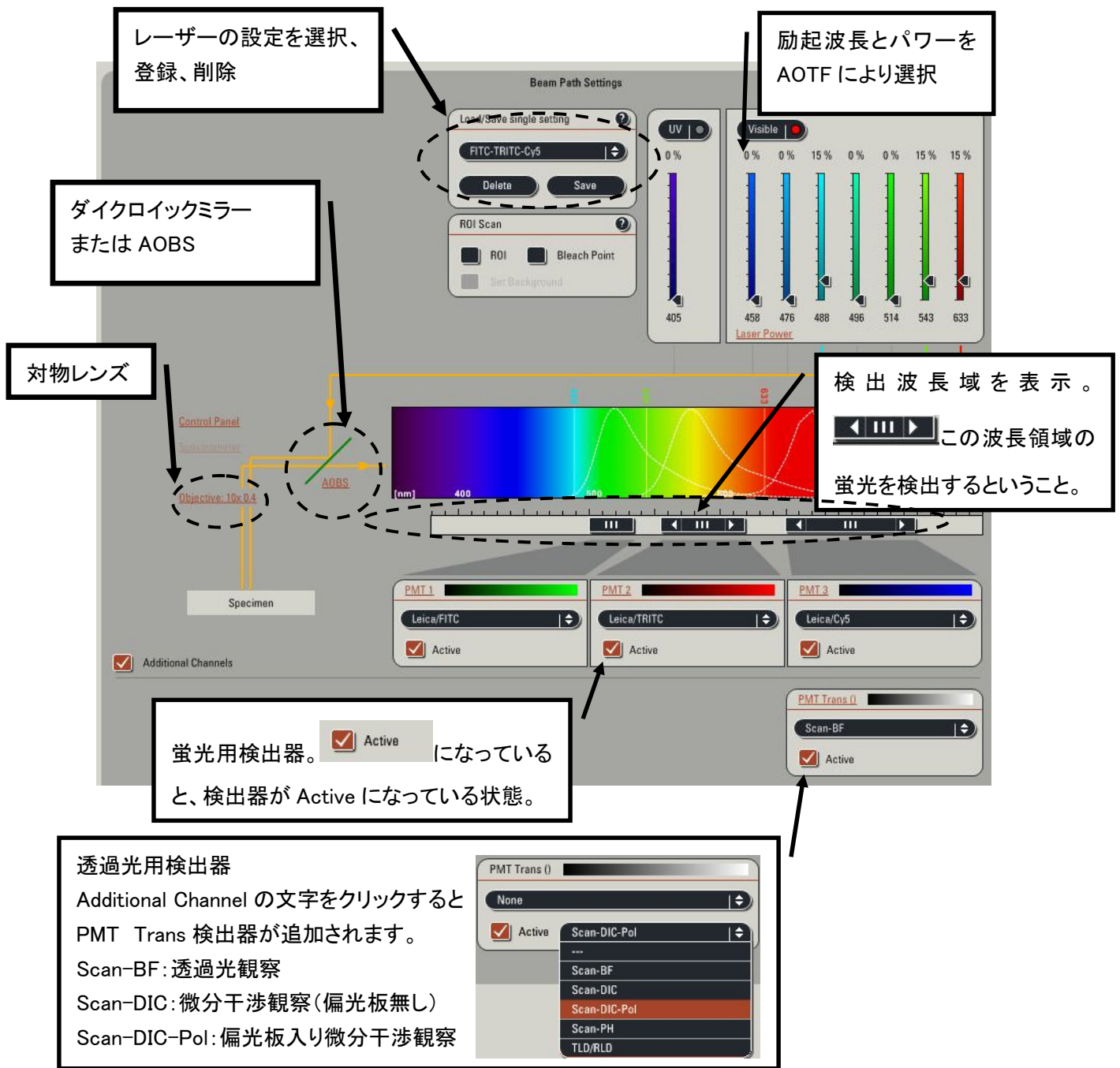
II-1. 画像の取得

1. Beam の設定

Acquire メニューを開きます。



操作画面にある Load/Save Setting から、FITC などサンプルの染色に近い設定を選択します。



レーザーの設定を選択、登録、削除

励起波長とパワーを AOTF により選択

ダイクロイックミラー または AOBS

対物レンズ

検出波長域を表示。
この波長領域の蛍光を検出すること。

蛍光用検出器。Active になっていると、検出器が Active になっている状態。

透過光用検出器
Additional Channel の文字をクリックすると PMT Trans 検出器が追加されます。
Scan-BF: 透過光観察
Scan-DIC: 微分干渉観察(偏光板無し)
Scan-DIC-Pol: 偏光板入り微分干渉観察

Beam Path Settings の登録名称について

登録は全ての試薬名称ではなく、一般的な試薬の代表名 (FITC など) で行われています。緑蛍光の代表として FITC、赤蛍光の代表として TRITC などです。どの設定が良いかは、使用される試薬の励起波長と蛍光波長をご確認の上、登録されているものの中から近いものをお選びいただくこととなりますが、下記表も参考にしてください。

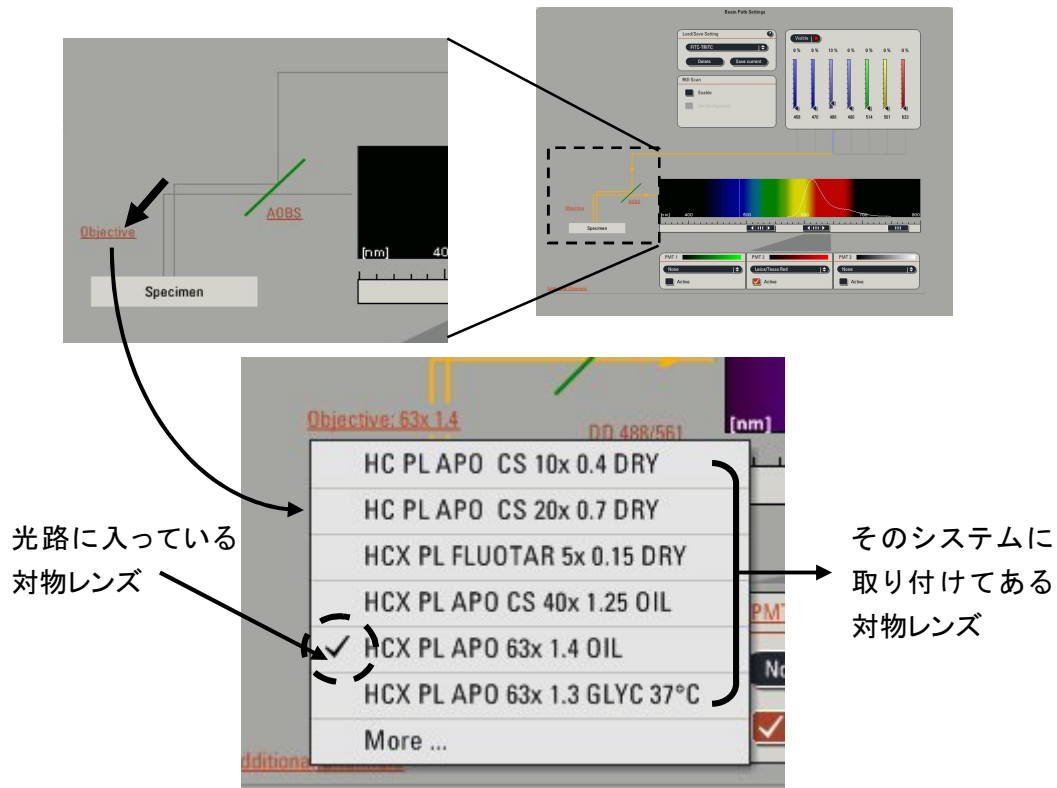
登録名	使用可能な試薬名	使用される励起波長 (nm)
FITC(緑蛍光)	FITC、Alexa488、GFP、Cy2、Fluo3、Fluo4 など	488
TRITC(赤蛍光)	TRITC (ローダミン)、Cy3、Alexa546・555・568、PI、DsRed、TexRed など	543、561、(594)
Cy5(赤外蛍光)	Cy5、TOTO3、YOYO3、TOPRO3、YOPRO3 など	633
DAPI(青蛍光)	DAPI、Hoechst、Alexa350 など	405
CFP	CFP など	458
YFP	YFP など	514
GFP	GFP など	488
DsRed	DsRed など	543、561、(594)
Transmission	透過像	488
Reflection	反射像	488

*検出される蛍光波長は、プリズムスリット機能により自由に最適化することが可能です。最適化後、Save ボタンで新規登録(ユーザーディレクトリー)を行い、次回の操作を簡略化することができます。



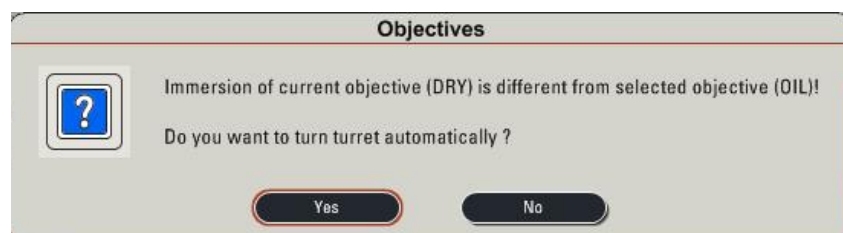
2. 対物レンズの交換

BeamPathSettings にある Objective を押し、使用する対物レンズを指定し、交換します。



液浸レンズ⇄ドライレンズの交換時は下記のメニューが表示されます。**Yes ボタン**でレンズが交換されます。

液浸レンズ使用時は、必ずサンプル側に付着している液浸(オイル、水、グリセリン)を拭いてからドライレンズに交換するようにしてください。



注意！

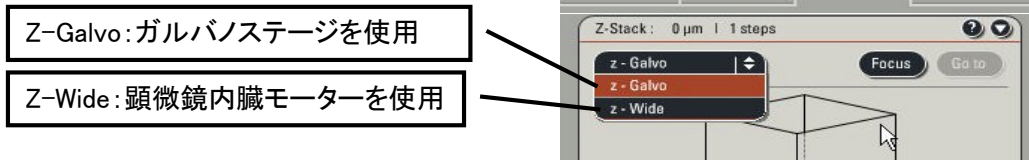
液浸(オイル、水、グリセリン)がサンプルに付着した状態でドライレンズに交換すると、ドライレンズの先端にオイルなどが付着してしまい、画像の劣化を招きます。

必ずオイルなどをふき取った上で、「Yes」をクリックしてドライレンズに交換してください。

オイルなどがドライレンズに付着してしまった場合には、画質の劣化を招きますので**必ずクリーニング**を行うようにしてください。

3. フォーカス駆動方式の選択

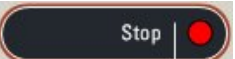
SP5 では、顕微鏡内臓モーターとガルバノステージ(Optional)の2つのフォーカス駆動方式があります。



	Z-Galvo ガルバノステージ	Z-Wide 顕微鏡側モータードライブ (倒立: レンズ上下、正立: ステージ上下)	
最小ステップ幅	10nm	15nm	
最大駆動距離	1500 μm	モジュールの稼動範囲 (cm)	
駆動モジュール	ガルバノステージ	正立顕微鏡の場合 ステージ	倒立顕微鏡の場合 レボルバー(レンズ)
操作モジュール	コントロールパネルまたはソフト上から操作 (連続断層像取り込み時の Begin と End の設定時は、顕微鏡本体のフォーカスダイヤル及びスマートムーブからの操作は有効ではないので注意)	顕微鏡本体のフォーカスダイヤル、スマートムーブ、またはソフト上から操作 (パネルボックスからも操作は可能ですが、デフォルトでは微動になります)	

4. スキャンの開始

Live  ボタンを押します。スキャンがスタートします。一度、スキャンを

すると、Stop  と表示が変わります。スキャンを止めるときは、この

Stop  ボタンを押します。

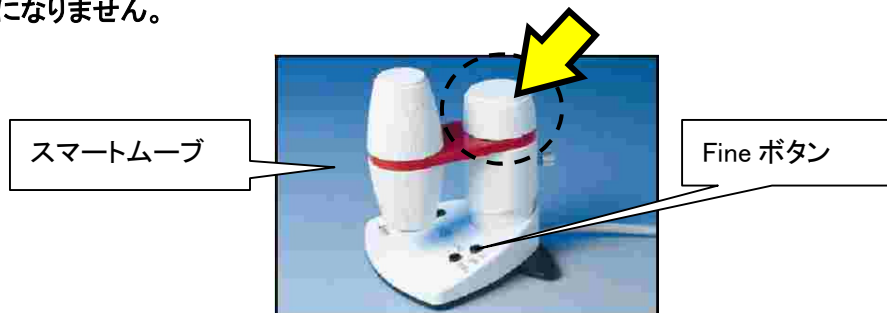
5. フォーカス面の調整

パネルボックスの一番右のダイヤルを回すと、ピントが移動していきます(ガルバノステージ・レボルバーなどが移動)。サンプルのどのピント面の画像を取り込むかを選択します。







顕微鏡本体のフォーカスダイヤルまたはスマートムーブからも、Zフォーカスの調整が可能です。スマートムーブの右側にあるFineボタンを押してZフォーカスダイヤルを回し、フォーカス面の調整を行ってください。

注意:フォーカスの調整は可能ですが、Z位置の登録(Begin、End)はZ-Wideモードでないと有効になりません。

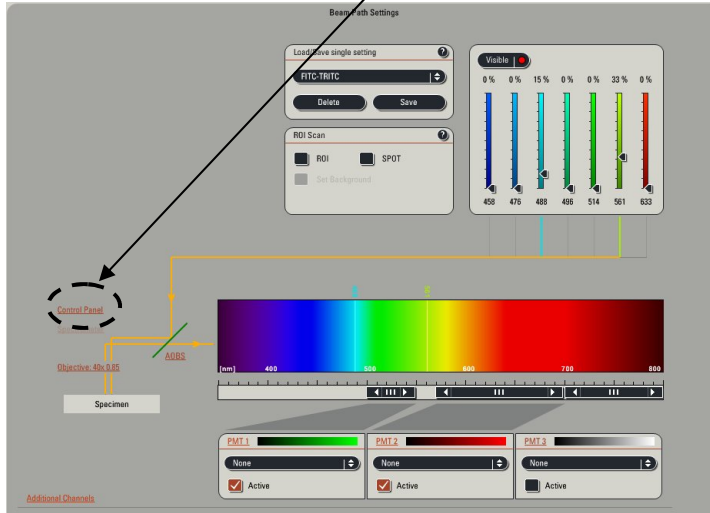


＜ダイヤルの回転方向とサンプルの動き＞

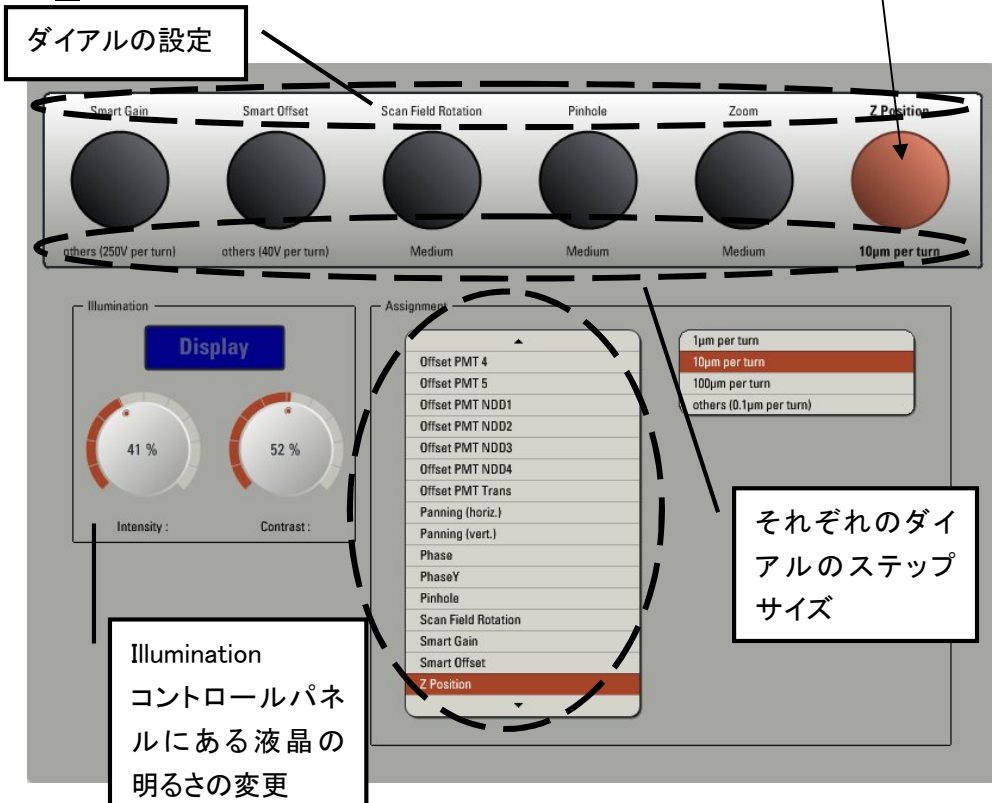
パネルボックス の場合				
	時計回し 		反時計回し 	
顕微鏡のステージ・対物レンズの移動方向	正立顕微鏡: 顕微鏡のステージが上に移動(ピントは下部へ)	倒立顕微鏡: 対物レンズが上に移動(ピントは上部へ)	正立顕微鏡: 顕微鏡のステージが下に移動(ピントは上部へ)	倒立顕微鏡: 対物レンズが下に移動(ピントは下部へ)
ガルバノステージ	正立・倒立顕微鏡ともにガルバノステージが下がる(ピントは上部へ)		正立・倒立顕微鏡ともにガルバノステージが上がる(ピントは下部へ)	
スマートムーブ・顕微鏡のフォーカスダイヤル の場合				
	時計回し 		反時計回し 	
顕微鏡のステージ・対物レンズの移動方向	正立顕微鏡: ステージが上に移動(ピントは下部へ)	倒立顕微鏡: 対物レンズが上に移動(ピントは上部へ)	正立顕微鏡: ステージが下に移動(ピントは上部へ)	倒立顕微鏡: 対物レンズが下に移動(ピントは下部へ)

<<コントロールパネルの設定変更>>

① BeamPathSettings 画面上で Control Panel をクリックする。



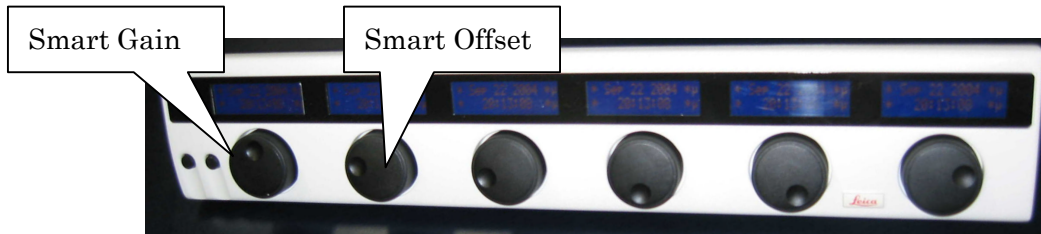
② 以下の画面が出るので、変更したいダイヤルをクリックしてアクティブにし(赤色にする)、Assignment 内のパラメーターを変更する。



6. 画像の感度調節

ここでは Gain と Offset の設定について説明します。

多重染色の場合は、モニター上でクリックしたチャンネルの設定をそれぞれ一つのダイヤルでコントロールできます。

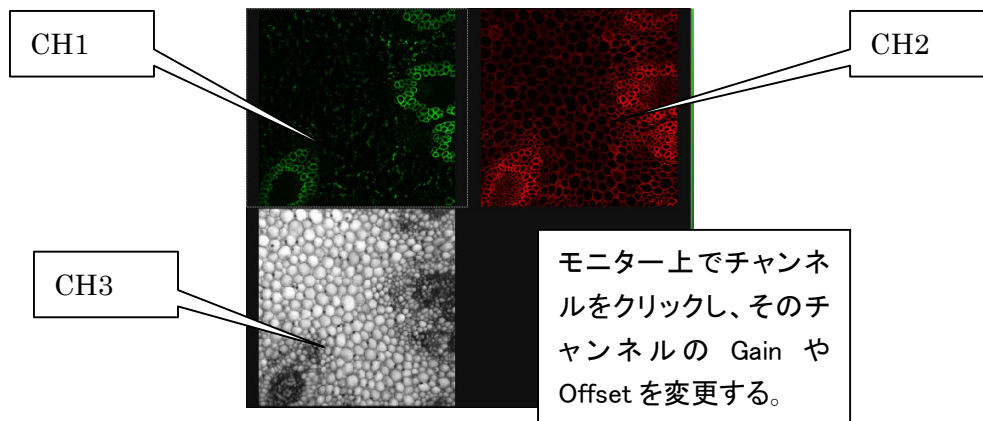


Gain: (画像の明るさ)

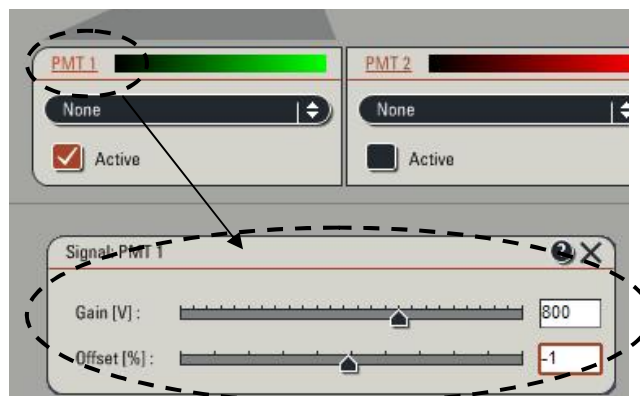
パネルボックスの一番左のダイヤル(デフォルトで“SmartGain”になっています)を回し、検出器の電圧を調整して画像の明るさ調整を行います。


Offset(バックの明るさ)

パネルボックスの左から 2 番目のダイヤル(デフォルトで“SmartOffset”になっています)を回し、バックの明るさを調整します。



モニター上で、感度を変更したい画像(ch)をクリックすると、そのチャンネルの Gain、Offset の変更が可能になります。



Viewerにあるボタンを使うと輝度のチェックが容易になります。



ボタンを押すと、押すたびに表示色が一時的に下記のように変更されます。

Original(緑、赤などのオリジナルカラー)

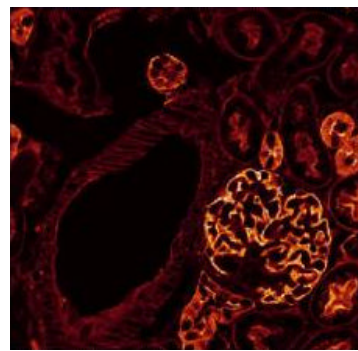
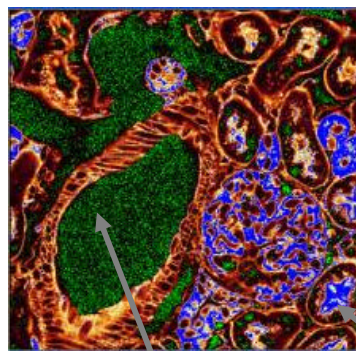
→Grow Over/Under(チェック用カラー)

→Gray(白黒)

→Original(緑、赤などのオリジナルカラー)

Grow Over/Under(チェック用カラー)は、表示階調(8Bit のときは、0~255 の256階調)内にあるときに、白~茶で表示します。表示階調内を超えているときは、青(256以上)や緑(0未満)で表示されます。感度を調節する際に、この青や緑がなくなるように感度の設定を行うと、適正感度の画像が得られます。青表示は、サチュレーション輝度が飽和している部分を示しています。緑表示は、バックグラウンドを引きすぎているときに表示されます。

>255	青(サチュレーション=)
255	青
.	白
.	茶
.	黒
0	緑
0<	緑



サチュレーションしている部分

バックを引きすぎている部分

7. Zoom

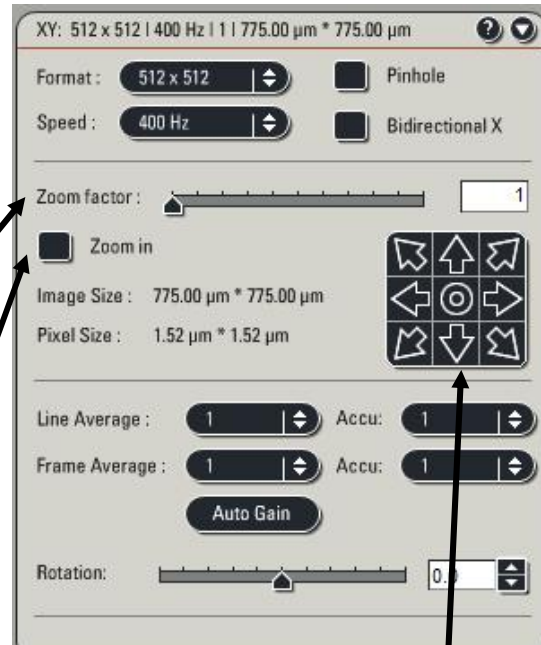
必要に応じて、1x-64xまでのZoomをかけることが可能です(レゾナントスキャナーの場合は1.7x-64x)。

スキャンズームは、同じ画像解像度のまま、スキャン領域をZoomします。Zoomした状態だと、矢印ボタンを使用することができます。

ZoomFactor(中心 Zoom): スライダーを動かし、ズーム倍率を変更できます。また、倍率入力も可能です

ZoomIn: 特定の位置を選択 Zoom できます。ZoomIn をクリックした後、Viewer 左側の□ボタンを押して画像上でROIを指定してください。

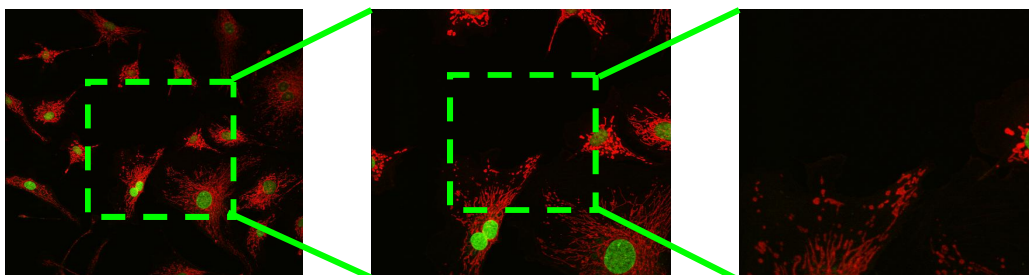
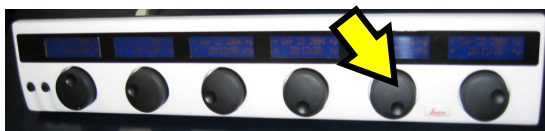
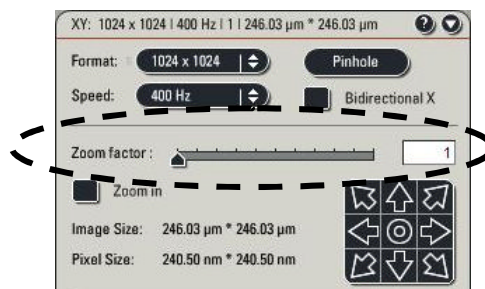
Zoom した状態で、矢印ボタンを使用し、スキャンエリアを移動することができます。



7-1. 中心 Zoom

モニターに表示されている画像の中心を拡大します。Zoom Factor のスライダーを左右に移動させ、画像を拡大する。または、拡大したい倍率を数値入力します。

Zoom(中心 Zoom)は、パネルボックスからも操作できます。



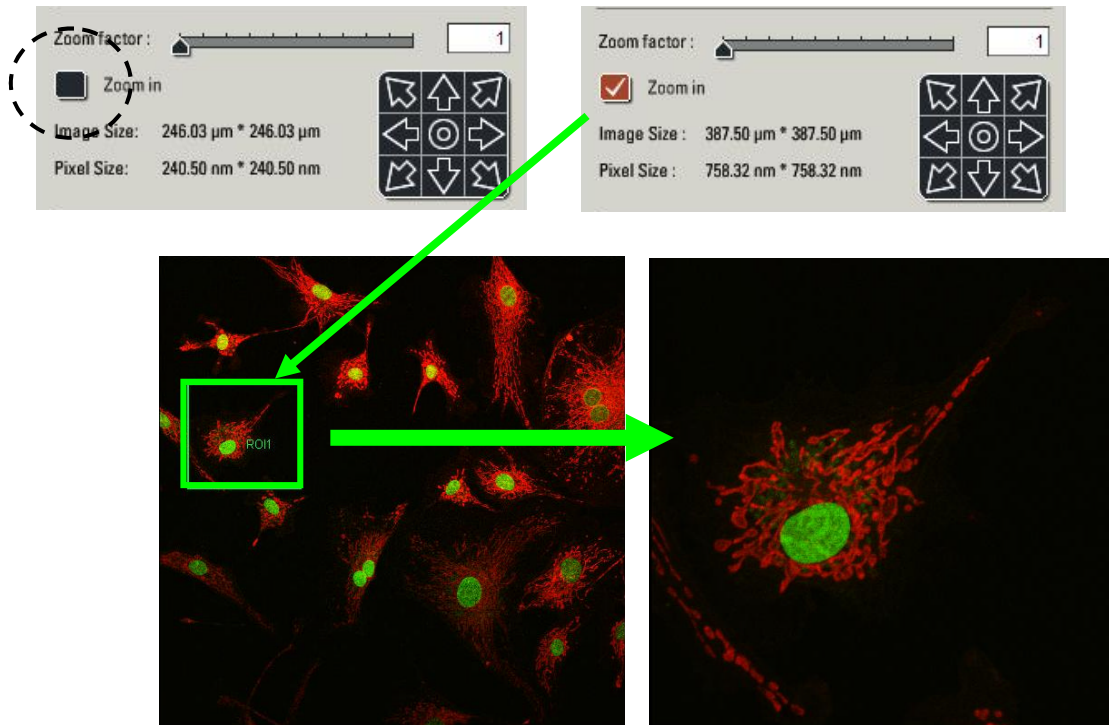
Zoom x1

Zoom x2
20

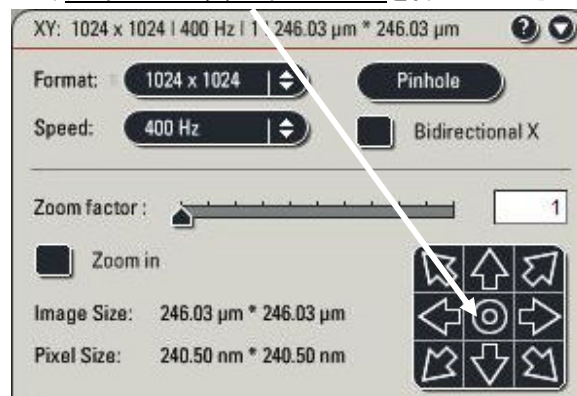
Zoom x4

7-2. Zoom In (選択領域の Zoom)

Zoom in にチェックを入れ、画像上で拡大したい部分を指定し、スキャンします。(コンベンショナルモードのときのみ有効、レゾナントモードでは使用できません。)



視野中心に戻る場合は、矢印キーの真ん中のボタンを押してください。

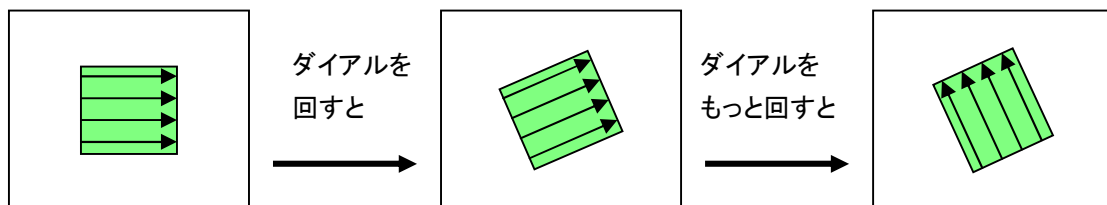
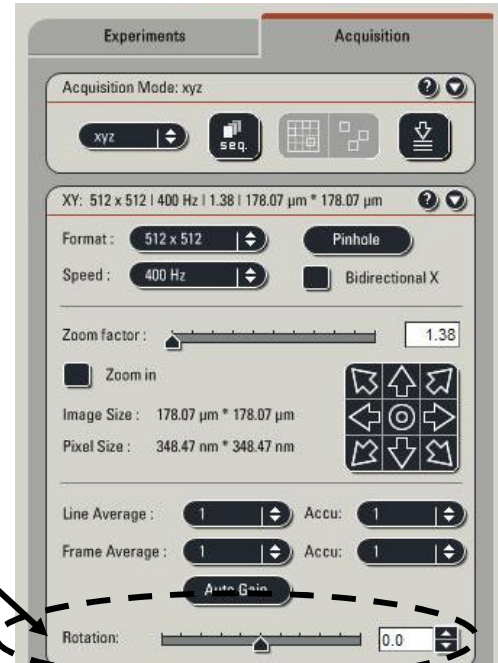


8. スキャンングローテーション

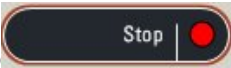
左から3番目のダイヤルを回すとスキャンングローテーションを行うことができます。ダイヤルを回すと、レーザーを操作する角度が変化します。スキャンングローテーションは、 -100° から $+100^{\circ}$ まで回転可能です。



Rotation のスライダーでも、スキャンングローテーションを可能です



9. スキャンングの停止

Stop  ボタンを押し、スキャンングを停止します。

注) Live ボタンはユーザーが Stop しない限りレーザーが照射されつづけますので、こまめに切るようにしてください。

(Live ボタンを使用して取得した画像データは、Experiment タグ上では「Preview001」などの名称で一時的に保管されますが、次回 Live ボタンを押したときには上書きされていきます。後述の「CaptureImage」ボタン、「Start」ボタンは上書きされない仕上げ取り込みのボタンになります。)

II-2. XY 平面の画像取得（1断面画像の取得）

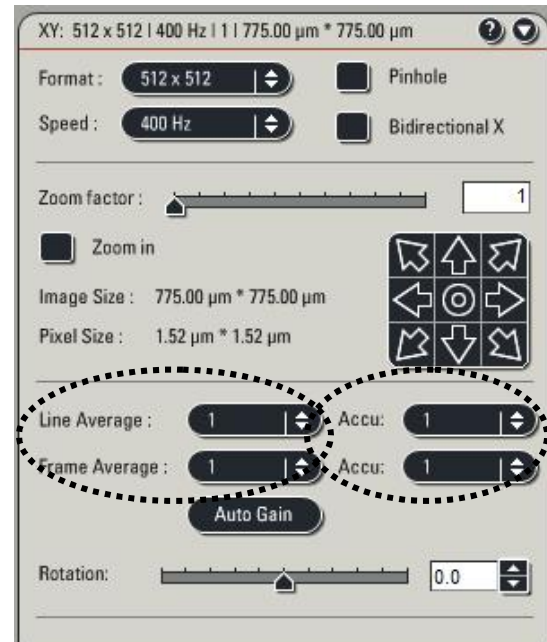
1. 取得したい焦点面に合わせる

2. Average の設定

Averaging は同じ焦点面を複数回スキャンしてシグナルを平均することによって、画質を向上させる機能です。

Line: ラインごとに指定した回数を平均します。スキャン時の時差が少ないため、生きているサンプルのアプリケーションに有効です。

Frame: Frame ごとに指定した回数を平均します。フレーム毎に平均された画像が表示されるため、何回の平均回数が必要かの判断に有効です。



3. Accumulation の設定

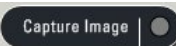
Accumulation は、同じ焦点面を複数回スキャンした画像を積算することによって、画像の明るさを、機能です。

バックがある場合、バックも上がってしまうので、あらかじめ多少バックを引いた設定にしておくことコントラストの良い画像になります。（→ II-1. 画像の取得 6.画像の調整、Offset の設定）

Line: ラインごとに指定した回数を積算します。スキャン時の時差が少ないため、生きているサンプルのアプリケーションに有効です。

Frame: Frame ごとに指定した回数を積算します。

4. XY 平面画像の取得

Capture Image  ボタンを押し、画像の取り込みを行います。画像の取り込みが終了しますと、自動的にレーザーが止まります。

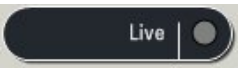
( ボタンで有効となるのは Line Accumulation のみ ですのでご注意ください。)

 ボタンで取得したデータは、Experiment タブ上で「Image001」などの名称となります。

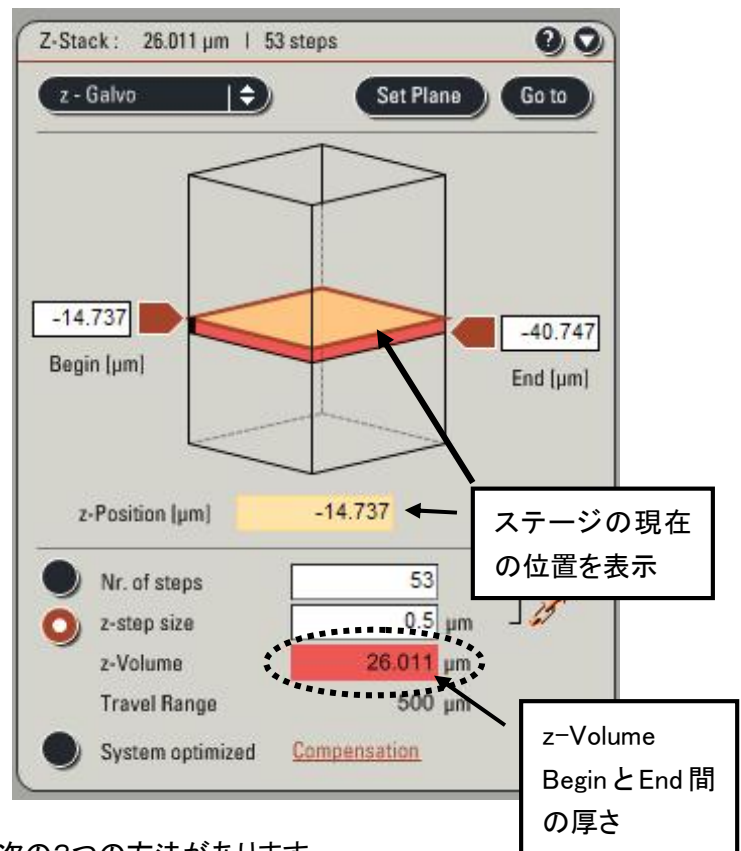
この状態では、取得した画像は保存されていません。必要に応じて、画像の保存を行ってください。

II-3. XYZ 画像の取得

1. 上限と下限の設定

Live  ボタンを使用し、スキャンしながら、Z position ダイヤルを回し、画像の取り込みをスタートさせる面で Begin ボタン(黒い部分)をクリックします。取り込みを終了させる面で End ボタンを押します。

Begin、End の設定が終了しましたら、一度  ボタンでスキャンングを止めます。




2. 取り込み枚数の決定

画像の取り込み枚数の決定方法は、次の3つの方法があります。

- **Nr. of steps**: 取り込み枚数
- **z-step size**: スライス時のステップ数
- **system optimized**: 自動計算による光学スライス数


2-1. Nr. of steps(取り込み枚数)による設定

BeginとEndで指定した間の厚さを何枚取得するか指定します。ステージのステップ幅よりも、取り込み枚数を優先させます。

Nr. of steps の項目をクリックしてアクティブの状態  にし、横の欄に直接数値を入力し、リターンキーを押します(z-step size が自動計算されます)。

2-2. z-step size(スライス時のステップ数)による設定

BeginとEndで指定した間の厚さをどのくらいの幅でステージをステップさせながら画像を取得するか指定します。ステージのステップ幅により枚数を決定します。

z-step sizeの項目をクリックしてアクティブの状態  にし、横の欄に直接数値を入力し、リターンキーを押します(Nr. of stepsが自動計算されます)。

<<Z-step sizeから入力する場合の目安>>

(封入材の屈折率・サンプルのカバーガラスからの距離等によっても分解能は変わってきますのでご注意ください。)

倍率・開口数・液浸/乾燥	およその光学断層厚
x63/1.4oil、x100/1.4oil	0.5um 前後
x40/1.25oil	0.9um 前後
x40/0.85dry	1.2um 前後
x20/0.7dry	2.5um 前後
x10/0.3dry	7.0um 前後

2-3. system optimized(自動計算による光学スライス数)による設定

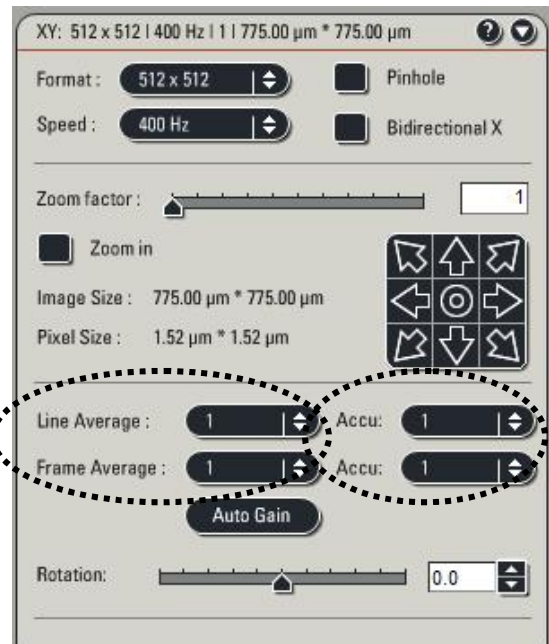
対物レンズのZ軸方向における分解能の半分の値でステージがステップするように自動設定されます。

3. Average の設定

Averaging は同じ焦点面を複数回スキャンしてシグナルを平均することによって、画質を向上させる機能です。

Line: ラインごとに指定した回数を平均します。スキャン時の時差が少ないため、生きているサンプルのアプリケーションに有効です。

Frame: Frame ごとに指定した回数を平均します。フレーム毎に平均された画像が表示されるため、何回の平均回数が必要かの判断に有効です。



4. Accumulation の設定

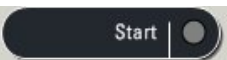
Accumulation は、同じ焦点面を複数回スキャンした画像を積算することによって、画像の明るさを、機能です。


バックがある場合、バックも上がってしまうので、あらかじめ多少バックを引いた設定にしておくことでコントラストの良い画像になります。(→ II - 1. 画像の取得 6.画像の調整、Offset の設定)

Line: ラインごとに指定した回数を積算します。スキャン時の時差が少ないため、生きているサンプルのアプリケーションに有効です。

Frame: Frame ごとに指定した回数を積算します。

5. 画像の取り込み

 ボタンを押します。上記までに設定された条件で画像の取得を行います。指定した枚数の取り込みが終了しますと、自動的にレーザーが止まります。

 ボタンで取得したデータは、Experiment タブ上で「Series001」などの名称となります。この状態では、取得した画像は保存されていません。必要に応じて、画像の保存を行ってください。

( ボタンで有効となるのは Line Accumulation のみですのでご注意ください。)

II-4. シーケンシャルスキャン

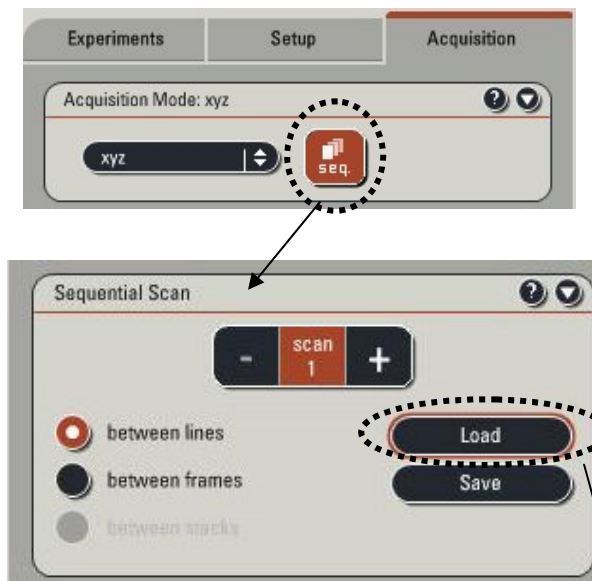
多重染色のとき、試薬同士の蛍光の漏れこみを回避するための方法です。

複数の試薬を同時に励起する方法に対し、一試薬づつ励起するという作業を行います。

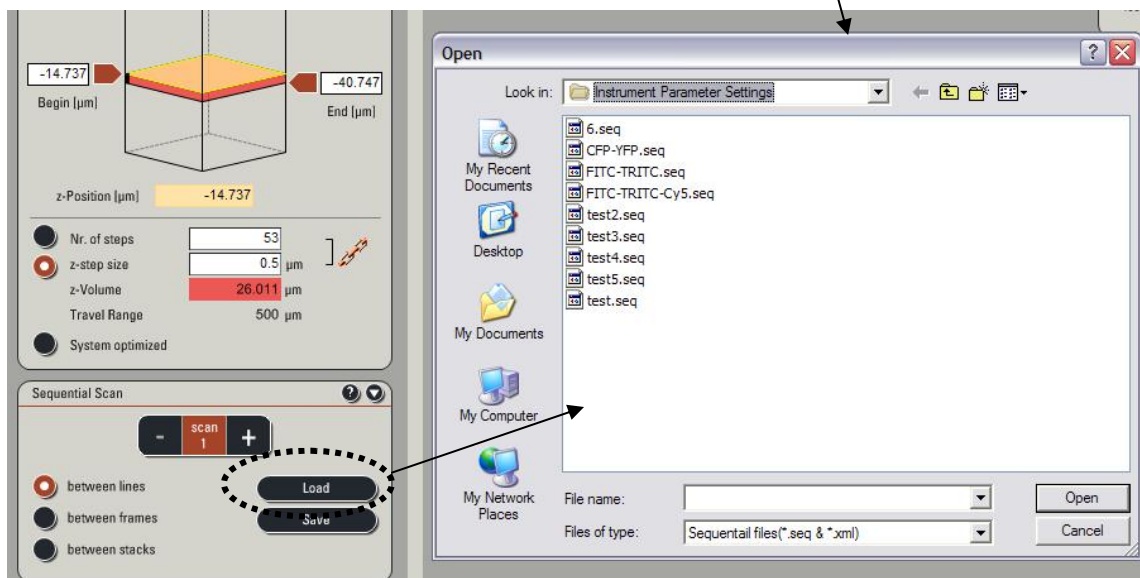
例えば FITC/TRITC の取り込みの場合、FITC 単色の設定と TRITC 単色の設定を交互に行います。

II-4-1.登録済みの設定を呼び出して使用する場合

1. Acquisitionタブの上部にあるSeqボタンを押す。Seqボタンが赤色になり、Sequential Scan パネルが新たに開きます。




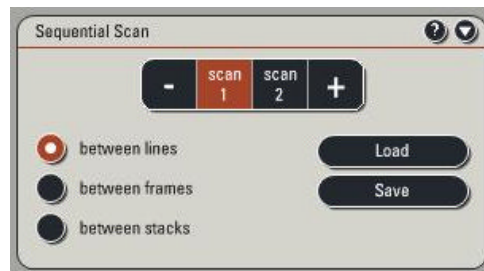
2. Load ボタンで、登録されているシーケンシャル設定を呼び出します。




3. 染色の数に従って複数のScanボタンが表示されます。
 (ここでは下記の2重染色の場合として説明します)

例) Scan1: FITC のみの設定
 Scan2: TRITC のみの設定

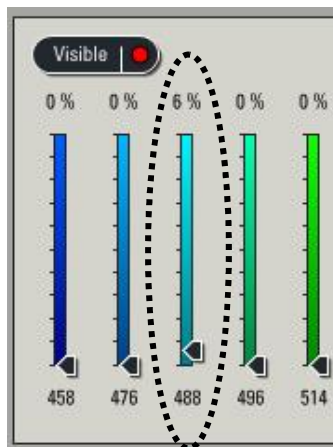
 などのボタンごとに、個別の設定(励起・蛍光波長)の設定が行われています。
 (ボタンを押すことによって設定内容を確認することができます)



4. ボタン毎にサンプルの染色に合わせて調整を行います。

例)  : FITC=488nm 励起、525nm 付近の蛍光検出
 Scan1 のボタンをアクティブにした状態で、Live ボタンで画像を取り込みながら、
 必要に応じて下記のパラメーターを調節

<励起パワー>



<検出波長範囲>



<Gain、Offset>



同様に Scan2 ボタンをアクティブにした状態で TRITC のパラメータを調節する。

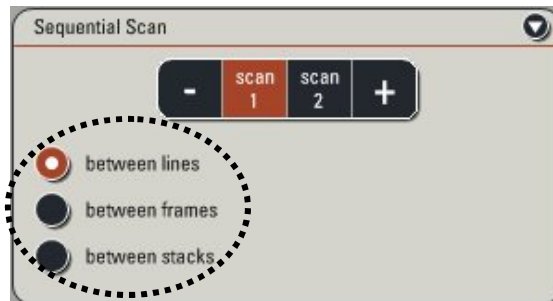
Scan2: TRITC=543 または 561nm 励起、600nm 付近の蛍光検出


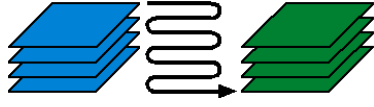
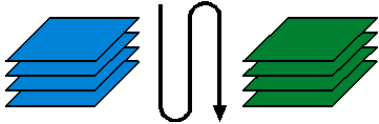
注意: シーケンシャルの原則として、単染色毎の励起、検出設定ですので、一度に複数の励起波長を当てる設定にしないようにしてください。例) Scan1 で 488 のみ、Scan2 で 543 のみ。

シーケンシャルモードについて

下記三つのモードがあります。

下記のような違いがありますので、必要に応じて使い分けてください。



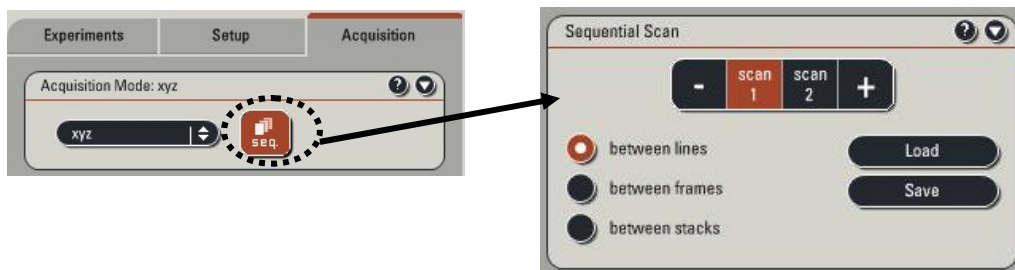
between lines		<p>時間差がほとんど無いので生細胞観察のときに有効 ほぼ同時に多重染色検出を行うので、染色の数だけ検出器が必要となる。</p>
between frames		<p>1フレーム分の時間差がある (固定サンプルなどでは問題無し) 染色毎に時間差があるため、最低ひとつの検出器さえあれば多重染色の取り込みができる。</p>
between stacks		<p>スタック毎なので時間差が大きい</p>

II-4-2.新規に設定を登録する場合

1. Load Save Settings から、多重染色の設定 (FITC-TRITC など) を選択する。



2. Acquisition Mode にある Seq ボタンを押す。Sequential Scan パネルが表示される。



3. シーケンシャルのモードは、デフォルトは between line(ラインモード)になっているので必要に応じて変更する。


4. 1色目 (Scan1) の設定を作ります。

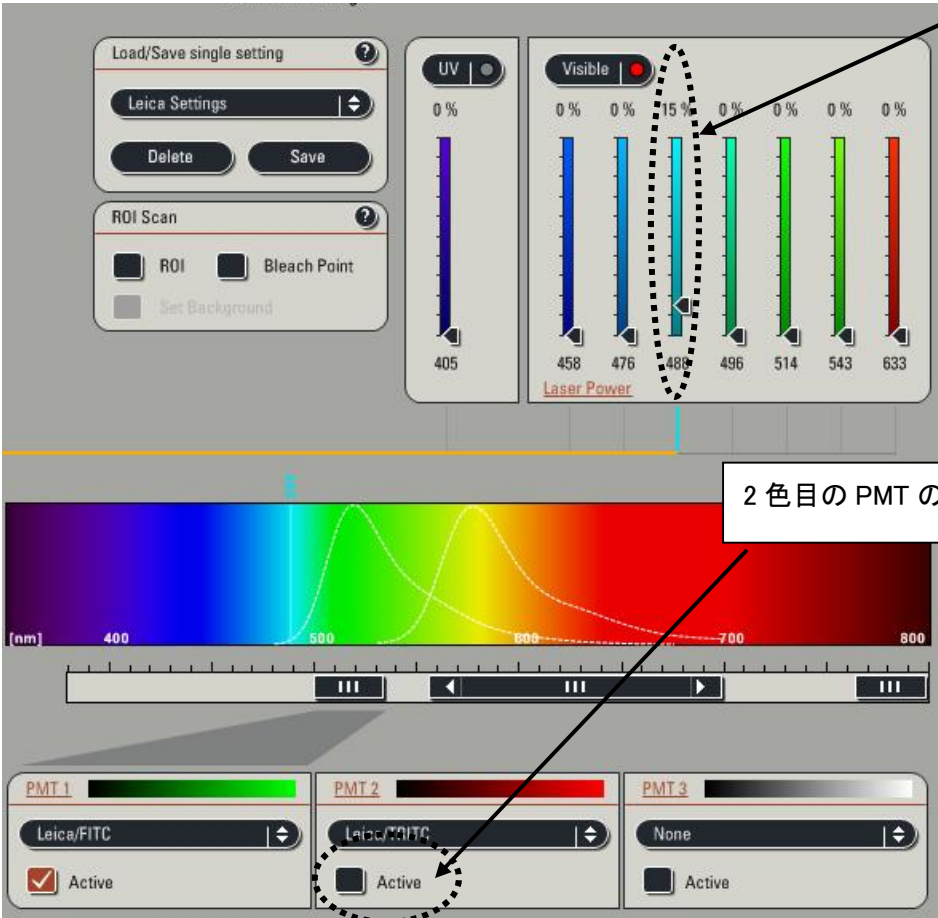
例) FITC-TRITC の設定の場合、条件は下記のようになります。

FITC: 488nm が ON、最初の検出器で FITC 蛍光の検出設定が行われている。

TRITC: 543 または 561nm が ON、2 色目の検出器で TRITC 蛍光が検出される設定となっている。

↓これを以下のように設定変更する

- ① Scan1 ボタン  を押してアクティブな状態とする
- ② FITC のみの励起設定にする→488nm のみが ON、それ以外の波長が全て 0% になるように設定し、検出器設定を FITC のみアクティブにし、それ以外の検出器は OFF にする。



The screenshot shows the software interface for configuring the microscope. At the top, there are buttons for 'Load/Save single setting' and 'ROI Scan'. The 'Visible' section shows a 'Laser Power' control with several sliders for different wavelengths: 405, 458, 476, 488, 496, 514, 543, and 633 nm. The 488 nm slider is set to 15%, while all others are at 0%. A callout box points to these sliders with the text: "488nm のみが ON、それ以外の波長 (ここでは 543 または 561nm) が全て '0%' にする". Below this is a spectral graph showing emission curves for FITC and TRITC. At the bottom, there are three PMT (Photomultiplier Tube) settings: PMT 1, PMT 2, and PMT 3. PMT 1 is set to 'Leica/FITC' and is checked as 'Active'. PMT 2 is also set to 'Leica/FITC' but is unchecked. A callout box points to the 'Active' checkbox for PMT 2 with the text: "2 色目の PMT の Active のチェックを外す".

- ③ フレームまたはスタックシーケンシャルを行う場合は、この設定で一度 Live ボタンを押して画像の明るさ等を確認し、488nm のパワー、Gain、Offset を決定する。(ラインシーケンシャルの場合はこのあとの 2 色目、3 色目の設定をした後でよい。)

5. 2色目の設定を作ります。

+ ボタンを押して、Scan2 ボタンが表示されアクティブになっている状態で、2 色目の設定を行う。

例) FITC-TRITC の場合


- ① Scan2 ボタン を押してアクティブな状態とする
- ② TRITC のみの励起設定にする → 543 (または 561) nm のみが ON、それ以外の波長が全て 0% になるように設定し、検出器設定を TRITC 用の検出器のみアクティブにし、それ以外の検出器は OFF にする。

488nm のレーザーパワーを“0%”にし、それ以外の波長(ここでは 543 または 561nm)のみが ON になっている状態とする。

一色目の PMT の Active のチェックを外す。

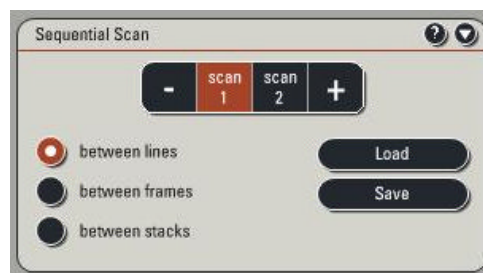
- ③ フレームまたはスタックシーケンシャルを行う場合は、この設定で一度 Live ボタンを押して画像の明るさ等を確認し、543, 561nm のパワー、Gain、Offset を決定する。(ラインシーケンシャルの場合はこのあとの 2 色目、3 色目の設定をした後でよい。)

6. 3色目以降の設定を作ります(3重染色以上の設定の時のみ)。

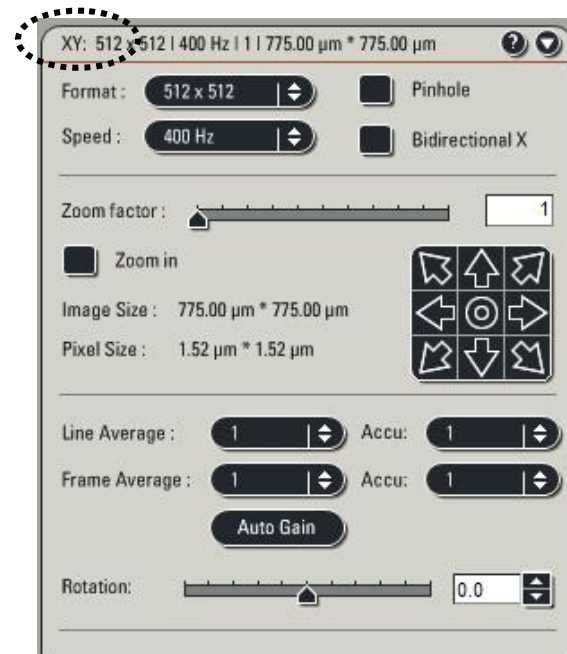
同様に+  ボタンを押して、Scan3の設定を行う。

7. ラインシーケンシャルモードの場合は、ここで Live ボタンを押し、それぞれの染色の画像の明るさ等を確認し、543,561nm のパワー、Gain、Offse を決定する。

8. 設定がよければ、ここで Seq の設定の登録を行う。
Save ボタンを押して、登録名を入力し、保存する。



ここで登録される内容は、波長や検出器の設定だけでなく、XY パネルの内容も同時に保存され、Load 時に再現される(Bidirectional X 以外)。

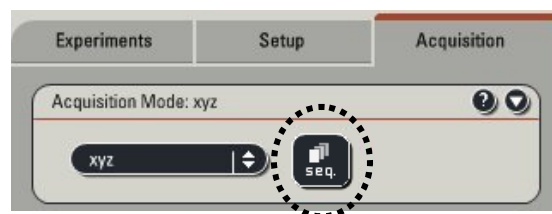


II-4-3.シーケンシャルスキャンを終了する場合

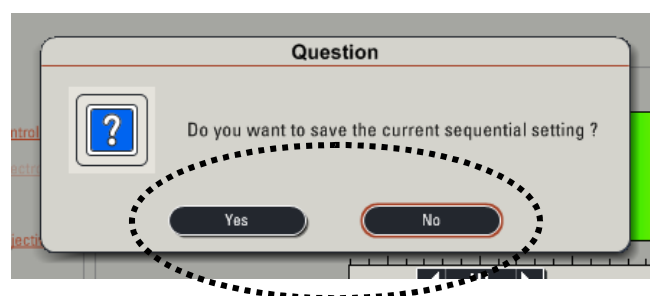
1. 赤色表示になっている Seq. ボタンを押します。



2. Seq. ボタンが赤色から黒色に反転し、「3.」項のとおりメッセージが表示されます。



3. 現在のシーケンシャルスキャンの設定を、保存するかどうかメッセージが表示されます。
Yes :シーケンシャルスキャンの撮影条件を保存してから終了する場合に選択してください。
No :シーケンシャルスキャンの撮影条件を保存せずに終了する場合に選択してください。



4. 以上の操作により、シーケンシャルスキャンが終了します。

II-5. 画像の保存

Experiments に表示されているデータが、現在 RAM メモリー上で展開しているデータを表示しています。これらは一時保管されているものであり、保存作業を行う必要があります。

画像の保存方法として、次の4つから選択できます。

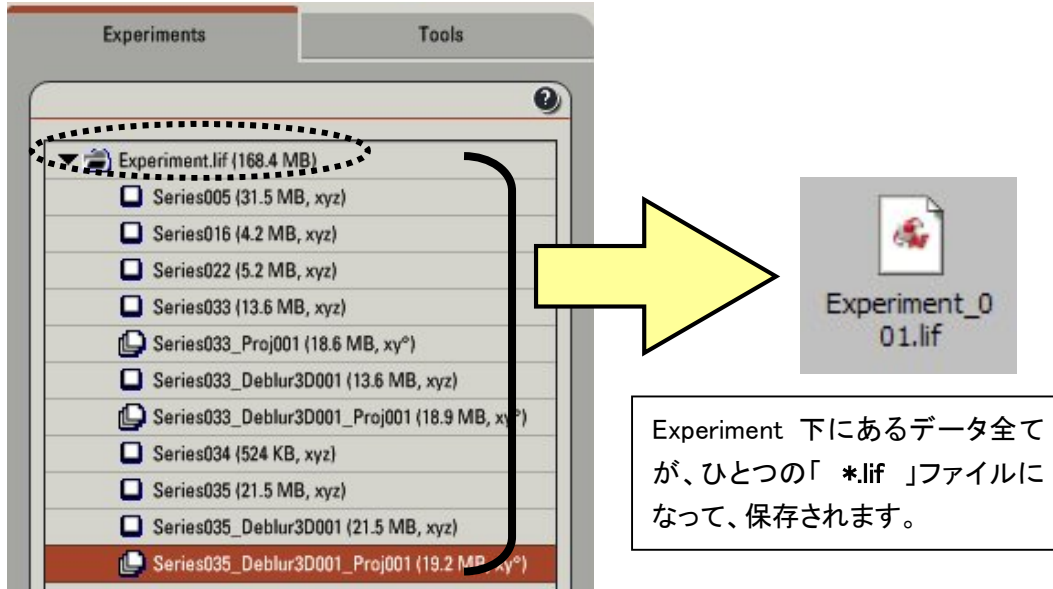
2~3 の保存データでは、SP5 での再解析は不可ですので、生データは“.lif”形式で保存してください。

1. **生データ Leica Image format “.lif” 形式で保存する。**
SP5のソフト LAS AF でデータを読み出すときの形式。
データはフォルダ毎の一括保存となります。
2. **汎用ファイル “.Tiff” または “.JPEG” 形式で保存する。**
データはフォルダ毎ではなく、個別のデータ毎の保存となります。
3. **Snapshot(画面ハードコピー)として保存する。Tiff や JPEG で出力可能。**
データはフォルダ毎ではなく、個別のデータ毎の保存となります。
4. **アニメーションファイル“.Avi” 形式で保存する。**
データはフォルダ毎ではなく、個別のデータ毎の保存となります。

1. 生データ Leica Image format “.lif” 形式で保存する。

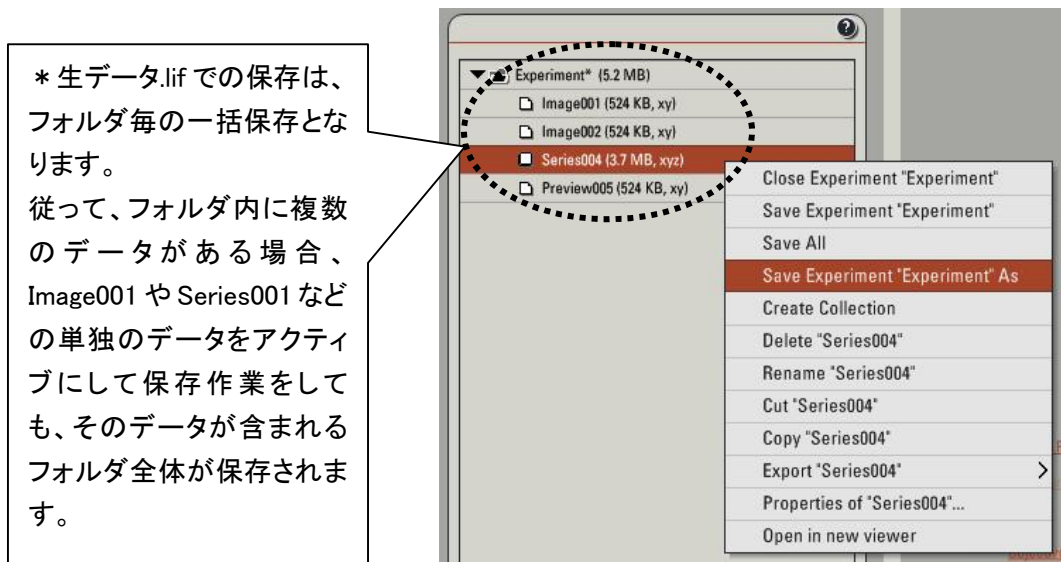
SP5のソフト LAS AF でデータを読み出すときの形式。

保存を行うと Experiment フォルダ内にあるデータが全て、ひとまとめになって一括保存されます。

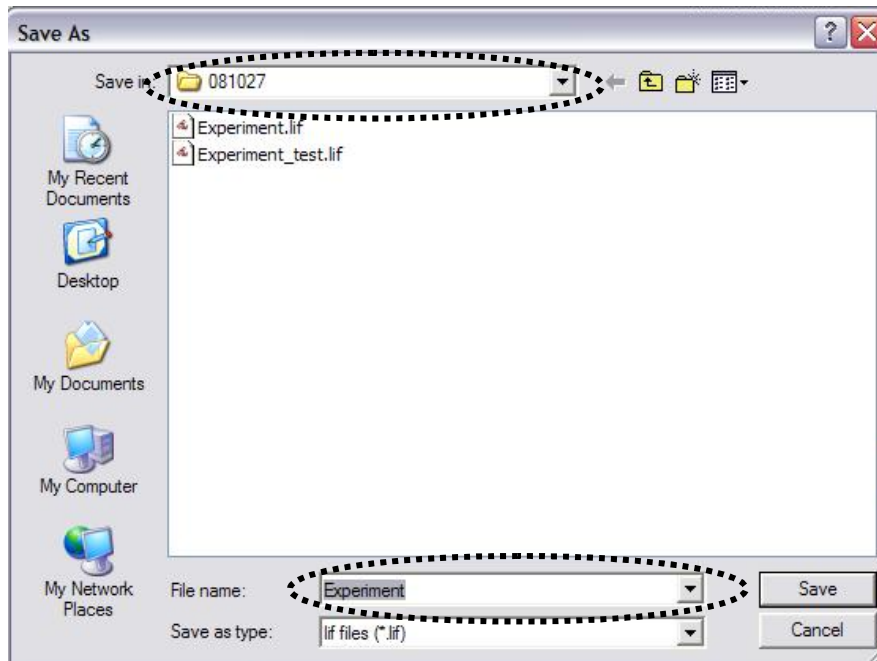


1-1. ”Save Experiment ‘Experiment’ As”を選択します。

保存したいデータが含まれるフォルダ内のデータのどれかをアクティブにし、マウス右クリックをし、”Save Experiment ‘Experiment’ As”を選択します。



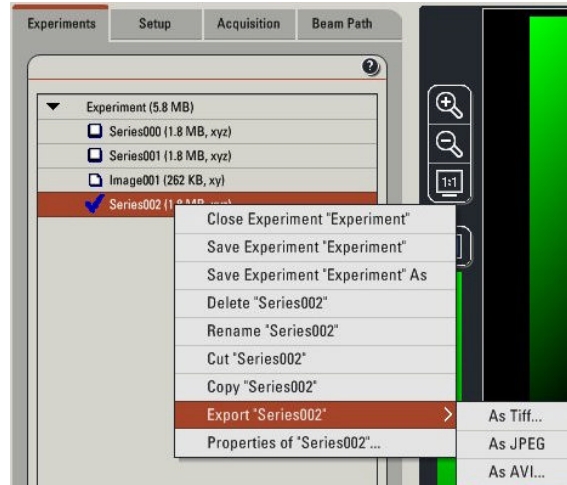
- 1-2. つぎのダイアログが開きます。
保存先とファイル名を決め、Save ボタンを押します。



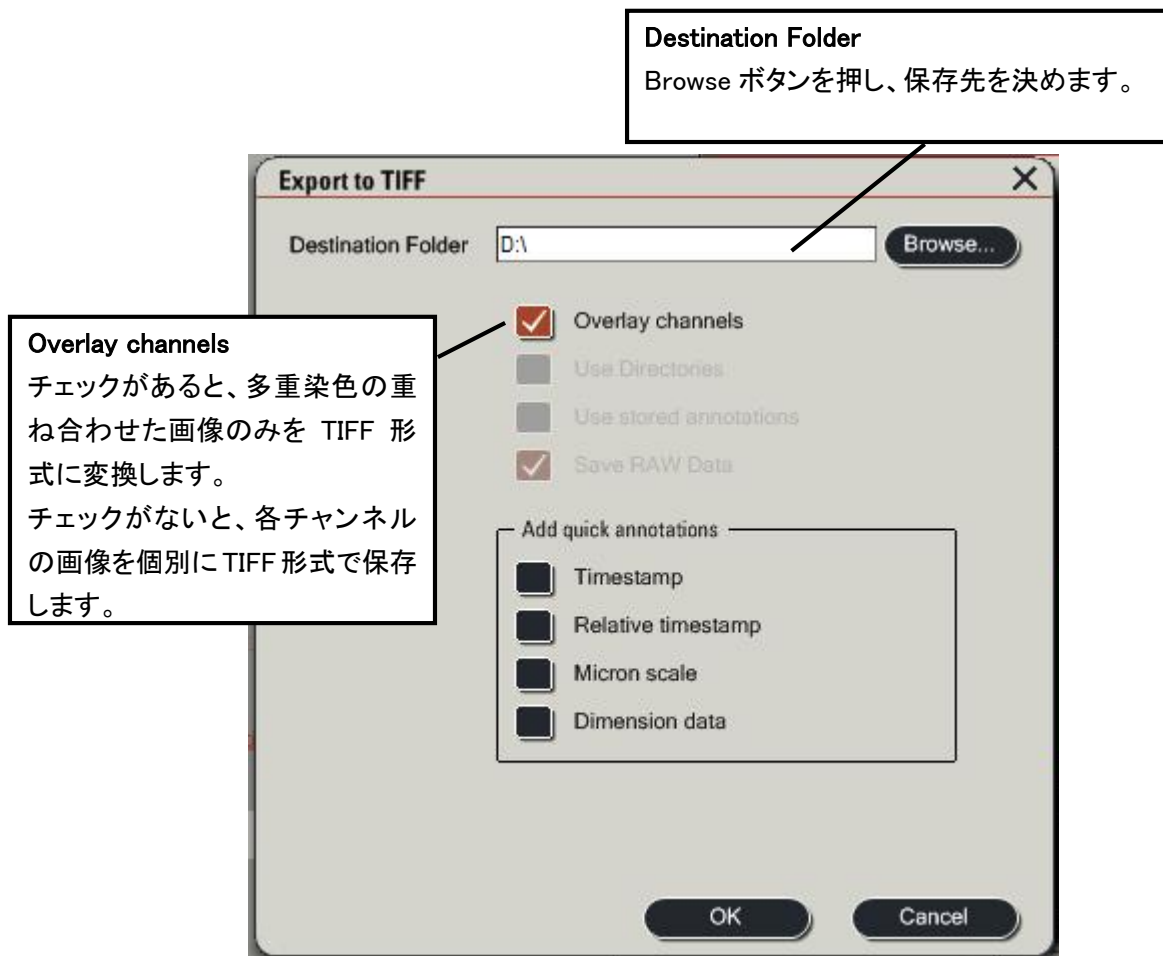
2回目以降の保存は、Experiment 上でデータを選択し、右クリックを押し、Save Experiment' OOOO 'を選択すると、上書き保存できます。

1. 汎用ファイル “.Tiff” または “.Jpg” 形式で保存する

- 2-1. 保存したいデータをアクティブにし、マウス右クリックをし、“Export ‘○○○’ ”を選択し、さらに、“As Tiff...” または、“As JPEG..”を選択します。



- 2-2-1. (TIFF を選択したとき)つぎのダイアログが開きます。
データの保存先を決め、OK ボタンを押します。



- 2-2-2. (JPEG を選択したとき)つぎのダイアログが開きます。

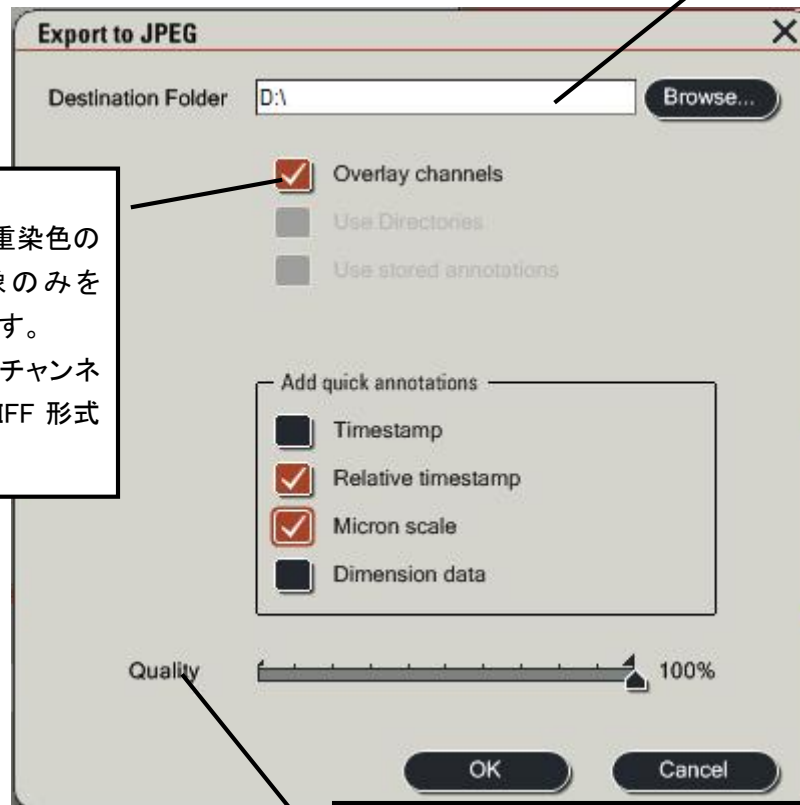
データの保存先を決め、OK ボタンを押します。

Destination Folder

Browse ボタンを押し、保存先を決めます。

Overlay channels

チェックがあると、多重染色の重ね合わせた画像のみを TIFF 形式に変換します。
チェックがないと、各チャンネルの画像を個別に TIFF 形式で保存します。



Quality

数値を小さくすると、画像が粗くなります。

2. Snapshot(画面ハードコピー)として保存する

モニターに表示している重ね合わせ画像などを保存します。Annotation Tool を用いて、コメントや矢印などを入れた状態でも保存可能です。モニターに表示されている画像数のままで保存されます。必要に応じて、ピクセル等倍表示ボタンを併用してください。

3-1. 保存したい画像上でマウス右クリックをします。

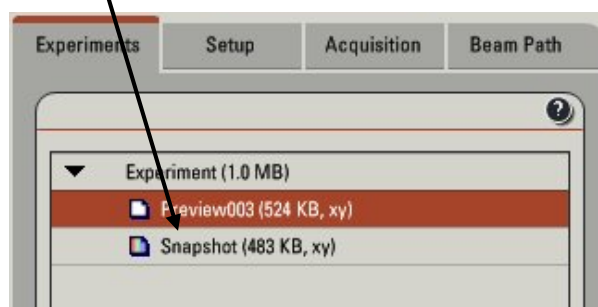
3-2. “Snapshot”または、“SnapshotAll”を選択します。



Snapshot : 画像上の選択した領域(白の破線で選択された領域)をスナップショットします

SnapshotAll : Viewer に表示されている画像をそのままスナップショットします

3-3. Experiment ダイアログに“Snapshot”または“SnapshotAll”画像が追加されます。

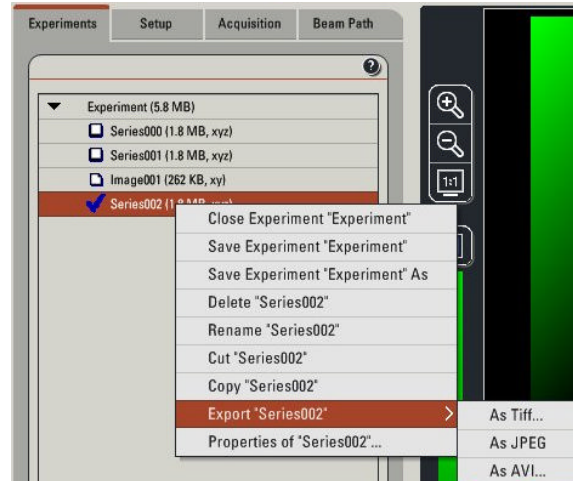


3-4. 保存します。

Snapshot データを右クリックし、Save Experiment” ○○○○“を選択し、上書き保存します。

3-5. 画像を出力します。

作製した Snapshot を選択し、アクティベートし、マウス右クリックをし、”Export ‘Experiment’ ”を選択し、さらに、”As Tiff...” または、”As JPEG..”を選択し、Export します。

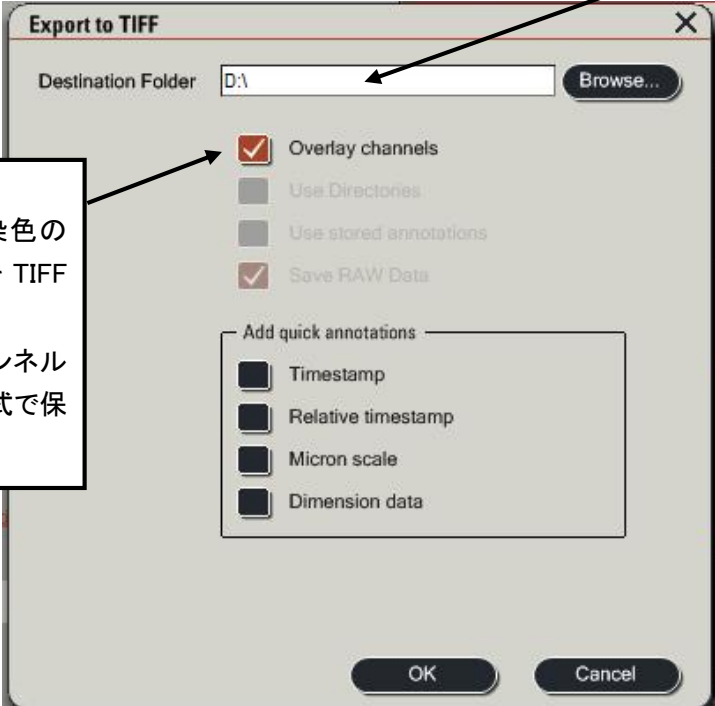


3-6-1. (TIFF を選択したとき) つぎのダイアログが開きます。

データの保存先を決め、OK ボタンを押します。

Destination Folder
Browse ボタンを押し、保存先を決めます。

Overlay channels
チェックがあると、多重染色の重ね合わせた画像のみを TIFF 形式に変換します。
チェックがないと、各チャンネルの画像を個別に TIFF 形式で保存します。



3-6-2. (JPEG を選択したとき) つぎのダイアログが開きます。
データの保存先を決め、OK ボタンを押します。

Destination Folder
Browse ボタンを押し、保存先を決めます。

Overlay channels
チェックがあると、多重染色の重ね合わせた画像のみを TIFF 形式に変換します。
チェックがないと、各チャンネルの画像を個別に TIFF 形式で保存します。

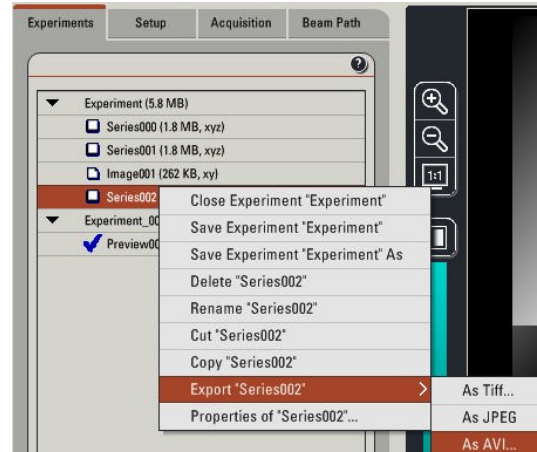
Quality
数値を小さくすると、画像が粗くなります。

The screenshot shows the 'Export to JPEG' dialog box. At the top, there is a 'Destination Folder' field containing 'D:\' and a 'Browse...' button. Below this are three checkboxes: 'Overlay channels' (checked), 'Use Directories' (unchecked), and 'Use stored annotations' (unchecked). A section titled 'Add quick annotations' contains four checkboxes: 'Timestamp' (unchecked), 'Relative timestamp' (checked), 'Micron scale' (checked), and 'Dimension data' (unchecked). At the bottom, there is a 'Quality' slider set to 100%, and 'OK' and 'Cancel' buttons.

4. アニメーションファイル“Avi”形式で保存する

4-1. データを Export します。

保存したいデータを反転させ、マウス右クリックをし、“Export ‘Experiment’ ”を選択し、さらに、“As Avi...” を選択します。



4-2. Export to AVI ウィンドウが開きます。

データの保存先を決め、OK ボタンを押します。

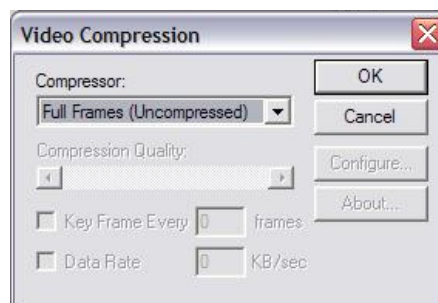
Frames/sec
画像のフレームレートを決めます

Overlay channels
チェックがあると、多重染色の重ね合わせた画像のみを TIFF 形式に変換します。
チェックがないと、各チャンネルの画像を個別に TIFF 形式で保存します。

Use Compression
チェックがあるときこの後(3-3.)で、データを圧縮するか聞かれます。チェックがないときはデータを圧縮しないで保存されます

4-3. ビデオの圧縮ウィンドウが開きます

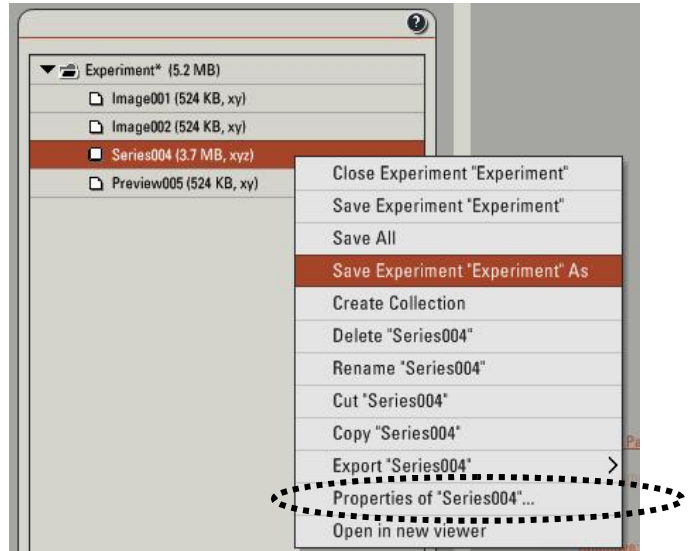
(Use Compression にチェックがあるとき)データを圧縮するかを決め、OK ボタンを押します。



5. 画像取得条件の確認

5-1. Properties を選択する

画像取得条件を確認したいデータのところで、マウス右クリックをし、Properties of “〇〇〇”を選択する。




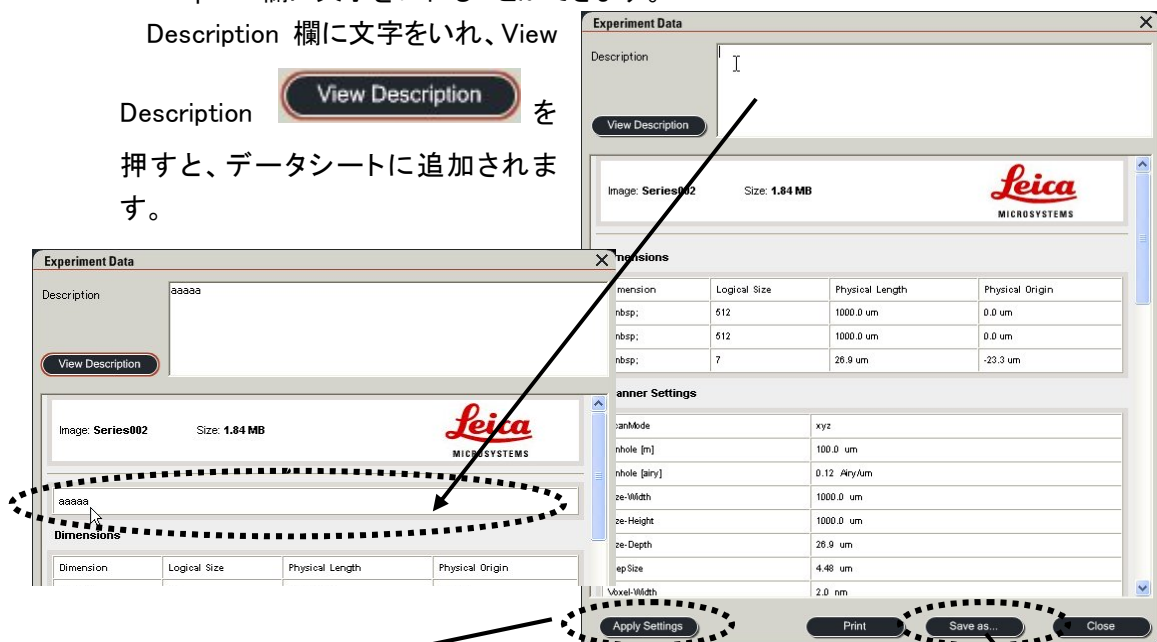
5-2. Experiment Data ウィンドウが開きます。

このデータシートから、画像を取得したときの条件がわかります。

5-3. Description 欄に文字をいれることができます。

Description 欄に文字をいれ、View

Description  を
押すと、データシートに追加されま
す。



ApplySettings

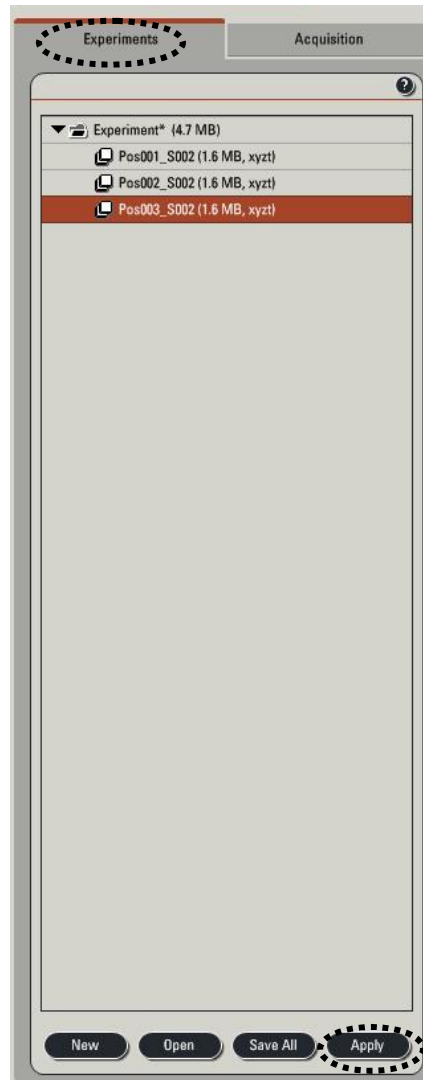
このデータを取得した時のセッティングに戻します。
レーザーパワー(AOTF)、PMT 感度、ピンホールサイズ、蛍光検出
幅が再現されます。(Experiment タブからも可→次項目)

Save As ボタンを
押すと、「*.xml」フ
ァイルとして、保
存することができます。

Apply Settings は、Experiment タブからも可能です。

該当データを取得した時のセッティングに戻します。

レーザーパワー(AOTF)、PMT 感度、ピンホールサイズ、蛍光検出幅が再現されます。



6. その他

experiments タグ内にあるデータを選択し、右クリックをすると、次のようなウィンドウが開き、個別のデータの保存、編集などが可能になります。



Close Experiment “ ○○○○ ” : ○○○○のフォルダ全体を閉じるときに使用します。

この作業は、単独のデータに対するものではありませんのでご注意ください。例えばフォルダ内に複数のデータが存在した場合、保存せずに閉じてしまうと、個別のデータ(例えば Series001 など)だけではなく、全てのデータが失われることとなります。

このとき、データが保存済みでなければ、保存するか否かの確認ウィンドウが表示されます。

Save Experiment “ ○○○○ ” : ○○○○のデータを追記して、保存するときに使用します。

Save All “ ○○○○ ” : 展開されている全てのフォルダの保存を行います。一つ目のフォルダの保存が終了すると、自動的に次のフォルダ用の保存用ウィンドウが表示されます。

Save Experiment “ ○○○○ ” As : ○○○○のデータに名前を付けて保存します。(詳しくは、「Ⅱ-4.取得画像の保存 1. Leica Image Format “.lif”形式で保存する」を参照。)

Create Collection:フォルダ内にフォルダを作成し、複数のデータをまとめることができます。

Delete “ ○○○○ ” : ○○○○のデータを削除します。

Rename “ ○○○○ ” : ○○○○のデータの名前を変更します。

Cut “ ○○○○ ” : ○○○○のデータを切り取ります。

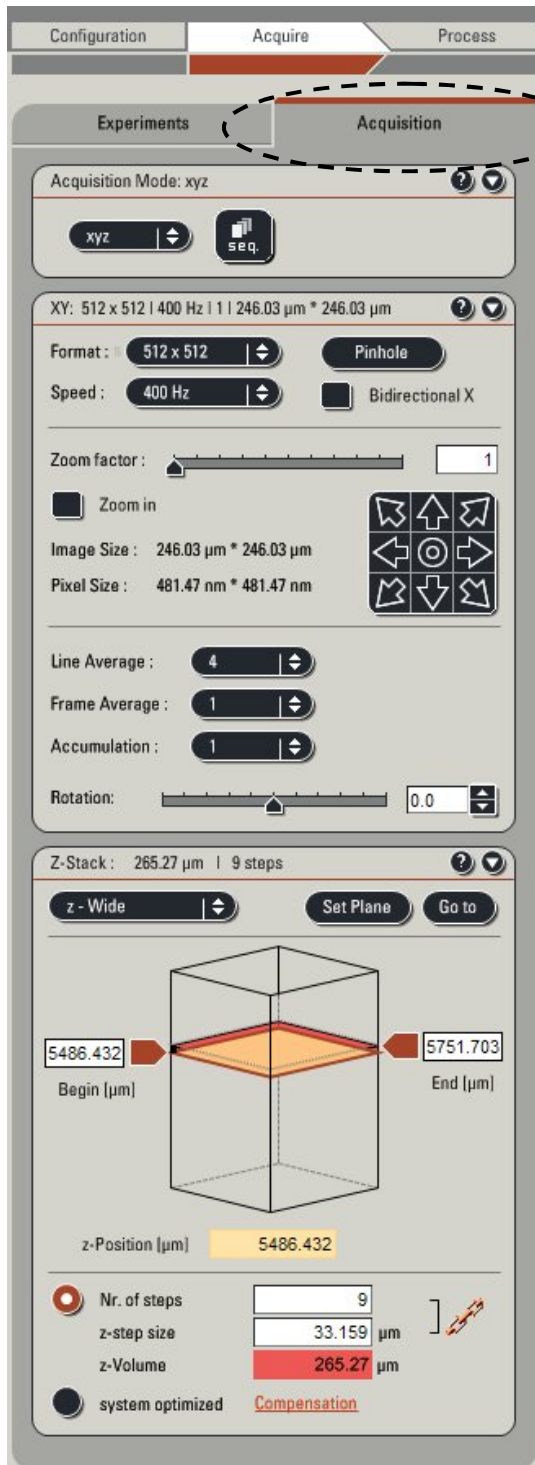
Copy “ ○○○○ ” : ○○○○のデータをコピーします。

Export “ ○○○○ ” : ○○○○のデータを TIFF や JPEG、AVI といったファイル形式にし、出力します。(詳しくは、「Ⅱ-4.取得画像の保存 2. 汎用ファイル “.Tiff”、または “.Jpg”形式で保存する」、及び、「Ⅱ-4.取得画像の保存 4. アニメーションファイル “.Avi”形式で保存する」を参照。)

Properties of “ ○○○○ ” : ○○○○のデータの取得条件などを確認します。(詳しくは、「Ⅱ-4.取得画像の保存 5. 画像取得条件の確認」を参照)

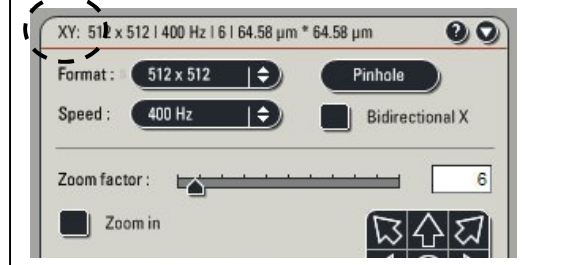
Open in New Viewer: アクティブにしたデータを、別のウインドウで表示します。

II-6. Acquisition タブについて




画像取得時のさまざまな設定を行うタブです。
使用するスキャンモード等によって、新規にパネルが Open/Close します。

パネル: XY、Z-Stack など機能ごとに分かれたメニューのこと。下図は「XY パネル」



以下、パネル毎に機能の説明を行います。

1. Acquisition Mode パネル : スキャンングの方法を指定します。

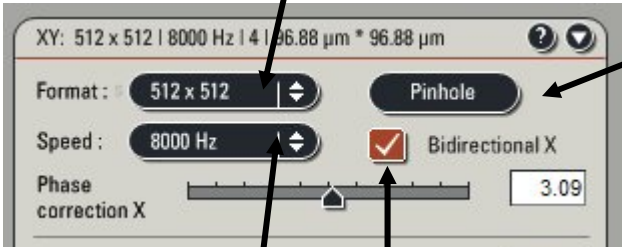


シーケンシャルを行うときに使用します。このボタンを押すと、Sequential Scan が追加されます。

スキャンモードを選択するときに使用します。

- xyz : xy面画像やxy面のz方向における連続画像を取得します
- xzy : xz面画像やxz面のy方向における連続画像を取得します
- xyt : xy面画像を時間軸方向における連続画像を取得します
- xyzt : xyz画像の時間軸方向における連続画像を取得します
- xzyt : xzy画像の時間軸方向における連続画像を取得します

2. XY パネル : スキャン条件を設定します。



Format
 スキャンングエリアを指定します。デフォルトでは、512 x 512 フォーマットになっています。また、More を選択すると、任意にサイズを指定できます。

Pinhole
 ピンホールの大きさを変更します

Speed
 スキャンングスピードを変更します。デフォルトで 400Hz に設定されており、More... を選択すると、1Hz 単位から設定可能です。

Bidirectional X
 双方向スキャンにします(高速スキャン)。

一方向
 双方向

Bidirectional の場合は、位相 (Phase; 左右の画像のずれ) の調整が必要になります。画面上のスライダーで調整するか、コントロールパネルのダイヤルに Phase の機能を割り当てて調整をしてください。(コントロールパネルの設定: 17 ページ参照。)

2. XY パネル(続き)

Zoom in
任意の場所指定してズームします。レゾナントの場合は使用できません。

Zoom factor
中心 Zoom を行います。コントロールパネルからも操作可能です。

現在の Zoom 倍率を表示しています。レゾナントの場合は 1.7 が最小ズームです。

Zoom をした状態で、スキャンングエリアを移動できます。Zoom が 1 倍のときは使用できません。

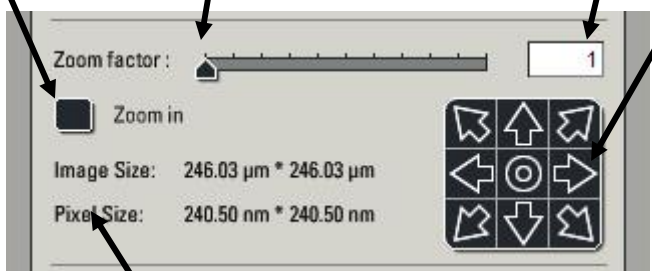
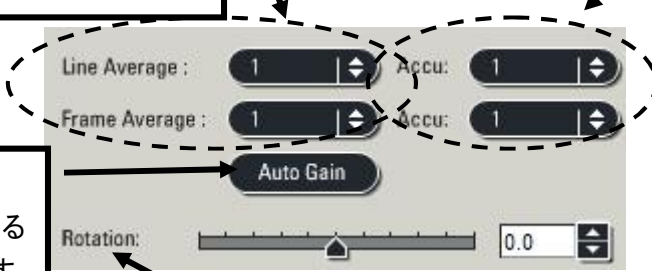


Image Size
スキャン領域の大きさ X 方向 * Y 方向 [μm]
Pixel Size
1 ピクセルあたりの大きさ X 方向 * Y 方向 [nm]

Average
画像取得時に行う平均の回数を指定します。

Accumulation
画像取得時に、行う画像の積算の回数を指定します。

Auto Gain
モニターに表示されている面の感度を自動調整します




Rotation : 取得画像の回転を行います。

Pinhole
ピンホールの変更をします。

Unit
ピンホールサイズの単位の変更を行います。

Airy1
ピンホールの変更を理論上の最適値に変更します。



3. Z-stack パネル: 連続断層画像を取得するときの条件を決めます。

Z-Stack :

Set Plane
ピント面の登録を行います。

Begin
連続断層画像の取得時に、画像の撮り始めの面を指定します。

End
連続断層画像の取得時に、画像の撮り終わりの面を指定します。

1245.62 Begin 1245.62 End

z-Position 1245.62

z-Position
現在のステージ位置

Nr. of steps
スライス数を優先して、連続断層画像の取得を行います

z-step size
ステージなどのステップ幅を優先して、連続断層画像を取得します。

z-Volume
BeginとEndで指定した間の厚さの絶対値

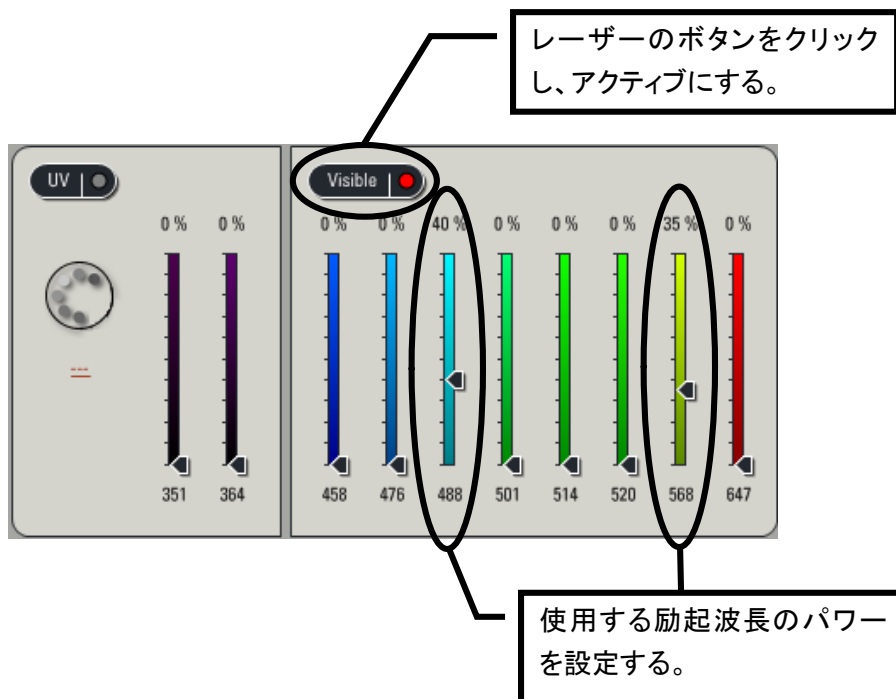
System optimized
システムの自動計算によるスライス数

system optimized

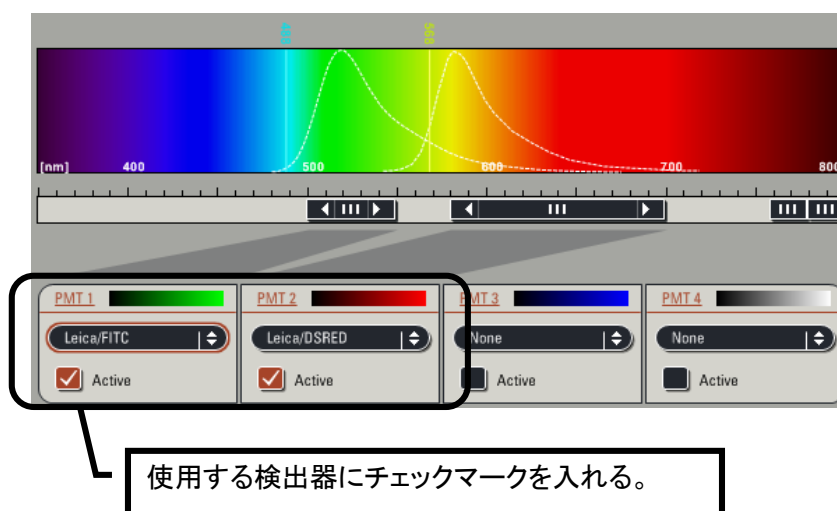
II-7. Beam Path Settings の新規登録

Beam Path Settings 上で、励起波長や検出器、ダイクロイックミラーなどの新しい組み合わせを設定し、Load/Save Setting に User Settings として名前を付けて登録します。

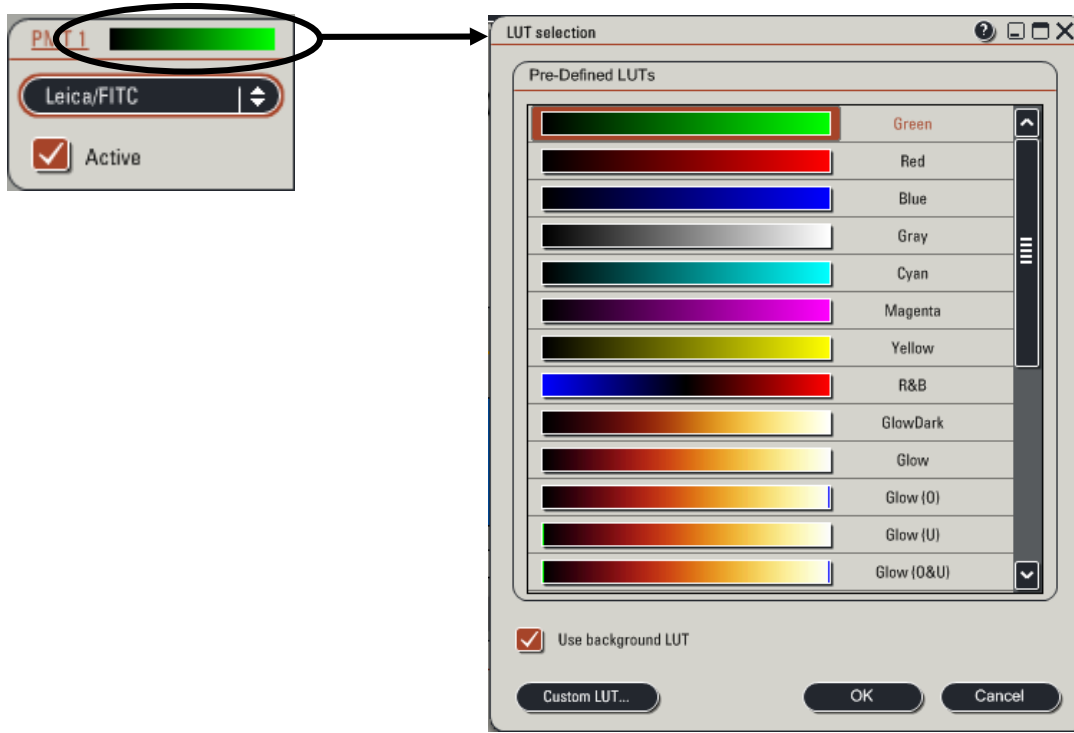
1. 使用する励起波長とパワーを、AOTF から設定します。



2. 使用する検出器を選択します。

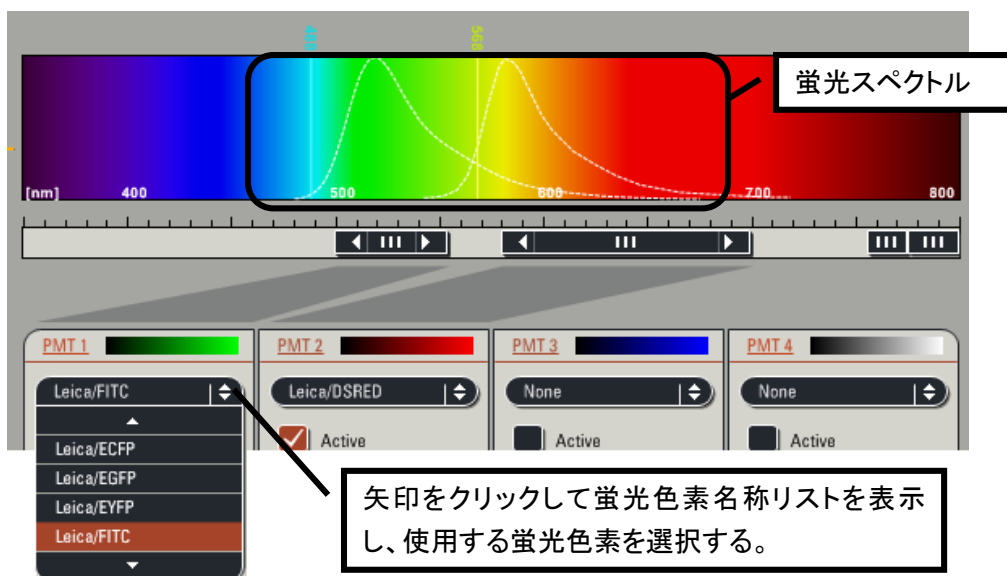


3. 検出器の設定ボックスのカラーバーをクリックして、擬似カラー一覧を表示し、使用する色を選択します。

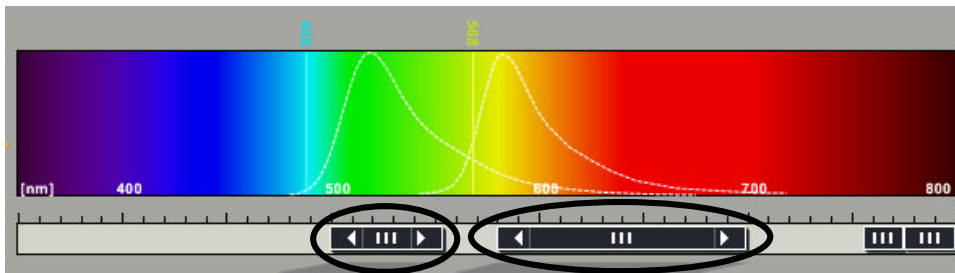


擬似カラー一覧

4. 蛍光色素名称リストから使用する蛍光色素の名称を選択し、蛍光スペクトルを表示します。

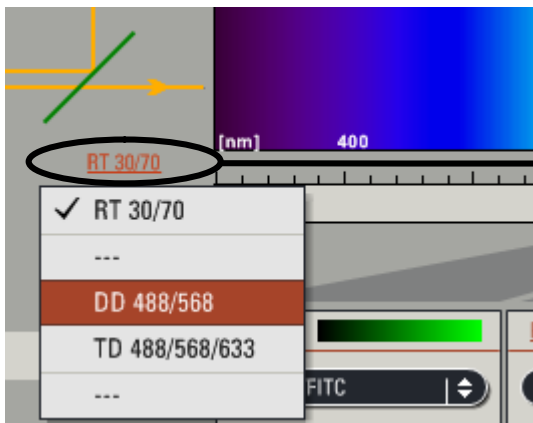


5. 各検出器の蛍光波長取り込み領域(スリット幅)を設定します。



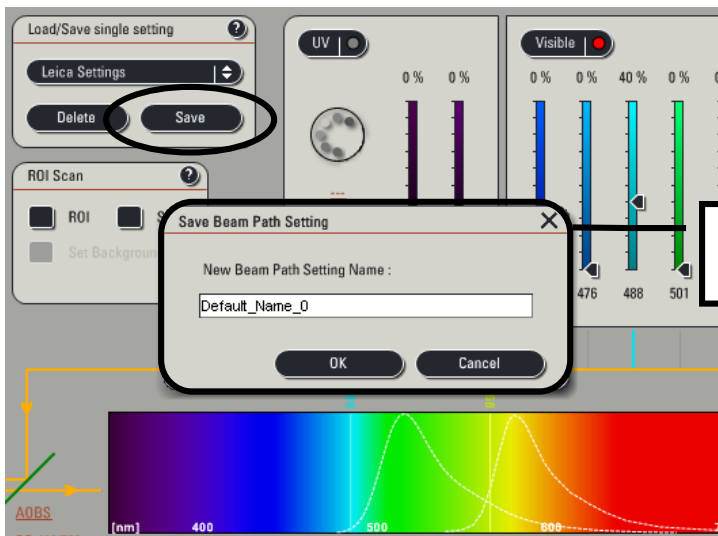
スリット幅を設定する。
※ダブルクリックで数値入力も可能。

6. ダイクロイックミラーを選択します。



名称をクリックして、使用するダイクロイックミラーを選択する。

7. 上記の新規設定を、「Save」ボタンから名前を付けて登録します。

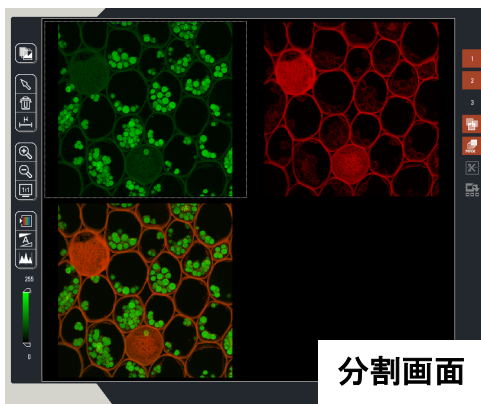
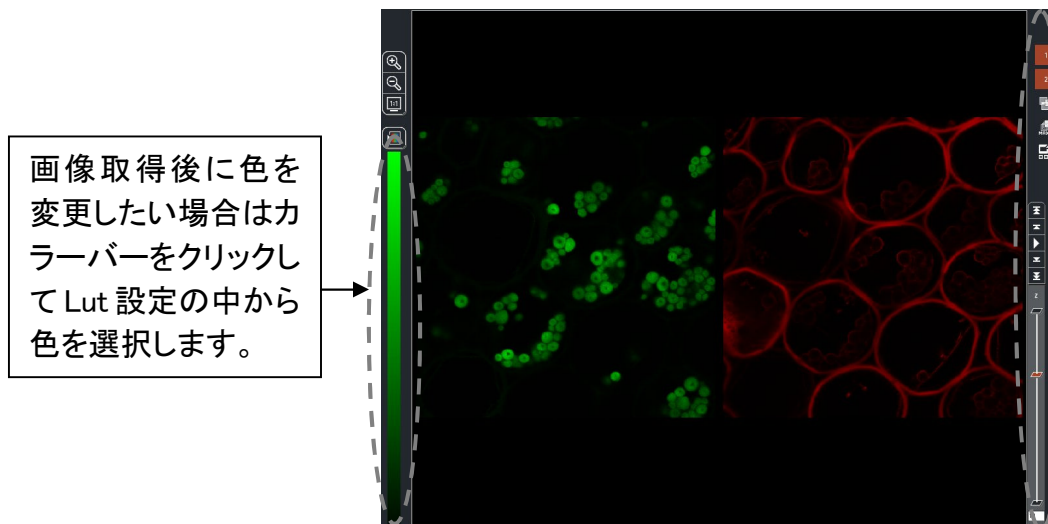


「Save」ボタンをクリックし、新規設定の名称を入力して「OK」ボタンを押す。

8. 登録内容を呼び起こして使用する場合は、Load/Save Setting の User Setting から名称を選択して使用します。

Ⅲ.Viewer について

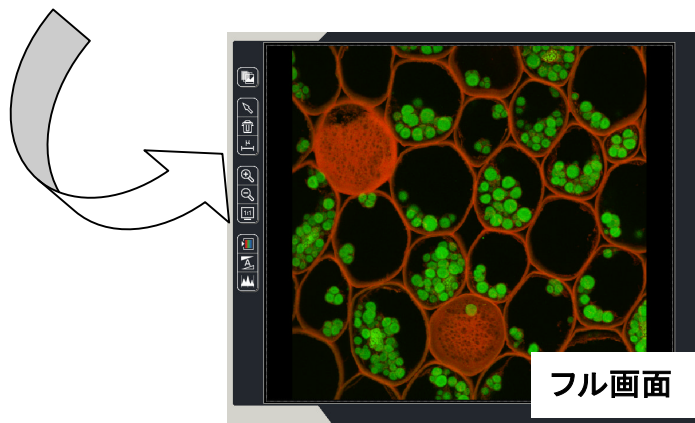
Viewer: 画像が表示されているウインドウを指します。画像の左右にあるボタンで、取得した画像の表示方法を変更などを行います。






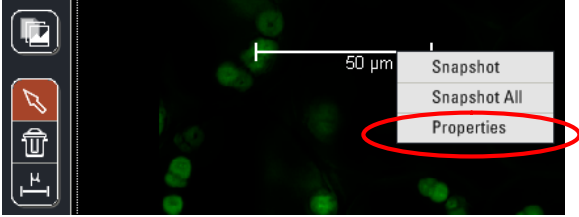




画像上でのダブルクリックで

分割画面⇄フル画面


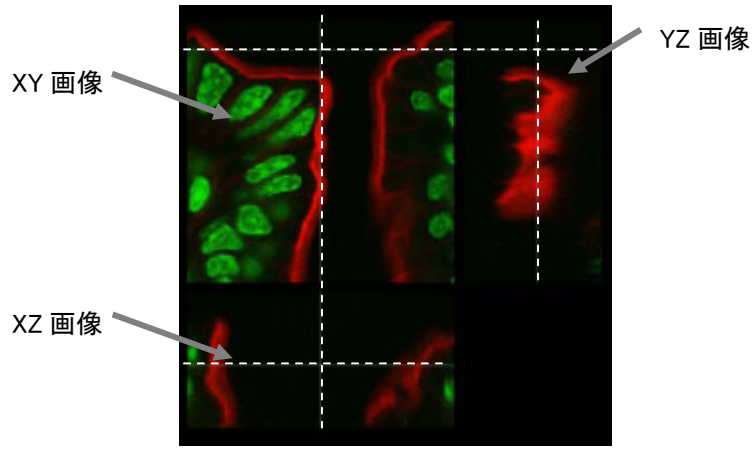

の表示を切り替えられます。


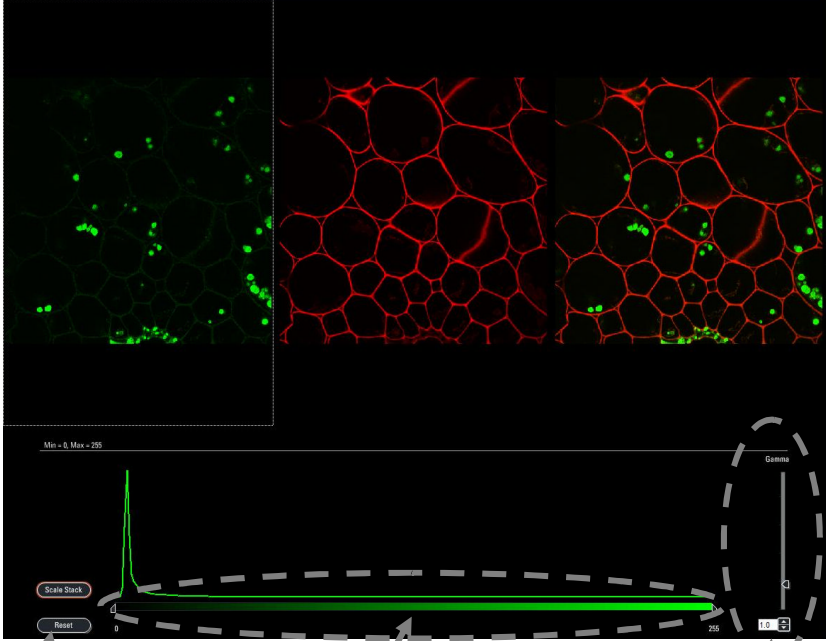









ボタンの機能

	<p>挿入した注釈を選択し、移動できます。</p>
	<p>選択した注釈などを削除します。</p>
	<p>スケールを挿入します。長さを計測できます。 スケールを選択後、マウスを右クリックして、“Properties”を選択し、長さを入力すると、任意スケールを作成できます。</p> 
	<p>画面表示拡大ボタン 取り込み画像を拡大します。</p>
	<p>画面表示縮小ボタン 取り込み画像を縮小します。</p>
	<p>画面表示切替ボタン 取り込み画像を1:1表示にします。デフォルトで、Viewer の大きさに合わせた表示になっています</p>
	<p>Quick Look Up Table ボタン ボタンを押すと、Grow Over/Under→Gray→Original と表示が変わります。</p>

	<p>Original</p> <p>Grow over/under</p> <p>Gray</p>
<p>1</p> <p>2</p>	<p>検出器の表示切替ボタン</p> <p>赤くなっているチャンネルの画像を表示します。そのチャンネルの画像を非表示にしたい場合はクリックして黒い状態にします。</p>
	<p>Overlay 表示ボタン</p> <p>複数チャンネルでの取り込み(多重染色)のとき、重ね合わせ表示を行います。再度、ボタンを押すと、解除されます。</p>
	<p>Maximum projection ボタン</p> <p>連続断層像の画像の重ね合わせを行います。連続断層像方向に最高輝度のシグナルのみをつなぎ合わせて1枚の画像を合成します。サンプルの構造を観察する場合に使用するための重ね合わせ機能です。</p> <p>Direction of view</p> <p>Intensity</p> <p>Intensity Maximum</p>
	<p>ギャラリー表示ボタン</p> <p>連続画像をギャラリー表示します。</p>

	<p>Orthogonal Sectioning 3D データの XZ、YZ 断面を表示します。</p> 
	<p>Auto Contrast ボタン 自動で、取得した画像のコントラストをチャンネルごとに調整を行います。</p>

	<p>Contrast 調整ボタン コントラストやガンマレベルの調整を行うときに押すボタンです。</p>  <p>Reset ボタン。ひとつ前の状態に戻ります</p> <p>コントラスト調整</p> <p>ガンマレベル調整</p>
	<p>連続断層画像の先頭ページを表示する。</p>
	<p>前ページを表示する。</p>
	<p>連続断層画像を動画で再生。</p>
	<p>次ページを表示する。</p>
	<p>連続断層画像の最終ページを表示する。</p>
	<p>連続断層画像の動画再生時のリピート機能。巻き戻し無し、常に先頭ページからのリピート。</p>
	<p>連続断層画像の動画再生時のリピート機能。巻き戻しのリピート。</p>

IV. スキャンバリエーション

1. TimeLapse(経時変化取り込み)

2. Lambda Scan

3. Z 方向に強度の補正をしながら Scan する

4. ROI Scan(任意エリアのスキャン)

5. Live Data Mode(高度なタイムラプス)(*オプションソフト)

6. スキャンングステージ使用法(Tile Scan、多点タイムラプス)

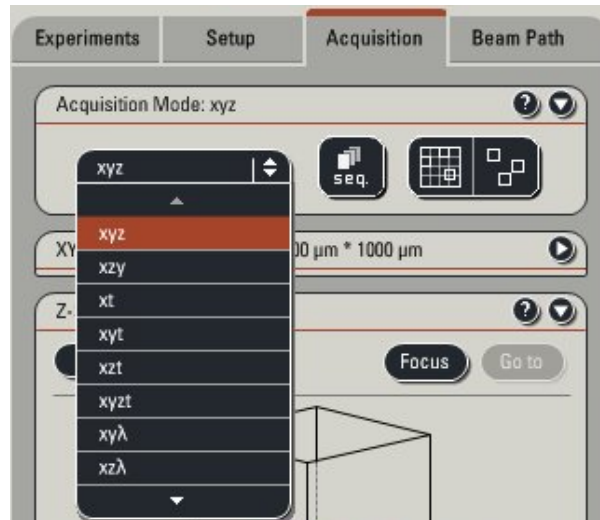
1. TimeLapse (経時変化取り込み)

1. xyt、xyztの選択

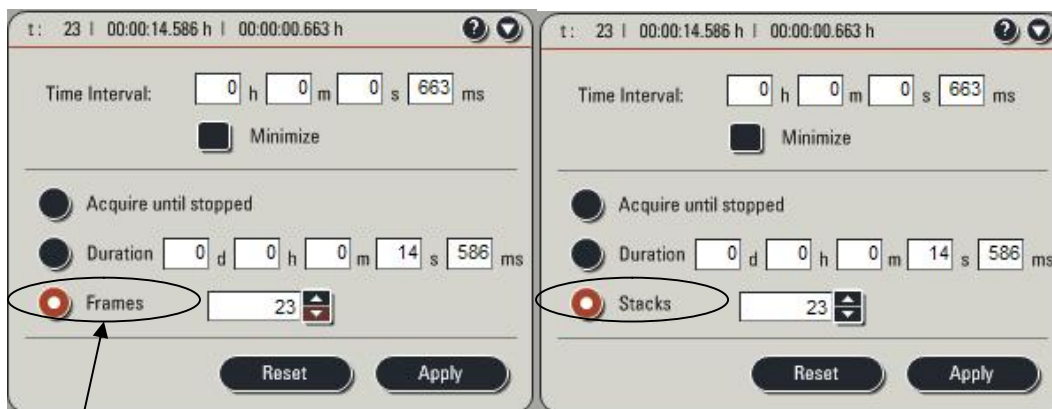
Acquisition Mode から XYt、XYZt を選択します。

xyt : XY 画像 (通常の平面画像) の TimeLapse スキャン

xyzt : XYZ 画像取り込みの TimeLapse スキャン



下図のタイムラプス用パネルが開きます。




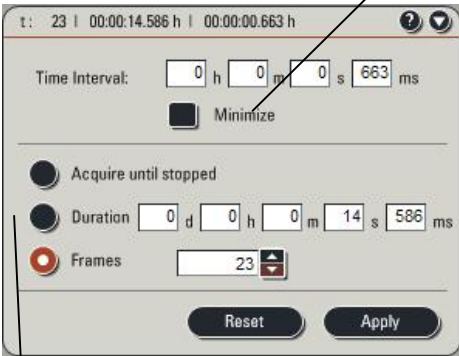
この項目は、XYT の時は Frame、XYZT の時は Stack となります。
(XYZT のときは Z Stack パネルで Frame 数を決める)

2. 画像の調整

画像の調整は、「Ⅱ. 基本操作」を参考にしてください。


3. 時間軸方向の取り込み条件を設定

時間軸方向の取り込み条件を設定し、Accept  ボタンを押します。

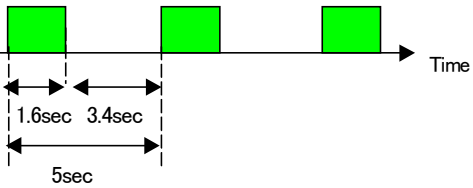



Time Interval
 スキャンの時間を入力します。

Minimize Minimize にチェックを入れると、常にスキャンをしている設定になります。



例えば1フレームの取得に1.6秒かかる場合で、5秒置きに画像を取得したい場合、ここに 5s0ms と入力すると、1枚撮り終わった後3.4秒待機し2枚目を取り込む設定になります。



Scanning のパターンは、次の3つの方法があります。  が Active になっています

Acquire until stopped

画像取り込み開始後、指定した条件で画像の取り込みを続けます。Stop ボタンを押すまで、画像取り込みを行う設定になります。


Duration

画像取り込み時間を設定します。

Frames / Stacks

XYtモードのときは、画像を取り込む枚数を、XYZtモードのときは、Z スタックを取り込むスタック数を設定します。

4. データ取得の開始

Start  ボタンを押します。上記までに設定された条件で画像の取得を行います。画像の取り込みが終了しますと、自動的にレーザーが止まります。この状態では、取得した画像は保存されていません。必要に応じて、画像の保存を行ってください。

2. Lambda Scan

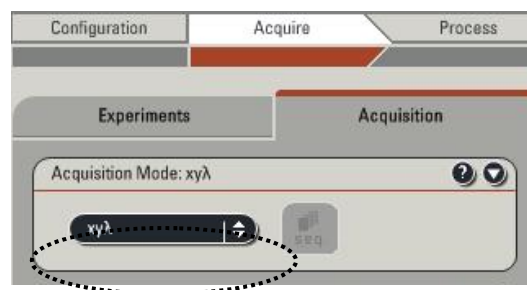
Lambda Scan は、スリットの幅を波長方向に少しずつ、変更し、その蛍光のスペクトルを取得する方法です。また、このときに取得したスペクトルを用いて、蛍光スペクトルを元にし、近接した波長の分離を行うことができます。

1. まず、Live ボタンで画像の取り込みを行う

視野、ピント等をおおよそ合わせます。

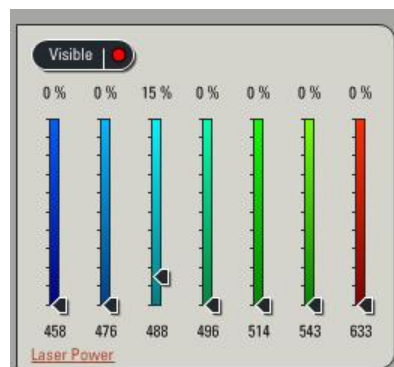
2. XYλ、または XYZλ を選択

Acquisition Mode から、XYλ、XYZλ を選択します。



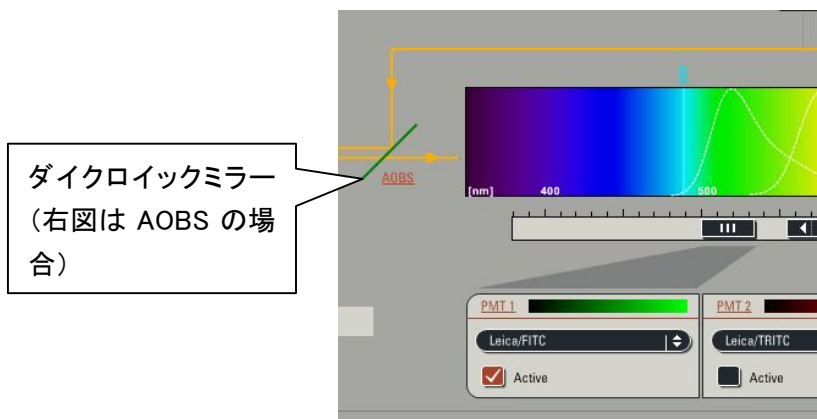
3. 励起光の設定

必要な励起光及びパワーを設定する。(下図は 488nm を 15% に設定した例。)



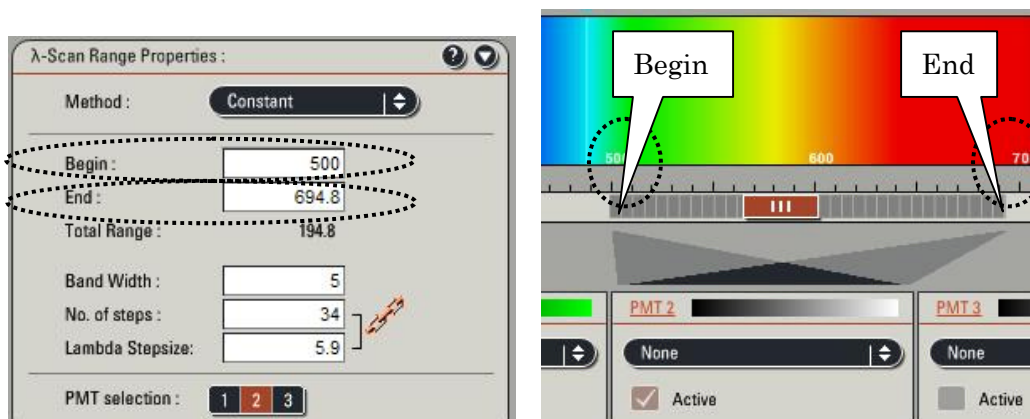
4. ダイクロイックミラーの設定(AOBS(オプション)の場合は設定の必要無し)
使用する励起光に応じて設定する。

使用する励起光	使用するダイクロイックミラー
405nm	Substrat
458nm	RT30/70
488nm	RSP500
514nm	DD458/514
543nm	DD488/543
561nm	DD488/561
594nm	DD488/594 または TD458/514/594
633nm	TD488/543(または 561)/633

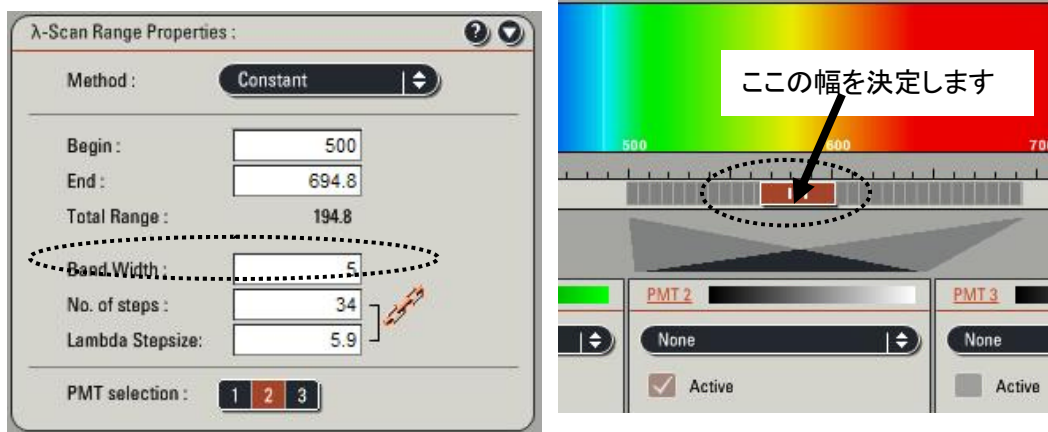


5. スペクトルの取得範囲を設定します

取得をはじめる波長 (Begin)、及び、取得を終わらせる波長 (End) を数値入力します。



6. 蛍光検出波長域 (Band Width) の設定



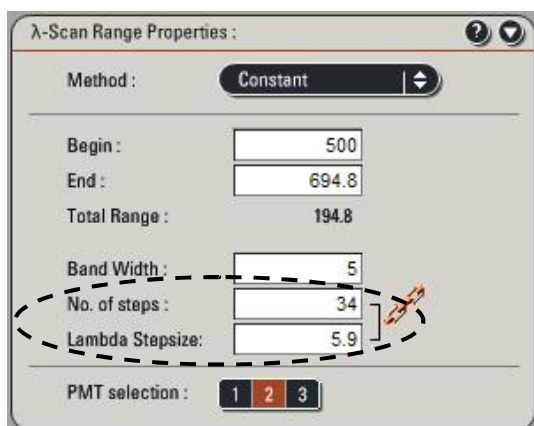
最小 5nm まで蛍光検出波長域を狭めること(=>波長方向の分解能の向上)ができます。
ただ、検出波長域を狭くすることで、画像の取得を行いにくくなるため、そのような時は、検出波長域を広げて、測定します。

7. 画像の取り込み枚数の指定

No. of steps、または、Lambda Stepsize のどちらかの方法で画像取得を行うかを決め、数値入力します。最小ステップサイズは3nm です。

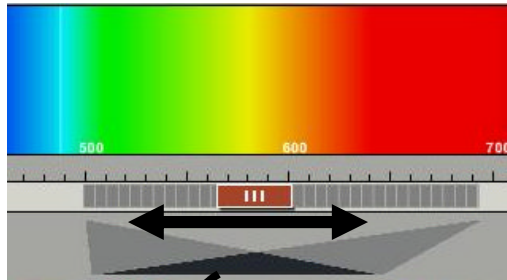
No. of steps: Begin と End の間を何枚取得するかを優先して、画像を取得します。

Lambda Stepsize: 波長方向のステップサイズを優先して画像を取得します。



8. 感度調節

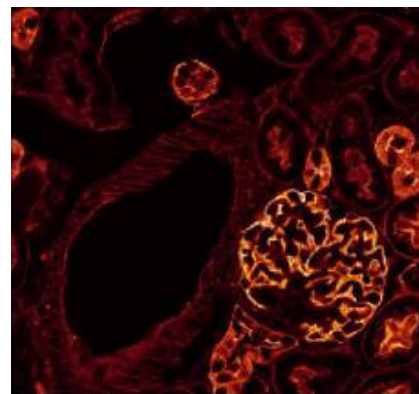
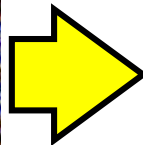
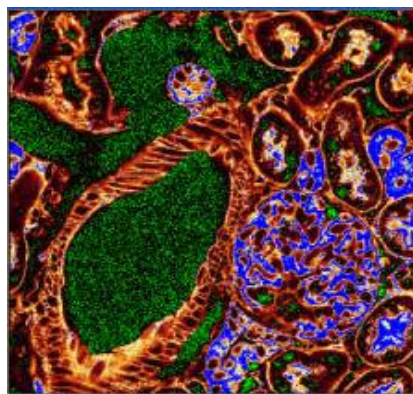
Live ボタンを押し、スキヤニングを行った状態で、狭めた蛍光検出波長域のブロックを波長方向に左右に動かし、最も画像が明るくなる波長域(蛍光が最も強くなる波長域)で、感度を設定する。(その場所の明るさが飽和(サチュレーション)しないように設定する)




蛍光検出波長域ブロックを動かし、最も感度の高い領域を探す。

一度ブロックをクリックした後は、マウスのホイール、キーボードの←→キーでも移動可能です。

感度調節を行う



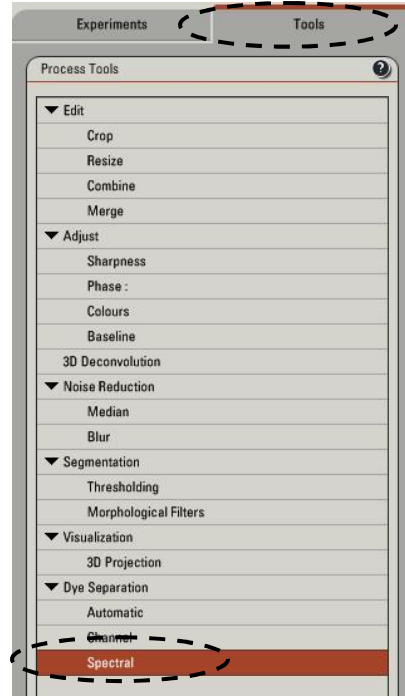
9. データ取得の開始

Start  ボタンを押します。上記までに設定された条件で画像の取得を行います。画像の取り込みが終了しますと、自動的にレーザーが止まります。この状態では、取得した画像は保存されていません。必要に応じて、画像の保存を行ってください。

10. スペクトル情報をグラフ化

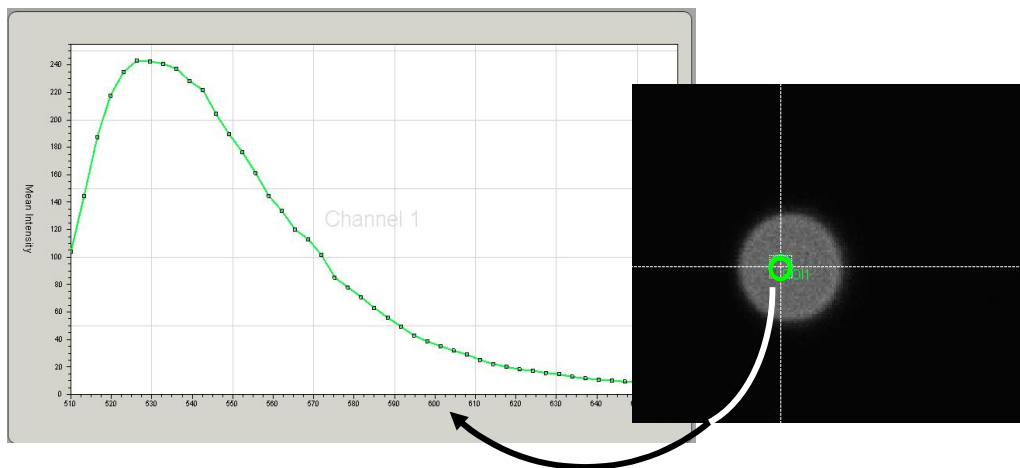
10-1. Process メニューを開く

Tools タブの Dye Separation の Spectral を
選択します



10-2. Viewer にある ROI を動かし、スペクトルを表示します。

ROI で指定している場所のスペクトルデータが左側のモニターに自動的に表示されます。



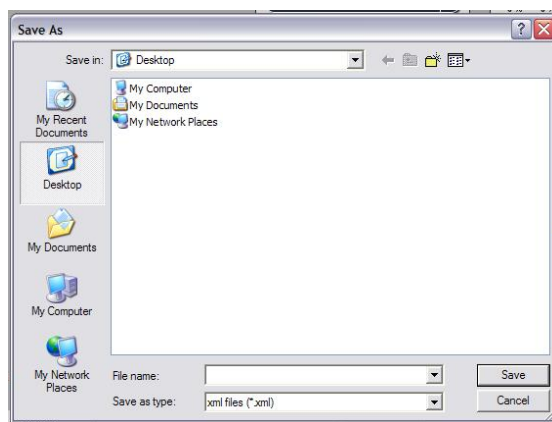
10-3. グラフデータの抽出

グラフデータを Excel ファイルとして保存できます。

10-3-1. グラフ上で右クリック → Export → Excel を選択する。



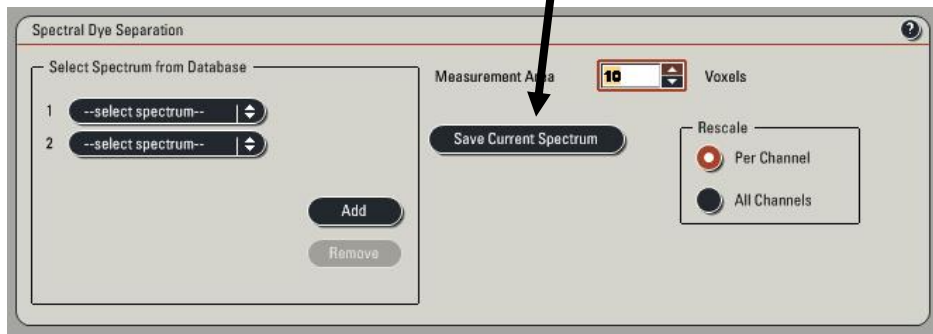
10-3-2. 名前を付けて保存する。



11. スペクトルデータの登録

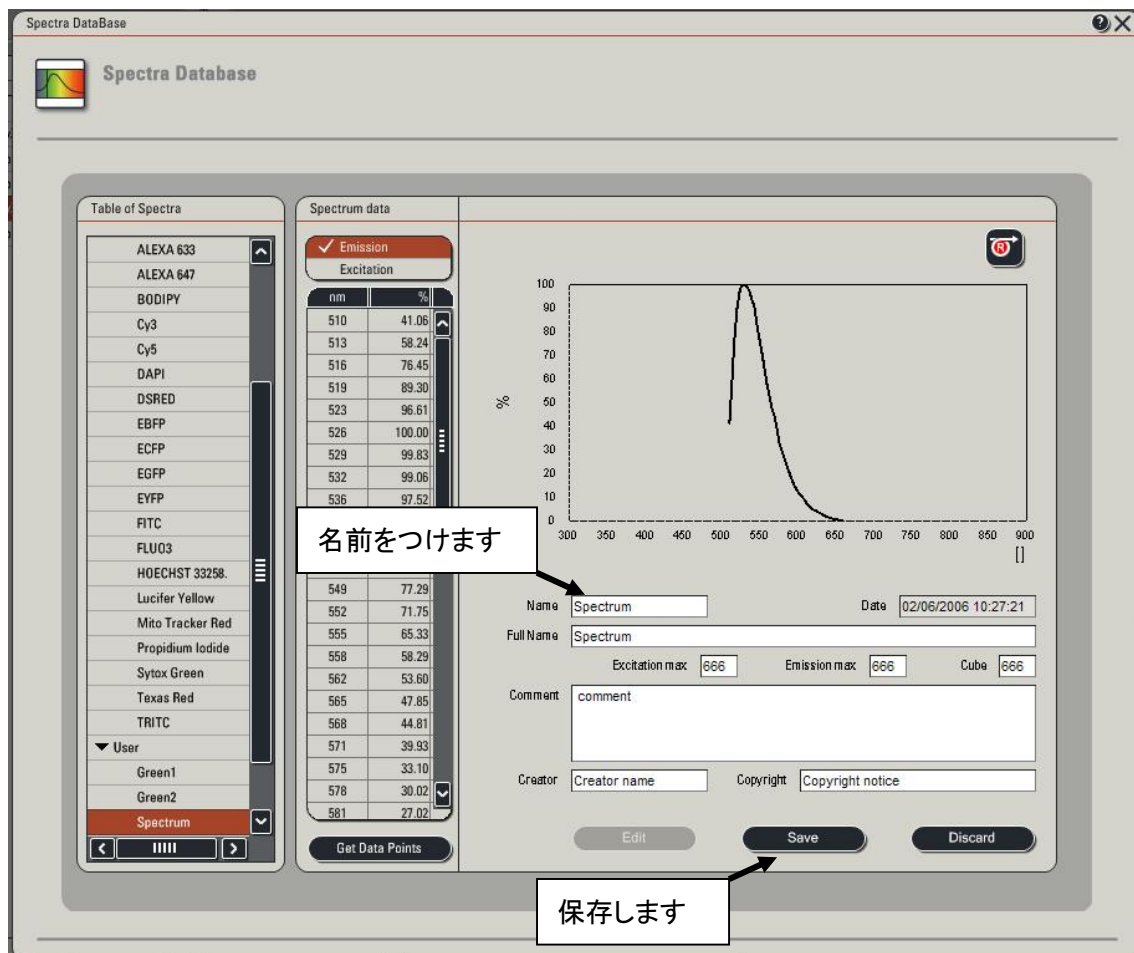
11-1. Save Current Spectrum を押す

スペクトルデータの保存を行うときは“Save Current Spectrum”を押し、Spectra DataBase ウィンドウを開きます。



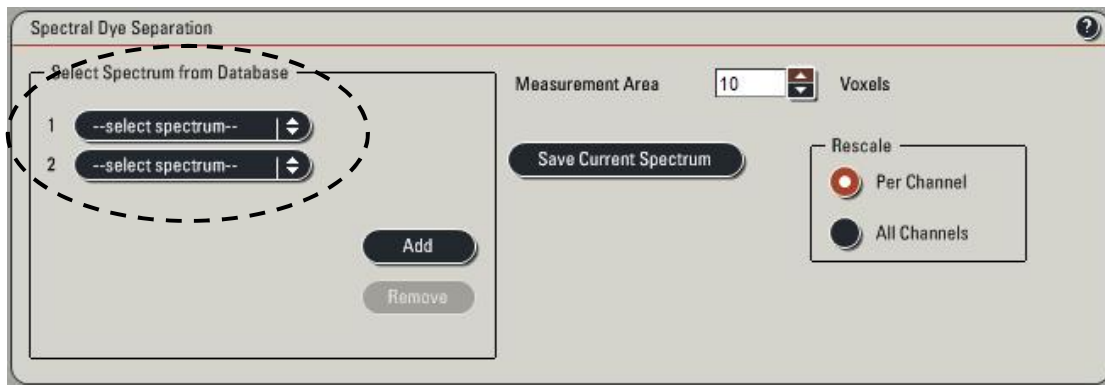
11-2. 保存します

名前を付けて、保存します



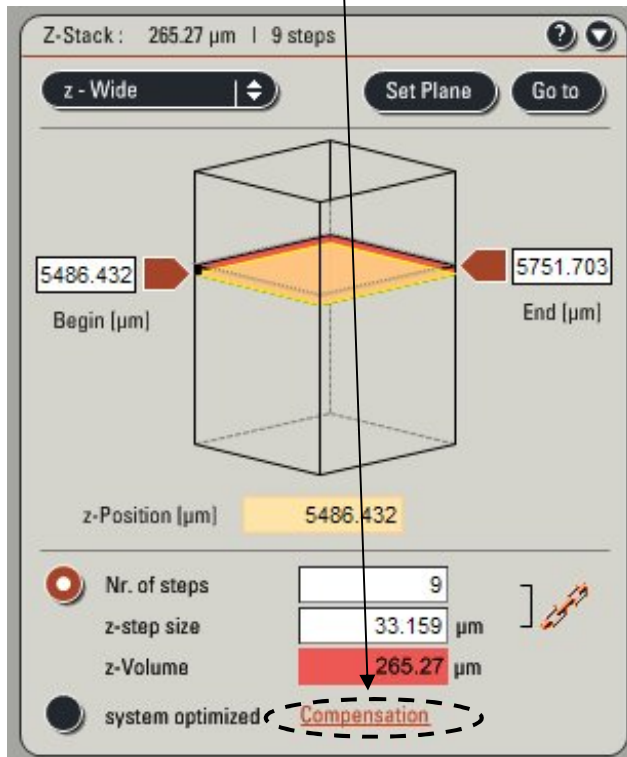
12. スペクトルデータからの蛍光の分離

Select Spectrum from Database の Select spectrum から、使用した蛍光色素を選択します。Apply ボタンを実行します。このとき、1で選択したものを緑色で表示し、2で選択したものを赤で表示します。

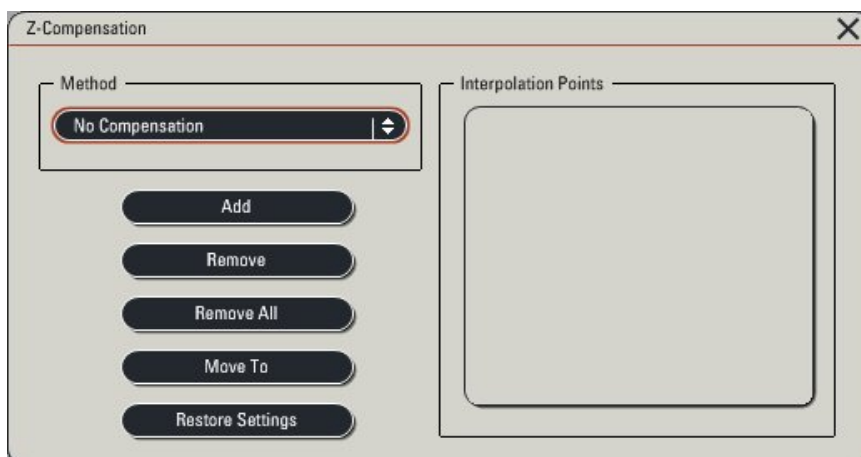


3. Z 方向に強度の補正をしながら Scan する

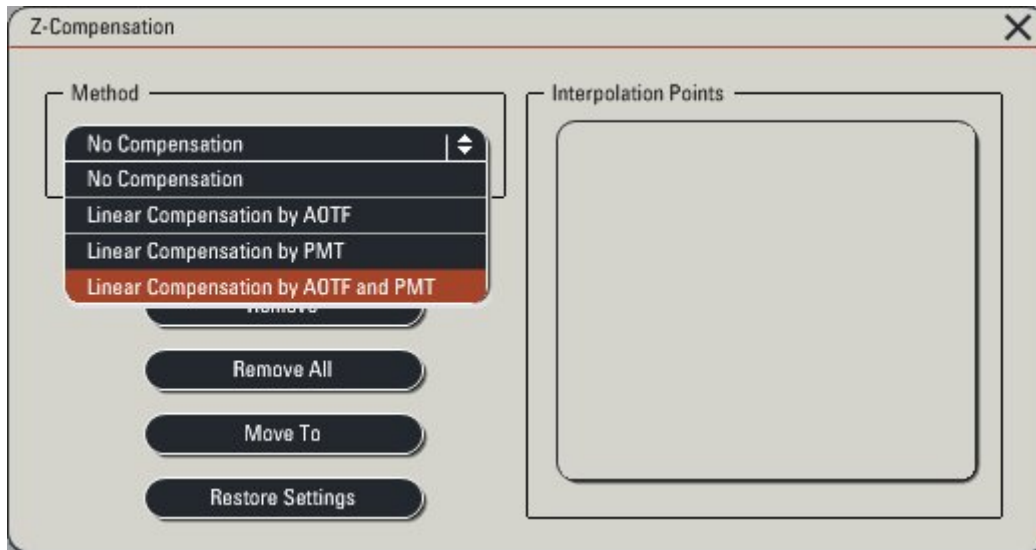
① Z-Stack パネル上の Z-Compensation をクリックする。



以下のウィンドウが開く。



②Method がデフォルトでは No Compensation になっているが、以下のいずれかを選択する。



No Compensation:

補正無し

Linear Compensation by AOTF:

AOTF(照射するレーザー強度)を変更することにより補正する

Linear Compensation by PMT:

PMT(検出器の電圧)を変更することにより補正する

Linear Compensation by AOTF and PMT:

AOTF と PMT の両方を同時に変更することにより補正する。

以下、Linear Compensation by AOTF and PMT のモードで説明します。

③Begin./End のポジションを決める時に、それぞれの Z 位置で最適と思われる AOTF 強度、PMT 電圧を変えて設定する。

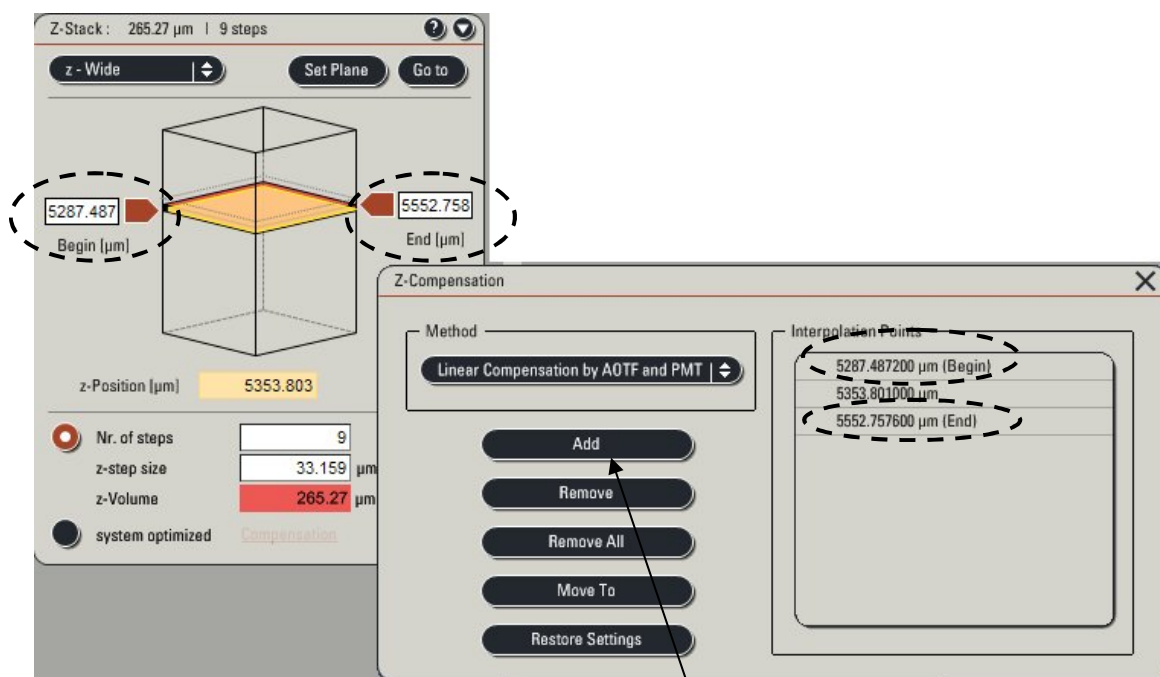
Begin,End ボタンを押した時点で設定されている AOTF、PMT の数値が記憶され、その 2 点間をリニアで補正します。

例)

サンプル表面(明るく観察される Z 位置)にて、AOTF10%、PMT800で Begin ボタンを押す

サンプル内部(暗く観察される Z 位置)にて、AOTF50%、PMT1000で End ボタンを押す

* AOTF を上げると退色が起こる場合があるので注意してください。



④Begin,End の位置以外に Z 位置を追加したい場合は、Add ボタンを使用して同様に設定する。

⑤その他のボタンについて



Add: 補間点の追加

Remove: 選択した補間点の削除

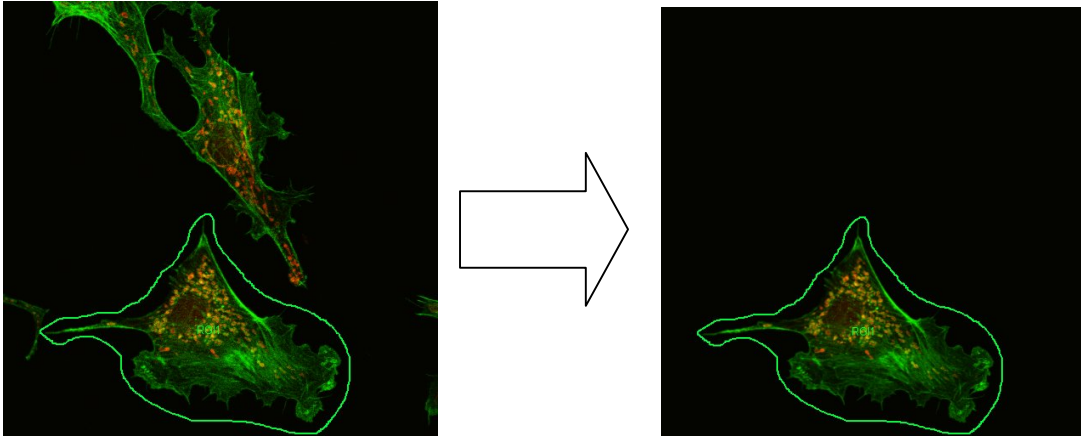
Remove All: 全ての補間点の削除

Move to: 設定した補間点の位置に移動

Restore Settings: 設定した補間点の条件の呼び出し

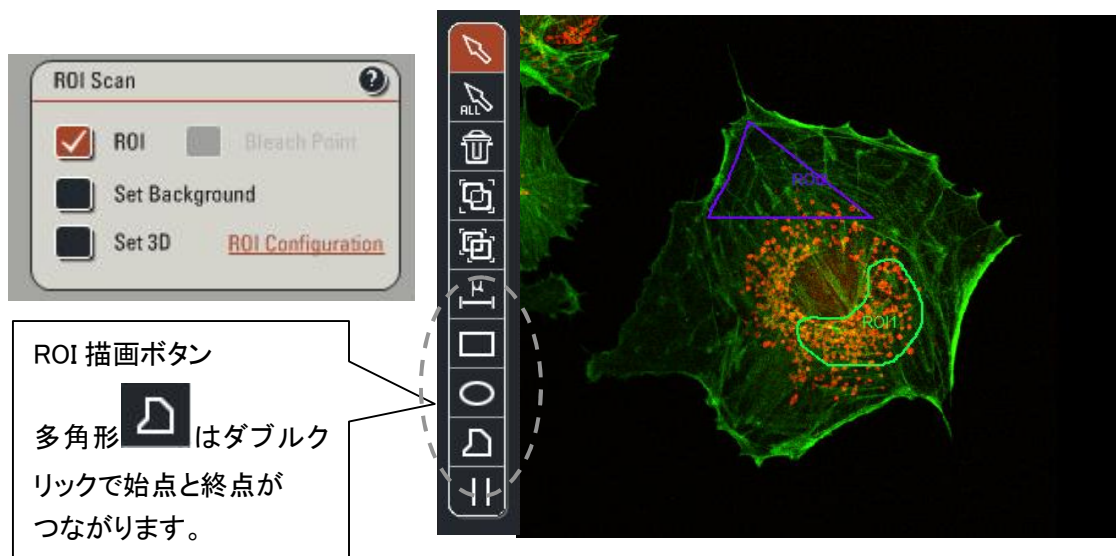
4. ROI Scan (任意エリアのスキャン)

レーザーを任意のエリアのみに照射することにより、その部分のみのスキャン、あるいは退色をさせます。

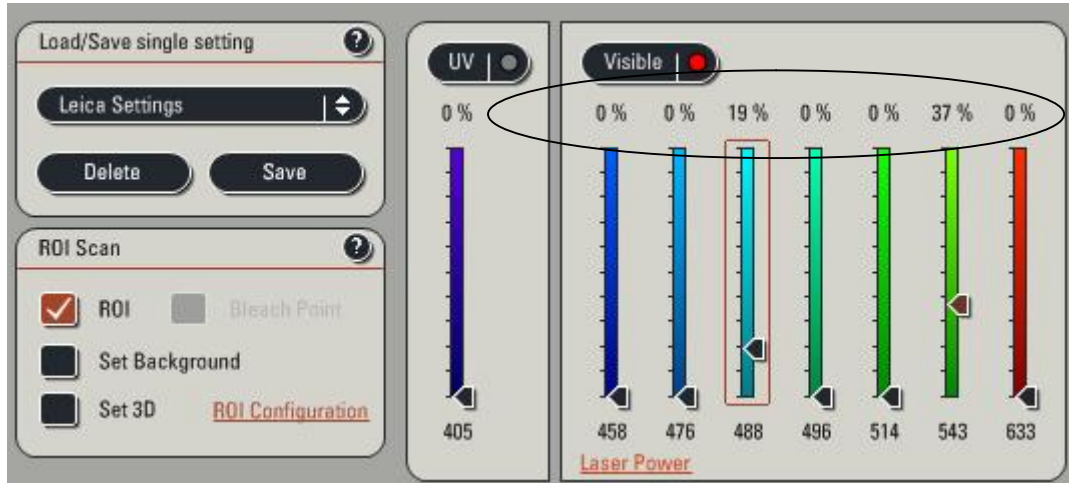


①まず画像を取り込み、レーザーパワー、Gain 等の設定を行います。

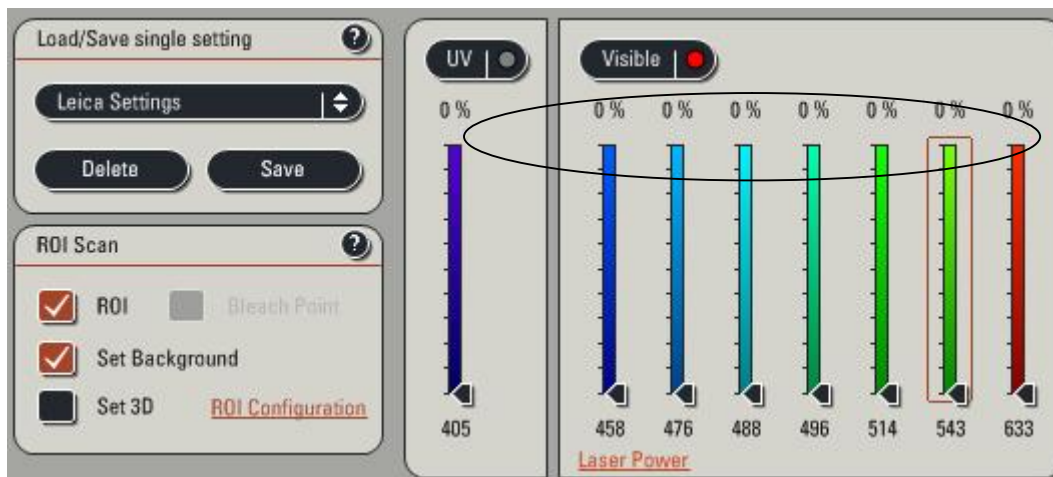
②ROI をアクティブにし、画像上に ROI を描きます。



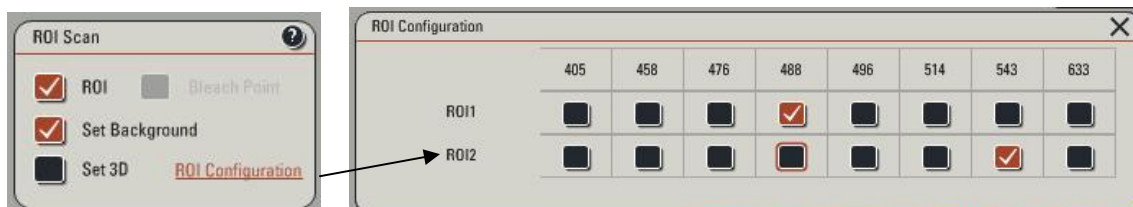
③ROI の内側に照射するレーザー強度を設定します。
照射しない場合はゼロパーセントにします。



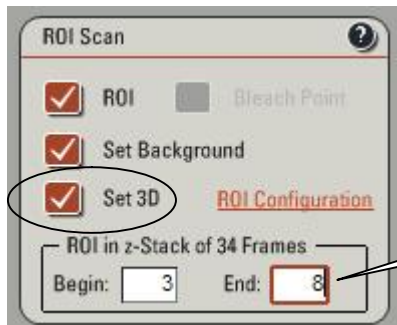
④ROI の外側に照射するレーザー波長及び強度を設定します(通常ゼロ)。



⑤ROI 毎に照射する波長を設定します。

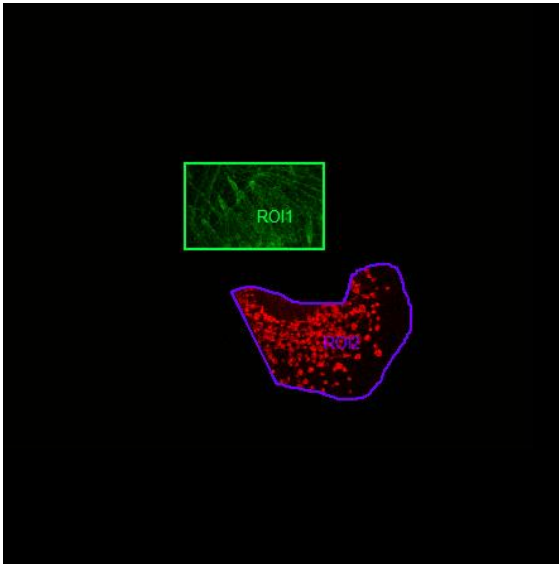


⑥連続断層取得時に、任意のフレームでのみ ROI を実行したい場合は、Set 3D の設定を行います。(Seq 時には有効となりません)



ここでは 3~8 フレーム目のみ
で ROI を実行

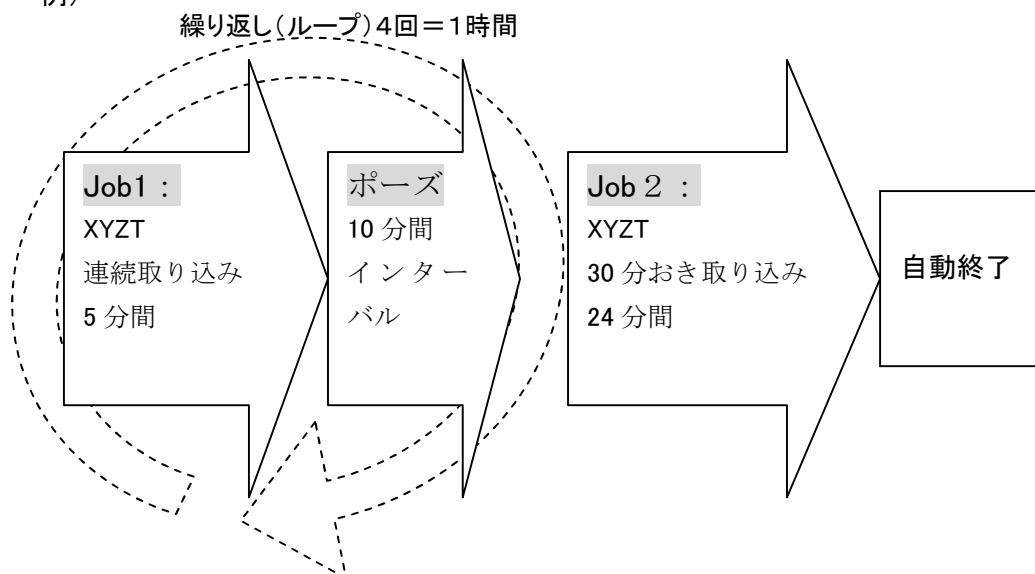
⑦スキャンを実行します。ROI の内側だけのイメージングが行われます。



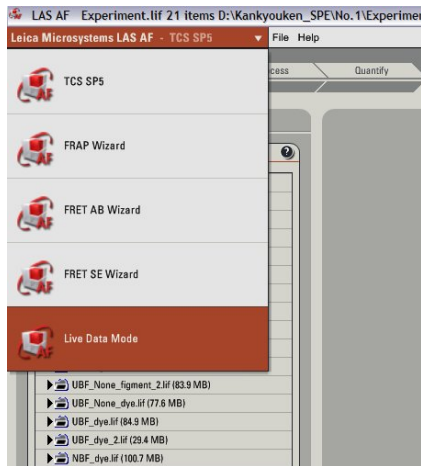
5. Live Data Mode (高度なタイムラプス) (* オプションソフト)

前述1. のタイムラプスの項で説明したタイムラプスは、インターバルタイムが一定のシンプルなタイムラプスですが、これに対して、Live Data Mode(以下 LDM)では、より高度なタイムラプス設定が可能となり、複数の異なるセットアップ(タイムラプスのインターバル、取得時間、蛍光取得のセッティング等、全てのパラメータ)をあらかじめ Job1、Job2 という名称で登録しておき、それをマクロのように組み合わせてタイムラプスを実行します。

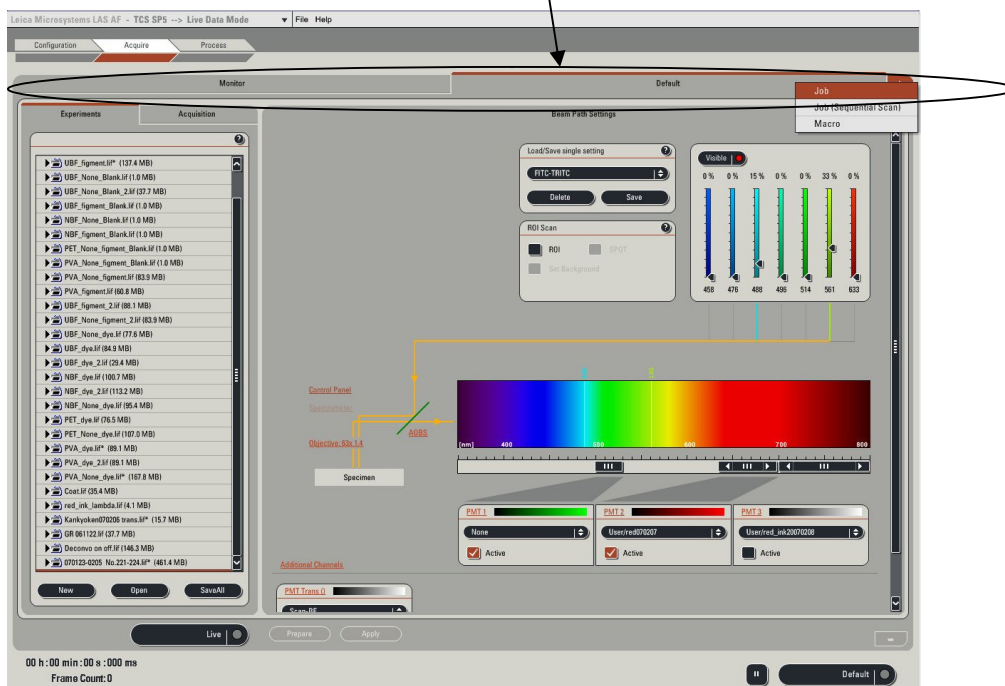
例)



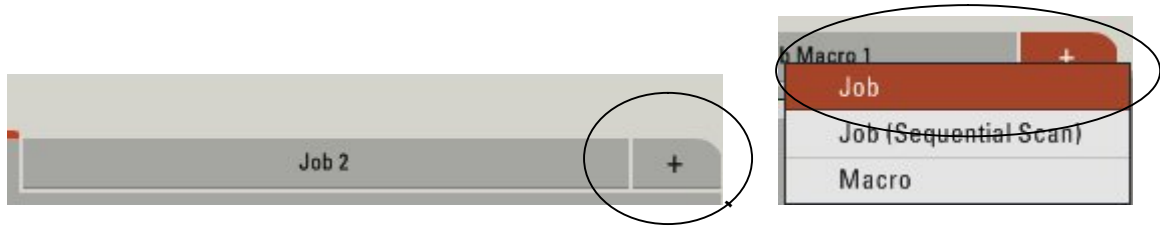
①まず LDM モードに入ります。画面左上のメニュー「Leica Microsystems LAS AF-TCS SP5」をクリックし、Live Data Mode を選択します。



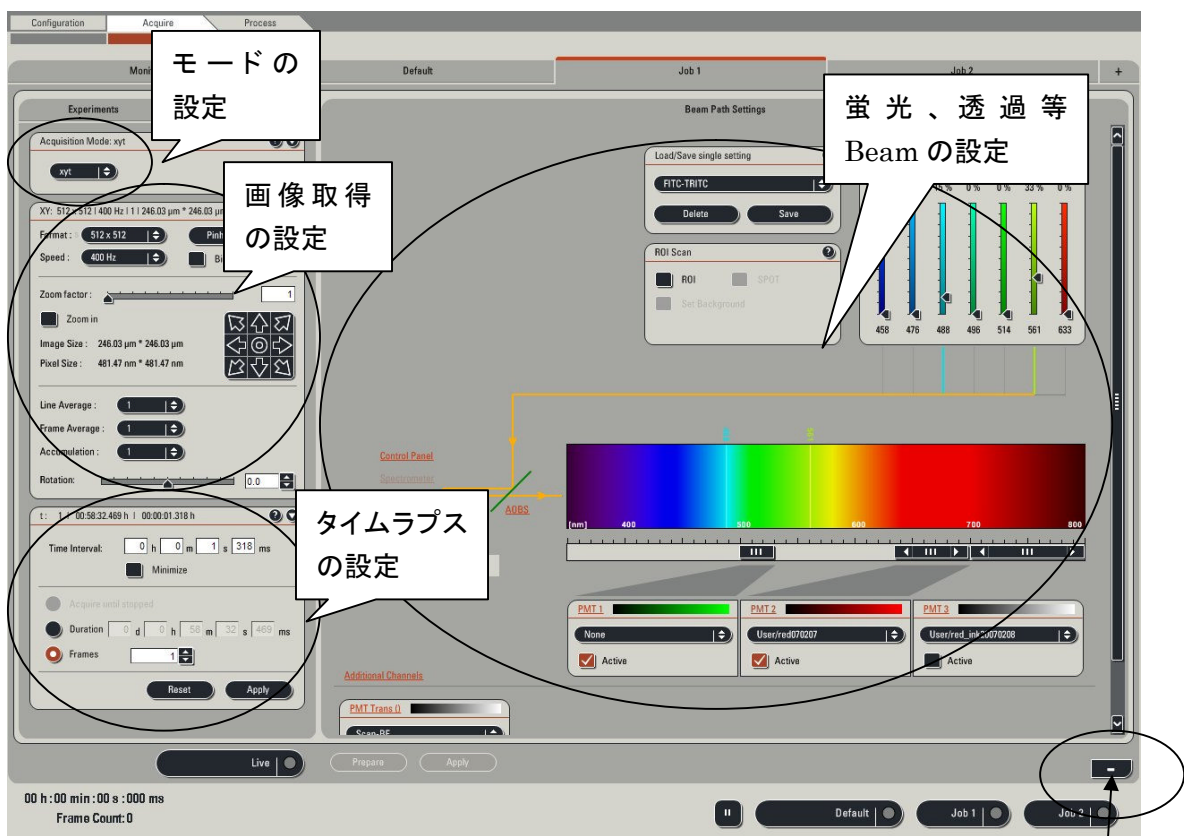
②画面が切り替わり、画面上に Monitor、Default などのタブが表示された LDM 画面となります。このモードを抜けるときは①のように画面左上をクリックして、TCS-SP5 の項を選択すると標準メニューに戻ります。



③LDMメニュー右上のプラスマークをクリックし、Job を選択して新規の Job を追加、セットアップをしていきます。



④新規に Job1 のタブが開きます。このタブ上で、Job1 のセットアップ(蛍光、透過等 Beam の設定、画像取得のための設定、XYT、XYZ、XYZT などのモードの設定、タイムラプスの設定等)を行います。



⑤スキンの実行は、操作画面右下の Scan ボタン(タブと同じ名称のボタン)を押します。
例) Job1 のスキャンを実行するときは Job1 のボタンを押す。



⑥作成した Job を削除するには、その Job のタブをアクティブにし(開き)、操作画面右下の「-」ボタンを押します。

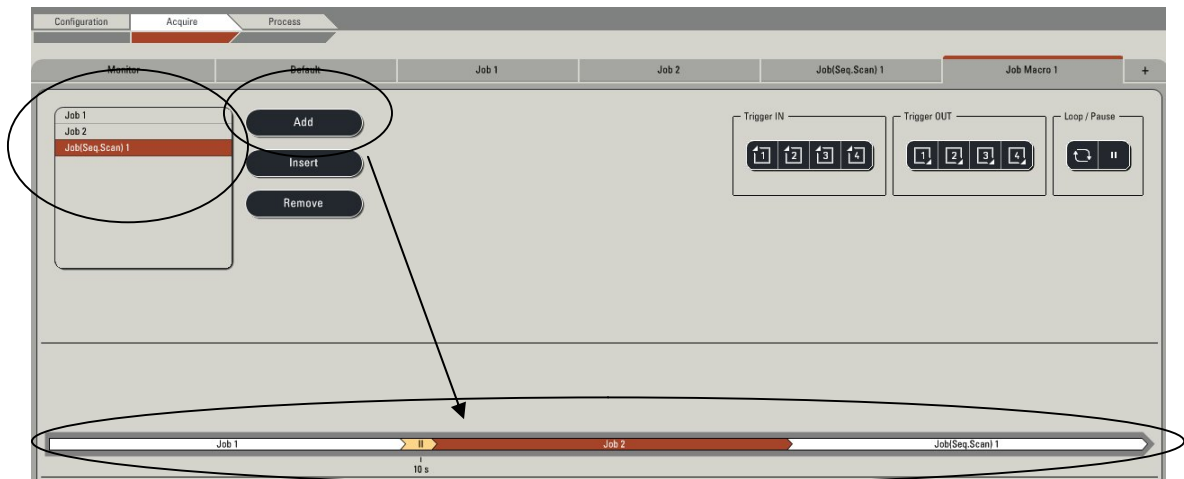
⑦同様にして必要に応じて Job2、Job3の設定を行います。

⑧作成した Job の組み合わせ(マクロ)を行います。操作画面右上のプラスボタンを押して、JobMacro を選択します。

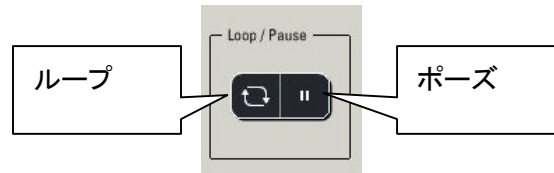


⑨以下の画面が開きます。

左にリストアップされた Job の中から必要なものをクリックして Add ボタンを押すとマクロのようにセットアップが行われていきます。

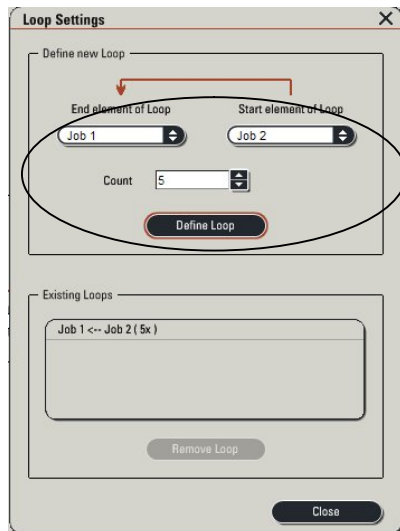


⑩ ループ、ポーズの設定は操作画面右上から行います。



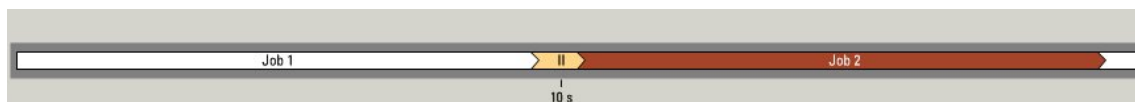
ループの設定:

どの Job からどの Job までを何回繰り返すかを設定し、DefineLoop ボタンを押します。



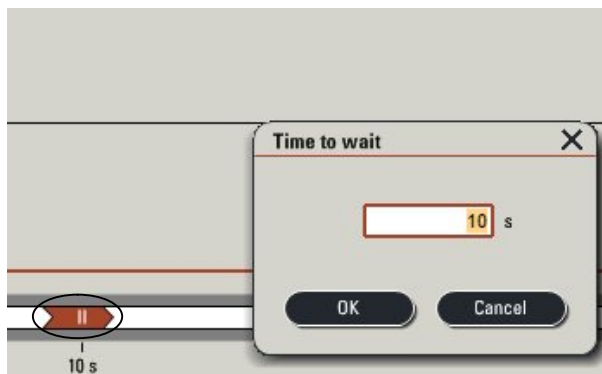
ポーズの設定:

ポーズを入れるタイミングの後にあたる Job をアクティベートし、ポーズボタンを押します。
例) Job2 をアクティベートして、ポーズボタンを押す。



デフォルトで 10 秒のポーズが入ります。

時間の変更はポーズの部分をクリックすると入力画面が表示されます。



⑪ JobMacro1を実行する場合は、操作画面右下の JobMacro1ボタンを押してタイムラプスをスタートします。



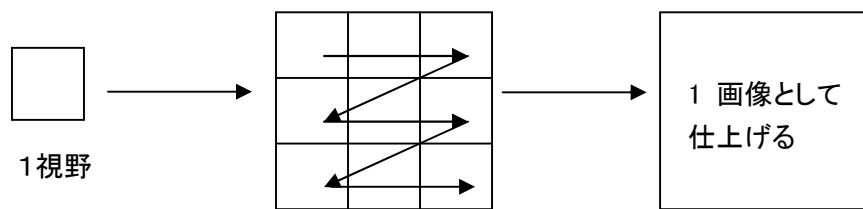
6. スキャンングステージ使用法 (Tile Scan、多点タイムラプス)

*この機能は、スキャンング(電動)ステージ(オプション)が搭載されているシステムで有効となる機能です。

スキャンングステージで使用できる機能は下記の通りです。

1. Tile Scan (Mapping)

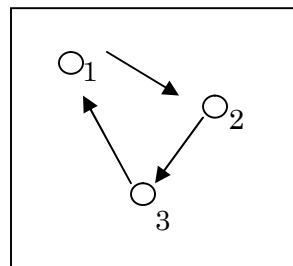
1視野を連続的にスキャンし、1枚の画像に貼り合わせるにより、より広い視野の画像を取得することが可能となります。



タイルスキャン

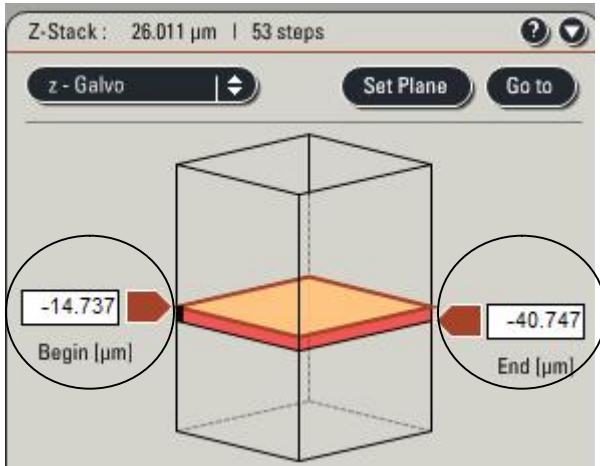
2. 多点タイムラプス (Mark & Find)

複数の測定ポイントをあらかじめ登録し、それらを連続してタイムラプスでスキャンを行う。



1. Tile Scan(Mapping)

1. Tile Scan 機能に入る前に、Zstack パネルで Begin と End をアクティブにする。




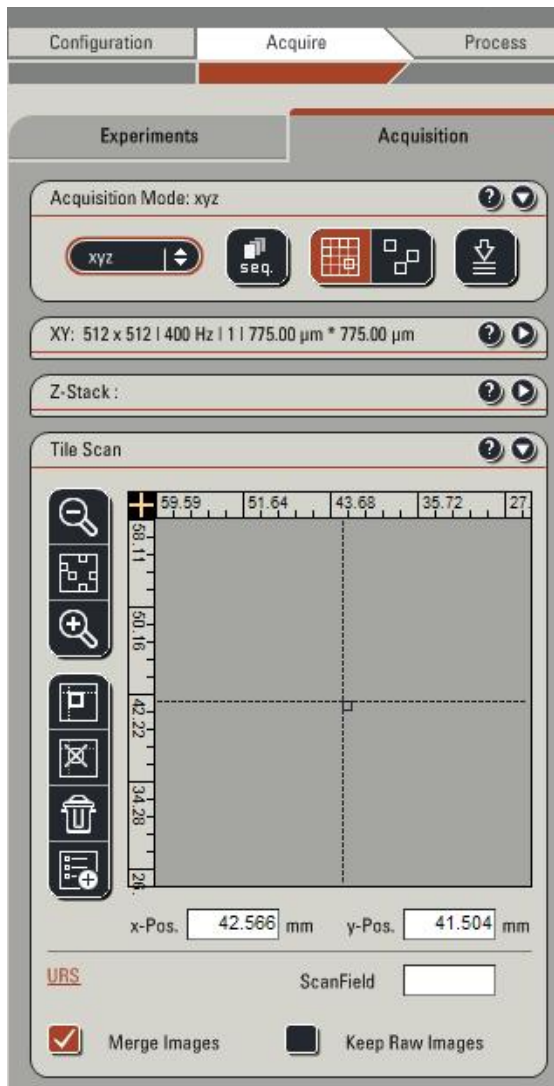
実際に測定する位置は、後ほど決めるのでここではアクティブになっていれば良い。








* 左図のように Begin と End の欄に数字が入っていればアクティブとなっている。

2. スキャンモードを選択する(XYZ, XYZTなど)



3. Tile Scan ボタン  を押します。TileScan パネルが開きます。



-  マップの位置表示縮小
-  現在指定されている測定ポイントをマップに表示
-  マップの表示拡大
-  測定ポイント登録
-  測定ポイント削除(1点)
-  測定ポイント削除(全部)
-  ステージ位置補正機能

ScanField

4x3 など、取り込み画像枚数の設定。

Merge Images

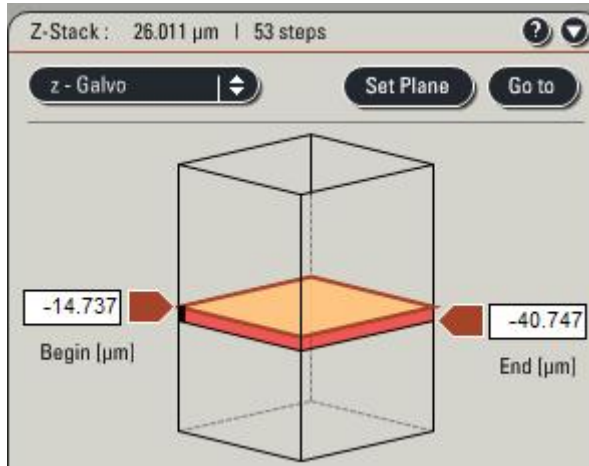
取り込んだ複数画像を、取り込み終了と同時に1枚の画像に張り合わせる(元の1枚1枚の画像は残らない)
OFF にすると、貼り合わせ画像は作成できなくなります
のでご注意ください。

Keep Raw Images

取り込み終了と同時に1枚の画像に張り合わせるときに、元の1枚1枚の画像も残す。

4. Z StackパネルでBeginとEndを登録し、枚数や平均回数を設定します。

このとき、視野が広い場合は、端から端までカバーできる Begin と End を設定するようにします。




5. スマートムーブからステージを操作して観察するポジション(XY)に移動します。

Tile Scan ポジションの登録は次の 2 通りの方法があります。

5-1. 目的とする全視野の対角位置の 2 箇所を設定することにより自動設定

5-2. 現在位置で3x3などの数字を入力する。

5-1. 目的とする全視野の対角位置の 2 箇所を設定することにより自動設定

スマートムーブでスタート位置と終了位置をそれぞれ  で設定します。

2 点目を設定した時点で、ScanField に3x4 などの数字が自動的に入力され、Tile Scan 範囲が決定されます。

5-2. 現在位置で3x3などの数字を入力する。

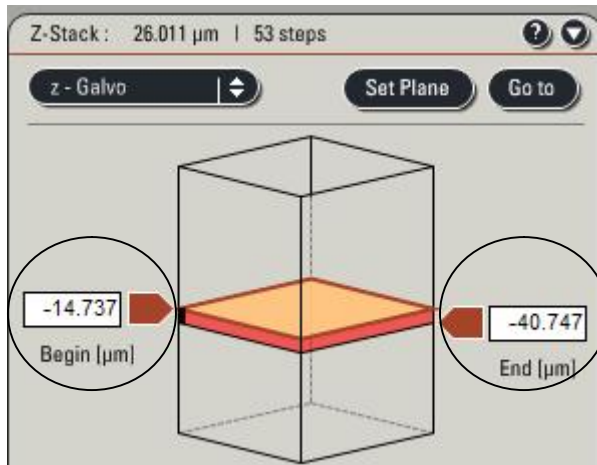
スマートムーブで目的周辺に移動し、そこで ScanField に任意の画像枚数(2x2 など)を入力します。(xはアルファベットのエクソ「x」またはアスタリスク「*」が使用できます)

6. スタートボタン  で実行します。

Merge Images がアクティブで Keep Raw Images がオフの場合は(初期設定)、スキャンが終了すると、自動的にマージされた画像が作成され、各々の画像は残りません。

2. 多点タイムラプス (Mark & Find)

1. Mark & Find 機能に入る前に、Zstack パネルで Begin と End をアクティブにする。




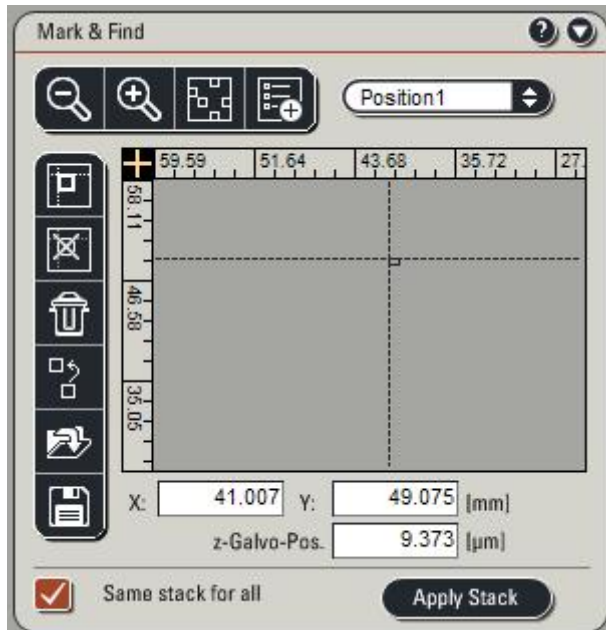
実際に測定する位置は、後ほど決めるのでここではアクティブになっていれば良い。

* 左図のように Begin と End の欄に数字が入っていればアクティブとなっている。

2. スキャンモードを選択する (XYT, XYZT など)



3. Mark & Find ボタン  を押します。Mark & Find パネルが開きます。



パネル上部の機能:



マップの位置表示縮小



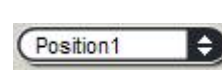
マップの表示拡大




現在指定されている測定ポイントをマップに表示



ステージ位置補正機能



ポイントを  ボタンで登録すると、順番にナンバリングされます。またここからポイントを指定すると、その位置にステージが移動します。

パネル左側の機能:



測定ポイント登録



測定ポイント削除(1点)



測定ポイント削除(全部)



測定ポイントの入れ替え



設定の呼び出し



設定の登録


Same stack for all

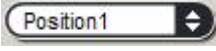


全てのポイントと同じZスタック位置で取り込むか否かの設定

Apply Stack

各測定ポイントにおいて、異なるZスタックの設定を行うときに、このボタンでZ位置の登録を行う。(測定ポイントを登録後、Zスタックパネルにて BeginEnd を設定し、その後  ボタンを押す)

4. スマートムーブで位置を移動し、 ボタンを押して測定ポイントを登録します。

 欄に順番に登録が行われていきます。この欄で Position2 などのポイントを選択すると、その位置に自動的に移動します。

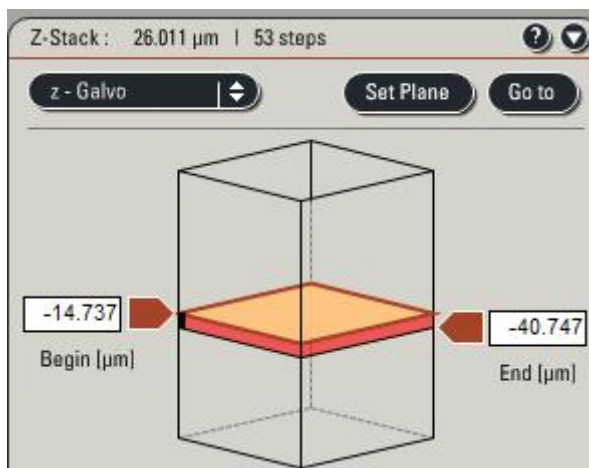
登録ポイントの削除は  で目的のポイントを選択した上で、 ボタンで実行します。 は全ポイントの削除となります。

5. XYZTの場合は、各ポイントにおけるZ位置の登録を行います(XYTの場合は必要無し)。

5-1. Same stack for all をディアクティブにします。

5-2.  欄でポイントを選択します。

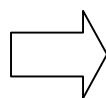
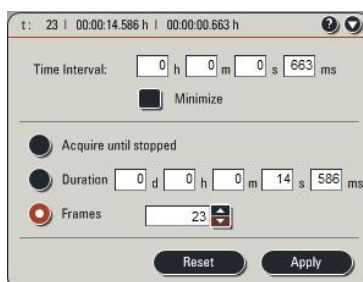
5-3. Z StackパネルでBeginとEndを登録し、枚数や平均回数を設定します。



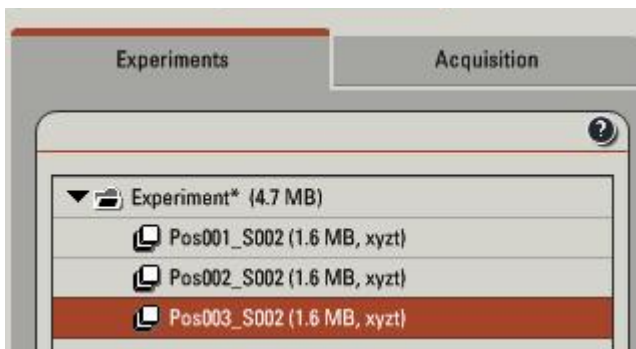
5-4. Mark & Find パネル上で  ボタンを押します。

5-5. 同様に次のポイントを登録します。

6. タイムラプスパネルで時間等の設定後、Start ボタンを押してタイムラプスを実行します。

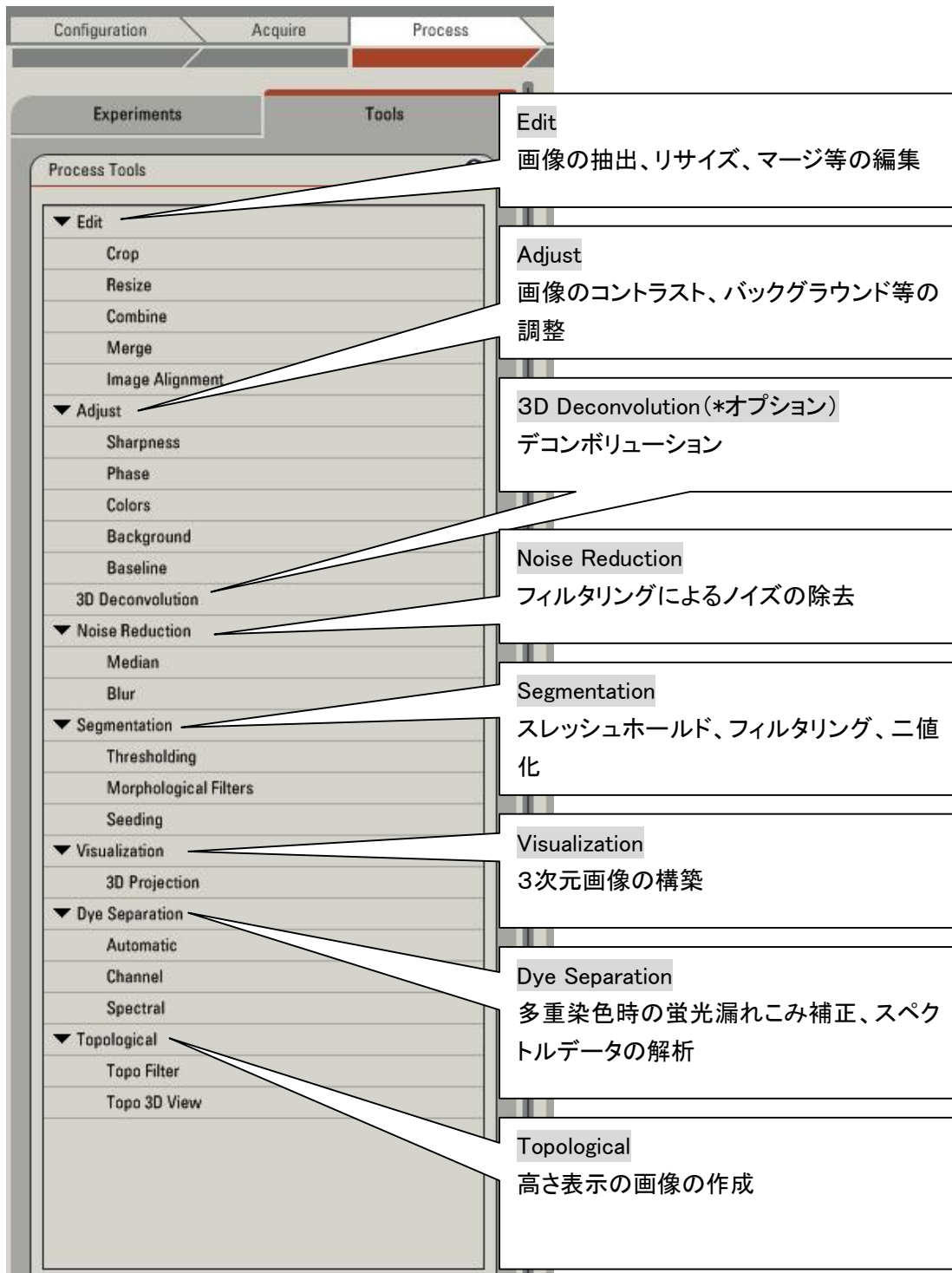


7.取り込まれたデータは下記のようにポイント別データとなっています。
Z 軸方向の重ね合わせを作成する場合は、Process メニューの3D Projection ツールで重ね合わせを実行し、必要に応じて保存してください。



V. Process

Process メニューでは、Acquire メニューで取り終わった画像に対して、様々な画像処理を行います。



The screenshot shows the 'Process' menu in the software interface. The menu is organized into several categories, each with a callout box explaining its function:

- Edit**: 画像の抽出、リサイズ、マージ等の編集
- Adjust**: 画像のコントラスト、バックグラウンド等の調整
- 3D Deconvolution (*オプション)**: デコンボリューション
- Noise Reduction**: フィルタリングによるノイズの除去
- Segmentation**: スレッシュホールド、フィルタリング、二値化
- Visualization**: 3次元画像の構築
- Dye Separation**: 多重染色時の蛍光漏れこみ補正、スペクトルデータの解析
- Topological**: 高さ表示の画像の作成

The 'Process Tools' panel in the interface lists the following items:

- ▼ Edit
 - Crop
 - Resize
 - Combine
 - Merge
 - Image Alignment
- ▼ Adjust
 - Sharpness
 - Phase
 - Colors
 - Background
 - Baseline
 - 3D Deconvolution
- ▼ Noise Reduction
 - Median
 - Blur
- ▼ Segmentation
 - Thresholding
 - Morphological Filters
 - Seeding
- ▼ Visualization
 - 3D Projection
- ▼ Dye Separation
 - Automatic
 - Channel
 - Spectral
- ▼ Topological
 - Topo Filter
 - Topo 3D View

Edit

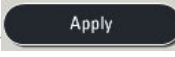
Crop

Crop は、取得した画像(XYZ、Time Series)から任意のものからのみの抽出を行います。

1. チャンネルの抽出

多重染色データから、任意のチャンネルのみのデータを抽出する。


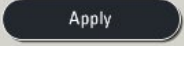
必要なチャンネル以外のチャンネルボタンを押してオフにし(黒くする)、右下の

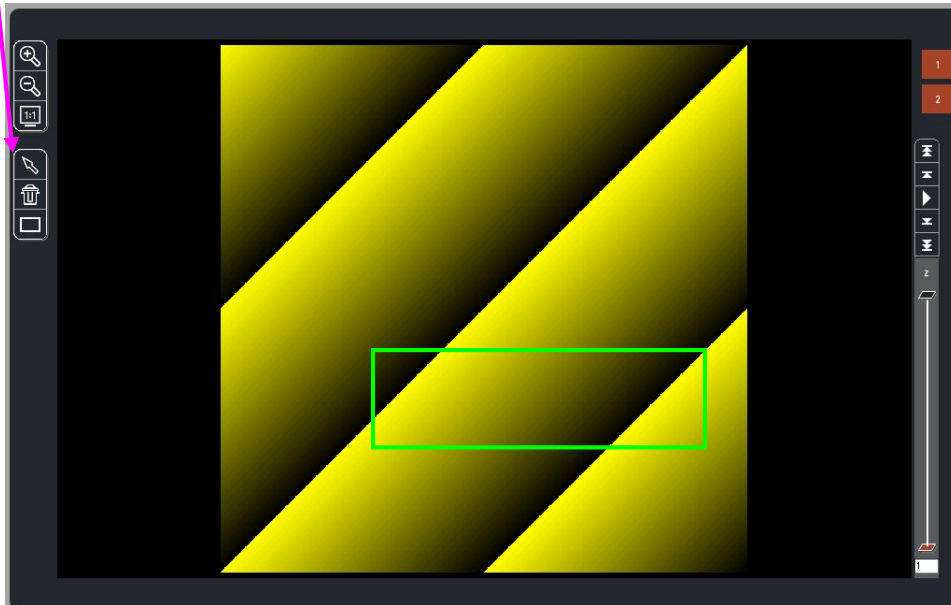
Apply ボタン  を押します。アクティベートされたままのチャンネルのみのデータとなります。



2. XY 方向の抽出(切り取り)

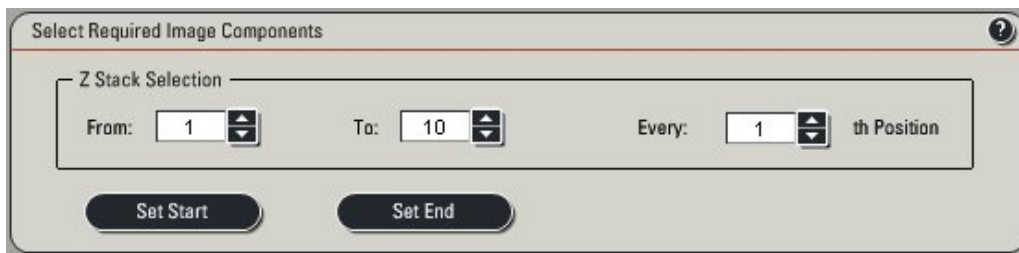
① Experiment タブにあるデータを選択し、Tools タブの Crop を選択します

②  ボタンを押し、画像上に四角形を描き、右下の Apply ボタン  を押します。この部分が切り抜かれる領域になります。



3. 連続データ方向の抽出(XYZ、XYT、XYZT 等)

① Z series または Time Series のときは、Select Required Image Component にある From と To と



に数値を入力し、切り抜く画像の範囲を決定します。From または、To の値を変更したときは、Set Start または、Set End を押し、決定を行ってください

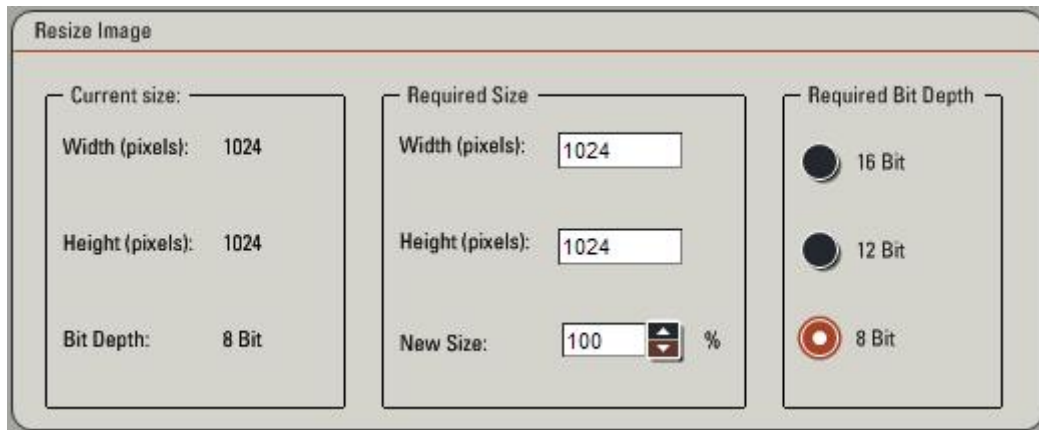
② Every ○○th Position の値を必要に応じて変更します。“1”の場合、Series 画像全てを切り取ります。“2”の場合、1 枚おきに画像を切り取ります。

③ 設定が終了したら、Apply  ボタンを押します。切り抜かれた画像が、Viewer に表示されます。

Resize

Resize は、取得した画像の大きさや、Bit の値を変更するときに使用します。

1. Experiment タブにあるデータを選択し、Tools タブの Resize を選択します。
2. 任意に Required Size、Required Bit Depth を選択します

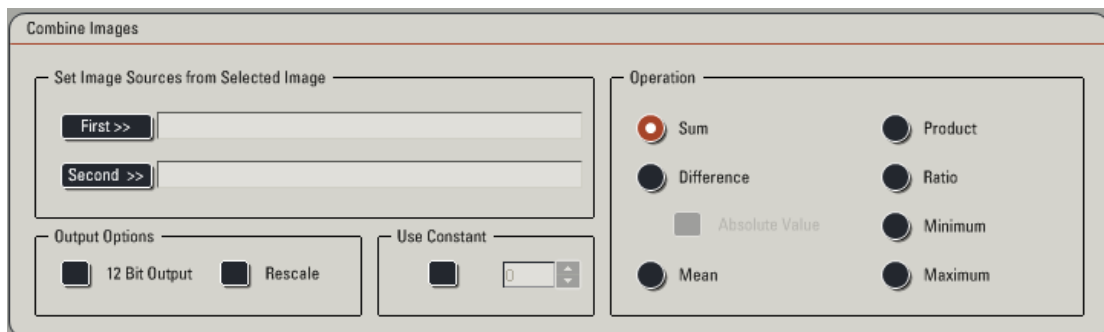


3. 設定が終了したら、Apply  ボタンを押します。Resize された画像が Viewer に表示されます。

Combine

Combine は、取得した画像シリーズ同士を結合します。

1. Experiment タブにあるデータを選択し、Tools タブの Combine を選択します。



First と Second に任意の画像シリーズを選択します。

Operation から、結合作業内容を選択します。

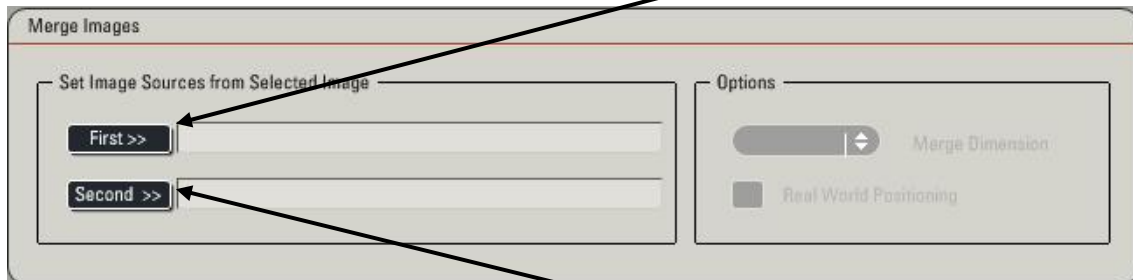
Output Operations、Use Constant が必要な場合は、チェックをつけます

2. 設定が終了したら、Apply  ボタンを押します。Combine された画像が、Viewer に表示されます。

Merge

Merge は、別々に取得画像をひとつの画像にする機能です。

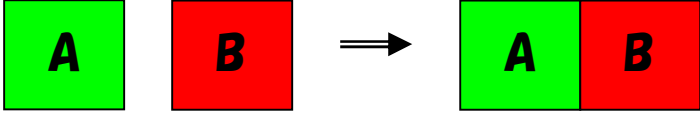
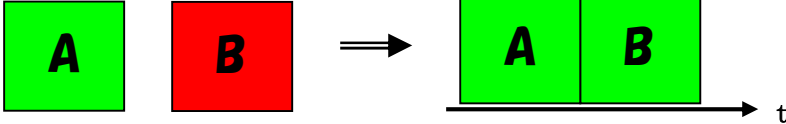
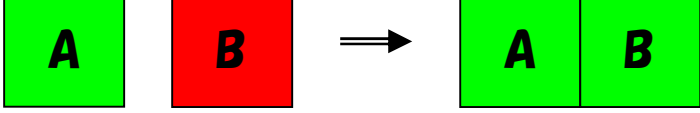
1. 合成したい画像を Experiment タブから選択し、First ボタンを押します。

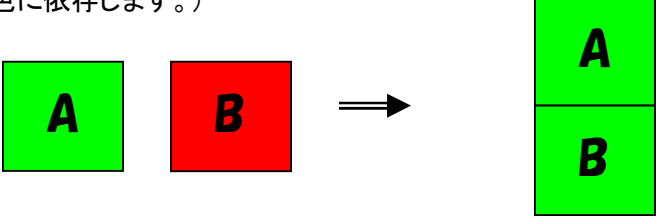


2. もうひとつの合成したい画像を Experiment タブから選択し、Second ボタンを押します。

3. Options にある Merge Dimension から、合成方法を選択します。それぞれのパラメーターは次のように合成します。



Channel	多 Channel でデータを取得したときのように画像を合成します。
	
t	<p>時間軸方向に画像を合成します。(表示される色は、First に指定した色に依存します。)</p> 
x	<p>画像を x 軸方向(左右)に並べます。(表示される色は、First に指定した色に依存します。)</p> 

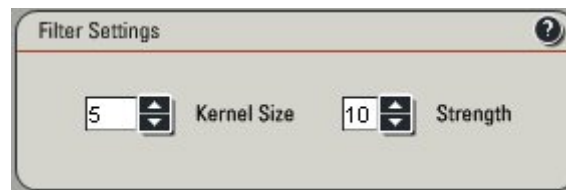
y	<p>画像をy軸方向(上下)に並べます。(表示される色は、First に指定した色に依存します。)</p>  <p>The diagram illustrates the process of stacking two images, A and B, along the y-axis. On the left, image A is a green square and image B is a red square. An arrow points to the right, where the two images are stacked vertically. The top half of the resulting image is green and labeled 'A', and the bottom half is also green and labeled 'B'. This indicates that the color of the resulting image is determined by the 'First' image specified, which in this case is the green image A.</p>
----------	--

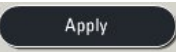
Adjust

Sharpness

画像を鮮鋭化します。

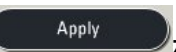
1. Experiment タブにあるデータを選択し、Adjust タブの Sharpness を選択します。
2. Kernel Size の数値を選択します。Kernel Size では、何 Pixel 数を Filter 処理後に、1Pixel とするかを指定します。例えば、Kernel Size を5すると、元画像の5pixel がフィルター処理後に、1pixel となるように計算を行います。

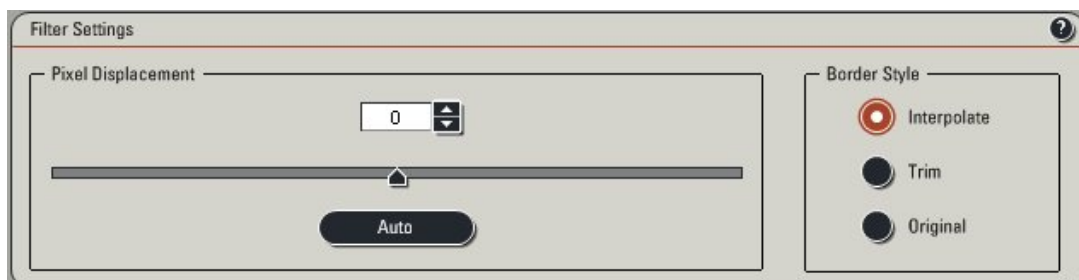


3. Strength の数値を選択します (Strength の値が“0”だと、Sharpness の効果は得られません)。
4. 設定終了後に、Preview ボタンを押すと、画像の確認ができます。
5. 設定終了後に、Apply  ボタンを押すと、その設定が適用されます。

Phase

双方向スキャン (BidirectionalMode) を使用した場合、画像の位相がずれる場合があります。Phase 機能では、このずれた位相をそろえます。

1. Experiment タブにあるデータを選択し、Adjust タブの Phase を選択します。
2. Pixel Displacement にあるスライダーを動かすか、数値入力を行い、位相を合わせます。
3. Border Style を選択します。
4. 設定終了後に、Preview ボタンを押すと、画像の確認ができます。
5. 設定終了後に、Apply  ボタンを押すと、その設定が適用されます。



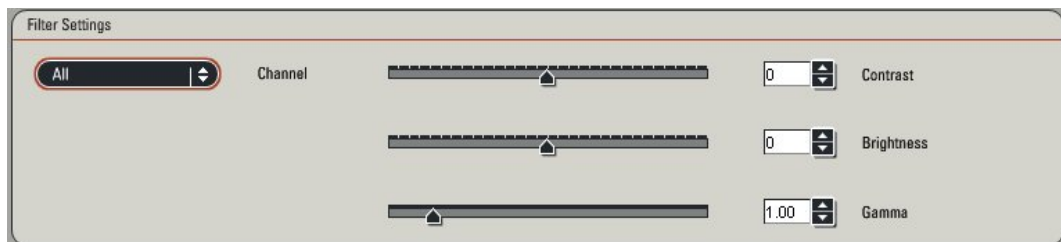
Colours


Colours では、Contrast、Brightness、Gamma の補正を行うことが可能です。

1. Experiment タブにあるデータを選択し、Adjust タブの Colours を選択します。
2. Channel から、どのチャンネルに対し、補正を行うのかを決めます。



3. Contrast、Brightness、Gamma のスライダーまたは、数値入力を行います。



4. Apply  ボタンを押し、その設定を適用します。

Background

チャンネル毎にバックグラウンド処理を行います。

1. Experiment タブにあるデータを選択し、Adjust タブの Background を選択します。
2. Channel から、どのチャンネルに対し処理を行うのかを選択します。



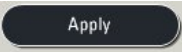
3. Background の値を設定し、APplyボタン  を押します。

Baseline

Baseline の設定を変更することで、背景の不要な明るさを除去することができます。

1. Experiment タブにあるデータを選択し、Adjust タブの Baseline を選択します。
2. Correction から、Minimum、Mean、Eliminate Autofluorescence のいずれかを選択します。

Minimum	その画像における輝度の最小値を Baseline とし、その値を“0”にします。
Mean	その画像における輝度の“0”から Threshold までの値の平均値を計算し、その値をその平均値を“0”にします。
Eliminate Autofluorescence	低輝度の Pixel を2値化し、その結果を画像に適応します。

3. 必要に応じて、Increase Dynamics をチェックします。Increase Dynamics は、最小輝度値が“0”になるようにします。
4. 設定終了後に、Preview ボタンを押すと、画像の確認ができます。
5. 設定終了後に、Apply  ボタンを押すと、その設定が適用されます。

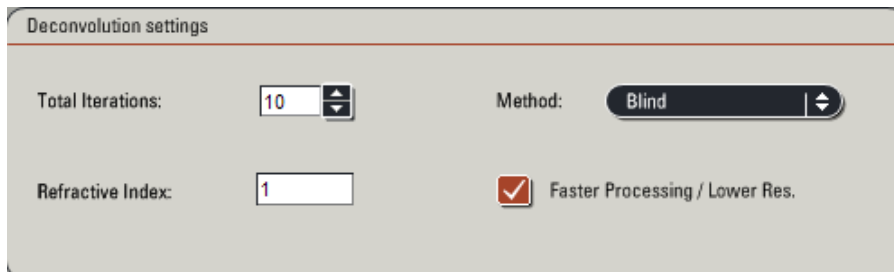
3D Deconvolution (*オプションソフト)

非焦点面にある輝点からの拡散光を取り除き、擬似的に光学断層像を作ります。

1. Experiment タブにあるデータを選択し、Deconvolution タブの3D Deconvolution を選択します。
2. Method から、Blind、Maximum Likelihood、Inverse Filter、Gold's Method のいずれかを選択します。

Blind	Blind は、PSF(Point Spread Function)を必要としない方式であり、PSF を必要とする方式より柔軟性があり、例えば対物レンズ等の情報がなくても処理が出来ます。
Maximum Likelihood	Blind の方式に似ており、柔軟性があります。PSF が出来ていれば、Blind より処理が高速になります。 TimeLapse データ処理に一番適しています。
Inverse Filter	処理方式の中で一番高速です。デコンボリューションの下調べに使用する場合があります。
Gold's Method	Blind、Maximum Likelihood より高速に処理できます。 Inverse Filter より結果が綺麗です。

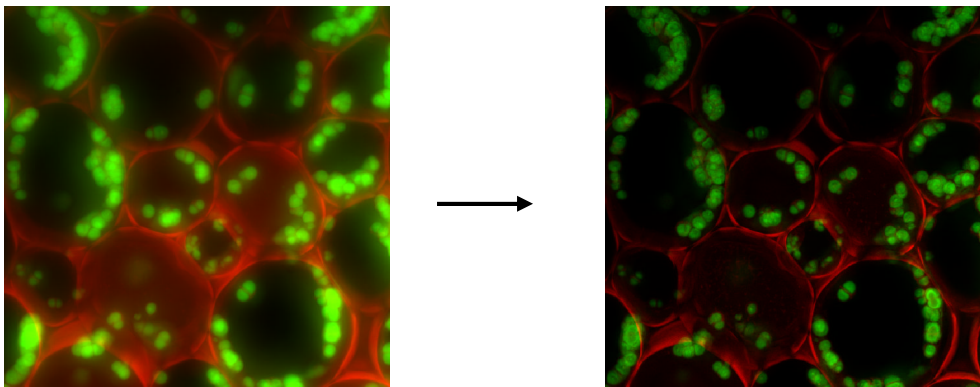
3-1 Blind



TotalIterations (計算回数)を入力する。Default は10回です。

RefractiveIndex は、使用した対物レンズの屈折率が自動的に入力されます。

FasterProcessing/LowerRes.は、処理は早いですが解像度が低いです。



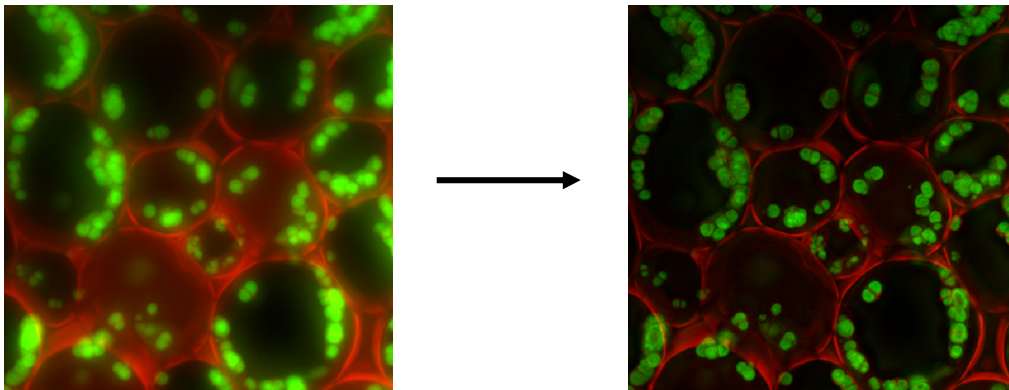
3-2 Maximum Likelihood

Deconvolution settings

Total Iterations: Method: Auto Generate PSF

Refractive Index: Faster Processing / Lower Res.

Auto Generate PSF は、PSF を作成していない時に選択します。



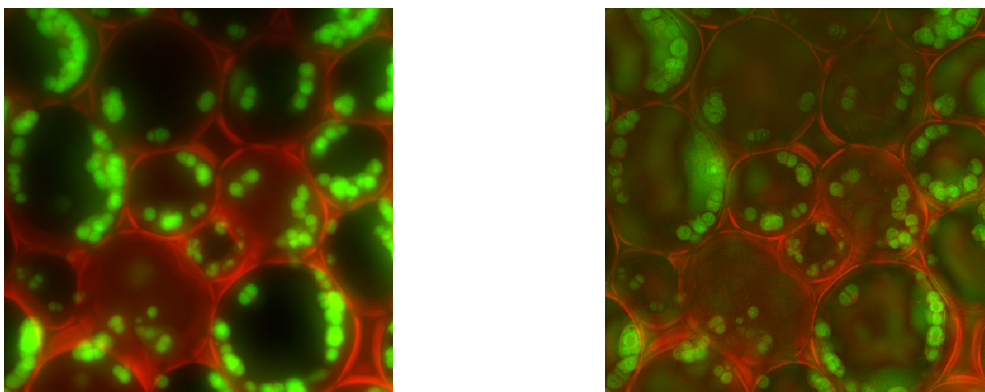
3-3 Inverse Filter

Deconvolution settings

Total Iterations: Method: Auto Generate PSF

Refractive Index: Faster Processing / Lower Res.

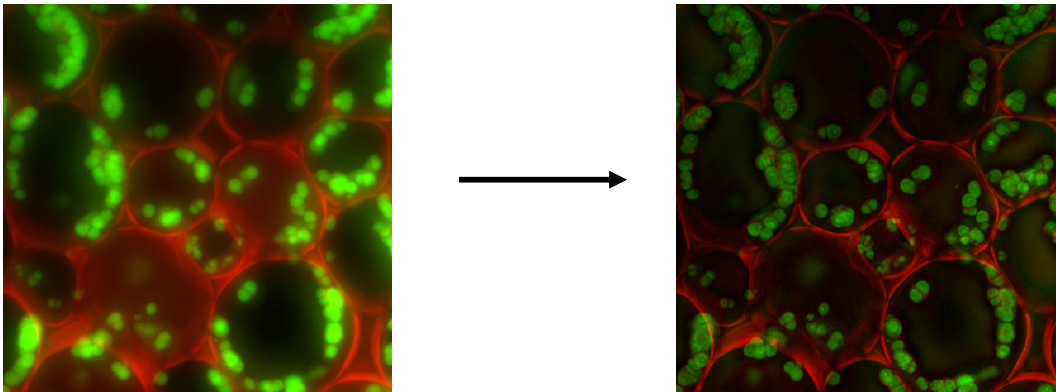
Total Iteration、Faster Processing / Lower Res. は、選択できません。
Auto Generate PSF は、PSF を作成していない時に選択します。



3-4 Gold's Method

Deconvolution settings

Total Iterations:	<input type="text" value="10"/>	Method:	<input type="text" value="Maximum Likelihood"/>	<input type="checkbox"/> Auto Generate PSF
Refractive Index:	<input type="text" value="1"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Faster Processing / Lower Res.	<input type="button" value="Set PSF"/>	



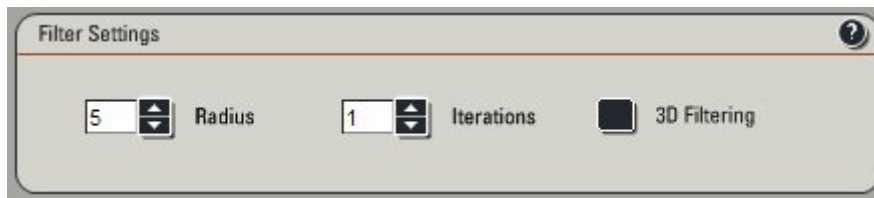
3. 設定終了後に、Preview ボタンを押すと、画像の確認ができます。
4. 設定終了後に、Apply ボタンを押すと、その設定が適用されます。

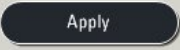
Noise Reduction

Median

ノイズを軽減して画像をスムーズにする画像処理フィルター(Median アルゴリズム)です。

1. Experiment タブにあるデータを選択します。
2. 必要に応じて Radius、Iterations、3D Filtering を設定します。
Radius: 処理を行うピクセル数; 5の場合は該当ピクセルを含め、円を構造要素として5ピクセル分の処理を行う
Iterations: 処理の繰り返し回数
3D Filtering: アクティブにすると Z 方向にも処理を行います。

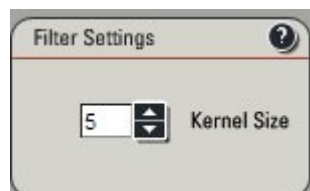


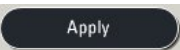
3. Preview ボタンでプレビュー画像の確認ができます。
4. Apply ボタン  で実際に処理を行い、Experiment タブに処理後のデータが作成されます。

Blur

ノイズを軽減して画像をスムーズにする画像処理フィルター(Blur アルゴリズム)です。

1. Experiment タブにあるデータを選択します。
2. 必要に応じて KernelSize の設定を行います。
KernelSize: 処理を行うピクセル数; 5の場合は該当ピクセルを含め、長方形を構造要素として5ピクセル分の処理を行う



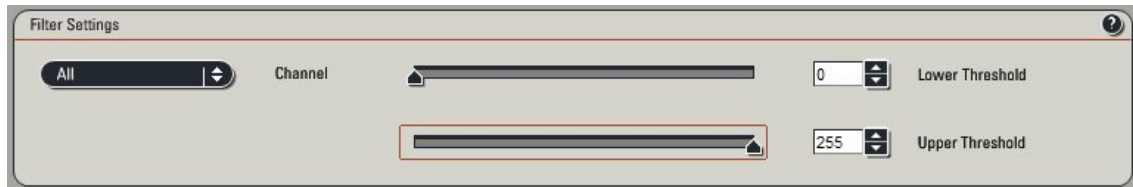
3. Preview ボタンでプレビュー画像の確認ができます。
4. Apply ボタン  で実際に処理を行い、Experiment タブに処理後のデータが作成されます。

Segmentation

Thresholding

スレッショールド値の設定を行います。

階調の上位、下位のスレッショールドを個別に設定することができます。



Morphological Filters

画像処理フィルター (Erosion、Dilation、Open、Close) の処理をかけます。

1. Experiment タブにあるデータを選択し、Filter の種類を選択します。

2. 必要に応じて Radius、Iterations、3D Filtering を設定します。

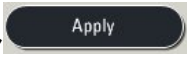
Radius: 処理を行うピクセル数; 5の場合は該当ピクセルを含め5ピクセル分の処理を行う

Iterations: 処理の繰り返し回数

3D Filtering: アクティブにすると Z 方向にも処理を行います。

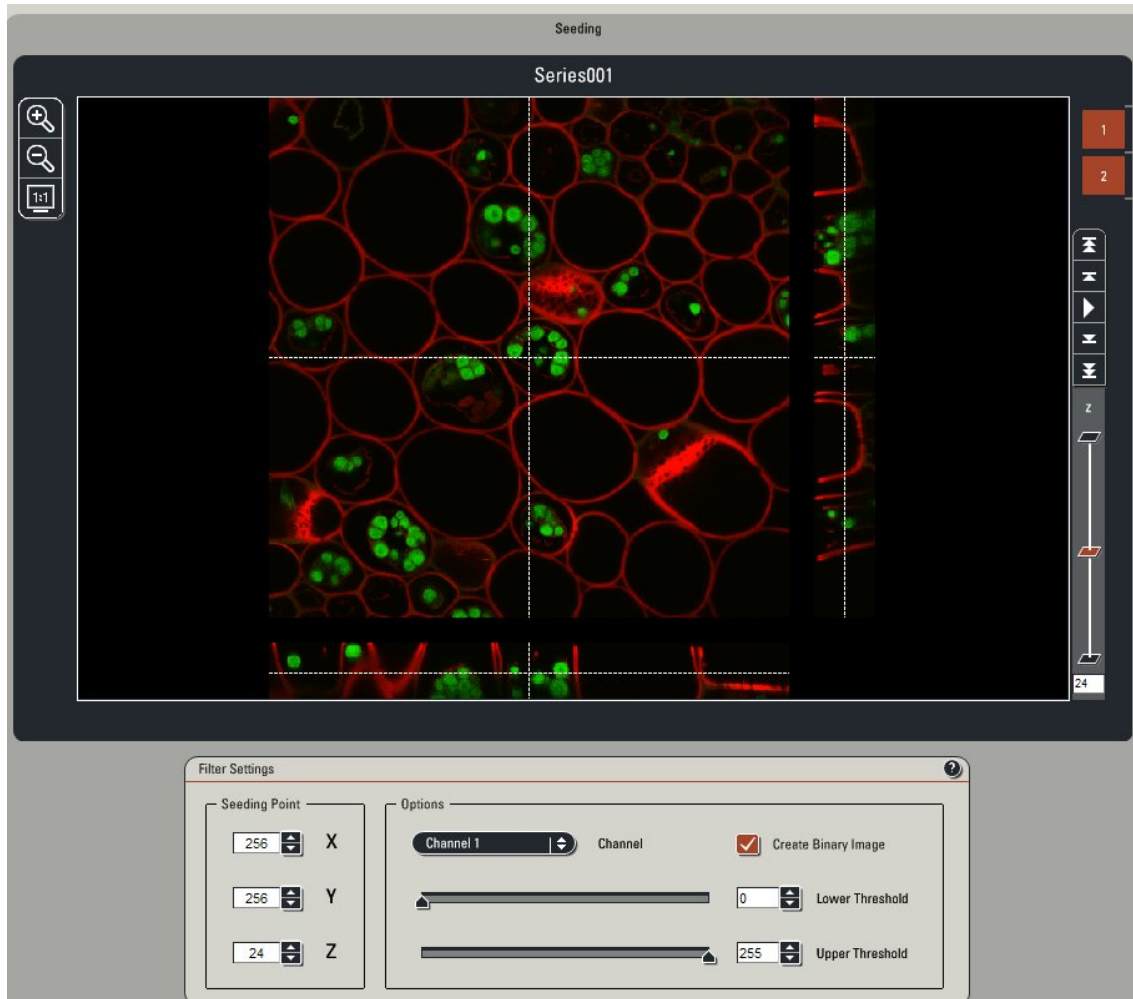



3. Preview ボタンでプレビュー画像の確認ができます。

4. Apply ボタン  で実際に処理を行い、Experiment タブに処理後のデータが作成されます。

Seeding

スレッショールドを設定し、構造の 3 次元的な抽出を行います。



1. Experiment にあるデータを選択します。
2. Preview画像上で、抽出を行いたい構造部分を十字で指定し、その構造をスレッショールドを設定することにより抽出します。Create Binary Image がアクティブになっていると、画像の2値化を行います。
3. Preview ボタンでプレビュー画像を確認できます。
4. Apply ボタン  で実際に処理を行い、Experiment タブに処理後のデータが作成されます。

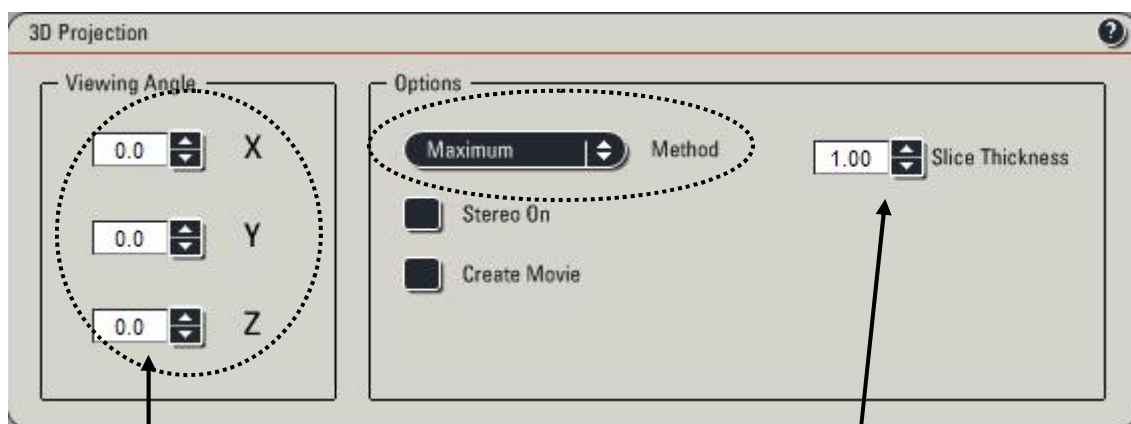
Visualization

3D Projection

三次元画像の構築を行います。

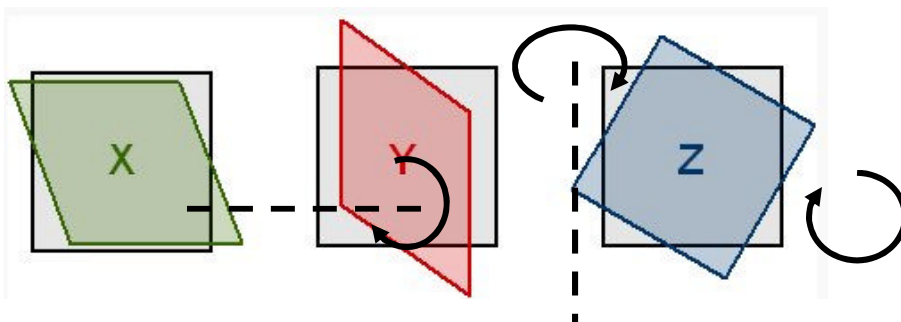
1 角度のみの3次元画像の作成

1. Experiment タブにあるデータを選択し、Tools タブの Visualization / 3D Projection を選択します。
2. Method から Projection のタイプを選択します。(通常はデフォルトの Maximum を使用します)

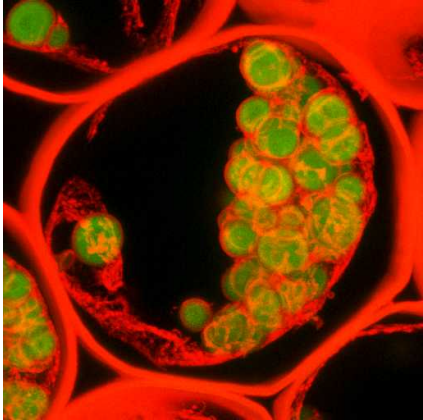
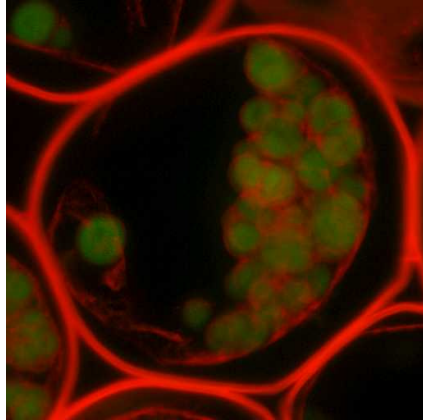
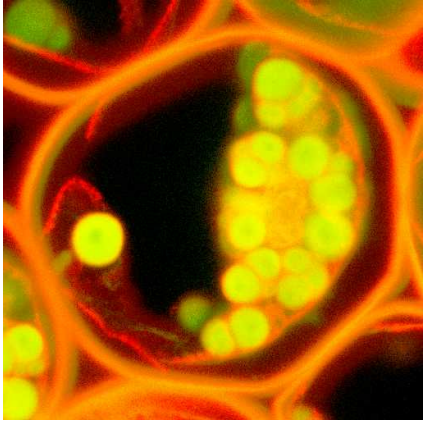
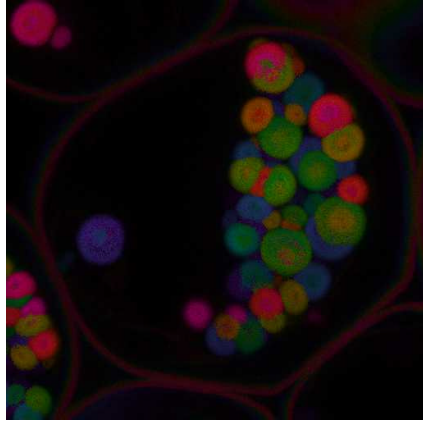


Slice Thickness
Section の厚さを変更します。通常“1.00”のままにして使用します。

Viewing Angle
Projection を行う方向を変更します。X、Y、Z それぞれに数値を入力する、または、マウスのクリックを押しながら、画像を回転して方向を変更します。



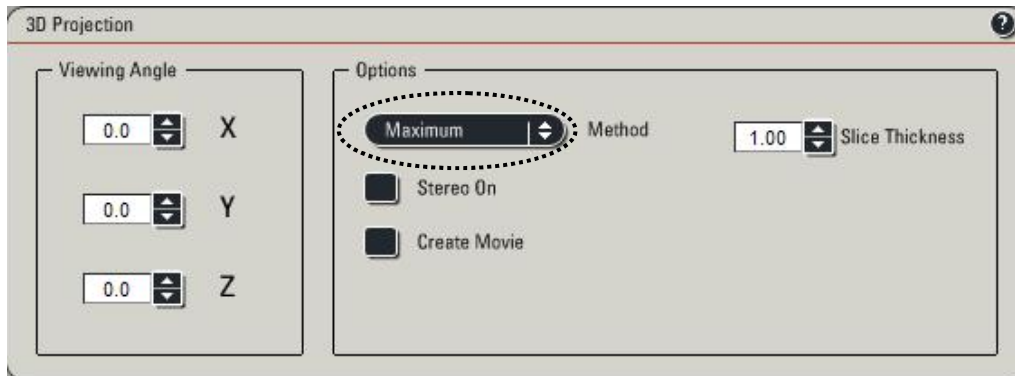
画像の構築方法は次の 4 種類があります。

Maximum Projection	Average Projection
<p>Z-Stack 画像を構成しているそれぞれのピクセルを Z 軸方向にみたとき、輝度の最も高いものを抽出し、構築した画像。</p>	<p>Z-Stack 画像を構成しているそれぞれのピクセルを Z 軸方向にみたとき、輝度の平均値を計算し、構築した画像。</p>
	
Transparent Projection	Color Coded Projection
<p>Z-Stack 画像を構成しているそれぞれのピクセルを Z 軸方向にみたとき、すべての輝度から加重平均を計算し、それをもとに構築した画像。</p>	<p>Z-Stack 画像を Z 方向の位置の違いを色によって識別した画像。</p>
	

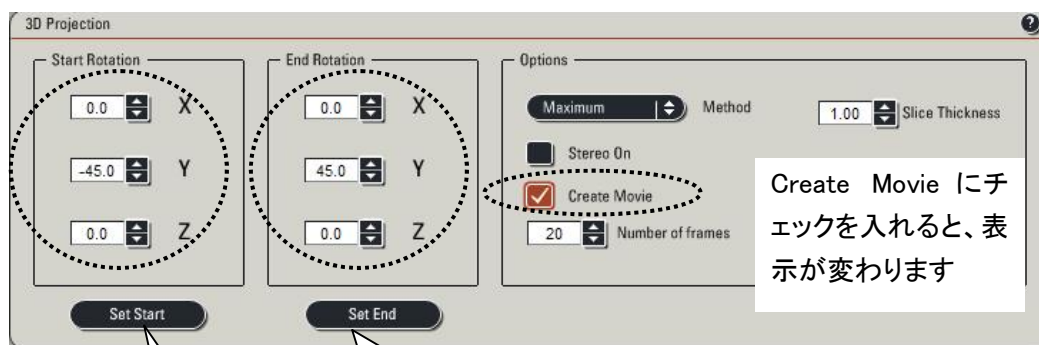
3. 設定が終了したら、Apply  ボタンを押します。Projection された画像が、Viewer に表示されます。

3D アニメーションの作成

1. Experiment タブにあるデータを選択し、Tools タブの Visualization / 3D Projection を選択します。
2. Method から Projection のタイプを選択します(デフォルトは Maximum)。

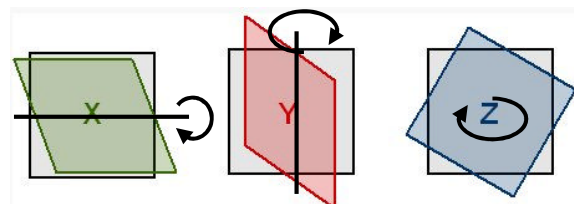


3. Create Movie にチェックを入れます。チェックをいれると、表示がアニメーション作製画面に変わります。
アニメーションの開始面と終了面を決め、Frame 数を Number of Frames に入力します。



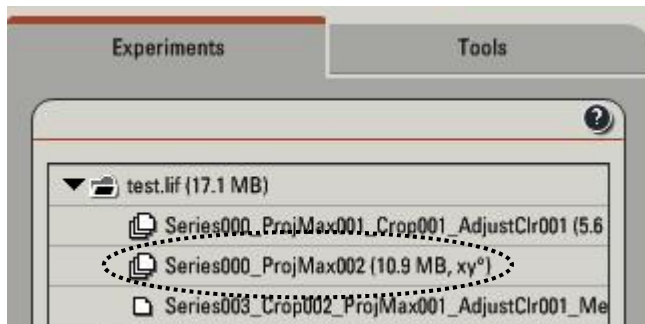
Viewing Angle

Projection を行う方向を変更します。X、Y、Z それぞれに数値を入力する、または、マウスのクリックを押しながら、画像を回転して方向を変更します。



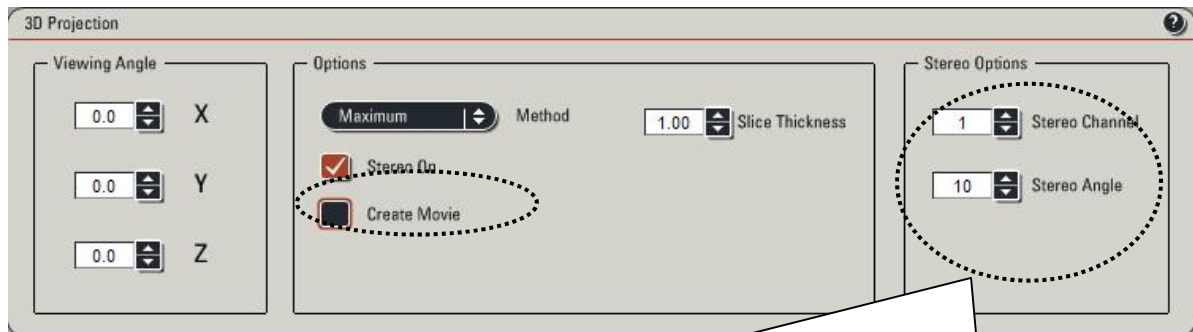
4. 設定が終了したら、Apply  ボタンを押します。作製されたアニメーションが、Viewer に表示されます。

5. 作成されたアニメーションのデータは、Experiment タブで下記のように表示されます。必要に応じて保存、また AVI での出力を行います。



ステレオ画像の作成

1. Experiment タブにあるデータを選択し、Tools タブの Visualization / 3D Projection を選択します。
2. Stereo On をアクティブにし、ステレオ画像を作成する元データ(チャンネル)、角度を設定します。

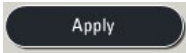



Stereo Channel

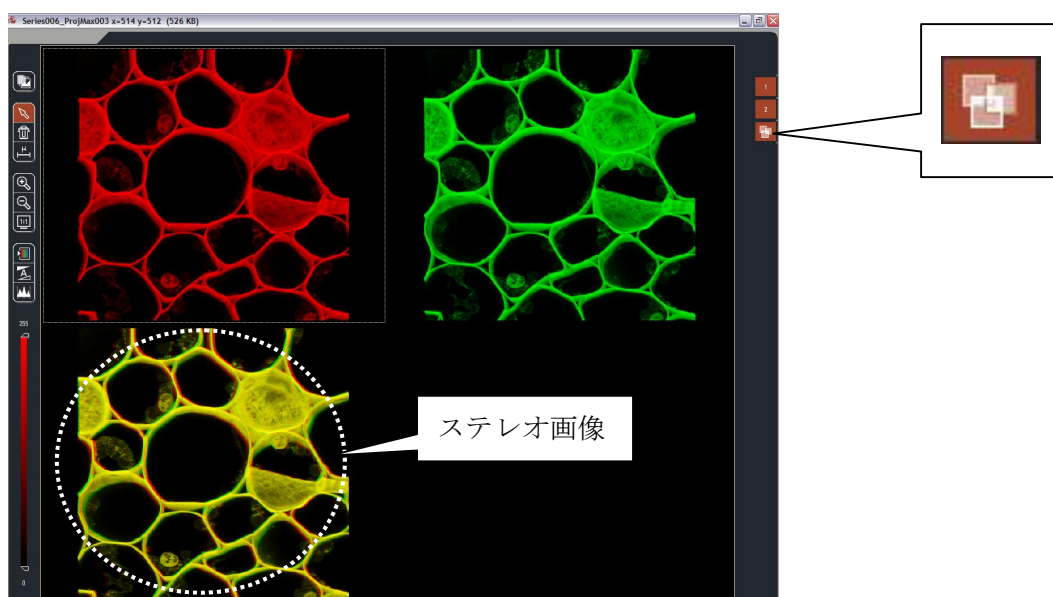
多重染色の場合にはどのチャンネルのデータでステレオ画像を作成するかを選択する。
(ステレオ画像は、複数チャンネルでは作成できません)

Stereo Angle

ステレオ表示で使用される 2 色(赤緑)の角度設定を行います。

5. Apply  ボタンを押します。作製されたステレオ画像が、Viewer に表示されます。
作成されたステレオ画像は、赤と緑の2チャンネルをオーバーレイした状態で完成します。

オーバーレイボタン  がアクティブになっていなければアクティブにします。



Dye Separation

Automatic

複数チャンネルで取り込んだ多重染色の画像データに対して散布図のアルゴリズムに従って処理を行い、蛍光の漏れこみの補正を行います。

1. Experiment タブにあるデータを選択し、Tools タブの Dye Separation / Channel を選択します。
2. Method から、Strong または、Weak を選択します。

データ取得に使用したチャンネル数を表示します

Manual Dye Separation

Method

Strong

Weak

Fluorescent Dyes:

2

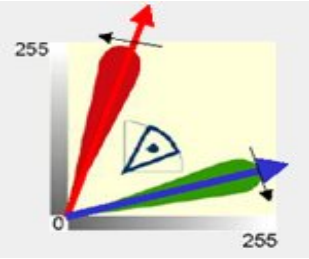
Rescale

Per Channel

All Channels

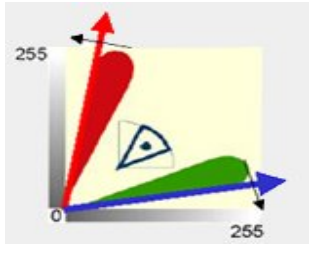
Strong

散布図の中心を基準に分離します



Weak

散布図の対応するチャンネル側を基準に分離します

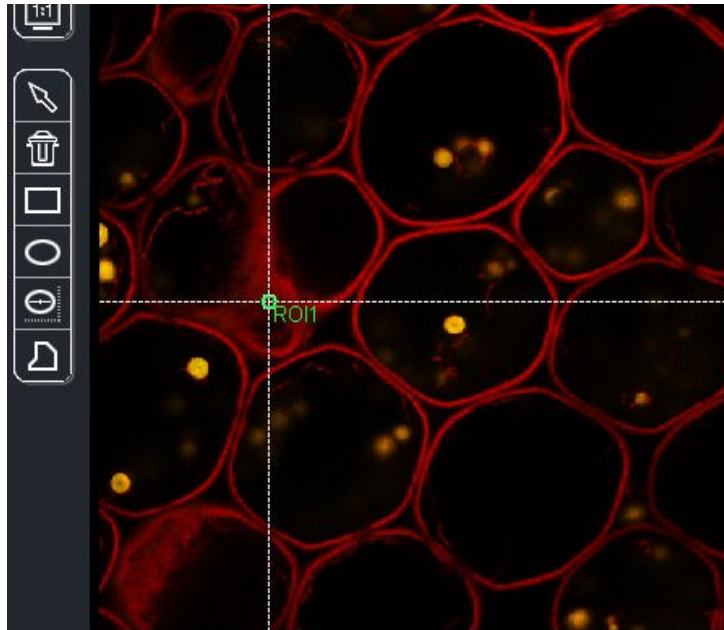


3. 設定が終了したら、Apply  ボタンを押します。

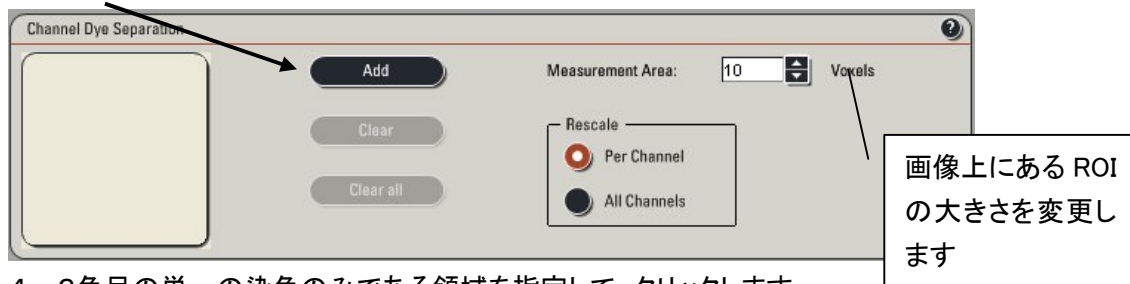
Channel

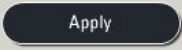
複数チャンネルで取り込んだ多重染色の画像データに対して、ユーザーが画像上で任意の蛍光シグナルの XY 座標を指定して処理を行い、蛍光の漏れこみの補正を行います。

1. Experiment タブにあるデータを選択し、Tools タブの Dye Separation / Channel を選択します。
2. 多重染色の画像上で単一の染色のみである領域を ROI で指定して、クリックします。ROI 上の領域における各色素の割合が、グラフとして、画像左側の画面に表示されます。



3. Add ボタンを押して登録します。



4. 2色目の単一の染色のみである領域を指定して、クリックします。
5. Add ボタンを押して登録します。
6. 3色目がある場合は、同様に指定してクリックしてください
7. Apply  ボタンを押して、実行します。

Spectral

ラムダスキャン(=波長方向に連続して取り込んだデータ、複数のチャンネルで取り込んだデータではない)によって取得したデータに対して解析を行うソフトです。

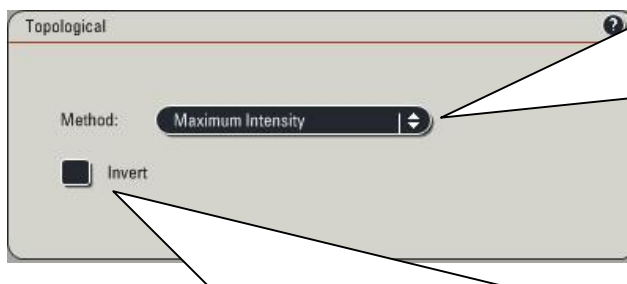
操作法については、IVスキャンバリエーションの2. Lambda Scan の「10. スペクトル情報をグラフ化」の項をご参照ください。

Topological

Topo Filter

深さ方向に取り込んだ連続断層像から、高さ表示の画像 (Topo 画像) を作成します。

1. Experiment タブにある深さ方向の連続断層データを選択し、Tools タブの Topo Filter を選択します。
2. Method を Maximum Intensity または Center of Mass から選択します。



Maximum Intensity


深さ方向に輝度をモニターし、最高輝度が得られた Z 位置を高さと認識する。

Center of Mass

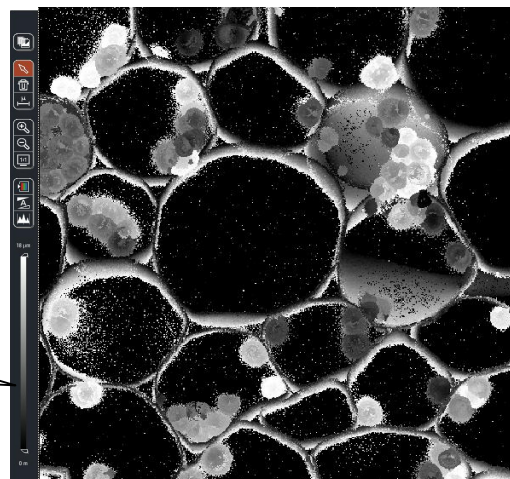
深さ方向に輝度をモニターし、輝度のカーブが描く全体のボリュームの中心を計算し、その Z 位置を高さと認識する。

Invert

深さの向きを逆にする。Topo 画像は、その元データとなる連続断層像取得時に設定した Z 方向の Begin と End の位置を元に作成されるので、深さの向きが逆の場合はアクティブにする。

3. Apply  を押します。Topo 画像が作成されます。

色は自動的に設定されるので、必要に応じて変更してください。



画像の色を変更する
カラーバー

Topo 画像:

高さ情報を明るさ(輝度)に切り替えて表示するので、画像の意味合いは下記のようになります。

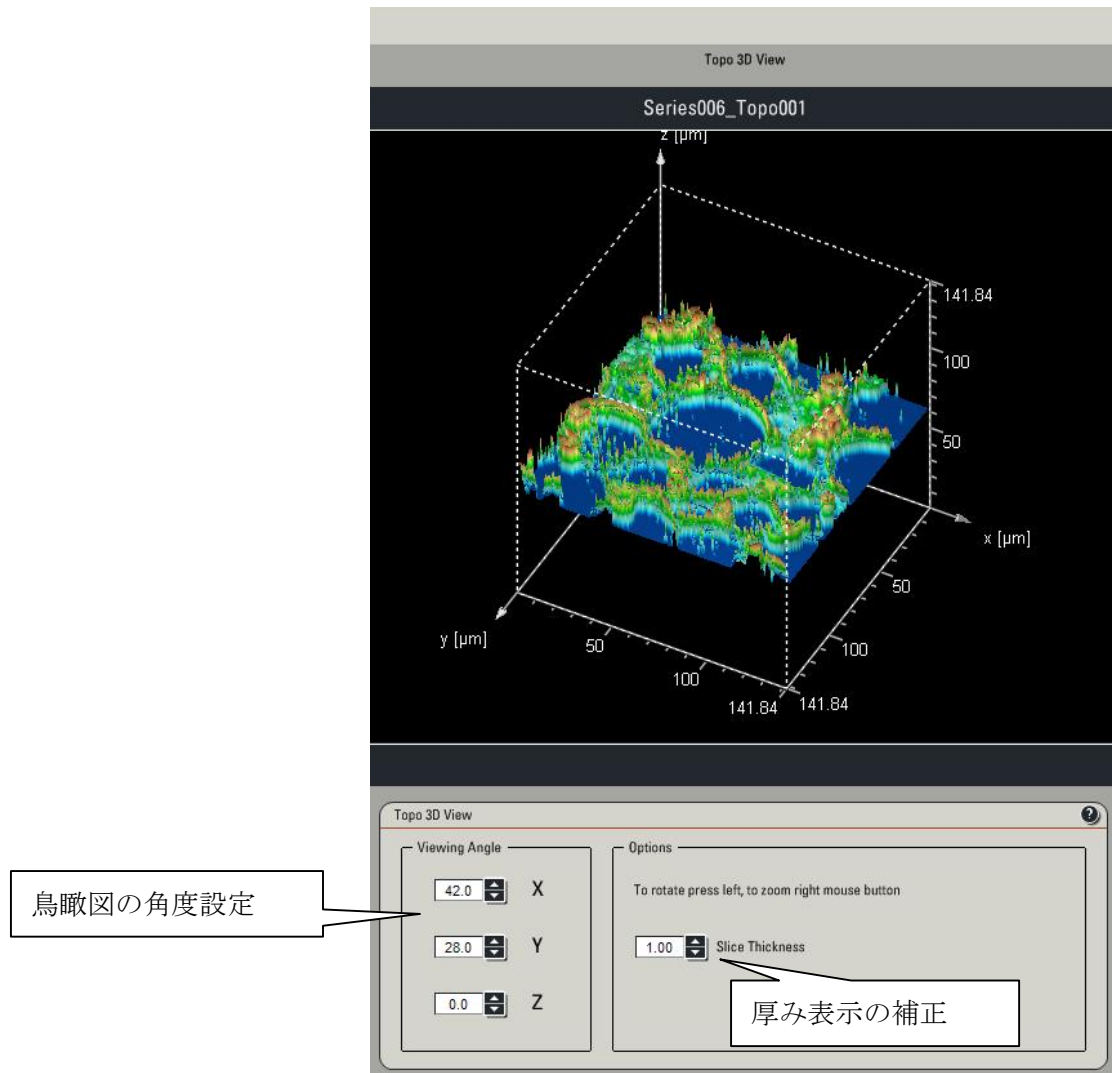
輝度(高): 高い位置に存在するシグナル

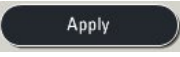
輝度(低): 低い位置に存在するシグナル

Topo 3D View

Topo 画像(前項目)から、鳥瞰図を作成します。

1. Experiment タブにある Topo 画像データ選択し、Tools タブの Topo 3D View を選択します。
表示された鳥瞰図をクリック&ドラッグするか、操作パネルに角度を入力して鳥瞰図の角度を設定します。



2. Apply  を押します。Topo 画像が作成されます。

Experiment タブに鳥瞰図データが作成されているので、必要に応じて保存します。

このデータは、Snapshot 形式で作成されます。



VI. Quantify

Quantify メニューは以下2つのモードに分かれています。

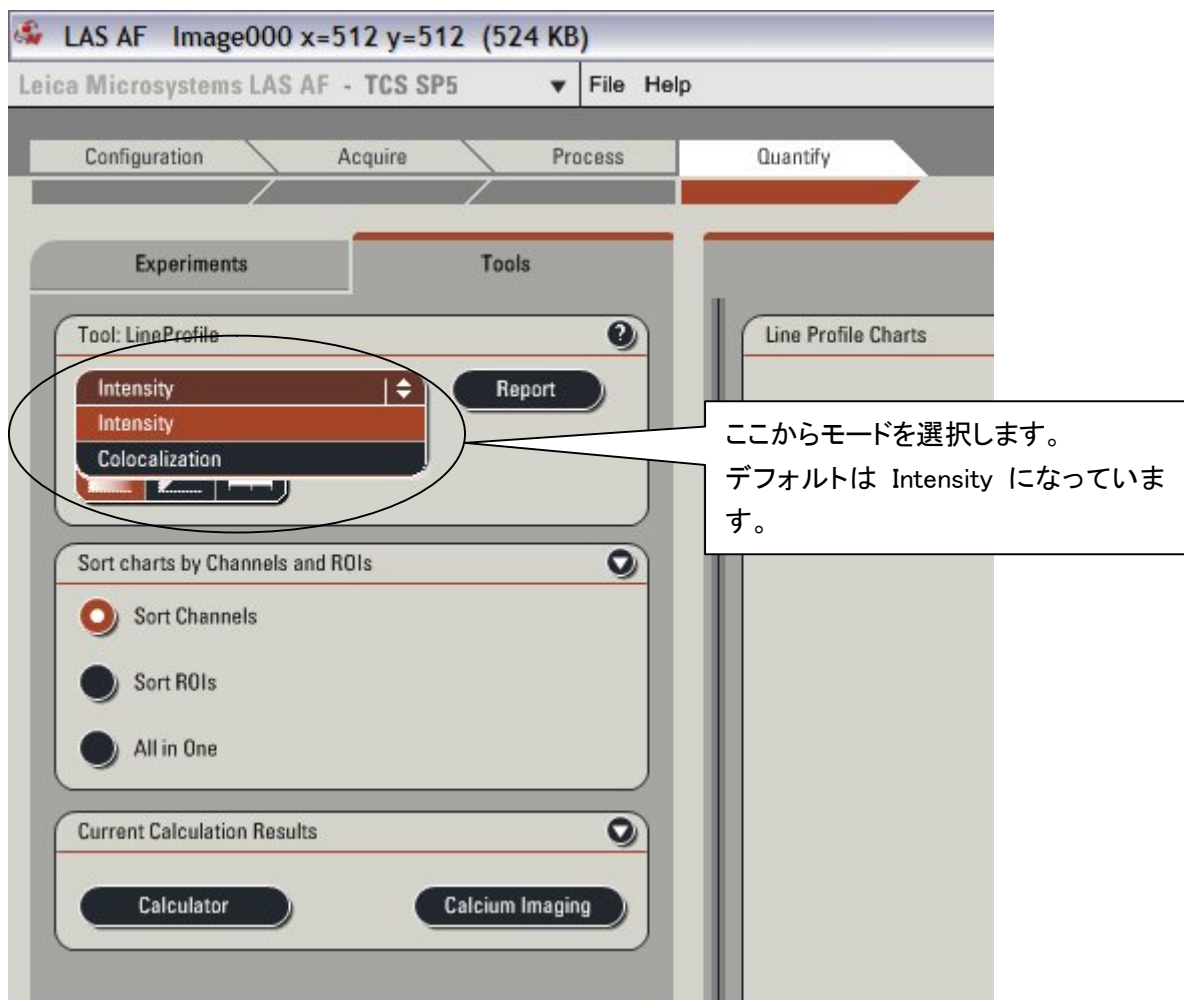
Intensity :

画像上での長さ、面積、輝度などの測定、及びレシオの設定とグラフの表示等。

Colocalization : (*オプションソフト)

多重染色時の共局在解析。

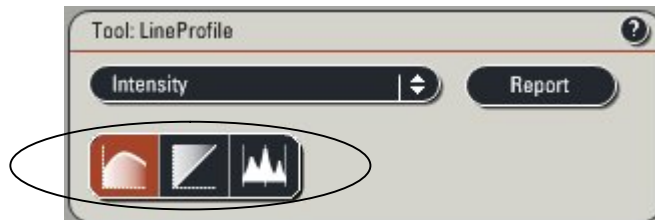
画像上で共局在している部分を特定し蛍光強度や面積等を数値化する。






VI – 1. Intensity

画像上での長さ、面積、輝度などの測定、及びレンオの設定とグラフの表示等。

モードは以下3つがあります。それぞれのボタンを押して測定モードを選択してから、実際の測定作業に入ります。



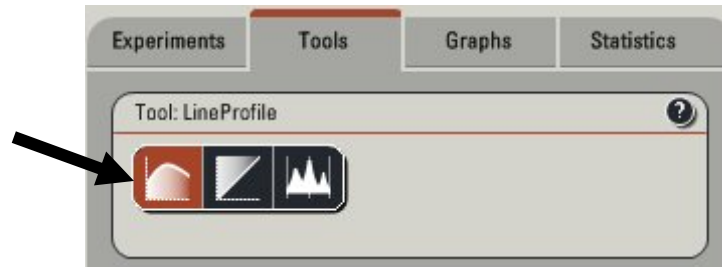
 <p>Line</p>	<p>ラインプロフィールツールは線に沿って強度分布の測定を行います。取得した画像に描いた線に沿って、強度データを画像から読み込んで、グラフや簡単な統計処理を行います。グラフをチャンネルごとに表示するか、ROI ごとに表示するか選択することができます。</p>
 <p>Stack</p>	<p>Stack Profile 機能は、ROI (Region of Interest) の中で輝度強度を測定して、それをグラフ表示や、様々な統計的な値について計算します。Stack Profile は、XYZ 画像や、Time-Lapse 画像に対して使用します。</p>
 <p>Histogram</p>	<p>Histogram はサンプル中で強度分布と頻度を測定します。Histogram 機能は、強度の頻度を測定して、カーブを表示して、様々な統計的な値について計算します。一平面において、設定された ROI 内のヒストグラムを表示させます。</p>



また、Stack Profile 機能で Calculator を用いると、ROI の中でチャンネルごとに測定した輝度強度から、Ratio データを取ることができます(後述の説明をご覧ください)。

Line Profile

ラインプロファイルツールは線に沿って強度分布の測定を行います。取得した画像に描いた線に沿って、強度データを画像から読み込んで、グラフや簡単な統計処理を行います。グラフをチャンネルごとに表示するか、ROI ごとに表示するか選択することができます。

1. Tools タグから Line Profile  を選択します。



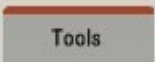
2. Viewer (画像が表示されているウインドウ) の左側に並んでいる  または  を使用し、画像上に線を描きます。

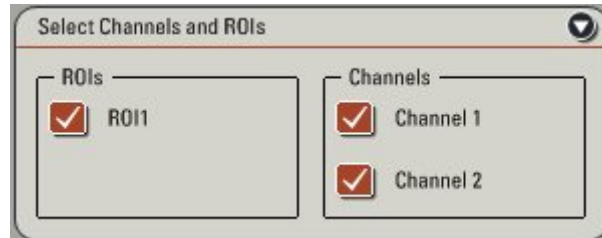
((注意))

Line Profile の時に、、、 も選択することができますが、グラフや統計に反映されません。



3. Graphs タグを押すと、2. で指定した線上値の結果をグラフで表示します。

Tools  タグにある Select Channels and ROIs でグラフ表示する条件を変更できます。チェックがついているものについて、表示するようになります。



Tools  タグにある Sort charts by Channels and ROIs でグラフ表示する方法を変更できます。

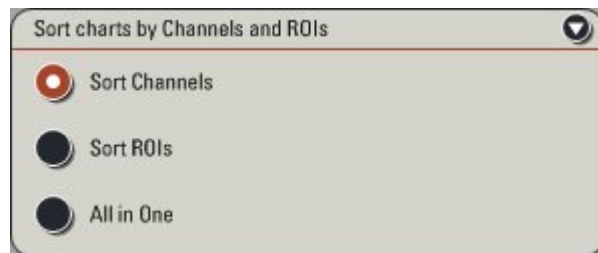
Sort Channels:

検出器ごとに結果を表示します。

Sort ROIs:

ROI ごとに結果を表示します。

All in One: 全てまとめて表示します。



グラフの数値データを抽出する

それぞれの輝度データは Excel ファイル形式で保存することが可能です。

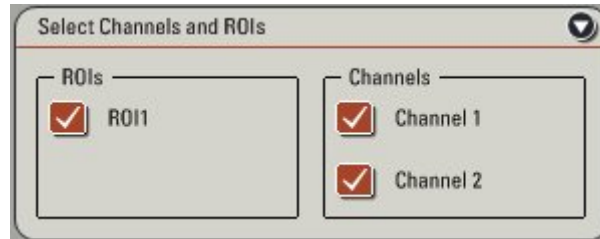
- ROI により、グラフ画面上で、マウス右クリックし、Export→Excel を選択する。



- ファイルの種類が Excel Files になっていることを確認して、ファイル名を入力して保存します。

4. Statistics を押すと、2. で指定した場所の結果を表示します。

Tools タグにある Select Channels and ROIs でグラフ表示する条件を変更できます。チェックがついているものについて、表示するようになります。



Tools タグにある Sort charts by Channels and ROIs でグラフ表示する方法を変更できます。

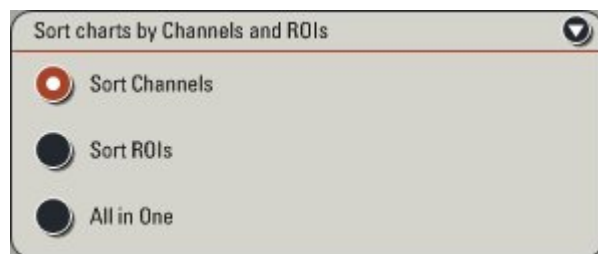
Sort Channels:

検出器ごとに結果を表示します。

Sort ROIs:

ROI ごとに結果を表示します。

All in One: 全てまとめて表示します。



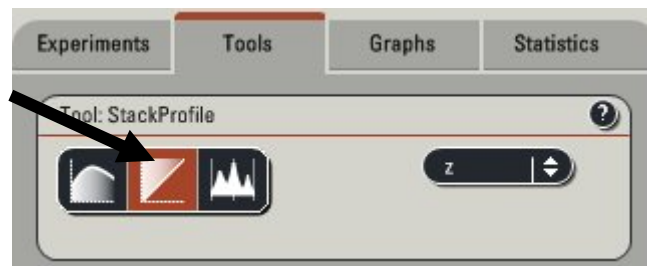
Line Profile における Statistics の Parameter について




Parameter	意味
Length	ROI で指定した領域の線の長さ
Pixels Count	ROI で指定した領域のピクセル数
Mean	ROI で指定した領域の平均輝度
Variance	ROI で指定した領域の分散
Standard Deviation	ROI で指定した領域の標準偏差
Average Deviation	ROI で指定した領域の平均偏差
Max. Amplitude	ROI で指定した領域の輝度の最大値
Max. Position	ROI の始点から、最大値を指名した位置の距離
Min. Amplitude	ROI で指定した領域の輝度の最小値
Min. Position	ROI の始点から、最小値を指名した位置の距離
Center of Mass Pos.	X 軸方向のシグナル全体のボリュームの中心値

Stack Profile

Stack Profile 機能は、ROI(Region of Interest)の中で輝度強度を測定して、それをグラフ表示や、様々な統計的な値について計算します。Stack Profile は、XYZ 画像や、Time-Lapse 画像に対して使用します。

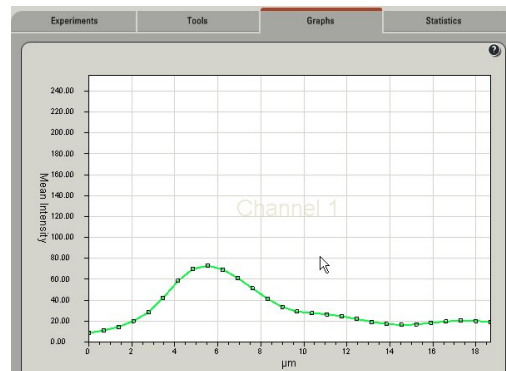
1. Tools  から Stack Profile  を選択します。

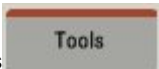


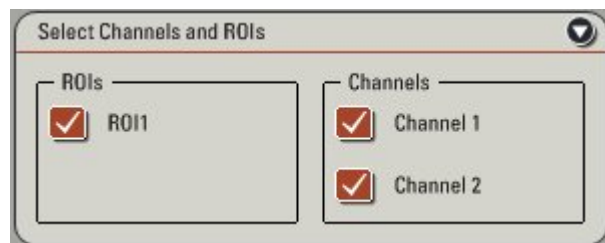
2. Viewer(画像が表示されているウインドウ)の左側に並んでいる  または  または  を使用し、画像上に線を描きます。

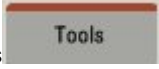


3. Graphs  を押すと、2. で指定した場所の結果を Graphs で表示します。



Tools  タグにある Select Channels and ROIs でグラフ表示する条件を変更できます。チェックがついているものについて、表示するようになります。



Tools  タグにある Sort charts by Channels and ROIs でグラフ表示する方法を変更できます。

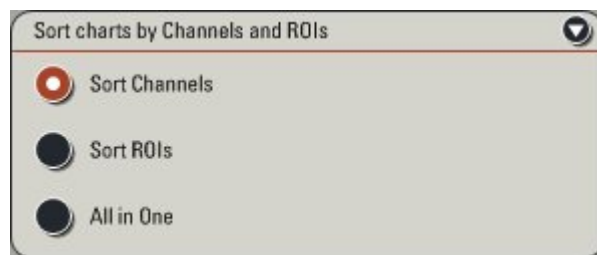
Sort Channels:

検出器ごとに結果を表示します。

Sort ROIs:

ROI ごとに結果を表示します。

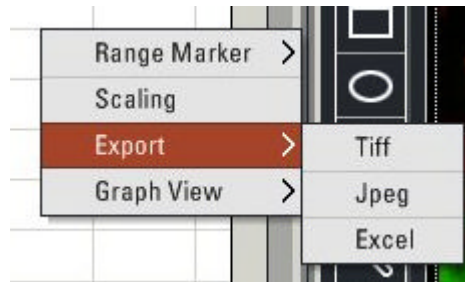
All in One: 全てまとめて表示します。



グラフの数値データを抽出する

それぞれの輝度データは Excel ファイル形式で保存することが可能です。

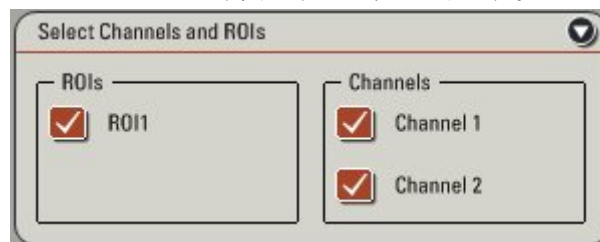
- ROI により、グラフ画面上で、マウス右クリックし、Export→Excel を選択する。



- ファイルの種類が Excel Files になっていることを確認して、ファイル名を入力して保存します。

- Statistics を押すと、2. で指定した場所の結果を表示します。

Tools タグにある Select Channels and ROIs でグラフ表示する条件を変更できます。チェックがついているものについて、表示ようになります。



Tools タグにある Sort charts by Channels and ROIs でグラフ表示する方法を変更できます。

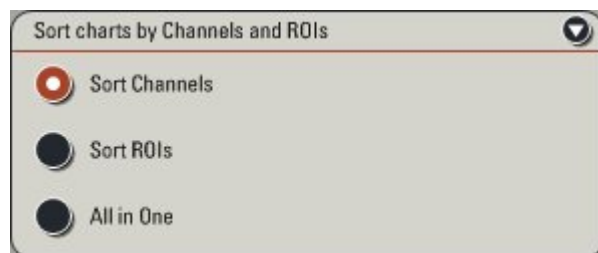
Sort Channels:

検出器ごとに結果を表示します。

Sort ROIs:

ROI ごとに結果を表示します。

All in One: 全てまとめて表示します。



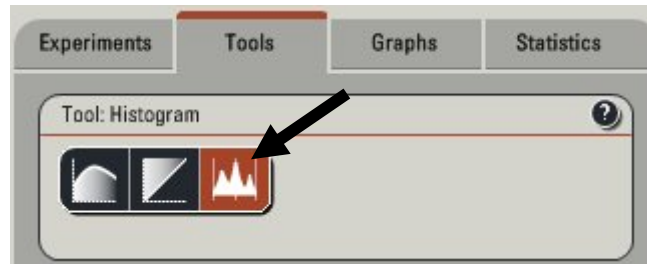
Stack Profile における Statistics の Parameter について




Parameter	意味
Mean Value	ROI で指定した領域(体積)の平均輝度
Pixel Count	ROI で指定した領域のピクセル数
Pixel sum	ROI で指定した領域(体積)のピクセル総数
Length	画像の取得開始点から終了点までの厚さ
Frame Counts	取得したフレーム数
Standard Deviation	ROI で指定した領域(体積)の標準偏差
Average Deviation	ROI で指定した領域(体積)の平均偏差
Max. Amplitude	ROI で指定した領域(体積)の輝度の最大値
Max. Position	Max.Amplitude が得られた位置(X 軸)
Min. Amplitude	ROI で指定した領域(体積)の輝度の最小値
Min. Position	Min.Amplitude が得られた位置(X 軸)
Center of Mass Pos.	X 軸方向のシグナル全体のボリュームの中心値

Histogram

Histogram はサンプル中で強度分布と頻度を測定します。Histogram 機能は、強度の頻度を測定して、カーブを表示して、様々な統計的な値について計算します。

1. Tools から Histogram  を選択します。

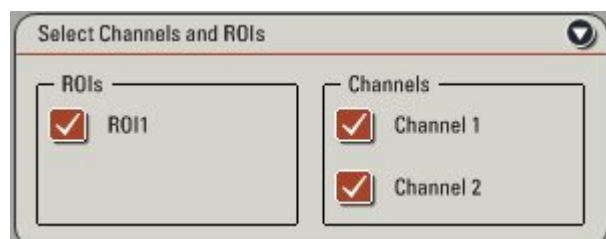


2. Viewer (画像が表示されているウインドウ) の左側に並んでいる  または  または  を使用し、画像上に線を描きます。



3. Graphs を押すと、2. で指定した場所の結果を Graphs で表示します。

Tools タグにある Select Channels and ROIs でグラフ表示する条件を変更できます。チェックがついているものについて、表示するようになります。



Tools  タグにある Sort charts by Channels and ROIs でグラフ表示する方法を変更できます。

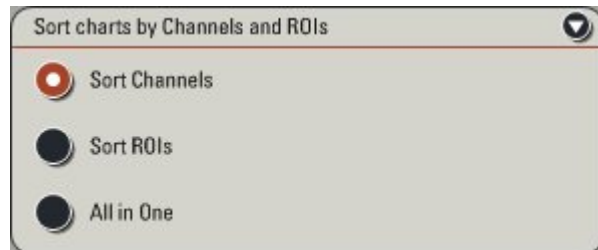
Sort Channels:

検出器ごとに結果を表示します。

Sort ROIs:

ROIごとに結果を表示します。

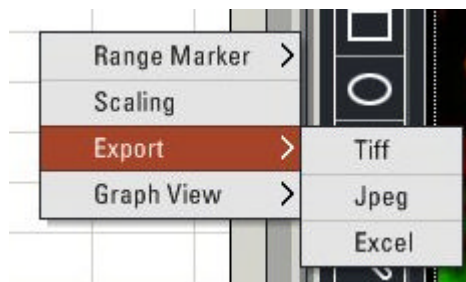
All in One: 全てまとめて表示します。



グラフの数値データを抽出する

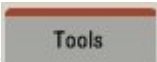
それぞれの輝度データは Excel ファイル形式で保存することが可能です。

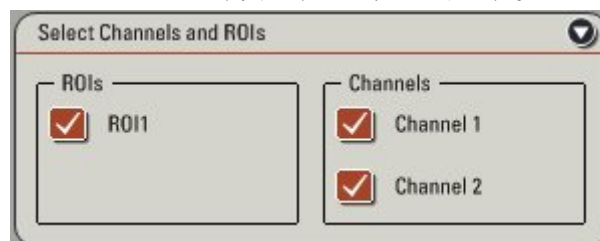
1. ROI により、グラフ画面上で、マウス右クリックし、Export→Excel を選択する。



2. ファイルの種類が Excel Files になっていることを確認して、ファイル名を入力して保存します。

4. Statistics を押すと、2. で指定した場所の結果を表示します。

Tools  タグにある Select Channels and ROIs でグラフ表示する条件を変更できます。チェックがついているものについて、表示するようになります。



Tools タグにある Sort charts by Channels and ROIs でグラフ表示する方法を変更できます。

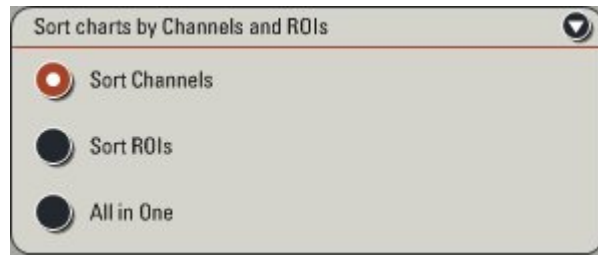
Sort Channels:

検出器ごとに結果を表示します。

Sort ROIs:

ROI ごとに結果を表示します。

All in One: 全てまとめて表示します。



Histogram における Statistics の Parameter について

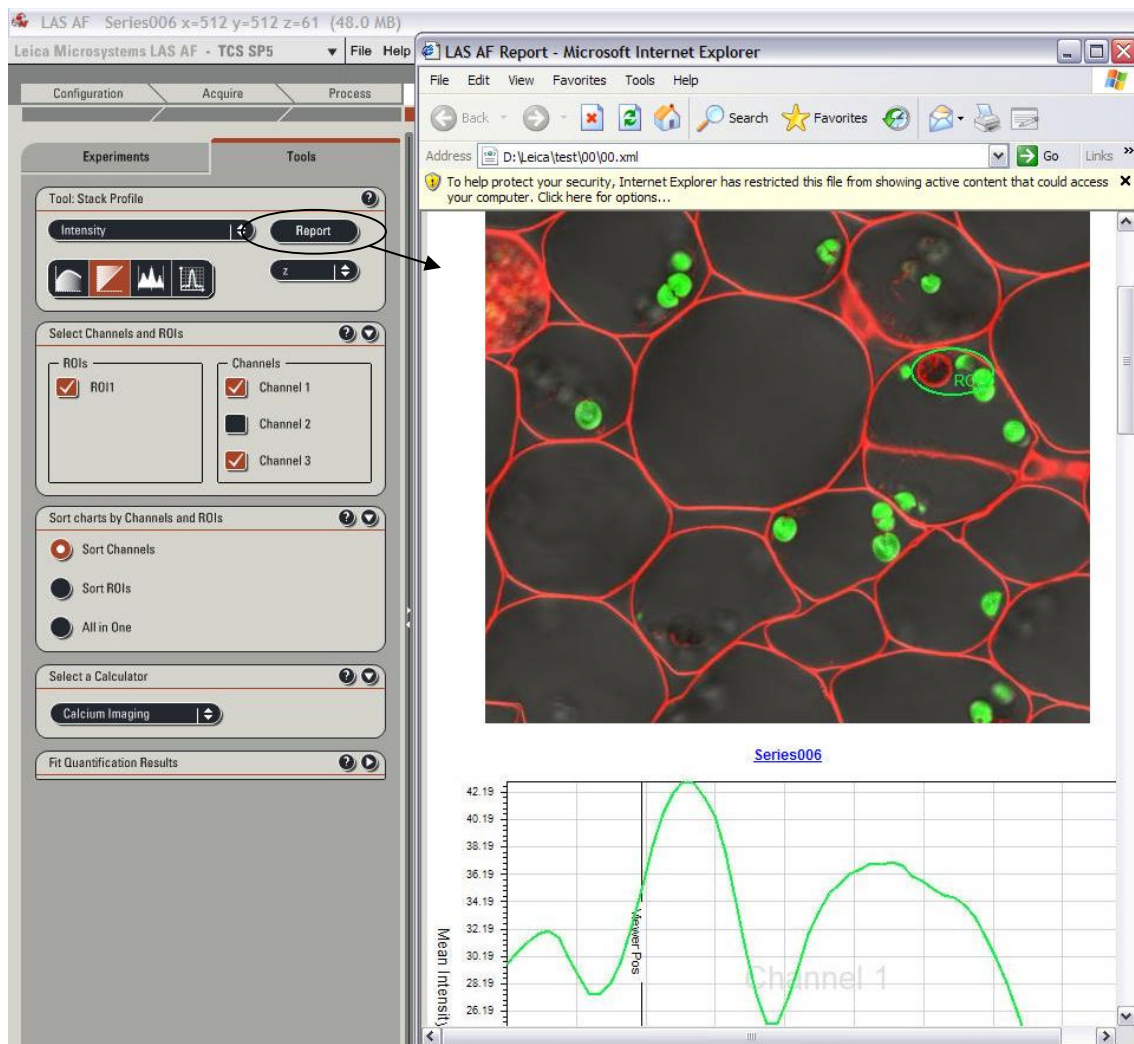
Parameter	意味
Area	ROI で指定した領域の面積 (表面の凹凸を含まない)
Mean Value	ROI で指定した領域の平均輝度
Pixel Count	ROI で指定した領域のピクセル数
Pixel sum	ROI で指定した領域の総ピクセルの輝度の総和
Maximum	ROI で指定した領域の輝度の最大値
Minimum	ROI で指定した領域の輝度の最小値
Variance	ROI で指定した領域の輝度の分散
Standard Diviation	ROI で指定した領域の輝度の標準偏差
Average Diviation	ROI で指定した領域の輝度の平均偏差
Maximum peak	ROI で指定した領域の輝度の最高値
Minimum Valley	ROI で指定した領域の輝度の最高値
Volume	ROI で指定した領域の体積 (Z 方向は垂直に測定)
Surface area	ROI で指定した領域の表面積 (表面の凹凸込み)
Surface ara/area	ROI で指定した領域の表面積 (凹凸込み) / 面積 (凹凸含まず)

Report ボタンによる結果出力

Report ボタンによって、測定結果を .xml形式で出力が可能です。



測定を行ったら Report ボタンを押します。まず保存画面が表示されますので、保存作業を行います。保存が終了すると、下記のように保存された xml ファイルが表示されます。



Report ボタンによって保存されたデータはフォルダ形式で保存されています。

その中に複数のファイルが入っていますが、保存時のファイル名を開くと上記のxmlファイルが開きます。また、個別の画像、グラフなども別々に保存されていますので、個別に開くこともできます。また、グラフデータはcsvデータ(テキストデータ)としても保存されていますので、そのデータをエクセルで使用することも可能です。

Ratio 測定

ここでは Time Lapse との併用を例にご説明します。

1. タイムラプスの設定(「IV-2. Time Lapse」を参考にしてください)

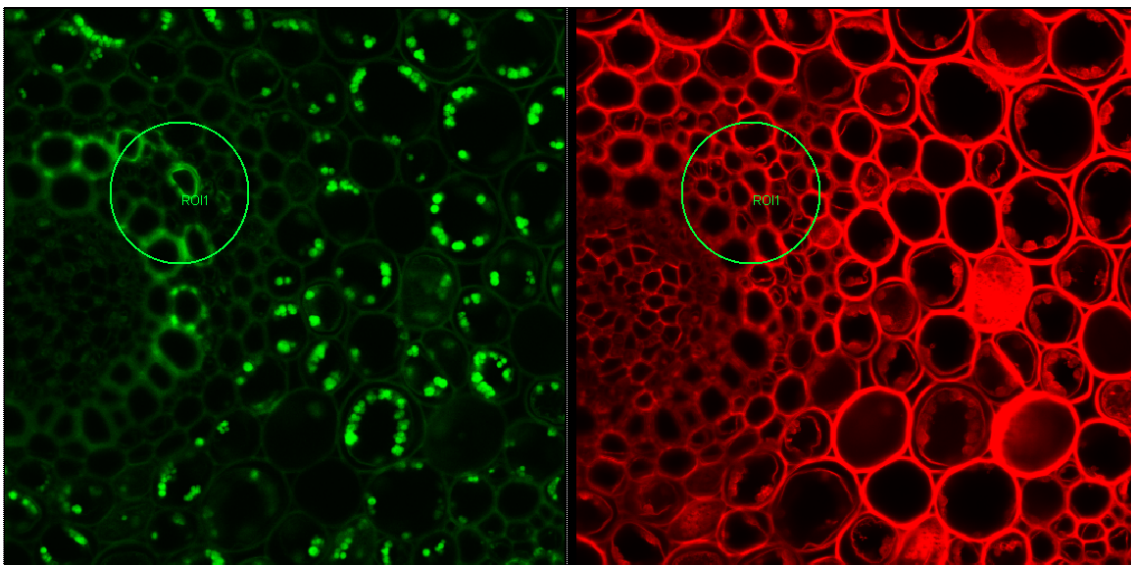
- 1) Acquisition Mode から XYtなどのタイムラプスモードを選択します
- 2)取得画像の調整をします(「II.基本操作」を参考にしてください)
- 3)時間軸方向の取り込み条件を設定します

2. Quantify メニューから Stack Profile を選択する

3. 計測範囲を指定

Viewer 画面に表示されている画像上に ROI を描き、計測範囲を指定します。

 または  または  を使用し、画像上に線を描きます。



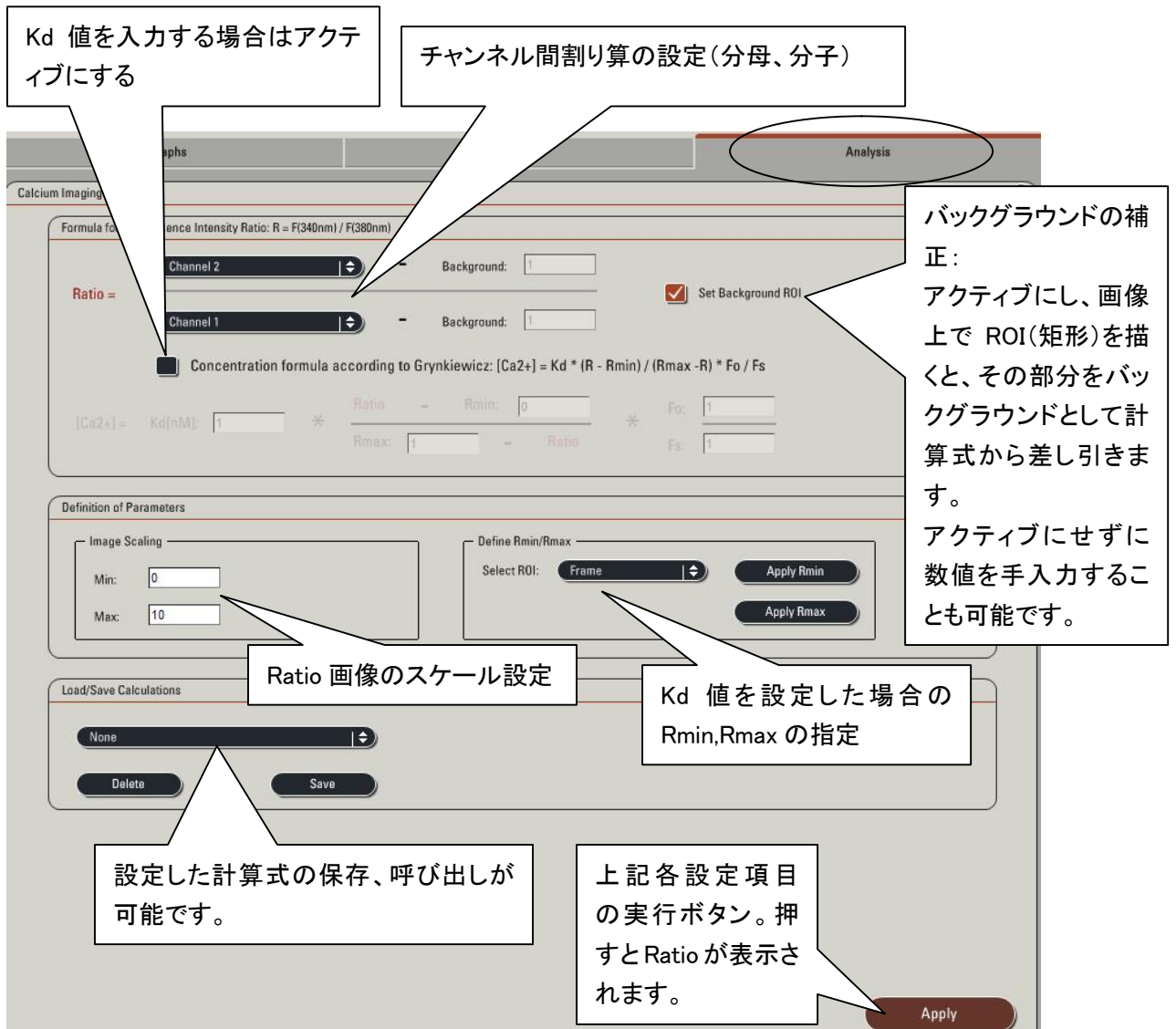
5. Tools タブの Select a Calculator で Calcium Imaging を選択します。



6. 計測の設定を入力

Analysis タブを開き、必要項目を設定します。

設定後、右下の Apply ボタンをクリックしてください。Ratio 画像が表示されます。



Kd 値を入力する場合はアクティブにする

チャンネル間割り算の設定(分母、分子)

バックグラウンドの補正:
アクティブにし、画像上で ROI(矩形)を描くと、その部分をバックグラウンドとして計算式から差し引きます。アクティブにせずに数値を手入力することも可能です。

Ratio 画像のスケール設定

Kd 値を設定した場合の Rmin, Rmax の指定

設定した計算式の保存、呼び出しが可能です。

上記各設定項目の実行ボタン。押すと Ratio が表示されます。

Formula for Concentration Intensity Ratio: $R = F(340nm) / F(380nm)$

Ratio = $\frac{\text{Channel 2}}{\text{Channel 1}}$

Background: 1

Set Background ROI

Concentration formula according to Grynkiewicz: $[Ca^{2+}] = Kd * (R - Rmin) / (Rmax - R) * Fo / Fs$

[Ca²⁺] = Kd(nM): 1 * Ratio - Rmin: 0 * Fo: 1 / Rmax: 1 - Ratio * Fs: 1

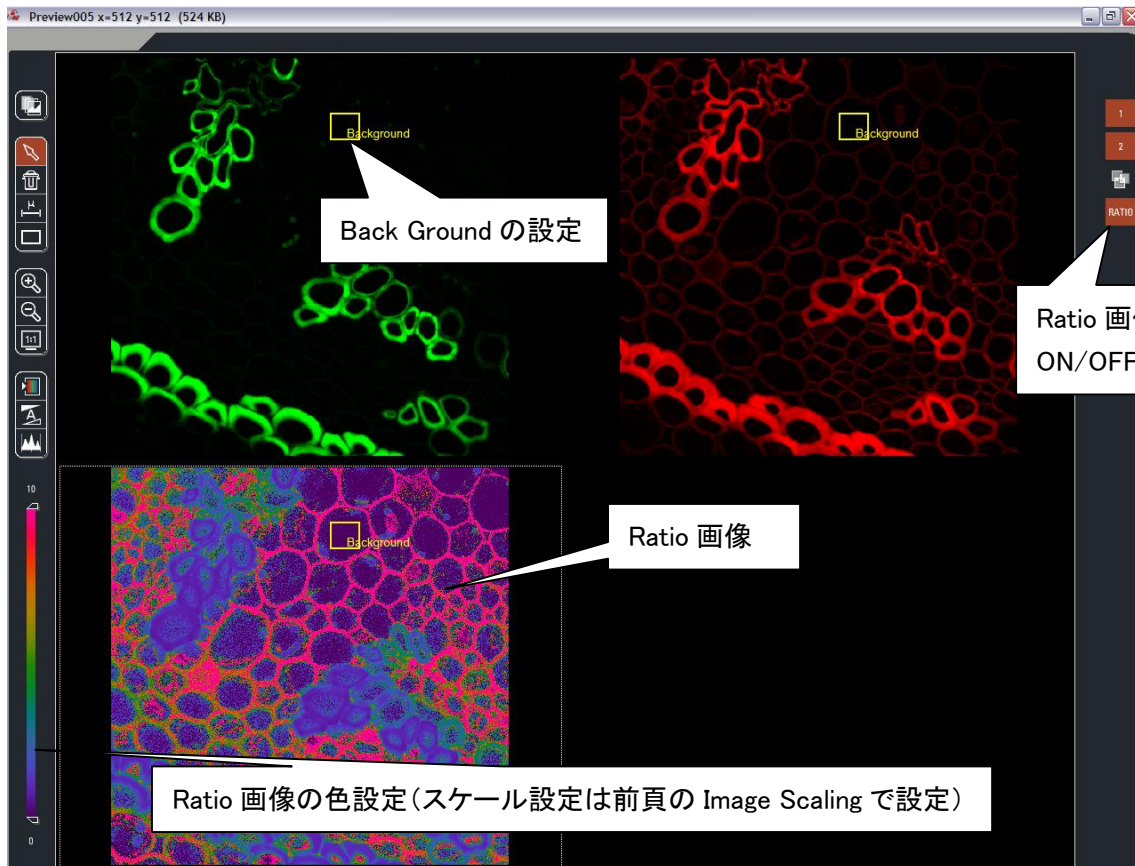
Definition of Parameters

Image Scaling: Min: 0, Max: 10

Define Rmin/Rmax: Select ROI: Frame, Apply Rmin, Apply Rmax

Load/Save Calculations: None, Delete, Save

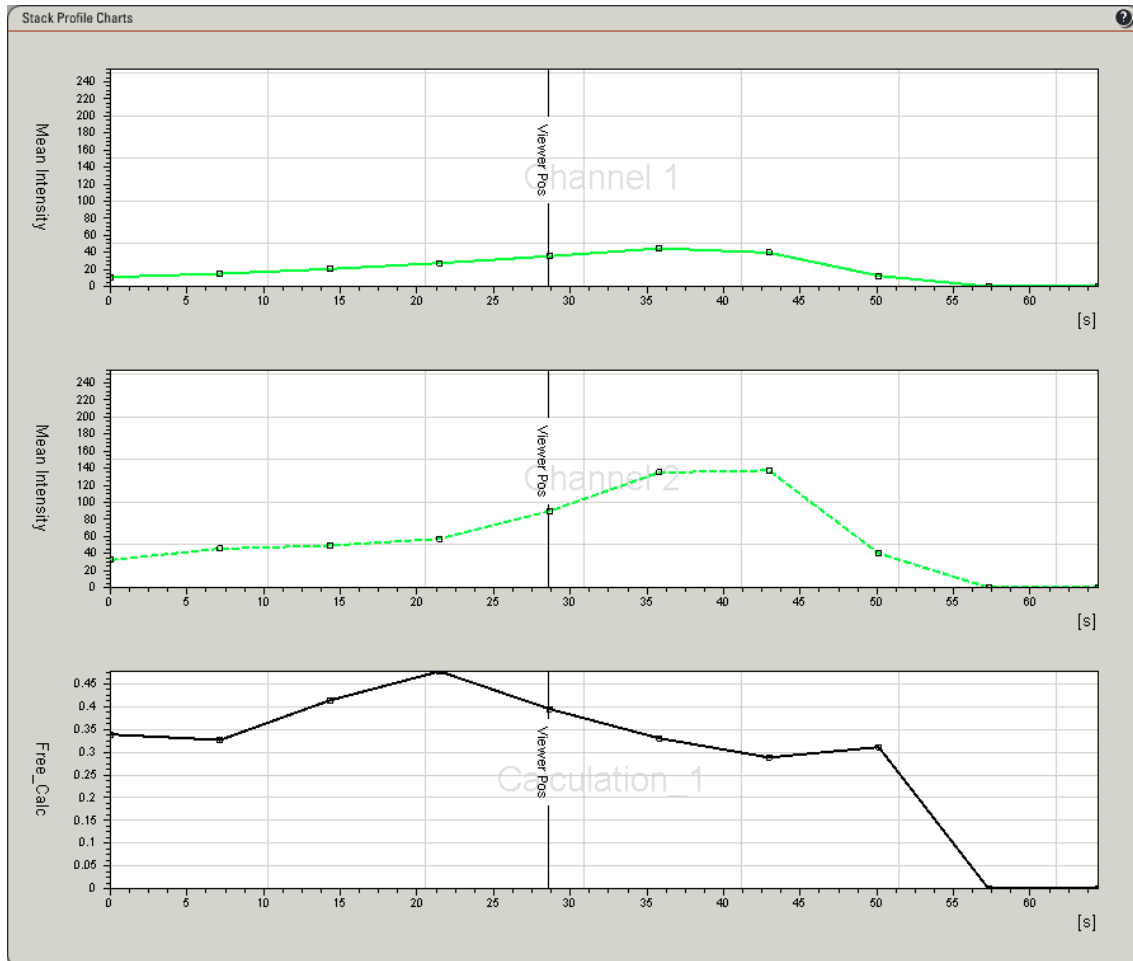
Apply



6. データ取得の開始

Start  ボタンを押します。

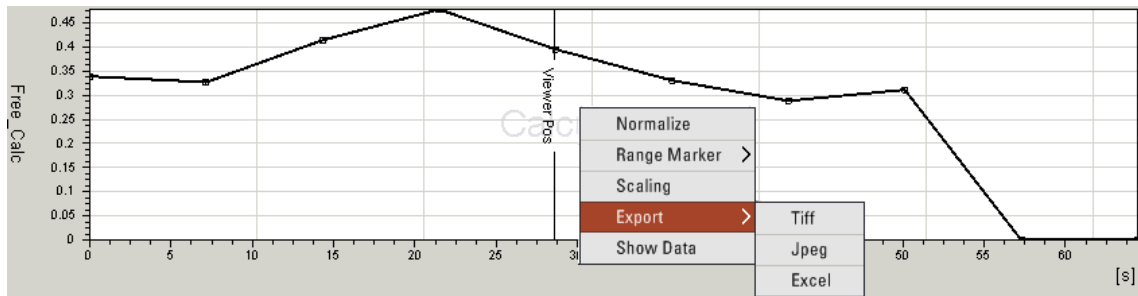
グラフのタブを開くと、時間経過にしたがって、チャンネルごとの蛍光強度の変化がライブでグラフ表示されます。



7. グラフの数値データを抽出する

それぞれの輝度データは Excel ファイル形式で保存することが可能です。

1) グラフ画面上で、マウス右クリックし、Export→Excel を選択します。

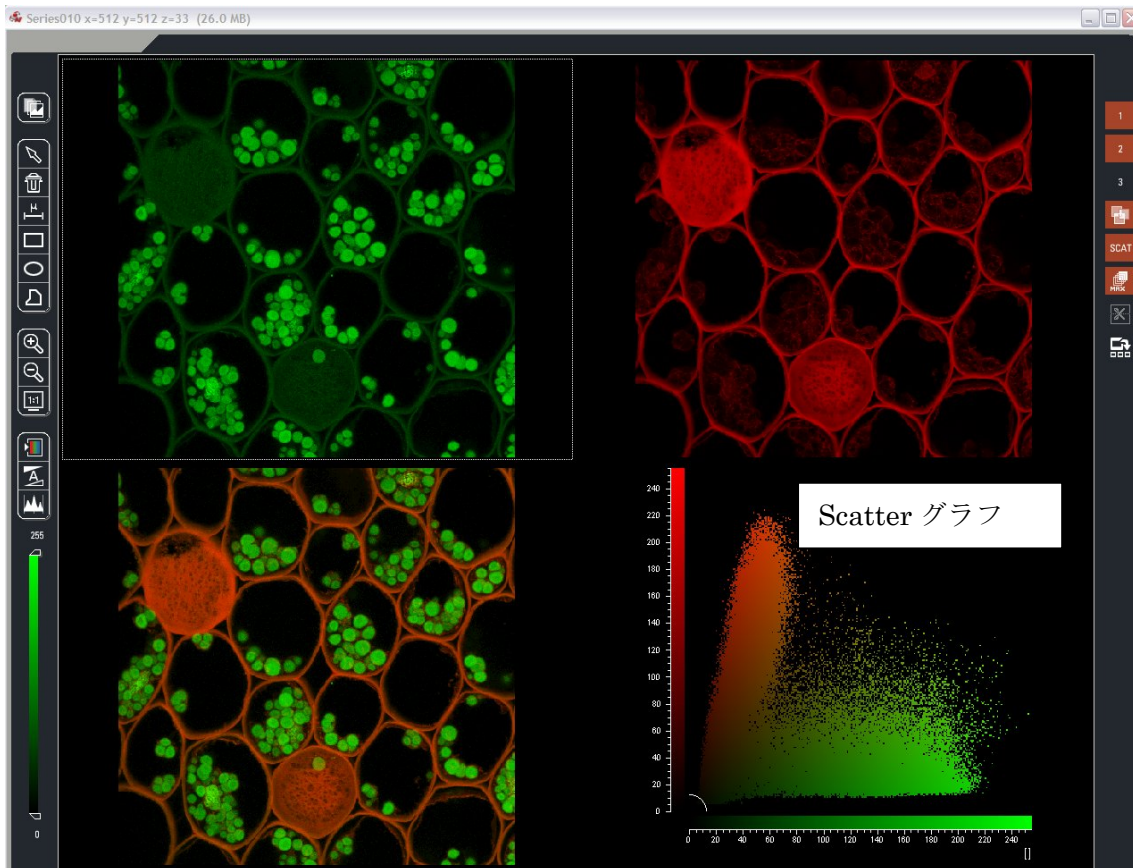


2) ファイルの種類が Excel Files になっていることを確認して、ファイル名を入力して保存します。

VI-2. Colocalization (*オプションソフト)

多重染色時の共局在解析。

画像上で共局在している部分を特定し蛍光強度や面積等を数値化する。

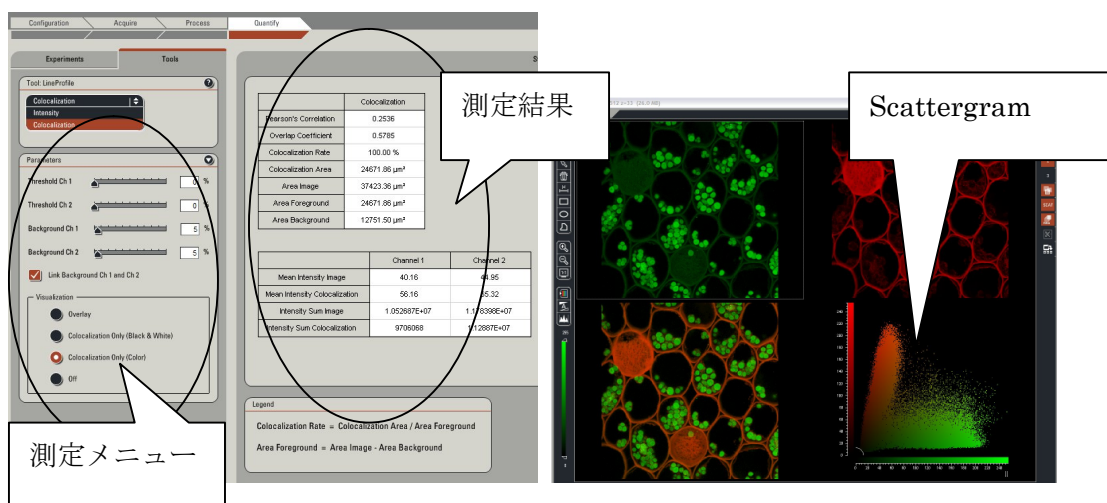


① まず 2 重染色 of 画像を取り込むか、ファイルから開きます。

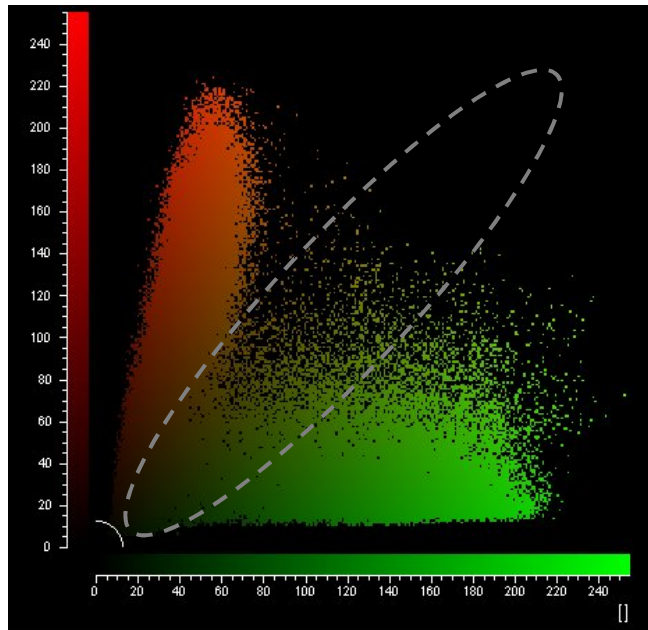
② Quantify メニューの Tools タブで、「Intensity」になっているモードを Colocalization に変更します。(オプションソフトですのでインストールされていない場合は Intensity モードのみになります)



③ Colocalization メニューが開き、Viewer には Scattergram (散布図) が表示されます。



Scattergram(散布図)は画像上の2チャンネル間のシグナル分布を表しているものです。シグナルが横軸に近ければ近いほど、純粋なチャンネル1のシグナル、縦軸に近ければ近いほど純粋なチャンネル2のシグナルを意味します。点線で示すような、対角線上にシグナルがある場合(縦軸や横軸から遠い)、双方のチャンネルで同じ割合でシグナルが存在(共局在)していることになります。

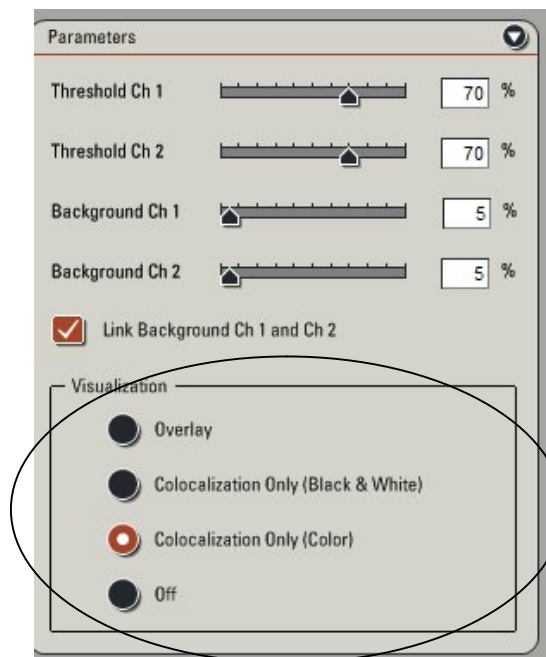


④メニューの Threshold と BackGround を操作して、Scattergram上の共局在領域を指定します。Background はデフォルトで2チャンネルがリンクするように設定されています。

Threshold で指定された領域

Background で指定された領域

⑤ 共局在領域の画像上への表示方法を選択します。



Overlay:

オリジナル画像の上に共局在を指定した部分が白で表示される。

Colocalization Only(Black & White):

共局在を指定した部分のみを白で表示

Colocalization Only(Color):

共局在を指定した部分のみをオリジナルカラーで表示

Off:

共局在を指定した部分を表示せず、オリジナルの画像のみを表示する。

⑥ 指定した共局在領域の測定値が表示されています。

	Colocalization
Pearson's Correlation	0.7615
Overlap Coefficient	0.8123
Colocalization Rate	33.03 %
Colocalization Area	5676.63 μm^2
Area Image	22144.27 μm^2
Area Foreground	17185.58 μm^2
Area Background	4958.69 μm^2

Peason's Correlation :

ピアソンの相関係数。計算された相関係数がゼロでないという確率。相関係数の有意水準。

Overlap Coefficient : オーバーラップ係数

Colocalization Rate : Colocalization Area を Area Foreground で割った値

Colocalization Area : 指定した共局在領域

Area mage : 画像全体の面積

Area Foreground : 画像全体の面積から Background を差し引いた面積

Area Background : Background で指定した面積

	Channel 1	Channel 2
Mean Intensity Image	38.21	90.65
Mean Intensity Colocalization	132.06	169.62
Intensity Sum Image	1.001547E+07	2.376379E+07
Intensity Sum Colocalization	8874300	1.139859E+07

Mean Intensity Image : 画像全体の蛍光強度の平均値。

Mean Intensity Colocalization : 指定された共局在領域の蛍光強度の平均値

Intensity Sum Image : 画像全体の蛍光強度の総和

Intensity Sum Colocalization : 指定された共局在領域の蛍光強度の総和

⑦これら二つの表の数値データは、表上で右クリックすることによって出力できます。右クリックで Export という表示になりますので、Export を左クリックすると数値データを保存する画面になります。Excel でインポートできるデータです。

	Colocalization
Pearson's Correlation	0.7615
Overlap Coefficient	0.8123
Colocalization Rate	44.39 %
Colocalization Area	9829.61 μm^2
Area Image	22144.27 μm^2
Area Foreground	22144.27 μm^2
Area Background	0.00 μm^2


Export

VII. SHUT DOWN

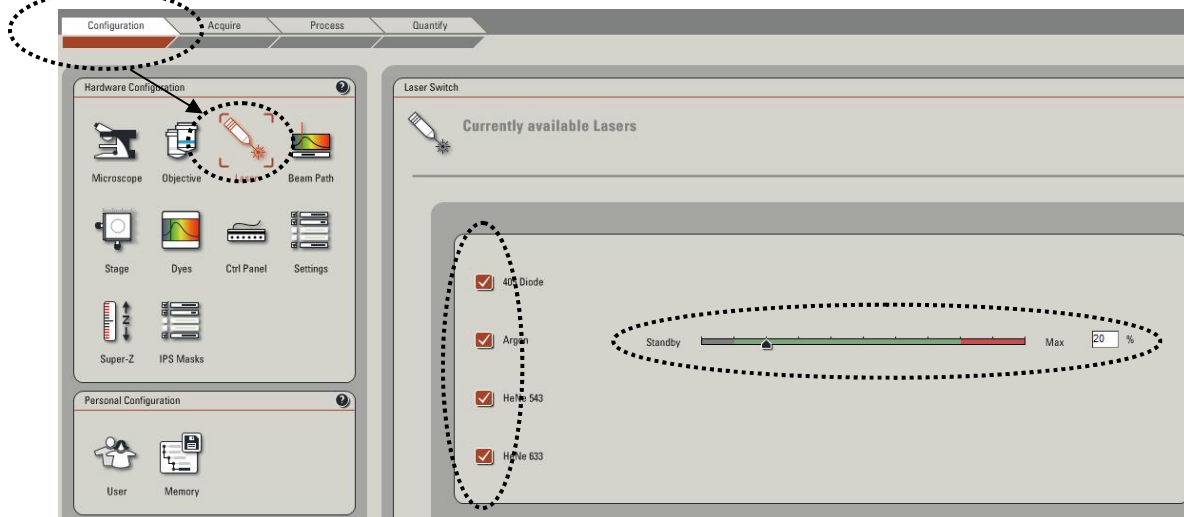
1. ソフト上からレーザー OFF

Configuration タブ  を開き、Hardware Configuration の中の



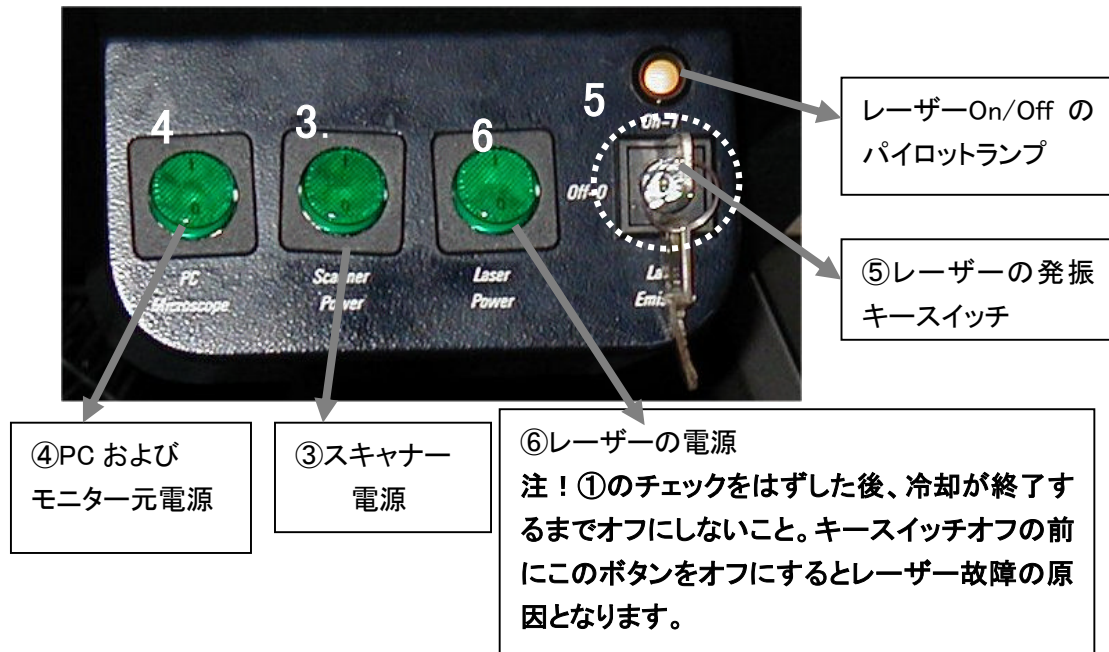
Laser アイコン  をクリックし、アクティブになっているチェックボックスをシングルクリックでデアクティブにし、オフにします。Ar レーザーを使用していた場合はパワーを0%に落としてからチェックボックスをオフにしてください。

注意)ダブルクリックすると、レーザーOFF の直後に ON にすることとなり、頻繁に繰り返すと故障の原因になりますのでご注意ください。



2. ソフトウェア LAS AF 及び PC を終了

必要なデータを保存後ソフトを終了し、画面左下 Start ボタンから XP を Shutdown してください。



3. スキャナーの電源 OFF（真中の緑のボタンを OFF）

4. PCおよびモニターの電源 OFF（左の緑のボタンを OFF）

XP が終了するまで待ち、モニターが暗くなるのを確認してからオフにしてください。

5. 1. でレーザーをOFFにした後、約 5 分位でArレーザーのファンが自動的に止まるので、それを確認してレーザーの発振キースイッチを OFF

6. レーザーの電源OFF(一番右の緑のボタンを OFF にする。)

注意！”1” および ”5 “のレーザーのオフより前に” 6 ”のレーザーの電源(冷却)をオフにしないこと。レーザーオフの前に冷却が止まることになり、レーザー故障の原因となります。

7. 水銀ランプの電源ボックスのスイッチを OFF

1～2時間位使用しない場合はOFFにする。点灯直後に消灯しないこと、また再点灯はランプが冷えてから行う。ランプハウスは非常に高温になるため注意のこと。作業終了後、ビニールのカバーをかぶせるときにランプハウスが充分冷えているのを確認すること。

下記いずれかのモデルとなります。 **注意**)どちらも頻繁にON/OFFしないこと。



水銀ランプ(100W)
再点灯はランプハウスが冷えてから(15～30分待つて)行う。
またランプハウスは非常に高温となるため、使用後ビニールカバーをかけるときは注意すること。



超高圧水銀ランプ(120W)
再点灯は5分ほど待つてから行う。
(電源内部で点灯しているのでランプハウスは無し)

8. 液浸(オイル・水・グリセリン)対物レンズのクリーニング

9. 顕微鏡の電源を OFF

(下記どちらかのモデルとなります)



ライカマイクロシステムズ株式会社 連絡先

<東京本社>

〒108-0072 東京都港区白金 1-27-6
白金高輪ステーションビル 6F
TEL:03-5421-2815
FAX:03-5421-2891

<大阪セールスオフィス>

〒531-0072 大阪市北区豊崎 5-4-9
商業第二ビル 10F
TEL:06-6374-9771
FAX:06-6374-9772

日本語サイト:

http://www.leica-microsystems.co.jp/website/su_jp.nsf

English site:

http://www.confocal-microscopy.com/website/sc_llt.nsf