

cellSens Dimension ソフトウェア

カウントアンドメジャー・

フルオプション

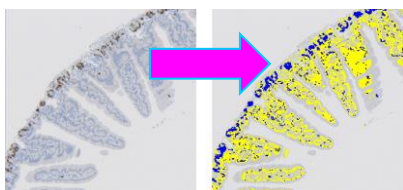
## 基本操作

### 画像解析の手順

1. しきい値を設定する
2. カウントを実行する
3. 結果を見る

#### 1. しきい値を設定する

しきい値を設定することで、目的の細胞のカウントや複数部位の比較ができます。



しきい値の設定方法には次の4通りがあります。

- 自動しきい値
- 手動 HSV しきい値  
→ 色相、彩度、輝度に対してしきい値を設定（カラー画像向け）
- 手動しきい値  
→ （カラー画像）RGB のフェーズでしきい値を設定  
→ （グレースケール画像）輝度のフェーズでしきい値を設定
- 適応しきい値  
→ 背景にムラのあるグレースケール画像に適したしきい値設定

#### <Point!>

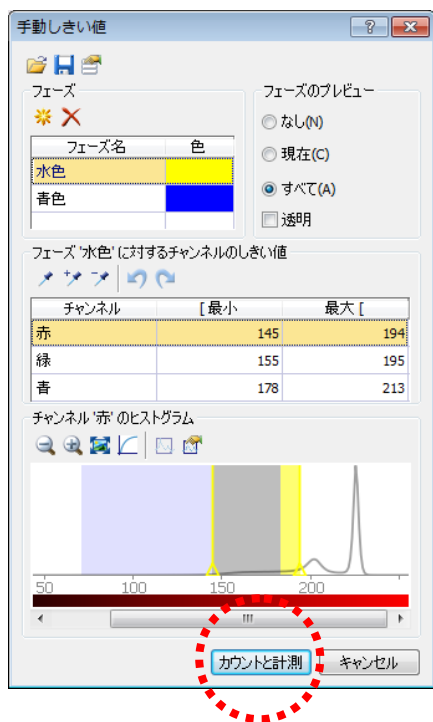
目的のボタンが表示されていない場合は、

しきい値のボタン右側にある▼を押すとプルダウンで他のメニューが表示されます。

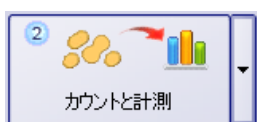


## 2. カウントを実行する

しきい値の設定が完了した際に同じウィンドウ内にある<カウントと計測ボタン>をクリックすることでカウントを実行します。



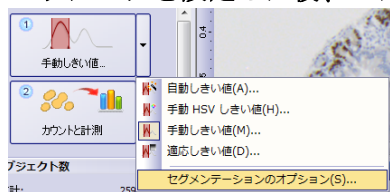
しきい値以外の設定を変えて再びカウントを実行する際にはカウントと計測ボタンを押します。



### <Point!>

しきい値の設定後カウントと計測をせずに終了できます。

しきい値のボタン右側の▼からセグメンテーションのオプションを開き、パラメータを設定した後、セグメンテーションを実行するにチェックを入れます。



サイズの大きい画像等を扱う際には、カウントと計測を行うと時間がかかるので全ての設定を終えてから上記②のカウントと計測ボタンを押すのが効率的です。

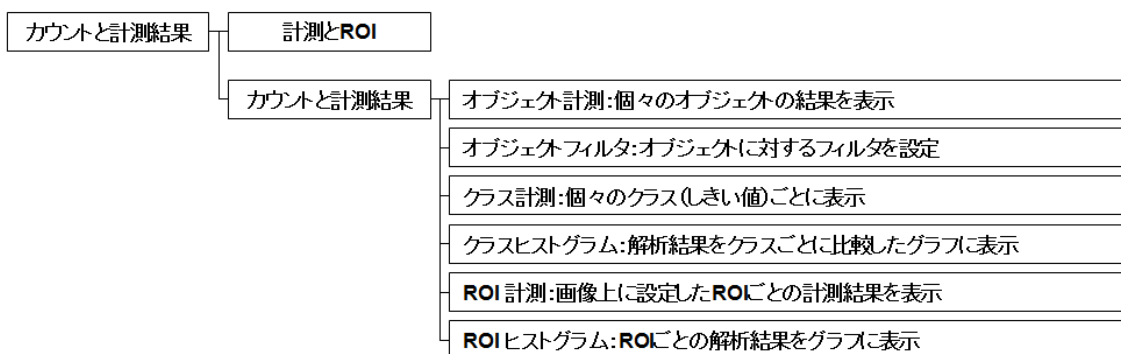
### 3. 結果を見る

画像解析の結果は**カウントと計測結果**ウィンドウに表示されます

メインメニュー>ビュー>ツールウィンドウ>計測結果ウィンドウ で表示


オブジェクトの ID	面積 [um <sup>2</sup> ]	平均 (輝度 (グレー))	平均 (輝度 (カラー))	平均 (長さ) [um]	最大 (長さ) [um]	最大 (長さ) (P)
2	5398.39	-	197.75	127.37	167.26	-
3	97.97	-	198.78	12.38	19.22	-
4	9.33	-	205.40	3.56	5.40	-
5	466.50	-	196.32	37.30	55.20	-
6	154.88	-	194.92	17.31	35.64	-
7	17.73	-	201.68	5.14	10.18	-
フィルタ範囲内の数	2590	0	2590	2590	2590	-
平均	197.32	-	195.42	11.48	17.83	-
標準偏差	1268.88	-	10.45	19.27	31.94	-

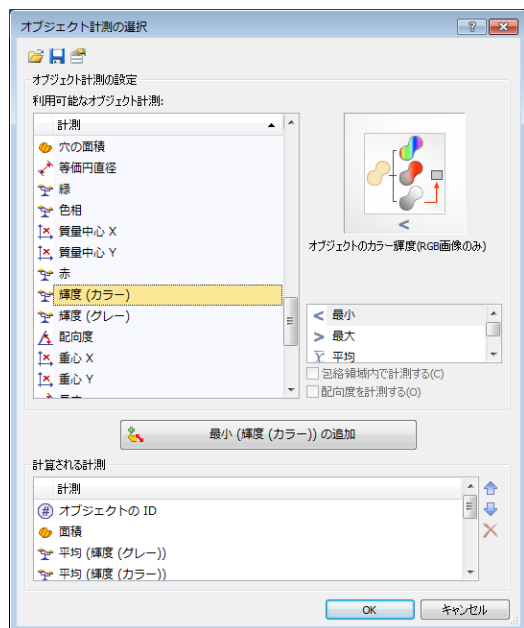
カウントと計測結果ウィンドウは下記の通りに構成されています。



各解析の結果は結果シートに表示されます。

シートの上には**選択した計測パラメータ**の結果が表示されます。

計測パラメータを選択するには、ウィンドウ内のツールバーから**オブジェクト計測**の選択ボタン  をクリックします。



## 背景にムラのある画像を解析する

### 1) シェーディング補正を行い、自動/手動しきい値を用いて核を検出する

#### 画質を調整する

処理>画質調整には画像のコントラストを最適化するための画像処理機能があります。画像の明るさやコントラストの調整のほか、偏った色合いを補正することができます。

画質調整には複数のメニューがありますが、ここではシェーディング補正を用います。

#### シェーディング補正をかける

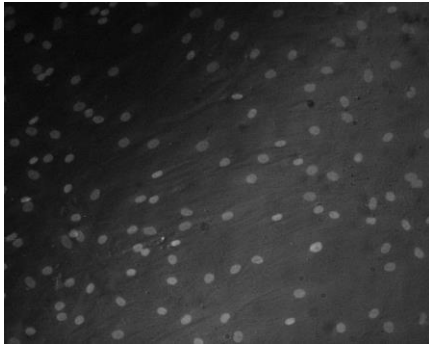
シェーディング補正により、標本が均等に照射されていないことに起因する、画像全体の明るさのムラを補正できます。カメラが原因で発生するシェーディングは、カメラの種類によっては、画像を取り込む際に直接補正できます。[処理]>[画質調整]>[シェーディング補正...] コマンドは、既存の画像のシェーディングを補正する際に使用します。

- メインメニューから**処理>画質調整>シェーディング補正**を選択します。
- [自動補正]により、アクティブな画像から補正画像が計算されます。
- シェーディング補正の結果が満足のものではなかった場合には、[詳細設定...] ボタンをクリックして他のパラメータを選択します。
- OK をクリックしてウィンドウを閉じます。

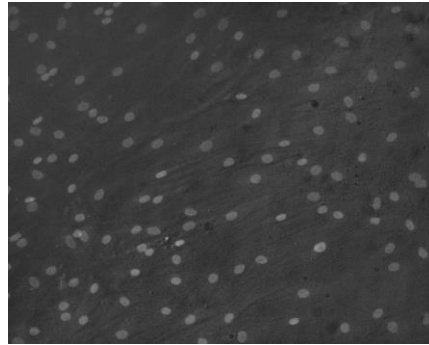
#### 【 Point!! 】

画質調整には以下のメニューを備えています。

- ・ 輝度の調整：明るさ、コントラストおよびガンマ値を調整。
- ・ RGB の調整：赤、緑、青の割合を変更。
- ・ コントラスト最適化：輝度ヒストグラムを基にコントラストを最適に調整。
- ・ コントラスト最大化：輝度ヒストグラムを基にコントラストを最大に調整。
- ・ 微分コントラスト強調
- ・ シェーディング補正：明るさのムラを補正。
- ・ 背景の減算：背景の輝度を減算し、S/N 比を向上。
- ・ 背景補正：背景の減算とは異なるアルゴリズムで背景輝度を補正。
- ・ ホワイトバランス：画像の不要な色合いを補正。
- ・ EFI の計算：Z シリーズ画像から EFI 画像を計算。
- ・ ベストフォーカスの抽出：Z シリーズ画像からベストフォーカスフレームを計算。
- ・ 明視野分離
- ・ 蛍光分離




シェーディング補正前



シェーディング補正後

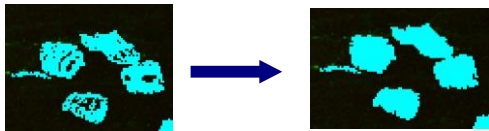
### しきい値を設定する

核を抽出するため、しきい値を設定します。

- **【カウントと計測】** タブ内、**手動しきい値**を選択します。  
(他のメニューが表示されている場合は、右側の▼をクリックしてメニューから選択)
- 核の部分を選択します。
  - 新規のしきい値  をクリックしてから画像内の核部分をマウスドラッグにより全て塗りつぶします。(画像が小さい場合はマウススクロールで拡大します)。
- **カウントと計測**をクリックすると、核がそれぞれマークされているのがわかります。

#### 【 Point!! 】

選択範囲の隙間が気になる場合は、検出のオプションから設定できます。



- **カウントと計測**ボタン横の▼をクリックし、**検出のオプション**を選択します。
- ウィンドウ内下部、オプション内にある**穴を埋める**にチェックします。



- OK をクリックしてウィンドウを閉じます。
- **カウントと計測**ボタンをクリックすると、穴を埋めた状態で再度カウントと計測されます。

## 2) 適応しきい値を用いて核を検出する

### 適応しきい値とは？

照明ムラによりシェーディングと呼ばれる陰影効果が画像内に発生することがあります。また、標本の厚さが不均一であると、標本内の同じオブジェクトが、画像では異なる輝度値で表示されることがあります。このような場合は、しきい値法として適応しきい値設定を選択します。

### 輝度の適応

輝度調整を実行すると、画像内の異なる輝度が相互に調整されます。これには、各ピクセルに対して、隣接するピクセルの平均輝度が求められます。続いて、この平均輝度がピクセルの輝度から減算されます。たとえば、画像で暗い背景上に明るいオブジェクトが表示されている場合、補正の実行後、同等に明るいオブジェクトは同等に明るく表示されます。

### 輝度の適応を調整する

- **【カウントと計測】** タブ内、**手動しきい値**を選択します。  
(他のメニューが表示されている場合は、右側の▼をクリックしてメニューから選択)
- **【ローカル-グローバル】** スライダーを使用して、輝度調整時に平均化する隣接周辺領域のサイズを選択します。スライダーを左右に動かして、最適な補正值を決定します。
- スライダーを**【ローカル】**方向に動かすと、平均化する隣接周辺領域が小さくなります。
- スライダーを**【グローバル】**方向に動かすと、平均化する隣接周辺領域が大きくなります。

#### **【 Point!! 】**

**【プレビュー】**チェックボックスをオンにすると、輝度調整の効果を画像上で直接確認できます。

**【プレビュー】**チェックボックスのオンとオフを繰り返すことにより、元の画像と「補正された」画像を交互に切り替え、画像への輝度調整の効果を判断することができます。


注:輝度調整は、しきい値ダイアログボックスでのみ使用される中間値です。解析実行後の結果画像は元の画像と同じです。つまり、元の画像データ自体は変更されません。

隣接周辺領域の最大サイズは、画像のサイズにより異なります。最大で、画像の最も短い辺のピクセル数の半分まで設定できます。つまり、たとえば 1400 x 1000 の画像の場合、最大サイズは 500 ピクセルになります

## しきい値を設定する

### 相対しきい値

輝度調整を行っているため、フェーズに対するしきい値は絶対値ではなく相対しきい値であり、各ピクセルに対して再計算する必要があります。したがって、しきい値が負の値になる可能性もあります。

- 核の部分を選択します。
  - 新規のしきい値  をクリックしてから画像内の核部分をマウスドラッグにより全て塗りつぶします。(画像が小さい場合はマウススクロールで拡大します)。
- カウントと計測をクリックすると、核がそれぞれマークされているのがわかります。


#### 【 Point!! 】

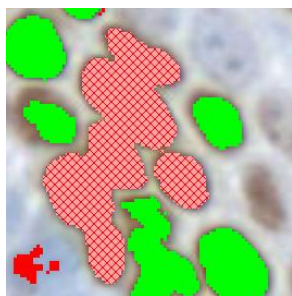
しきい値は、ヒストグラムで設定するか、フィールドに直接入力するか、画像で直接決定することにより設定します。しきい値の範囲は、8 ビットグレースケール画像では [-255 ~ +256]、16 ビットグレースケール画像では [-65535 ~ +65536] になります。

## オブジェクトを分割する

接触している複数のオブジェクトは 1 つのオブジェクトと見なされてしまいます。正しいカウント結果を出すために分割する必要があります。

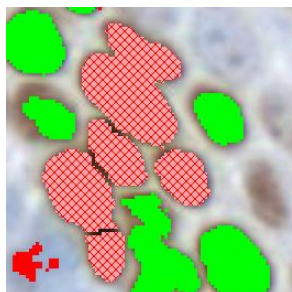
### オブジェクトを選択する

- カウントと計測ウィンドウ内<オブジェクトの編集>から検出されたオブジェクトの選択  を選びます。
- オブジェクト上でクリックすると、選択されたオブジェクト全体が赤い網掛けで表示され、複数のオブジェクトが 1 つとみなされていることがわかります。




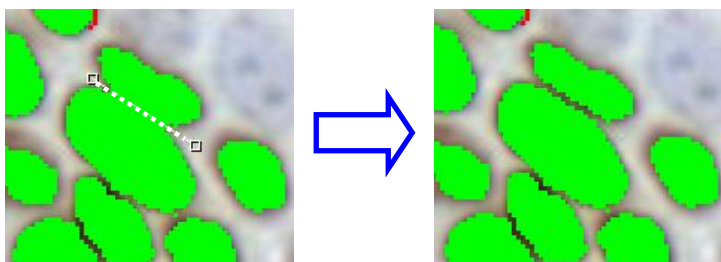
### オブジェクトを自動分割する

- 網掛けされたオブジェクトの上で右クリックし、メニューから選択されたオブジェクトの自動分割を選択します。(下図では複数のオブジェクトを選択しています)



### オブジェクトを手動分割する

- 上部のオブジェクトがまだ分割されていないので手動分割を行います。カウントと計測ウィンドウ内<オブジェクトの編集>からオブジェクトの手動分割  を選択します
- 分割したいオブジェクトの外側で左クリックし、そのままドラッグをして分割線を引き、途中で右クリックします。



**【 Point!! 】**

画面全体に自動分割をかける際には、

Ctrl + A をキーボードで同時に押すことで全ての検出オブジェクトが選択されます。

## 計測結果を見る

しきい値でわけたそれぞれの範囲に対する計測結果は**カウント**と**計測結果ウィンドウ**で確認できます。計測内容や計測範囲もこのウィンドウ内で選択できます。


## 結果表示を選択する

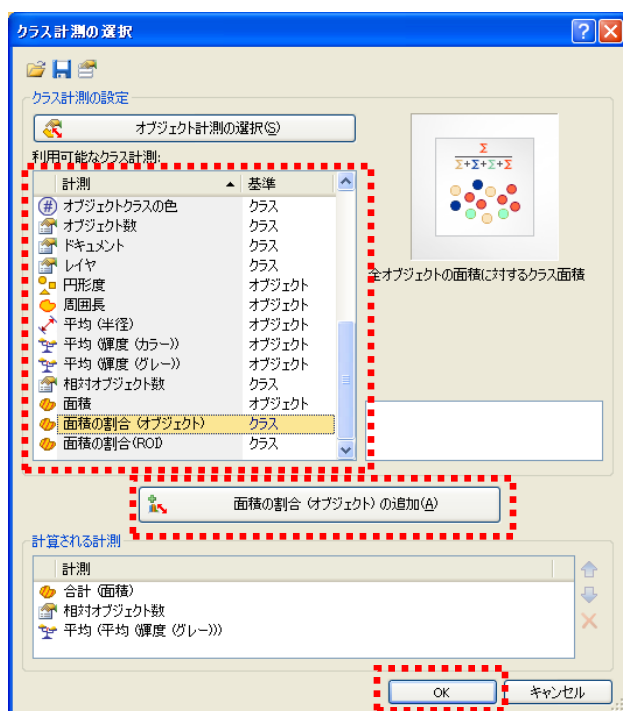
画像解析の結果はカウントと計測結果ウィンドウ内のタブを切替えて表示します。

- ・ オブジェクト計測：個々のオブジェクトの結果を表示。
- ・ オブジェクトフィルタ：オブジェクトに対するフィルタを設定。
- ・ クラス計測：画像解析結果が、個々のクラス（しきい値等）ごとに表示。
- ・ クラスヒストグラム：画像解析結果をクラスごとに比較したグラフに表示。
- ・ ROI 計測：画像上に設定した特定の領域（ROI）ごとの計測結果を表示。
- ・ ROI ヒストグラム：ROI ごとの画像解析結果をグラフに表示。

## 計測内容を選択する

表示する結果を一覧から選択することで、様々な計測結果を得られます。

- ・ **カウントと計測結果ウィンドウ内、オブジェクト計測の選択**  を選択。
- ・ 表示された**オブジェクト計測の選択ウィンドウ**から必要な計測内容を選択。



## 計測を実行する

カウントと計測ボタン



をクリックすると設定した計測結果が表示されます。

**【 Point!! 】**


面積の割合（オブジェクト）は指定領域の合計を 100 として面積を比較します。

一方の面積の割合（ROI）は画面全体に対する指定領域の割合を表示します。

## 画像の一部を解析する (ROI を設定する)

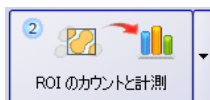
ROI (Region Of Interest) を用いることで画像内の一部だけを解析できます。ROI には円形、四角、自由な形にできるポリゴンの3種類あります。

### ROI を設定する (ポリゴン)

- メインメニュー>ビュー>ツールバーからライフサイエンス応用を表示。
- 新規の ROI-ポリゴン  をクリックする。
- マウスの左ボタンをクリックしながら、目的の範囲を囲む。
- 右ボタンをクリックして、ROI の設定を終了する。
- 複数範囲を選択する場合は繰り返し行う。

### ROI のカウントと計測を行う

- ROI のカウントと計測ボタン



を押す。

- ROI のカウントと計測ボタンが表示されていない場合は、**カウントと計測**ボタン右側の▼をクリックしてから選択する。

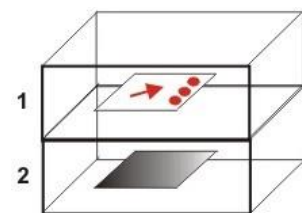
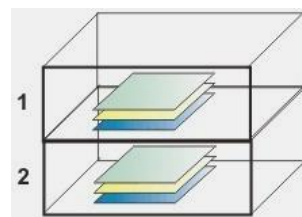


## マルチレイヤ画像

- 複数のレイヤから構成される画像をマルチレイヤ画像と呼びます。
- レイヤは画像レイヤとベクトルレイヤに分類されます。
- [カラー画像の統合] 機能により生成された蛍光画像は画像レイヤです。
- ベクトルレイヤは、以下の3種類に分類されます。
  1. スケールバー、情報スタンプ
  2. [図形描画]ツールバーを使用して作成したラベル、しるし、図形など。
  3. [計測とROI]、[計測]ツールウィンドウを使用して計測した計測オブジェクト

### レイヤの参考例

- 2つの画像レイヤから構成されたマルチレイヤ画像。  
取り込みオーバーレイで撮像された蛍光画像と透過画像
  
- 画像レイヤ (2) と描画レイヤ (1) から構成されたマルチレイヤ画像



## レイヤの確認と編集

- マルチレイヤ画像のレイヤ構造は[レイヤ]ツールウィンドウで表示されます。
- [レイヤ]ツールウィンドウで、個々のレイヤの表示/非表示、及び削除が可能です。



← 描画レイヤ

← 解析レイヤ

各画像レイヤ

- 🌈 = 24ビット トゥルーカラー画像
- 🌈 = 48ビット トゥルーカラー画像
- 🖼️ = 8ビット グレースケール画像
- 🖼️ = 16ビット グレースケール画像
- 🌈 = マルチチャンネル画像
- 📄 = Zシリーズ画像
- 📄 = タイムラプス画像

🔒 禁止アイコンは、レイヤを移動できないことを表します。

- 目のアイコン “👁️” を ON/OFF することでレイヤの表示/非表示が可能です。
- 不必要なレイヤは[レイヤの削除ボタン] “🗑️” で削除することが可能です。
- 複数の画像レイヤを表示している場合、下位のレイヤが最上位のレイヤに隠れてしまふことがあります。[レイヤの不透明度の設定] “👁️” で各レイヤの透明度を設定可能です。