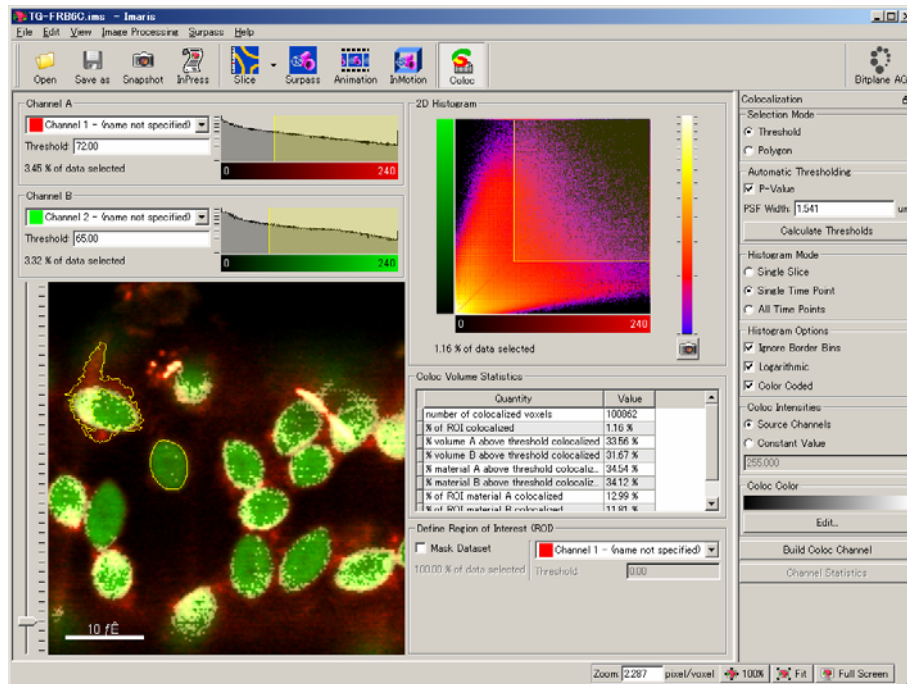


ImarisColoc

Quick Manual



1. 共局在部位の特定
2. 共局在チャンネルの作成 - Build Coloc Channel
3. 統計データの保存 - Export

1. 共局在部位の特定

Coloc は 2 チャンネル間の蛍光輝度値を基に共局在部位を特定し、数値解析を行なうツールです。また、共局在部位を新しいチャンネルとして抽出することができます。

1-1. **Channel A、Channel B** でそれぞれ処理するチャンネルを選択します。

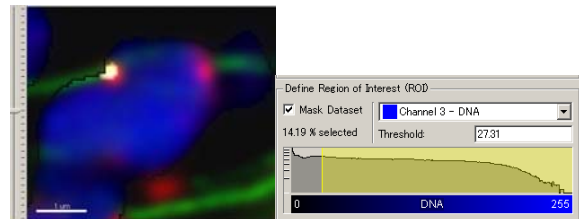
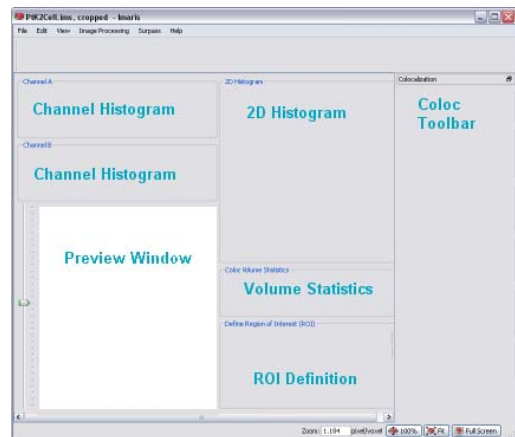
1-2. **各チャンネルのヒストグラム、2D ヒストグラム** (スキャッターグラム)、**プレビュー画面**から閾値を設定し、共局在部位を特定します。

※ 画像から閾値を設定する場合は、マウス左クリックで **Channel A** の閾値、**Shift + 左クリック**で **Channel B** の閾値を設定することができます。

※ ヒストグラムと 2D ヒストグラム、プレビュー画面の閾値設定は連動しており、共局在部位として選択された部分には画面上でマスクカラーがつけます。

※ **Define Region of Interest (ROI)**にて、特定チャンネルでマスクINGすることができます。

例) 細胞核(青)、標的タンパク質A(赤)・B(緑)の 3 チャンネル画像で、核内の A・B の共局在を解析したい場合、細胞核(青)チャンネルでマスクINGすることで核内のみの情報として解析することができます。



1-3. **Volume Statistics** に統計データが表示されます。

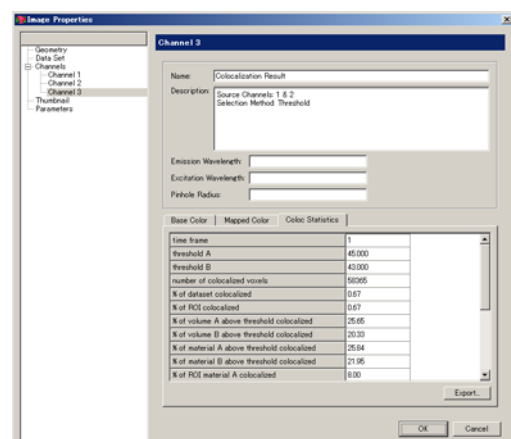
※ パラメータや計算式は **Help – Reference Manual** をご参照ください。

2. 共局在チャンネルの作成

ツールバーの **Build Coloc Channel** をクリックすると、共局在部位として特定されたボクセルを抽出し、新しいチャンネルとして作成します。

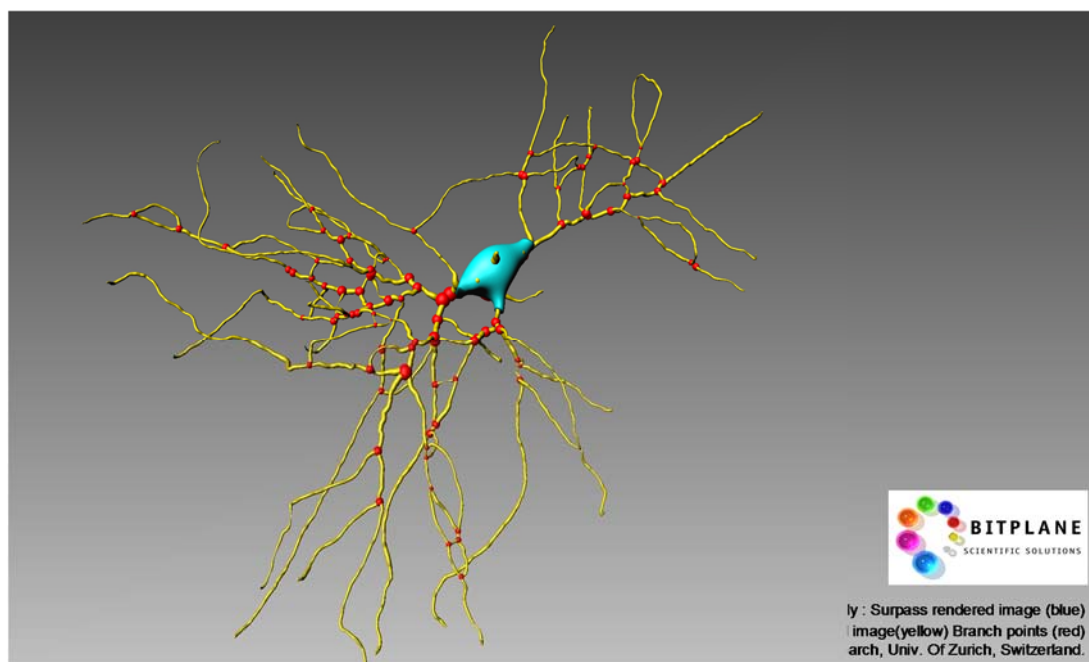
3. 統計データの保存

ツールバーの **Channel Statistics** をクリックすると、2.で作成した Coloc チャンネルのプロパティウィンドウが開きます。統計データは **CSV 形式**で **Export** することができます。



Imaris FilamentTracer

Quick Manual



1. フィラメントモデルを作成する - Draw

フィラメントのトレーシング方法には、以下の 5 種類があります。

1-1. Automatic Tracing :トレーシング操作を全て自動で行う方法。

1-2. AutoPath :フィラメントの開始地点のみ手動設定し、そこからの経路を自動トレーシングする方法。

1-3. AutoDepth :3D 画像の深さ方向を自動認識させ、半手動でトレーシングする方法。

1-4. Manual Drawing :全て手動でトレーシングする方法。

2. 設定 - Settings

3. 編集 - Edit

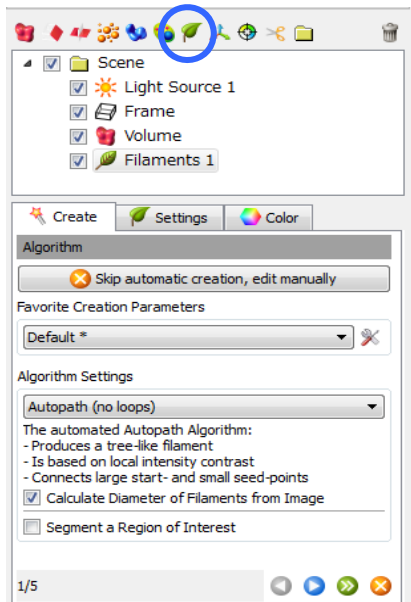
4. 測定 - Statistics

5. 擬似カラーの設定 - Color

1. フィラメントモデルを作成する - Draw

1-1. Automatic Tracing

Filament オブジェクトを選択すると、自動的に Automatic Tracing 用のウィザードがスタートします。以下 2 種類のアプローチがあります。



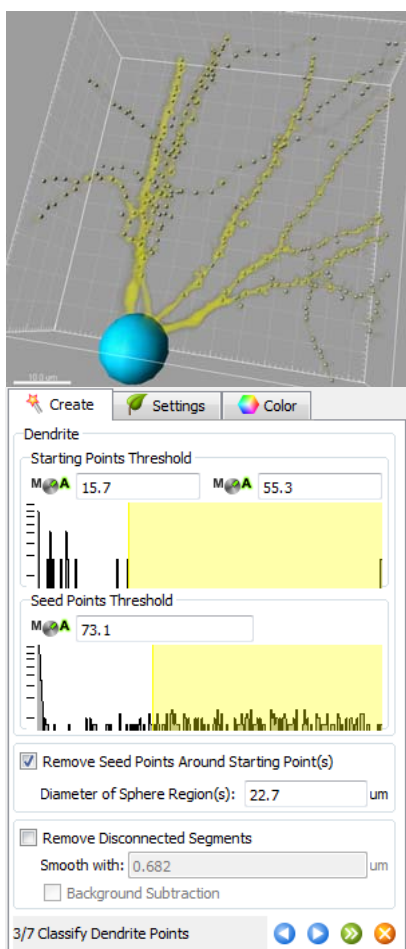
1-1-1. Autopath (no loops)

樹状のフィラメントモデルを作成します。画像中の輝度値をもとに、開始点(細胞体など)から終結点(樹状末端)へと、フィラメントを構築します。

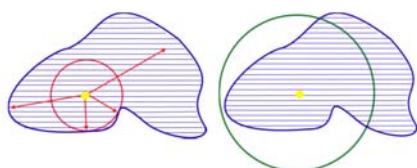
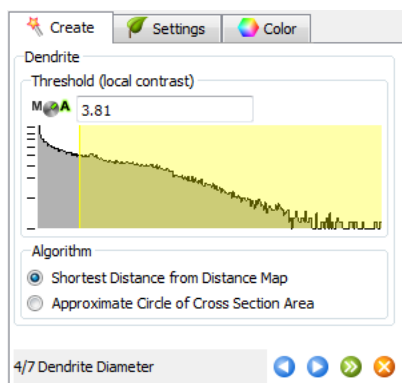
1-1-2. Threshold (loops)

ループを伴うフィラメントモデルを作成します。画像中の輝度値より閾値を定め、フィラメントを構築します。

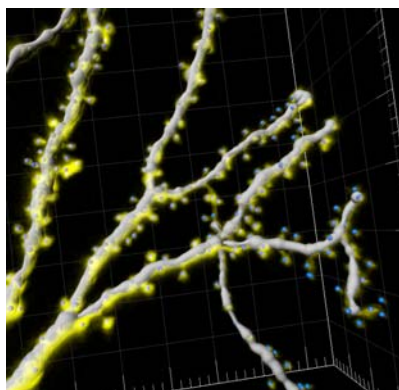
1-1-1. Autopath (no loops)



- 1) ROI の指定が必要であれば、Segment a Region of Interest にチェックを入れ、次のステップで ROI 指定します。
- 2) 処理を行うチャンネルを選択し、Starting point(フィラメントの最大直径)と Seed point(フィラメントの最小直径)のおおよその値を入力します。
- 3) 点状の仮モデルで確認しながら、Starting point(水色)と Seed point(白)の閾値をそれぞれ設定します。手動で編集を行う場合は、カーソルを Select モードにし、Starting point は Shift+右クリックで、また、Seed point は Shift+左クリックで、それぞれ追加・削除することができます。また、Starting point 付近の Seed point を削除したい場合は、Remove Seed Points Around Starting Point(s)にて、Starting pointを中心とした削除領域の直径を設定しておきます。また、Remove Disconnected Segments をアクティブにすると、指定距離以上離れた、つながっていないフィラメント断片を除去することも可能です。



Shortest Distance from Distance Map(左)
Approximate Circle of cross section area(右)



- 4) フィラメント径を設定します。サーフェースモデルのプレビューを確認しながら、閾値を設定します。フィラメント径の作成条件は、下記 2 つのアルゴリズムから選択可能です。

Shortest Distance from Distance Map :

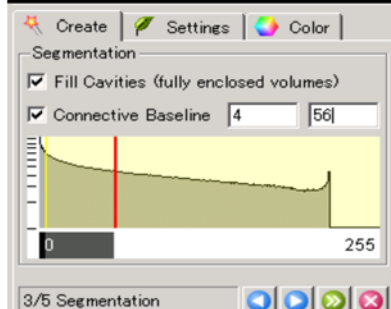
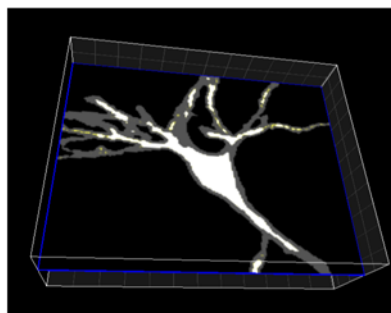
サーフェースで覆われたオブジェクトの断面のうち、Seed point からの最短距離をフィラメントの半径として計算します。円形の断面をもつサンプルや、中心軸がはっきりした画像の場合に適しています。

Approximate Circle of cross section area :

Seed point を中心として、オブジェクトの断面積に等しい面積の円の半径が適用されます。フィラメントの断面がいびつで、中心軸の位置が断面中心からずれているような場合に有効です。

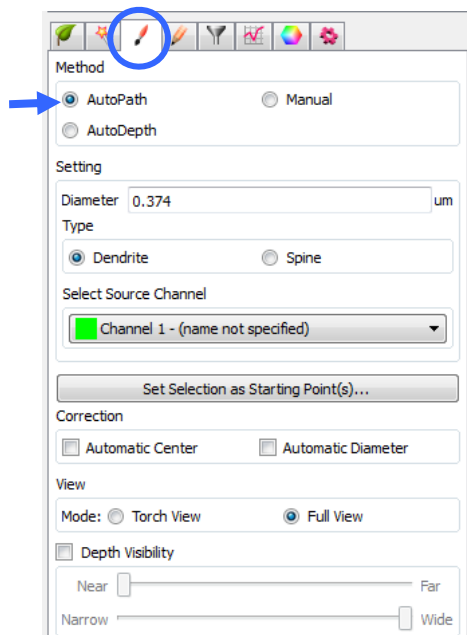
- 5) スパイン検出を行う場合は、スパインの径と最大の長さを入力します。
- 6) 2)と同様に点状モデルで確認しながら閾値を設定します。
- 7) 4)と同様にスパイン径を設定します。Finish でフィラメントモデルが作成されます。

1-1-2. Threshold (loops)



- 1) 処理を行うチャンネルを選択し、フィラメントのおおよその径を入力します。
- 2) グレー濃度値を設定し、二値化します。Z 方向につながりがあると思われるベースラインの値(灰色:右クリック)と、バックグラウンド(黒:左クリック)を設定します)
- 3) Dendrite の長さの編集を行います。任意の長さ以下の枝を除いて、フィラメントを作成することができます。
- 4) Finish でフィラメントモデルが作成されます。

1-2. Draw – Auto Path

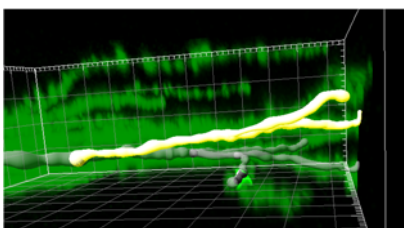
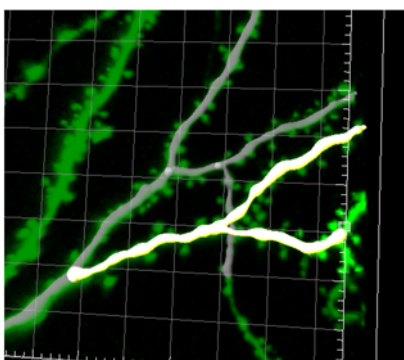


Auto Path では、手動で設定したスタート地点とポインタで指定した地点間で、最短の経路を自動検出します。

- 1) Filament オブジェクトを追加するとウィザードが開きますので、'**Skip automatic creation, edit manually**'をクリックします。
- 2) **Draw タブ**を開き **Auto Path** を選択します。
- 3) フィラメントのタイプを **Dendrite** もしくは **Spine** から選択します。
- 4) ポインタを **Select モード** (矢印) にし、**Shift+右クリック**でフィラメント作成のスタート地点を設定します。
- 5) ポインタの位置に立方体が表示されるので、マウスホイールを回してフィラメントの径と同程度に調節します。(もしくは Diameter に径を入力します。)
- 6) ポインタを動かすと(クリックせずにそのままマウスを動かしてください)、画像上でスタート地点からの最短経路を表示します。エンド地点にて **Shift + 左クリック**し、フィラメントを作成します。

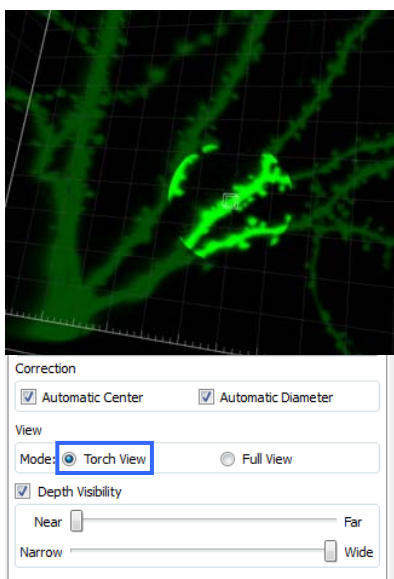
※ Correction – Automatic Diameter にチェックを入れておくと、フィラメントの直径を自動検出し、その太さでフィラメントモデルを作成します。

1-3. Draw – AutoDepth



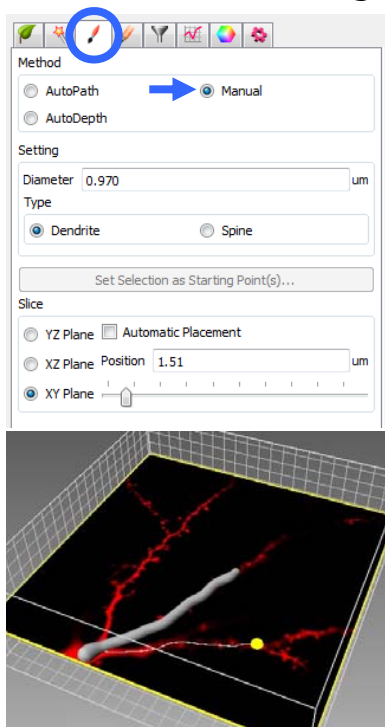
AutoDepth では、手動で 3D 画像上をトレーシングします。深さ方向の情報は自動認識されます。

- 1) Filament オブジェクトを選択すると、ウィザードが開きますので、'**Skip automatic creation, edit manually**'をクリックします。
- 2) **Draw タブ**を開き **AutoDepth** を選択します。
- 3) フィラメントのタイプを **Dendrite** もしくは **Spine** から選択します。
- 4) ポインタを **Select モード** (矢印) にすると、ポインタの位置に立方体が表示されるので、マウスホイールを回してフィラメントの径と同程度に調節します。
- 5) **Shift+左クリック**し、画像に沿ってフィラメントを描きます。トレース中は左クリックしたままドラッグしてください。(Shift はトレース中は離して構いません。)左クリックを離すと、フィラメントが終結します。3 次元の深さ方向は、最大輝度値を自動検出して、トレーシングされます。



- ※ Correction – Automatic center にチェックを入れておくと、トレースがはみ出してしまった場合も自動的にセンタリングを行います。
- ※ Correction – Automatic Diameter にチェックを入れておくと、フィラメントの輝度値から直径を自動検出し、その太さでフィラメントモデルを作成します。
- ※ View – Mode を Torch View にすると、ポインター周辺部のみがハイライトされます。
- ※ 構造が複雑な画像データの場合は、Depth Visibility にて、画像データの手前側と奥側の情報をクリッピングし、見やすくすることができます。

1-4. Draw – Manual Drawing

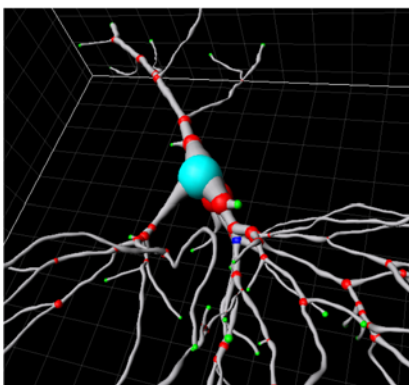
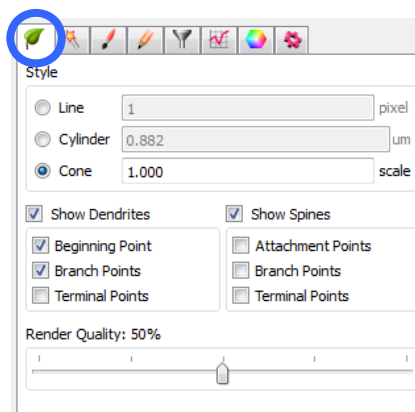


手動で XY, YZ もしくは XZ の 2D 平面上をトレースする方法です。また Z 位置も任意に設定することができます。

※ 'Automatic Placement' にチェックが入っていると、輝度によって自動で XY 平面が Z 方向に移動します。

- 1) Filament オブジェクトを選択すると、ウィザードが開きますので、'**Skip automatic creation, edit manually**' をクリックします。
- 2) **Draw** タブを開き **Manual** を選択します。
- 3) フィラメントのタイプを **Dendrite** もしくは **Spine** から選択します。
- 4) ポインターを **Select モード** (矢印) にし、**Shift** キーを押さえます。
- 5) ポインターの位置に立方体が表示されるので、マウスホイールを回してフィラメントの径と同じくらいに調節します。(もしくは径を入力します。)
- 6) 画像に沿って **Shift+左ドラッグ** し、フィラメントを描きます。トレース中は **Shift+左クリック** したままドラッグしてください。Shift もしくは左クリックを離すと、フィラメントが終了します。Shift+右クリックで XY, XZ, YZ Plane を選択できます。
- 6) トレーシング中に使用した立方体の径でフィラメントが作成されますので、必要に応じて **Edit** タブでフィラメントのセンタリングや径の再設定を行います。(後述)

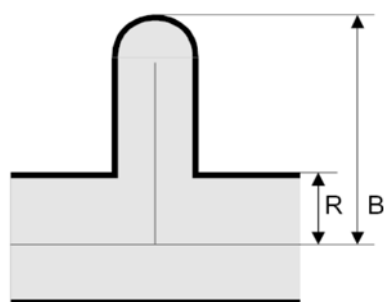
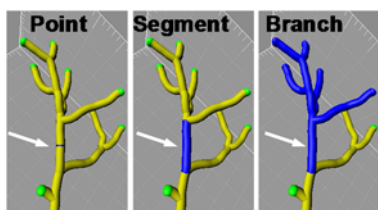
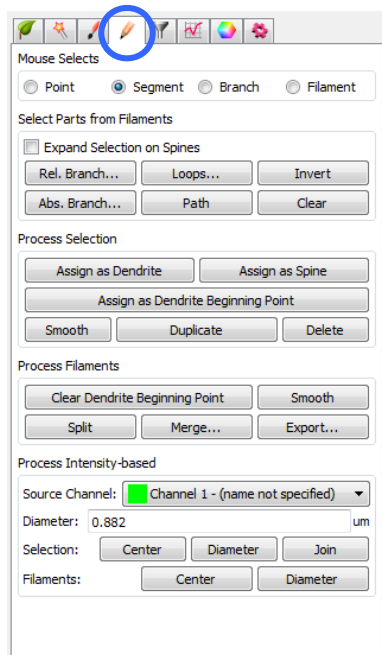
2. 設定 - Settings



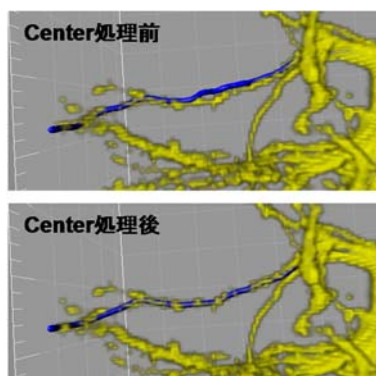
Settings タブでは、描いたフィラメントモデルの表示形状をライン状やシリンダー状、あるいは検出された直径に応じたコーン状に変更したり、表示上の太さを変更したりすることができます。

また、分岐点(赤)や末端(緑)、始点(水色)などのマーカーを挿入することができます。

3. 編集 - Edit



Ratio of Branch length(B) to Trunk radius(R)



Edit タブでは、描いたフィラメントモデルを編集することができます。

- 1) ポインターを **Select モード**(矢印)にします。
- 2) **point**(一断片)、**Segment**(一節)、**Branch**(一枝)、**Filament**(一構造)より選択し、フィラメントの任意箇所をクリックすると、対応する断片や枝がハイライト表示されます。
- 3) **Select Parts from Filament** では、フィラメント全体から任意のものを複数選択することができます。

Rel.Branch: (枝の長さ/幹の半径)の比が、設定した長さより短いものを選択します。

Loops: ループを形成している箇所を選択します。

Invert: 選択した部分以外を選択(ハイライト表示)します。

Abs.Branch: 任意の長さよりも短いフィラメントを選択します。

Path: Ctrlキー+左クリックで任意の2点を選択し、Path をクリックすると、2点間の最短経路を示します。

Clear: ハイライト表示をクリアします。

- 4) **Process Selection** では選択部分に対して、また **Process Filaments** ではフィラメント全体に対して任意の処理を行います。

Assign as ...: ...の構造物として特定します。

Smooth: スムージングを行います。

Duplicate: 選択した構造物を、フィラメントモデルとして複製します。

Delete: 選択した箇所を消去します。

Split: 連結していないフィラメント同士を、別々のオブジェクトとして分割します。分割されたオブジェクトは、個別に擬似カラーや形状を設定することができます。

Merge: 複数のフィラメントオブジェクトを一つのオブジェクトにまとめます。

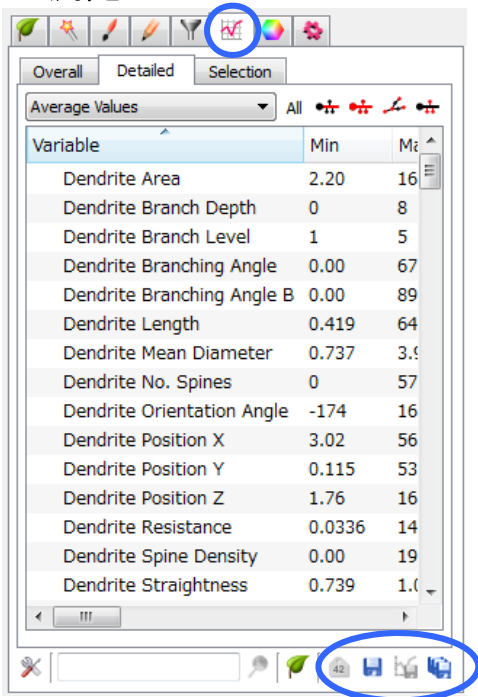
Export: Neuron Files(*.hoc)形式で保存します。

Center: 手動で描いてはみ出した線を、輝度の中心にフィットさせます。

Diameter: 径の太さを再計算します。手動でフィラメントを描いたときなどに使用します。

Join: Ctrlキー+左クリックで任意の2点を選択し、Join をクリックすると、2点間をつなぐようにフィラメントを作成します。

4. 測定 - Statistics



Statistics では、作成したフィラメントオブジェクトより計測した数値データを示します。

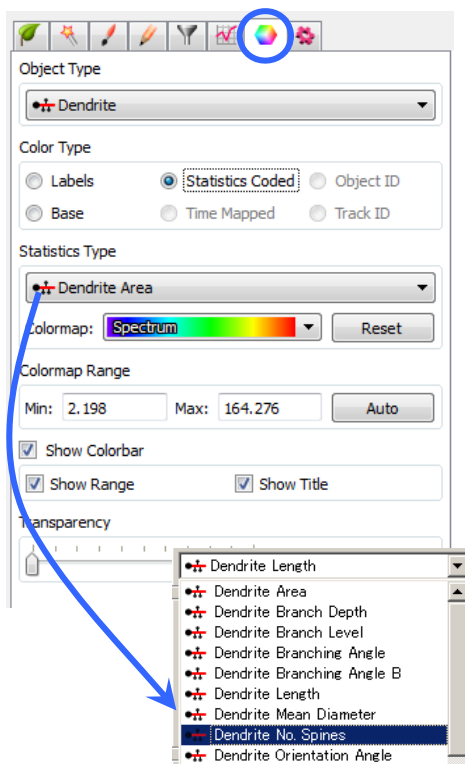
Overall ではフィラメントオブジェクト全体の情報、Detailed では選択したパラメータの情報、Selection ではフィラメントオブジェクト内で選択した部分の統計値を表示します。

- Area** : 表面積
- Branching angle** : 分岐角度 (主軸からの角度)
- Branching pts** : 分岐数
- length** : 長さ
- mean diameter** : 平均直径
- orientation angle** : 開始点の角度
- straightness** : 直線性
- Terminal Pts** : 先端の数
- volume** : 体積

※ その他パラメータの詳細に関しては、Help - Reference Manual をご参照ください。

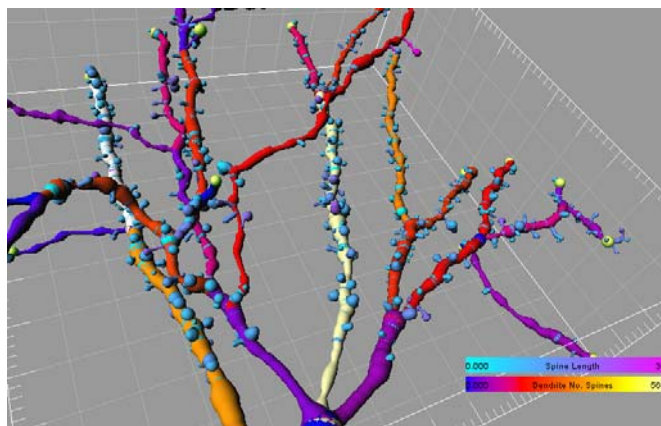
各統計値は、CSV 形式、または Excel 形式で保存することができます。

5. 擬似カラーの設定 - Color



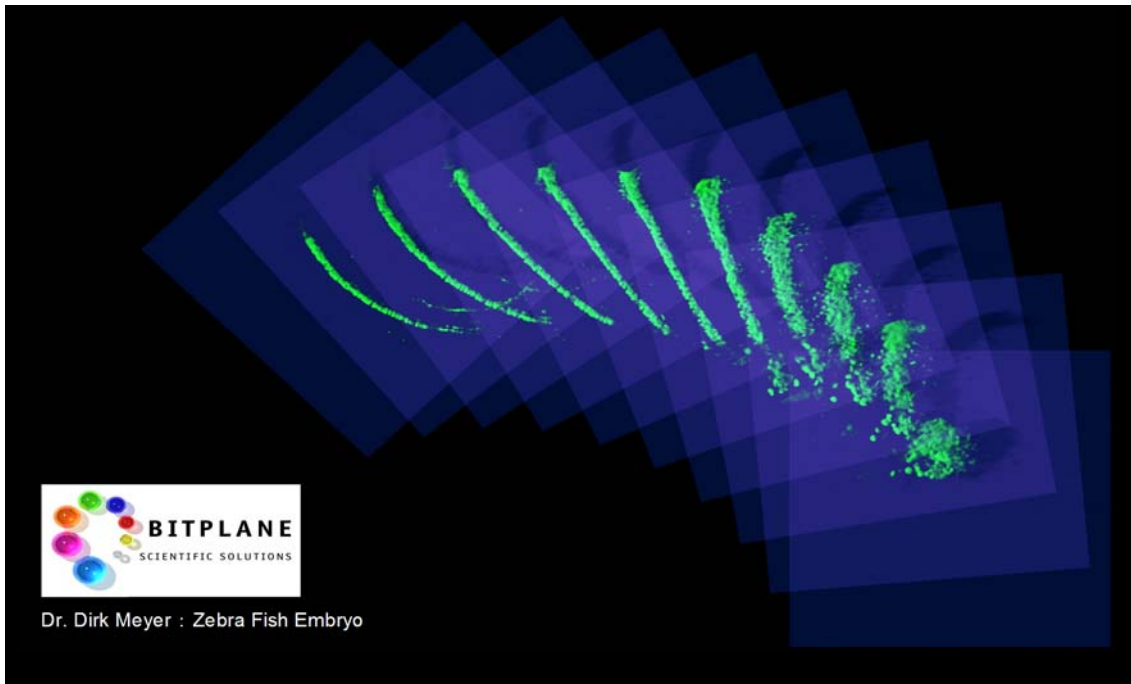
フィラメントモデルの擬似カラーを設定します。

- 1) **Object Type** にて Dendrite、Spine、分岐点などオブジェクトを選択し、それぞれに設定することができます。
- Transparency** では透明度を変えることができます。
- 2) また **Color Type** で **Statistics Coded** を選択すると各パラメータの統計値で色分けすることができます。



ImarisTrack

Quick Manual



1. オブジェクトの種類を選択する - Spots / Surface Object
2. トラッキング処理
 - 2-1. Automatic Tracking
 - 2-2. Create Track from Selection
 - 2-3. Manual Tracking
3. 編集 - Settings / Edit / Edit Tracks
4. 統計値の解析 - Statistics

1. オブジェクトの種類を選択する

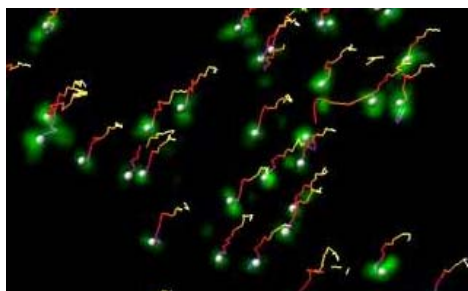
画像の蛍光輝度値をもとに閾値を設定し、トラッキングしたいオブジェクトを作成します。

トラッキング用のオブジェクトは、以下の 2 種類があります。

点状モデルでトラッキングしたい場合は...



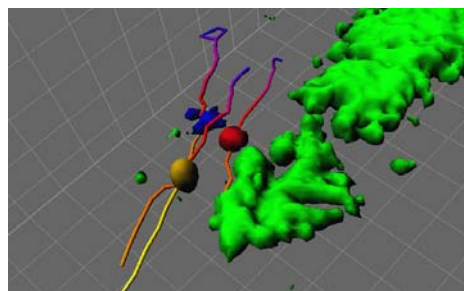
Spot オブジェクト



形状を保ってトラッキングしたい場合は...



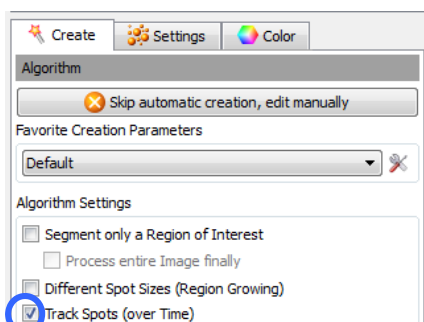
Surface オブジェクト



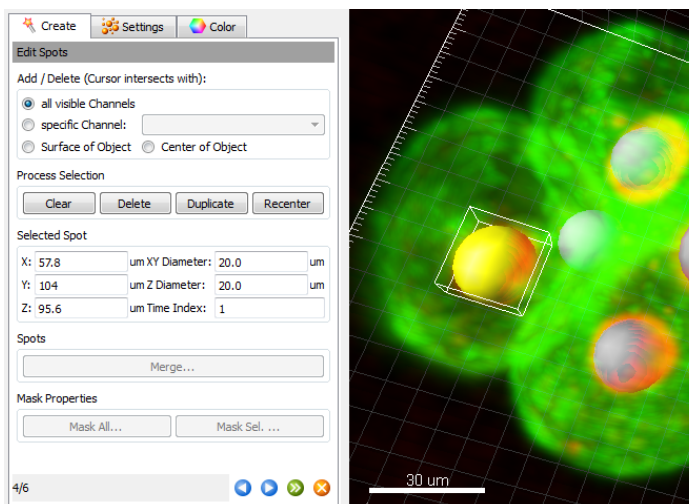
2. トラッキング処理

2-1. Automatic Tracking

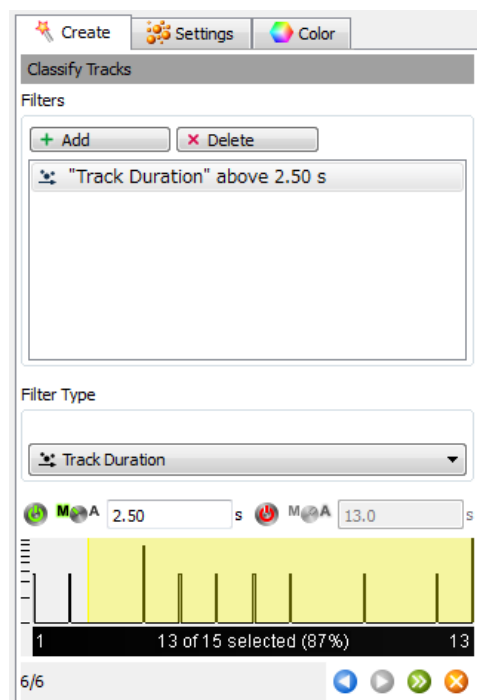
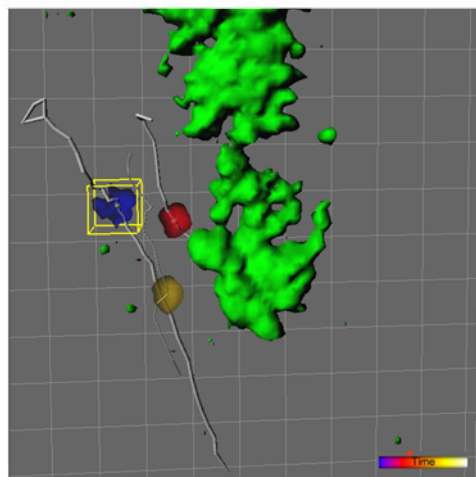
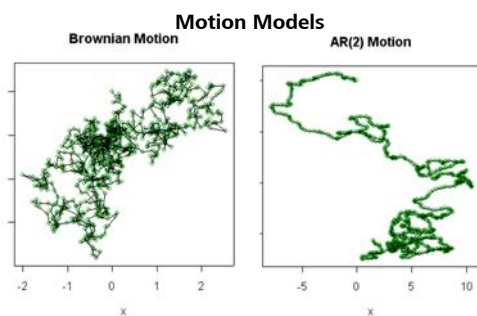
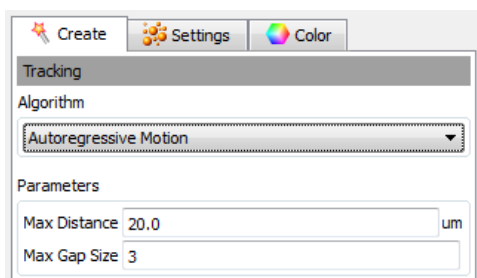
- 1) Spots 及び Surface を作成するウィザードの最初のステップにおいて Track Spots (over Time) (もしくは Track Surfaces (over Time)) にチェックを入れます。



- 2) ウィザードに従い、オブジェクトを作成します。タイムバーを動かし、各タイムポイントで測定対象のオブジェクトが作成されているかどうか、確認しながら次の工程に進みます。
- 3) 閾値設定でオブジェクトを抽出できなかった場合は、ウィザードの Edit 工程において手動でオブジェクトを追加・削除することができます。



左図: Spot Track の Edit 工程。ポインターを **Select** モード(矢印)にし、測定対象上で **Shift + 左クリック** することでスポットを追加・削除することができます。また、**Recenter** ボタンで輝度中心にセンタリングすることができます。



4) トラッキングのアルゴリズムを選択します。

5 種類のモーションモデルがあります。

Brownian Motion: ブラウン運動していると想定されるオブジェクトに適しています。

Autoregressive Motion: オブジェクトの時系列的な動きから、移動する方向や速度を予測してトラッキングを行いません。

Autoregressive Motion Expert: オブジェクトの移動方向・速度だけでなく、輝度情報も利用してトラッキングを行います。

Connected Components: 複数のオブジェクトが融合・乖離する場合に適しています。タイムポイント間でオーバーラップがあるオブジェクトをトラッキングします。

Lineage: 細胞分裂に特化した、オブジェクトの分裂・融合を解析します。Autoregressive motion のアルゴリズムを採用しています。

5) タイムバーを動かし、オブジェクトが各タイムポイント間で最大どのくらいの距離を移動するか、確認しておきます。

※ 【Frame】で Grid 表示にしておくと、距離を測りやすくなります。

Max Distance: タイムポイント 2 点間で移動すると想定される最大距離を指定します

Max Gap Size: タイムラプス中にオブジェクトが画像取得範囲の内外に移動することで出現・消失する場合、また輝度の強弱により検出できないタイムポイントがあった場合、Max Gap Size を設定することで 1 つのトラックオブジェクトとして検出することができます。

6) 移動距離、速度などでオブジェクトを分別処理する場合は、Filters にてフィルタリングすることができます。

7) **Finish** をクリックすると、自動トラッキング処理を終了します。

2-2. Create Track from Selection (Spots オブジェクトのみ)

選択した特定のオブジェクトのみトラッキングを行います。Spots オブジェクトのみ有効です。

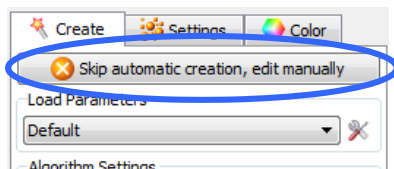
- 1) 2-1-1) にて、**Skip automatic creation, edit manually** をクリックし、ウィザードを終了します。すると自動的に Edit タブが開きます。
- 2) ポインターを **Select** モード(矢印)に切り替え、タイムバーをトラッキングの最初のタイムポイントに合わせます。
- 3) トラッキングしたいオブジェクト上で **Shift+左クリック** し、Spots オブジェクトを追加します。
- 4) **Create Track from Selection...** をクリックし、検出する Spot の直径やアルゴリズム、条件を設定します。(アルゴリズムや条件に関しては 3 ページをご参照ください。)
- 5) **OK** をクリックすると、自動的にトラッキングを行います。



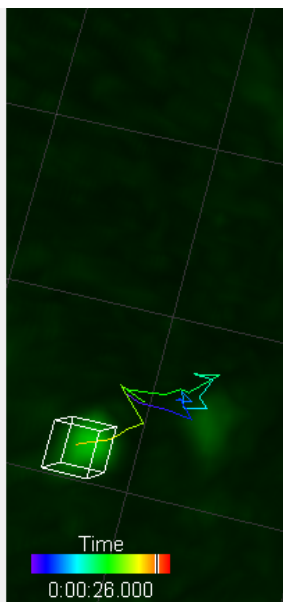
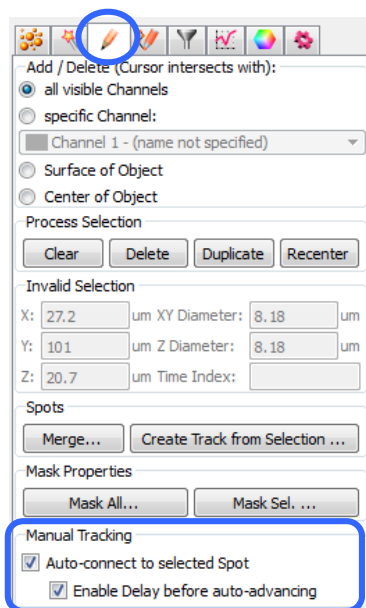
2-3. Manual Tracking

手動で一つのオブジェクトに対し、トラッキングを行う方法です。

- 1) 2-1-1) にて、**Skip automatic creation, edit manually** をクリックします。



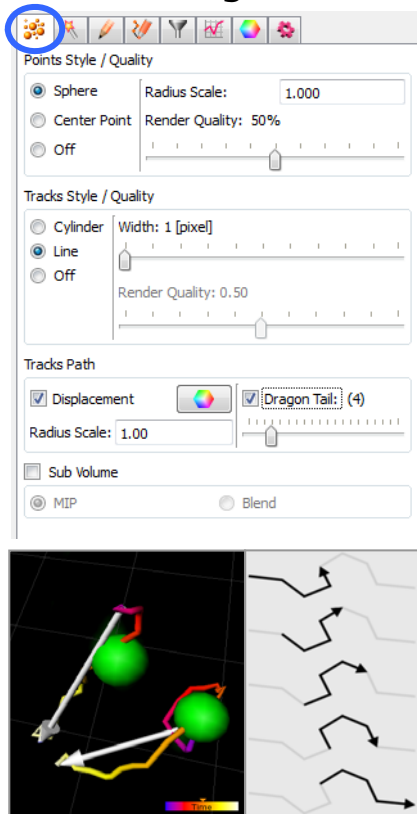
- 2) Edit タブ- Manual Tracking にて、**Auto-connect to selected Spot** (もしくは **Auto-connect to selected Surface**) にチェックを入れます。
- 3) ポインターを **Select** モード(矢印)に切り替え、タイムバーをトラッキングの最初のタイムポイントに合わせます。
- 4) トラッキングしたいオブジェクトのサイズに合わせて、ポインターのキューブサイズをマウスホイールで調節します。オブジェクト上で **Shift + 左クリック** して Spots(または Surface) オブジェクトを追加します。自動的に次のタイムポイントの画像に切り替わりますので、同様にして各タイムポイントでオブジェクトを追加し、軌跡を描いていきます。



※ すでにオブジェクトが作成された状態から Manual Tracking を行う場合は、**左クリックのみ**でオブジェクトを選択してください。

※ Enable Delay before auto-advancing にチェックを入れると、オブジェクトを追加後、次のタイムポイントに切り替わるまでの時間を 0.05~5 秒間空けることができます。この Delay の間に、追加したオブジェクトの修正を行うことができます。Delay 時間は、Edit メニュー – Preference – Surpass にて設定可能です。

3. 編集 - Settings / Edit / Edit Tracks



Displacement 表示(左)と Dragon Tail 表示(右)

3-1. **Settings**タブにおいて、オブジェクトの表示設定を行います。

Spots (Surfaces) Style / Quality

オブジェクト形状の選択、表示のOn/Offを設定します。

Tracks Style / Quality

トラッキング経路の形状をライン状やシリンダー状に変更することができます。

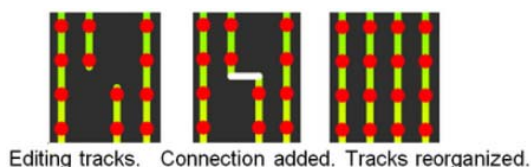
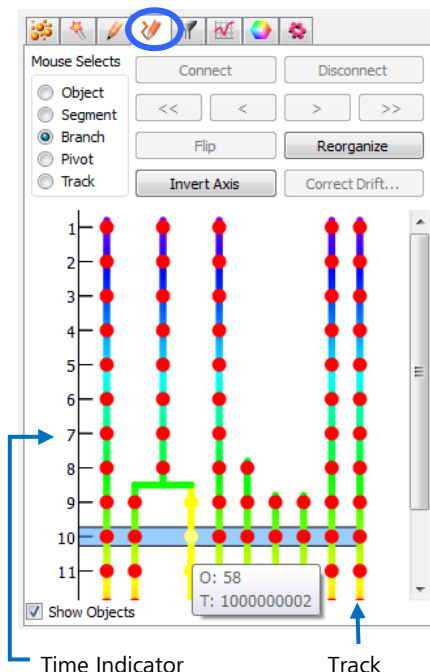
Tracks Path

経路の表示を変更することができます。

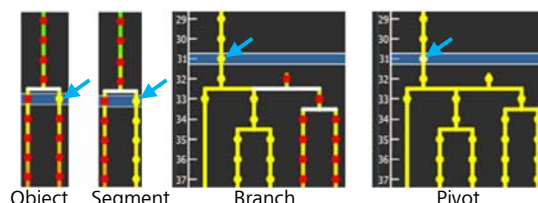
Displacement: トラッキングのスタート-エンドポイント間でオブジェクトの移動方向を矢印で表示します。

Dragon Tail: 動画表示の際、軌跡に合わせてパスが尾を引く表示方法です。

3-2. **Edit Tracks**タブにおいて、手動でトラッキングの接続関係を編集することができます。

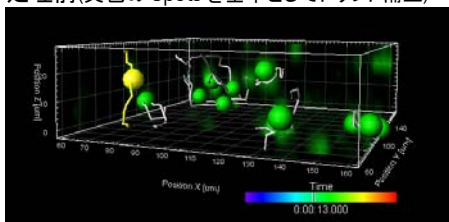


- 1) Edit Tracksタブより、Trackエディターを開きます。
Mouse selects - Objectを選択します。ポインタを**Select**モード(矢印)にし、タイムバーを動かして修正が必要なオブジェクトを選択します。
- 2) オブジェクトの結合を編集する場合は、その前後のタイムポイントにおいて**Ctrl + 左クリック**でオブジェクトを選択し、**Connect**をクリックします。乖離を編集する場合は、同様にオブジェクトを選択して**Disconnect**をクリックします。
- 3) 編集後は、**Reorganize**で系統樹を整列させることができます。また、**<<**, **<**, **>**, **>>**でトラックの表示順を入れ替えることができます。(Track IDは変わりません)

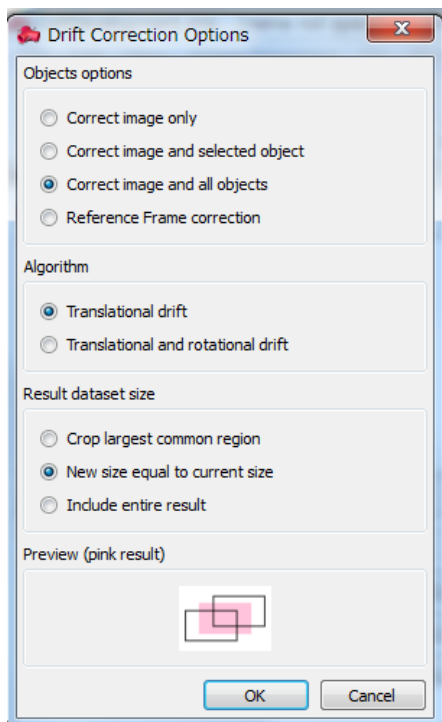
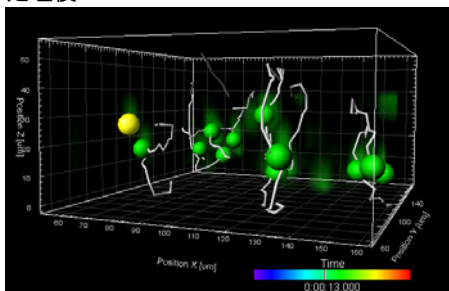


3-3. Correct Drift では、画像取得中のフォーカスずれなどによるドリフトを補正します。

処理前(黄色の Spots を基準としてドリフト補正)




処理後



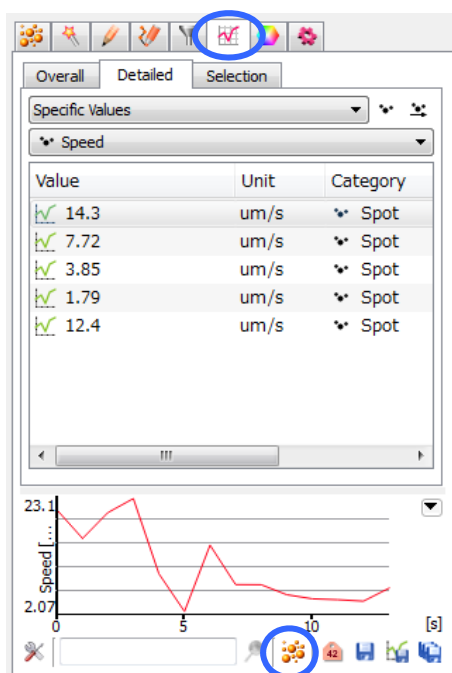
- 1) **Edit Tracks** タブを開き、**Mouse selects - Track** を選択します。
- 2) ポインターを **Select** モード(矢印)にし、Mouse selects は **Track** を選択した状態で、基準となるトラックオブジェクト(実際には動いていないはずのオブジェクト: 左図では黄色スポット)を選択します。
- 3) **Correct Drift** をクリックし、パラメータを選択します。OK をクリックすると、そのオブジェクトが移動しないように周囲のイメージがシフトし、ドリフトを補正します。

※ Objects options にて、**Correct image and selected object** を選択した場合は、Statistics で算出される数値データも自動的に補正後のものに更新されます。また、**Correct image and all objects** を選択した場合は、現在のオブジェクトだけでなく、オブジェクトリスト上で追加されている他のオブジェクトの数値データも更新されます。

※ Reference Frame オブジェクト  は、胚発生の解析の際など、タイムシリーズ中にオブジェクト全体が回転またはシフトする場合に、それらの位置あわせ(アライメント)を行うためのオブジェクトです。**Reference Frame correction** を選択した場合、数値データは元画像における値と Reference Frame で補正した値の両方が算出されます。

※ Reference Frame オブジェクトは手動で追加し、座標や方向の編集が可能です。詳しくは Help - Reference manual をご参照ください。

4. 統計値の解析 - Statistics



Statistics では体積、移動距離、移動速度などの計測結果が表示されます。**Excel** や **CSV** 形式のファイルとして保存することができます。

Overall ではトラックオブジェクト全体の情報、**Detailed** では表示されているタイムポイントにおける選択したパラメータの情報、**Selection** では画像中で選択したオブジェクトに対応した情報がそれぞれ表示されます。

※ パラメータの詳細に関しては、**Help – Reference Manual** をご参照ください。

特定のトラックオブジェクトを画像中もしくは **Statistics** 表の数値データから選択し、**Duplicate Selection to new Spots (Surfaces)** をクリックすると、選択したオブジェクトのみを複製して抽出することができます。