



Living up to Life



# TCS SP8

Advance

LAS X

20200529

<b>I. 画像表示画面</b>	1
1. Comparison view (異なる画像の並列表示)	1
2. Snapshot (表示画像のキャプチャ)	1
<b>II. スキャンバリエーション</b>	2
1. Time Lapse (XYZ 画像の経時取り込み)	2
2. XT Scan (X ライン画像の経時取り込み)	3
3. XZ Scan スーパー Z ガルバノステージ(オプション)	4
* スーパー Z ガルバノステージ可動範囲の設定	6
4. Lambda Scan	7
5. Z 方向に強度の補正をしながら Scan する	12
6. ROI Scan (任意エリアのスキャン)	15
<b>III. スキャニングステージ使用方法 (オプション)</b>	17
1. Tile Scan	18
* キャリブレーション方法	23
2. マルチポイント (Mark & Find)	24
<b>IV. Live Data Mode (高度なタイムラプス)(オプション)</b>	27
<b>V. Adaptive Focus Control (AFC)(オプション)</b>	33
<b>VI. Process</b>	38
1. Edit	39
1. Crop	39
2. Resize	40
3. Combine	41
4. Shading	42
5. Merge	43
6. Mosaic Merge	44
7. Manual Image Alignment	46
8. Projection	46
2. Adjust	47
1. Sharpens	47
2. Phase	47
3. Colors	48

4. HSL/HSV Colors	48
5. Background	49
6. Baseline	49
3. Noise Reduction	50
1. Median	50
2. Blur	50
4. Segmentation	51
1. Threshold	51
2. Morphological Filters	51
3. Seeding	52
5. Dye Separation	53
1. Automatic Dye Separation	53
2. Channel Dye Separation	55
3. Spectral Dye Separation	56
6. Topological	57
1. Topological Filter	57
2. Topological 3D View	57
7. Excitation Emission Scans	58
1. Excitation / Emission Contour Plot	58
2. Excitation / Emission 3D View	59
<b>VII. Quantify</b>	60
1. Intensity	60
1. Line Profile	60
2. Stack Profile	61
3. Histogram	61
4. Determine FWHM	62
2. Tool	64
1. Select Channels and ROIs	64
2. Sort charts by Channels and ROIs	64
3. Select a Calculator	65
3. Colocalization	68
<b>VIII. 3D Viewer</b>	70
1. 3D Viewer の起動と基本操作	70
2. 3D Viewer メニュー	71
1. Projection Procedure	72

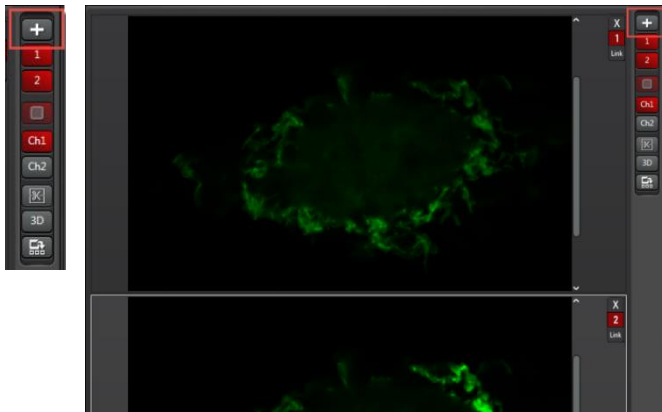
2. Function for Displaying Images	75
3. Orthogonal Sections	76
4. Clipping Planes	77
5. Movie Editor	79
3. 3D Annotations	81
4. Processing	82
5. Processing Processes	83

## I. 画像表示画面

### I-1. Comparison view

異なる画像を並列表示することができます

左下画像赤枠内の「+」ボタンを押すと、右下画像のように2画面表示になります  
(複数回押すと、複数画面表示になります)



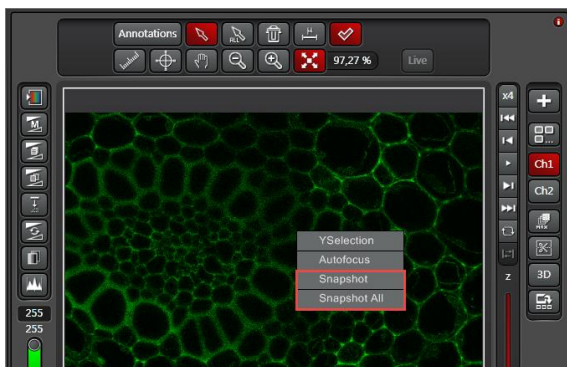
下図矢印部分の「Link」を押すと、LINK を押した画像間の Zoom、Z、時間、位置などの操作が同期します

X を押すと表示が OFF になります



### I-2. Snapshot

画像上で右クリックすると、下図赤枠内のように Snapshot または Snapshot All が表示されます



**Snapshot** : 右クリックした Channel だけの Screenshot 画像を作成します

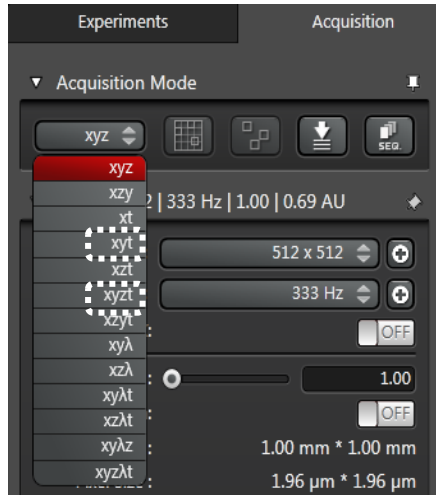
**Snapshot All** : 右クリックした画像のすべての Channel および Overlay の Screenshot を作成します

新しく作成されたデータは、元のデータ名の後ろに「Snapshot~」または「Snapshot all~」がつきます

## II. スキャンバリエーション

### II-1. タイムラプスの設定(xyt、xyzt)

#### 1. 撮影モードの選択



Acquisition Mode から xyt または xyzt を選択します

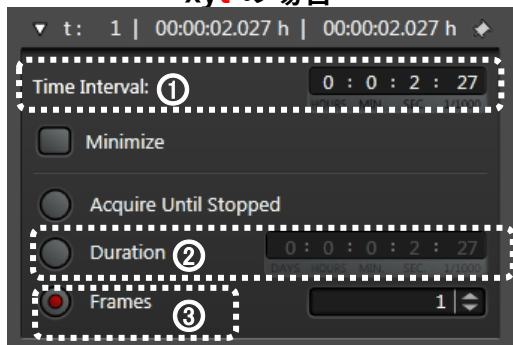
**xyt** : XY 画像のタイムラプス

**xyzt** : XYZ 画像のタイムラプス

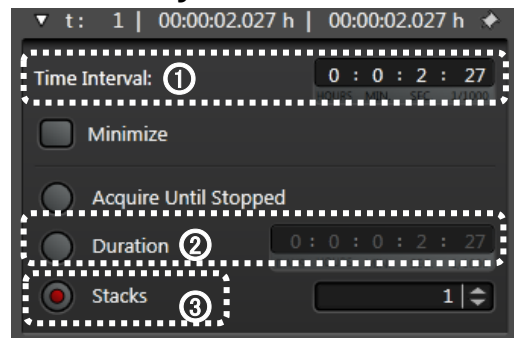
選択に応じて、パネルが開きます

xyt : 左下図、xyzt : 右下図

**xyt の場合**



**xyzt の場合**



#### 2. ①撮影間隔を設定します

\* 撮影開始から次の撮影開始までがインターバルです(撮影終わりから次の撮影開始までではありません)

\* Minimize を選択すると最小間隔で撮影できます

#### 3. ②合計画像取得時間または③撮影繰返し回数を設定します

\* 撮影間隔は 2 で決まっているので、合計画像取得時間と撮影繰返し回数のどちらかを決めれば、もう一方は一義的に決まります

\* Acquire Until Stopped では Stop を押すまで撮影し続けます

\* xyt の場合は Frame、xyzt の場合は Stacks と表示されます

#### 4. Start ボタンで 取込を開始します

\* 取得画像は Open Projects タブ内に Series~の名前で一時保存されます

\* 画像取込中は、顕微鏡および除振台に触れないようにご注意ください

## II-2. タイムラプスの設定(xt) Scan

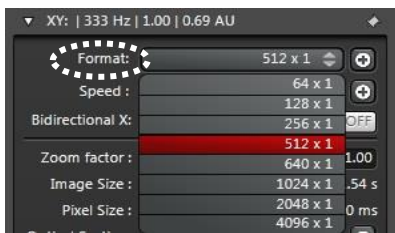
X 方向 1 ラインしか取得できませんが、非常に速い動きを観察するのに適しています  
縦軸が時間、横軸が X 方向の画像が作成されます

### 1. 撮影モードの選択



Acquisition Mode から xt を選択します

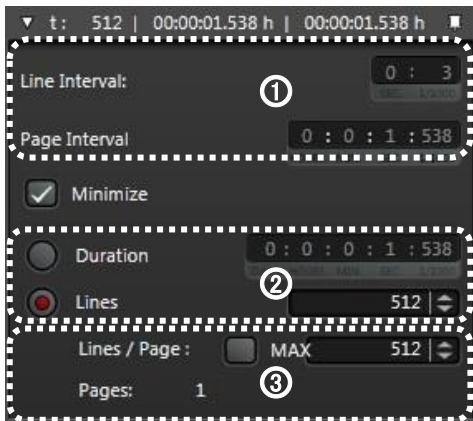
### 2. スキャン幅の設定



画像の横軸に相当する箇所の長さを Format から選択します

また数値の右、⊕をクリックすると任意の Format を設定できます

### 3. ①撮影間隔をおよび②合計画像取得時間または撮影繰返し回数を設定します



\* Line Interval は 1 ラインをスキャンするのに必要な時間で、ラインの幅とスキャンスピードにより決まります

\* Page Interval で Page ごとの撮影間隔を設定します

\* Minimize を選択すると最小間隔で撮影できます

\* 撮影間隔は 3 で決まっているので、合計画像取得時間と撮影繰返し回数のどちらかを決めれば、もう一方は一義的に決まります

### 4. ③画像の縦軸の長さを設定します

\* Line/Page で縦軸に時間が表示されるので、何ライン分を一つの画像(Page)として表示するか設定します(最大 8192 ラインまで表示可能)

\* Pages=合計取得 Line 数/縦軸の Line 数(Line/Page)となります

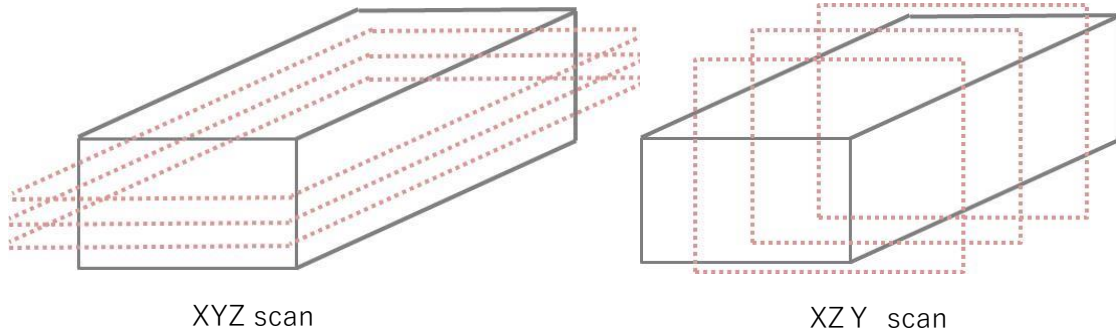
### 5. Start ボタンで取込を開始します。

\* 取得画像は Open Projects タブ内に Series~の名前で一時保存されます

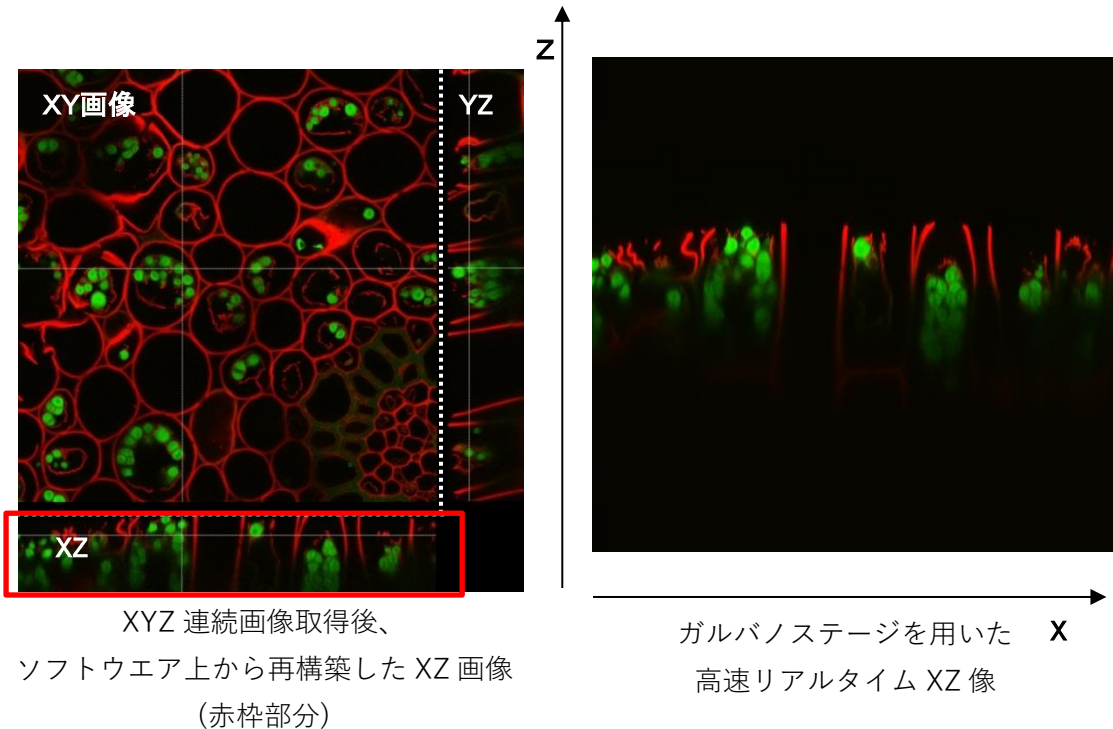
\* 画像取込中は、顕微鏡および除振台に触れないようご注意ください

### II-3. XZ Scan スーパーZ ガルバノステージ

XYZ 画像を取得することなく、直接 XZ 断面画像を取得することができます。

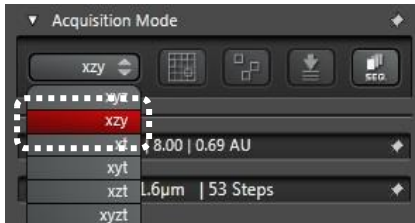


XZ 断面画像を得るためには XY 平面画像を複数枚取得し、ソフトウェア上で XZ 断面画像を構築するのが一般的です。しかしこの方法では XZ 断面以外の Y 方向でも画像取得を行うため時間がかかります(左下図)。一方、スーパーZ ガルバノステージを用いればスキャン範囲を X Line で固定した状態でスーパーZ ガルバノステージ自身を高速で動かし画像取得するため、リアルタイムでの XZ 断面画像の取得が可能です(右下図)。





## 1. 撮影モードの選択



XZ 断面画像を取得したい位置の XY 平面画像を取得したのち、xzy、xzt または xyz を選択します


\* xzy と xyz では XZ 連続断層画像の取得を行えます

## 2. XZ 断面取得位置の設定

xyz、xzt または xyz を選択すると、XY 平面画像上にスキャンされる XZ 位置として点線が表示されます

XZ 断面を取得したい位置でクリックすると点線が移動します

## 3. フォーカス調整

XZ 断面の Z 位置を調整する場合は、Live  を押して顕微鏡のフォーカスノブまたはスマートムーブで Z の位置を調整してください

\* XZ~選択時、コントロールパネルの Z 位置調整だったダイヤルは Y 位置調整ダイヤルとなります

5.  または  をクリックして画像を取得します

## 6. Y Stack の設定

xyz の連続断層画像の取得と同様に Y Stack を設定します。



7. Start ボタンで取込を開始します。

\* 取得画像は Open Projects タブ内に Series~の名前で一時保存されます

\* 画像取込中は、顕微鏡および除振台に触れないようにご注意ください

## スーパーZ ガルバノステージの設定

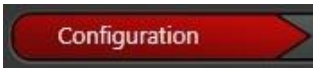
スーパーZ ガルバノステージのZ方向の可動範囲は1.5 mmですが、デフォルト設定ではサンプルがレンズに当たる危険性を少なくするために0.5 mmに制限しています。この制限を外すためには、次の操作で設定を変更してください

① 「Configuration」タブ  から「Super-Z」  を選択してください

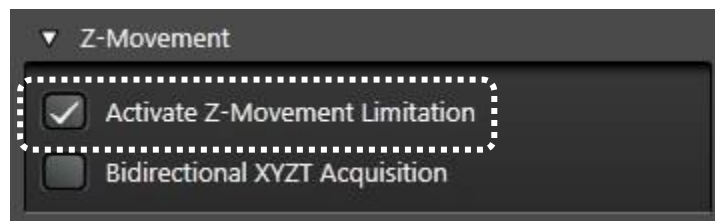
② 「Super-Z Range」の「Restricted Range (0.5 mm)」を「Whole Range (1.5 mm)」に変更してください



起動時設定では、XZ scanの際には自動的に最少ズーム倍率はその画像取得条件に基づく値に固定されます。最少ズーム倍率を変動させたい場合は、次の操作で設定を変更してください

① 「Configuration」タブ  から「Hardware」  を選択してください

② 「Z-Movement」の中に「Active Z-Movement Limitation」という項目があります。このチェックを外すことで、その条件での最低倍率(もっとも広い視野)での観察が可能となります



## II-4. Lambda Scan

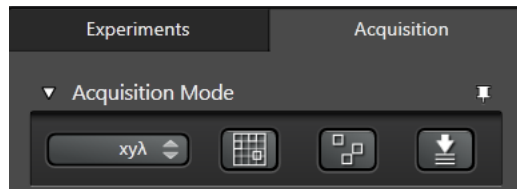
Lambda Scan は取得波長幅を固定した状態で長波長側へ徐々に動かし、蛍光のスペクトルを取得する方法です。また、このときに取得した蛍光スペクトルを元にして近接した波長の分離を行うことができます

\* 取得波長幅が狭い方が分解能は高くなり、最小 5 nm まで狭めることができますが、取得波長幅を狭くすると光子数が少なくなります。暗い場合は励起光の出力または取得波長幅を調整してください

\* サチュレーションしないように励起光の出力および取得波長幅を設定してください

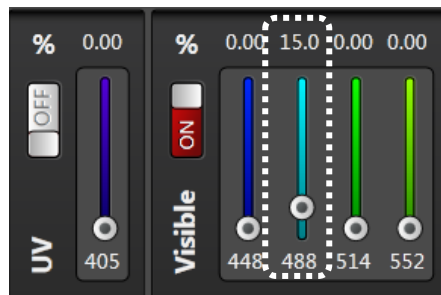
Acquisition Mode から、XYλ、XYZλを選択します

\* Lambda Scan 選択時は Sequential を使用できませんので、OFF にしてから Acquisition Mode から選択してください



### 4. 励起光の設定

必要な励起光及び出力を設定する(下図は 488 nm を 15% に設定した例)



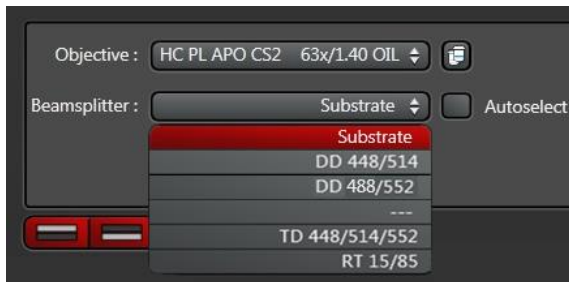
### 5. 使用する励起光に応じてダイクロイックミラーを設定する

\* AOBS(オプション)を搭載するシステムの場合設定のする必要ありません

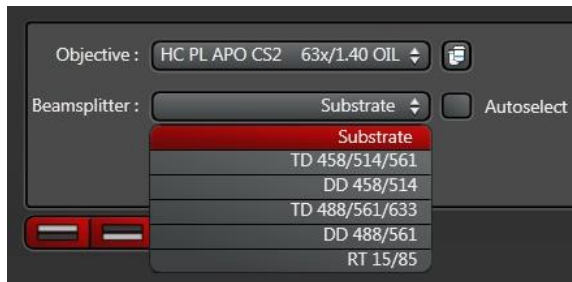
励起光	ダイクロイックミラー
405 nm	Substrate
448 nm	RT15/85
488 nm	RT15/85
514 nm	DD448/514
552 nm	DD488/552
561 nm	DD488/561
633 nm	TD488/552(561)/633
633/638 nm	TD488/552(561)/638

例.

CSU(Compact Supply Unit)の場合

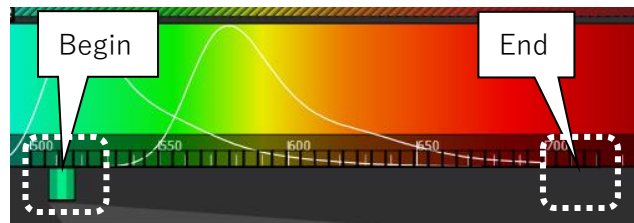
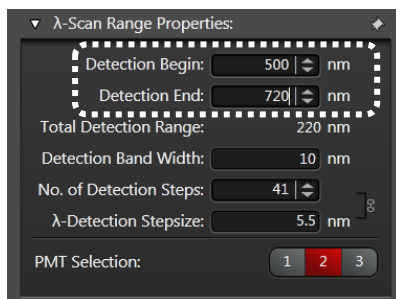


FSU(Flexible Supply Unit)の場合



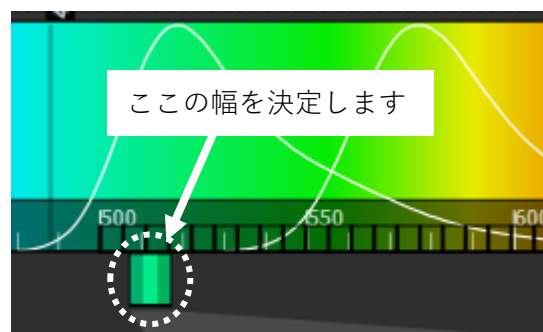
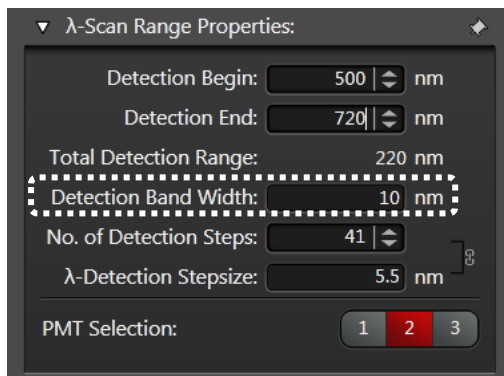
## 6. スペクトルの取得範囲の設定

取得する範囲の最初(Begin)と最後(End)の波長を入力します



## 7. 蛍光取得波長幅(Band Width)の設定

\* 最小 5 nm



## 8. 画像の取り込み枚数の指定

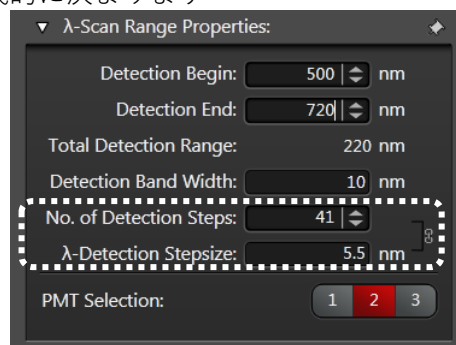
No. of Detection Steps、または、 $\lambda$ -Detection Stepsize のどちらかの方法で画像取得を行うか設定します

**No. of Detection Steps** : Begin から End までに何枚取得するかを優先して、画像を取得します

**$\lambda$ -Detection Stepsize** : 7 で決定した蛍光取得波長幅を Stepsize 分移動させながら画像を取得します

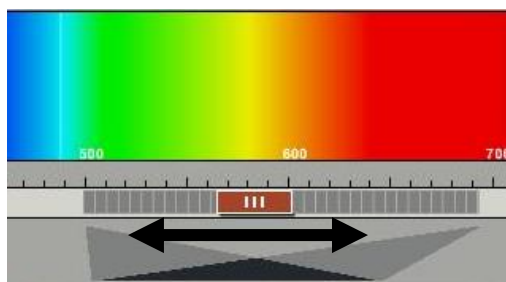
\* Stepsize の最小値は 3 nm です

\* スペクトルの取得範囲は 6 で決定しているため、枚数または Stepsize のどちらかを決定すれば、もう一方は一義的に決まります



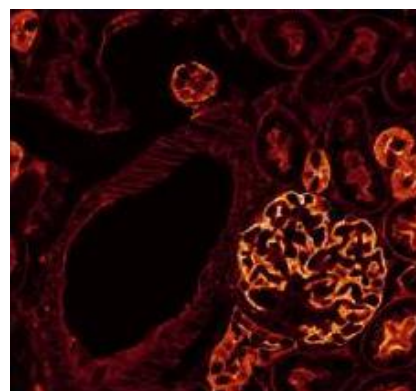
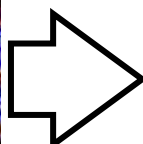
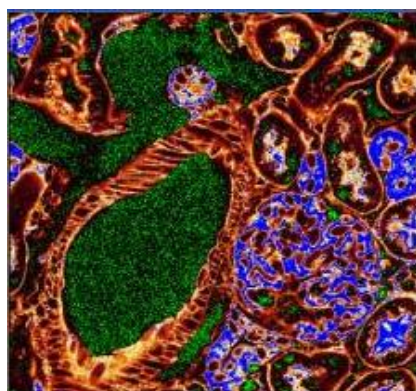
## 9. 感度調節

スキャンしながら 7 で設定した蛍光取得波長幅をスペクトル取得範囲内で動かし、最も画像が明るくなる(蛍光が最も強くなる)場所を探します。その場所で明るさがサチュレーションしないようにレーザー強度や検出器の感度を設定します




蛍光検出域を動かし、最も感度の高い波長域を探す

\* 検出波長幅をクリックした後は、マウスのホイール、キーボードの矢印キーでも移動可能です

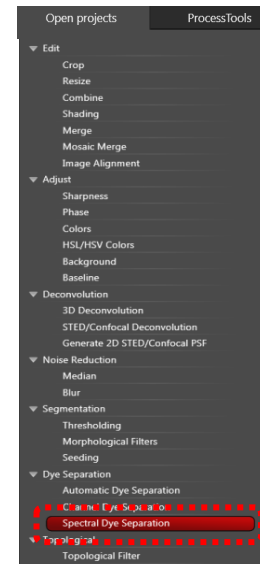


## 10. データ取得の開始

Start ボタン  を押すと、上記設定条件で画像の取得を行います

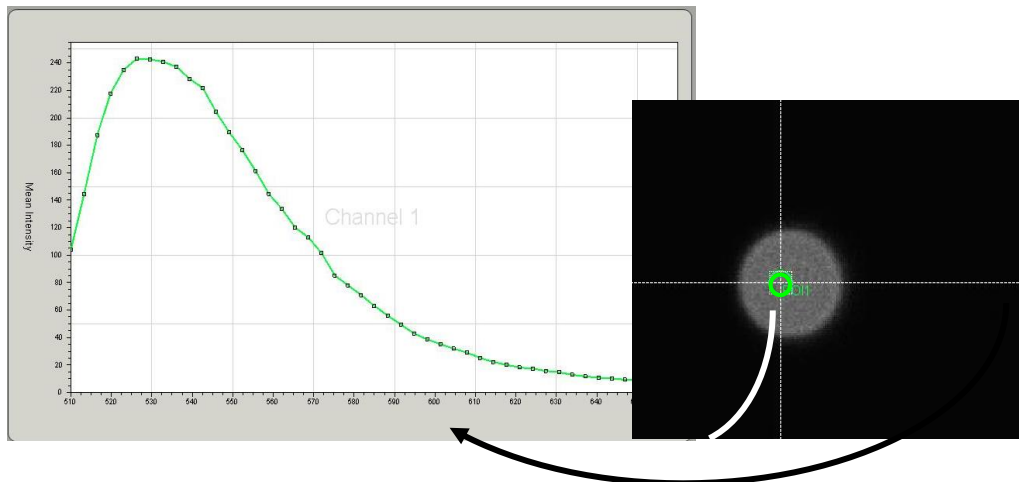
## 11. 取得したスペクトル情報のグラフ化

右図のように「Process」メニューを開き、ProcessTools タブ内の Dye Separation の Spectral Dye Separation を選択します



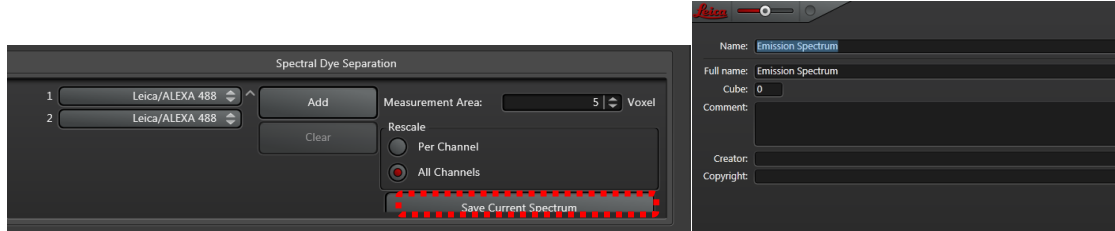
## 12. ROI を指定しスペクトルを表示

Viewer(右側に表示される画像)上に ROI を指定するとその場所でのスペクトルデータが下図のように表示されます



### 13. スペクトルデータの登録

スペクトルデータの保存を行うときは左下図“Save Current Spectrum”をクリックすると、右下図が表示されるので名前を付けて保存します



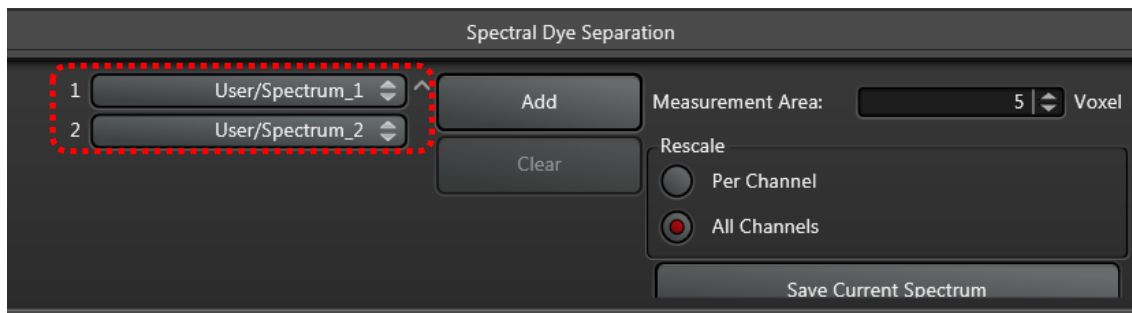
### 14. スペクトルデータを用いた蛍光の分離

下図赤枠部分で使用した蛍光色素または登録したスペクトルを2つ以上選択します

(3つ以上選択する場合は Add で追加します)

Apply ボタンをクリックし、処理を実行します

(1 で選択したものを緑色、2 で選択したものを赤で表示します)





## II-5. Z 方向に強度の補正をしながら Scan する

Z 軸方向にレーザー強度や検出器の感度を変えながらスキャンする設定です

Begin と End 間の任意の Z 位置におけるレーザー強度や検出器の感度を設定できます

\* 励起光の出力や検出器の感度は登録位置間でリニアに変化します。

基準となるポジションをゼロとして設定した全ての Z-Position と設定値が表示されます  
設定は取得データと共に保存され、取得データよりコンフォーカルセッティングと一緒に呼び起こすことができます(Configuration メニューの Instrument Parameter Settings で “Z-compensation” にチェックが入っていることを確認してください)

\* Auto Focus、Best Focus 機能とは併用できません。



1. 通常通りの蛍光設定を行います
2. 左図赤枠内+ボタンをクリックし、Z-Compensation パネルを開き、下記 2 つの強度補正方法から 1 つを選択します

### Compensation by AOTF/EOM Gain :

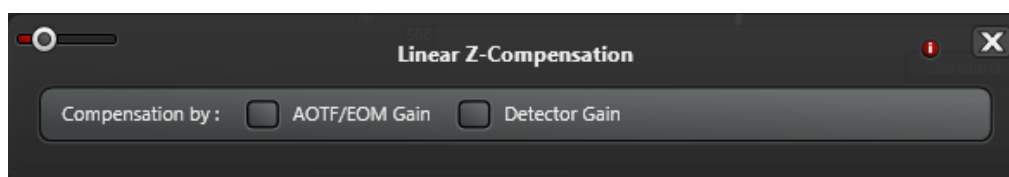
レーザー強度を変更することによって輝度補正を行います

### Compensation by Detector Gain :

検出器の感度(Gain)を変更することによって輝度補正を行います

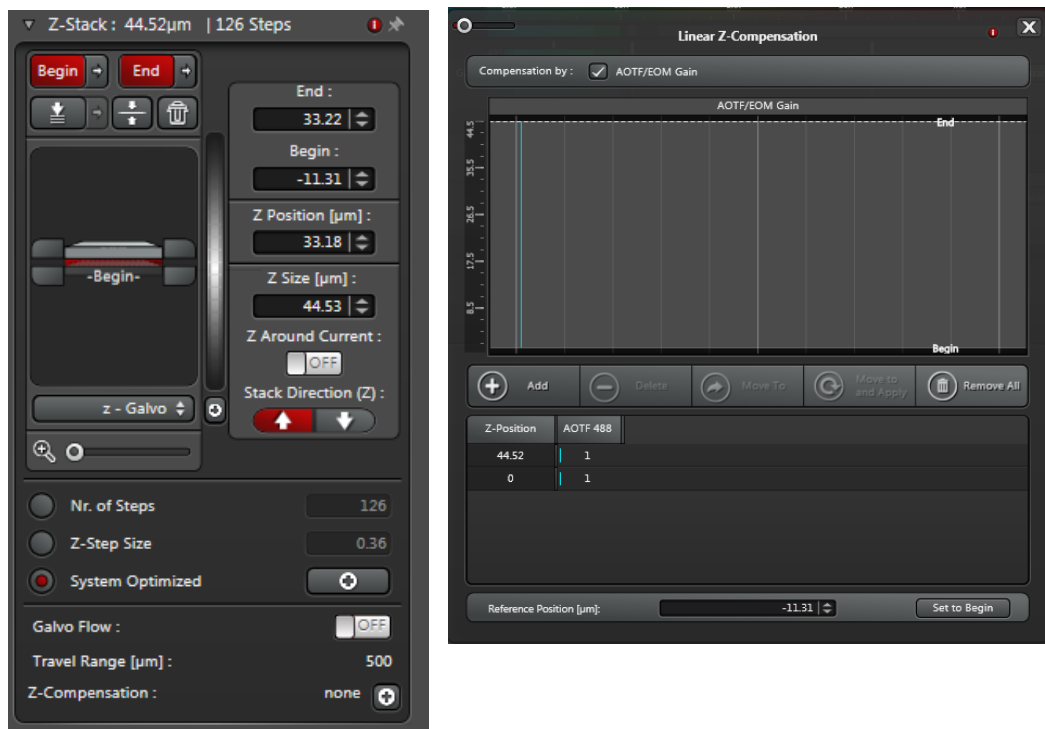
\* 単色の場合は、上記 2 つの項目は組み合わせて使用することができます

多色(単色でも Sequential Scan が ON)の場合は、AOTF/EOM Gain(レーザー強度)だけ選択できます






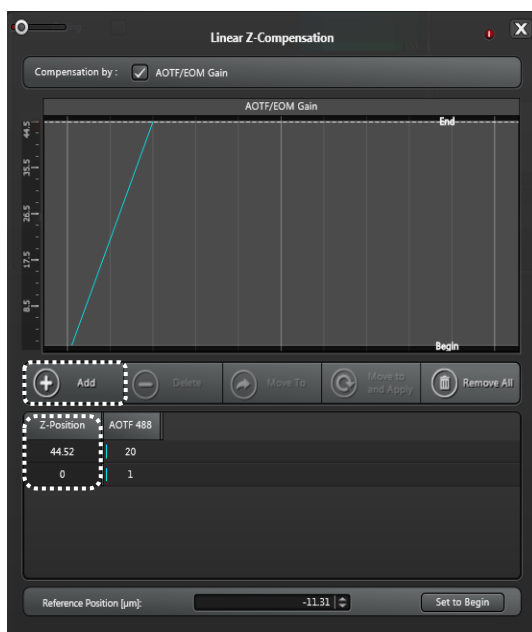
3. 強度補正方法を選択すると右下のパネルが開きます  
Begin で設定した位置が Z-Position 0 となります



4. Begin と End の励起光出力および検出器の感度を変更する場合

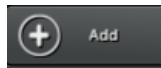
\* 多色(単色でも Sequential Scan が ON)の場合、変更できるのは AOTF/EOM Gain(レーザー強度)だけです

励起光出力または検出器の感度を設定し、変更したい Z-Position を選択し  ボタンをクリックすると設定が変更されます



### 5. Begin と End の間で変更したい場合

変えたい Z 位置に移動し、励起光出力または検出器の感度を調整した後、

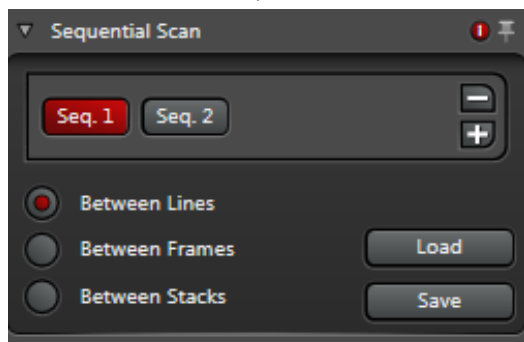


をクリックすると、Z-Position と各値が登録されます追加されます

Z-Position	AOTF 488
0	25.88
-9.85	39.22
-26.74	47.45
-43.59	51.76

### 6. Sequential Scan の場合は、それぞれの Seq ごとに設定できます

選択されている Seq Number の設定項目が Z-Compensation パネルに表示されます。



### 7. Start ボタンをクリックし、Z-Stack 画像を取得します。

**Add** : 登録済みの Z-Position が選択されている場合は設定の上書き、選択されていない場合は現在の Z 位置での設定の追加

**Delete** : 選択した追加登録位置の削除  
(Begin, End は削除できません)

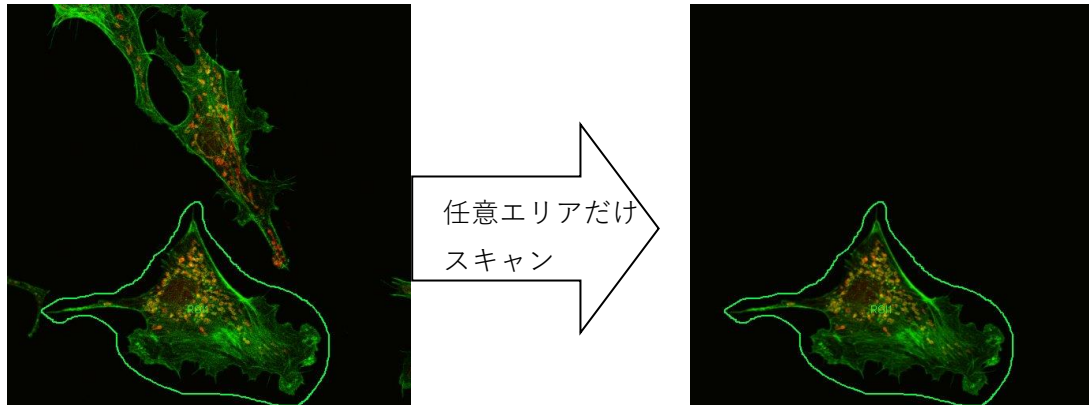
**Move to** : 選択した登録位置への移動

**Move to and Apply** : 選択した登録位置の条件の呼び出し

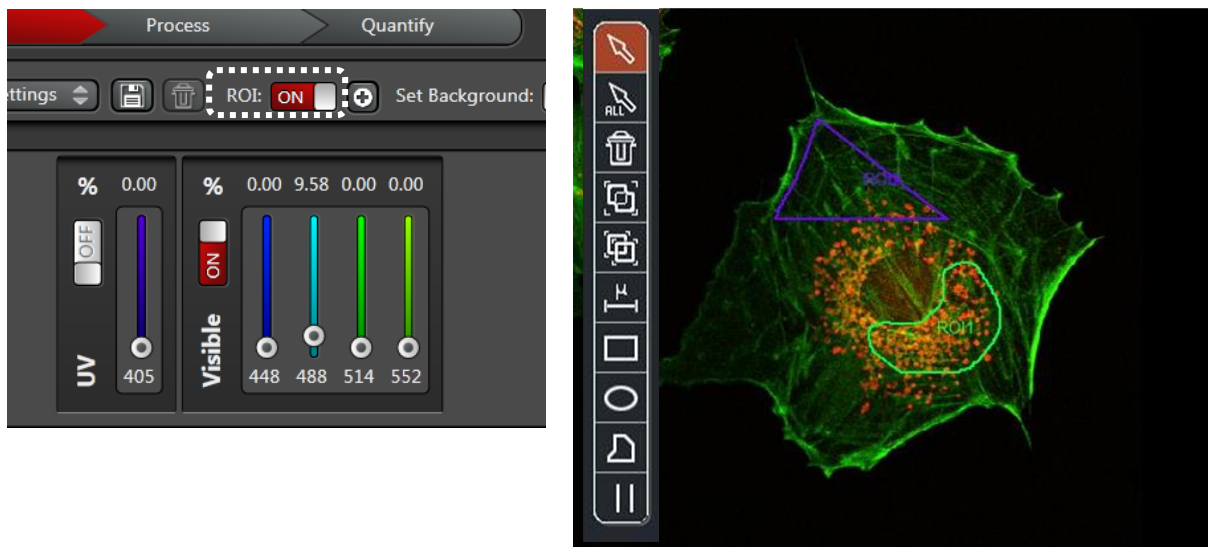
**Remove All** : 全ての追加登録位置の削除  
(Begin, End は削除できません)


## II-6. ROI Scan (任意のエリアスキャン)

レーザーを任意のエリアのみに照射することにより、その部分のみの画像取得、あるいは退色を行うことができます



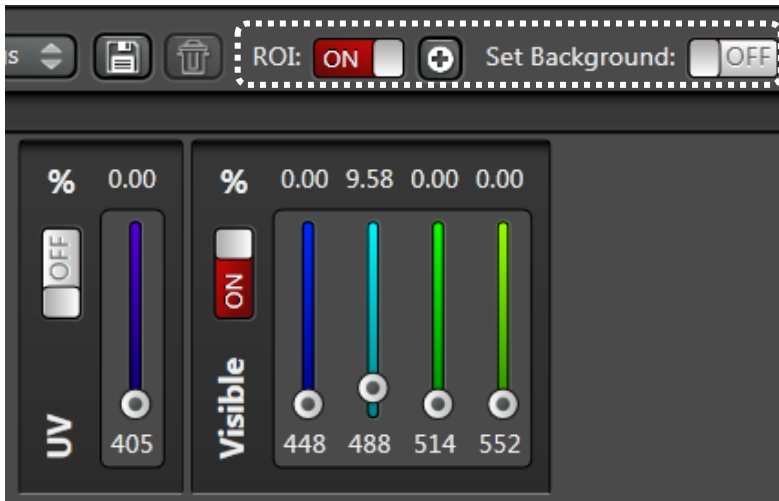
1. ROI を ON にし、画像上に ROI を描きます



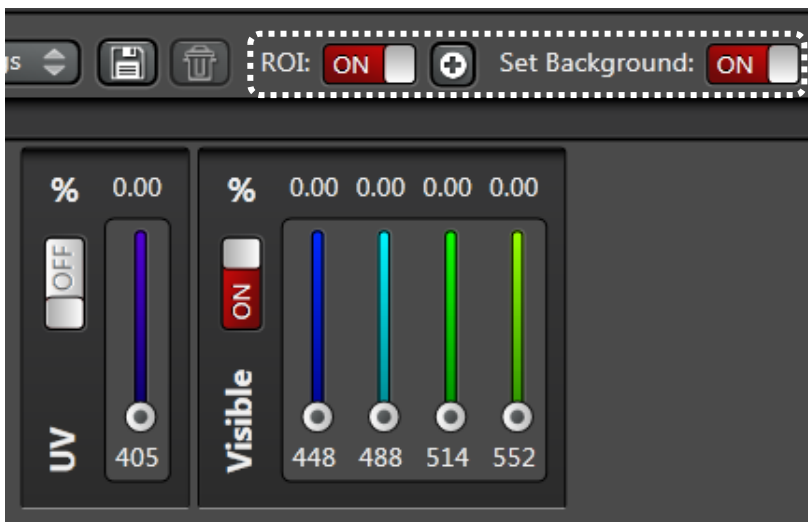
 をクリックしたあと、下記 2 つの方法で ROI を作成します  
 ドラッグした状態ではフリーハンドで線を描け、ダブルクリックした場所と始点とがつながります  
 クリックで頂点を追加し、ダブルクリックした場所と始点がつながります

2. ROI 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 0%にします

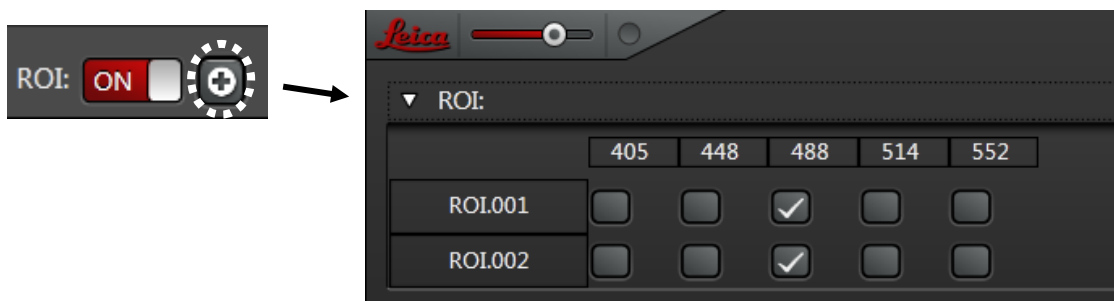


3. Set Background を ON にして、ROI の外側に照射するレーザー強度を設定します



4. ROI 毎に照射する波長を設定できます

「+」ボタンをクリックすると以下のパネルが開きます



### III. スキャニングステージ使用法 (Tile Scan, 多点取得) (オプション)

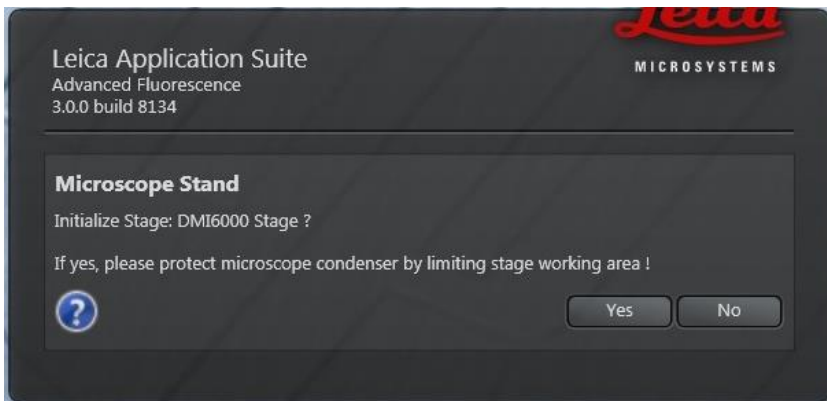
この機能は、電動スキャニングステージが搭載されているシステムでのみ有効です

\*LAS X を立ち上げる際に、ステージのイニシャライズを必ず行ってください

#### スキャニングステージのイニシャライズ

ソフトウェア「LAS X」を立ち上げる際に、スキャニングステージのイニシャライズが必要です

下図のメッセージが表示されたら、「Yes」をクリックしてください。ステージが自動的に動き出し、イニシャライズを開始します

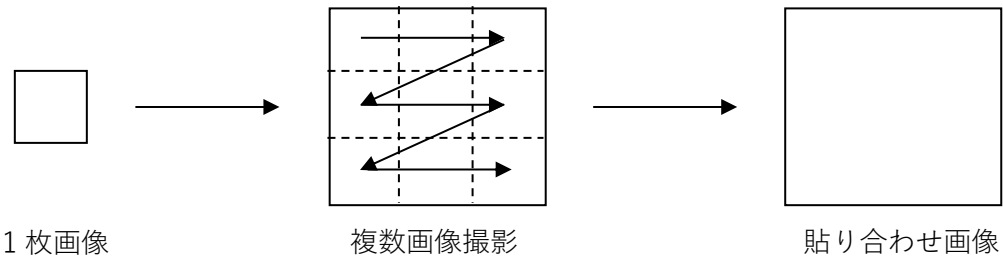


\*ステージが動きますので、この時点ではまだサンプルをステージ上に載せないでください

\*設定により顕微鏡立ち上げ時にイニシャライズされ、上記メッセージが表示されない場合があります

### III-1. Tile Scan 設定方法

複数枚の画像を取得し、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

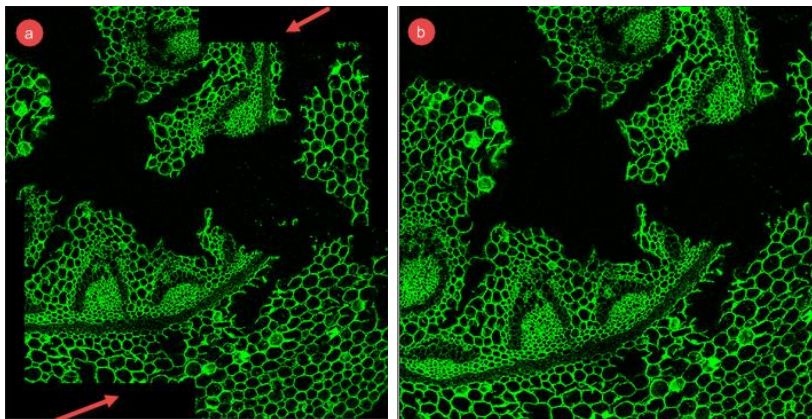


\* Rotation 機能(オプション)が搭載されている場合は、Rotation のキャリブレーションが行われていることを確認してください

キャリブレーションが正しく行われていないと貼り合わせがうまくいきません。

下図 a のような場合、キャリブレーションがうまくできていませんので、キャリブレーションを行ってください。

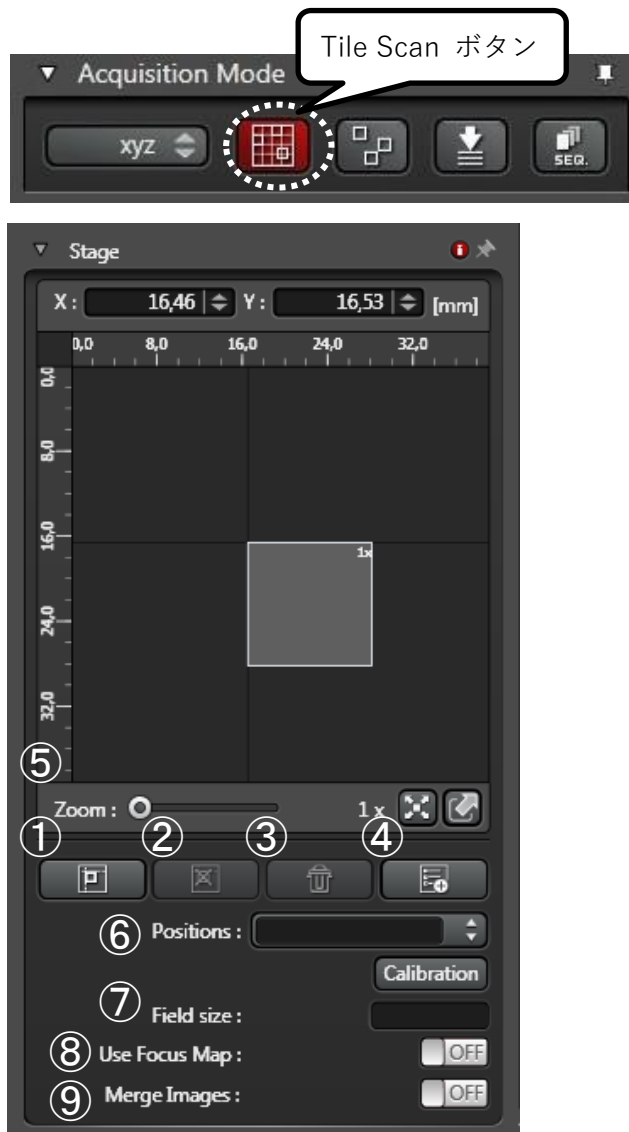
キャリブレーション方法は 23 ページ参照



a キャリブレーションできていない場合

b キャリブレーションできている場合

1. Acquisition Mode パネル内の Tile Scan ボタンをクリックし、Tile Scan パネルを表示します



① Tile Scan:ポジション登録
② 登録ポジションの削除
③ 登録した全ポジションの削除
④ <b>Stage Configuration</b> ステージの設定、Stitching(つなぎ目補正)の設定などはこちらから行います
⑤ <b>Zoom</b> マップ表示拡大
⑥ <b>Positions</b> 登録ポジションの選択
⑦ <b>Field size</b> 取り込み画像枚数の設定 (3x2 など)
⑧ <b>Use Focus Map</b> 傾き補正を行いながら画像取得を行います
⑨ <b>Marge Images</b> 画像取得と同時に、複数枚の画像を1枚の画像に張り合わせます


2. スキャン範囲を指定します

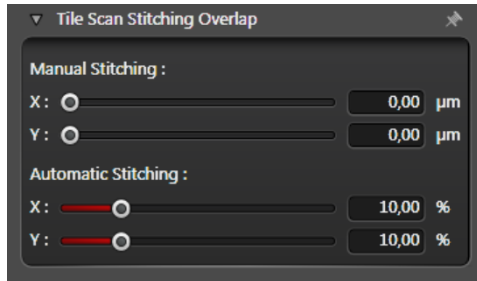
2点を指定し、それらを対角の頂点とする長方形をスキャン範囲とする方法と、登録地点または現在位置を中心にスキャンする範囲のサイズを指定する方法の2つがあります

**対角の頂点を指定する方法：**対角の頂点となる2点でポジション登録ボタンをクリックするとスキャン範囲が自動で計算されます

**中心位置を指定する方法：**登録位置をポジション登録するかスキャン範囲の中心位置に移動したのち、⑦Field Size にスキャン範囲を「3x2」のように指定します

3. のりしろの幅の調整をします

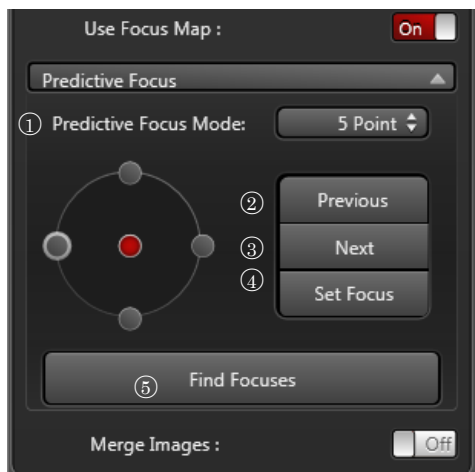
張り合わせを行う際の「のりしろ」の幅は、④  をクリックすると下図 Stage Configuration ウィンドウが開きます。Tile scan Stitching Overlap から変更することができます



<b>Manual Stitching</b>
のりしろを長さで指定できます
<b>Automatic Stitching</b>
のりしろを%で指定できます

#### 4. Focus Map

フォーカス位置を維持した状態で 2D Tile Scan を行えます  
補正位置の数が多い程、精度が高くなります



#### 5. 画像取得後の自動画像張り合わせ方法の設定

##### ① Predictive Focus Mode

補正位置をマニュアルで設定する(デフォルト)かテンプレート(円形 Circle or 長方形 Rectangle)を使用するか、また補正位置を 5 or 9 点にするか選択します  
マニュアルの場合は最低 3 点必要です

##### ② Previous

前の補正位置に戻ります

##### ③ Next

次の補正位置に戻ります

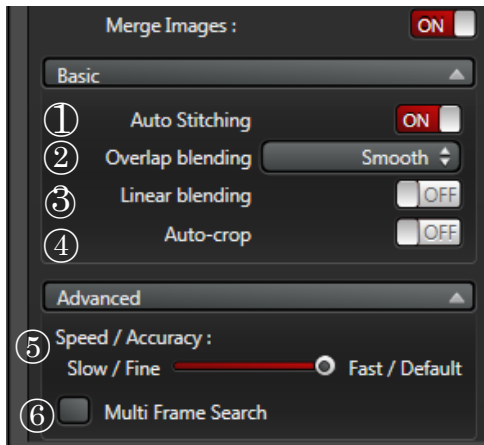
##### ④ Set Focus

現在の Z 位置を登録します

##### ⑤ Find Focuses

オートフォーカス機能を使って Z 位置の登録を行います





### ①Auto Stitching

撮影設定を参考に画像の重なりを自動で計算します

### ②Overlap blending

重なり of 計算方法を選択します。

- ・ None

のりしろ部分が完全に一致している場合に使用する

- ・ Smooth

のりしろの中央にある、画像の中心位置に近い Pixel に重みづけして計算します

\* Maximum Projection を行うと境界線がスジとなって出やすいです

- ・ **Statistical**

のりしろの上または下側部分からランダムに選ばれ、画像の中心に近いほど選ばれる確率が高くなります

### ③Linear blending

のりしろが小さい場合 ON(デフォルト)、

のりしろが大きい場合 OFF にする

### ④Auto-crop

ON の場合、ローテーション角度のずれなどで、ずれてしまった画像を長方形になるように切り取ります

### ⑤Speed / Accuracy

張り合わせの精度と時間の調整を行えます

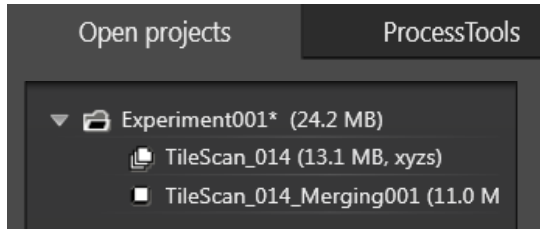
### ⑥Multi Frame Search

Z-Stack 設定時に使用できます

Z 位置に対して補正をかけることができます

6. 「Start」をクリックしてスキャンを開始します

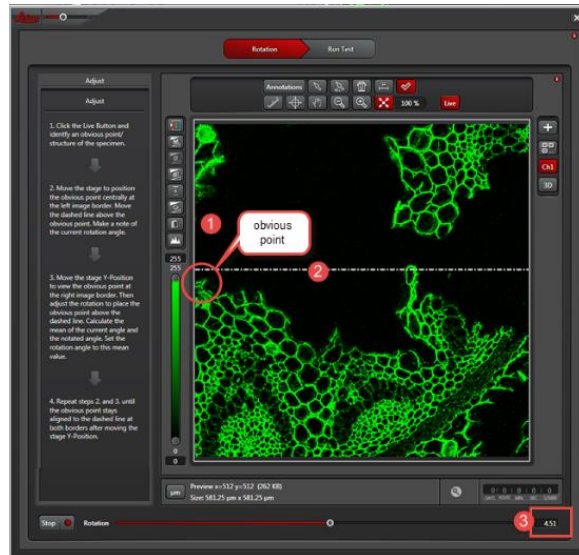
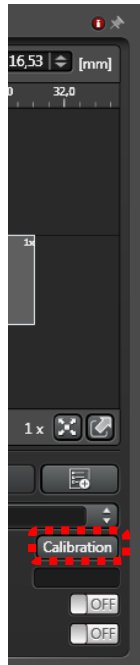
下記画像の場合、「TileScan\_014」が Raw データ、「TileScan\_014\_Merging001」が張り合わせ画像となります



7. 画像取得後に張り合わせを行う場合は、VI-1-6. Mosaic Merge(46 ページ)参照

## Scan Rotation のキャリブレーション方法

左下図 Calibration をクリックすると、右下図が表示されます



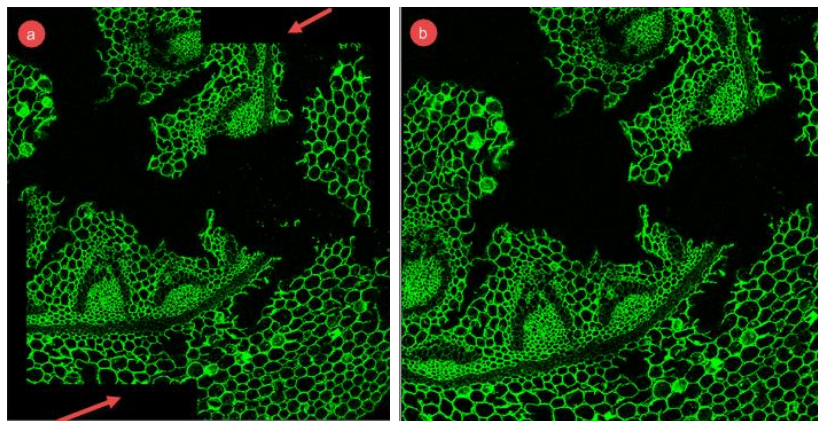
ウィンドウ内の Live ボタンを押し、①のように特徴的な個所が画像の端になるようにステージを動かします  
特徴的な個所をクリックすると、そこへ点線が②のように移動します  
ステージを左右に動かし、画像が点線と平行に動くように、③の回転角を設定します

Run Test タブに移動し、ウィンドウ内の Live ボタンを押します

Run Test ボタンを押すと、Tile Scan 画像の取得および貼り合わせが行われます

貼り合わせがうまくいっている場合はウィンドウを閉じます

うまくいっていない場合は、回転角を設定し直してください



キャリブレーションできていない場合(a)、できている場合(b)

### III-2. マルチポイント(Mark & Find)画像取得設定方法

1. Acquisition Mode パネル内の Mark & Find ボタンをクリックし、Mark & Find パネルを表示します



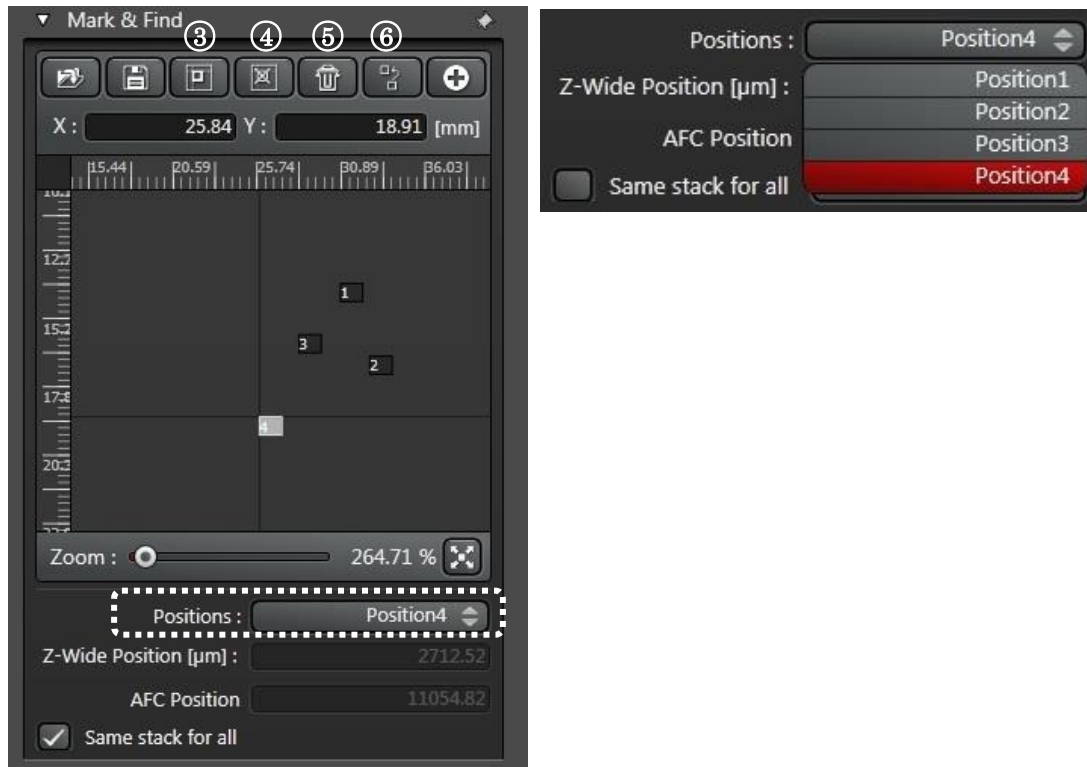
①	<b>ポジションの呼び出し</b> ファイルを指定し、保存されたポジションデータを呼び出します
②	ポジションのデータを保存します
③	現在のポジションを登録します
④	選択したポジションを削除します
⑤	登録したすべてのポジションを削除します。
⑥	登録ポジションの情報が上書きされます。
⑦	<b>Zoom</b> マップ表示拡大
⑧	<b>Positions</b> 登録ポジションの選択
⑨	<b>AFC Position</b> 登録された AFC(オプション)ポジションを表示します。
⑩	<b>Same stack for all</b> 立ち上げ時は、チェックがはいています。
⑪	登録された Position の位置が表示されます

## 2. ポジションの登録・追加・削除

ポジション登録を行いたい場所へ移動し、③Position 登録を行うと Position が追加されていきます(下右図は Position を 4 つ追加した場合)

プルダウンメニューから Position を選択するとその場所へ移動します

④選択されているポジションの削除、⑤すべてのポジションの削除、⑥選択されているポジションを現在位置で上書き

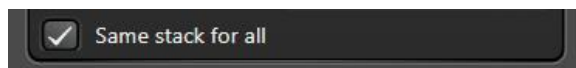


## 4. Z-Stack の設定

ポジション間で同一の Z-Stack 設定で画像取得を行う場合は、「Same stack for all」のチェックを入れた状態(デフォルト)で設定します

\* ポジションの追加と Z-Stack の設定はどちらが先でも問題ありません

\* 最後に設定された Z-Stack がすべてのポジションに適用されます



ポジション間で異なる Z-Stack 設定(Begin、End の位置や撮影枚数、撮影間隔)で画像取得を行う場合は、「Same stack for all」のチェックを外します

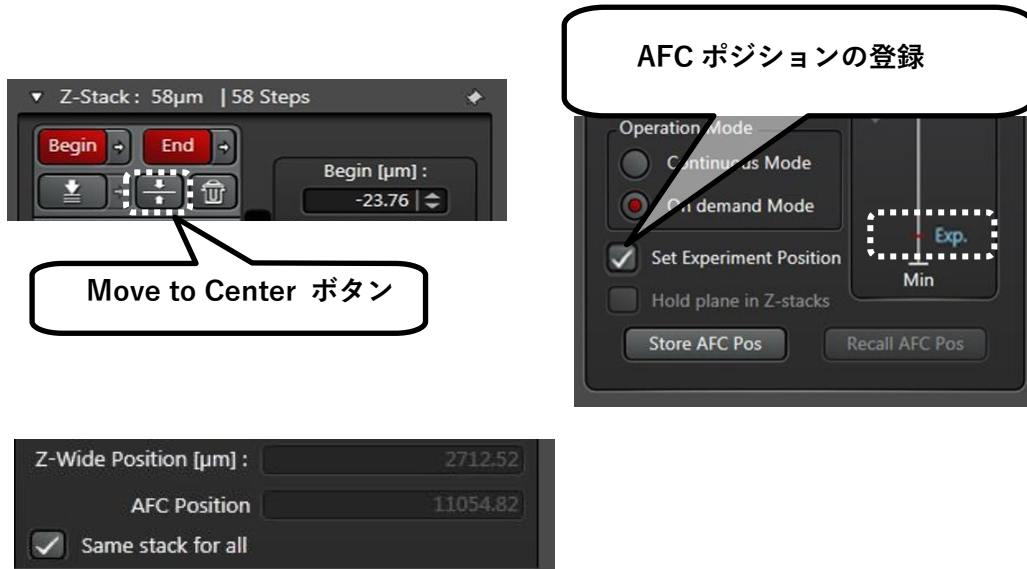
ポジション毎に「Z-Stack の設定しあと Redefine Stack を押し」、次のポジションの登録または移動します



### 3. AFC ポジションの設定(オプション)

AFC(Adaptive Focus Control)が搭載されている場合、焦点維持機能が有効となります。  
Z-Stack の設定後に「Move To Center ボタン」でフォーカスを中心位置にした後、「Set Experiment Position」で AFC ポジションを登録します。

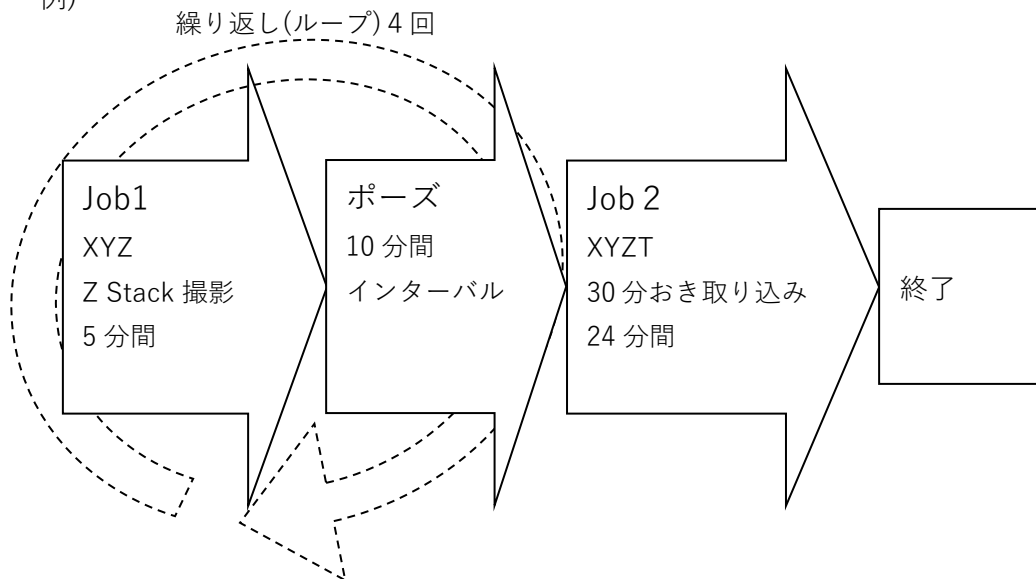
\* V. Adaptive Focus Control(AFC)(34 ページ)を参照



#### IV. Live Data Mode (高度なタイムラプスイメージの取得設定) (オプション)

これまでの撮影方法では撮影条件やインターバルタイムを変えることはできません  
しかし、Live Data Mode では複数の異なる撮影条件(Format のサイズ、Zoom 倍率、Scan Speed などの蛍光取得のセッティング、タイムラプスのインターバルなど、ほぼ全てのパラメーター)をマクロのように組み合わせることで撮影することができます

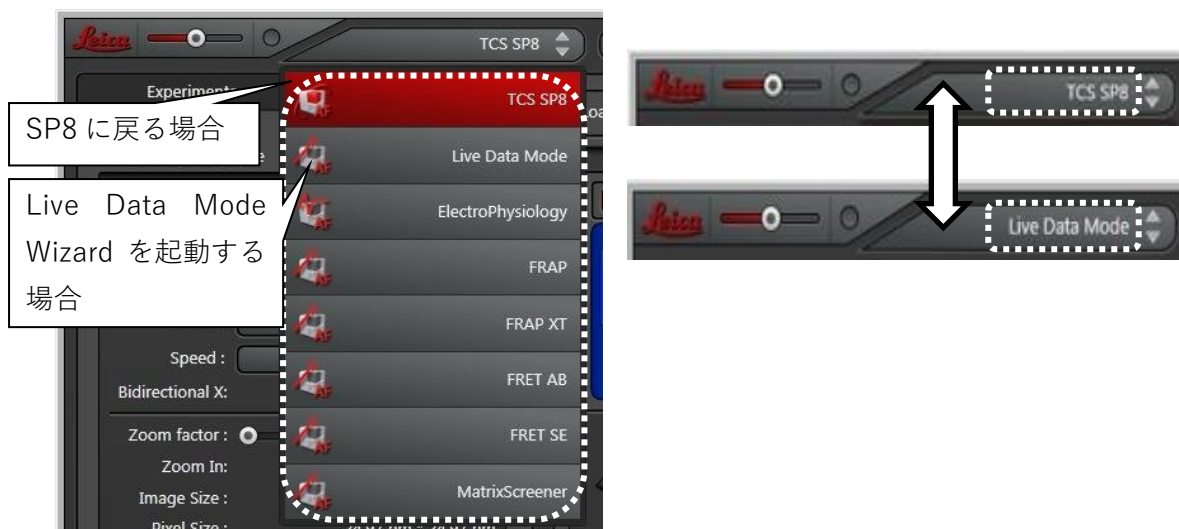
例)



##### 1. Live Data Mode Wizard を起動します

画面左上のメニュー「TCS SP8」をクリックし、プルダウンメニューから Live Data Mode を選択します

\* TCS SP8 に戻る場合、プルダウンメニューから TCS SP8 を選択します





## 2. Insert または Add で Job を追加します



**Insert** : 選択されている Job の前に Job を挿入

**Add** : 選択されている Job の後に Job を挿入

Insert または Add をクリックし、追加する Job を右上図のように表示されるプルダウンメニューから選択します

### **New Confocal Job** : 新規 Job の追加

Job と表示されます

\* Sequential Scan の設定はできません

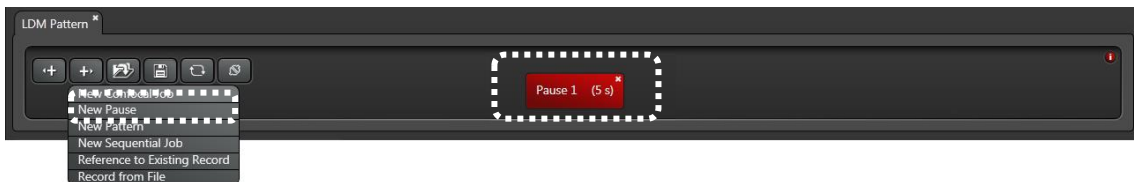
Sequential Scan の設定を行う場合は、New Sequential Job を選択してください



### **New Pause** : 新規 Pause の追加

1 ms から 99 Days まで設定できます(デフォルトは 5 s)

Pause を右クリックすると、Pause Time が表示され、時間を変更できます



### **New Pattern** : 新規マクロの挿入

Job や Pause などの設定を一つのみとして扱うことができます

右下図のように Pattern というタブが作成されます

LMD Pattern 上では Pattern として表示され、Pattern 上では Job や Pause などを設定できます

\* Scan する順序の変更や繰り返し設定を簡単に行うことができます





## New Sequential Job : 新規 Sequential Job の追加

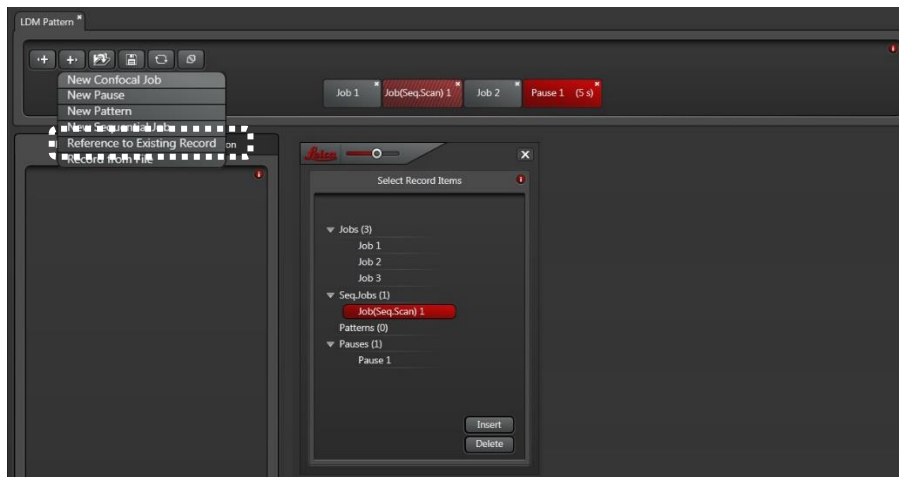
Job(Seq.Scan)と表示されます

Sequential Scan の設定を行うことができます



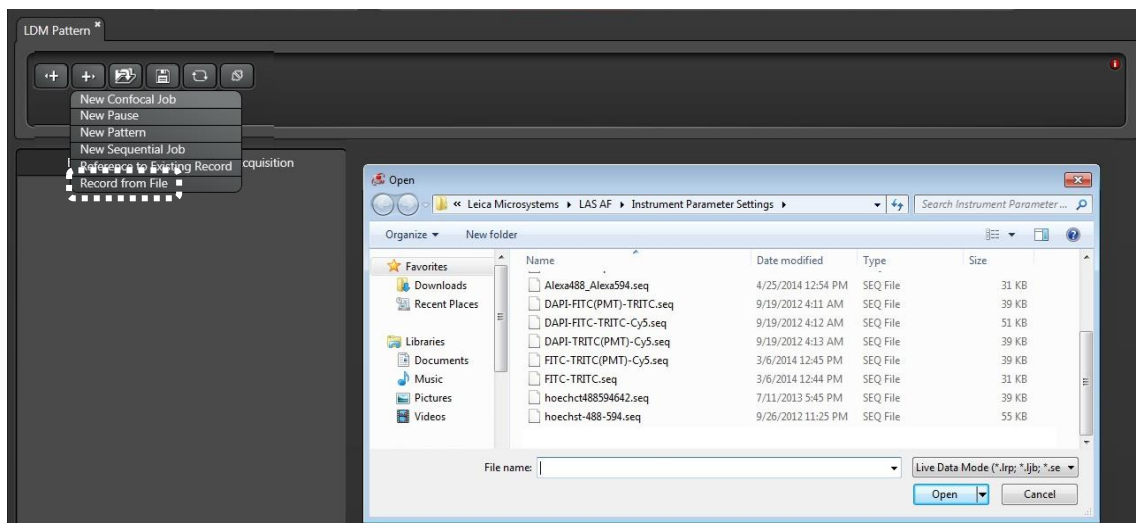
**Reference to Existing Record :** 既存の Job、Pause や Pattern の設定を参照及び編集  
クリックすると、下図のように新規ダイアログが表示され、すでに設定している Job や  
Pause と同じ設定を呼び出して使用することができます

\*呼び出された設定のいずれかを変更すると、そのほかの Job や Pause にも変更が自動的に適用されます

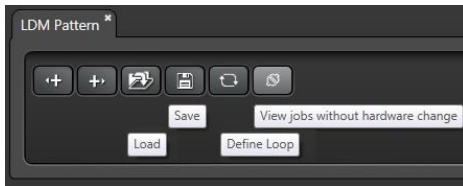


## Record from File : 保存済みの Job や Pattern を呼び出し

クリックすると、下図のようにウィンドウが表示され保存済みの設定が表示されます



### 3. その他のボタンの機能



**Load** : Save で保存した Live Data Mode の設定を呼び出せます

**Save** : クリックするとプルダウンメニューで下記 Selected Record と Pattern の 2 つが表示されます(どちらも Load から呼び出せます)

**Selected Record** : 現在選択している Job の設定を保存します

**Pattern** : Pause を含めたすべての Job を保存します

**Define Loop** : 選択した Pause を含めたすべての Job(複数選択する場合は、Ctrl を押したまま最初と最後をクリックします)の繰り返し設定をできます

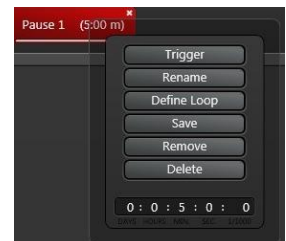
Job の上の数値をダブルクリックすることで繰り返し回数を変更できます

**View Jobs without hardware change** : クリックすると Hardware の切替えを行うことなく、画像取得などの設定の確認や変更ができるようになるため、素早い Job の切替えができます

Live などの画像取得を行う場合はもう一度クリックして元に戻してください(戻さなかった場合、レーザーを発振せずに設定通りに動きます)

### 4. 挿入された Job、Pause や Pattern の編集

各 Job の右クリックで右図のようにプルダウンメニューが表示され、下記操作が可能です



**Trigger** : Job や Pause の開始や終了時に外部装置(Trigger Unit が別途必要です)などにシグナルを出す設定をできます(Pattern には設定できません不可)

**Rename** : 選択されている Job、Pause や Pattern の名前の変更

**Define Loop**(3 の Define Loop と同じ)

選択した選択されている Job、Pause や Pattern(複数選択する場合は、Ctrl キーを押したまま最初と最後をクリックします)の繰り返し設定をできます

Job などの上の数値をダブルクリックすることで繰り返し回数を変更できます

**Save**(3 の Save と同じ) : 選択されている Job、Pause や Pattern の保存

**Remove** : 選択されているすべての Job、Pause や Pattern の削除

**Delete** : すべての Pattern の削除

\*各 Job は、ドラッグ&ドロップで順序の変更が可能です

## 5. 挿入した Job 毎に設定を行います

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

\*それぞれの設定だけを確認する場合は、View Jobs without hardware change をクリックすると Job の切り替えを素早く行うことができます

(撮影前にもう一度クリックするのを忘れないでください)



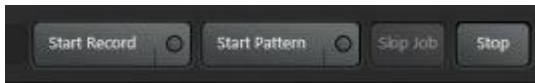
撮影条件を変更したい Job を選択する

①スキャンモードの設定

②励起波長、検出波長、検出器感度などの設定

③画像取得の設定(画素数、平均回数、ズーム、スキャンスピード、Zスタック、タイムラプスなど)

6. タイムラプス全体の実行、各 Job のみの実行は、下記ボタンで行います



**Start Record** : 選択されている Job のみの実行

**Start Pattern** : 選択されている Pattern の実行

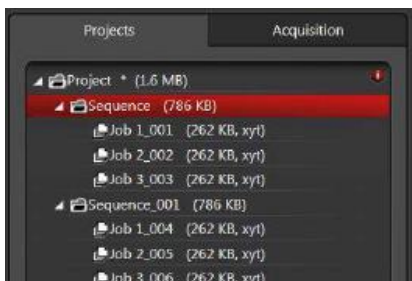
**Start** : すべての Pattern の実行

**Skip Job** : 現在画像取得中の Job をスキップします

**Stop** : 画像取得を中止します

7. 取得データについて

データは下図のように Sequence というサブフォルダーの中に、Job ごとにデータが分かれて一時保存されます



Live Data Mode では、各 Job 間で変更可能なパラメーターをあらかじめ設定することが可能です

パラメーターは Configuration メニュー/IPS/Confocal Live Data Mode で確認できます  
チェックが入っている項目は Job 間で変更できますが、チェックが入っていないまたは項目がないものは変更できません

8. Mark & Find の設定

右図のように Pattern の左下図に表示されるボタンを押すと、Mark & Find を設定できます

また、Mark & Find をアクティブにすると右下図のように + ボタンが表示され、この + ボタンを押すと Mark & Find の設定画面が表示されます (III-2.マルチポイント Mark & Find、24 ページ参照)



## V. Adaptive Focus Control (AFC) (オプション)

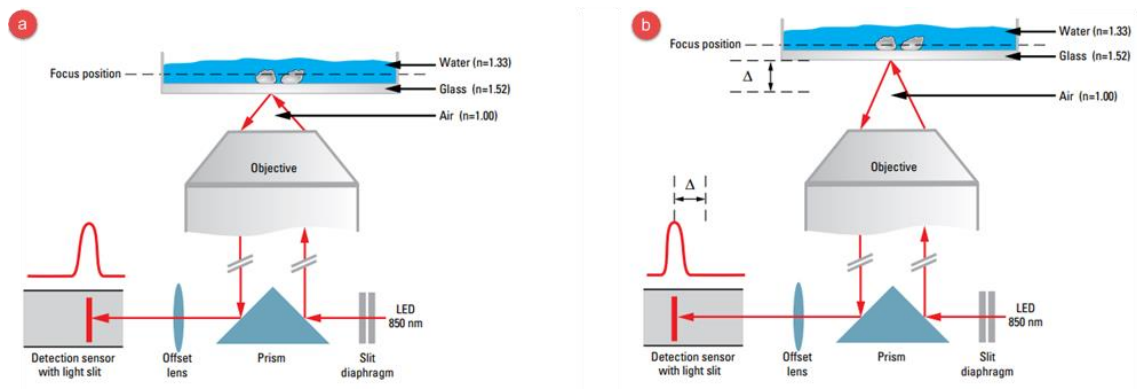
AFC は屈折率の差から生じる赤外光の反射を利用して対物レンズと容器底面の距離を記憶し、自動的にその距離を維持するオートフォーカスシステムです

### AFC 使用の注意点

・すべての対物レンズが AFC に適用可能というわけではありません  
 レンズの適用がご不明な場合は、弊社担当までお問い合わせください

\* AFC は容器底面での屈折率の差によって生じた反射を利用したオートフォーカスシステムです

\* 容器底面の厚さ、材質、汚れ・傷等により上手く作動しない場合があります



初期値(a)およびフォーカス位置の変化後(b)の模式図

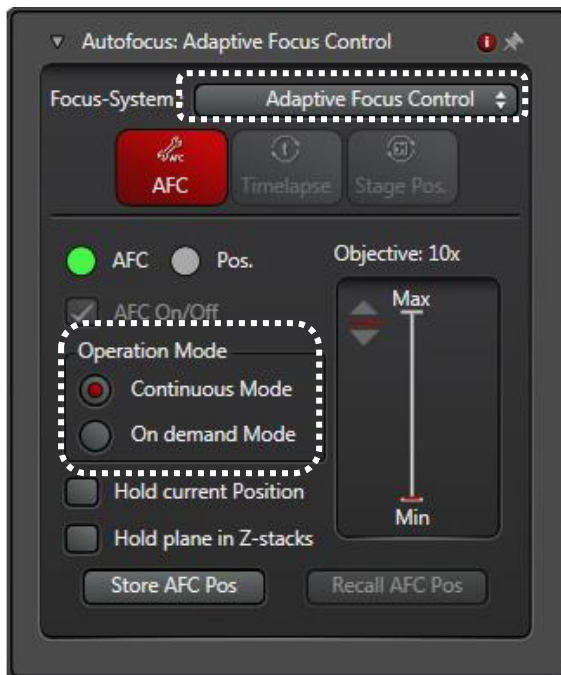
850 nm のレーザーを照射し、ガラスと空気/水などの界面での屈折率差による反射を用いて位置を記憶します

a から b のように対物レンズと界面の距離が変わっても追従する機能です

1. Acquisition Mode パネル内の Auto Focus ボタンをクリックし、Adaptive Focus Control パネルを表示します



2. Focus-System から「Adaptive Focus Control」を選択します



### Operation Mode の選択

**Continuous Mode** : 常にオートフォーカス状態になります

XYT 画像等の取得時に使用します

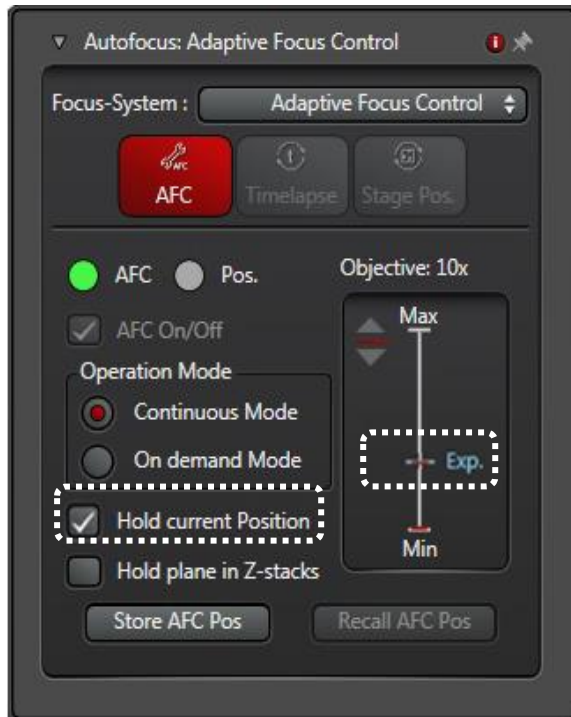
**On demand Mode** : 画像取得時にフォーカス合わせをします

XYZT 画像、またマルチポイントタイムラプス画像等の取得時に使用します

### 3. 基準点となる Z 位置の登録を行います

Continuous mode の場合：XYT 画像

撮影する Z 位置を決め、「Hold Current Position」にチェックを入れると、現在の Z 位置が登録されます



AFC を設定できます



AFC を設定できません



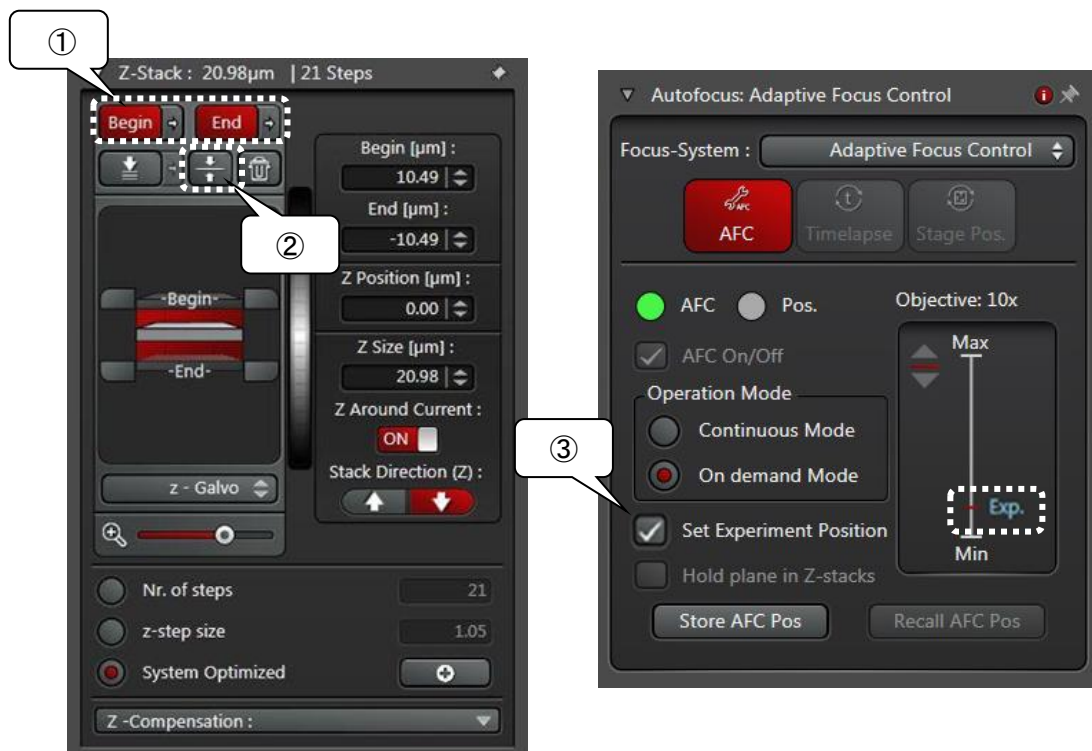
Autofocus パネル内の AFC ボタンが緑色に点灯している場合、その Z 位置は AFC の稼働範囲内ですので、登録可能です

\* 赤色に点灯している場合、AFC の稼働範囲外にあり、登録ができません



On demand Mode の場合：XYZT 画像やマルチポイントタイムラプス画像

- ① Live 画像を出しながら、通常通り Z-Stack 設定をおこないます
- ② 「Move To Center」を選択し、設定した Z 範囲の中央位置へ移動します
- ③ Autofocus パネルの「Set Experimental Position」にチェックを入れます



**\* 注意**

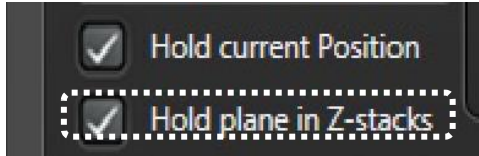
AFC を使用した Z-Stack では、「Set Experimental Position」で登録した位置が Z-Stack の中心位置として設定されます

\* Z のサイズは維持されるため、設定した Begin および End とは異なる範囲が再設定・撮影されます

必ず「Move To Center」を選択後に「Set Experimental Position」を設定してください



#### 4. Z-stack 取得時のオートフォーカス




「Hold plane in Z-stacks」にチェックを入れた場合は、Z-stack 取得時もオートフォーカスが有効になります

#### 5. タイムラプスの設定登録


\* マルチポイントのタイムラプスやタイリングの場合、温度変動などの影響により高さが変わりやすいので、設定することをお勧めします

XYT モード, XYZT モードの場合は、設定する必要はありません

① Autofocus パネルの  ボタンから、オートフォーカスを機能させるタイミングを選択します

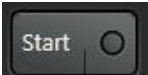


- ・ First Cycle Only : 一番目のサイクルでのみ実施
- ・ Every Cycle : すべてのサイクルで実施
- ・ Every ~ th cycle : 指定したサイクル数ごとに実施

② マルチポイントタイムラプスの場合は、Autofocus パネルの  ボタンからオートフォーカスを機能させるタイミングを選択します

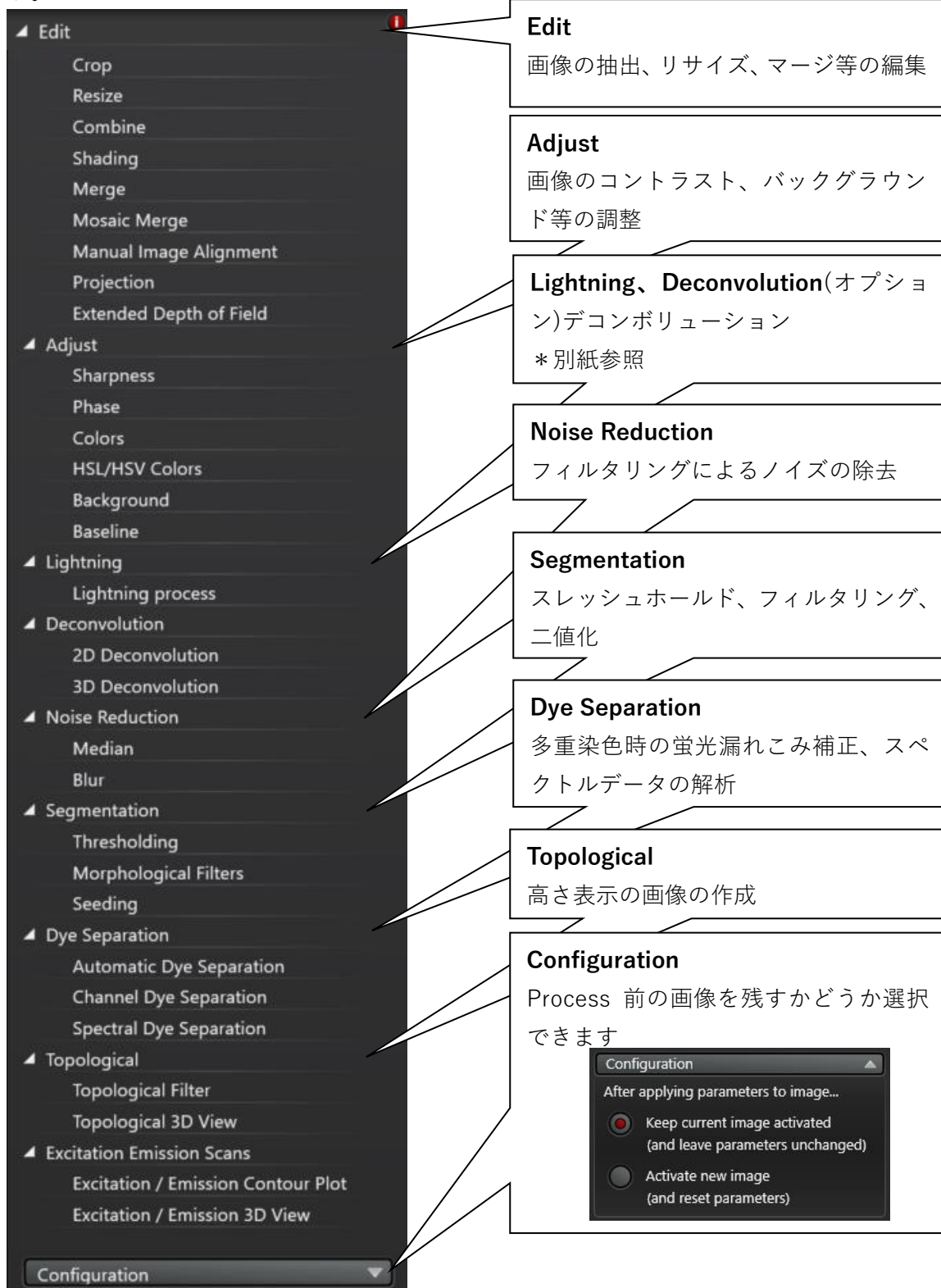


- ・ First Position Only : 一番目のポジションでのみ実施
- ・ Every Position : すべてのポジションで実施
- ・ Every ~ th position : 指定したポジション数ごとに実施

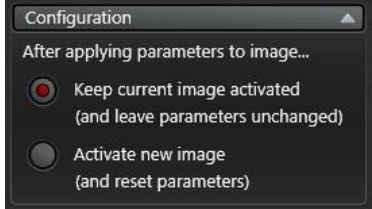
6.  ボタンから、撮影を開始します

## VI. Process

Process メニューでは、Acquire メニューで取得した画像に対して、様々な処理を行えます。



The image shows a dark-themed software menu titled "Process" with various sub-menus. Callout boxes on the right provide descriptions for several of these sub-menus:

- 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
- Lightning、Deconvolution**(オプション)デコンボリューション  
\*別紙参照
- 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
- 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
- Configuration**: Process 前の画像を残すかどうか選択できます  


The menu items visible in the screenshot are:

- Edit
  - Crop
  - Resize
  - Combine
  - Shading
  - Merge
  - Mosaic Merge
  - Manual Image Alignment
  - Projection
  - Extended Depth of Field
- Adjust
  - Sharpness
  - Phase
  - Colors
  - HSL/HSV Colors
  - Background
  - Baseline
- Lightning
  - Lightning process
- Deconvolution
  - 2D Deconvolution
  - 3D Deconvolution
- Noise Reduction
  - Median
  - Blur
- Segmentation
  - Thresholding
  - Morphological Filters
  - Seeding
- Dye Separation
  - Automatic Dye Separation
  - Channel Dye Separation
  - Spectral Dye Separation
- Topological
  - Topological Filter
  - Topological 3D View
- Excitation Emission Scans
  - Excitation / Emission Contour Plot
  - Excitation / Emission 3D View

At the bottom of the menu is a "Configuration" dropdown menu.

## VI-1. Edit

取得した画像(チャンネル、XYZ、Time Series)から任意のデータを抽出することができます

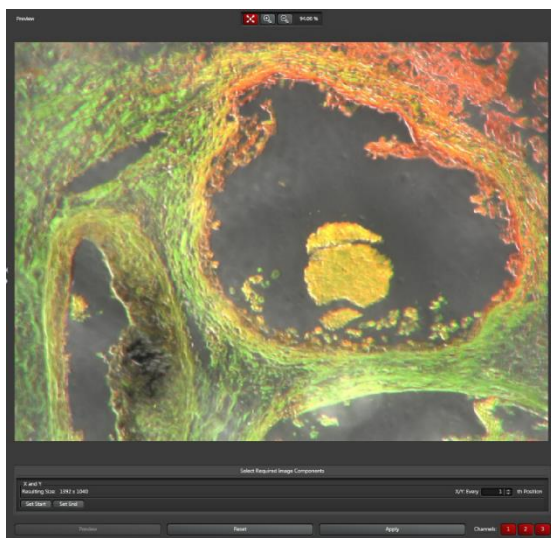
\* カラーカメラで撮影した画像では、RGB 各色の抽出も可能です

### VI-1-1. Crop

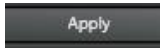
チャンネル、XY 領域および Z やタイムシリーズ画像の抽出、データサイズの縮小を行うことができます

新しく作成されたデータは、元のデータ名の後ろに「\_Cropped~」がつきます

#### チャンネルの切り抜き



不必要なチャンネルのボタンをクリックするとグレイアウトします

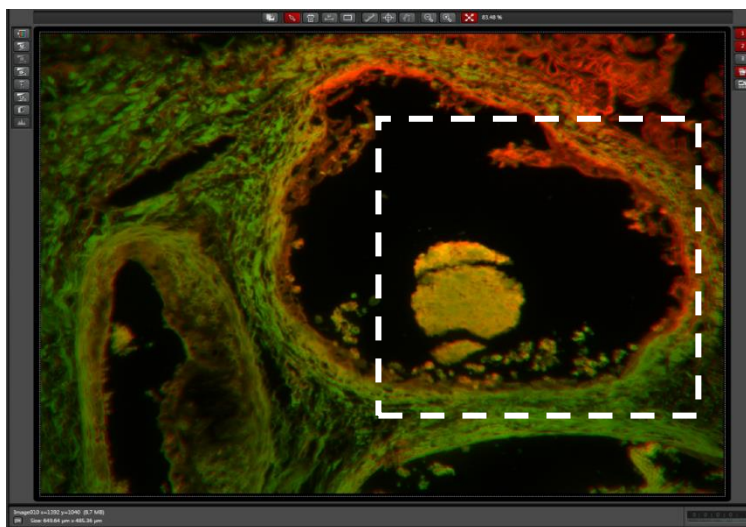
右下の Apply ボタン  をクリックすると、アクティブ(赤)なチャンネルだけのデータが新たに作成されます


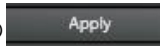


OFF にしたチャンネル

上記の例では、チャンネル 1 および 2 のデータのみが新たに作成されます

#### XY 領域の切り取り



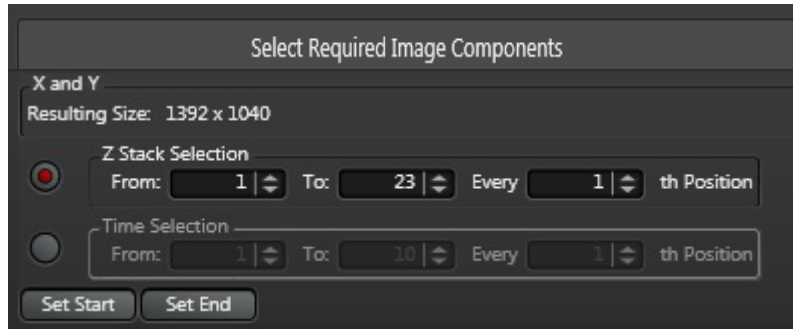
 ボタンをクリックし、画像上でのドラッグ&ドロップで ROI を作成し、右下の  ボタンをクリックすると、指定した範囲が抽出されたデータが新たに作成されます

### 連続データの抽出 (XYZ、XYT、XYZT 等)

Z Series または Time Series 画像を選択し、Select Required Image Component の

「From」と「To」に切り取るデータの数値を入力します

「Set Start」または「Set End」をクリックすることで現在の Z または T 位置を「From」または「End」に設定することもできます



Every ~th Position を変更すると切り取る間隔を変更することができます

例：“1”の場合、「From」から「To」まですべての画像を切り取ります。“2”の場合、1枚おきに画像を切り取ります

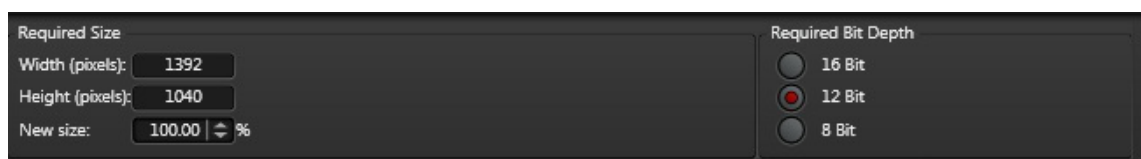
Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

### VI-1-2. Resize

画像サイズを縮小することができます

新しく作成されたデータは、元のデータ名の後ろに「\_Resize~」がつきます。

Required Size および Required Bit Depth を設定します



Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

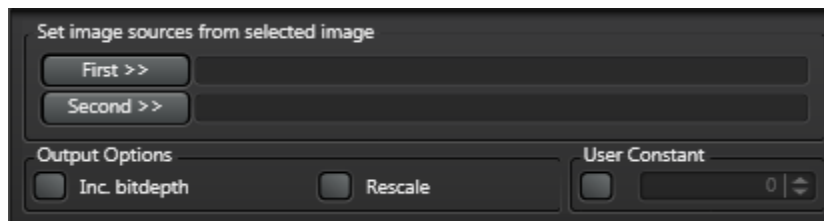
### VI-1-3. Combine

取得した画像シリーズ同士で演算を行うことができます

新しく作成されたデータは、元のデータ名の後ろに「\_Combine~」がつきます。

#### Projects 内の画像を選択し、First と Second をクリックします

画像の Format サイズや Bit 数が異なる場合、VI-1-2. Resize で揃えてから行ってください



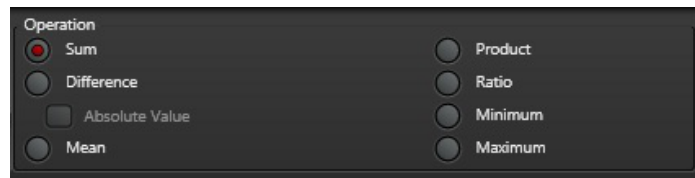
#### Operation から、画像間の演算内容を選択します

Output Options および User Constant にチェックを入ると下記の機能を使用することができます

**Inc. bitdepth (bit depth increment) :** 画像の明るさを積算する際、丸め誤差やサチュレーションが起きないように bit スケールが 12 または 16 に変えます

**Rescale :** bit スケールの合計値が演算結果の bit スケールになります

**User Constant :** 「First」または「Second」で選択した画像のコントラストを変えることができ、「First」と「Second」の両方で画像が選択されている場合、「First」のコントラストが変わります



**Sum :** 選択した 2 つの画像の合計輝度を表示します

**Difference :** 選択した 2 つの画像の輝度の差、「First」 - 「Second」を表示します

**Absolute Value :** 「Difference」で計算結果が負の数であった場合、絶対値として表示します

選択されていない場合、0 として表示されます

**Mean :** 選択した 2 つの画像の平均輝度を表示します

**Product :** 選択した 2 つの画像の輝度値を掛けた結果を表示します

「User Constant」を選択した場合、入力した値を「First」の輝度値に掛けた結果を表示します

**Ratio :** 選択した 2 つの画像の輝度値を割った結果を表示します

「Use Constant」を選択した場合、入力した値で「First」の輝度値を割った結果を表示します

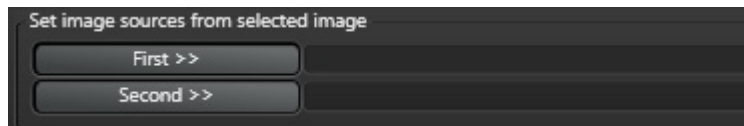
**Minimum :** 選択した 2 つの画像の輝度値を比較し、輝度値が小さい方を表示します

**Maximum :** 選択した 2 つの画像の輝度値を比較し、輝度値が大きい方を表示します

Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

#### VI-1-4 . Shading : 取得画像のシェーディング補正

取得した画像のシェーディング補正(照明ムラの補正)をすることができます  
別途、シェーディング参照用の画像を取得する必要があります。明視野、蛍光共に適用で  
きます



**First** : シェーディング処理をする画像を選択します

**Second** : シェーディングの参照画像(視野にサンプルが無い画像)を選択します



#### シェーディング参照画像取得のコツ

- ① サンプルが無く、ゴミも少ない視野を選びます  
(サンプル画像撮影時と同じ照明条件で)



- ② 若干フォーカスをずらし、ゴミをフォーカスアウトさせます



画像を取得して参照用とします



## VI-1-5. Merge

Merge は異なる画像データ(Z-Stack 画像やタイムシリーズも可)をひとつの画像データにまとめることができます

新たに作成されるデータは、データ名の後ろに「\_Merged～」がつきます

合成したいデータを選択し、「First」および「Second」を押します



**Merge Dimension** : 以下の4つの合成方法があります

**Channel** : Sequence で撮影したときのように Channel として追加します

First の Channel に Second の Channel が追加されます

Ex. First と Second が 2 Channel ずつの場合、Second の Channel が 3 と 4 に追加されます

**t** : Timelapse で撮影したときのように First のあとに Second が追加されます

表示される色は First の色に統一されます

**x** : First の右隣に Second を横に並べて表示します

表示される色は First の色に統一されます

**y** : First の下に Second を縦に並べて表示します

表示される色は First の色に統一されます

**z** : Z Stack 画像のように First の次に Second の画像を追加します

表示される色は First の色に統一されます

画像の大きさが異なる場合、左上を合わせた状態で合成されます

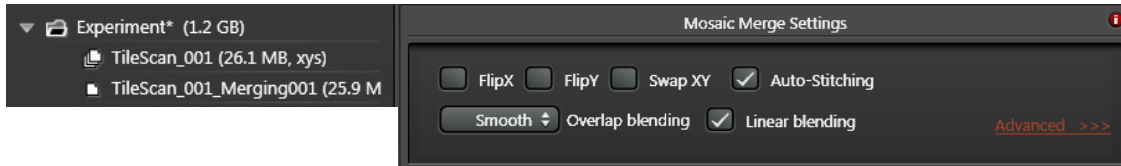
Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

## VI-1-6. Mosaic Marge

Tile Scan 画像の貼り合わせを行います

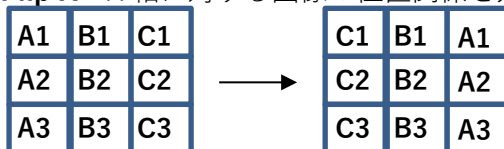
Tile Scan 画像データ(データ名は TileScan\_~となっています)を選択します

新たに作成されるデータは、データ名の後ろに「\_Merging~」がつきます

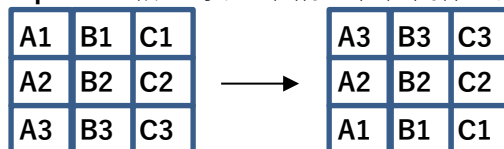


\* Rotation の設定が正しく行われている場合、Flip X、Flip Y、Swap XY はすべてオフの状態(デフォルト)で貼り合わせを行うことができます

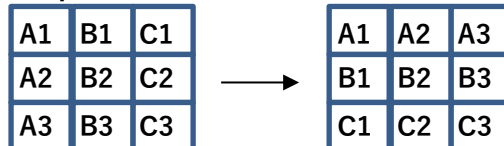
**Flip X** : X 軸に対する画像の位置関係を入れ替えます



**Flip Y** : Y 軸に対する画像の位置関係を入れ替えます



**Swap XY** : X 軸および Y 軸に対する画像の位置関係を入れ替えます



### Overlap blending

ドロップダウンメニューから以下の3つを選択することができます(Auto-Stiching が ON になっていることを確認してください)

**None** : 重ね合わせ領域に対して重みづけをせずに計算を行います。重ね合わせ領域が完全に一致している場合に用います

**Smooth** : 重ね合わせ領域の中で画像に近い方に重みづけして計算します  
画像間のつながりが滑らかです

Mosaic Merge 後に Maximum Projection する場合、重ね合わせ領域が格子状になってしまうため適していません

**Statistical** : 重ね合わせ領域の中で画像に近い方からランダムに選択して、計算します  
Mosaic Merge 後に Maximum Projection できます

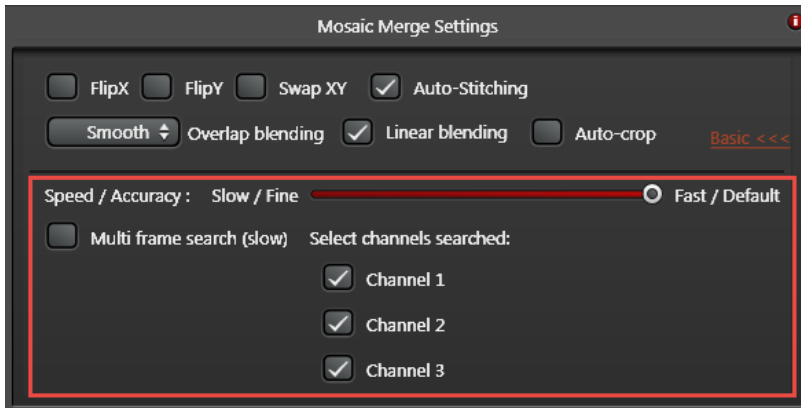
**Linear Blending** : 重ね合わせ領域で直線的に重みづけして計算します(オフの場合は、非線形に重みづけして計算します)。重ね合わせ領域が大きい場合に有効で、重ね合わせ領域も鮮明な画像を得ることができます。

\* 明るさにムラがあるサンプルでは、ムラがより強調されるため適していません



**Auto-Stiching** : 貼り合わせを行う際、つなぎ目の補正(Stiching)を行います

\* OFF の場合、画像を重ねるだけです



**Speed / Accuracy** : 処理の精度と速度のバランスの設定をおこないます

左側 : 処理の精度は高いが時間がかかります

右側 : 精度は低いですが時間はかかりません(デフォルトは右端です)

**Multi frame search (slow)** : バックグラウンドで作製した Maximum Projection 画像を用いて重ね合わせ位置の補正を行います(Z Stack 画像でのみ有効です)

\* Maximum Projection 画像は作成されません

**Select channels searched** : 重ね合わせ補正を行う Channel を選択できます

Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

\* Light Sheet などカメラで撮影したデータの場合、16-bit とレンジが広いとため、暗い画像となることが多いです

その場合、シグナルがバックグラウンドと認識されてしまうため、Look-Up Table を操作し画像を明るい状態にしてから Mosaic Merge 処理を行ってください

## VI-1-7. Manual Image Alignment

Channel が複数ある画像で、Channel 間の位置補正を手動で行うことができます  
処理画像は、データ名の後ろに「\_ImageAlignment～」がつきます



**Choose channel to align** : 位置補正を行うチャンネルを選択します

**Move selected channel** : 選択したチャンネルの画像を動かします

矢印 : 矢印方向に動きます

◎ : 初期位置に戻ります

スライダー : スライドした方向へ大きく動きます

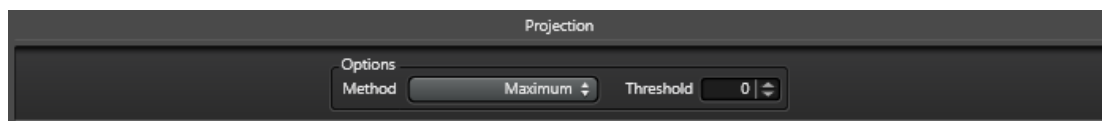
**Shift values** : 矢印またはスライダーで動かした移動量(Pixel および $\mu\text{m}$ )が表示されます  
また移動量(Pixel)を指定することができます

**Automatically crop image after realignment** : Apply を押すと、はみ出た部分が取り除かれた画像が新規作成されます

Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

## VI-1-9. Projection

Maximum Projection 画像を作成することができます  
処理画像は、データ名の後ろに「\_Processed～」がつきます



**Maximum** : Z 方向で最も明るい数値を Pixel ごとに探し、表示します

**Threshold** : 表示する明るさの閾値を設定できます

Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

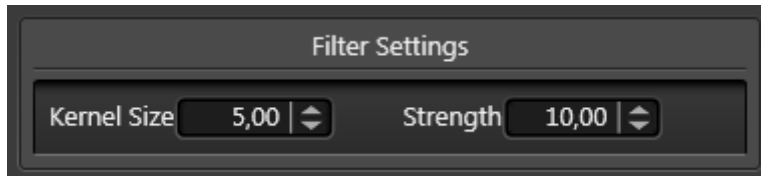
## VI-2. Adjust

画像の位置補正、Sharpness、Contrast、Brightness などの調整を行うことができます

### VI-2-1. Sharpness

画像の Sharpness を変更することができます

処理画像は、データ名の後ろに「\_Sharpen～」がつきます



**Kernel Size** : 設定した範囲(Pixel)内の Pixel を対象に処理を行います

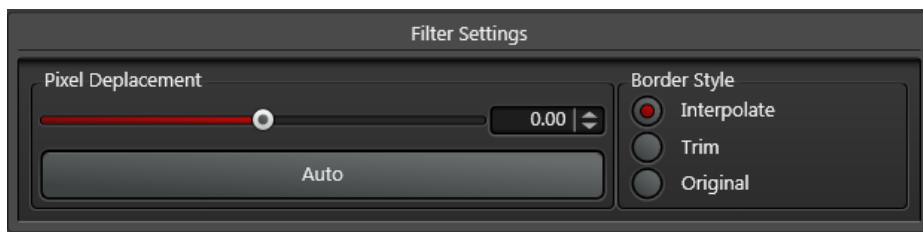
**Strength** : 処理を行う際の重みづけを設定します。値が大きいほど先鋭化しますが、ノイズも出やすくなります

Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

### VI-2-2. Phase

双方向スキャン (Bidirectional X)を使用した際、画像の位相(スキャンの往路と復路)がずれる場合があります、この位相のずれを補正できます

処理画像は、データ名の後ろに「\_Phase～」がつきます



**Pixel Displacement** : スライダーまたは数値入力で偶数番目の Line の移動幅を設定します

**Border Style** : 移動させた分、奇数または偶数 Line だけになる箇所(突出した部分)ができます。突出した部分に対する処理方法に以下の3つがあります

**Interpolate** : 突出した部分の掛けている箇所を補完します

**Trim** : 突出した部分をトリミングします

**Original** : そのまま表示します

Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

### VI-2-3. Colors

Contrast、Brightness、Gamma を調整することができます  
処理画像は、データ名の後ろに「\_AdjustClr～」がつきます



**Channel** : Contrast、Brightness、Gamma を調整する Channel を選択します

**Auto Contrast** : クリックすると、コントラストが自動調整されます

**Invert Intensity** : 輝度値を反転することができます

**Contrast/Brightness** : スライダーまたは数値入力により Contrast および Brightness を調整することができます(-100 から 100 まで)

**Gamma** : スライダーまたは数値入力により Gamma を調整することができます

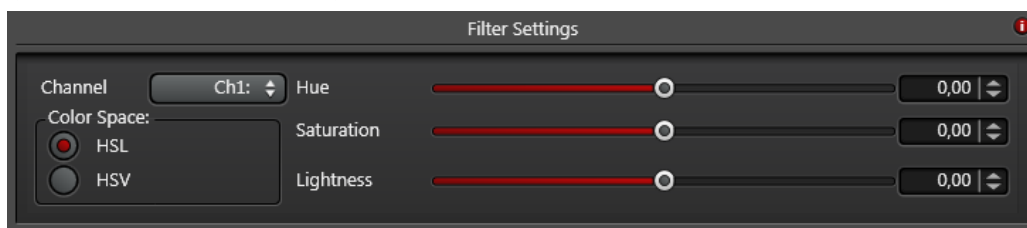
\* 数値は 0.01 から 7.00 にしてください

1 未満では画像が暗くなり、1 より大きければ明るくなります

Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

### VI-2-4. HSL/HSV Colors WideField(カメラ)の機能です

カメラで撮影された RGB 画像に対して HSL (Hue、Saturation、Lightness) または HSV (Hue、Saturation、Value) により補正を行うことができます



**Channel**: 色補正を行うチャンネルを選びます

**HSL/HSV** : 色補正を行う方法を選択します

HSL : 光源色(光源そのものが発する色)

HSV : 物体色(光が物体に反射して得られる色)

**Hue** : スライダーまたは数値入力により色相を調整できます(-180 から 180)

**Saturation** : スライダーまたは数値入力により彩度を調整できます(-100 から 100)

HSL の場合、50%で彩度が最大になります

HSV の場合、100%で彩度が最大になります

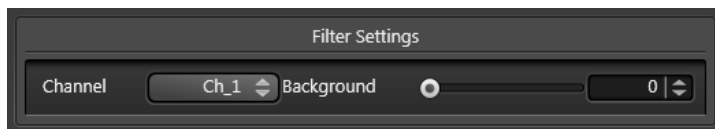
**Lightness** : HSL を選択した場合、表示されます。スライダーまたは数値入力により輝度を調整できます。値が一番大きいとき、彩度が一番高くなります(-100 から 100)

**Value** : HSV を選択した場合、表示されます。スライダーまたは数値入力により輝度を調整できます。50%のときに、彩度が一番高くなります(-100 から 100)

Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

## VI-2-5. Background

画像表示の閾値を設定することで、Background を抑えることができます  
処理画像は、データ名の後ろに「\_BSub～」がつきます



**Channel** : 閾値を設定する Channel を選択します

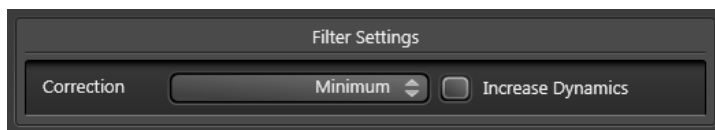
**Background** : スライダーまたは数値入力により閾値を設定できます

8 bit の場合は 0 から 255、12 bit の場合は 0 から 4095

Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

## VI-2-6. Baseline

Baseline の設定を設定することで、Background を抑えることができます  
処理画像は、データ名の後ろに「\_Baseline～」がつきます



**Correction** : 以下の 3つの方法で Baseline を算出し、輝度値から引きます

**Minimum** : 最小輝度値を Baseline とします

**Mean** : 平均輝度値を Baseline とします

**Eliminate Autofluorescence** : 複数回検出されシグナルの内、最小輝度を Baseline とします

**Increase Dynamics** : Baseline を引いた後、元のスケールと同じになるように輝度値を引き伸ばします

Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

## VI-3. Noise Reduction

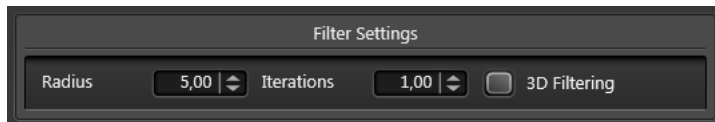
Median または Blur 処理を行うことで、ノイズを軽減することができます

### VI-3-1. Median

非線形処理を行います

画像の輪郭線は維持されます

処理画像は、データ名の後ろに「\_Median～」がつきます

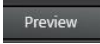
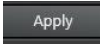



**Radius** : 設定した範囲内(Pixel)の輝度の中央値を輝度として表示します

数値が大きいほど、計算に時間がかかります

**Iterations** : 反復計算を行う回数を設定します

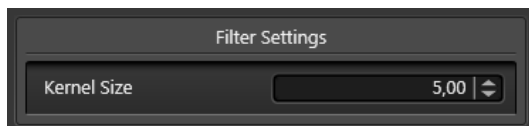
**3D Filtering** : Z Stack 画像に対して処理を行う場合 ON にすると、平面ではなく、球形として計算します

	選択した設定の簡易画像を表示します
	選択した設定で処理を開始します
	設定を初期値に戻します

### VI-3-2. Blur



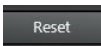
線形処理を行います

処理画像は、データ名の後ろに「\_Blur～」がつきます



**Kernel Size** : 設定した範囲内(Pixel)の輝度の中央値を輝度として表示します

\* Kernel Size が 3 のとき、3x3 計 9 Pixel の平均値が中心の Pixel の輝度値として採用されます

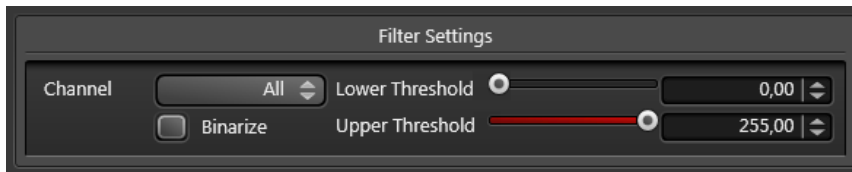
	選択した設定の簡易画像を表示します
	選択した設定で処理を開始します
	設定を初期値に戻します

## VI-4. Segmentation

画像にフィルタ(閾値)を設定し、特定の要素を抽出します  
輝度や形態でフィルタリングできます

### VI-4-1. Thresholds

画像表示を行う閾値の下限と上限を設定できます  
処理画像は、データ名の後ろに「\_Thresh～」がつきます



**Channel** : 設定を行う Channel を選択します

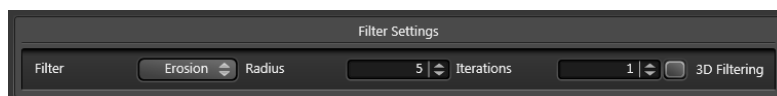
**Lower Threshold / Upper Threshold** : 画像表示する閾値の下限および上限を設定します

**Binarize** : 下限から上限の範囲内にあるものを白、下限より下を黒の二値化して表示します

Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

### VI-4-2. Morphological Filters

画像から抽出を行えます  
処理画像は、データ名の後ろに「\_Processed～」がつきます



**Filter** : 以下の4つの処理方法があります(右図一番上は処理前)

**Erosion** : 大きな構造を小さく、小さい構造が取り除きます(上から二番目)

**Dilation** : 構造をより大きくし、隙間を埋めます(上から三番目)

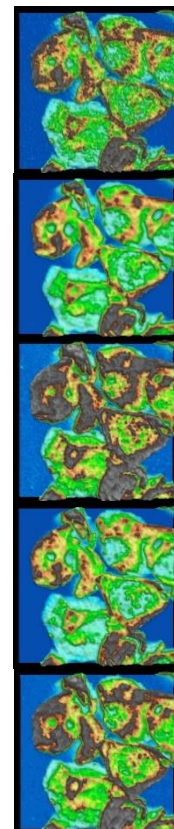
**Open** : Erosion のあとに Dilation を行います(上から四番目)  
小さな構造が取り除かれます(ノイズの多い画像に有効です)

**Close** : Dilation のあとに Erosion を行います(一番下)  
隙間が埋まります(構造に抜けがあるような画像に有効です)

**Radius** : 設定したサイズ(Pixel)を基準に処理を行います  
数値が大きいほど、計算に時間がかかります

**Iteration** : 反復計算を行う回数を設定します

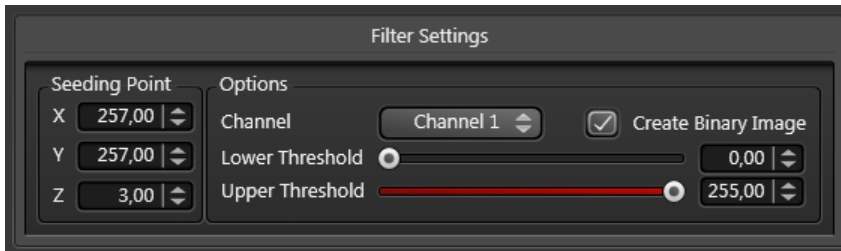
**3D Filtering** : Z Stack 画像の場合 ON にすると、平面ではなく、球形として計算します



Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

### VI-4-3. Seeding

Z Stack 画像から設定した蛍光強度を持つシグナルの抽出を行えます  
処理画像は、データ名の後ろに「\_Seeding～」がつきます



**Seeding Point** : 抽出したい箇所の XYZ 座標は画像をクリックすると自動入力されます(Z はスライス番号)

**Channel** : 抽出を行う Channel を選択します

\* 処理後は選択した Channel だけになります

**Lower Threshold / Higher Threshold** : 画像表示する閾値の下限および上限を設定します

**Create Binary Image** : 下限から上限の範囲内にあるものを白、下限より下を黒の二値化して表示します(デフォルトは ON)

Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します



## VI-5. Dye Separation

色素の漏れこみ補正を行うことができます(S/N のいい画像を用いることが重要です)

下記のように使い分けをします

### Channel Dye Separation :

- ・補正を行いたい蛍光色素がそれぞれ単独発現しているサンプルがあるか、画像内に蛍光色素が単一で存在しており Reference をとれる場合
- ・自家蛍光を除く場合

### Spectral Dye Separation :

- ・補正を行いたい蛍光色素がそれぞれ単独発現しているサンプルがあるか、画像内に蛍光色素が単一で存在しており Reference をとれる場合
- ・蛍光または励起スペクトル画像を使用する場合
- ・自家蛍光を除く場合

### Automatic Dye Separation :

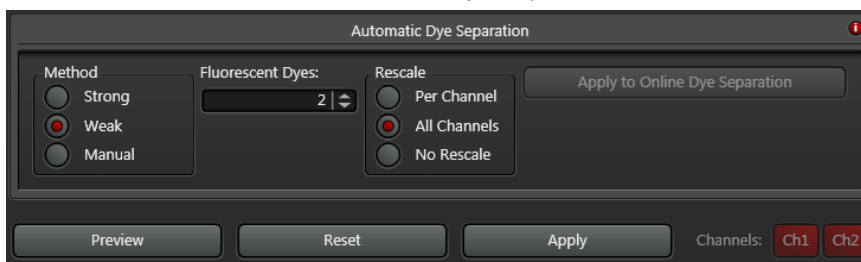
- ・Reference を取れない場合(ただし、S/N がいい場合)
- ・Weak : ノイズやバックグラウンドが弱い場合
- ・Strong : ノイズやバックグラウンドが強い場合

### Manual Dye Separation :

- ・Reference を取れない場合
- ・Automatic Dye Separation でうまくいかない場合

### VI-5-1. Automatic Dye Separation

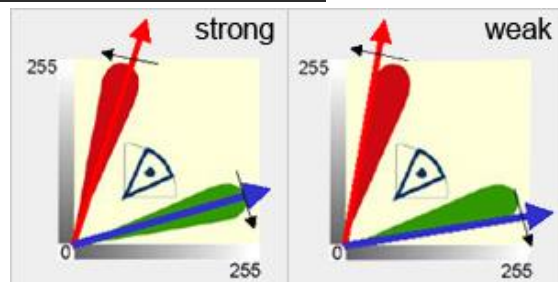
多色画像において、蛍光の漏れこみの割合を計算し、それを基に補正を行います  
処理画像は、データ名の後ろに「\_DyeSep～」がつきます



**Method :** 以下の3つの処理方法があります(ノイズやバックグラウンドが弱い場合)

**Strong :** 散布図の中心を基準に自動で計算されます

**Weak :** 散布図の軸に近いところを基準に自動で計算されます(ノイズやバックグラウンドが強い場合)



**Manual** : 漏れこみの度合いを手動で設定することができます

\* Manual を選択すると、右図が表示されます

**Edit Matrix** : Dye 1 または Dye 2 の Ch 1 および Ch 2 における漏れこみの割合を入力すると、漏れこみの割合を考慮した輝度値に補正します

**Reset Matrix** : 設定をデフォルトに戻します

**Save** : 設定を保存します

**Load** : 設定を呼び出します

**Apply** : 設定を適用します



**Fluorescent Dye** : 使用した色素の数を設定します(デフォルトは使用した Channel の数)

**Rescale** : 補正された輝度値を表示する際、輝度スケールの表示設定を行うことができます

**Per Channel** : 表示スケール設定を Channel ごとに変更します

**All Channel** : 表示スケール設定を Channel 間で統一します

**No Rescale** : 表示スケール設定を変更しません

### Online Dye Separation

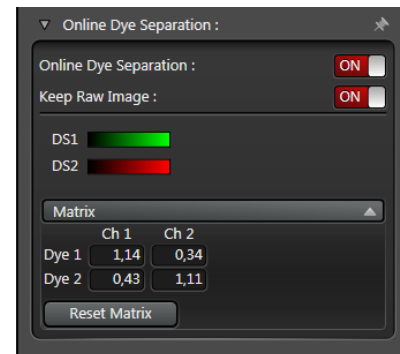
撮影中に Dye Separation を行い、その結果を表示します (Sequence Scan が ON になっている場合、単一 Seq の設定でも使用できません)

**Keep Raw Image** : Dye Separation を行う前のデータを残しておくか選択できます

**DS 1、DS 2** : Pseudo Color を設定できます

**Matrix** : Dye Separation を行う際の漏れ組の度合いを設定できます

**Reset Matrix** : 設定した Matrix の値をリセットします



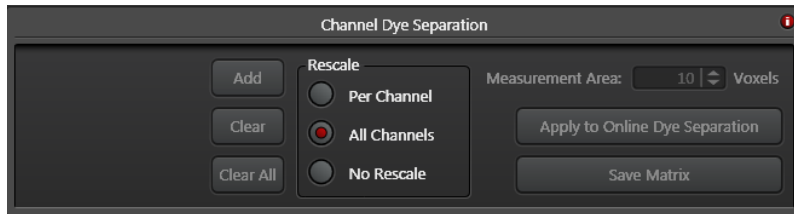
複数チャンネルで取り込んだ多重染色の画像データに対して散布図のアルゴリズムに従って処理を行い、蛍光の漏れこみの補正を行います。

Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

## VI-5-2. Channel Dye Separation

多色画像において、画像中の任意の位置の蛍光強度比を基に蛍光の漏れこみ補正を行います

処理画像は、データ名の後ろに「\_Processed～」がつきます



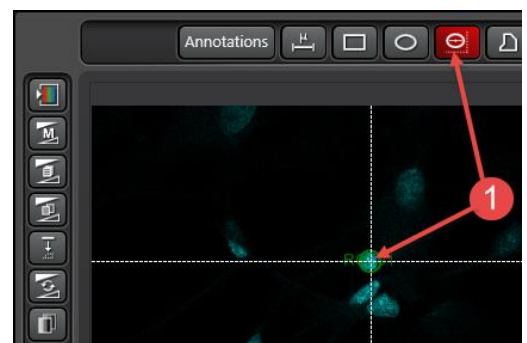
**Measurement Area** : Reference を設定する際のサイズを設定できます(単位は voxel)

**Add** : 右図矢印の Annotations Tool を選択し、Reference とする場所をクリックすると、十字線が表示されます

Add をクリックすると、Channel の輝度比が登録されます

**Clear** : 最後に登録した Reference を削除します

**Clear All** : 登録したすべての Reference を削除します



**Per Channel** : 表示スケール設定を Channel ごとに変更します

**All Channel** : 表示スケール設定を Channel 間で統一します

**No Rescale** : 表示スケール設定を変えません

### Online Dye Separation

撮影中に Dye Separation を行い、その結果を表示します (Sequence Scan、Between Frames や Between Stacks が ON になっているときは使用できません)

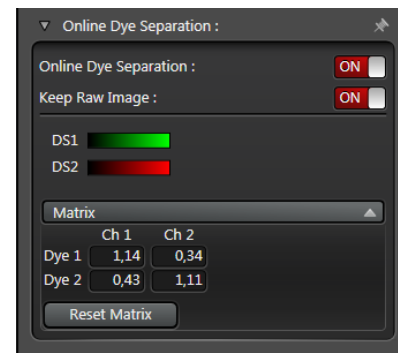
**Keep Raw Image** : Dye Separation を行う前のデータを残しておくか選択できます

**DS 1、DS 2** : Pseudo Color を設定できます

**Matrix** : Dye Separation を行う際の漏れ組の度合いを設定できます

**Reset Matrix** : 設定した Matrix の値をリセットします

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。



**Preview** : 選択した設定の簡易画像を表示します

**Apply** : 選択した設定で処理を開始します

**Reset** : 設定を初期値に戻します

### **VI-5-3. Spectral Dye Separation**

波長方向に連続して取り込んだデータによって取得したデータに対して解析を行う機能です

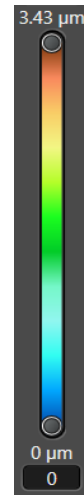
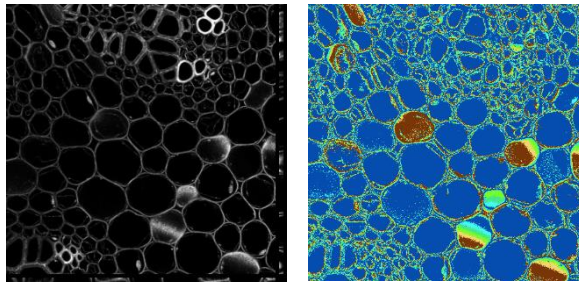
操作法については、II-2 Lambda Scan の「スペクトル情報をグラフ化」の項をご参照ください

## VI-6. Topological

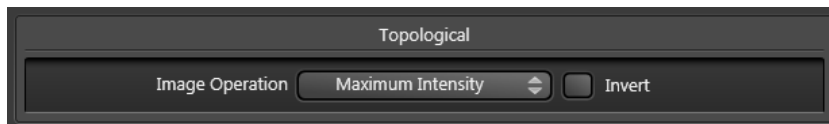
高さ情報を色情報に変換して 2D または 3D 表示します

### VI-6-1. Topological Filter

右図のように Z Stack 画像の高さ情報を色情報に変換して 2D 表示します  
左下が輝度画像、右下が Topological Filter 処理を行った画像



処理画像は、データ名の後ろに「\_Topo～」がつきます



**Image Operation** : 以下 2 つの処理方法があります

**Maximum Intensity** : Z 方向で最も輝度が高い位置を高さとして表示します

**Center of Mass** : Z 方向で輝度の重心位置を高さとして表示します

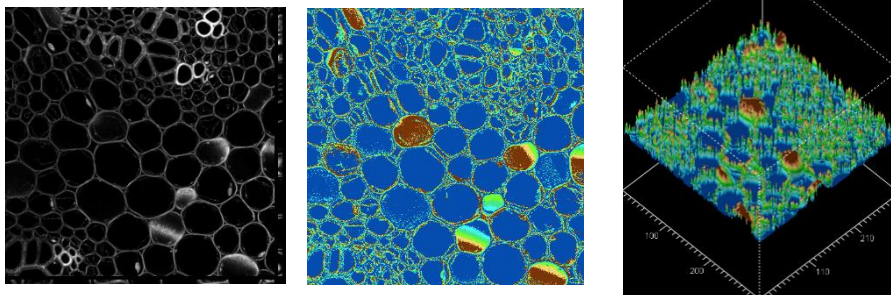
**Invert** : 高さ表示する際、0 点を Begin から End に変更します(デフォルトは Begin)

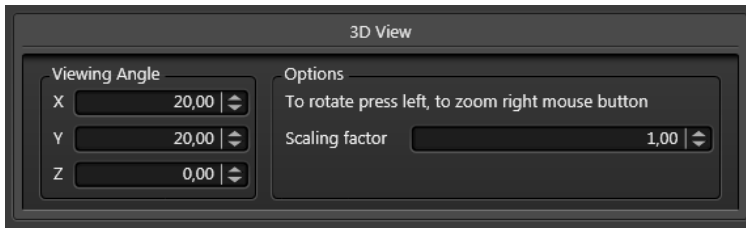
Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

### VI-6-2. Topological 3D Viewer

VI-6-1. Topological Filter で作製した画像を 3D 表示します

左下が輝度画像、中央が Topological Filter 処理した画像、右下が Topological Filter 処理したものを 3D 表示した画像





**Viewing Angle** : 鳥瞰図を作成する際の回転角を設定できます

**X, Y, Z** : 回転角が表示されます

**Scaling Factor** : Z の高さを強調することができます(デフォルトは 1.00)

3D 画像上で左ドラッグすると回転、右ドラッグするとズームすることができます

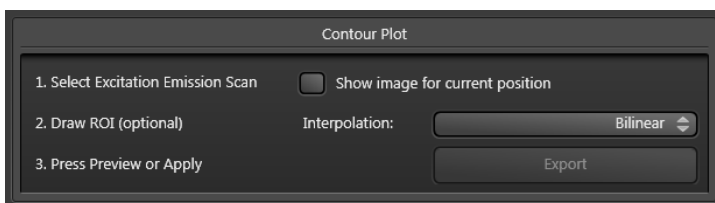
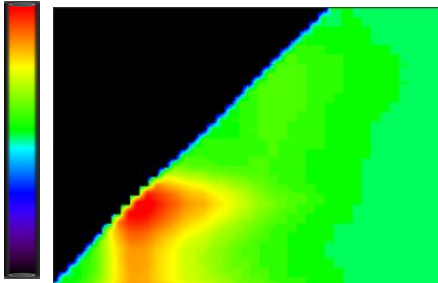
Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

## VI-7. Excitation / Emission Scans

$\Lambda\lambda$  Scan して得られたデータを 2D(縦軸：励起、横軸：蛍光)表示することができます

### VI-7-1. Excitation / Emission Scans Contour Plot

蛍光輝度を右下図のように表示し、励起(縦軸)と蛍光(横軸)プロットを右下図のように 2D 表示します



Lambda	Size	Format
Lambda_490nm	(262 KB, xy/Λ)	
Lambda_510nm	(786 KB, xy/Λ)	
Lambda_530nm	(1.3 MB, xy/Λ)	
Lambda_550nm	(1.8 MB, xy/Λ)	
Lambda_570nm	(2.4 MB, xy/Λ)	
Lambda_590nm	(2.9 MB, xy/Λ)	
Lambda_610nm	(3.4 MB, xy/Λ)	
Lambda_630nm	(3.9 MB, xy/Λ)	
Lambda_650nm	(4.5 MB, xy/Λ)	
Lambda_670nm	(5.0 MB, xy/Λ)	
Lambda_690nm	(5.5 MB, xy/Λ)	
Lambda_710nm	(5.5 MB, xy/Λ)	

**1. Select Excitation Emission Scan** : 右図で赤字になっている

「LambdaLambda~」という名前のデータを選択します

**2. Draw ROI (optional)** : 2D 表示する範囲を設定します

Pixel の場合はクリックするだけ、ROI の場合は ROI を指定してください

**3. Press Preview or Apply** :

Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します

**Show image for current position** : 2D(縦軸：励起、横軸：蛍光)上をクリックすると、選択された励起および蛍光で取得された画像が表示されます

**Interpolation** : 蛍光輝度を表示する際、測定した波長間の補間をする必要があります、以下の3つの補間方法があります

**Bilinear** : 隣接した4つ蛍光輝度値を基に、距離に応じて重みづけして補間します  
デフォルトで選択されていて、作成される図のクオリティーは中程度です

**Nearest Neighbor** : 処理が速く行われますが、作成される図のクオリティーは低いです

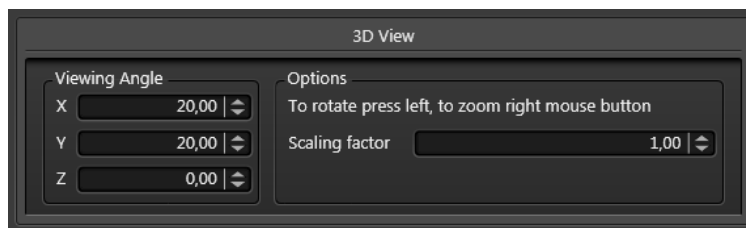
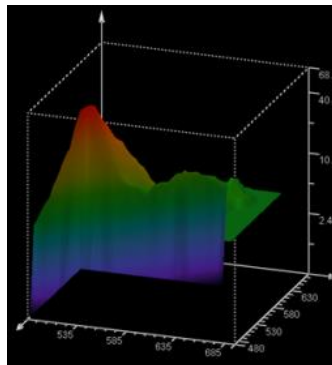
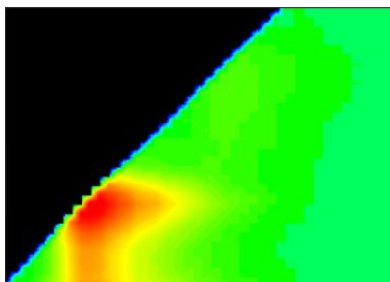
**Triangulate** : 輝度値を基にドロネー図三角形分割を用いて補間します  
作成される図のクオリティーは高いです

**Export** : 作成した図を tif、raw data、raw txt または txt で出力することができます

Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します

## VI-7-2. Excitation / Emission 3D Viewer

Excitation / Emission Scan Contour Plot で得られた励起と蛍光プロット(左下図)を右下図のように 3D 表示します



**Viewing Angle** : 鳥瞰図を作成する際の回転角を設定できます

**X, Y, Z** : 回転角が表示されます

**Scaling Factor** : Z の高さを強調することができます(デフォルトは 1.00)

3D 画像上で左ドラッグすると回転、右ドラッグするとズームすることができます

Preview	選択した設定の簡易画像を表示します
Apply	選択した設定で処理を開始します
Reset	設定を初期値に戻します



## VII. Quantify

取得した画像データをもとに定量を行うことができます

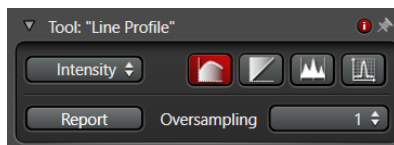


Intensity : 取得画像上に作成した ROI 内の輝度値を定量することができます(デフォルト)

Colocalization : 共局在率の定量を行うことができます

### VII-1. Intensity

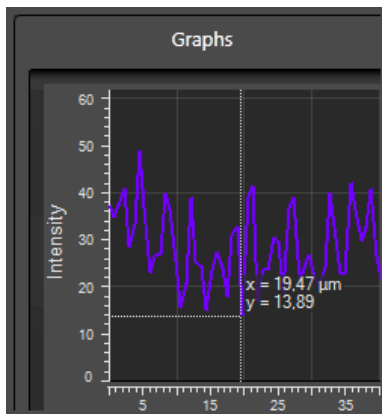
#### VII-1-1. Line Profile



画像上に作成した線(下図赤点線部の Tool で作製した)の輝度値を測定し、グラフ表示を行うことができます



左下 : 画像上に作成した線の輝度値のグラフ(縦軸 : 輝度値、横軸 : ROI の長さ)、右下 : 測定結果(Channel ごとに表示されます)



Statistics	
Channel 1	
Length	
Pixel Count	
Mean Value	
Variance	
Standard Deviation (RMS)	
Average Deviation	
Max Amplitude	
Max Position	
Min Amplitude	
Min Position	
Center Of Mass Pos.	
Maximum Peak	
Maximum Valley	

**Length** : ROI の長さ(μm)

**Pixel Count** : 輝度も持つ Pixel 数

**Mean Value** : 平均輝度値

**Variance** : 輝度値の分散

**Standard Deviation(RMS)** : 標準偏差  
(二乗平均平方根)

**Average Deviation** : 平均偏差

**Max Amplitude** : 最高輝度値

**Max Position** : 最高輝度値をもつ

Pixel の位置

**Min Amplitude** : 最低輝度値

**Center of Mass Pos.** : 重心にある Pixel の位置

**Maximum Peak** : 平均値から最も正の偏差が大きい Pixel の輝度値

**Maximum Valley** : 平均値から最も負の偏差が大きい Pixel の輝度値

**ROI Length** : ROI の長さ(Pixel)

**Oversampling** : 1 から 64 までの選択した値に応じて輝度値を強調して、表示します

**Report** : ROI が描かれた画像、輝度グラフ、測定結果を XML で出力します



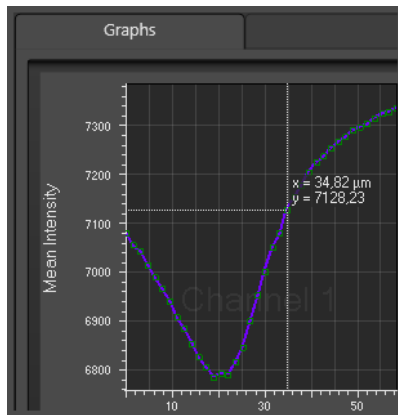
## VII-1-2. Stack Profile



画像上に作成した線や ROI(下図赤点線部の Tool で作製した)の輝度値を測定し、グラフ表示を行うことができます



左下：画像上に作成した ROI の輝度値のグラフ(縦軸：ROI の平均輝度値、横軸：Z 位置など下記 Dimension を参照)、右下：測定結果



Mean Value
Sum Processed Pixel
Pixel Sum
Length
Frame Count
Variance
Standard Deviation
Average Deviation
Max Amplitude
Max Position
Min Amplitude
Min Position
Center Of Mass Position

**Mean Value**：輝度平均  
**Pixel Count**：合計 Pixel 数  
**Pixel Sum**：輝度を持つ合計 Pixel 数  
**Length**：Z の厚さ(μm)  
**Frame Count**：Z の撮影枚数  
**Variance**：輝度値の分散  
**Standard Deviation(RMS)**：標準偏差(二乗平均平方根)  
**Average Deviation**：平均偏差

**Max Amplitude**：最高輝度値

**Max Position**：最高輝度値をもつ Pixel の位置

**Min Amplitude**：最低輝度値

**Center of Mass Pos.**：重心にある Pixel の位置

Dimension：z、y、t、λ、Λ、line、n、ch からグラフの横軸となるパラメーターを選択します(データにより選択できる項目が異なります)

z、y、t はそれぞれ xyz、xzy、xy(z)t 取得時

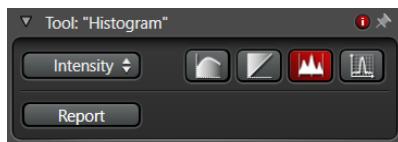
λ、Λ は蛍光スペクトルまたは励起スペクトル取得時

line、n は xt 取得時(line：line ごとに表示、n：page ごとに表示)

ch は多色画像取得時

Report：ROI が描かれた画像、輝度グラフ、測定結果を XML 形式で出力します

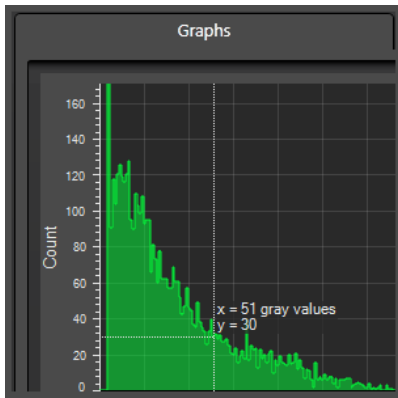
## VII-1-3. Histogram



画像上に作成した線や ROI の輝度値を測定し、グラフ表示を行うことができます

左下：画像上に作成した ROI の輝度値のグラフ(縦軸：Pixel 数、横軸：輝度値)

右下：測定結果



Mean Value
Sum Processed Pixel
Pixel Sum
Maximum
Minimum
Variance
Standard Deviation
Average Deviation
Maximum Peak
Maximum Valley

**Mean Value** : 輝度平均  
**Sum Processed Pixel** :  
**Pixel Sum** : 輝度を持つ合計 Pixel 数  
**Maximum** : 最高輝度値  
**Minimum** : 最低輝度値  
**Variance** : 輝度値の分散  
**Standard Deviation(RMS)** : 標準偏差

(二乗平均平方根)

**Average Deviation** : 平均偏差

**Maximum Peak** : 平均値から最も正の偏差が大きい Pixel の輝度値

**Maximum Valley** : 平均値から最も負の偏差が大きい Pixel の輝度値

**Report** : ROI が描かれた画像、輝度グラフ、測定結果を XML で出力します

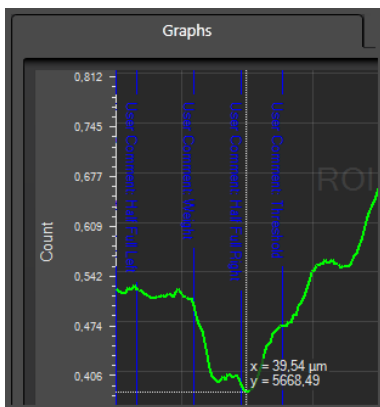
### VII-1-4. Determine FWHM



FWHM(Full Width at Half Maximum)測定を行うことができます

左下 : 画像上に作成した ROI の輝度値のグラフ(縦軸 : 輝度値、横軸 : ROI の長さ)

右下 : 測定結果



1. Peak: Description
1. Peak: Max Value
1. Peak: Ratio To Main Peak
1. Peak: Distance To Main Peak
1. Peak: Pixel Distance To Main Peak
1. Peak: FWHM
2. Peak: Description
2. Peak: Max Value
2. Peak: Ratio To Main Peak
2. Peak: Distance To Main Peak
2. Peak: Pixel Distance To Main Peak
2. Peak: FWHM
3. Peak: Description
3. Peak: Max Value
3. Peak: Ratio To Main Peak
3. Peak: Distance To Main Peak
3. Peak: Pixel Distance To Main Peak
3. Peak: FWHM

- 1. Peak: Description :
- 1. Peak: Max Value :
- 1. Peak: Ratio To Main Peak :
- 1. Peak: Distance To main Peak
- 1. Peak: Pixel Distance To main Peak
- 1. Peak: FWHM
- 2. Peak: Description
- 2. Peak: Max Value
- 2. Peak: Ratio To Main Peak

- 2. Peak: Distance To Main Peak
- 2. Peak: Pixel Distance To Main Peak
- 2. Peak: FWHM
- 3. Peak: Description
- 3. Peak: Max Value
- 3. Peak: Ratio To Main Peak

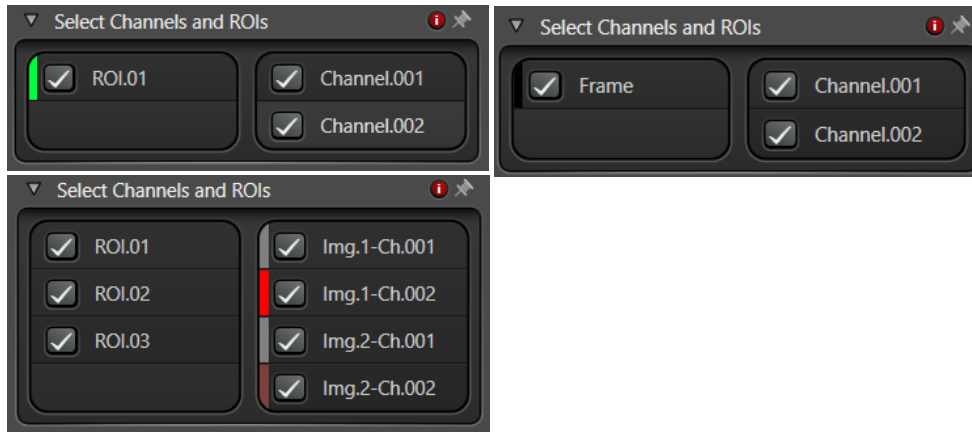
- 3. Peak: Distance To Main Peak
- 3. Peak: Pixel Distance To Main Peak
- 3. Peak: FWHM

Report : ROI が描かれた画像、輝度グラフ、測定結果を XML で出力します

## VII-2. Tool

### VII-2-1. Select Channels and ROIs

グラフに表示する項目を選択することができます



**ROI** : ROI を複数作成した際、グラフに表示する ROI を選択することができます

**Frame** : Stack Profile を選択し ROI を作成していない場合、VI-1-2. Dimention で選択したパラメーターを横軸としたグラフの表示/非表示を選択できます

**Img.-Ch.** : Comparison view で画像を複数表示し、Link している場合、グラフに表示する画像の Channel を選択することができます

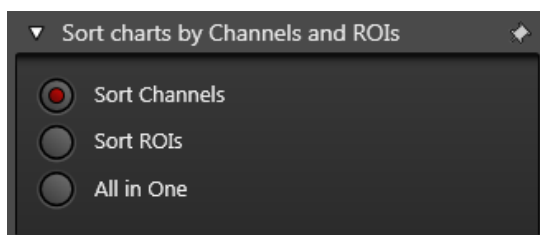
**Channel** : グラフに表示する Channel を選択することができます

**Spectrum** : 蛍光スペクトルを取得した画像で Stack Profile を選択すると、輝度がグラフ表示されます

**Exc. Spectrum** : 励起スペクトルを取得した画像で Stack Profile を選択すると、輝度がグラフ表示されます

### VII-2-2. Sort charts by Channels and ROIs

グラフに表示する項目を選択することができます



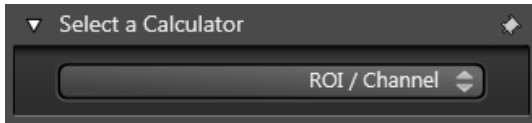
**Sort Channels** : グラフを Channel ごとに分けて表示します

**Sort ROIs** : グラフを ROI ごとに分けて表示します

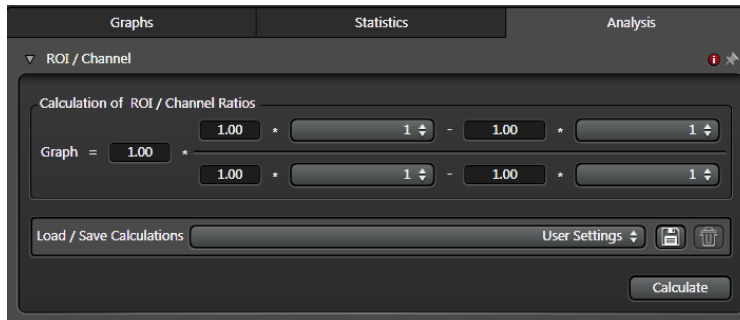
**All in One** : 一つのグラフにすべてを表示します

## VII-2-3. Select a Calculator

Stack Profile 選択時に、輝度値を用いた計算を行うことができます



### ROI/Channel



0 : 計算から排除します(デフォルト)

1 : 計算に入れます

**Channel/ROI** : 選択した Channel および ROI の輝度値を基に計算を行います

**Channel/Frame** : 選択した Frame の輝度値を基に計算を行います

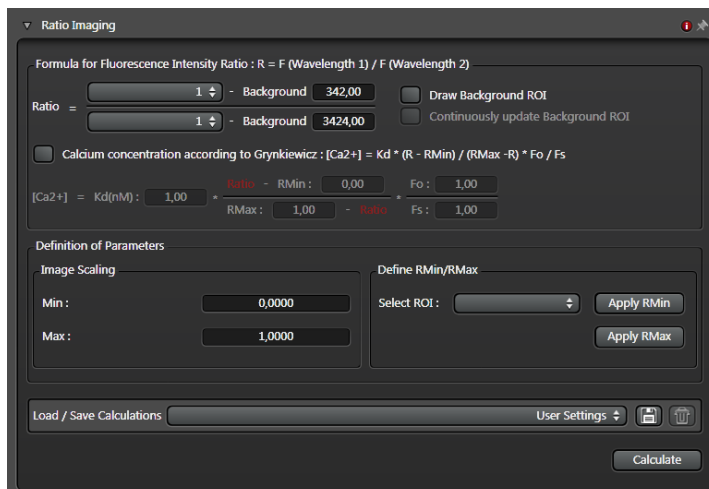
**Spectrum/ROI** : 蛍光スペクトルを取得した画像の ROI の輝度値を基に計算を行います

**Spectrum/Frame** : 蛍光スペクトルを取得した画像の Frame の輝度値を基に計算を行います

**Exc. Spectrum/ROI** : 励起スペクトルを取得した画像の ROI の輝度値を基に計算を行います

**Exc. Spectrum/Frame** : 励起スペクトルを取得した画像の Frame の輝度値を基に計算を行います

### Calcium Imaging/Ratio Imaging



Formula for Fluorescence Intensity Ratio と Calcium concentration according to Gryniewicz の 2 つの方法があります

### Formula for Fluorescence Intensity Ratio

蛍光強度比を基に Calcium 濃度を計算する方法です

**Ratio** : 励起波長 340 nm と励起波長 380 nm の比率(励起波長 340 nm/励起波長 380 nm)

**Background** : 閾値を設定することでバックグラウンドの影響を排除し、より正確な計測を行うことができます

**Draw Background ROI** : バックグラウンドとなる閾値を計算するための ROI を設定できます

**Continuously update Background ROI** : Background ROI が変わると自動的に計算し閾値を設定します

### Calcium concentration according to Gryniewicz

蛍光強度比を基に Gryniewicz の方法を用いて細胞内 Calcium 濃度を計算する方法です

Ref. Takahashi *et al.* PMID:10508230, Gryniewicz *et al.* PMID:8894275

**Kd[nM]** : Fura-2 の Calcium 錯体解離定数(224 nM)

**Ratio** : 励起光 340 nm 輝度値/励起光 380 nm 輝度値(蛍光波長は 510 nm)

**Rmin** : Calcium Free のときの Ratio

**Rmax** : Calcium Saturated のときの Ratio

**Fo** : Calcium Free Fura-2 の蛍光強度(380 nm で励起)

**Fs** : Calcium Saturated Fura-2 の蛍光強度(380 nm で励起)

### Definition of Parameters

#### Image Scaling

Calcium 濃度を画像として表示する際、表示スケールを変更することができます

**Min、Max** : 画像内の最低または最高 Calcium 濃度

**Define Rmin/Rmax**: Rmin と Rmax は自動算出されますが、指定した ROI から算出することもできます

**Select ROI** : Rmin と Rmax を算出する ROI を選択できます

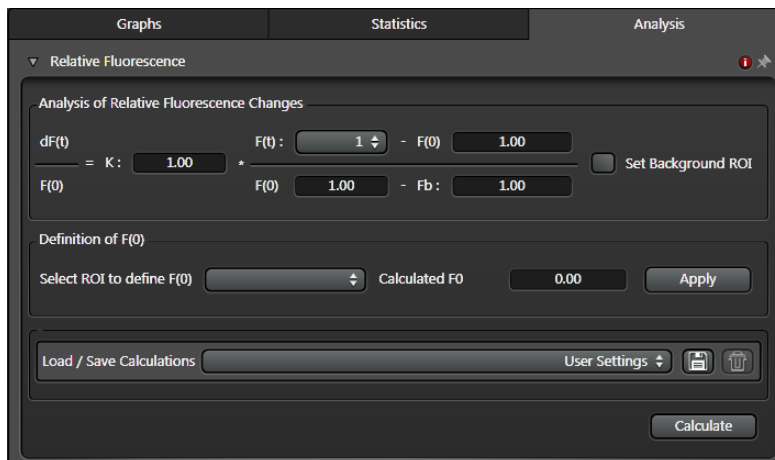
**Apply Rmin、Apply Rmax** : 算出された Rmin または Rmax を計算式に適用します

**Load/Save Calculations** : 設定値などを保存または呼び出すことができます

**Calculate** : 計算を開始します

## Relative Fluorescence

蛍光強度の相対的な変化を計算することができます



**K** : 任意の値を入力できます

**F(t)** : 0、1(デフォルト)、Channel/ROI、Channel/Frame から選択します

**Channel/ROI** : 選択した ROI の輝度値を基に計算を行います

**Channel/Frame** : 選択した Frame の輝度値を基に計算を行います(画像上に ROI があれば Channel/ROI だけが表示されます)

**F0** : 基準となる輝度値を設定します(Definition of F(0)で計算することができます)

**Fb** : 閾値を設定することでバックグラウンドの影響を排除し、より正確な計測を行うことができます

**Set Background ROI** : バックグラウンドとなる閾値を計算するための ROI を設定できます

### Definition of F(0)

**Select ROI to define F(0)** : F(0)を計算するための ROI を設定すると、自動計算されます

**Apply** : 算出された F(0)を計算式に適用します

### General Functions

**Load/Save Calculations** : 設定値などを保存または呼び出すことができます

**Calculate** : 計算を開始します

## Fit Quantification Results

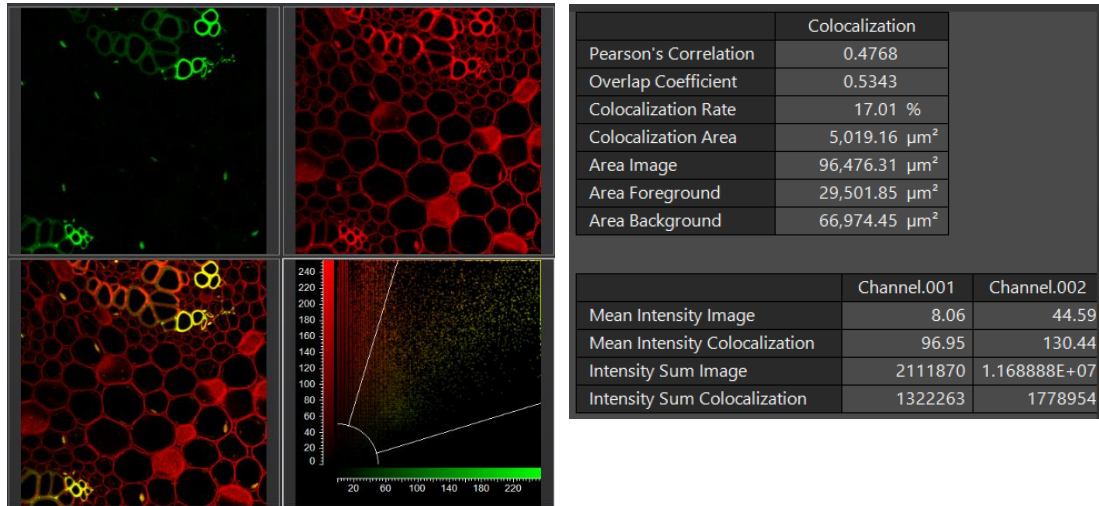
FRAP を行ったデータに対して、Stack Profile で作成したグラフを Levenberg-Marquardt アルゴリズムを基にフィッティングを行います

フィッティングを行い得られた結果はグラフ上に表示されます

\* 別紙参照

### VI-3. Colocalization

画像全体または ROI 中の共局在率を測定し、左下図のように散布図で表示、および右下図のように定量することができます



#### Statistics

**Pearson's Correlation:** ピアソンの相関係数。Ch1 と Ch2 の相関強度を+1 から-1 で表し、+1 の場合は完全に共局在している(正の相関関係)ことを示す。また、-1 の場合全く共局在していない(不の相関関係にある)ことを示す

\* 評価できるのは線形関係にある場合だけです

**Overlap Coefficient:** オーバーラップ係数

Ch1 と Ch2 の重なりを 0 から 1 で表し、1 に近いほど共局在していることを示す

**Colocalization Rate:** 共局在している面積(Colocalization Area)をバックグラウンドより上にある面積(Foreground Area)で割った値

**Colocalization Area:** 共局在している面積 ( $\mu\text{m}^2$ )

**Area mage:** 画像全体の面積( $\mu\text{m}^2$ )

**Area ROI:** ROI で指定された面積( $\mu\text{m}^2$ )

**Area Foreground:** 画像全体からバックグラウンドを差し引いた面積( $\mu\text{m}^2$ )

**Area Background:** バックグラウンド以下の面積( $\mu\text{m}^2$ )

**Mean Intensity Image:** 画像全体における平均蛍光強度

**Mean Intensity ROI\*:** ROI における平均蛍光強度

**Mean Intensity Colocalization:** 共局在している領域における平均蛍光強度

**Intensity Sum Image:** 画像全体における蛍光強度の総和

**Intensity Sum ROI\*:** 画像全体における蛍光強度の総和

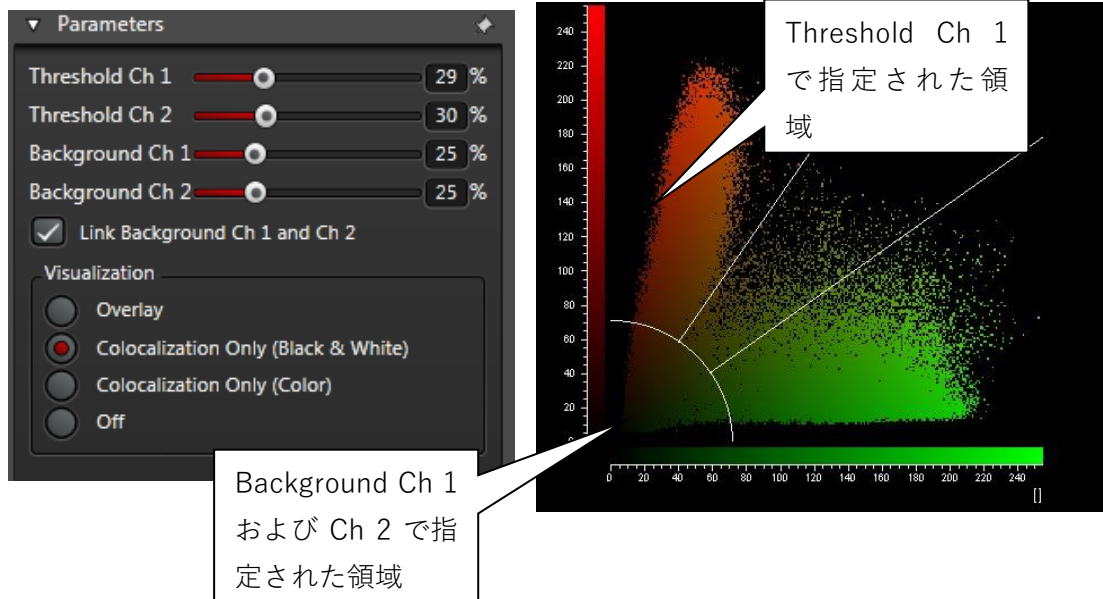
**Intensity Sum Colocalization:** 共局在している領域における蛍光強度の総和

\*ROI を指定した場合にのみ表示されます



## Parameters

共局在率を測定する際の閾値を設定できます



**Threshold Ch 1、Threshold Ch 2:** 蛍光強度の割合を入力することで、共局在率測定の際の閾値を設定することができます

**Background Ch 1、Background Ch 2:** Channel 2 から Channel 1 への、Channel 2 から Channel 1 への漏れこみの割合を入力することで、共局在率測定への影響を排除できます

**Link Background Ch 1 and Ch 2:** ON になっている場合、Channel 1 と 2 の Background の割合が同じになり、OFF の場合、個別に設定することができます

**Overlay :** Pseudo Color 画像のなかで、共局在している部分が白で表示される。

**Colocalization Only(Black & White) :** 共局在している部分だけを白で表示


**Colocalization Only(Color) :** 共局在している部分のみを Pseudo Color で表示

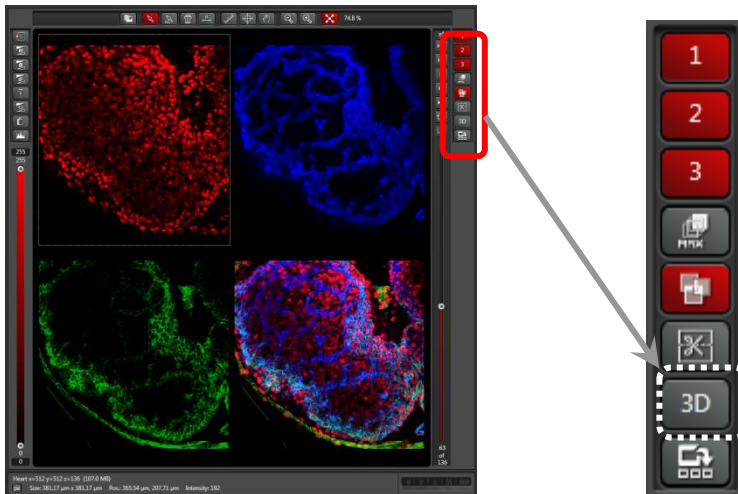
**Off :** Pseudo Color 画像だけを表示する(共局在している部分を表示しない)

## VIII. 3D Viewer (オプション)

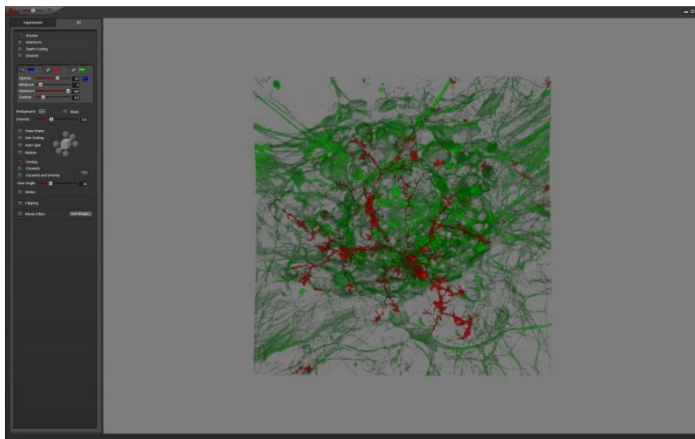
### VIII-1. 3D Viewer の起動と基本操作

3D Viewer では、XYZ データから 3 次元画像の構築が可能です  
(立体(ステレオ)表示が可能なモニターを接続すれば、立体表示をすることもできます)

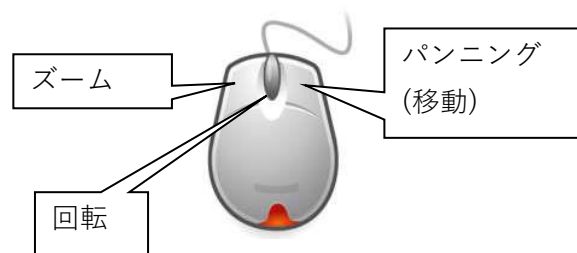
Viewer の 3D ボタン  をクリックすると 3D Viewer が起動します



下図は 3D Viewer 起動画面

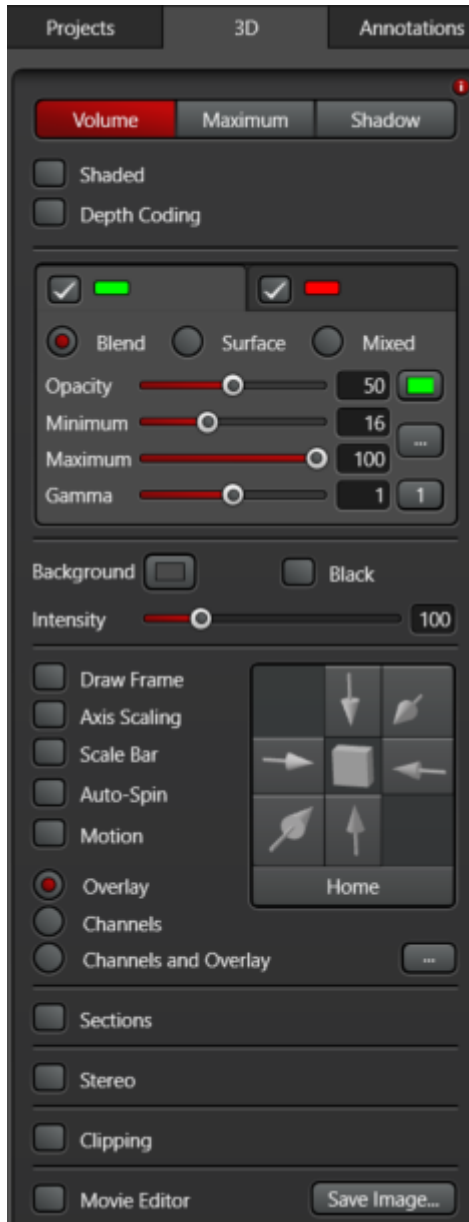


マウスによる画像操作



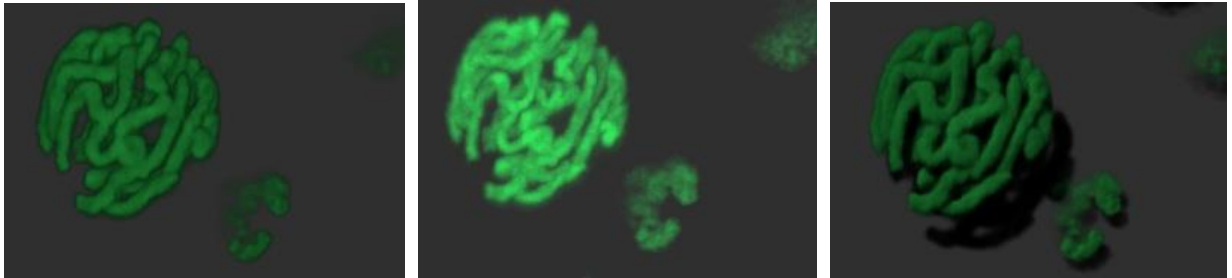
## VIII-2. 3D Viewer メニュー

3D Viewer の左側にある下図から 3D 表示方法の変更や調整を行うことができます



## VIII-2-1. Projection Procedure

3D 表示する方法を Volume、Maximum、Shadow の 3 つから選択できます



**Volume** : 左上画像、同じ輝度値でも奥へ行くに従って輝度値が低くなるように表示します

**Maximum** : 上中央画像、同じ輝度値であれば、奥行に関わらず等しく輝度値を表示します

**Shadow** : 右上画像、Volume 表示に影を加えて立体感を強調して表示します

\* 処理が重いので、Volume または Shadow を OFF の状態でパラメーターの調整を行うことをお勧めします

### Volume の設定画面

Blend、Surface、Mixed の 3 つの表示方法があります



**Blend** : 光の透過率を調整することで、奥行を表現できます

**Surface** : 光の照射方向を調整することで、立体感を表現できます

**Mixed** : Blend と Surface の両方、光の透過率と照射方向を調整できます

## Maximum および Shadow の設定画面



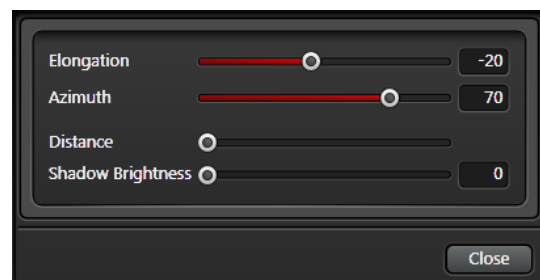
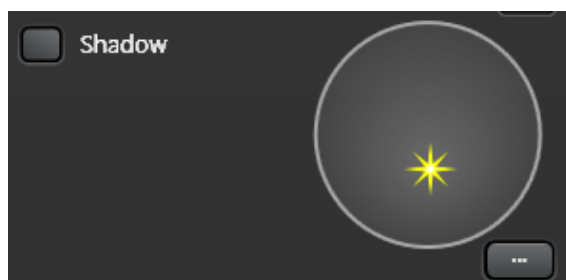
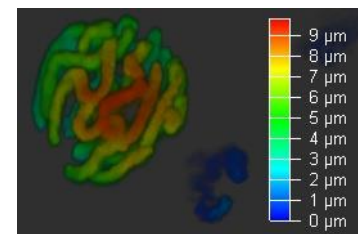
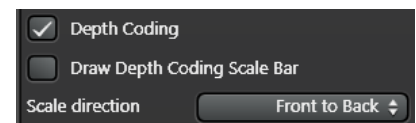
**Shaded** : ON にするとコントラストを強調して表示します

**Depth Coding** : 右画像のように奥行方向に色を付けて表示することができます


ON にすると右図が追加表示されます

**Draw Depth Coding Scale Bar** : 右画像のように色の变化と奥行の長さのスケールバー表示を切替えることができます

**Scale Direction** : Front to Back、Back to Front があり、色を設定する際、奥から手前と手前から奥に変化するか選択できます



**Shadow** : OFF にすると影を非表示にします(Shadow のみ)

 をクリックすると、右上画像が表示されます

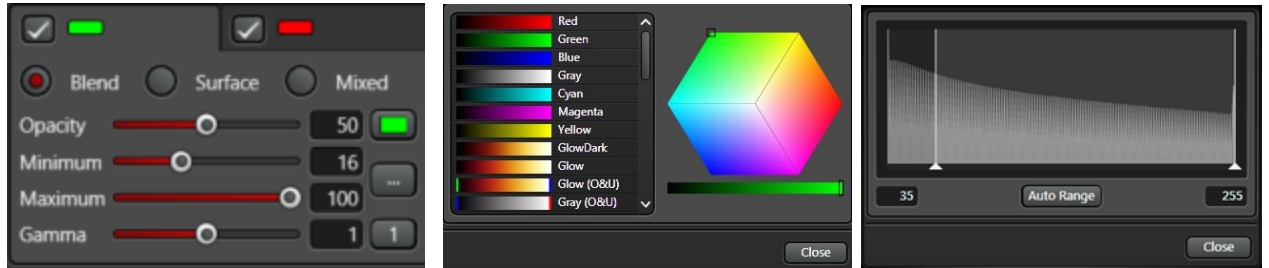
**Elongation** : 照射する光の角距離(Channel 間で共通)

**Azimuth** : 照射する光の方位角(Channel 間で共通)


左上画像中の\*の位置をドラッグまたはクリックで、光の照射位置を変えることができます

**Distance** : 影までの距離を変更できます(Shadow のみ)

**Shadow Brightness** : 影の明るさを変更できます(Shadow のみ)




**Opacity** : 不透明度を変更できます(低くすると、奥側が見やすくなります)


Opacity のスライダー右にある  をクリックすると、上中央画像が表示され、Pseudo Color を変更できます

**Minimum** : 表示の下限値を変更できます

**Maximum** : 表示の上限値を変更できます

Minimum のスライダー右にある  をクリックすると、右上画像が表示され、表示の下限と上限を変更できます

**Gamma** : 画像のガンマ値(輝度値)を変更することができます


Gamma のスライダー右にある  をクリックすると、デフォルトに戻ります

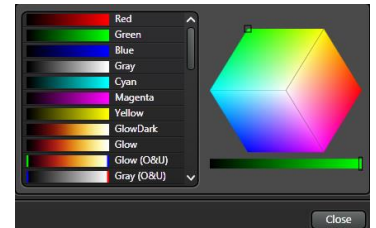
**Threshold** : 表示する閾値を設定できます(%)

**Specular** : 照射された光を反射する度合いを調整できます


**Ambient** : 照射された光を反射する度合いを調整できます

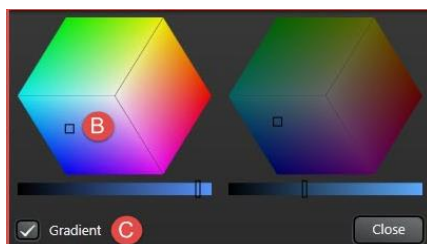
Specular は Z 方向における表面だけ、Ambient はそれ以外の表面

Specular および Ambient のスライダー右にある  をクリックすると、右図が表示され Pseudo Color を変更できます



**Shininess** : 光沢感を調整できます

**Background** :  左図 A をクリックすると下図が表示され、背景色を変更することができます



左図 C の Gradient を ON にすると、背景色を上(左で指定した色)から下(右で指定した色)へグラデーションがかかった色に変更できます

上図 D の Black を ON にすると、背景色が黒になります

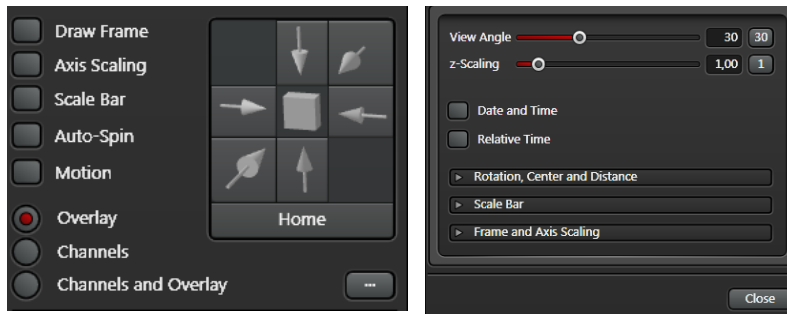
**Intensity** :  3D 画像の明るさ変更することができます

(50~300、Intensity を変更することによる背景色、Frame、Scale などほかの表示への影響はありません)



## VIII-2-2. Functions for Displaying Images

3D 画像の移動、回転、Frame やスケールバーの追加などを行うことができます



矢印を選択すると正面、背面、右、左、上、下の面が正面にくるように回転します

**Home** : 位置や Zoom などがリセットされます

**Draw Frame** : 3D 画像に枠を表示します(動画にした際、角度などがわかりやすくなります)

**Axis Scaling** : XYZ の何れかの辺のひとつにスケールバーを表示します(画像を回転させるとスケールバーが表示される辺は変わります)

**Scale Bar** : 3D Viewer 画面左下にスケールバーを表示します


**Auto-Spin** : 3D 画像をクリック&ドラッグした方向に回転し続けます(回転速度はドラッグした速度に依存します)

**Motion** : 3D 画面中央を軸に一定の角度で左右に揺れ続けます

**Overlay** : 重ね合わせ画像だけが表示されます(デフォルト)

**Channels** : Channel ごとに単一 Channel 画像が 3D 画面に分割表示されます(横並び)

**Channels and Overlay** : 単一 Channel 画像と重ね合わせ画像が 3D 画面に分割表示されます(横並び)

Channel and Overlay 右にある  をクリックすると、右上画像が表示されます

**View Angle** : パースを調整することができ、値を大きくすると広角レンズで撮影したように立体感を出すことができます(デフォルトは 30、0 から 90)

**z-Scaling** : 1 Stack 分の厚さを変えることで、Z 方向の立体感を出すことができます(デフォルトは 1、0.1 から 10.0)

**Date and Time** : 画像取得日時を 3D Viewer 上に表示します(上下左右中央から選択)

**Relative Time** : Time lapse を撮影した場合、相対的経過時間を 3D Viewer 上に表示します(上下左右中央から選択)

**Rotation, Center and Distance** : 3D 画像の移動、回転角などを数値で表示します(数値入力もできます)

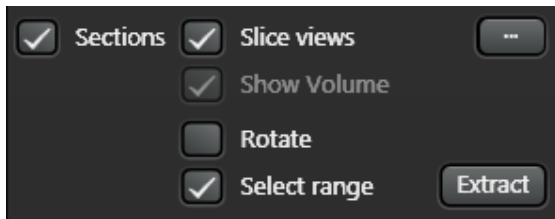
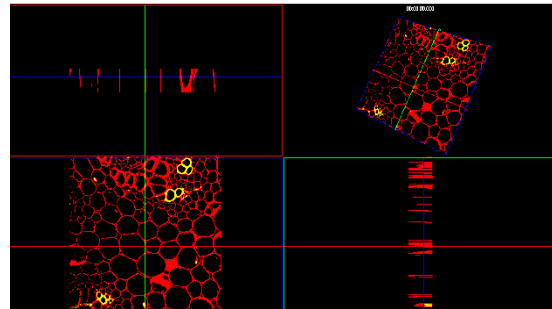
**Scale Bar** : 3D Viewer 画面左下に表示されるスケールバーのサイズやフォントなどの設定を行えます

**Frame and Axis Scaling** : Axis Scaling で表示される軸の設定を行えます

### VIII-2-3. Orthogonal Sections

**Sections、Slice views** : ON にすると、右図のように 3D 画像と断面画像を同時に表示します

左上 : XZ 断面、左下 : XY 断面、右上 : 3D 画像(各断面画像を同時に表示)、右下 : YZ 断面

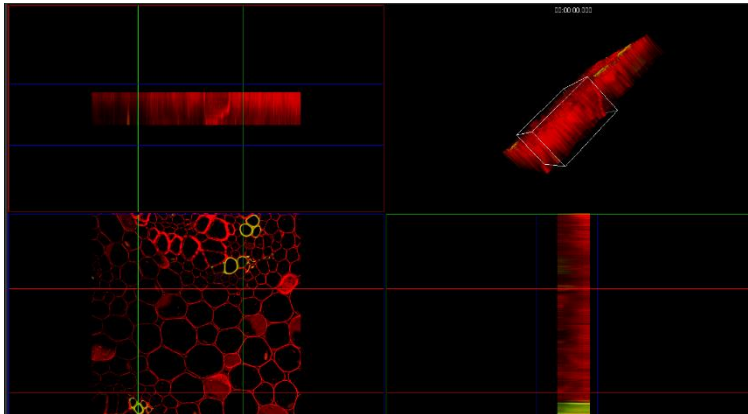


**Show Volume** : ON にすると各断面画像を同時に表示するのではなく、3D 表示します

**Rotate** : OFF の場合、3D 画像を回転させても断面に変化はないが、ON の場合、回転に応じて切断面が変化します

**Select range** : ON にすると下図のように枠線が表示されます

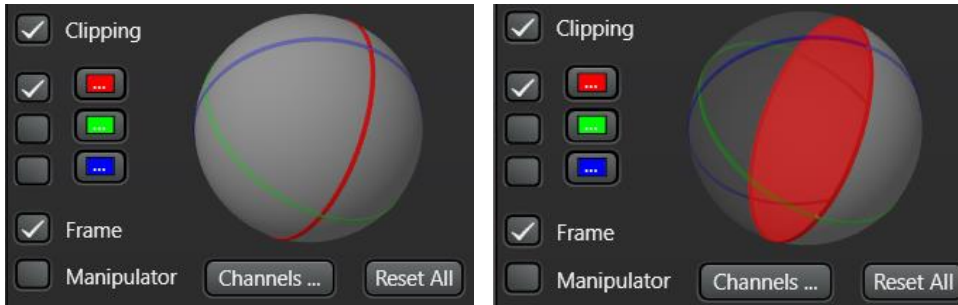
**Extract** : Select Range で選択された範囲を切りぬいた画像を作成します  
新しい画像はデータ名の後ろに「-3D-Region」が付きます



**Stereo** : 立体画像表示に対応したディスプレイを使用している場合、ON にすると立体的に見えます



## VIII-2-4. Clipping Planes



**Clipping : ON にすると** 3D 画像を分割し、表示/非表示を選択することができます



赤、緑、青がそれぞれ(3D 画像本来の)XZ 断面、YZ 断面、XY 断面を表しています

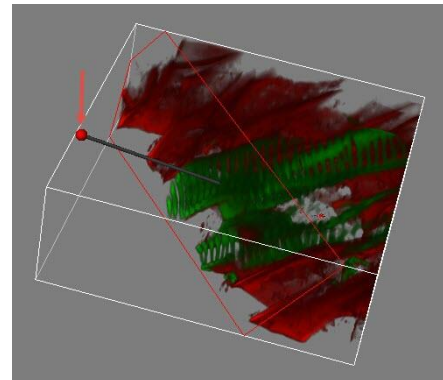
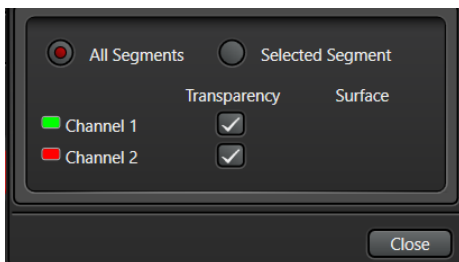
赤を ON にした状態(左上図)で球の左側をクリックすると、右上図のようにグレースケールし、3D 画像の上半分が非表示になります(赤が XZ 断面を表すため、Y 方向に 2 分割されます)

球と 3D 画像のどちらかを回転させると、もう一方もそれに合わせて回転します

**Frame** : ON の場合、XZ 断面、YZ 断面、XY 断面を 3D 画像上で表示します(デフォルトは ON)

**Manipulator** : 矢印部分の赤い丸をつかんだ状態でドラッグすると右図のように断面の角度を自由に変えることができます

**Channels** : クリックすると下図が表示されます




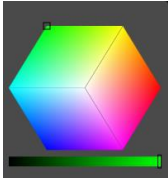
**Transparency** : 非表示にしている箇所においても ON にした Channel を表示します

**All Segments** : 非表示部分での Channel ごとの表示/非表示切替えができます

**Selected Segments** : 非表示部分だけでなく、表示部分においても Channel ごとの表示/非表示切替えができます

**Reset All** : すべての設定をデフォルトに戻します(3D 画像の回転角や Zoom などは戻りません)

左図赤枠部分の何れかをクリックすると、右図が表示されます  
Clipping Plane の設定を行えます  
右図の  をクリックすると、下図が開き、色を変更することができます



**Draw Frame** : 3D 画像上で Clipping Plane を表示しません

**Draw Manipulator** : 3D 画像上で Manipulator を表示しません

**Extract Plane** : Clipping Plan の断面画像を表示、保存することができます

データ名の後に「-3D-Clip plane」が付きます

**Plane Style** : None、White、Transparent、Opaque から選択します

**None** : Clipping Plane で枠しか表示しません

**White** : Clipping Plane 内を白く表示します

**Transparent** : Clipping Plan 内の輝度値に応じて表示を変え、低ければ透明になります

**Opaque** : Clipping Plan 内の輝度値に応じて表示を変え、低ければ黒になります

**Apply to all** : 選択した Clipping Plan だけでなく、その他の Clipping Plan においても同じ設定(None、White、Transparent、Opaque)を適用します

**Pitch** : Clipping Plan を水平方向に置いた時の、水平方向の回転角

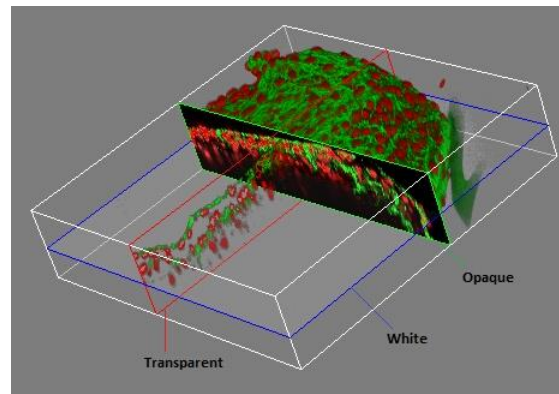
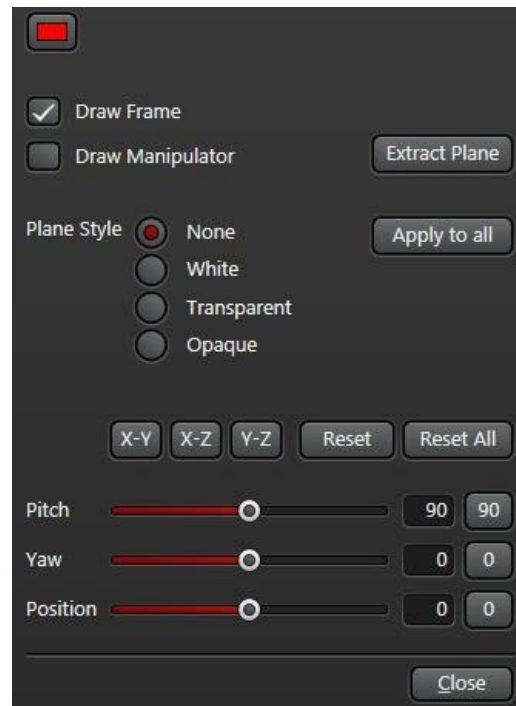
**Yaw** : Clipping Plan を水平方向に置いた時の、垂直方向の回転角

**Position** : Clipping Plan を水平方向に置いた時の、垂直方向の移動

**X-Y, X-Z, Y-Z** : Clipping Plan を XY 断面、XZ 断面、YZ 断面に変えることができます

**Reset** : 選択している Clipping Plan の設定をデフォルトに戻します

**Reset All** : すべての Clipping Plan の設定をデフォルトに戻します



## VIII-2-5. Movie Editor



3D 画像の動画を作成できます



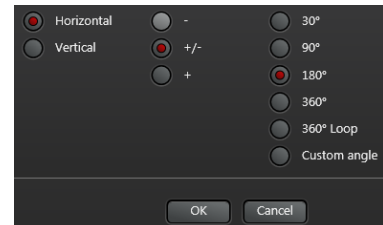
左図の Movie Editor を ON にすると、ウィンドウ  
下側に下図が表示されます

\*仕様により ON にできない場合があります



**Add** : 動画を作成する際、動きのポイントとなる箇所で Add をクリックすると、上図のよう  
になります   左図は 3 回 Add した場合で、白い線が追  
加した箇所、赤い線が最後に追加した箇所または選択されている箇所を示します  
白線と白線の間をクリックし、Add を行うとその箇所に追加することが可能です  
白線をクリック&ドラッグで動かすことで、動画の動きの速さを変えることができます

**Rotate...** : クリックすると、右図が表示されます  
Horizontal(垂直)または Vertical(水平)で回転軸を、-、  
+/-、+で回転方向を、数値で回転角を、Custom angle で  
任意の値を入力できます



選択すると、  へ設定が自動  
入力されます

**Replace** : 置き換えたい箇所の白い線をクリックし、Replace を押すと置換されます

**Remove** : 消したい白い線をクリックし、Remove を押すと消去できます


**Clear** : 設定したすべての動きを消去します

**Frames** : 動画の Frame 数を設定できます

 から動画の再生方法を Single、Yo-Yo、Loop から選択できます

Single は 1 回だけ再生、Yo-Yo は再生と逆再生を繰り返し、Loop は再生を繰り返します

**Preview** : 上記動画の再生方法で、動画を再生します

 動画の再生速度を選択できます(単位は Frame/s)

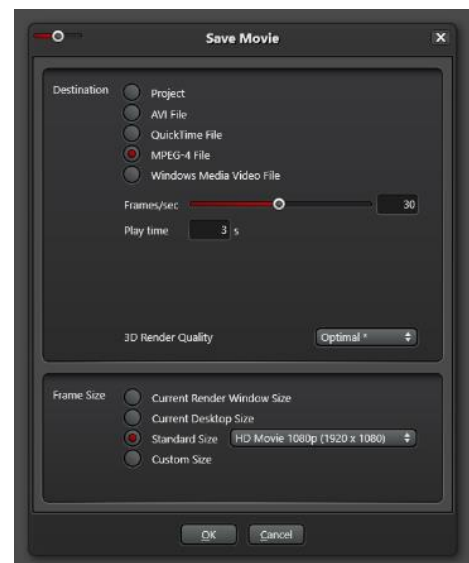
**Save...** : 右図が表示され、作成した動画を保存できます

Project は動画作成時の上下を Z に、時間を t として

Project 内に保存します

**Undo** : 直前の動作を取り消します

**Redo** : Undo を取り消します



**Settings** : クリックすると、右図が表示され、動画を作成時の設定を変更することができます

**Background** : ポイント間でバックグラウンドの色を変えます

**Render Mode** : ポイント間で Volume、Maximum、Depth Coding や Shadow の表示法を変えます

**Channel Transparency** : ポイント間で Opacity、Minimum、Maximum、Gamma を変えます

**Surface Shading** : Volume-Surface のとき、ポイント間で Opacity、Specular Intensity、Specular Color、Ambient Intensity、Ambient Color、Shininess を変えます

**Surface Threshold** : Volume-Surface のとき、ポイント間で Threshold を変えます

**Channel Visible** : ポイント間で Channel ごとの表示/非表示を変えます

**Channel Color** : ポイント間で Channel ごとの色を変えます

**Clip Planes** : ポイント間で Clip plane で設定した表示/非表示を変えます

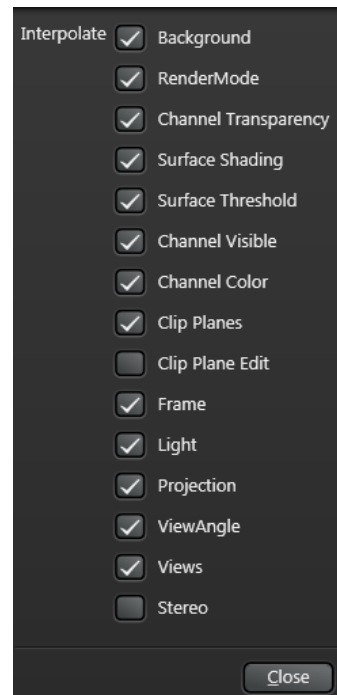
**Clip Plane Edit** : ポイント間で Clip plane で設定した断面を変えます

**Frame Light** : ポイント間で Frame や Scale Bar の設定を変えます

**Projection** : ポイント間で Rotation、Pan、Zoom の設定を変えます

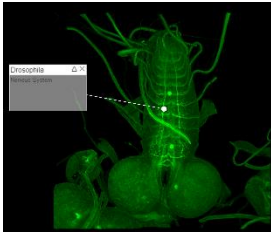
**View Angle** : ポイント間で View Angle の設定を変えます

**Stereo** : ポイント間で Stereo の設定を変えます



Save Image で現在表示している画面の Screen Shot を保存することができます

### VIII-3. 3D Annotations



左図のように 3D 画像中に注釈を入れることができます

**New Annotation** : クリックしたあと、3D 画像の注釈を入れたい場所と説明文を表示するエリアの左上と右下を順番にクリックすると、注釈個所と説明文表示襟が表示されます

**Caption** : 注釈のタイトル

**Text** : 注釈の本文

**Remove** : 選択されている注釈の削除

**Clear** : すべての注釈の削除

#### Configuration the Comments Field



をクリックすると、右図が表示されます

**Show box** : 注釈のポイント位置のみを表示します

**Show text** : 注釈の本文を表示します

**Show arrow** : 注釈のポイントと説明文をつなぐ線を表示します

#### Caption

**Text Color** : 注釈タイトルの文字の色を変更できます

**Font** : 注釈タイトル文のフォントやサイズなどを変更できます

**Opacity** : 注釈タイトルの表示個所の不透明度を変更できます

#### Text

**Text Color** : 注釈本文の文字の色を変更できます

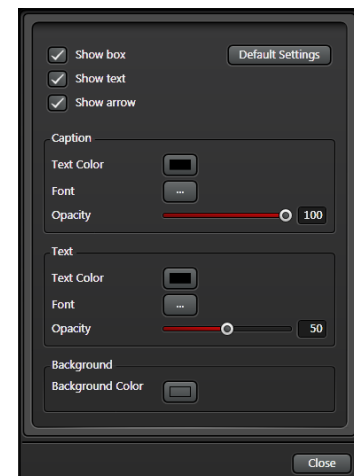
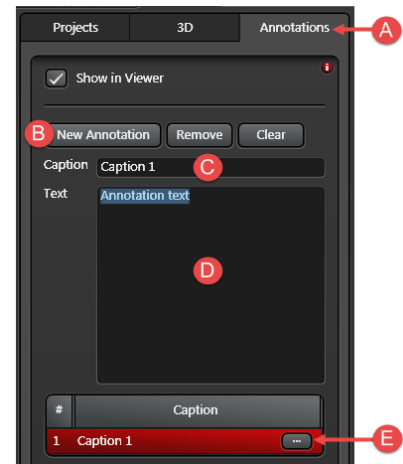
**Font** : 注釈本文のフォントやサイズなどを変更できます

**Opacity** : 注釈本文の表示個所の不透明度を変更できます

#### Background

**Background Color** : 注釈表示個所の背景色を変更できます

**Default Setting** : クリックするとデフォルトの設定に戻ります



## VIII-4. Processing



- 1：最大画面表示にします
- 2：ズームアウトします
- 3：倍率の表示/指定できます(%)
- 4：ズームインします
- 5：ピクセル等倍表示にします
- 6：表示する Channel を選択できます
- 7：Channel の Pseudo Color と明るさを設定できます
- 8：画像を白黒表示にします
- 9：輝度の表示スケールを最大にします
- 10：輝度の表示スケールを一番明るいところに合わせます
- 11：輝度の表示スケールを設定できます
- 12：各 Channel の重ね合わせ画像のみを表示します
- 13：各 Channel の個別画像のみを表示します
- 14：各 Channel の重ね合わせ画像および個別画像を表示します
- 15：画像撮影時と同様の 2D 表示に切り替えます(右に Z 位置調整バーが表示されます)
- 16：3D 表示に戻します
- 17：3D 表示上で Orthogonal 断面画像を表示します
- 18：画面を 4 分割し、Orthogonal 断面画像および、3D 表示上で Orthogonal 断面画像を表示します
- 19：補間表示機能の ON/OFF を設定できます(デフォルトは ON)
- 20：このボタンを押すと複数画像を並列表示することができます(再度押すと単一画像表示に戻ります)
- 21：複数画像を表示する際、どのように並べるのか設定することができます
- 22：このボタンを押すと並列表示している画像の動きをリンクすることができます
- 23：リンクする操作を設定することができます
- 24：並列表示できる画像の数を増やせます
- 25：並列表示できる画像の数を減らせます
- 26：表示する画像を選択することができます

## VIII-5. Processing Processes

下記パラメーターを用いることで、画像処理を行うことができます





## General Functions

項目間で共通する機能です

**Operation Active** : 項目に対して処理を行うか選択できます(デフォルトは ON)

**Run...** : 処理を実行します

**Preview** : 処理を簡易表示します

## Dimension Settings

**XYZ same setting** : XYZ すべてを同じパラメーターで処理します

**XY same setting, Z different settings** : XY と Z でパラメーターを変えて処理します

**X, Y and Z different settings** : XYZ それぞれパラメーターを変えて処理します

**Individual setting for dimensions** : タイムラプスなど XYZ 以外の次元がある場合、それぞれに別のパラメーターで処理します

## Dimensions

**Crop** : 指定範囲を切取ることができます

**Flip X, Y, Z** : X 軸方向の反転、Y 軸方向の反転、Z Stack 画像の反転(順序を変える)

**Dimension Reduction** : 3D データを下記 3 つの方法で 2D 画像に変換することができます

**Maximum Projection** : Pixel における Z 方向で最も輝度値が高い数値を採用して表示

**Best Focus Plane** : 画素値の分布の傾き(シャープネス)が最も大きい Z Stack 面を選択・表示

**Extended Depth of Focus** : 各 Pixel において Z 方向で最もシャープネスが高くなる数値を採用して表示

**Concatenate** : 異なる画像データを合成することができます

... : クリックし合成する画像を選択し、+または-で合成する画像を増減することができます

**Dimensions** : 画像を合成する次元を下記から選択できます

X, Y, Z, Channel, Light Sheet Excitation Angle, Emission wavelength, Excitation wavelength, Stage Position, Time, Loop, Live

## Resize

**Factor XY, Z** : XY または Z の Pixel 数を変更することができます

**Image data type** : 表示スケールを 16 Bit から 8 Bit に変更し、データ容量を減らすことができます

**Rescale** : 輝度の表示スケールを下記 3 つから選択できます

**No Rescale** : 表示スケールを変更しません

**Maximum** : 最大表示スケールを最も明るい個所に合わせます

**Min. to Max.** : 最小および最大スケールを最も暗いところと明るい個所に合わせます

... : クリックすると、Dimension Setting を設定できます

## Mosaic Stitcher

VI-1-6. Mosaic Marge(44 ページ)参照

## Sharpen

**Delineate** : 真ん中の色調を取り除き、コントラストを上げます

**Unsharp Masking** : ノイズを上げることなく、シャープネスを上げます  
(画素値の変化が大きい Pixel が残り、変化の小さい Pixel は除去されます)

## Smooth

**Gaussian Filter** : 注目画素の周辺の輝度値を中心からの距離に応じた重みづけをしたあと平均輝度値を取ります

**Sigma** : 周辺のサイズを設定できます

**Sliding Average** : 注目画素の周辺の平均輝度値を取ります

**Edge Preserving Smooth** : 中心からの距離および中心の輝度値と他の Pixel の輝度値の差に応じた重みづけをしたあと平均輝度値を取ります(エッジ付近で輝度差が大きければ、重みが低くなり、エッジが保存されます)

\* ノイズの大きい画像に有効です

\* 画像処理したあとにこの処理を行うと誤った結果が得られる場合があります

**Strength** : 演算回数を設定できます(デフォルトは 20、回数が多いと時間がかかります)

**Noise** : 取り除くノイズレベルを設定できます(デフォルトは 1)

## Noise Reduction

**Median Filter** : Size X, Y, Z で設定した範囲の輝度の中央値を輝度値とします

**Wavelet Noise Reduction** : Wavelet 変換を基にエッジを検出し、エッジを残したままノイズを抑えます

**Noise** : 設定した値以下の標準偏差をノイズとして除去します

\* 画像処理したあとにこの処理を行うと誤った結果が得られる場合があります

**Total Variation Denoising** : 輝度変化の絶対値を積分した値から画像の滑らかさを求め、ノイズを除去します

\* 画像処理したあとにこの処理を行うと誤った結果が得られる場合があります

## Background

**Background Noise Reduction** : 中心からの距離および中心の輝度値と他の Pixel の輝度値の差に応じた重みづけをしたあと平均輝度値を取ります(エッジ付近で輝度差が大きければ、重みが低くなります)

**Sigma** : 計算を行う範囲を設定できます

**Noise** : 設定した値以下の標準偏差をノイズとして除去します

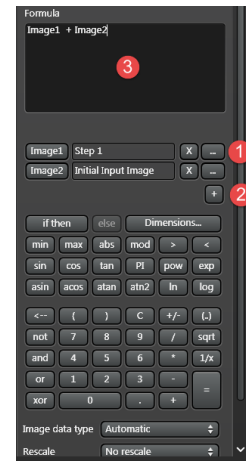
**Background Substraction :** Size で設定した大きさの球を輝度グラフの下側に添うように動かし、その球の外側の軌跡をシグナルとします(軌跡以上をノイズとして除去します)

**Size :** 計算を行う範囲を設定できます

## Arithmetics/Combine Images

**Image Calculator :** 右図のような計算機が表示され、複数画像の計算を Pixel ごとに行えます

\* 計算は 0-255 や 0-65535 などの Gray Scale ではなく 0-1 で行われます



## Gray Morphology

**Gray Erode :** 画像の構造を小さくします

**Size :** 小さくする度合いを設定できます

**Gray Dilate :** 画像の構造を大きくします

**Size :** 大きくする度合いを設定できます

**Smooth white detail - Open :** Erosion の後に Dilation を行うことで小さい構造が除かれます

**Size :** 取除く度合いを設定できます

**Smooth white detail - Close :** Dilate のあとに Erosion を行うことで小さい隙間を埋めます

**Size :** 埋める度合いを設定できます

**Find white detail - Top Hat :** 元の画像と Open 処理を行った画像の差分を表示します

**Size :** 認識除去する明るさの度合いを設定できます

**Find black detail - Top Hat :** Close 処理を行った画像と元の画像の差分を表示します

**Size :** 認識除去する暗さの度合いを設定できます

**Enhance white detail :** 画像の明るいところを強調します

**Size :** 強調する度合いを設定できます

**Enhance black detail :** 画像のコントラストを上げます

**Size :** コントラストを上げる度合いを設定できます

## Segmentation

### Threshold

**Margin** : Threshold で設定した値 $\pm$ Margin で設定した値を閾値とします(Threshold 12、Margin 5 のとき、7 と 17 になる)

**Reset** : 設定した Threshold の値をすべて削除します

**Undo** : 直近の操作を削除します

**Manual** : 閾値となる値を設定できます

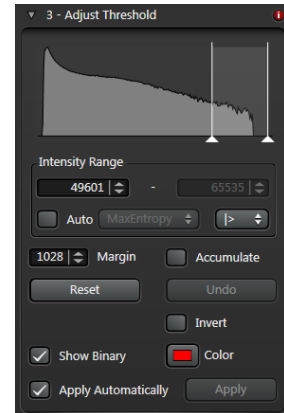
**global threshold - Otsu** : 分離度が最も大きくなる時の値を閾値とします

**global threshold - Iso** : 画像をある値を設定し、それ以上とそれ以下の平均値を算出します


これらの平均値と設定した値を比較し、平均値よりも大きくなったときの値を閾値とします

**global threshold - Triangle Threshold** : ヒストグラムのピークと下と上を線で結び、この線とヒストグラムの差分が最も大きくなる値を閾値とします

**Maximum Entropy** : 二値化した際、それぞれの分布エントロピーが最大になる値を閾値とします(デフォルト)



 : 閾値の上限のみを設定できます

 : 閾値の上限と下限両方を設定できます(Auto では選択できません)

 : 閾値の下限を設定できます

**Separate Objects** : 複数の構造が接している際、分けます(3D の場合、構造表面のくぼみをもとに決定されます)

**Object Size** : 入力した構造のサイズをもとに分けられます(単位は $\mu\text{m}$ )

**Skeleton** : 1 Pixel(Voxel)の線(骨格)を構造の中に作成します

**Fill Holes** : Image Processing Pre-Filter や Adjust Threshold 処理を行った際にできた構造の穴を埋めます(Intensity で穴を埋めるよりもノイズを抑えることができます、右図処理前(左)、処理後(右))



**Distance Transform** : 二値化された画像に対して、0 と非 0 の Voxel 間の距離を表示します

**Gradient Magnitude** : XYZ 方向の輝度の勾配の大きさを表示します

### Binary Morphology

**Shrink Objects - Erode** : Size で設定された範囲にシグナルがあれば最小輝度値を抽出し、大きな構造を小さく、小さな構造を排除します

**Grow Objects - Dilate** : Size で設定された範囲にシグナルがあれば最大輝度値を抽出

し、構造を大きく、小さな隙間を埋めます

**Grow Outlines** : 構造の表面を認識し、Size で設定した分だけ大きくします

**Discard detail – Open** : Dilation を行った後に Erosion を同じ回数だけ行い、ノイズなど小さな構造を排除します

**Combine black detail - Close** : Erosion を行った後に Dilation を同じ回数だけ行い、構造にある小さな抜けを埋めます

**Open and Close** : Erode、Dilate、Dilate、Erode の順に処理します

**Close and Open** : Dilate、Erode、Erode、Dilate の順に処理します

**Split Touching** : 接触し 1 つとして認識されたものを複数個に分けます

**Invert** : 現在選択されている項目を外し、選択されていない項目を選択します

**Edge Remove** : 画像の 4 辺に接している構造を排除します





## ライカ マイクロシステムズ 株式会社

本社 〒169-0075 東京都新宿区高田馬場1-29-9  
Tel.03-6758-5640 Fax.03-5155-4336

大阪セールスオフィス 〒531-0072 大阪府大阪市北区豊崎5-4-9 商業第2ビル  
Tel.06-6374-9771 Fax.06-6374-9772

名古屋セールスオフィス 〒460-0003 愛知県名古屋市中区錦2-15-20 三永伏見ビル2F  
Tel.052-222-3939 Fax.052-222-3784

福岡セールスオフィス 〒812-0025 福岡県福岡市博多区店屋町8-30 博多フコク生命ビル12F  
Tel.092-282-9771 Fax.092-282-9772

●<http://www.leica-microsystems.co.jp> E-mail: [lmc@leica-microsystems.co.jp](mailto:lmc@leica-microsystems.co.jp)

※この製品のデザインおよび仕様は改良などのために予告なく変更する場合があります