Application Guide

LSM7 family

応用編

ZEN 2012 Black edition

ZEISS

We make it visible.

目次

第 1 章　画像取得編 3
1. 光路設定 3
2. 指定した領域をスキャンする方法 8
3. スキャンスピードを早くする方法 10
4 Z-stack 11
5. 電動ステージのコントロール（電動ステージはオプションです) 14
6. タイリング（電動 XY ステージ搭載システムでのみ有効） 16
7. Positions：多点観察のための座標登録（Position List) 19
8. Time series 22
9. Auto Focus/ Focus devices and strategy (一部オプション) 23
10. 温度コントロール及び CO_2 コントロール 26
11. 多点タイムラプス 27
12. Online Ratio 28
13. フォトブリーチング （ Bleaching) 29
14. Auto Save 31
第 2 章　解析編 32
1. Profile 32
2. Histogram 33
3. Co-localization 34
4. 3D 38
5. Time series で取得した画像の解析 （解析ソフト Physiology) 43
6. 解析データの保存 43
第 3 章　画像処理編 44
1. Maximum Intensity Projection 44
2. Color-coded projection 45
3. Image calculator 46
4. Average 49
5. Filter 50
6. Linear Unmixing 51
7. Ion Concentration (オプション) 53
8. Modify Series 55
9. Stitch（オプション） 58
10. Copy 59
11. Adjust 62

第1章　画像取得編

1. 光路設定

1) 透過像と蛍光画像を同時に取得する

・微分干渉像や位相差像といった透過画像を取得するためには、まずは Smart Setup から蛍光光路設定を作成するか、Experiment Manager の Configuration から光路設定を読込みます。

① Show all tools にチェックを入れ、Light Path を表示します。

② Light Path ウインドウにおいて、任意の Track を 1 つ選択します。

③ Light Path の設定領域で T-PMT にチェックを入れます。
チェックを入れると、Channels 画面の Track に T-PMT が追加されます。

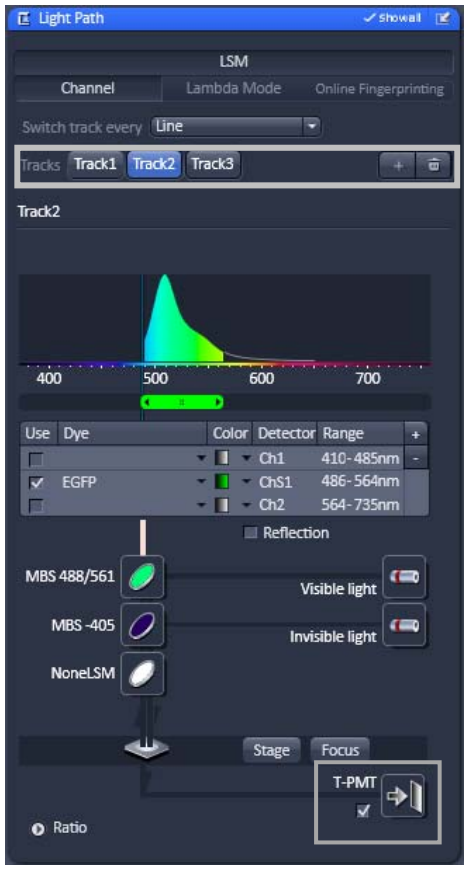


Fig. 1　Light path 画面（LSM710/780 の例）

2) 蛍光取得の設定方法（LSM710/ 780 の場合）

全てマニュアルで光路を作成する場合には、以下のように設定します。

① レーザのアイコンをクリックし、開いたウインドウから目的の蛍光色素を励起するレーザを選択し、任意でレーザパワーを設定します。

Visible と Invisible でレーザの入力位置が異なります。Visible には Ar/ 543/ 561/ 594/ 633 などの可視光レーザ、InVisible には 405/ 440/ 多光子レーザが対応します。

レーザパワーは、レーザの種類にもよりますが、0.5-2%程度から始めてみてください。

Fig. 2 レーザの選択とパワーの設定

② 選択したレーザの数値が記載されている MBS（Main Beam Splitter）それぞれ選択します。

③ 任意の検出器にクリックをし、取得する蛍光範囲を選択します。Color のプルダウンから任意の疑似カラーを設定します。

④ Ch1, Ch2, Ch3 は 1nm 単位、ChS は約 10nm 単位で取得波長範囲を設定可能です。Dye のプルダウンから任意の蛍光色素を選択し、蛍光スペクトルを参考に取得範囲を設定します。
自家蛍光などを除去する場合も、取得範囲を変更しながら画像を取得し、任意の範囲を設定することが可能です。

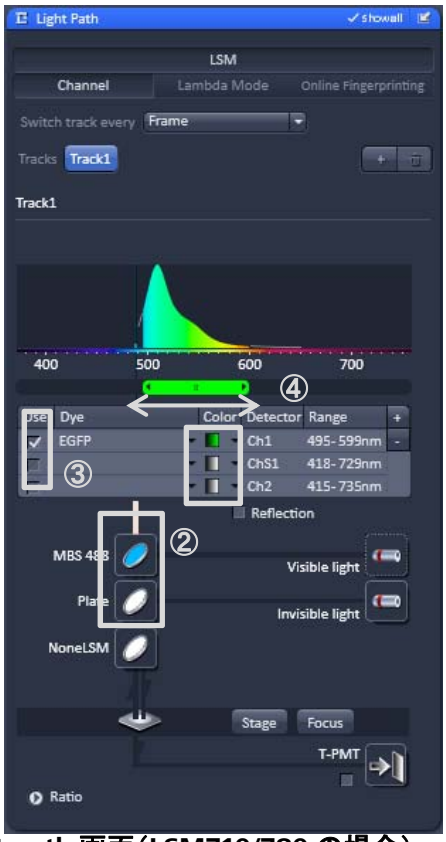


Fig. 3 Light path 画面（LSM710/780 の場合）

3) 710/ 780 システムでの Sequential 取り込みの設定

① チャンネルを追加する場合には、tracks の+ボタンをクリックします。

② Track の切り替えから、Frame もしくは Line を選択します。
なお、Line 切り替えに設定した場合には、MBS の組み合わせ、各チャンネルで検出する取得範囲は全 Track で共通になります。

③ Sequential 切り替えの場合には、可能ならば MBS は全 Track で共通に設定します。例えば、GFP-DsRed を取得する設定で 488nm と 561nm のレーザを使用する場合には、MBS488/561 を両 Track に設定します。

④ その後の各 Track の作成方法は、前項をご参照ください。

4) 蛍光取得の設定方法（LSM700 の場合）

全てマニュアルで光路を作成する場合には、以下のように設定します。

① レーザのアイコンをクリックし、開いたウインドウから目的の蛍光色素を励起するレーザを選択し、任意でレーザパワーを設定します。
レーザパワーは、2%程度から始めてみてください。

② 任意の PMT をクリックし、LUT のプルダウンから任意の疑似カラーを設定します。

③ 蛍光の取得範囲は、基本的に導入されているフィルタを選択することで決定します。

④ もし、詳細に検出範囲を設定する場合には、VSD（Variable secondary Dichroic Mirror）を使います。VSD により Ch1 はショートパス、Ch2 はロングパスで検出できるため、長波長側を狭めたい場合には Ch1、短波長側を狭めたい場合には Ch2 を選択します。
また VSD とフィルタを組み合わせることも可能です。例えば、Ch1 に BP420-550 のフィルタを挿入し、VSD を 500nm にすると、BP420-500 として使用可能です。自家蛍光などを除去する場合には、取得範囲を変更しながら画像を取得し、任意の範囲を設定することが可能です。

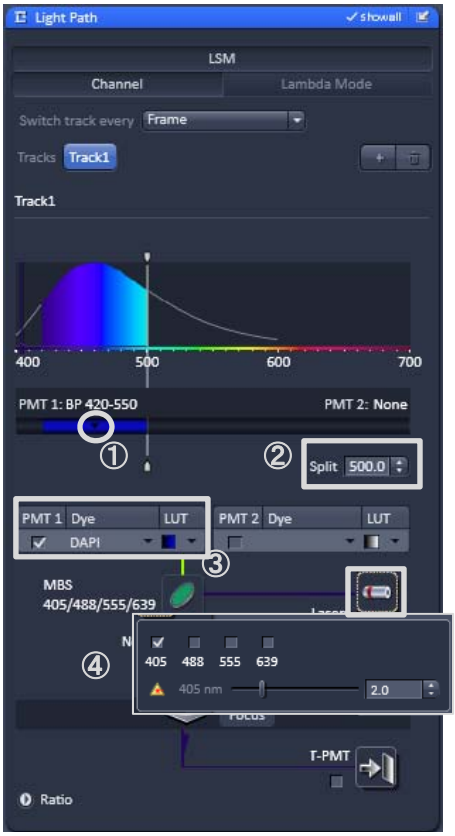


Fig. 4 Light path (LSM700 の場合)

⑤ なお、Sequential に複数の蛍光を設定する場合には、+ボタンをクリックし、新しい Track を作成し、それぞれレーザ波長と取得範囲を設定します。
Line switch に設定する場合は、各チャンネルのフィルタは共通になります。

5) Smart Setup

Quick start manual に表記がない、Smart setup 機能を使う場合は、以下の通りにします。

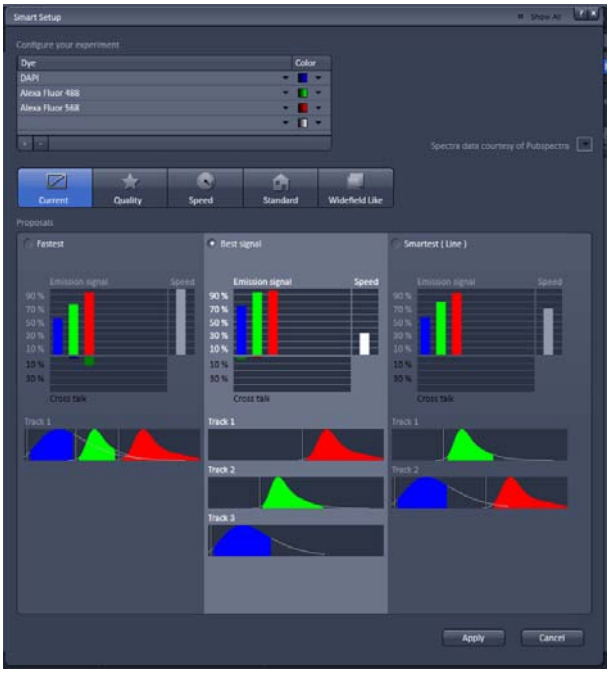


Fig. 5 Smart setup

① Proposals

Fastest (Simultaneous)

画像取得スピードを優先して画像を取得します。
システムに搭載されている PMT 数を最大数として、同時取り込みの設定が適用されます。
LSM700 の場合、蛍光用 PMT は 2Ch のため、2 色ずつ取得する設定が作成され、LSM780 などの 34ch のシステムでは、4 色同時取り込みの設定が適用されます。

このモードでは、複数の蛍光色素へ同時にレーザを照射するため、蛍光の漏れこみを生じる可能性があります。

Best signal (Sequential)

蛍光の漏れこみを回避して画像を取得します。このモードでは、色素ごとに光路を組み、それぞれを切り替えて画像を取得するため、Smart Setup 内では最も画像取得に時間がかかります。

Smartest (line)

蛍光の漏れこみを可能な限り回避しつつ、取得スピードにも配慮して画像を取得します。3 色以上の蛍光画像を取得する場合、蛍光の漏れこみが起こりにくい蛍光同士を同時励起（Fastest モードと同じ）で撮り、蛍光の漏れこみが起きやすい組合せはシーケンシャルモードで撮ります。また、MBS（Main beam splitter）を変更せず、Line sequential で画像取得がなされます。
蛍光色素によっては、漏れこみが起こることもありますので確認が必要です。

*2ch 仕様のシステムでは、Fastest と同じ設定が作成されます。

Linear unmixing

Show all をクリックした際に表示されます。Lambda mode（Spectral imaging 説明書参照）ではなく、チャンネルアンミキシング（Fastest を使用）での蛍光分離を行う設定です。

② Current
推奨される一般的な設定で、主に光路のセットアップを行います。
PH : 1~3AU の範囲で全チャンネルの Optical thickness が同じ厚さ
Frame size : 変更なし
Scan speed : 変更なし
Bit depth : 変更なし
Set Exposure : 作動せず

③ Quality
画質優先の設定を行います。
PH : 各チャンネル 1AU
Frame size : Highest に近い画素数（おおよそ 1000x1000 以上）
Scan speed : 6
Bit depth : 12bit
Set exposure : 自動的に行い、画像取得

④ Speed
スピード優先の設定を行います。
PH : 各チャンネル 2AU
Frame size : 400x400
Scan speed : 10 及び Bi-direction scan（p.10 画像を早く取得するには、参照）
Bit depth : 12bit
Set Exposure : 自動的に行い、画像取得

⑤ Standard
一般的な設定です。
PH : 各チャンネル 1AU
Frame size : 512x512
Scan speed : 9
Bit depth : 12bit
Set exposure : 自動的に行い、画像取得

⑥ Wide field Like
蛍光顕微鏡の画像に近似した設定で画像を取得します。
PH : 各チャンネル max
Frame size : 512x512
Scan speed : 9
Bit depth : 12bit
Set exposure : 自動的に行い画像取得

2. 指定した領域をスキャンする方法

1) Crop 及び Scan area の移動

LSM で画像取得をする場合、画像取得が可能な視野内であれば ソフトウェア上からスキャンエリアを選択することが可能です。

・まず画像を 1 枚表示します。

●手動でスキャンエリアを決める場合

① Acquisition Mode の Scan Area を開きます。

もし、詳細設定ができない場合には、Acquisition Mode ウインドウの Show all をクリックします。

② Live もしくは Continuous をクリックし、スキャンを行いながら、Scan Area のスライダを動かすか、Scan Area 自体をドラッグさせて上下左右に移動させます。

また、画像の取得エリアの大きさを変更したい場合には、Zoom 機能を用います。

*機種によって異なりますが、LSM700 の場合には 0.5 倍~、LSM710/ 780 の場合には 0.6 倍~、取得エリアを変更が可能です。Zoom を使用する場合、ある程度の Zoom 値までは 解像度が上昇しますが、レンズの解像力よりも大きな Zoom を使用した場合には、デジタルズームと同じ状態になります。

Fig. 6 Scan Area

基本編の “Mode” のご説明もご覧ください。

また、画像を回転させて表示したい場合には、Scan Area の○印を持ち移動させることで画像を 360 度回転取得が可能です。

③ 元のサイズ（Zoom 1x）、位置に戻す場合は Reset All をクリックします。

●画像から任意の場所を決める場合

① コントロールエリアの Crop ボタンをクリックします。

② 中央に、 Zoom 2 倍となる大きさの正方形が表示されます。この中央をドラッグすると目的の位置に移動します。

③ また、縦横の線上をドラッグすることにより、回転させることが可能です。
この場合、青色の線が書いてある辺が画像の上になります。

④ New で新しい画面を出しスキャンすることで、選択したエリアの画像が取得されます。

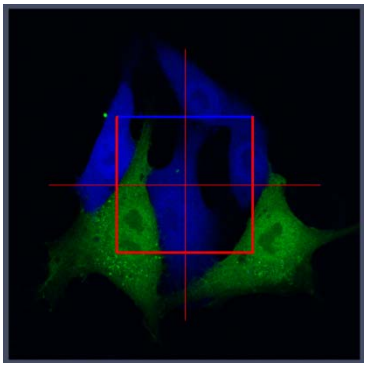
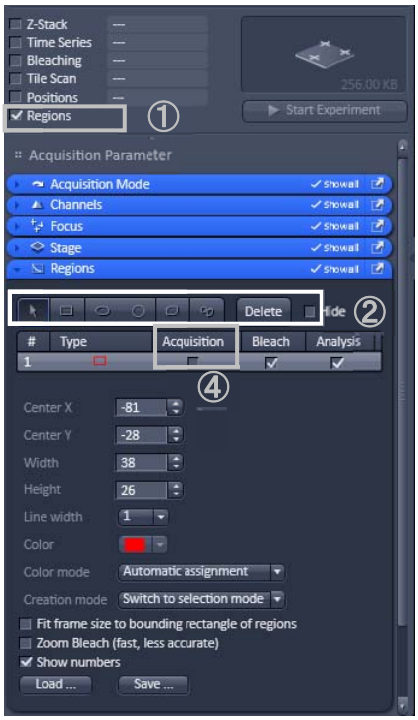


Fig. 7 Crop

2) ROI scan

Region は定型、不定形の領域を任意に選択し、その部分のみを画像化することが出来ます。逆に囲った部分以外の領域にはレーザ光は照射されません。特定の部分にのみ光を照射する事によりフォトブリーチングへの応用も可能です（フォトブリーチングに関しては後述します）。



・設定を行う前に画像を 1 枚表示します。
・描画ツールを使用し、任意の領域を囲みます。

① 左ツールエリアの Regions にチェックを入れます。

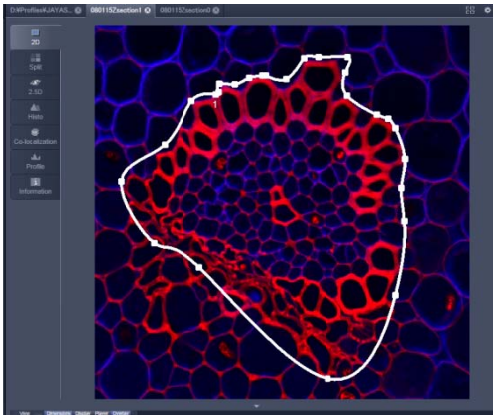
② Regions メニューから、例えば を選択します。

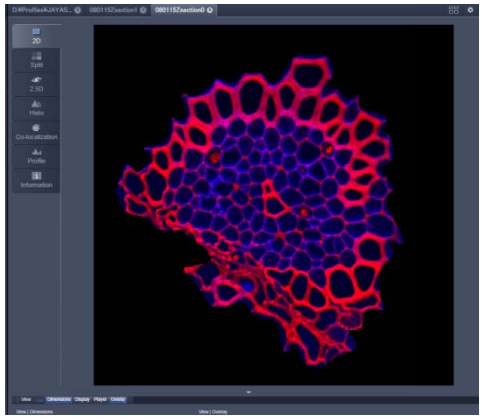
③ 取得したい画像領域を囲みます(Fig. 8)。任意の領域は 99 ヶ所まで選択可能です。

④ Acquisition にチェックを入れ、Bleach、Analysis などの項目はチェックを外します。

* Fit frame size to bounding rectangle of regions と show number にチェックを入れるとウインドウが自動的に選択領域のみの表示に変わります。

・再びスキャンをすると、上記③で選択した領域のみがスキャンされます。





3. スキャンスピードを早くする方法

スキャン速度（1 画面の画像取得に必要な時間）を短縮するには、以下の方法があります。

1) スキャンスピードを変える

Acquisition Mode の Speed タブでスキャンスピードを変更できます。

① Scan speed のスライダを動かし、スキャン速度を変更します。
最高スピードは、スキャンエリアのサイズ（ZOOM 比）によって変動します。
*Pixel time、及び 1 平面を取得するのに必要な時間が表示されます。これは、Scan speed、Frame size、Scan average、及び取得するチャンネルの数によって変わります。

② Scan direction を → (一方向)から ⇔ (双方向)に変更すると、①のスキャンスピードを半分に短縮できます。 生細胞などの、速い動きのサンプルに有効です。双方向スキャンを行う場合、Auto ボタンをクリックし、スキャナの補正を行います。

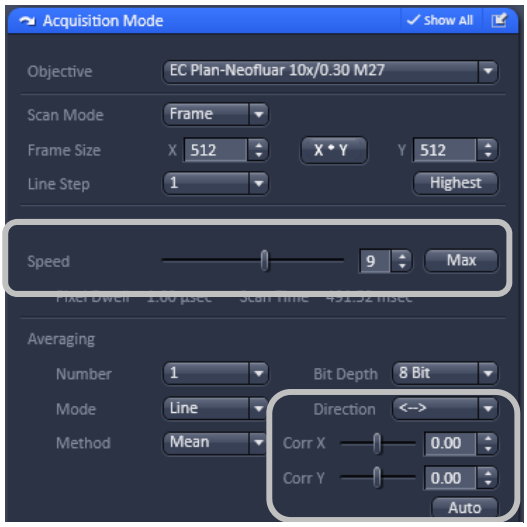


Fig. 11 Scan speed と 双方向スキャン

*Auto ボタンをクリックすると、レーザを照射し往復の画像ズレを補正します。補正は画像からのシグナルを基に計算していますので、コントラストの低いサンプルの場合には有効ではない場合があります。その場合、Continuous で画像を表示させながら、Corr X 及び Corr Y のスライダを動かし、画像を見ながら補正を行います。

2) 画素数を少なくする

画像サイズの初期値は、Frame Size : X512 x Y512 です。全体の画素数を少なくする、特に Y 軸の画素数を少なくすると、全体のスキャン時間を短縮できます。
（X 軸の画素数を少なくしても、全体のスキャン時間は変わりません）

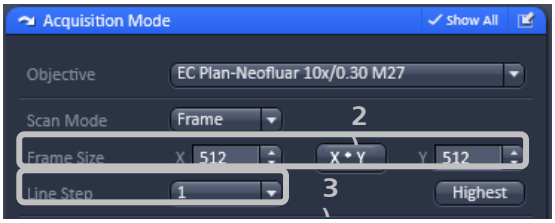


Fig. 12 Frame size

前述の Crop を用いて画像を見ながらスキャンエリアを絞ることも可能です。

3) ステップスキャンを行う

ステップスキャンでは、水平方向のラインを間引いて画像取得をし、間引いた部分を補完して画像表示を行います。
Line Step で数値を選択すると、1/数値 で間引きを行います。

4) 目的領域のみスキャンを行う

前述の、ROI Scan を参考にしてください。

4 Z-stack

1) Mark First/ Last

始点と終点の 2 点の深さ位置を設定し、Z-stack を取得する方法です。

① 左ツールエリア内にある【Z-stack】にチェックを入れます。

② First/Last タブを選択します。

③ フォーカス面の始点、終点を登録します。

a) Live 又は Continuous をクリックし、画像を連続表示します。

b) フォーカスノブを手前方向に回し、フォーカス位置を下げカバーガラスに近い面を表示します。この位置で、Set First をクリックします。

c) フォーカスノブを奥の方向に回し、フォーカス位置を上げサンプルの深い面を表示します。この位置で、Set Last をクリックします。

d) First 及び Last の位置が設定できたら、Stop ボタンでスキャンを停止します。

Fig. 13 Z-Stack (First/ Last)

④ 次に、画像を取得する Interval、もしくは Slice 枚数を選択します。

a) Interval を設定する

*Smallest ボタンをクリックすることで、光学的な画像の厚み、Optical slice (設定したピンホール径で決定されます) の 1/2 のサイズを自動的に Interval として設定することが可能です。

b) Slice を設定する
あらかじめ、何枚の Z-stack を取得するか決めてある場合には、こちらに数値を入れます。

⑤ 全ての設定が終わったら、 Start Experiment ボタンをクリックし、Z-stack の取得を開始します。

また、Average や Scan speed の設定を変更する場合には、Start する前に設定してください。

2) Center

深さ位置の中心位置と枚数　の設定を決定し Z-stack を取得する方法です。
あらかじめ、厚みの分かっているサンプルの場合に便利です。

① 左ツールエリアの Z-stack にチェックを入れます。

② Center タブを選択します。
Show all を押すと、Center タブが表示さ れます。

③ Live もしくは Continuous で画像を表示しながらフォーカスノブを回し、深さ位置の中心部分に合わせます。この位置で Center ボタンをクリックします。
もし中心位置からずれた位置を設定したい場合には、Offset に数値(µm)を入力します。

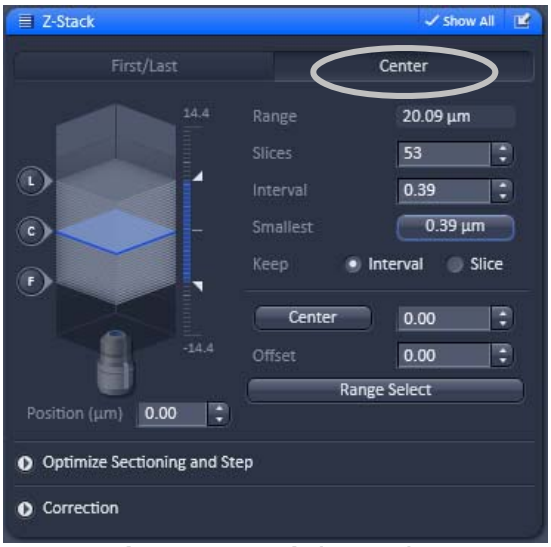


Fig. 14 Z-stack (Center)

また、Range select ボタンをクリックすると XZ で画像が取得、表示され、中心点及び範囲の設定の手助けとすることが可能です。画像を見ながら、中心位置(緑色の線)及び開始位置・終了位置(赤色の線)を設定してください。

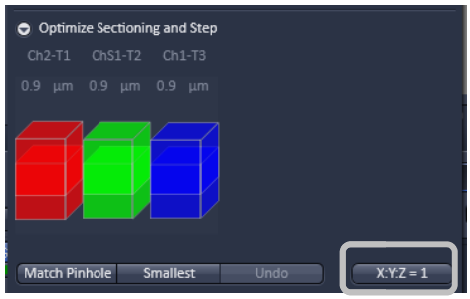
④ サンプルの厚さを考慮して、Slices(枚数)と Interval(取得間隔)を決定します。
Smallest ボタンをクリックすることで、光学的な画像の厚み Optical slice (設定したピンホール径で決定されます) の 1/2 のサイズを自動的に Interval として設定することが可能です。

⑤ Start Experiment をクリックすると、Z-stack の取得を開始します。

3) 詳細設定

3D 解析に最適な画像を取得したい場合には、下記のパラメータが設定できます。

① Voxel (X:Y:Z=1 : 1 : 1) 設定で画像を取得します。
Optimize Sectioning and Step を開くと、X:Y:Z=1:1:1 というボタンがあります。
この設定を行うと、XY の解像度と Z 軸の解像度 (Interval) を同様に設定します。
ただし、高 NA の対物レンズを用いている場合や、画素数が大きい場合にはセクションの枚数がかなり大きくなることがあります。
XY の解像度は Acquisition Mode の Scan Area、Pixel size に表示されています。



② Refractive index correction を設定します。
Correction を開くと、Refractive index correction という設定があります。
この設定により、対物レンズの媒質の屈折率（Oil=1.518、H_2O=1.3）とサンプルの媒質の屈折率が異なる場合に、これを補正するものです。

(サンプルの媒質の屈折率) / (対物レンズの媒質の屈折率) で割り算した数値を入力してから、Z-stack の取得範囲を決めて画像取得を行います。

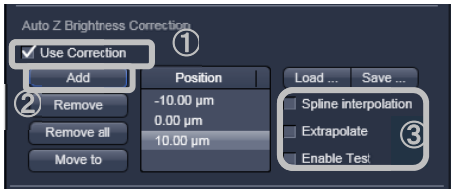
4) Auto Z

Z-stack を取得する際に、深さ方向にレーザパワーや Gain、Offset といったパラメータを動かしながら取得する方法です。

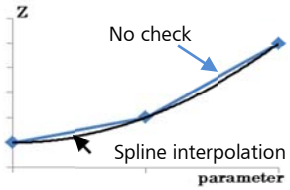
*Auto Z を利用する場合、Gain、Offset、レーザパワーを変化させるため、画像内での相対的な輝度の比較はできなくなりますのでご注意ください。

① Z-stack ウインドウの Correction で Use correction にチェックを入れます。

② 画像を表示しながら明るさを確認し、レーザパワー、Gain、Digital Offset を調整し、深さのポイントごとに、Add をクリックしていきます。

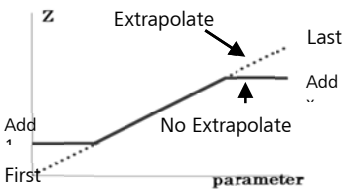


③ それぞれのポイント間で直線的に、設定項目が変化します。



*Spline Interpolation にチェックを入れると、曲線的に各深さポイント間での画像取得パラメータの補間を行います。

*First/ Last で設定された上限/ 下限の Z 位置と、Add で設定されたポイントの間を補間する場合には、Extrapolate にチェックを入れてください。



*Enable test にチェックを入れると、画像取得中に実際のパラメータの変化を見ることができます。

5. 電動ステージのコントロール (電動ステージはオプションです)

1) Stage：電動 XY スキャニングステージのコントロール

電動 XY ステージが搭載されている場合、付属のジョイスティック等によりステージを制御します。また、ZEN ソフトウェア上からも下記 **Stage** ウインドウにて XY の移動を制御することができます。

① ソフトウェアから制御を行う場合、Acquisition Parameter - Stage を開き動作します。

Fig. 18 Stage control

X-, Y (µm):	ステージ上における現在の座標が表示されています。
Step size (µm):	1 クリックでの移動距離
Set Zero:	現在の XY 座標を基点(X,Y)＝(0,0)として登録します。
Move to zero:	基点に移動します。

（Z の座標は、フォーカスノブ、または **Focus** ウインドウにて制御することができます。）

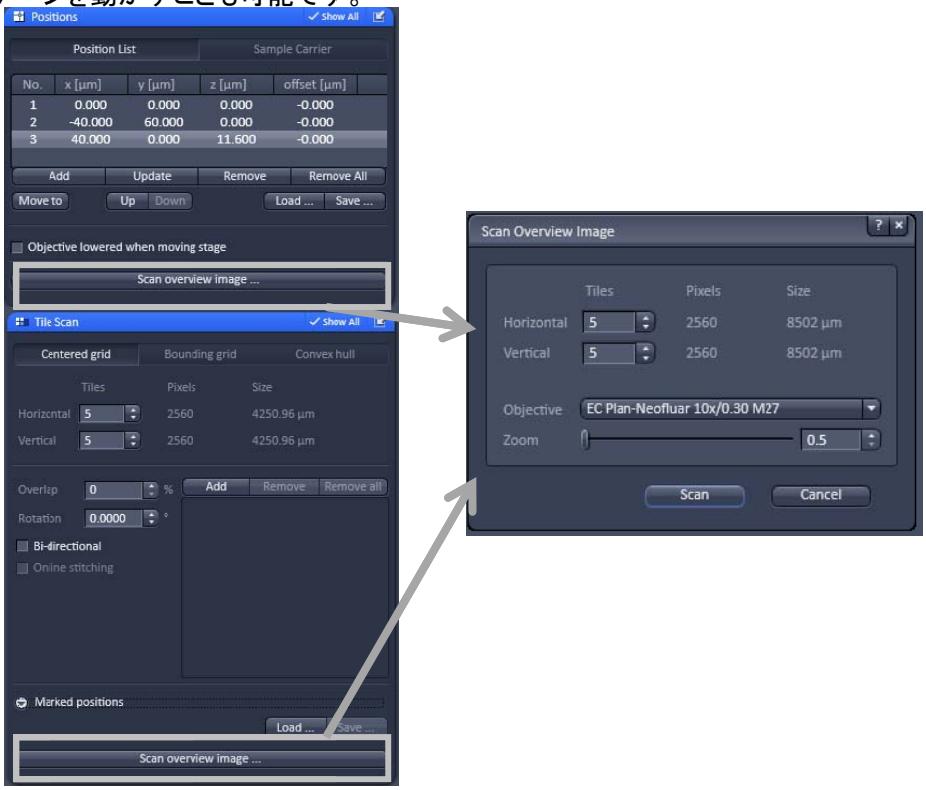
また、**Stage** ウインドウ上のジョイスティック より、微動と粗動 での移動が可能です。

② 座標の登録を行う場合、 にチェックをいれると Marks リストが表示されます。

登録しておきたい座標上で **Mark** をクリックすると、**Marks** リストに登録することができます。
座標情報は複数登録することができ、リストの中から任意の座標を選択して **Move To** をクリックすると、自動的にステージがその位置へ移動します。
また、登録した座標は **Remove** または **Remove all** でリストから削除することができます。

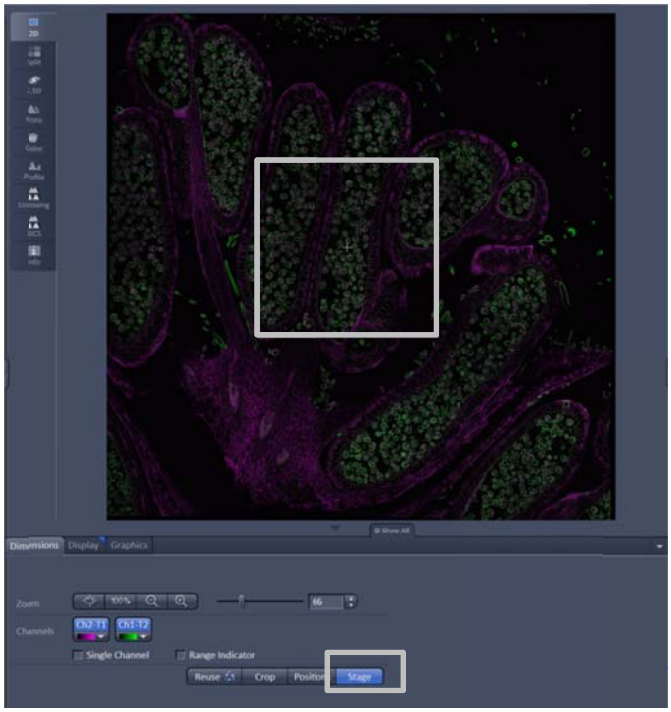
2)　画像上からステージを動かす

センターエリアの画像を取得した画面からも、ステージを動かすことが可能です。
また、**Scan overview image** で、**Tile Scan** により広視野の画像を取得し、その画像上からステージを動かすことも可能です。



Positionsウインドウ、もしくはTile scanウインドウから、Scan overview image…ボタンをクリックし、Tile枚数、対物レンズ、ズーム倍率を選択し
Scanをクリックすると、現在の座標を中心としてタイルスキャンを行います。

Stage を選択すると画像中に現在のスキャンエリアを示す四角形が表示され、クリックした座標にステージが移動します。



6. タイリング（電動 XY ステージ搭載システムでのみ有効）

1) Tile Scan の設定

あらかじめ**Scan Control**ウインドウでフォーカスを合わせ、基礎画像の調整（明るさ、コントラスト等）を行っておいて下さい。

① 中心にしたい場所を決め、視野の中心にステージを移動させます。
（この際、**Stage - Set**にて、基点登録（X,Y）=（0,0）しておくと、後で座標を確認しやすくなります。）

② 左ツールエリアの**Tile Scan**にチェックを入れ、**Tile Scan**ウインドウを開きます。
Horizontal, **Vertical**の**Tile枚数**を入力します。（最大100x100まで）
Pixels : 画像全体のピクセル数が表示されます。
Size : 画像の実寸（μm）が表示されます。

③ **Start Experiment**でステージが移動し、基点を中心としたTile画像を取得します。設定した枚数分スキャンすると、画像取りを終了します。
必要に応じて、画像を保存してください。

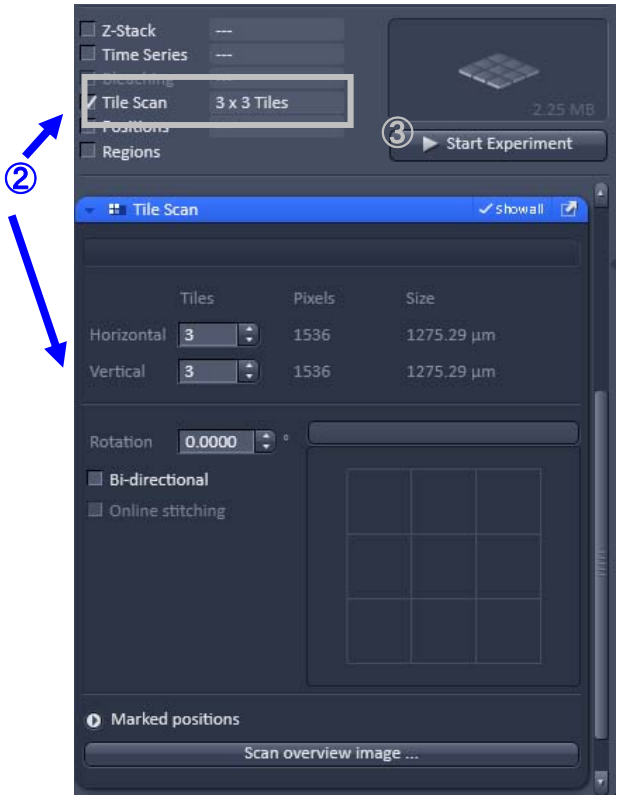
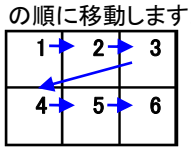


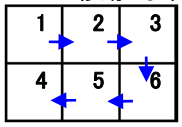
Fig. 11 Tile scan の設定画面

※ Show all にて、ステージの角度補正（**Rotation**）が可能です。

※ 通常ステージは 1→2→3→4→5→6 の順に移動します。



※ **Bi-directional** にチェックを入れると、1→2→3→6→5→4 の順にステージが移動します。



2) Overlap させて Tile scan を行う場合（Tiling のオプションソフトウェア)

オプション機能が付加される場合には、以下の3つの方法を取ることが可能です。

① 1)と同様に、中心にしたい場所を決め、Tile scanの枚数を設定します。
この時、Overlapに、10-15%の数値を設定します。

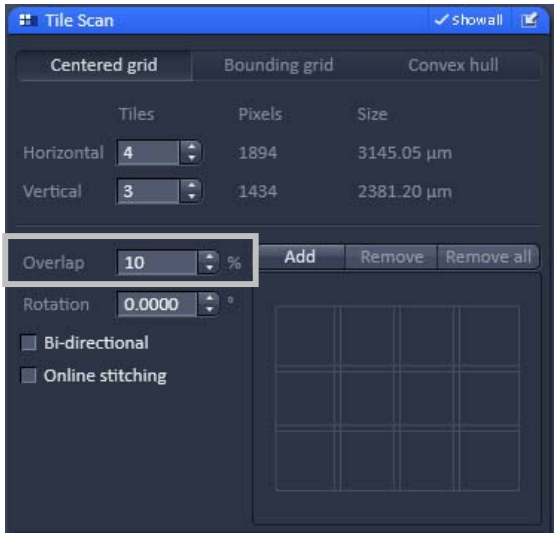


Fig. 22 Tile scan

② Start experimentで基点を中心とした、Tile画像を取得します。
また、あらかじめStitching補正強度がわかっている場合には、Online stitchingにチェックを入れると、全位置の画像を取得後に、自動的にStitching操作を行います。
（*繋ぎ合わせ終了後の位置調整はできません）

③ 取得後の画像のつなぎ合わせに関しては、第3章 9.Stitchをご確認ください。

3) 目視/スキャンで範囲を決める方法（Tiling のオプションソフトウェア）

中心点からではなく、四隅もしくは隅の位置数点を指定し、その範囲でタイリング画像の取得を行う方法です。

① Tiling のチェックボックスにチェックを入れます。

② 指定した範囲を四角形で取得する Bounding grid もしくは、指定位置のみを含む多角形で取得する Convex hull タブを開きます。

* 目視で範囲指定を行う場合は、表示された Tiling ウインドウを外に出しておきます。

③ 目視/スキャンで取得したい位置を確認し、Add, Add と隅の位置を指定します。
この時、フォーカス面も設定します。

④ 目視設定していた場合には、LSM に光路を移しスキャンをしながらフォーカス位置もしくは、Z-stack の設定をします。

⑤ 任意で Overlap の設定を行います。

⑥ Start experiment をクリックし、タイリング画像取得を行います。

⑦ 上記 2）にあるように、Overlap させた場合には、Stitching 操作を行います。

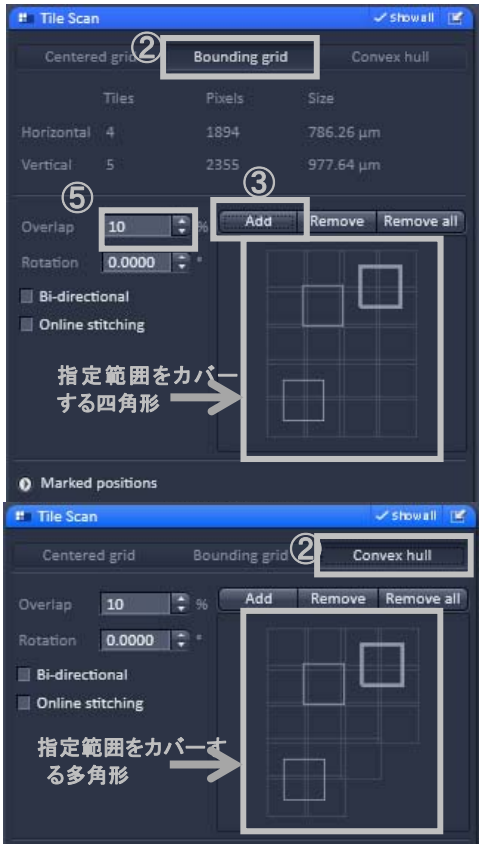


Fig. 23 Bounding grid/ Convex hull

7. Positions： 多点観察のための座標登録（Position List)

1) Position list

左ツールエリアの**Positions**にチェックを入れると、下記**Positions**ウインドウが表示されます。**Position List**では、複数の座標を登録することができます。

1) 登録したい場所にステージを移動させ、フォーカスを合わせます。**Add**ボタンでその座標を登録することができます。この座標情報は、**Stage Marks**リストにも反映されます。

リストの中から任意の座標を選択して**Move To**をクリックすると、自動的にステージがその位置へ移動します。また、登録した座標は **Remove** または**Remove all**でリストから削除することができます。

2) **Start Experiment**をクリックすると、登録した各座標へ順番に移動し、画像を取得します。

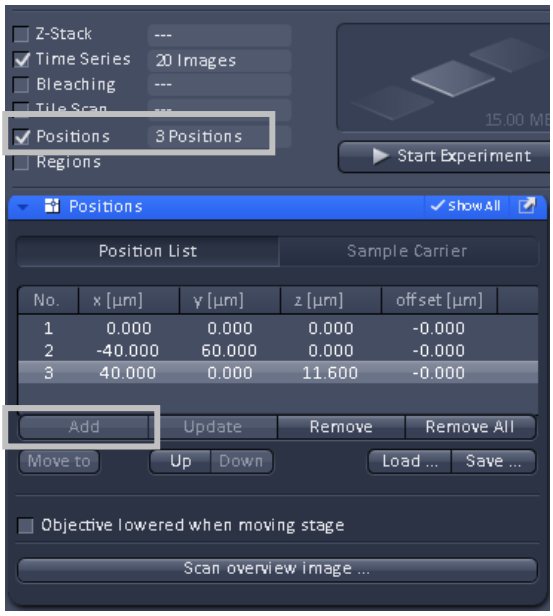


Fig. 24 Positions

～設定のヒント～

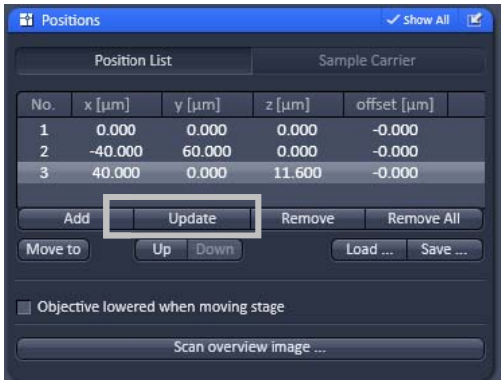
a) 目視でポジションを指定したい場合

① Positionsウインドウの右上の↗をクリックし外に出します。

② Locateタブの Ocular Onlineを使用し、目視でサンプルを確認します。

③ 登録したい任意の座標で、Addボタンをクリックします。

④ Acquisitionタブに戻り、各座標において フォーカス位置を確認します。



Move to ボタンにより任意登録位置に移動しますが、XYZの位置を修正したい場合には、Updateボタンをクリックすることで、更新が可能です。

b) Overview imageからポジションを指定したい場合

Scan overview imageでは、**Tile Scan**をして広視野の画像を取得し、その画像上で座標を指定することができます。

① Tile枚数、対物レンズ、ズーム倍率を選択して**Scan**をクリックすると、現在の座標を中心としてタイルスキャンを行います。

② 取得した画像下方のビューコントローラ - **Dimensions**にて**Positions**を選択し、画像中の任意の場所でクリックすると、その座標が**Positions List**に登録されます。また、**Stage**を選択すると画像中にスキャンエリアを示す四角形が表示され、クリックした座標にステージが移動します。（座標は登録されませんので、必要に応じて**Positions** - **Add**で登録してください。）

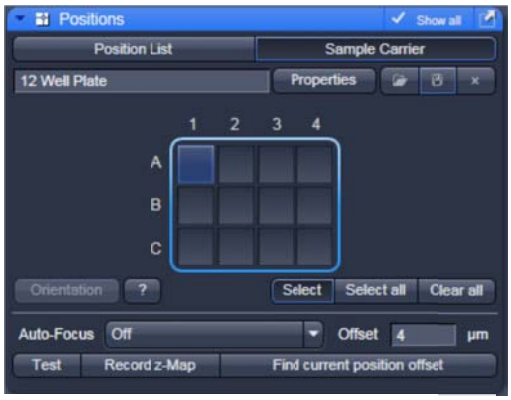
2) Positions: 多点観察のための座標登録 (Sample carrier)

マルチウェルプレートの形状に応じて、取得するウェルの数やウェル番号を指定することができます。

① マルチウェルプレートの形状とウェルの位置確認

a) Loadボタンでサンプルプレートの形状を選択します。
Propertiesにて、ウェルの数、ウェル間の距離を入力し、設定を作成することも可能です。

es



rrier

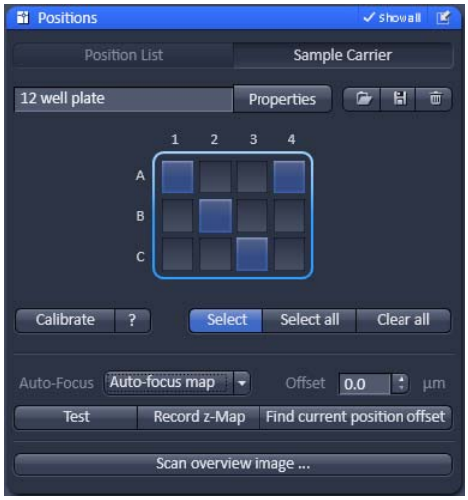
b) ステージを目的のウェルポジションに合わせ、Orientationをクリックしてから、ウインドウ内の対応するウェルをクリックします。目的のウェルポジションが青色で表示されたら、ステージの位置確認完了です。

c) 他のウェルをクリックすると、ステージが自動的にその位置へ移動します。

② 複数ウェルの選択

a) **Select** をクリックしてから測定したいウェルをクリックします。複数選択することができ、選択されたウェルは青色で表示されます。
Select All では全てのウェルが選択され、**Clear All** では全ての選択が解除されます。

b) **Start Experiment** をクリックすると、選択した各ウェルへ順番に移動し画像を取得します。



選択

8. Time series

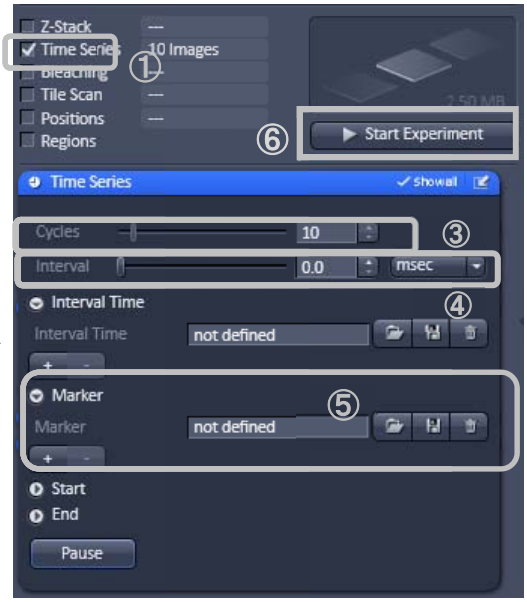
予め時系列で取得したい画像のベースとなる明るさ(コントラスト)を決めておきます。

① 左ツールエリアより、Time Series にチェックを入れます。

② Time Series 取得条件の設定を行います

③ Cycles の項目で、Time series を合計何枚取得するか、決定します。

④ Interval で、画像取得間隔を決めます。
例えば、Interval を 10sec と設定すると、スキャンする時間を含め、次の画像を取得するまでの時間が間隔となります。
スキャン時間が、Interval よりも長い場合には、スキャン時間が律速時間(Interval)になり、間断なく画像取得を続けます。



⑤ 必要に応じ、Marker の Description にコメントを書き込みます。
Time series 取得中に薬物による刺激を加えるような場合に、Set をクリックすることで、時間軸に最大 7 つまでテキストマーカーを挿入可能です。

※書き込む欄が表示されていない場合、 を押し、書き込み欄を追加します。

⑥ Start Experiment ボタンをクリックし、スキャンを開始します。

9. Auto Focus/ Focus devices and strategy (一部オプション)

タイムシリーズ画像の取得の際に、フォーカスを安定化させながら使用する機能です。

蛍光像または反射像からフォーカス位置を探し、追従する機能と、Definite focus（ハードウェアオプション）を用いて追従する機能の 3 種類が使用可能です。

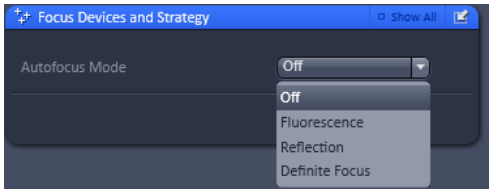


Fig. 31 Focus devices & strategy

1) Fluorescence mode

画像取得と同じ蛍光取得の設定で画面中央の XZ 画像を撮り、最も輝度が高い Z 位置を認識します。

① Autofocus Mode から、Fluorescence を選択します。

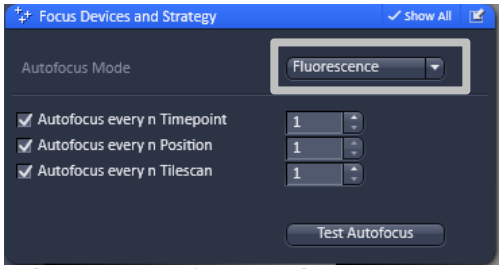


Fig. 32 Autofocus -Fluorescence -

② Autofocus をするタイミングを、チェックボックスと n で選択します。
Autofocus every n Timepoint : n タイムポイント毎に Autofocus を行います。
Autofocus every n Position : n ポジション毎に Autofocus を行います。
Autofocus every n Tilescan : タイリングの際に、n 位置毎に Autofocus を行います。

＊表示されるチェックボックスは、取得する設定によって異なります。

③ Start Experiment で画像取得を行います。

＊蛍光色素の励起を行いオートフォーカスを行いますので、褪色には気を付けて下さい。

2) Reflection mode

LSM700 の場合、画像取得と同じ蛍光取得の設定で、LSM710/ 780 の場合、反射光取得設定で XZ 画像を撮り、最も輝度が高い Z 位置 ＝ カバーガラス位置からのオフセット(移動距離)を使ってオートフォーカスを行います。

① Autofocus Mode から、Reflection を選択します。

② Find Offset をクリックし、カバーガラス面からサンプルまでの距離を自動的に探します。

③ Autofocus をするタイミングを、チェックボックスと n で選択します。
＊表示されるチェックボックスは、取得する設定によって異なります。

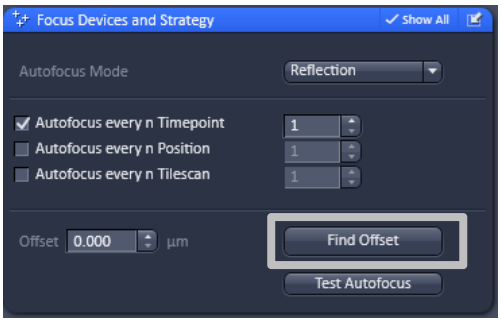


Fig. 33 Autofocus –Reflection-

④ Start Experiment で画像取得を行います。

＊オートフォーカスにかかる時間は、サンプルのサイズやカバーガラス面からの距離によって異なります。

3) Definite focus

フォーカス維持専用の Definite focus 装置を用いてオートフォーカスを行います。

① Autofocus Mode から、Definite focus を選択します。

② Autofocus をするタイミングを、チェックボックスと n で選択します。
＊表示されるチェックボックスは、取得する設定によって異なります。

③ Start Experiment で画像取得を行います。

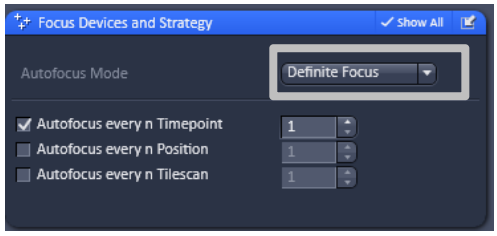


Fig. 34 Autofocus –Definite focus-

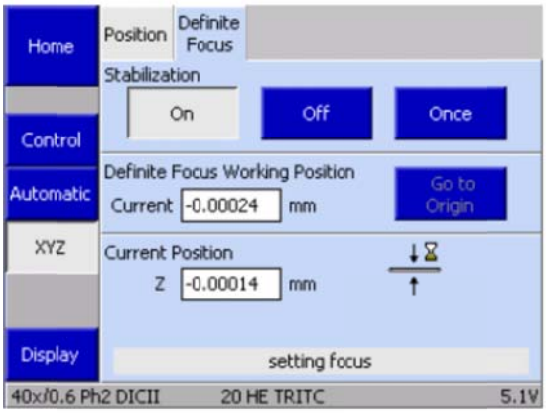
Definite focus は、カルチャーディッシュ底面の変化を追従するフォーカス補正装置ですので、サンプルそのものを追従することはできません。

4) Definite focus を Axio Observer のタッチパネルから設定する場合

この方法は、画像取得のタイミングとは独立して、タッチパネルで設定されたタイムインターバルでフォーカス補正する方法です。非常に速いタイムラプスを取得する場合には、Setting→Components→Focus から、Definite Focus period で Time Interval を再設定して使用可能です。

*デフォルトでは、Definite Focus のタイムインターバルは 5 秒です。
ただし、Time Series との組合せのみ有効です。

① ZEN ソフトウェアから、Live/ Continuous で画像を取得しながら、Focus を合わせます。
② Microscope → XYZ → Definite Focus で On にします。
③ 状態表示が、【オフ】から【Waiting…】→【setting focus…】に変化することを確認します。
④ 常に動作が行われることを確認してから、Time series 設定を行い、Start experiment ボタンをクリックします。
⑤ 連続画像を取得し始めてから、もう一度 タッチパネルから On をタッチします。



5) Definite focus に推奨の対物レンズとサンプル条件

① 対物レンズについて

LSM に搭載される対物レンズは、ほぼ使用可能です。

～ 使用可能なレンズ一覧 ～

EC Plan Neofluar	5x, 10x, 20x, 40x Oil, *63x Dry, *63x Oil, 100x Oil
LD Plan Neofluar	20x, 40x, *63x
LCI Plan Neofluar	25x, 63x
Plan Apochromat	*20x, *40x Dry, 40x Oil, 63x Oil, 100x Oil
Alpha-Plan Apochromat	*100x Oil
C-Apochromat	40x W, 63x W
Fluar	2.5x, 5x, 10x

*表記がないレンズは、赤外線を利用してフォーカス位置をそのまま維持することが可能です。
*表記のあるレンズに関しては、同様に赤外線を利用しますが、カバーガラス面からの Offset で作用します。一度レンズが下がり、フォーカスアウトしたように見えますが、オートフォーカス作動には問題ありません。

② サンプルの条件

サンプルの種類によっては、Definite focus がかかりづらいものがあります。
タッチパネルで【Waiting…】が続く場合、もしくは自動で【OFF】になる場合には、Definite focus が動作していない可能性があります。
必要に応じて、目視での作動チェックを行ってください。

10. 温度コントロール及び CO_2 コントロール

温度及び CO_2 の設定を行う場合には、下記のように行ってください。

1) ZEN からの設定

① Locate タブの Incubator ウインドウもしくは、Acquisition タブの Incubator ウインドウから設定します。

② 任意のデバイスを、任意の温度に設定します。

H Insert P　:サンプルを置くチャンバ
Inc PM　:CO_2 導入用の蓋
H Dev Humid　:CO_2 加湿用ビンを温めるデバイス

CO_2　:CO_2 濃度

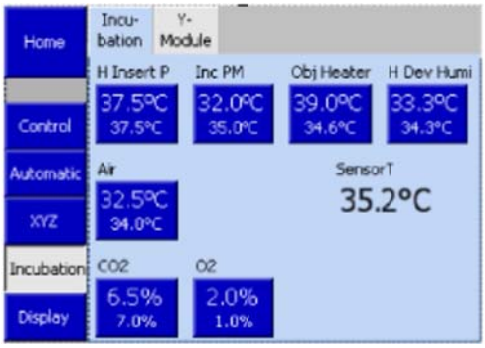
*表示されるデバイスは、システムによって異なります。

③ チェックを入れることで、それぞれのデバイスが作動し始めます。
右に表示されるグレーの数値が、現時点での実測値です。

2) タッチパネルからの設定

Microscope → Incubation から各デバイスを設定してください。

ZEN ソフトウェアから行った設定と、顕微鏡付属のタッチパネルから行った設定は連動しています。



3) 注意するポイント

●タイムラプスのためには、画像取得開始の最低 1 時間以上前に、暖気を開始してください。(CO_2 は、開始の 10-15 分程度前で構いません)
●CO_2 を使用する場合、ON にする前に必ず、CO_2 ボンベが開いていること及び、加湿用の瓶に必要量の蒸留水か純水が入っていることを確認してください。
●また、オイルレンズでの観察の場合には、可能であればオイルをつけた状態でシステムを温めてください。難しいようであれば、オイル自体も温まる状態を取ってください。オイルは温度によって粘性が異なり、十分に温まっていないとフォーカスずれの原因になります。

なお、ハードウェアの設定に関しましては、専用のマニュアルをご確認下さい。

11. 多点タイムラプス

1) 取得可能な設定

XY(二次元) x 複数ポジション x タイムラプス
XYZ(三次元) x 複数ポジション x タイムラプス

XY+タイリング(二次元) x タイムラプス
XY+タイリング+Z x タイムラプス
XY+タイリング+Z x 複数ポジション x タイムラプス

*XY にはラムダモード(λ)も含まれます。

2) 必要な設定

複数ポジションの設定 : p.19 7. Positions
タイリングの設定 : p.16 6. タイリング
タイムラプスの設定 : p.22 8. Time series
フォーカス補正の設定 : p.23 9. Auto Focus/ Focus devices and strategy
温度と CO2 の設定には、 : p.26 10. 温度コントロール及び CO2 コントロール

をご覧ください。

3) 多点タイムラプスの注意点

① 多点において、座標以外の全ての設定は共通になります。
例: Configuration、 Gain/ Offset/ scan speed/ average など取得条件、
Z 設定(枚数及び間隔)

ポジション毎に条件を変えるなどの複雑な多点タイムラプスを行う場合には、専用のオプションソフトウェア【Experiment Designer】が必要です。

② 3 次元で多点タイムラプスを行い、かつオートフォーカス機能を使用する場合、ポジションとして中心点を登録してください。(Z-setting は、First/ Last でも Center でも構いません)

12. Online Ratio

画像取得を行いながら、2 チャンネル間の Ratio 画像を作成することが可能です。

① Ratio を取得するための Configuration を Experimental Manager から選択します。

② Show all tools をクリックし、Light Path ウインドウを表示します。
*ここでは、例として CFP/ YFP の FRET と Ratio 画像を同時取得する方法をご説明します。

③ Show all をクリックすると、下に Ratio の設定が表示されます。ここで、最大 2 つのレシオチャンネルを作成します。

④ Source1 及び Source2 に該当するチャンネルを選択します。また R1(レシオチャンネル)の上をクリックすることで、擬似カラーを設定します。
*今回の例の場合、レシオチャンネルを 1 つ作成し、Source1 に CFP、Source2 に YFP のチャンネルを選択します。
*輝度により寒色から暖色のグラデーション表示によりレシオを表示する場合には、レインボーカラーを選択します。

⑤ Channels ウインドウ内のレシオチャンネルから、数式を選択します。

Ratio type1 $\frac{S1+a}{S2+b} * c + d$

Ratio type2 $\frac{S1 * a - S2 * b}{c} + d$

Ratio type3 $\frac{S1 - S2 * a}{S1 + S2 * b} * c + d$

Ratio type4 $\frac{S1 - S2 + a}{S2 + b} * c + d$

⑥ 数式に数値を適宜入力します。
*始める前に、Offline で計算式の見積もりを行うことをお勧めします。(p.47 画像間のレシオ表示 参照)

⑦ 以上を設定の上、必要に応じ Time series を設定し画像を取得します。

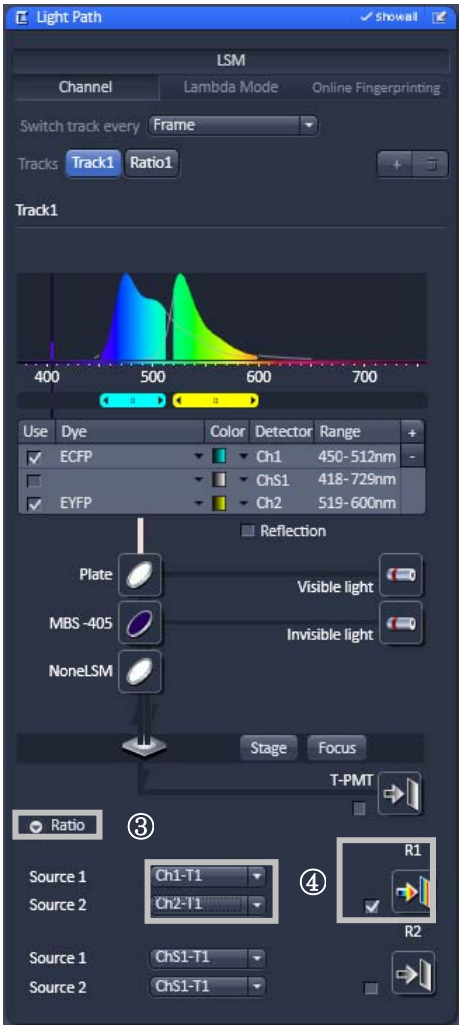


Fig. 36 Online ratio (Light path)

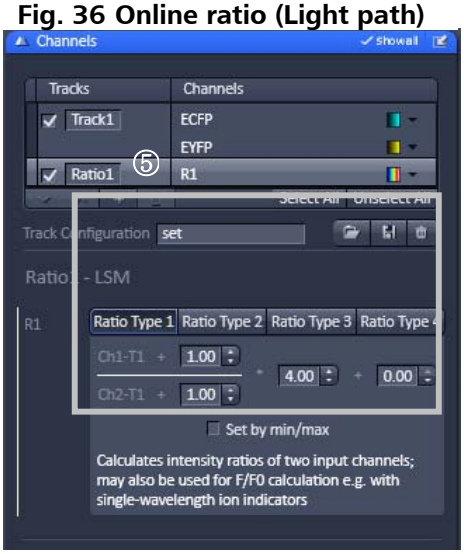


Fig. 37 Online ratio (channels)

13. フォトブリーチング （Bleaching）

Bleachingの機能は、Time seriesとの連動も可能ですので、フォトブリーチング後の蛍光の変化を測定するようなアプリケーションにも対応しています。
フォトブリーチングを行う場合には事前に以下のことを確認しておいてください。

・ブリーチしたい色素がどの程度のレーザの強さ（Excitation of Bleach）＆回数(Iterations)で消光するのか。

・蛍光の戻り、もしくは移動はどの程度の時間間隔で追っていくのが適当か。

・ブリーチ前の画像の明るさをどの程度に設定するか（ブリーチ後の明るさがどの程度か）。

① 左ツールエリアにて、Bleaching にチェックを入れると、Time series、Regions にもチェックがなされます。
*Time series が必要ない場合には、チェックを外してください。

Fig. 38 Bleaching 設定画面

・ Time Series にて取得枚数などの設定を行います。取得枚数が決まると、図の表示に全取得枚数が表示されます。
・ 左ツールエリア内の Bleaching ウインドウにてブリーチングの設定を行います。

ここでブリーチング用レーザの波長、照射回数(Iteration)、レーザ光の強さ(Excitation)の設定をします。

② Start Bleaching after # scans に チェックを入れ、タイムシリーズでスキャン開始から、何枚目の画像で ブリーチングを行うかを指定します。
例えば、2 と指定すれば、2 枚画像を撮った直後にブリーチングを行い、ブリーチング後に 3 枚目以降の画像を撮ります。

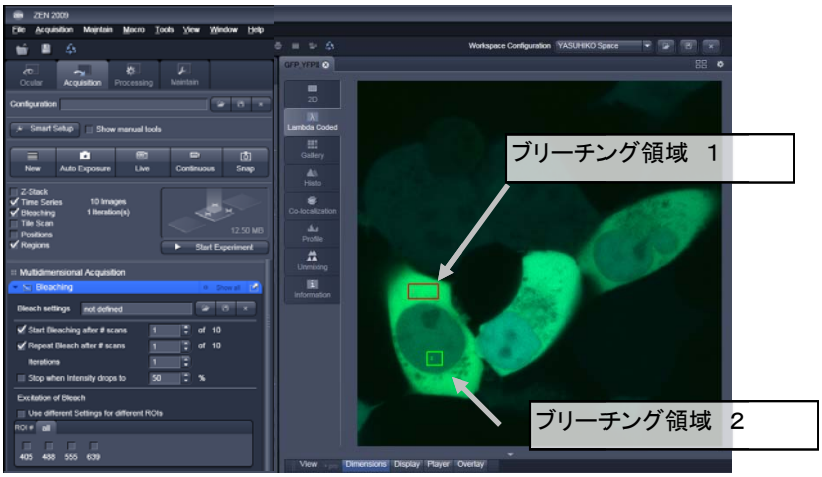
③ 繰り返してブリーチングを行いたい場合、Repeat bleach after # scans にチェックを入れると、#枚毎に Bleaching 操作を行います。
また、チェックが入っていると Stop when Intensity drop to のパラメータが表示され、輝度が初期値と比べ何%になったら繰り返しの Bleaching を Stop するか設定できます。

④ Iteration にて 1 度のブリーチングで何回繰り返し、レーザ照射をするかを指定します。
例えば、Iteration を 10 と指定すると、1 度のブリーチングで指定した領域に 10 回繰り返しブリーチングを行います。

* Repeat Bleach after # scans にチェックを入れると、タイムシリーズ取得中に、入力した枚数ごとにレーザ照射を繰り返し行うことが可能です。

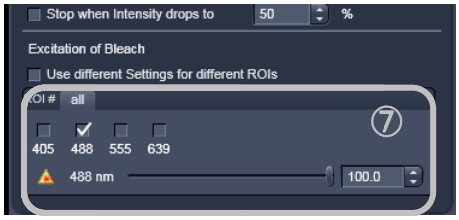
⑤ Different scan speed にチェックを入れると、通常のイメージング時のスピードとは個別に、ブリーチング時のスキャンスピードを設定できます。

⑥ Regions ウインドウ内でブリーチングのための領域(ROI)を指定してください。
ブリーチングを行いたい領域を示す Number の Bleach 及び、Analysis にチェックを入れるとチェックを入れた領域だけがブリーチングされます。



⑧ Excitation of Bleach エリア内でブリーチングに使用されるレーザラインやレーザ強度を選択します(Fig.31 , 34)。

※Use different Settings for different ROIs にチェックを入れると、それぞれ異なる領域(ROI)ごとに、異なるレーザやレーザ強度を選択することが可能です。
その場合、ROI No.に対応するタブを選択すると、個々のレーザ設定ができます。



⑨ Start Experiment ボタンを押し、スキャンを開始します。

始

14. Auto Save

自動保存を行いたい際に設定します。

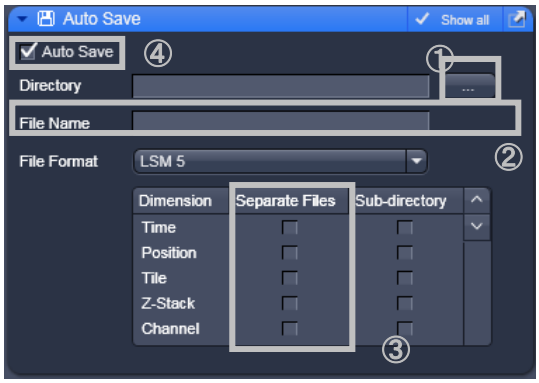


Fig. 43 Auto save

① 保存先の Directory を選択します。

② ベースとなる File 名を付けます。保存されるデータは、【ベース名_年月日時間】というファイル名になります。

③ Z/ Time/ Position などのデータを取得する際に、どのパラメータごとに別ファイルで保存するかを Separate Files のチェックで選択します。

④ Auto save にチェックを入れます。

*データ取得終了後は、必ず Auto Save のチェックを外してください。外さない場合には、それ以降の全てのデータも Auto Save されますのでご注意ください。

第2章 解析編

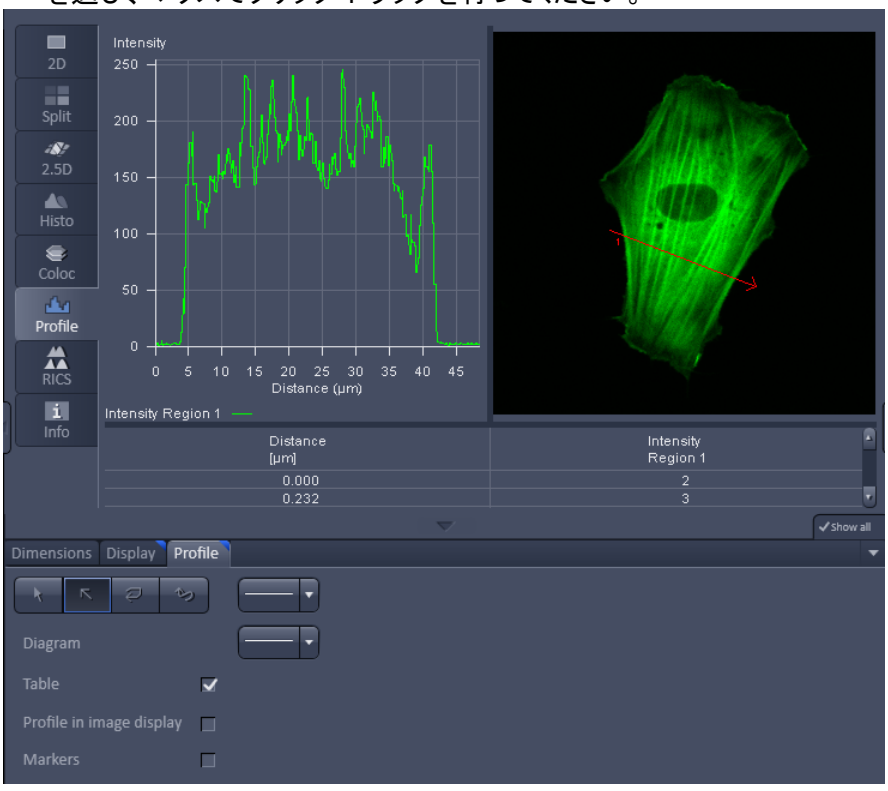
輝度解析を行いますので、輝度値としては 8bit もしくは 12bit、16bit のダイナミックレンジを有効に利用した方がよいでしょう。そのためには"Range indicator"などを使用し、画像の調整（Gain / Digital Offset）を行ってください。

1. Profile

画像中にひいた線上の輝度を表示します。

① ビュータブから Profile を選択すると、画像と中央に赤色の矢印とグラフが表示されます。

② 線上の輝度を知りたい位置に、下のビューコントローラの矢印（直線もしくは曲線）を選び、マウスでクリック・ドラッグを行ってください。



表示する情報は、画像下のビューコントローラから選択可能です。

Table:	輝度値の表を表示
Profile in image display:	画像上に Profile のグラフを表示
Markers:	マーカーの追加

2. Histogram

画像中の平均蛍光輝度や面積を表示します。

① ビュータブから、"Histo" を選択すると、画像とヒストグラムのグラフが表示されます。
ヒストグラムには横軸が輝度、縦軸が各輝度の頻度が表示されます。

② 測定を行いたい領域を、ビューコントローラの ROI ツールを使って指定します。
画像左に表示されるのが、囲んだ領域のヒストグラムです。

③ 各チャンネルの Threshold レベルを変更することも可能です。
Threshold にチェックを入れ、処理するチャンネルと Lower/ Higher のスライダで輝度値の範囲を指定すると、指定されたピクセルのみ画像とグラフを表示します。
また、Threshold の Lower/ Higher 範囲内の平均輝度、標準偏差、ピクセル数、面積が表示されます。

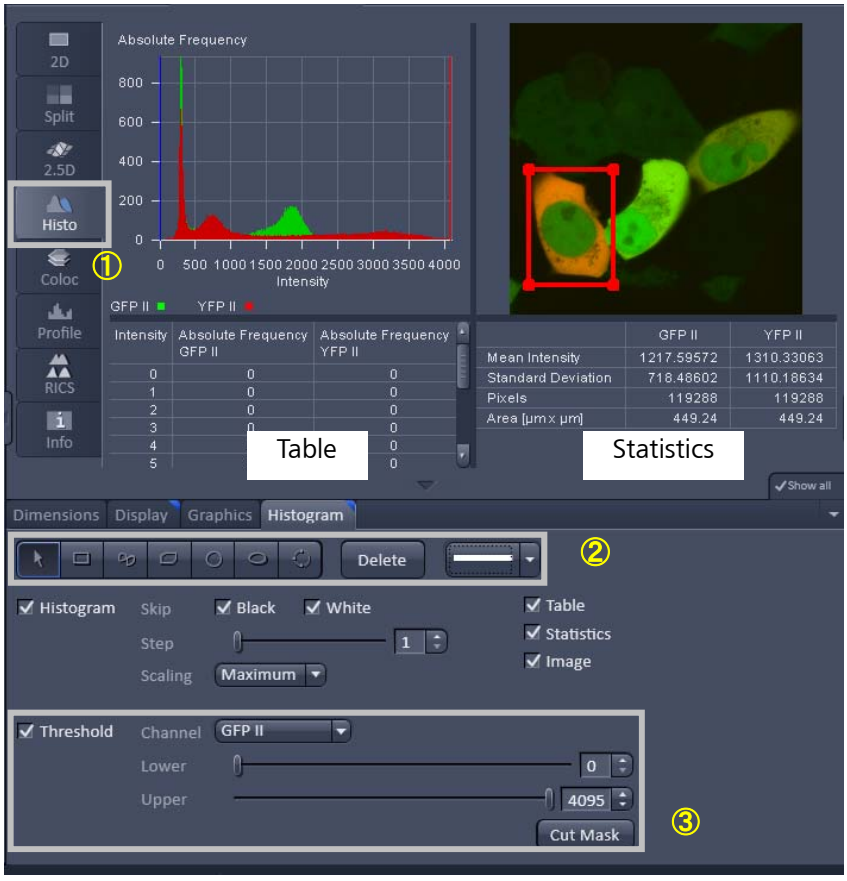


Fig. 45 Histogram 解析画面

表示する情報は、画像下のビューコントローラから選択可能です。

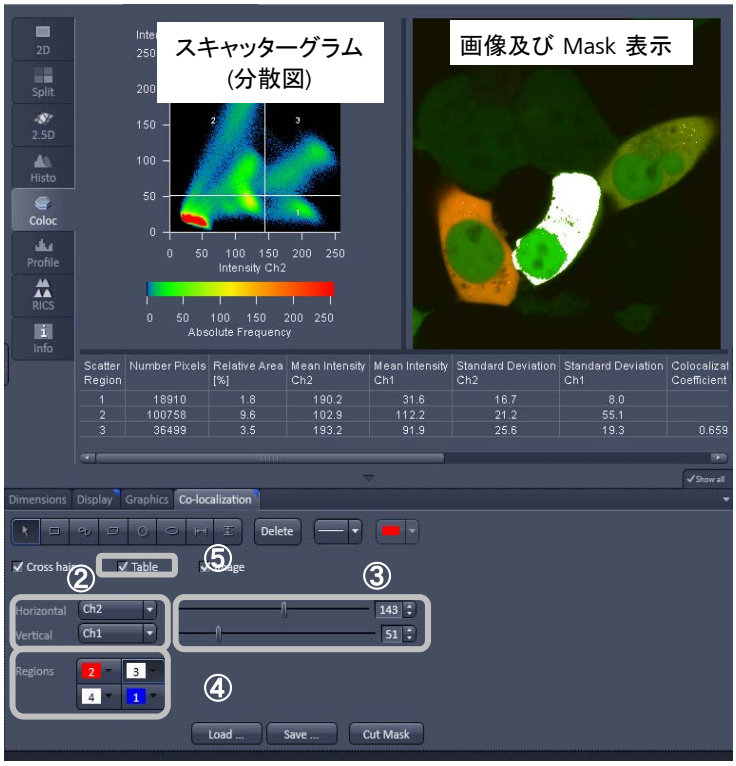
Image: 画像
Statistics: 選択範囲の平均輝度、面積など
Table: 輝度を表示する表

3. Co-localization

2 色以上の画像の場合には、Co-localization　共局在の解析が可能です。

① ビュータブから“Coloc”を選択すると、画像とスキャッターグラム(分散図)が表示されます。

*スキャッターグラムの横軸と縦軸は、各チャネルの輝度を表示しています。また、擬似カラーはピクセルの頻度を示しています。



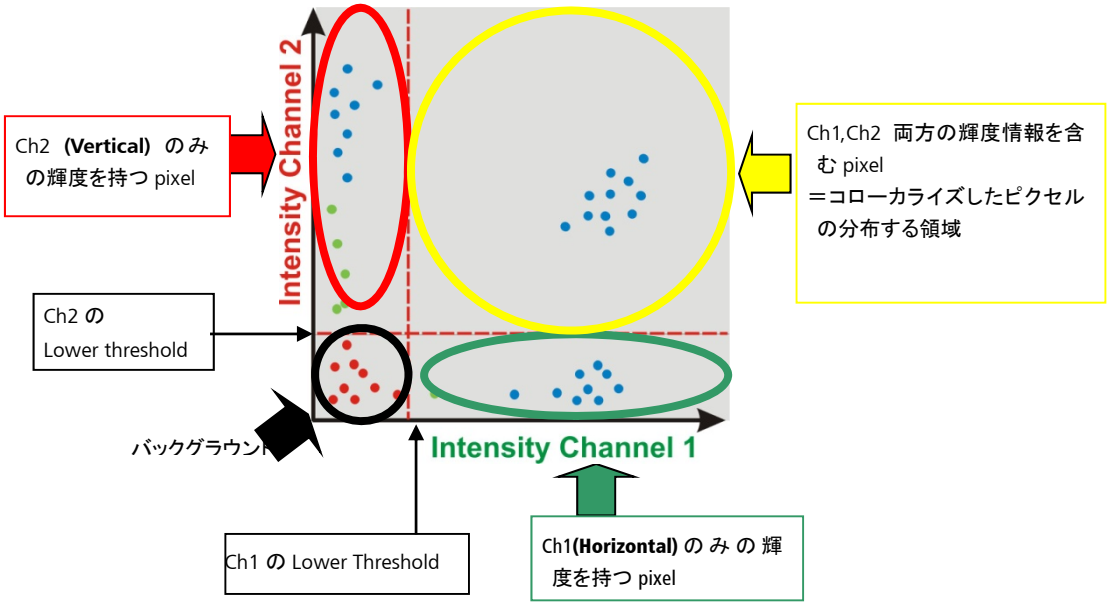
表示する情報はビューコントローラから選択可能です。

Cross hair:
　スキャッターグラム内のクロスライン

Table:
　データテーブル

Image:
　画像

Fig. 46　スキャッターグラム設定画面



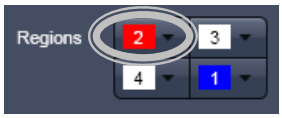
② ビューコントローラの " Horizontal ", " Vertical " でそれぞれの蛍光チャンネルを選択します。
*Horizontalはスキャッターグラムの横軸、Verticalは縦軸に輝度が表示されます。

③ 各チャンネルのスレッショルド(閾値)の設定を行います。
ビューコントローラの"Cross hair"を選択すると、スキャッターグラム内にクロスラインが設定されます(チャンネルの閾値を表します)。Regionではクロスラインで区切った領域(Region)を擬似カラーでマスキングすることができます。

例) 横軸のチャンネルに対して閾値を決める場合

a) ビューコントローラのDimensions の"Channels"において、1チャネルのみ表示します。画像上では1色の画像のみ表示されます。

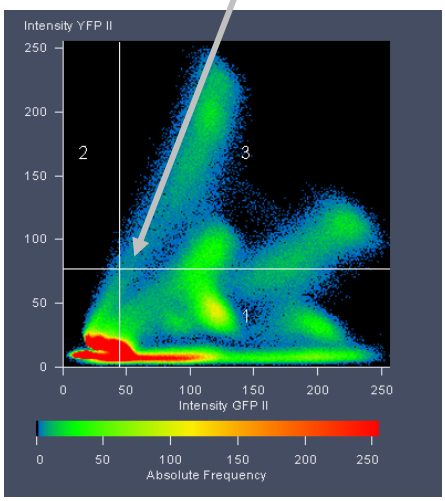
b) マスクツールの対応するRegion(Region 2)に対して、白を割り当てます。



Region:クロスラインで仕切られた各1、2、3のRegionに相当するピクセルに、任意の擬似カラーが塗られます。閾値の決定にはこの部分を使用します。

c) Threshold設定部分で、横軸チャネル(Horizontal) に相当する方のスクロールバー(下図ではGFP Ⅱ)を動かします。
スキャッターグラム上では2と3のエリアを仕切るラインが動きます。同時に画像上の輝度値の低いピクセル(バックグラウンドに設定する部分)に白の擬似カラーがつきます。このようにしてチャネルの閾値を決めます。

Lower Threshold を動かすとスキャッターグラム上のクロスラインが動きます。それに伴い Region2 に相当する部分がバックグラウンド領域として白く塗られます。



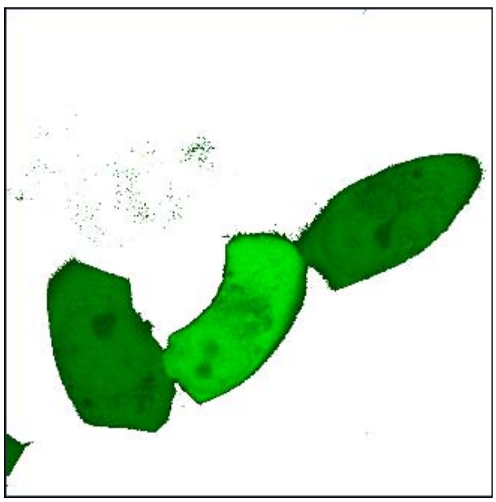


Fig. 47 Threshold 設定

① マスクツール中のRegion3に対して白を割り当てクリックすると、画面上では対応する部分に白い擬似カラーが反映されます。

① ビューコントローラの中の"table"チェックボックスにチェックすると、画面の下部に各数値を記したTableが表示されます。

☆各項目について

・Region: Scattergramの各Regionの番号
・Number Pixel: Pixel数
・Area: 面積
・Relative area: 全体の面積に対する各Regionの比
・Mean Intensity: 平均輝度
・Standard deviation: 標準偏差

2. Colocalization coefficients (0～1):
全ピクセルとColocalizeしているピクセルの比（各チャンネル毎に表示）

$$c_1 = \frac{pixels_{Ch1,coloc}}{pixels_{Ch1,total}} \qquad c_2 = \frac{pixels_{Ch2,coloc}}{pixels_{Ch2,total}}$$

3. Weighted colocalization coeficients (0～1):
全ピクセルの蛍光強度とColocalizeしているピクセルの蛍光強度比
（各チャンネル毎に表示）

$$M_1 = \frac{\sum_i Ch1_{i,coloc}}{\sum_i Ch1_{i,total}} \qquad M_2 = \frac{\sum_i Ch2_{i,coloc}}{\sum_i Ch2_{i,total}}$$

4. Correlation coefficient (-1～+1): Pearsonの相関係数
相関係数は-1.0≦| R | ≦1.0の値をとり、Rの絶対値が1.0に近いほど相関が強いといえます。

$$R_p = \frac{\sum_i (Ch1_i - Ch1_{aver}) * (Ch2_i - Ch2_{aver})}{\sqrt{\sum_i (Ch1_i - Ch1_{aver})^2 * \sum_i (Ch2_i - Ch2_{aver})^2}}$$

5. Overlap coefficient (0～1):
Mandersの相関関数（Manders, Verbeek and Aten, J.Microscopy 169: 375-382, 1993）
検出器の感度調整、退色など、調整による影響を受けにくい相関の取り方です。

$$r = \frac{\sum_i Ch1_i * Ch2_i}{\sqrt{\sum_i (Ch1_i)^2 * \sum_i (Ch2_i)^2}}$$

⑥ Co-localizeしていると判断した部分のみ切り出しを行う事が出来ます。
これにより、Z-stackしたサンプルの共存部位のみの3次元構築などに応用する事ができるようになります。

Colocalization Tool のなかの"Cut Mask"をクリックすると、現在マスクされている(白抜きされている部分)の画像が、別ファイルとして抽出されます。

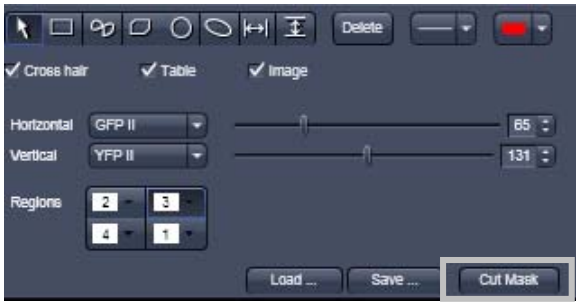


Fig. 48 Colocalization window

4. 3D

Z-stack を取得した画像では、3D 表示することが可能です。

1) 基本ボタンの設定

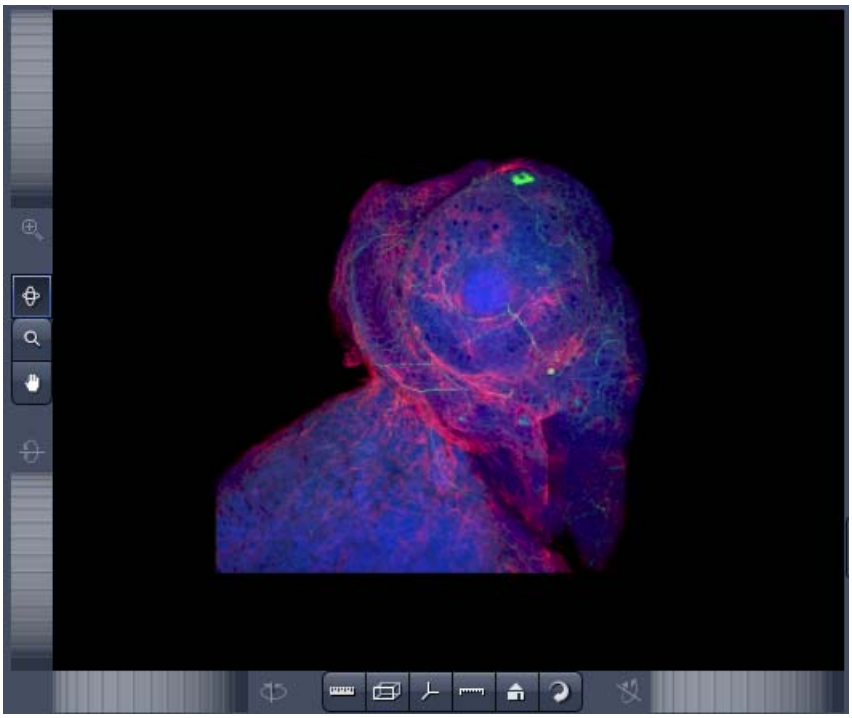


Fig. 49 3D view

表示画像の左		自由な回転表示	マウスの左ドラッグ
		画像の拡大/ 縮小	
		移動	
表示画像の下		測定機能（Option 機能）	クリックで表示/非表示の切り替え
		画像の外側にフレームを表示します	
		XYZ の軸を X:赤、Y:青、Z:緑で表示します	
		XYZ にスケールを表示します	
		ホーム画面(初期設定の方向)に戻します	
		アニメーションモード（Option 機能）	

2) 表現方法の選択(3D タブ)

ビューコントローラで、表現方法を選択できます。

Fig. 50 3D の表現方法の選択

① Shadow
影をつけることで立体的に見せる方法です。
この表現方法では、画像の回転はできません（Image VisArt plus のオプション機能がある場合にはこの限りではありません）

② Transparent
透明度をつけて重なりを表現する方法です。

③ Maximum
Maximum intensity projection です。
Z-stack を重ねた方向に見通した時、最も輝度が高いものをプロットします。

④ Surface
設定した閾値以上の輝度を持つ部分の表面構造を作成する、Surface rendering 法です。

⑤ Mixed （Image VisArt plus のオプション機能です）
チャンネル毎に表示を変更したい場合に、用います。

⑥ Precise ⇔ fast のスライダ
表現方法の質を変更するものです。Precise に近づくに従い、より細かい構造を表現しますが、計算に時間がかかることがあります。

また、Create Image をクリックすることで、現在表示されている画面をスクリーンショットして新しい.lsm (.czi) ファイルを作成できます。

3) Appearance タブ

3D タブで選択した表示に対して、Appearance で各パラメータを設定することができます。

3-1) Shadow 表示

① Transparency

表現を行う Threshold 等の設定を行います。

Fig. 51 Transparency setting

全てのチャンネルの設定を同様にしたい場合には All、各チャンネルで個別に設定したい場合にはチャンネルの選択を行い、各パラメータを設定します。

Threshold: 入力値以下をバックグラウンドとします
Ramp: 輝度の傾きを設定します
Maximum: 輝度の最も高い値を設定します

② Surface

画像構造の表面を表示する粗さを決めていきます。

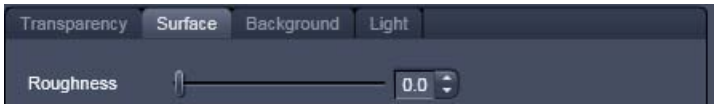


Fig. 52 Surface setting

Roughness を 0～1 の値の間で変更できます。

③ Background

3D 表示エリアのバックグラウンドの色を変更します。

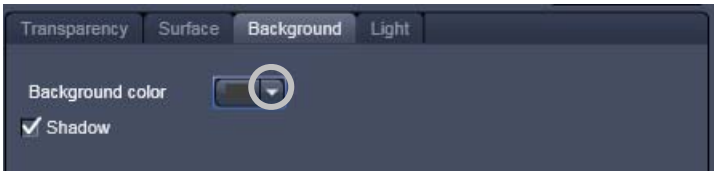


Fig. 53 Background setting

▼を押すことで、バックグラウンドの色を変えることが可能です。
また、Shadow にチェックすることで、影の表示・非表示を変更可能です。

④ Light
影をつけるための光の強度の調整を行います。

Fig. 54 Light setting

0.5～2.5 の値の間で変更可能です。 デフォルトは 1 ですが、更に強い光を当てる場合にはより大きな数値に、弱い光を当てる場合にはより小さな数値に設定します。

3-2）Transparent 表示

① Transparency
Shadow の項を参照ください。

② Background
Shadow の項を参照ください。

③ Light
Shadow の項を参照ください。

④ Special

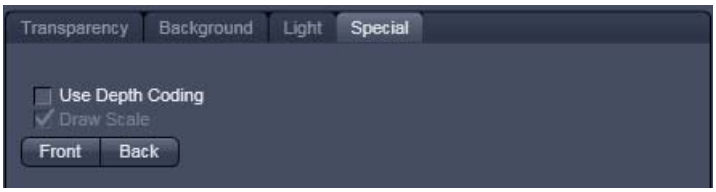


Fig. 55 Special setting (Transparent)

深さに応じた擬似カラー表示をする場合、Use Depth coding をクリックします。
Draw scale をクリックすると、深さと色を表示するカラーバーが表示されます。
Front/ Back は観察する方向を変更するボタンです。

3-3) Maximum

① Transparency

Fig. 56 Transparency (Maximum)

Maximum 表示の場合には、Threshold のみ設定可能です。

② Background

Shadow の項をご参照ください。

③ Light

Shadow の項をご参照ください。

3-4) Surface

① Surface

Fig. 57 Surface

表面構造を作成する際の、Threshold 等を設定します。

Threshold : 設定した値以上の輝度を持つボクセルの表面構造を表現します。

Ambient : 非直接的光源の設定が可能で、0~100 の間で変更できます。厚さに応じて光の当て方を変える場合(若干の影をつける場合)には、0 に近い値、マットな画像(全体が光っているような見方)にしたい場合には 100 に近づけていきます。

Specular : 光量の調整です。0~100 で変更可能です。

Shininess : 表面のツヤの変更を行います。0~100 の範囲で変更可能です。

② Background

Shadow の項をご参照下さい。

5. Time series で取得した画像の解析 (解析ソフト Physiology)

*この機能はオプションです。

カルシウムイオンのシグナル変化、フォトブリーチ後の蛍光の戻り具合などを測定するため、画像上の目的の領域を囲み、その領域の時間変化に伴う平均輝度の変化をグラフとして表すことができます。

① ビュータブの Mean ROI を選択します。
② ROI ツールを用い、任意の領域を選択すると、画像左に平均輝度変化を表すグラフが表示されます。
*画像取得中でもグラフ表示が可能ですが、場合によってはメモリに負荷がかかります。

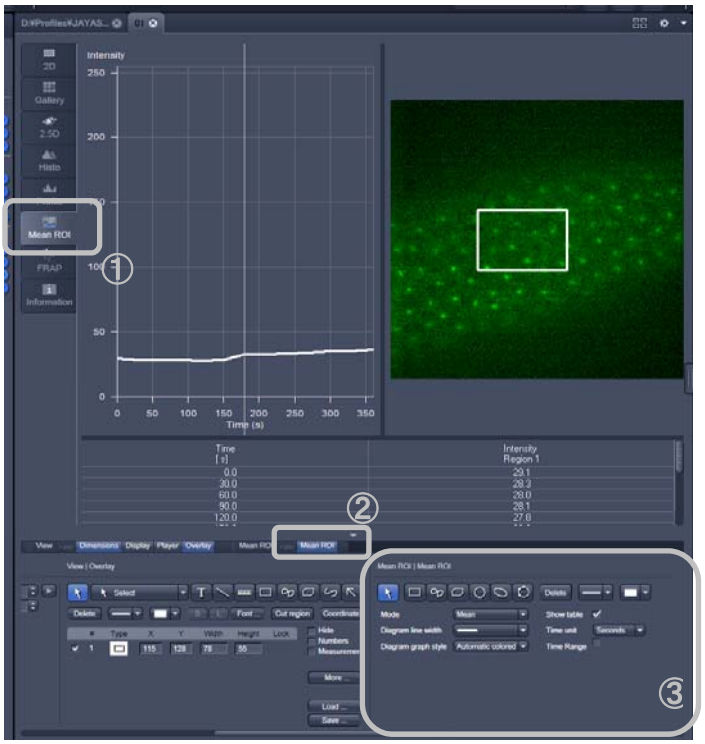


Fig. 58 Time series 解析画面

6. 解析データの保存

表示させた解析画面のスナップショットは、File → Export →Contents of Image window で保存ができます。

数値データを使用する場合は、データテーブル上で右クリックし、Save table を選択すると、タブ区切りされた txt ファイルとなります。

第3章　画像処理編

1. Maximum Intensity Projection

Z-stack の画像を重ね合わせることにより、オールインフォーカスの重ね合わせ画像を作成することが可能です。この方法を用いると、重ねる方向において最も輝度の高いピクセルが表示されます。

① Processing タブを選択します。

② Method ツールの Maximum Intensity projection を選択します。

③ Method Parameter ツールの Input Image で、重ね合わせ画像を作成したい元画像を選択します。

④ Z を選択します。

⑤ Apply をクリックして画像の作成を行います。

*Z-stack + Time series 画像の場合は、すべてのタイムポイントにおいて、重ねあわせ画像が作成されます。全体の動きを確認したい場合にお使いください。

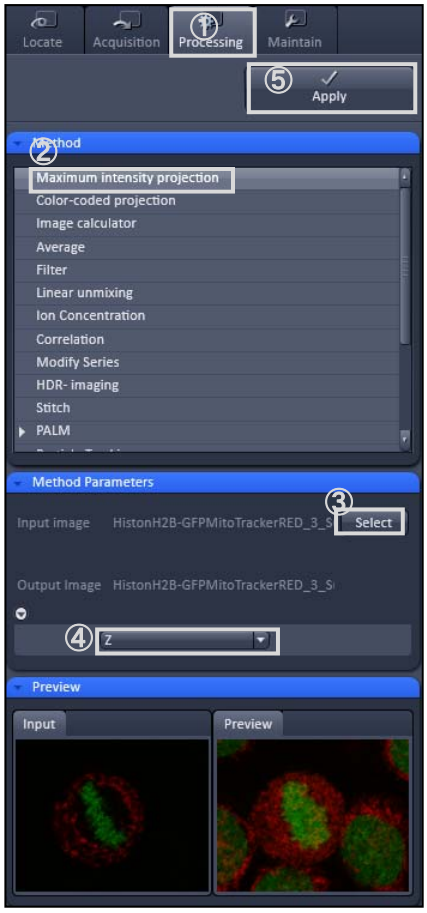


Fig. 59 Maximum intensity projection

2. Color-coded projection

Maximum Intensity Projection（1.）のように Z-stack の画像を重ね合わせ像を作成する際、シグナルの Z 位置に応じて段階的に色を変更した画像を作成できます。

① Processing タブを選択します。

② Method ツールの Color-coded projection を選択します。

③ Method Parameter ツールの Input Image で、重ね合わせ画像を作成したい元画像を選択します。

④ Z を選択します。

⑤ 色見本から使用する色を選択します。

⑥ Apply をクリックして画像の作成を行います。

***Z-stack + Time series 画像の場合は、すべてのタイムポイントにおいて、重ねあわせ画像が作成されます。**

Fig. 60 Color-coded projection

3. Image calculator

1 ないし 2 枚の画像を加減乗除し、計算を行った画像を作成できます。ここでは、代表的な 2 つの例を挙げて説明します。

1) 画像の足し算、引き算、かけ算

① Processing タブを選択します。

② Method ツールの Image calculator を選択します。

③ 演算に用いる画像をセンターエリアに表示し、Method Parameter ツールの Input Image と Input Image2 の Select をクリックして演算に用いる画像を選択します。
1 枚の画像内に複数のチャンネルを所有している場合、計算に使用するチャンネルを Channel から選択します。

④ Formula において計算式を入力します。

⑤ Preview で確認を行い、Apply をクリックして画像の作成を行います。

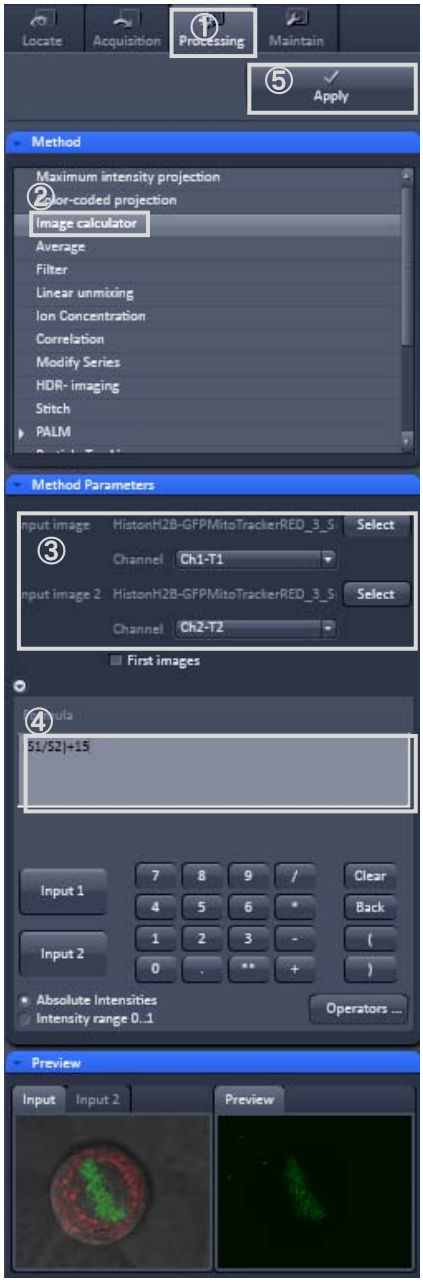


Fig. 61 Image calculator

2) 画像間のレシオ表示

2 つ以上のチャンネルを用いて、それぞれのチャンネルの輝度が変化する画像を取得した場合には、それぞれのチャンネルの画像をレシオ表示させることが可能です。
ここでは、Ca2+ Indicator の Cameleon の CFP 及び YFP の蛍光シグナルをレシオ表示する設定を例にとり、説明します。

① Processing タブを選択します。

② Method ツールの Image calculator を選択します。

③ 演算に用いる画像をセンターエリアに表示します。同じ画像内のレシオを計算表示する場合には、Input Image 1 と Input Image 2 に同じ画像を設定し、レシオを計算したいチャンネルをそれぞれ選択表示します。

例) CFP を Input image に、YFP を Input image 2 にそれぞれ設定します。

④ Formula において計算式を入力します。

一般的に、レシオ画像を作成する場合には、以下の式を使用しますが、実験に合わせて計算式を作成してください。

式 1> (Input 1 + A)/ (Input 2 + B) *C+D
○A,B は閾値、C は乗数（Bit の階調÷Ratio の変化量）を設定します。

式 2> (1- Input 1/ Input 2)*C
○C は bit 数や、Ratio の変化量に応じて設定します。

式 3> Select (Input 1>15, Input 2/ Input 1*C, 0)
○この式は、Excel の IF 関数と同様の物です。
α の条件を満たす場合 β 、満たさない場合 γ …という計算式です。Select (α, β, γ)と入力します。

上記の場合、CFP の蛍光輝度が 15 より高い場合、Input 2/ Input 1*C、15 以下の場合 0 の値を返す式です。

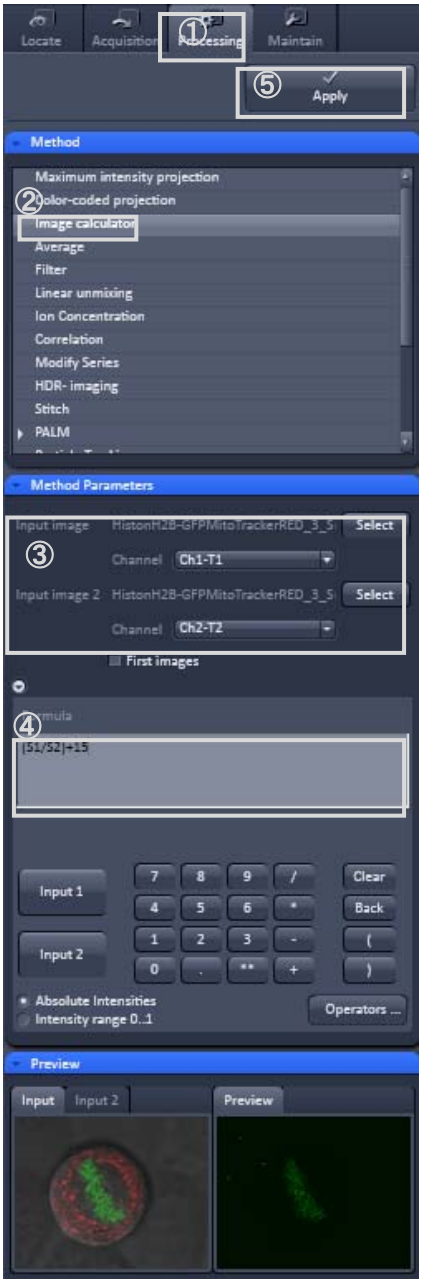


Fig. 62 Image calculator (ratio)

*A,B,C,D は取得した際の諧調（bit 数）を超えないように適宜数値を入力してください。

⑤ タイムシリーズ画像の複数枚画像の場合は、Preview 表示画面中の Dimension で Time スライダを動かすことで、各枚数目でのレシオ画像を確認することが可能です。

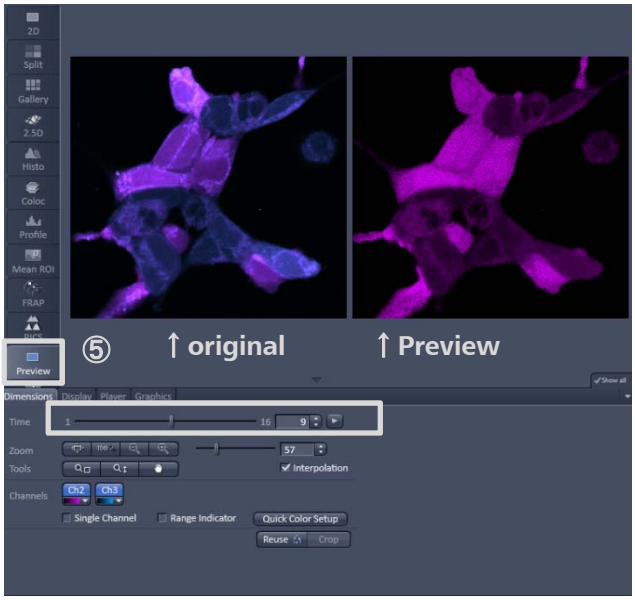


Fig. 63 Ratio の Preview 画面について

⑥ Apply をクリックします。レシオ画像が表示されます。 擬似カラーを変える場合は、Dimension のカラーパレットから選択してください。Ratio 表示には Rainbow 表示がよく使用されます。

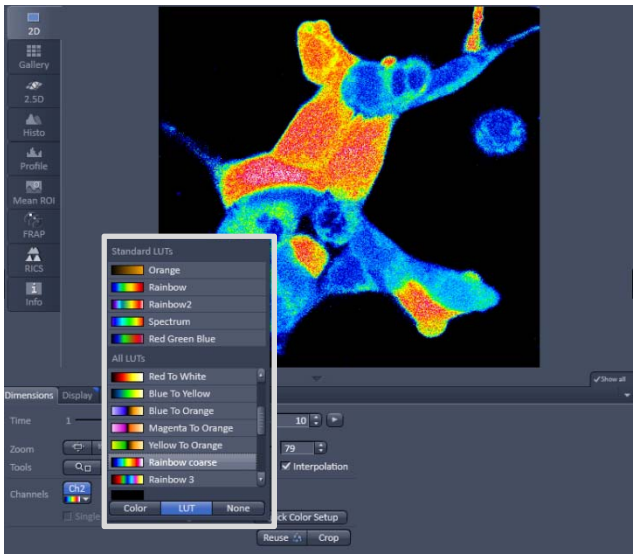


Fig. 64 Ratio の Rainbow カラー表示

⑦ 作成した Ratio 画像を、Player を用い確認してください。

⑧ Ratio 画像を元の画像に Merge させたい場合は、Copy の項目をご覧下さい。

4. Average

画像のピクセルやタイムを平均化することによって、画像容量を減らすことが可能です。

① Processing タブを選択します。

② Method ツールの Average を選択します。

③ 開いている画像に対し、Select ボタンをクリックすることで Input image に処理を行う画像を選択します。

④ ボタンを押し、設定項目を開きます。項目として X, Y, Z, Time, Channel があります。これらを設定後のピクセル及びタイムシリーズ数は、Size of result image で確認できます。

⑤ Apply をクリックして画像の作成を行います。

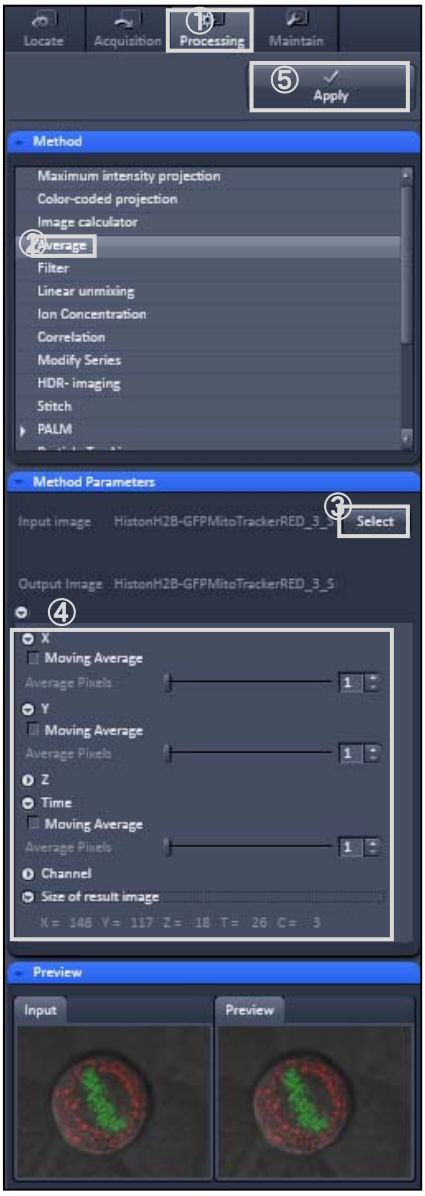


Fig. 65 Average

5. Filter

画像に代表的なフィルタリング処理をすることによって、画像の輪郭強調やぼかしなどの画像処理を行うことが可能です。

① Processing タブを選択します。

② Method ツールの Filter を選択します。

③ 開いている画像に対し、Select ボタンをクリックすることで Input image に処理を行う画像を選択します。

④ 使用するアルゴリズムを選択します。項目として Median, Smooth, Sharpen, Band, Gradient があります。

⑤ 選択したアルゴリズムで用いるパラメータの調整を行います。

⑥ Apply をクリックして画像の作成を行います。

＊各アルゴリズムの詳細につきましては、英文マニュアルをご覧ください。

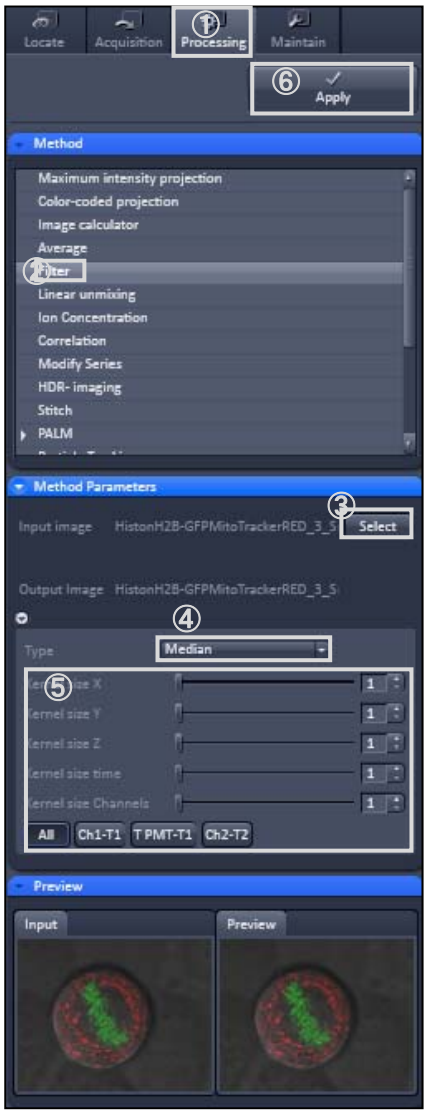


Fig. 66 Filter

6. Linear Unmixing

波長解析を行ったデータから蛍光の分離を行います。保存しているスペクトルデータから蛍光の分離を行います。この機能に関しての詳細は、ラムダモードの説明書または英文マニュアルをご覧ください。

1) ラムダモードの画像からスペクトルを取得する

① ラムダモードで取得した画像を開きます。

② 画像左側のビュータブから、Unmixingを選択します。

③ 目的位置のスペクトルを、ROIを囲むことによって取得します。

④ 画像下の タブから Save spectra databaseをクリックし、スペクトルデータを保存します。

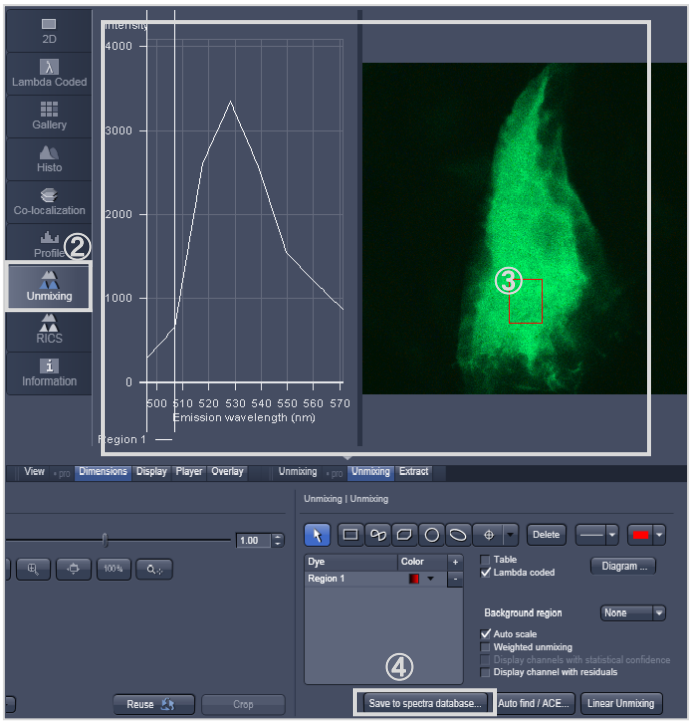


Fig. 67 Unmixing tab

2)　プロセッシングタブから、スペクトル分離を行う

① Processingタブを選択します。

② MethodツールのLinear Unmixingを選択します。

③ Unmixing処理を行う画像をSelectによって選択し、表示させます。

④ Componentsより分離をしたい蛍光の数を選択します。擬似カラーで表示されたタブをクリックすると、スペクトルデータベースの保存先が開きますので、ここから分離したい蛍光のリファレンスデータを選択し、チェックを入れます。また、分離後の蛍光の擬似カラーをリストより選択します。

⑤ 必要に応じてAuto scaleやDisplay Channel with Residualsの設定や、Backgroundより既に選択してあるリファレンスを選択し、バックグラウンドデータの設定をします（Unmixingの際にここで設定したバックグラウンドが引かれます）。

*Auto scale：計算後のチャンネルの輝度値を指定したBit数に拡張します。
*Display channel with Residuals：蛍光同士を分離するための計算をした際に、計算処理できない部分を、残差としてチャンネル作成します。（サチュレーションしたピクセルもこれに値することがあります）

⑥ Applyをクリックするとunmixingされた画像が表示されます。

Fig. 68 Linear unmixing

7. Ion Concentration (オプション)

生理学実験におけるイオン濃度の測定に用います。Fluo-3などのイオン濃度に応じて蛍光強度が変化する試薬、Ca^{2+}インジケータタンパク質のCameleonなどのレシオメトリック試薬を用いた **Time Series**画像において、蛍光強度とイオン濃度の関係を示す標準曲線を元にキャリブレーションを行います。

① **Processing** タブを選択します。

② Method ツールの Ion Concentration を選択します。

③ **Input Image** に目的の画像を選択します（③-a）。
Background を設定する場合は、**Background** となる画像を **Input Image 2** に設定し、**Background (Input 2)**にチェックを入れます。

④ サンプルに応じて、キャリブレーションの種類を選択します。

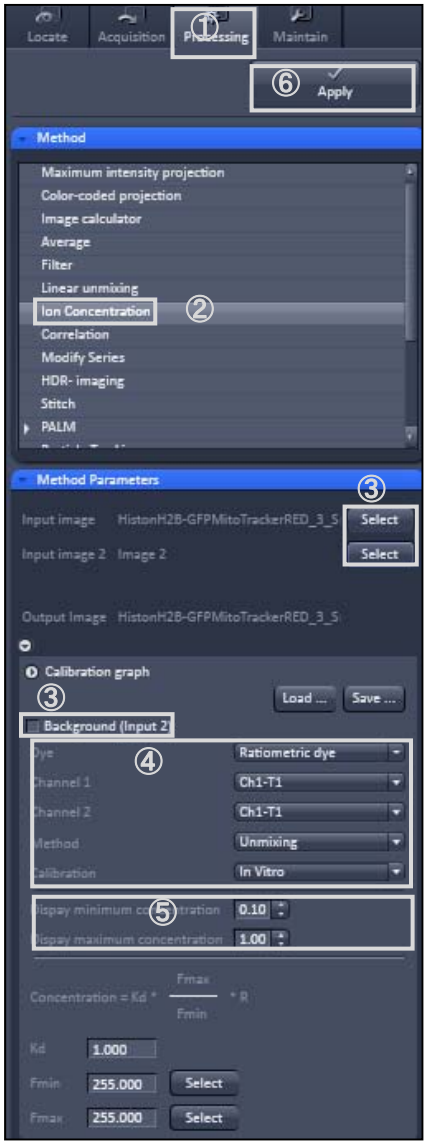


Fig. 65 Ion concentration

Dye について

- **Single wavelength dye**:
  Fluo-3, Fluo-4 などの一波長励起・一波長測定で、イオン濃度に応じて蛍光強度が変化する試薬の場合
  *退色や細胞の形状変化がある場合は、正確な濃度測定が困難になります。

- **Ratio metric dye**
  Indo-1, Cameleon などイオン濃度変化に応じて励起・蛍光スペクトルが変化する試薬の場合、**Ratio metric dye** を選択し **Channel 1** と **Channel 2** を設定します。

Method について

- **Ratio**：Ratio metric dye のみで使用できる Method です。単純に Channel 1 と Channel 2 の比率からイオン濃度の測定を行います。

- **Equation**：
  試薬に応じた式を用いて計算します。サンプル　の Kd, Fmin, Fmax　等をタイプします。

・Single wavelength dye の場合

Kd:　解離定数
F:　蛍光強度
Fmin:　イオンフリーの状態の蛍光強度（蛍光強度の最小値）
Fmax:　指示薬がイオンに結合飽和した状態の蛍光強度（蛍光強度の最高値）

Fmax 及び Fmin は、画像を表示した状態で ROI を囲み、Select ボタンを押すことでも指定が可能です。

・Ratio metric dye の場合

R:	蛍光強度比　F (Channel 1)/ F (Channel 2)
Rmin:	イオンフリー状態の R
Rmax:	イオン結合飽和状態の R
Fmin 2:	Channel 2 の最小蛍光強度
Fmax 2:	Channel 2 の最大蛍光強度

Rmin 及び Rmax は、画像を表示した状態で ROI を囲み、Select ボタンを押すことでも指定が可能です。この場合、変化前の領域指定により Rmin 及び Fmin 2 が、変化後の領域指定により Rmax の数値が設定されます。

- **Titration**：キャリブレーション用緩衝液もしくは実際の生体サンプルを用いて、イオン濃度と蛍光強度の標準曲線を作成します。Number lines でサンプル数を入力し、各イオン濃度における蛍光強度を測定し、標準曲線を作成します。

- **Unmixing**：Ratio metric dye のみで使用できる Method です。

・ Calibration graph を開くと、標準曲線が表示されます。このグラフを基にキャリブレーションを行います。
・ Kd 値は一般的には文献値を用います。

Calibration について

- **In Vitro**：溶液中など、In Vitro サンプルの測定を行う際に選択します。

- **In Situ**：培養細胞などのサンプル内で測定を行う場合に選択します。

⑤ 最小･最大濃度を設定します。
Preview 画面を見ながら、設定の確認を同時に行います。

⑥ Apply をクリックすると、キャリブレーションを行った画像が表示されます。

*作成された画像は Mean ROI 表示で濃度変化をグラフとして表示できます。
*キャリブレーションのパラメータは「.cal」という形式で、Save で保存、Load で呼び出しが可能です。

8. Modify Series

取得したシリーズ画像（Z-stack、Time series）の表示方向を変更したり、画像をつなげたりといった画像処理が可能です。大まかな流れは以下の通りです。

① Processing タブを選択します。

② Method ツールの Modify Series を選択します。

③ Method Parameters ツールの Input image、Input image 2 に、編集したいファイルを選択します。

④ Modify Series のパラメータから使用したい機能を選択します。

⑤ 条件を設定します。パラメータは機能により異なります。

⑥ Apply をクリックしてファイルを作成します。

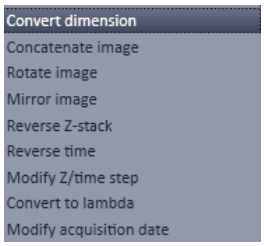


Fig. 70 modify series 基本画面

1）Convert dimension

画像の方向を変更することが可能です。Z-stack の切断面を動画として表現したり、Time series を Z-stack に変更して 1 枚に重ね合わせることで動きを表現したりします。

どの方向で変更を加えるか、選びます。

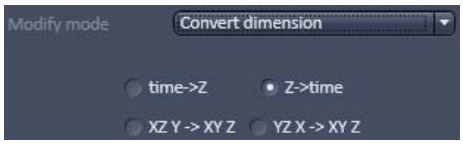


Fig.71 Convert dimension

Time to Z	: Time series の画像を Z-stack に変換します。
Z to Time	: Z-stack の画像を Time series に変換します。
XZY to XYZ	: XZ 断面の連続画像を作ります。
YZX to XYZ	: YZ 断面の連続画像を作ります。

2） Concatenate Image

複数の画像（単一もしくは連続画像）を順に接続して、連続画像に変換することが可能です。
Z 軸方向に接続するか、時間軸方向で接続するかを選択します。

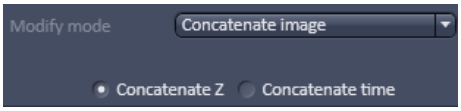


Fig. 72 concatenate image

Concatenate Z　　: Z-Stack を接続させます。
Concatenate Time　: Time Series を接続させます。

*画像ファイルは一度に 2 つ以上選択できませんので、それ以上の画像を接続する場合には、この操作を繰り返してください。

3） Rotate Image

取得し終わった画像を回転させることが可能です。

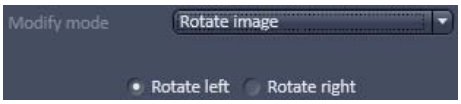


Fig. 73 Rotate image

Rotate left　　: 左時計回りに 90°回転します。
Rotate right　　: 右時計回りに 90°回転します

4） Mirror Image

取得画像の鏡像を作製できます。

Fig. 74 Mirror Image

X-Axis　　: X 軸方向を中心として反転します。
Y-Axis　　: Y 軸方向を中心として反転します。
Z-Axis　　: 深さ位置の上下を反転します。
Time-Axis : 時間軸を反転します。

5） Reverse Z-stack

Z-stack の上下方向を変えることが可能です。

Fig. 75 上下反転

6） Reverse Time

Time series の前後を変換することが可能です。

Fig. 76 時間軸の反転

7） Modify Z/ time step

Z-stack の取得間隔を、変更可能です。

Fig. 77 Modify Z/ time

New Z step　　: Z ステップのインターバルを設定します。
New time step　: 時間軸のインターバルを設定します。
*チェックを入れたパラメータのみ、入力値通り変更します。

8） Convert to Lambda

通常のマルチチャンネル画像を、Lambda の画像に変換できます

Fig. 78 Convert to Lambda

Start WL　　: 1 枚目の画像の波長を設定します。
Step　: 画像間の波長ステップを設定します。

9） Modify Acquisition data

画像取得日時の変更が可能です。

Fig. 79 Modify acquisition data

9. Stitch（オプション）

Tiling で取得した画像のつなぎ目を合わせる機能です。この機能は、第 1 章 6.タイリングで Overlap させて取得した画像に対して有効です。

① Processing タブを選択します。

② Method ツールの Stitch を選択します。

③ Method Parameters ツールの Input image に、編集したいファイルを選択します。

④ Correlation Threshold から Overlap 位置を合わせる際の画像の相同性に関して閾値を設定します。

⑤ Apply をクリックしてファイルを作成します。

Ignore Z-shift ：
3D の Tiling 画像の場合、チェックを入れると Z 側の Stitch を行いません。

Calculate topography：
3D の Tiling 画像の場合、チェックを入れることでトポグラフィ像を取得できます。(Topography オプションがある場合に有効)

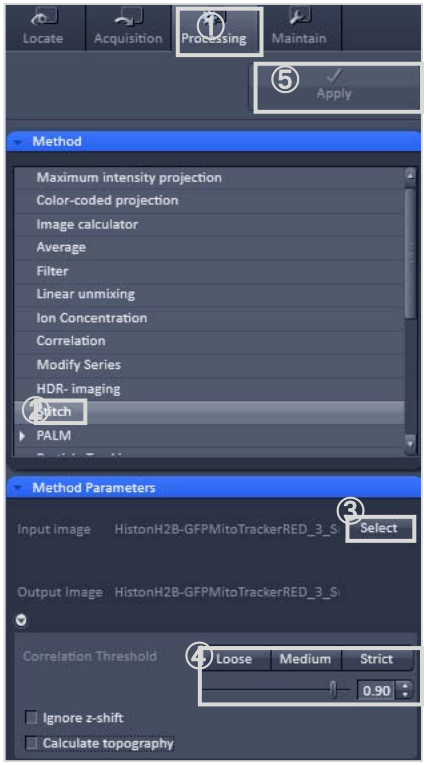


Fig. 80 Stitching

10. Copy

画像を足したり、複製したり、またシリーズ画像の一部分を抜き出したりといった処理を行う際に使用します。

Copy channel : チャンネルのコピー、抜き出し、重ね合わせを行います
Duplication : 画像の全てのチャンネルの複製を行います。
Delete Image : 画像を消去します
Subset : Z-stack もしくは Time series の一部分を抜き出すことができます。

1) Copy Channel

① Processing タブを選択します。

② Method ツールの Copy⇒Copy Channel を選択します。

③ Method Parameters ツールの Input image に、コピーしたいファイルを選択します。Channel からコピーするチャンネルを指定します。

④ 目的のチャンネルを新たな画像にして抜き出したい場合は New Image、他の画像にチャンネルを追加したい場合は Output Image を選択して New channel を選択します。
他の画像に重ね合わせたい場合は、Output Image を選択して、重ね合わせるチャンネルを選択します。

⑤ Apply をクリックしてファイルを作成します。

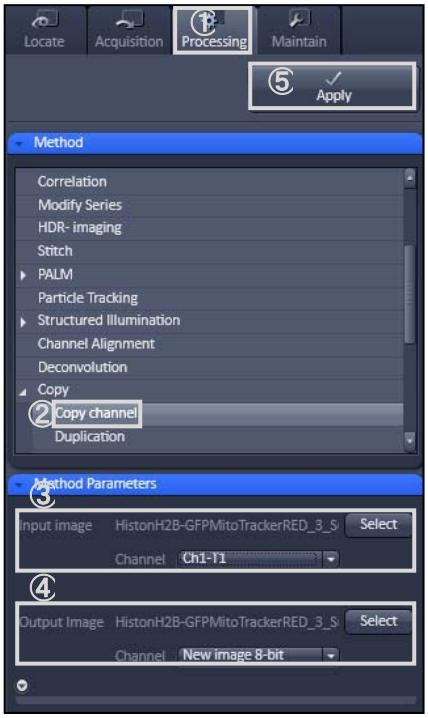


Fig. 81 copy channel

2) Duplication

Copy channel はチャンネル毎に複製を行いますが、全てのチャンネルを複製したい場合はこちらをお使いください。

① Processing タブを選択します。

② Method ツールの Copy⇒Duplication を選択します

③ Method Parameters ツールの Input image に、複製したいファイルを選択します。

④ Apply をクリックしてファイルを作成します。

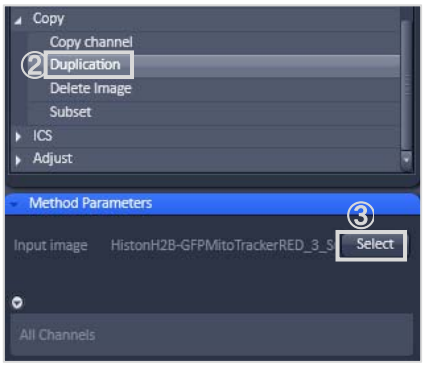


Fig. 82 画像の Duplication

3) Delete Image

ファイルから Z stack、Time Series もしくは Channel 画像の一部分を削除する機能です。

① Processing タブを選択します。

② Method ツールの Copy⇒Delete Image を選択します

③ Method Parameters ツールの Input image に、一部を削除したいファイルを選択します。

④ 削除する部分を指定します。
デフォルトの状態は、全て削除される設定になっています。各パラメータで少なくとも一枚（もしくは 1 チャンネル）は画像が残るように指定してください。

⑤ Apply をクリックしてファイルを作成します。

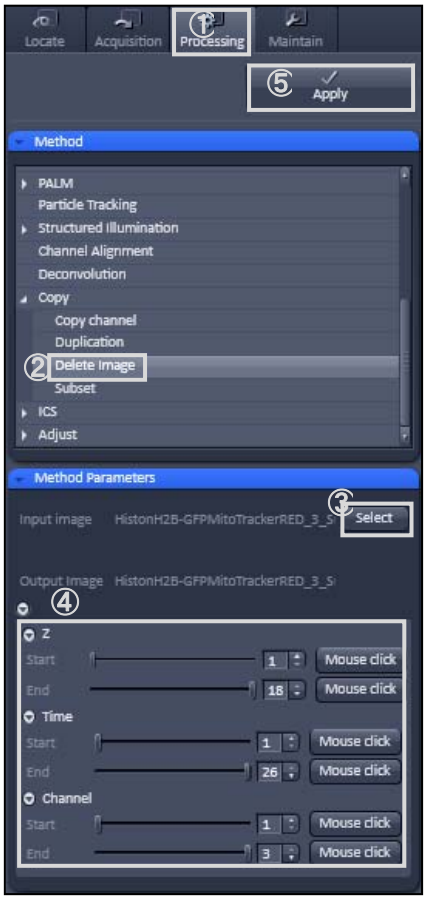


Fig. 83 画像の消去

4）Subset

ファイルの一部を切り取って新たなファイルを作成できます。XYZ と Time、Channel、Position を切り取ることが出来ます。

① Processing タブを選択します。

② Method ツールの Copy⇒Subset を選択します

③ Method Parameters ツールの Input image に、処理したいファイルを選択します。

④ 新たなファイルとして残す箇所を選択します。Z もしくは Time に関しては、画像の表示を Gallery にして Mouse click で範囲を指定すると目的の範囲を決めやすくなります。

⑤ Apply ボタンをクリックしてファイルを作成します。

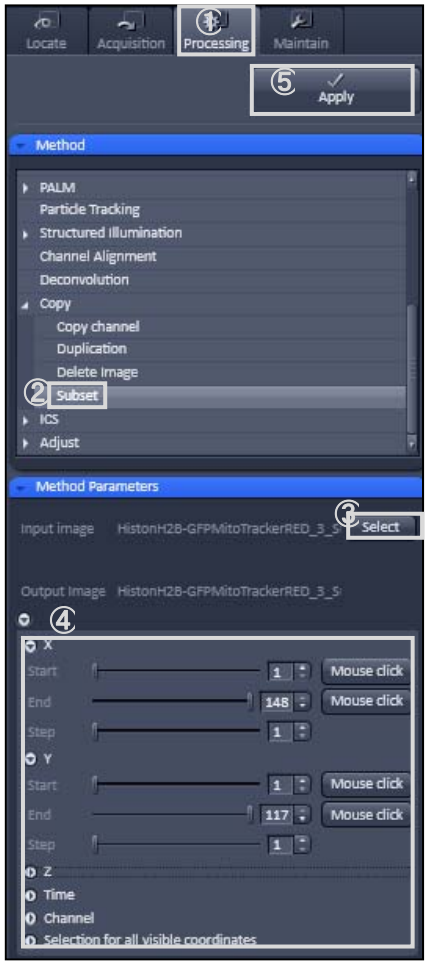


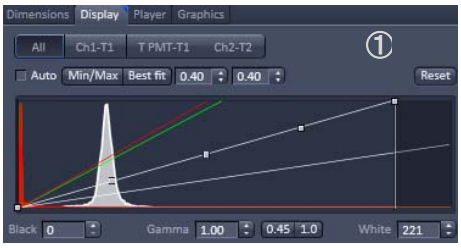
Fig. 84 Subset

11. Adjust

1) Burn in brightness and contrast

ビューコントローラの Display タブから調節した明るさやコントラストをダイナミックレンジとして、新たなファイルを作成できます。

① 画像処理を行いたい画像を開き、ビューコントローラの Display タブから画像のコントラスト、明るさを変更します。



② Processing タブを選択します。

③ Method ツールの Adjust⇒Burn in brightness and contrast を選択します。

④ 明るさやコントラストを調整したファイルを Method Parameters の Input Image で指定します。

⑤ Apply をクリックして新たなファイルを作成します。

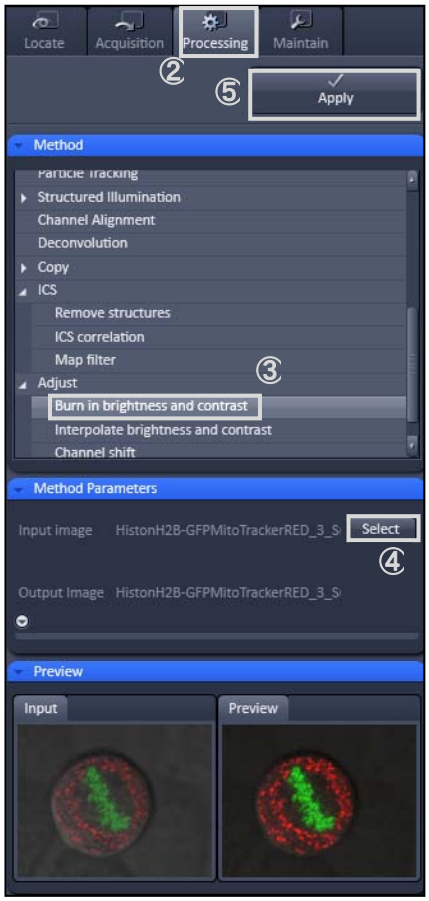


Fig. 85 Burn in brightness and contrast

2) Interpolate brightness and contrast

複数の画像を持つファイルを使用して、段階的に明るさやコントラストを変更したファイルを作成できます。厚みのあるサンプルを Z-stack で取得し、徐々に画像が暗くなってしまった場合などに有効です。ここでは、Z-stack 画像を例として説明します。

① Processing タブを選択します。

② Method ツールの Adjust ⇒ Interpolate brightness and contrast を選択します。

③ Method Parameters ツールの Input image に、複製したいファイルを選択します。

④ Coordinate で変更したいシリーズを選択します。（ここでは、Interpolate Z を選択）

⑤ 明るさとコントラストを指定する画像位置数を設定します。

⑥ 調整を行う画像位置とチャンネルを選択し、Brightness と Contrast を調整します。

⑦ 指定した各画像での Brightness と Contrast を確認します。

⑧ Apply ボタンをクリックしてファイルを作成します。

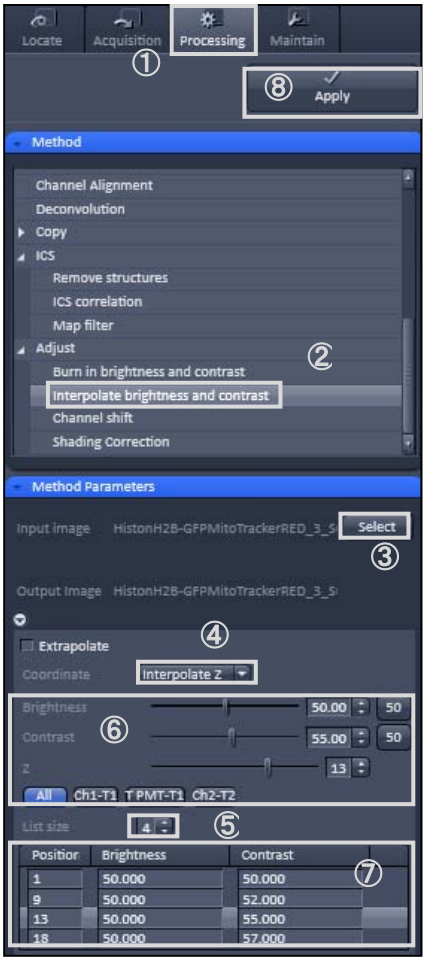


Fig. 86 Interpolate brightness and contrast

***指定したスライス間の明るさとコントラストを参考に、指定したスライス範囲外にも明るさとコントラストの勾配をつける場合は、Extrapolate にチェックを入れます。**

3) Channel shift

チャンネル間でのピクセルずれを補正したい場合に使用します。

① Processing タブを選択します。

② Method ツールの Adjust⇒Channel Shift を選択します。

③ Method Parameter ツールの Input Image に、複製したいファイルを選択します。

④ ピクセル位置を移動させたいチャンネルを選び、X もしくは Y のスライダを移動させます。

⑤ Apply をクリックしてファイルを作成します。

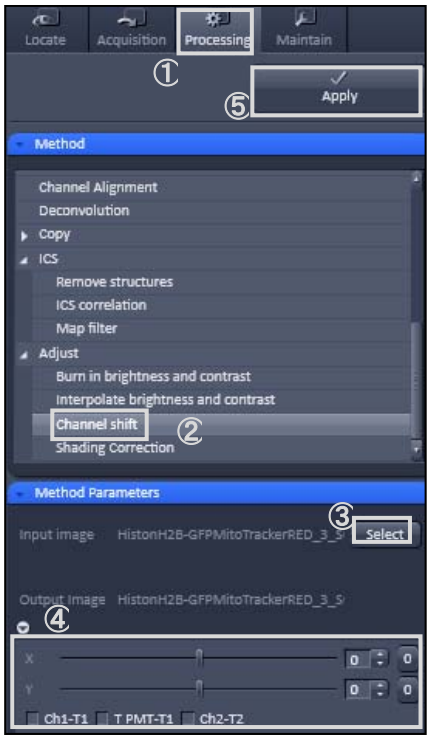


Fig. 87 Channel shift

4） Shading Correction

照明が不均一な画像のバックグラウンドレベルを補正できます。

① Processing タブを選択します。

② Method ツールの Adjust ⇒ Shading Correction を選択します。

③ Method Parameters ツールの Input Image に、補正に使用したいファイルを選択します。

④ Apply をクリックすると Input Image をバックグラウンド補正したものが新たなファイルとして表示されます。このファイルは保存して他のファイルのバックグラウンド補正に使用できます。

⑤ 既存のデータをもとに補正を行う場合、Save Generated reference image にチェックを入れ、Brower から使用するフォルダを指定してください。

⑥ Apply をクリックすると、補正後のファイルが作成されます。

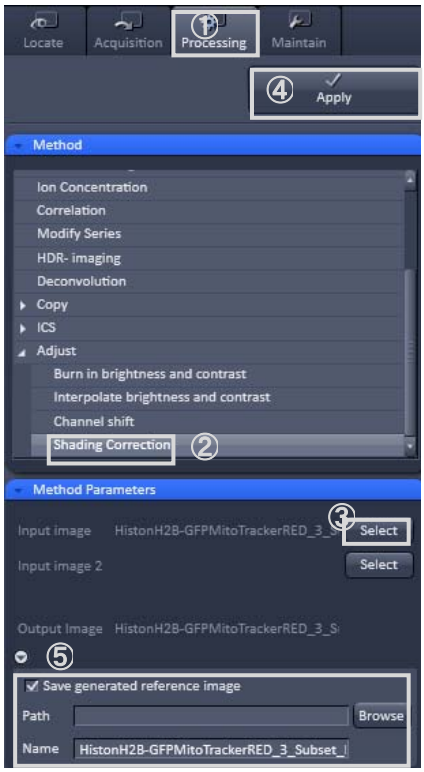


Fig. 88 shading correction