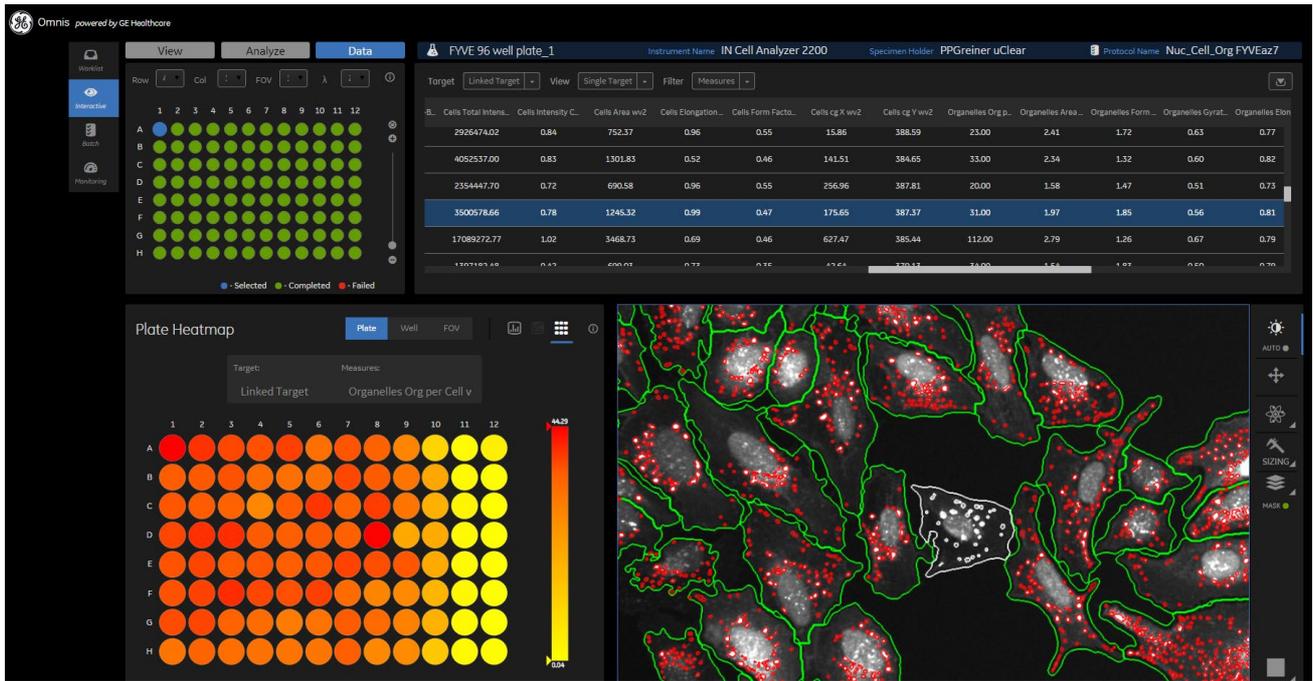


IN Carta Image Analysis Software



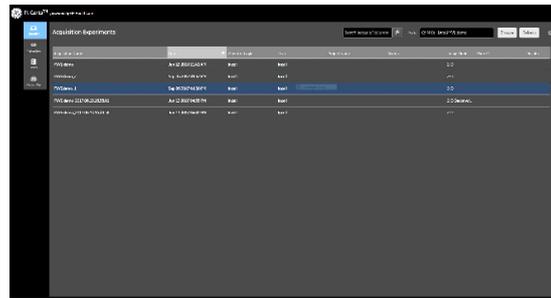
操作ガイド

目次

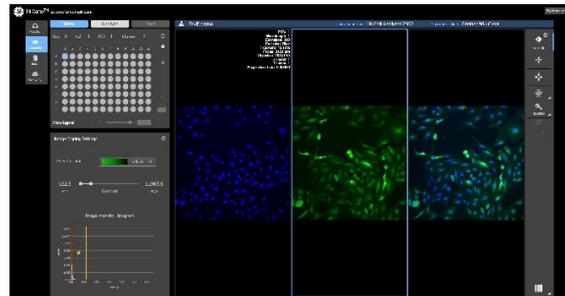
解析フロー.....	3
解析するデータを開く.....	5
表示の調整.....	6
解析プロトコルの作成.....	8
1. プロトコルのセットアップ.....	8
2. 認識パラメータの最適化.....	10
Analysis settings.....	11
解析実行.....	16
プロトコルの実行.....	16
結果の確認.....	17
1. データテーブルの見方.....	17
2. プロットパネルに結果サマリを表示.....	17
3. リンクデータの見方.....	18
4. イメージ上でハイライトされた細胞の表示方法変更.....	19
5. Classifier 分類機能.....	19
マシンラーニング Phenoglyphs (オプション).....	21

解析フロー

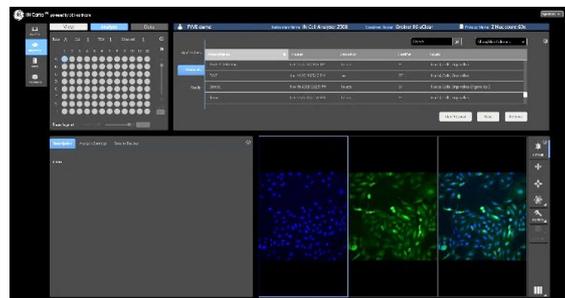
1. Work list から解析するデータを選択



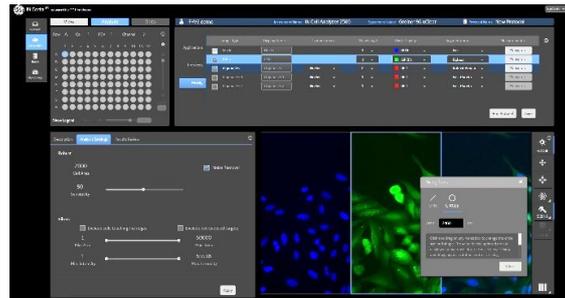
2. 表示イメージの形式設定
(コントラスト、疑似カラーなど)



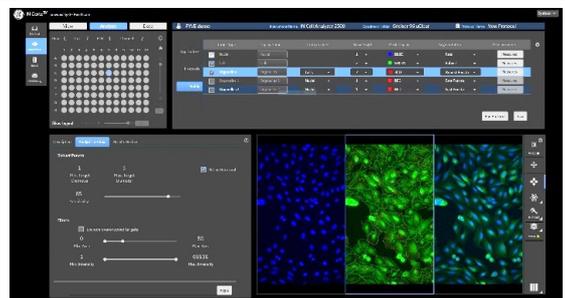
3. 解析プロトコルを作成



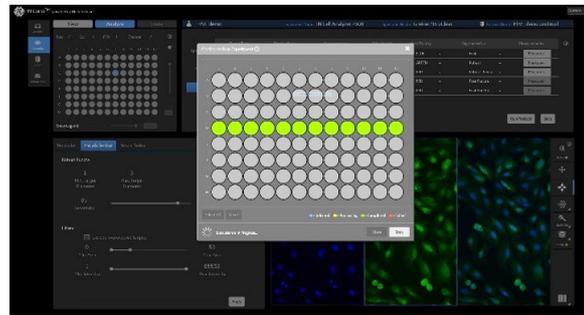
4. 認識パラメータの設定と測定項目の選択



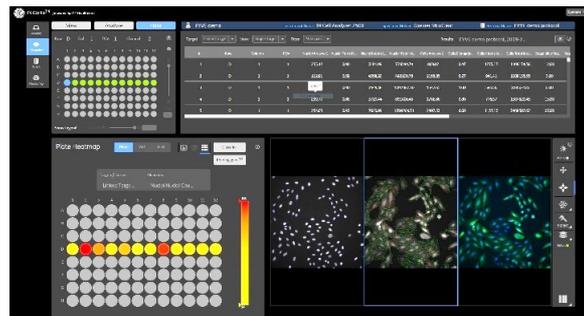
5. 認識の確認と最適化



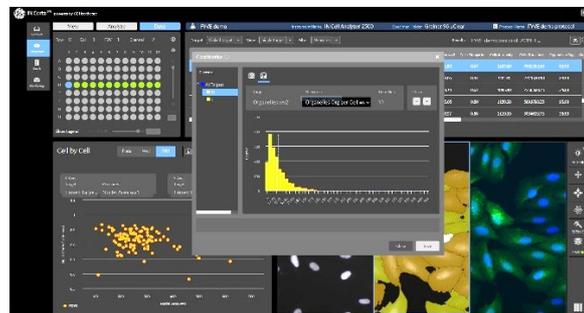
6. 解析の実行



7. 解析結果の確認



8. 必要な場合は解析席結果から細胞を分類



解析するデータを開く



IN Carta を起動します。

The screenshot shows the IN Carta software interface. The main window displays a table titled "Acquisition Experiments". The table has columns for Acquisition Name, Date, Operator Login, User, Project Name, Screen, Image Mode, Plate ID, and Results. The "Operator Login" column is highlighted with a red circle 4. The "User" column header is also highlighted with a red circle 4. The "Path" field is highlighted with a red circle 2. The "Search across all columns" field is highlighted with a red circle 5. The "Worklist" icon is highlighted with a red circle 1. The table contains several rows of data, with the first row highlighted by a red circle 3.

Acquisition Name	Date	Operator Login	User	Project Name	Screen	Image Mode	Plate ID	Results
GE test 170912_slide_2	Sep 12 2017 11:23 AM	Administrator				2-D Deconvol.		
GE test 170912_deconvo_2x2_1	Sep 12 2017 10:56 AM	Administrator				2-D Deconvol.		
GE test 170912_deconvo_1	Sep 12 2017 10:55 AM	Administrator				2-D Deconvol.		
GE test 170912_1	Sep 12 2017 10:54 AM	Administrator				2-D		
Test 20x 2-color 1FOV 12well_Sample	Aug 06 2015 11:55 AM	212032764				2-D		

1. Worklist で解析するイメージスタックのリストを表示します。
2. イメージスタックが保存されているファイルパスを指定します。
3. Path で指定したフォルダに含まれるイメージスタックがリスト表示されます。
4. リストは撮影プロトコル名、撮影日時、ユーザー名などで並べ替えができます。
5. Search フィールドでキーワード検索も可能です。Search フィールドでキーワード検索も可能です。
6. 解析するデータをクリックします。

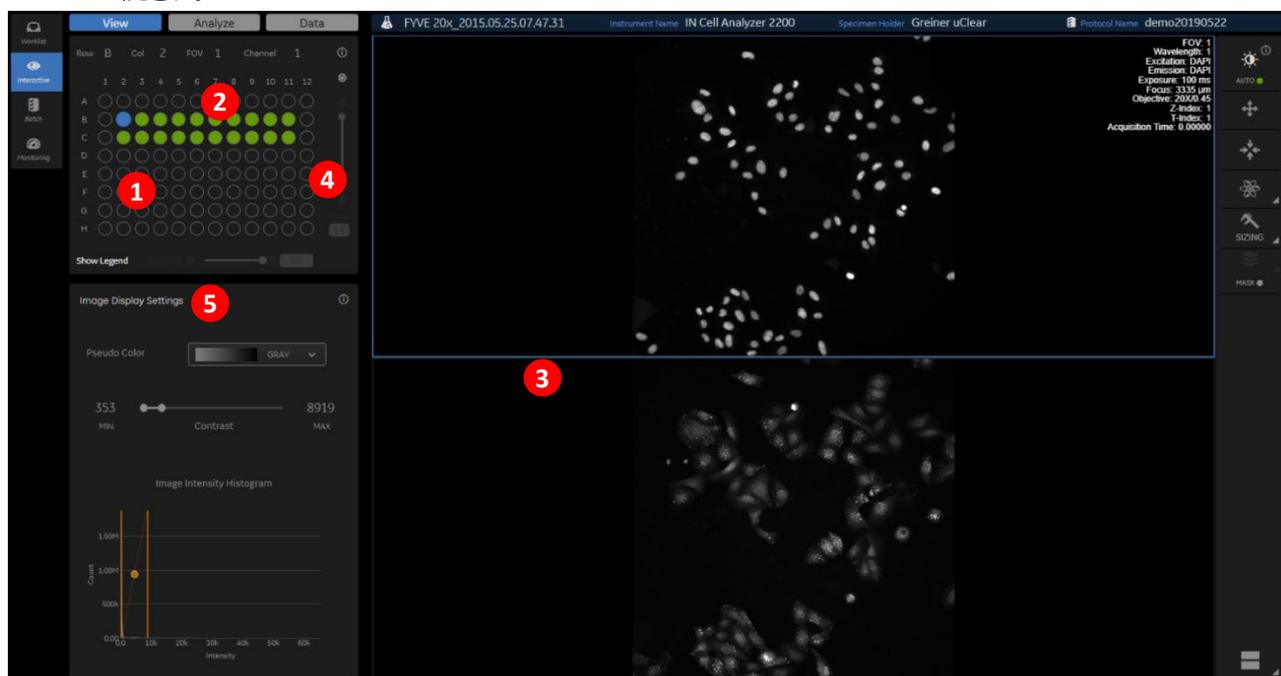
表示の調整

1. 表示イメージの選択

- プレートマップで view port にイメージを表示するウェルを選択してください。選択中のウェルはプレートマップ¹中で青色に表示されます。
- FOV や ²で³に表示される画像の視野もしくはチャンネルが変更できます。
- 3D データの場合は Z Slice のスライダー⁴、タイムラプスデータの場合は Time Point スライダー⁵で表示するスライスや時間が選択できます。

2. View Port のイメージ表示形式の設定

- 初期設定では撮影したチャンネル数の view port が表示されます。
青線で囲まれた領域³に表示されているチャンネル画像をダブルクリックするとそのチャンネル画像だけが大きく表示され、もう一度ダブルクリックすると戻ります。View Port Layout をクリックしてビューポートの数と配置を選択してください。



3. イメージ表示の調整

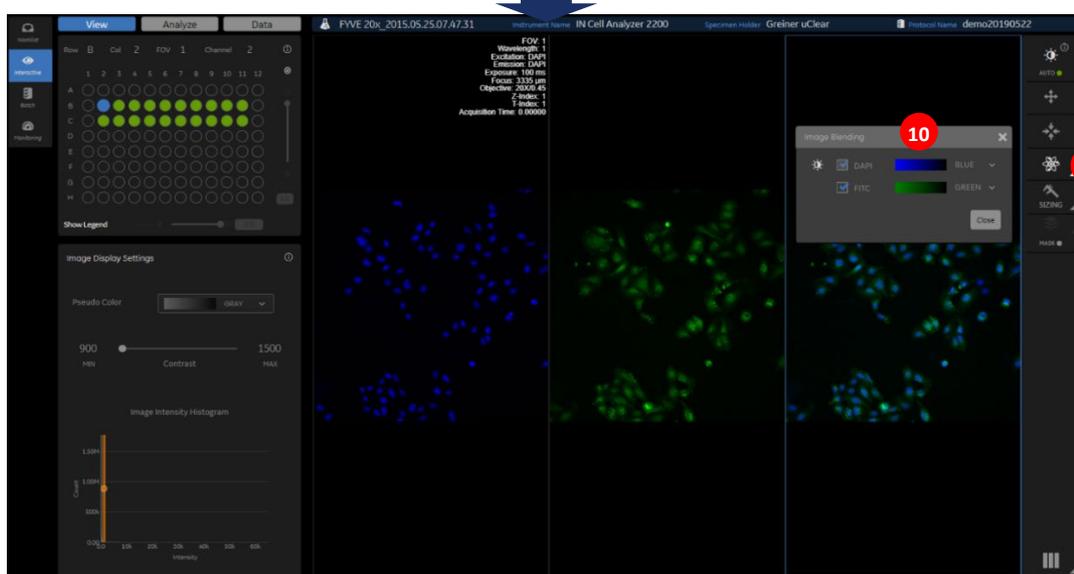
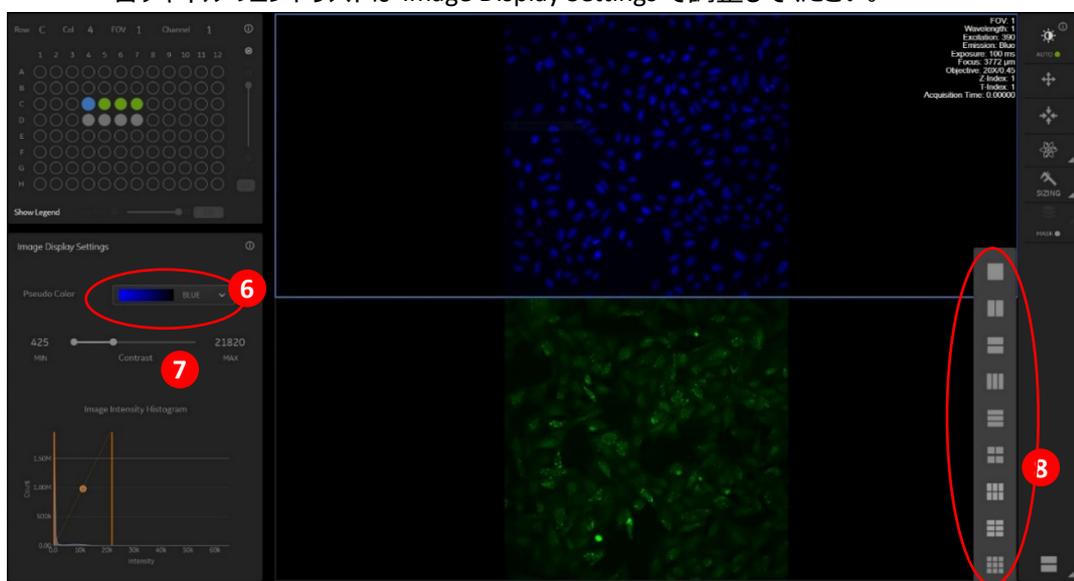
Image Display Settings でイメージ表示の色やコントラストを設定します。

- 表示を調整する **6** の画像をクリックします。
7 で表示の擬似カラーを選択します。
- 表示コントラストは Contrast スライダーもしくは Image Intensity Histogram で調整できます。
イメージ上をクリックして上下にドラッグしてブライトネス、クリックして左右にドラッグでコントラストの調整が可能です。

4. ブレンドイメージの作成

- ブレンドカラー（擬似カラーイメージを重ね合わせた画像）を表示する **8** を選んでから Image Branding **9** をクリックします。
- 重ね合わせるチャンネルにチェックを入れます。
- 各チャンネルの表示擬似カラーを選択します。 **10**

各チャンネルのコントラストは Image Display Settings で調整してください。



解析プロトコルの作成

1. プロトコルのセットアップ (Mononucleated Cells)

Analyze タブをクリックしてプロトコルを作成します。



タブ **1** で Mononucleated Cells を選択します。

タブ **2** で編集するプロトコルを選択して Modify タブをクリックするか、New をクリックします。

3 で解析対象にチェックを入れます。

4. 選択したそれぞれの Target type で

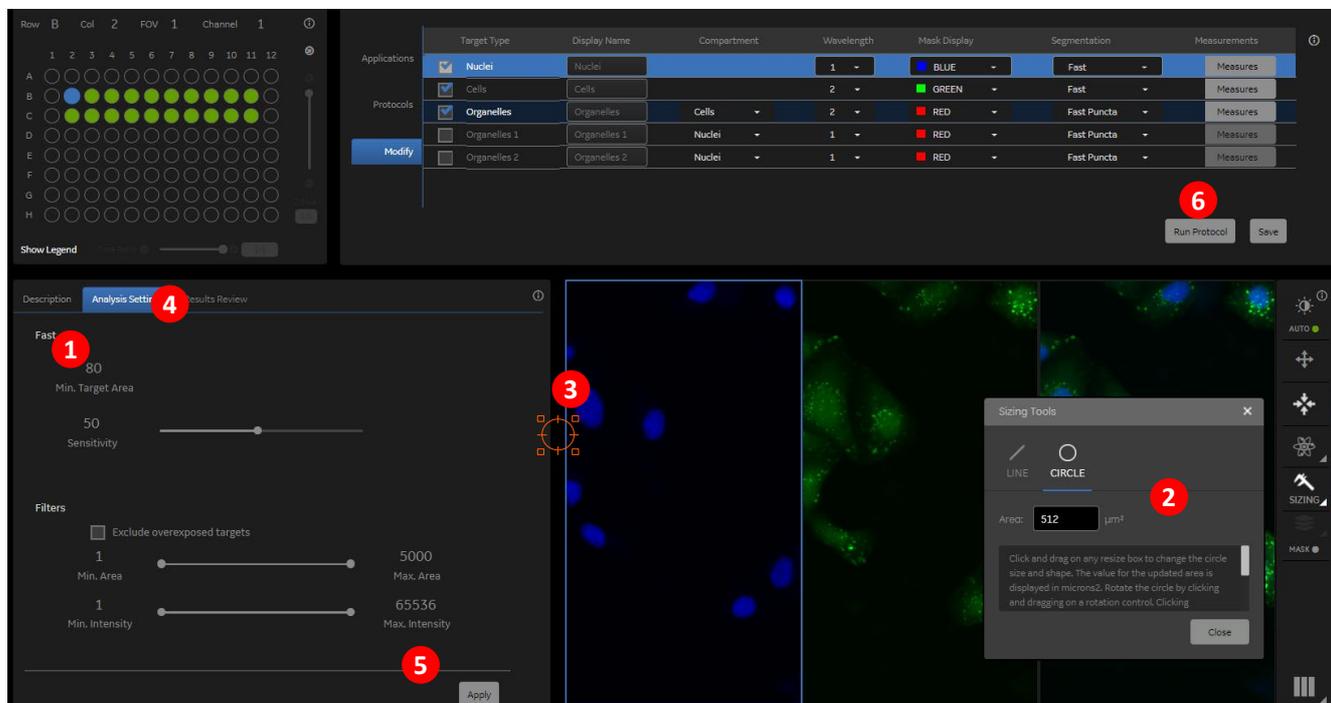
- A) 必要に応じて Display Name **4** に任意の表示ターゲット名を入力します。
- B) Organelles の場合のみ、Component でそのターゲットを検出する領域を指定します。
- C) ターゲットを認識するチャンネルを指定します。例えば Ch1 が核染色なら Nuclei の Wavelength は 1 です。
- D) Mask Display では画像上で認識したターゲットを表すマスクの色を選択します。
- E) ターゲットを画像から認識する Segmentation method を選択します。

Target Type	Segmentation Method	Description
Nuclei	Fast	処理速度の速い核認識メソッドですが、Robust の場合よりも正確ではない可能性があります。
	Robust	Fast より正確な核の検出を行いますが、Fast メソッドよりも検出が遅くなります。
Cells	Fast	処理速度の速い細胞認識メソッドですが、隣接する細胞間の境界線の検出は、Robust を使用する場合よりも正確ではない場合があります。
	Collar	細胞染色が無い場合に、核認識の輪郭から一定距離を細胞質と定義します。
	Robust	隣接する細胞間の境界を正確に検出しますが、Fast よりも処理に時間がかかります。
	Soma	神経突起解析で細胞体 (Soma) を検出するために調整されたアルゴリズムです。このアルゴリズムは、神経突起を含まずに細胞体を検出することを目的としています。
Organelle	Fast Puncta	ドット状の構造を迅速に認識します。Robust Puncta より検出精度が低い可能性があります。
	Robust Puncta	ドット状の構造を正確に認識しますが、Fast Puncta メソッドよりも処理に時間がかかります。
	Network	ミトコンドリアやゴルジなどの細胞内ネットワーク構造の検出に適しています。このアルゴリズムを使用するには、Target Type で Cells が選択されている必要があります。
	Fibers	アクチンなどのフィラメント構造を検出します。このアルゴリズムを使用するには、Target Type で Cells が選択されている必要があります。
	Neurite	Neurite は神経突起の認識とトレースを行います。このアルゴリズムを使用するには、Target Type で Cells が選択されている必要があります。

- F) そのターゲットで数値化する項目を Measure で選択します。Measure の項目は選択している Segmentation のメソッドにより異なります。測定内容は Measures で各項目にマウスポインタを合わせると Description が表示されます。
5. Z スタックデータで最もコントラストの高いスライスを解析する場合は、 をチェックして、ベストフォーカスを判断するチャンネルを指定します。

2. 認識パラメータの最適化

- Analyze Settings パネル **1** で各 Target の認識パラメータを設定します。（詳細は次のページ）
 - 面積や長さは Sizing ツール **2** で画像から測定する **3** ことができ、これを参考に Minimum などを設定できます。
 - 蛍光強度はイメージ上にマウスポインタを置くと Pixel Value としてビューポート右下に表示されます。
 - パラメータ中の大きさの単位： 長さは μm 、面積は μm^2 です。
- Apply をクリックすると、表示されている画像に設定が適用されて認識が確認できます。認識したターゲットのマスクを外したい場合は、Mask ボタンの右隣にある小さなマル  をクリックしてください。
- 必要に応じて Area や Intensity の Filter を設定してください。
 - 4** タブをクリックすると Measures で選択した項目の数値結果が確認できます。
- 設定変更後は **5** をクリックして再度認識を確認してください。
 - 6** をクリックしてプロトコルを保存します。



Analysis settings

Nuclei

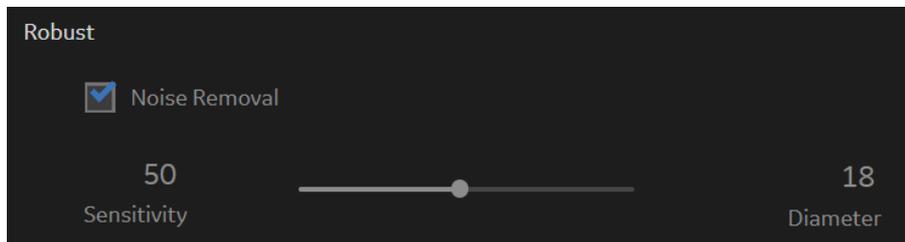
Nuclei ターゲットの場合、プロトコルエディターテーブルの Segmentation 欄のドロップダウンリストには、Fast（デフォルト）と Robust の 2 つのセグメンテーション方法が表示されます。

どちらの方法にもプリセットされたパラメータ値があり、Apply ボタンを使用してテストできます。プリセット値は、キーボード入力、水平スライダー、または上下のスクロール矢印を使用して変更できます。変更結果の確認は、Apply を再度選択します。



Fast セグメンテーションは処理の速い認識方法ですが、核の検出は Robust を使用した場合よりも正確ではない可能性があります。

- Min Target Area (μm^2)
データセット内の認識される核の最小領域。
- Sensitivity 感度（%スライダー）
1～100 の間で設定します。感度レベルが低い場合、核マスクは小さくなり、シグナルの低い核は検出から除外されます。

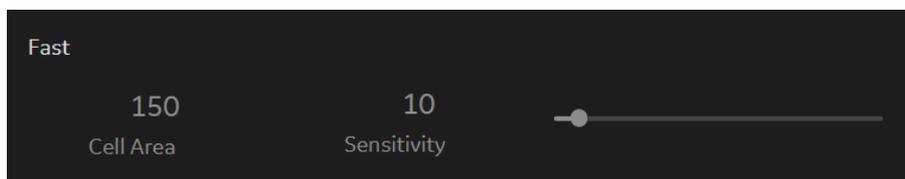


Robust セグメンテーションは、より正確な核の検出を行いますが、Fast メソッドよりも検出が遅くなります。

- Noise Removal
画像に核がほとんどない場合、またはコントラストが非常に低い場合に、潜在的なアーチファクト検出が減少します。Noise Removal はデフォルトでチェックされています。このパラメータの効率は、Diameter の値に依存します。
- Sensitivity 感度（%スライダー）
1～100 の間で入力します。感度レベルが低い場合、核マスクは小さくなり、シグナルの低い核は検出から除外されます。
- Diameter (μm)
典型的な核の直径を入力します。楕円形の核認識の場合は短軸と長軸の中間的な値です。サイジングツールを使用して評価できます。0.2 から 100 の間で入力します。

Cells

Cells の場合、プロトコルエディターの Segmentation のドロップダウンで Fast（デフォルト）、Collar、Robust、Soma の 4 つの選択肢があります。すべてのメソッドにはプリセットされたパラメータ値があり、Apply ボタンを使用してテストできます。プリセット値は、キーボード入力、水平スライダー、または上下のスクロール矢印を使用して変更できます。変更結果の確認は、Apply を再度選択します。



Fast セグメンテーションは処理の速い認識方法ですが、隣接する細胞間の境界線の検出は、Robust を使用する場合よりも正確ではない場合があります。

- Cell Area (μm^2)

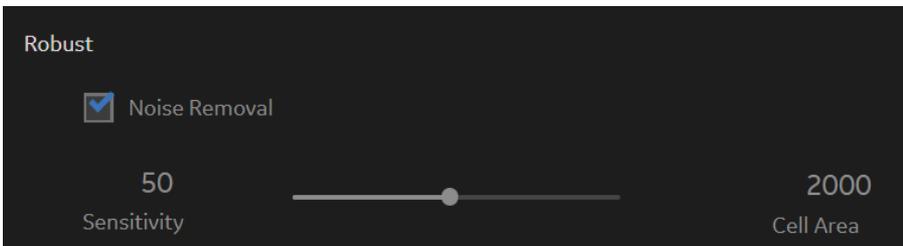
1~50,000 μm^2 である必要があります

- Sensitivity (%スライダー)
認識される領域は、感度レベルが低いほど小さくなります。



Collar セグメンテーションでは、核の輪郭から一定距離の領域を細胞質と定義します。Nuclei 領域の輪郭を内側の境界として、Radius でそこから Cell の輪郭までの距離を決定します。

- Collar Radius (μm)
核の縁から細胞の縁までの距離



Robust セグメンテーションは、隣接する細胞間の境界を最も正確に検出しますが、Fast セグメンテーションよりも処理に時間がかかります。ノイズ除去は、画像に存在する細胞が少ない場合、またはコントラストが非常に低い場合に、潜在的なアーチファクト検出を減らします。

- Noise Removal
ノイズ除去をオンにすると、細胞数の少ないフィールドの誤検出を減らすことができますが、細胞密度が高い場合は、細胞質マスクが縮小する可能性があります。Noise Removal はデフォルトでチェックされています。
- Sensitivity (%スライダー)
Cell の認識領域は、感度レベルが低いほど小さくなります。
- Cell Area (μm^2)
1 から 50000 の間で設定します。

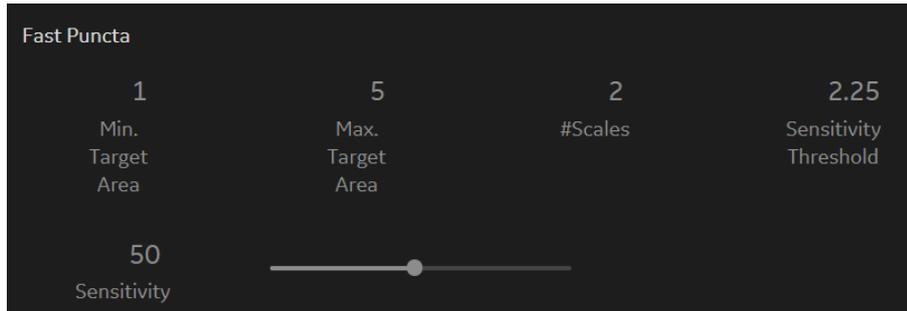


Soma セグメンテーションは、神経突起解析の一部として細胞体 (Soma) を検出するために調整されたアルゴリズムです。このアルゴリズムは、神経突起を含まずに Cell body を検出することを目的としています。

- Soma Area (μm^2)
典型的な Soma 面積
- Ratio
値が小さいと Soma は大きくなり、値が大きいと Soma のサイズは小さくなります。比率は 3 から 50 の間で設定します。
- Noise Removal
細胞が少ないフィールドの潜在的なアーチファクト検出を減らします。細胞密度が高いフィールドの Soma の認識が減少します。デフォルトでチェックされています。ただし、このパラメータの効率は、設定された Soma Area に依存します。
- Sensitivity (%スライダー)
Soma の認識は、低感度レベルでは小さくなります。1 から 100 の間で設定します。

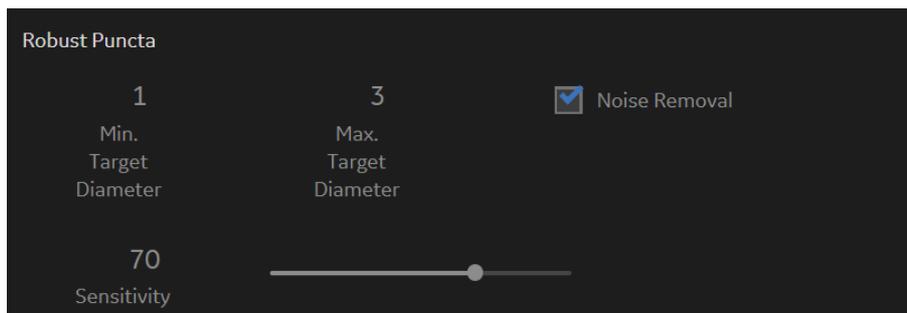
Organelle

Nuclei と Cells 以外の領域は Organelle で設定します。Segmentation の選択肢は Fast Puncta、Robust Puncta、Networks、Membrane、Fibers、Neurite Tracing、および Neurite の 7 つあります。すべてのメソッドにはプリセットされたパラメータ値があり、Apply ボタンを使用してテストできます。



Fast Puncta は処理の速い認識方法ですが、Robust Puncta メソッドを使用した場合よりも検出の精度が低下する可能性があります。

- Min Target Area (μm^2)
Puncta 領域の下限。0.1~10 (μm^2) で設定します。
- Max Target Area (μm^2) 。
Puncta 領域の上限。0.1~10 (μm^2) で設定します。
- #Scales
認識される Puncta の大きさの範囲を定義します。低い値では、Min Target Area に近い点のみが検出されますが、スケールを増やすと、より大きい点も含まれます。
- Sensitivity Threshold
Sensitivity スライダーを調整しても認識が改善されない場合に使用します。Threshold の値が大きいほど、高いコントラストの Puncta だけが認識されるようになります。
- Sensitivity (%スライダー)
Sensitivity を高くするとシグナル強度が低い Puncta も検出されます。



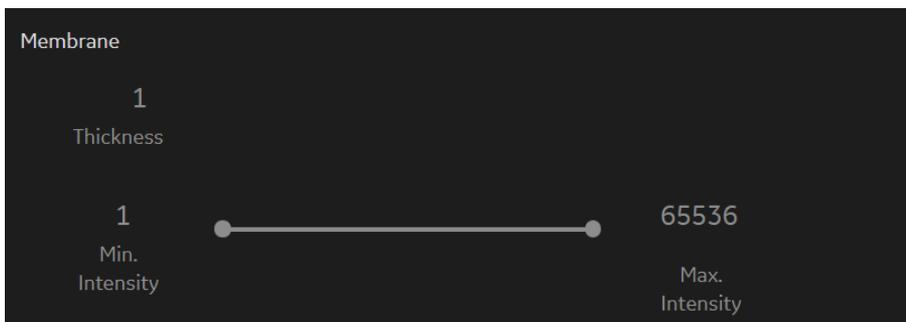
Robust Puncta は最も正確な結果を提供しますが、Fast Puncta メソッドよりも検出が遅くなります。

- Min Target Diameter (μm)
Puncta の直径の下限。0.1~10 (μm) で設定して。
- Max Target Diameter (μm)
Puncta の直径の上限。0.1~10 (μm) で設定します。
- Noise Removal
潜在的なアーチファクト検出を減らします。ノイズ除去は、デフォルトでオンになっています。ただし、このパラメータの効率は設定された Target Diameter に依存します。
- Sensitivity (%スライダー)
Sensitivity を高くするとシグナル強度が低い Puncta も検出されます。



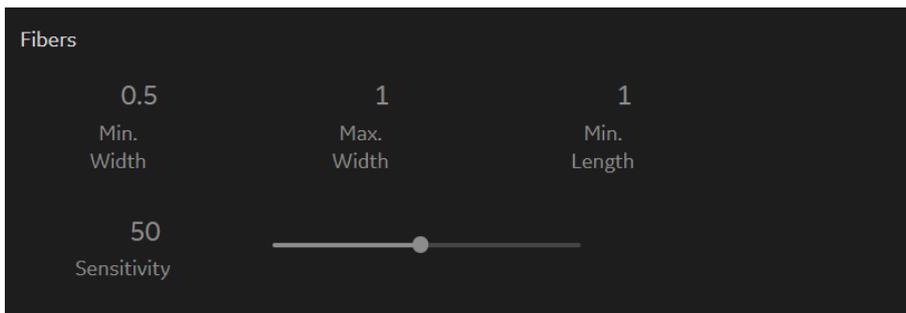
Network は、ミトコンドリアやゴルジなどの細胞内ネットワークの検出に適しています。この方法は、細胞骨格分析のために個々の繊維を検出するように最適化されていないことに注意してください。このアルゴリズムを使用するには、Target Type で Cells が選択されている必要があります。

- Thickness (μm)
ネットワーク構造の典型的な厚さ
- Sensitivity (%スライダー)
感度を高くするとネットワークの強度の低い部分も認識されます。1 から 100 の間で設定します。



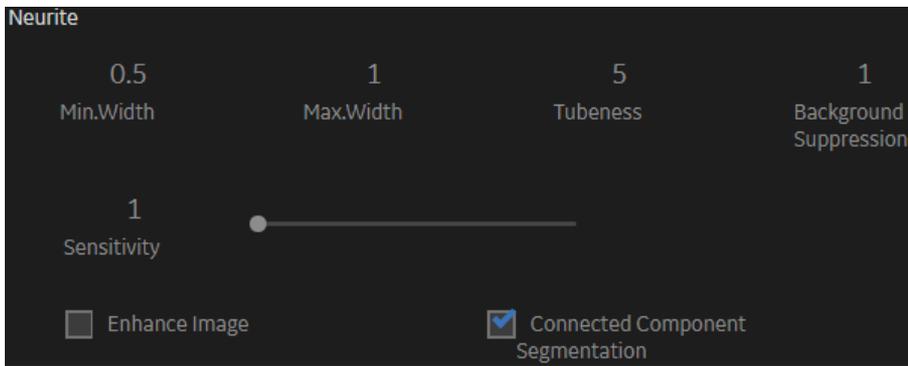
Membrane セグメンテーションは、細胞膜領域を定義することを目的としています。このアルゴリズムを使用するには、Target Type で Cells が選択されている必要があります。

- Thickness (μm)
0.1 から 5 (μm) の間で設定します。Cell で認識した輪郭の外縁の Membrane の厚みを入力します。



Fibers セグメンテーションは、アクチンフィラメントなどのフィラメント構造を検出します。この方法は、個々のフィラメントと崩れた繊維を検出するために設計されました。このアルゴリズムを使用するには、Target Type で Cells が選択されている必要があります。

- Min Width (μm)
フィラメントの幅の下限。0.1 から 1 (μm) の間で設定します。
- Max Width (μm)
フィラメントの幅の上限。0.1 から 2 (μm) の間で設定します。
- Min Length (μm)
ファイバーの最小長。1 から 20 (μm) の間で設定します。
- Sensitivity (%スライダー)
感度を高くするとファイバーの強度の低い部分も認識されます。1 から 100 の間で設定します。



Neurite は神経突起の認識とトレースを行います。このアルゴリズムを使用するには、Target Type で Cells が選択されている必要があります。

- ・ Min Width (μm)
神経突起の幅の下限。0.1 から 5 (μm) の間で設定します。
- ・ Max Width (μm)
神経突起の幅の上限。0.5~10 (μm) の間で設定します。
- ・ Sensitivity (%スライダー)
感度を高くすると神経突起の強度の低い部分も認識されます。1 から 100 の間で設定します。
- ・ Tubeness
値が大きいくほど、セグメンテーションマスクが滑らかになります。0.5 から 500 の間で設定します。
- ・ Background Suppression
値を大きくすると、セグメンテーションマスクのノイズが減少します。0.1 から 5000 の間で設定します。
- ・ Enhance Image
画像をノーマライズして、シグナルの高い部分と低い部分両方の神経突起のセグメンテーションを可能にします。
- ・ Connected Component Segmentation
断片化された神経突起の認識を改善します。

Filters

Exclude overexposed targets

マスク内にシグナル飽和 (65535) のピクセルがあるオブジェクトを認識から除外します。このオプションは、Cells を Collar でセグメンテーションしている場合には使用できません

- ・ Exclude cells touching the edges
画像の端にある細胞を除外されます。このオプションは、Cells でのみ使用できます。
- ・ Min/Max Area
認識されたオブジェクトの面積に対する閾値です。最小値-最大値を設定して大きさをフィルタリングできます。
- ・ Min/Max Intensity
認識されたオブジェクトの蛍光強度に対する閾値です。最小値-最大値を設定して明るさをフィルタリングできます。

解析実行

プロトコルの実行

1. Run Protocol をクリックします。
 2. クリック&ドラッグ、もしくはクリックで解析するウェルを選択するか、Select All ですべてのウェルを選択して Run をクリックします。
-

バッチ解析

1. Batch をクリック
2. New Batch をクリック
3. Batch Container に名前をつけて OK をクリック
4. Batch Containers パネルで Batch Container を選び、Acquisition Experiments から解析するイメージスタック、Analysis Protocol から解析プロトコルを選択して Add Selected をクリック
5. Submit for Processing をクリック

結果は自動で解析した画像ファイルと同じフォルダに保存されます。

Monitoring をクリックするとバッチ解析のステータスが確認できます。

結果の確認

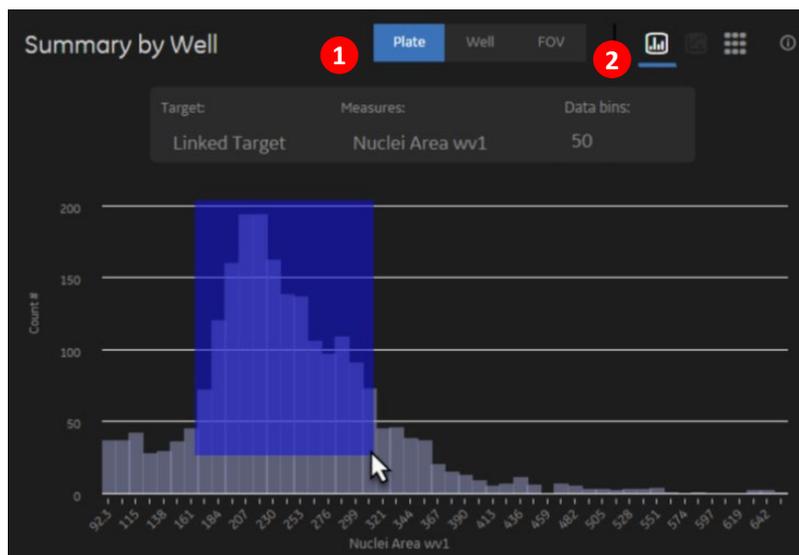
1. データテーブルの見方

1. Target のドロップダウンでテーブルに表示する Target を選択 **1**
2. View のドロップダウン **2** でテーブルの種類を選択
 ターゲットごとの数値結果を表示
 - Summary by FOV: 視野ごとの集計値（合計もしくは平均）を表示
 - Summary by Well: ウェルごとの集計値（合計もしくは平均）を表示
3. Result のドロップダウン **3** で表示する解析結果（同じデータを複数回解析している場合）を選択

Row	Column	FOV	Nuclei Nuclei Count ww1		
A	1	1	196.00		
A	2	1	249.00	202.38	10959.54
A	3	1	159.00	198.40	13014.73
A	4	1	192.00	202.72	14918.81

2. プロットパネルに結果サマリを表示

1. Plots Panel では簡単にデータの可視化ができます。表示するデータを Plate 全体、選択した Well、表示している FOV から選択します。 **1**



2. チャートの種類を選択します。 **2**



ヒストグラム



スキャッタープロット



ヒートマップ

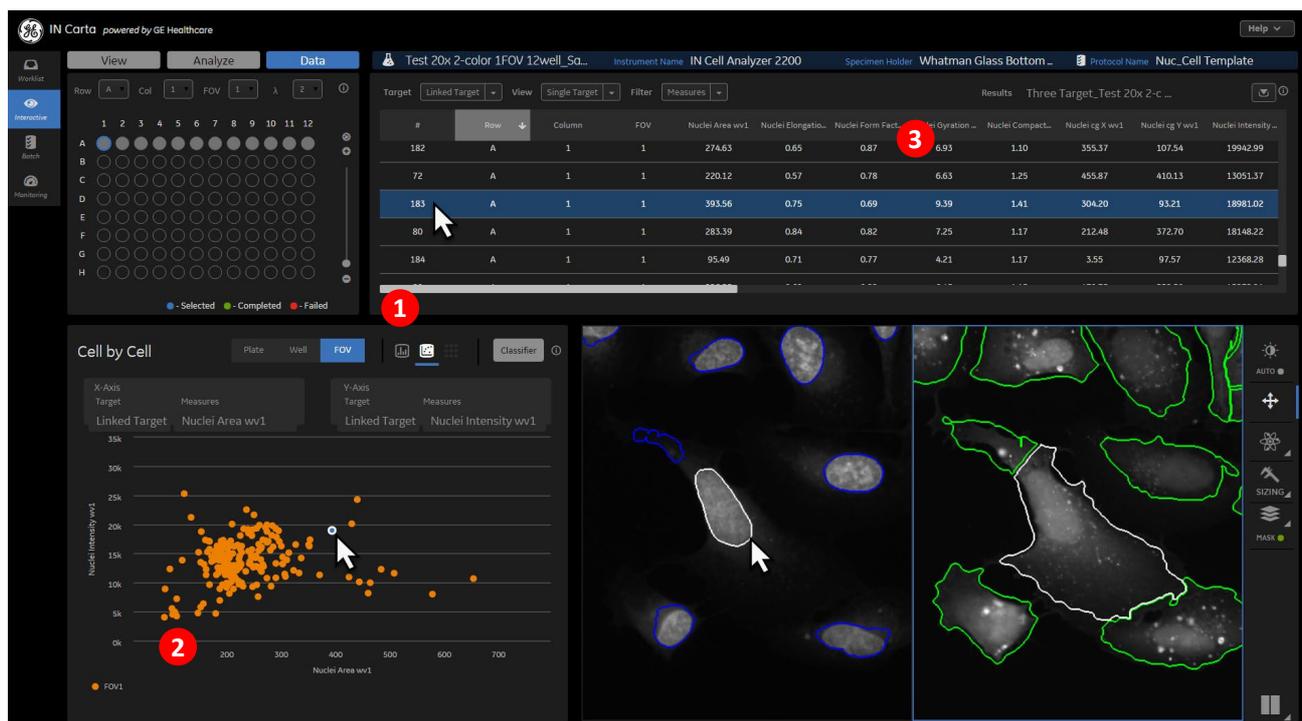
Plate	✓		✓
Well	✓		

3. ヒストグラムでは選択した 1 測定項目の細胞数の分布を表示します。
- ① Measure でヒストグラムの横軸の値を選択します。
 - ② 必要に応じて Data bins を調整します。
 - ③ 注目する領域はプロット上をクリック&ドラッグして拡大できます。Reset zoom をクリックすると元に戻ります。
- (イ) スキャタープロットでは 1 視野の細胞ごとの数値をプロットします。
- ① X 軸 Y 軸それぞれの Measure を選択します。
 - ② 注目する領域はプロット上をクリック&ドラッグして拡大できます。Reset zoom をクリックすると元に戻ります。
- (ウ) ヒートマップはプレート全体の相対的な値の大小を可視化します。
- ① Measures で表示する値を選択します。
 - ② ヒートマップスライダーでスケールの Min/Max が調整できます。

3. リンクデータの見方

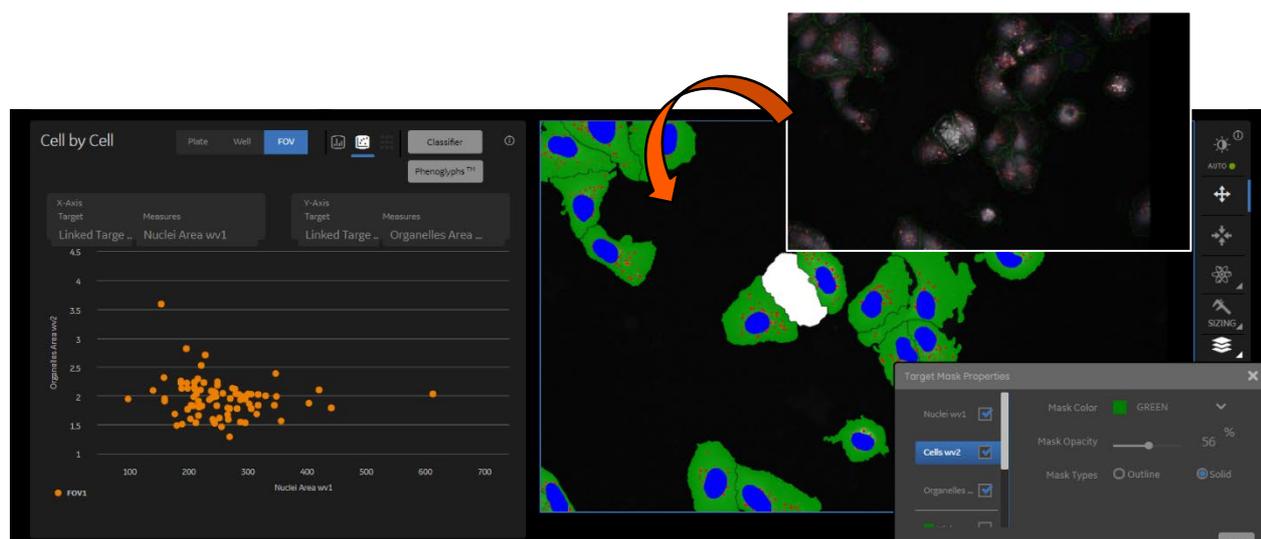
データテーブルに表示された Single Target の数値とスキャタープロット、イメージ上の認識はリンクしています。数値やプロットから画像を確認したり、画像から数値やプロットを確認することで、より詳細な結果の分析やプロトコルの更なる最適化のための情報が得られます。

1. プロットパネルで表示データを FOV にしてスキャタープロット **1** を選択します。
2. スキャタープロットの XY 軸に任意の Measure を選びます。 **2**
3. データテーブル **3** で Single Target を選択します。
4. 選択されている細胞がテーブル、プロット、イメージ上のマスクでそれぞれハイライトされます。また、プロット上で細胞を選択しクリックしても同様にハイライトされます。



4. イメージ上でハイライトされた細胞の表示方法変更

- デフォルトではハイライトされた細胞は outline（輪郭）が白になって表示されています。表示方法は変更することができます。
- Mask ボタンをクリックし、表示方法を変更し Target を選択します。Mask type を outline から Solid（塗りつぶし）に変更します。



5. Classifier 分類機能

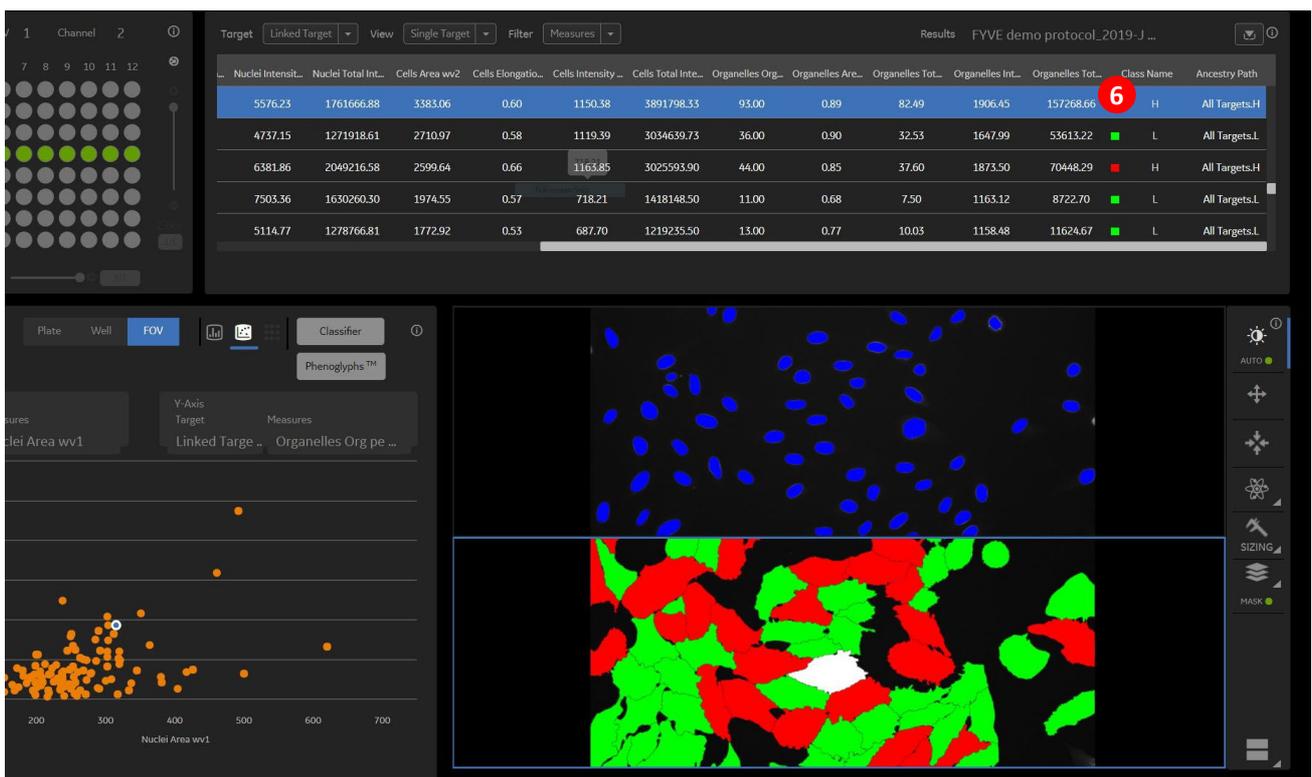
Classifier ではパラメータを選択し、細胞ごとにクラス分けをすることができます。

1. プロット右上の Classifier をクリックします。
① のドロップダウンでクラシフィケーションに使用する測定項目を選択します。
3. Class の ② をクリックします。
4. ヒストグラム上のゲート ③ を任意に移動させます。
5. クラスの名称や表示色は各クラス名右のアイコンをクリックして変更できます。④
6. クラスをさらに複数のサブクラスに分ける場合は、Classes の各クラスをダブルクリックして、そのクラスだけのヒストグラム表示にしてから + をクリックします。
⑤ をクリックすると、解析結果に Classification の設定が適用されます。



8. ヒートマップの Target/Class で任意のクラスを選択すると Class(%)でヒートマップ表示できます。

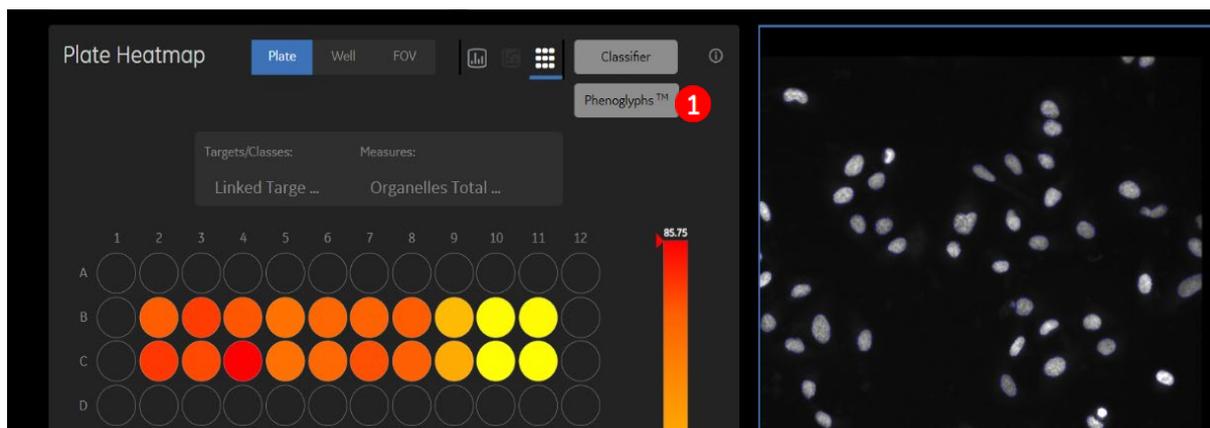
9. また、右上の Result



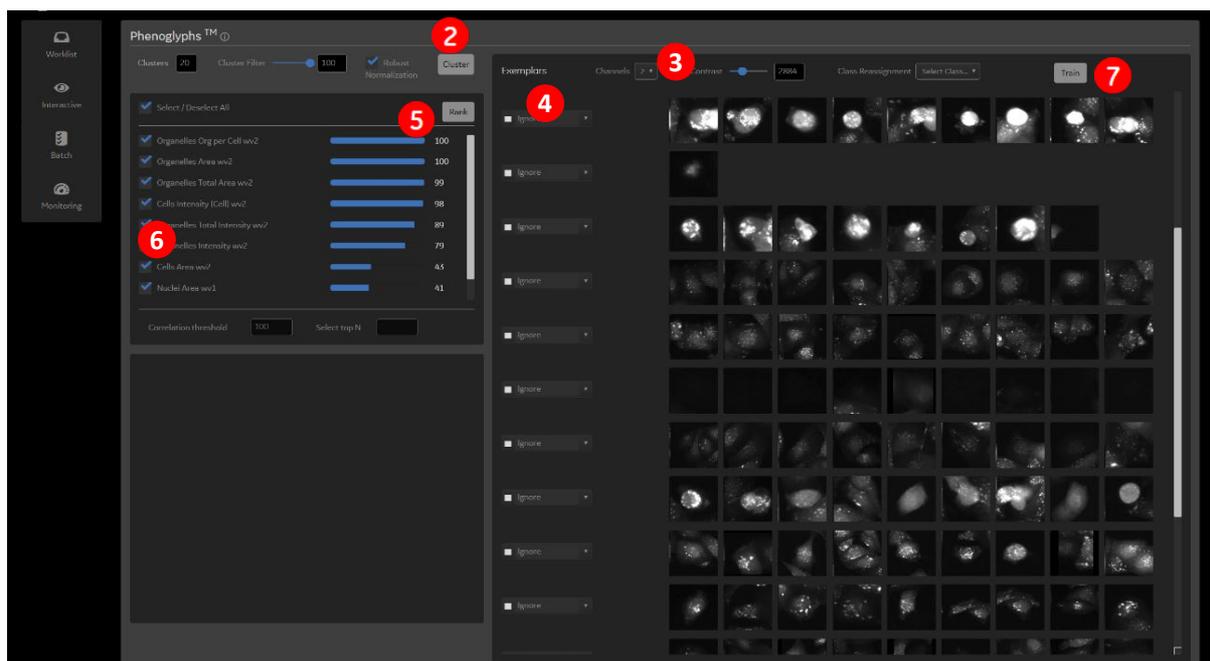
マシンラーニグ Phenoglyphs (オプション)

Phenoglyph は多項目による Classification をマシンラーニグによって行い機能です。分類すべきクラスター数が決まっていな、あるいは着目すべき表現型が未知の場合に有効です。

1. プロット右上の **1** をクリックします。



2. Clusters (分類したい数 ; デフォルト 20) を指定して、 **2** をクリック。指定した Cluster 数に分類されます。
3. 複数カラーの場合、Channel の変更ができます。 **3**
4. 類似するクラスに同じ名前と色をつけて、クラスをまとめます。 **4**
5. **5** をクリックすると、分類に使用するパラメータとその重み付けを確認することができます。
6. 分類に不要なパラメータがある場合、チェックを外して Cluster をクリックすることで再度分類ができます。 **6**
7. **7** をクリックすると 4 のオペレーターによるクラス分類に従って Classification model を学習します。



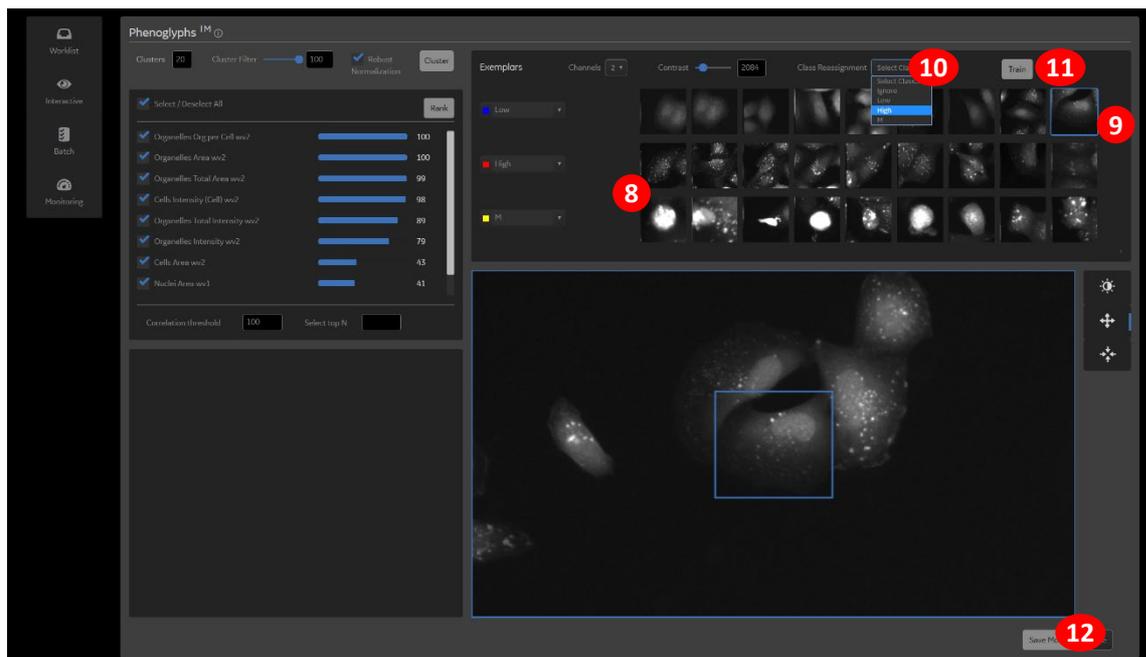
8. 必要な数のクラスにまとめます。 **8**
9. そのクラスにふさわしくないと判断された細胞があれば、その画像を選択します。 **9**
10. Class Reassignment から分類すべきクラス名を選択します。分類が不明確で学習に含めたくない画像の場合は

Ignore を選択します。10

11. Train をクリックします。11

* 9.~11.

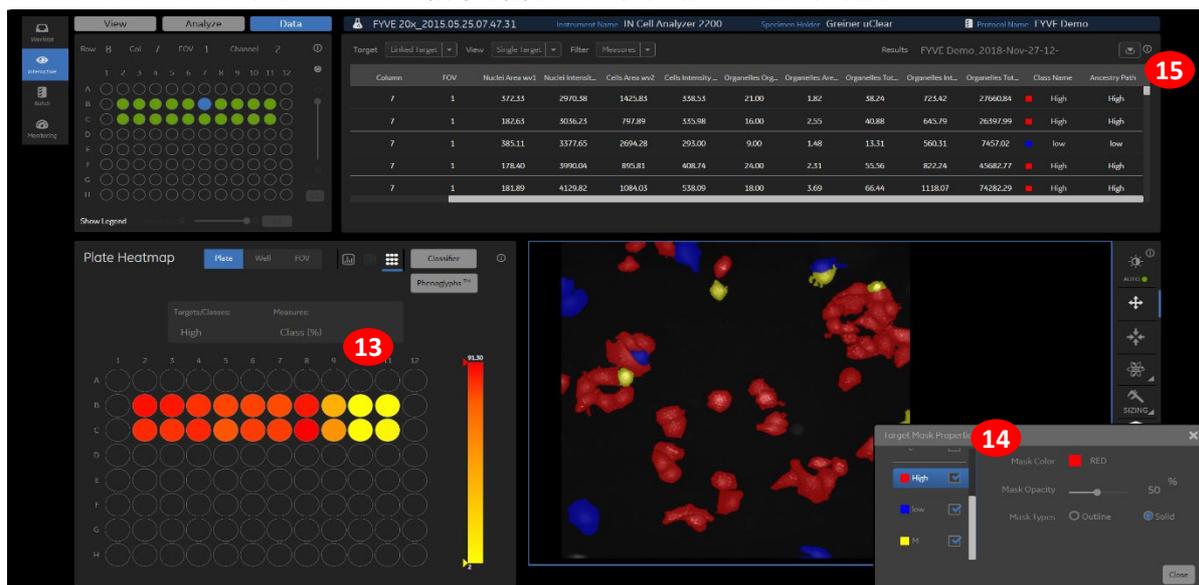
12. 最後に Save Model 12 をクリックします。



13. Plate Heatmap の項目を切り替えることで、各ウェルにおけるクラスの割合が表示できます。13

から、各クラスの細胞を色分けすることができます。14

15. Download Result 15 から、Cluster の結果を含む.csv ファイルがダウンロードできます。



モレキュラーデバイスジャパン株式会社

Phone: [0120-993-656](tel:0120-993-656)

Web: www.moleculardevices.co.jp

Email: info.japan@moldev.com

