

8. ImageJによる定量解析

8. ImageJによる定量解析

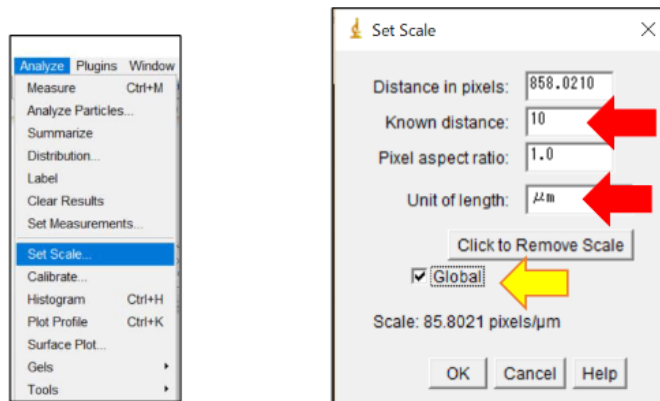
- IPにより取得した画像データから定量する際には、黒化度の度合いを測定します。
- IPデータの単位はPhotostimulated luminescence (PSL)。
- 昨日の液シンと同様に標準線源も同時に測定することで、PSLからBqに換算が可能。
- 解析にImageJを使います。

ImageJについて

- 無料なのに機能満載。
- 単純な定量だけなら追加のプラグイン等は必要なし。
- 英語で取っつきにくい。
- 日本語パッチもあります。ただし、使い方を検索した際に日本語マニュアルはたくさん出てきますが、説明画像は英語となるため、日本語化するとむしろわかりにくくなります。

③Analyze→Set Scale

赤矢印のところに「10」(測定した長さ)「 μm 」(単位)を入力する。「Global」に☑



Q8 Eさんのスマホは、管理区域外に持ち出すことができますか？

皆さんそれぞれの定量結果を基にして判断してください。

持ち出すことが不可の場合、どうしますか？

対応策を管理者の立場で考えてください。

- 対応策を発表してもらいます（1人3分程度）。
- パワーポイントで発表資料を作ってください。
- スライドサイズをワイド画面（16:9）に設定、フォーマットや枚数等に規定なし。文字サイズは小さいと後方席が厳しいかも。
- 発表資料ができましたら、USBにファイルを入れて前のPCに。
- ファイル名は受講番号（01-28まで）にしてください。
- 発表の開始時間は〇〇です。

画像解析

(オートラジオグラフィ)

目的

オートラジオグラムの解析を題材として
画像解析の基礎を身に付ける

Fiji (ImageJ) をインストールしていますか？

IP画像のデータはUSBにて配布しています。
受講 # 1-14、15-28に分かれています。

概要

(1) 画像の読み込み・表示

画像ファイルの読み込み

画像フォーマット

疑似カラー表示・コントラスト調節

(2) 定量解析

ROI Manager の操作

各種の領域選択法

定量計算

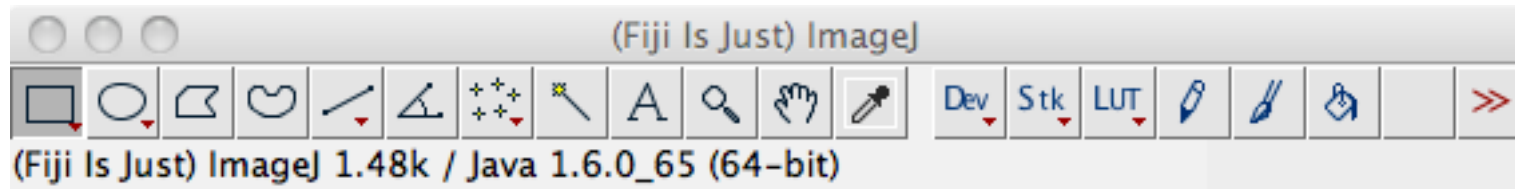
(番外編) インストール

Fijiのインストール

(1) 画像の読み込み・表示

画像ファイルの読み込み手順

Fijiのウィンドウに画像ファイルをドラッグ&ドロップするとオープンされる。
タイトルバー以外ならウィンドウのどこにドロップしても良い。
※ メニューの File > Open でファイルを選んでも読み込み可能。



↑ Windowsとmacで微妙に見た目が変わる。

(参考) 画像のフォーマット

画像フォーマットに関連するImageJ (Fiji) のメリット

1) 非常に多くの画像フォーマットを処理できる

特に設定を行わなくても一般的なフォーマット (jpg, png, tif, bmp) の多くを読みめる。

2) 32bit TIFFを扱える

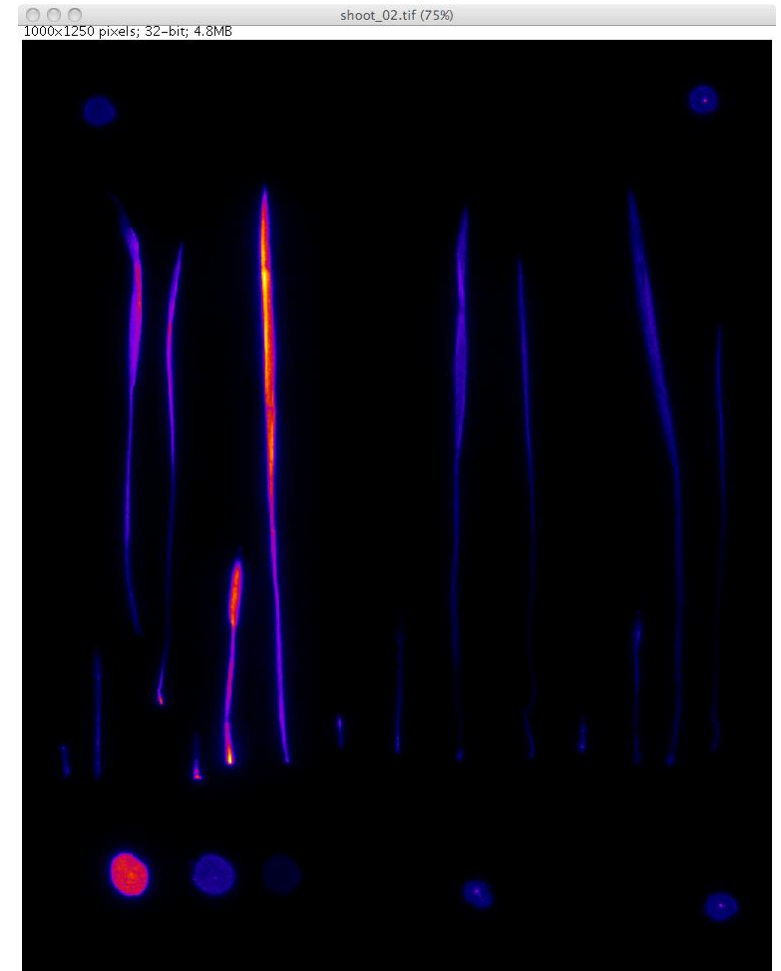
- 画像上のある点 (ピクセル) のシグナル強度を、一般的な8bitデータでは $2^8=256$ 階調でしか表現できない。
- イメージングプレートは5~6桁のダイナミックレンジを持つと言われているが、
- 8bit画像ではたかだか3桁までのダイナミックレンジしかない。
- IPの読取装置によっては (FLA-5000) で出力したtif画像はISACという古い医療系のフォーマットでデータを保存している。これを“ISAC Managerというプラグインを使って読み、それを32bit TIFFに変換することが可能である。
- 本実習ではFLA-7000を使用、tifは16bitで出力される ($2^{16}=65536$ 階調) 。そのため、変換せずにそのまま使用します。

疑似カラー

画像タイプがグレイスケール（8-bit, 16-bit, 32-bit）の場合、疑似カラーを用いてシグナル強度の違いを分かりやすく表示できる（人間の目は濃淡の変化よりも色彩の変化に鋭敏なため）。

Image > Lookup Tables に様々な設定があるので実際に試して見やすいと思ったものを用いると良い。

下記のシグナル強度と色の関係は、何も画像を開いていない状態で Lookup Tables を選択すると表示される。

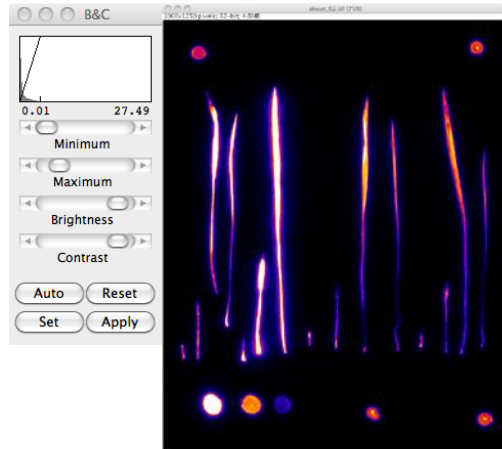
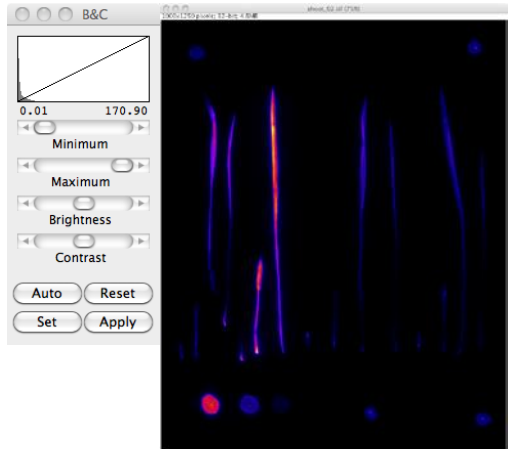


※ 疑似カラーはデータ自体を変更しているわけではなく、表示を変更しているのみ。
そのため、一度画像を閉じると元のグレイスケールに戻ります。

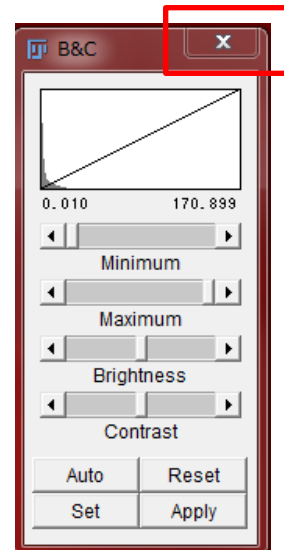
コントラスト調節

Image > Adjust > Brightness/Contrastで、コントラスト調節用のウィンドウが表示。
4つのスライダー（Minimum, Maximum, ...）を動かし、画像表示の変化を体感してみると良い。
スライダーで微調整できない数字に設定したい場合は画面下部の「Set」ボタンを利用する。

ただし、Applyを押さないこと！！！！



※最初に読込んだ際の見たとらわれず、調整してみることに。
黒つぶれ、白とびとされているところにも情報があるかもしれない。



調整したら、Applyを押さずに閉じるボタンで終了すること。
もしくは、ウィンドウを閉じずに表示させたままでもOKです。

コントラスト調節・疑似カラー設定時の注意

ImageJでグレースケール画像を扱う場合、コントラストの変更もLookup Tablesの変更も、データそのものではなく画面上の表示だけが変更されます。ただし、B&CウィンドウのApplyボタンを押すと実際のデータも変更されるため、Applyは使わない方がよい。

見た目の変更は解析結果に影響しないので、解析作業中は作業しやすいコントラスト・Lookup Tablesを選択すると良い。シグナル強度の高い領域に注目して作業する場合はB&CウィンドウのMaximumを高めに設定し、低い領域に注目する場合はMaximumを下限近くまで下げたほうが作業しやすいはずである。

コントラスト・Lookup Tablesで見た目を調整した画像を保存したい場合、File > Save As からTIFF以外のフォーマット（jpgやpng）を選んで保存すると良い。

また、キーボードの「+」「-」を押すことで拡大・縮小が可能だが、これも見た目のみの変更である。後述する線分の端点など、正確な位置合わせが必要な際に活用すると良い。

(2) 定量解析

イメージングプレートで得られる画像データのシグナル強度は、放射線量と高い相関を持つ。ImageJ (Fiji) に含まれる画像解析ツールを用いてシグナル強度を解析することで、可視化したサンプルに含まれるRI量を数値化できる。

本実習で触れる手法には、RIの定量以外にも電気泳動のバンド解析や染色細胞の自動計数など、様々な利用法がある。

定量の手順

Step1. 解析したい領域に囲いをつける。

Step2. 囲いを登録

Step3. 囲い内のシグナル量（PSL）を測定

Step4. 検量線（PSL-Bq）を作成

Step5. ノイズ（バックグラウンド）の除去

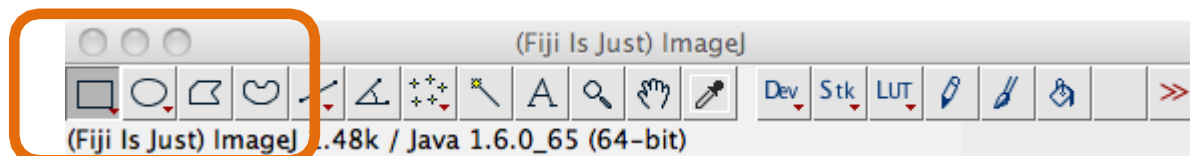
Step6. 検量線からサンプルのBqを算出

Step1. 解析したい領域に囲いをつける

ImageJで定量操作を行う場合、何らかの方法で関心領域（Region of Interest, ROI）を設定し、その内部のシグナル強度等の情報を収集する。

ROIの作製方法

Rectangular や Freehand を使って図形を描き、選択領域とする。



これらを使って囲いを作る！

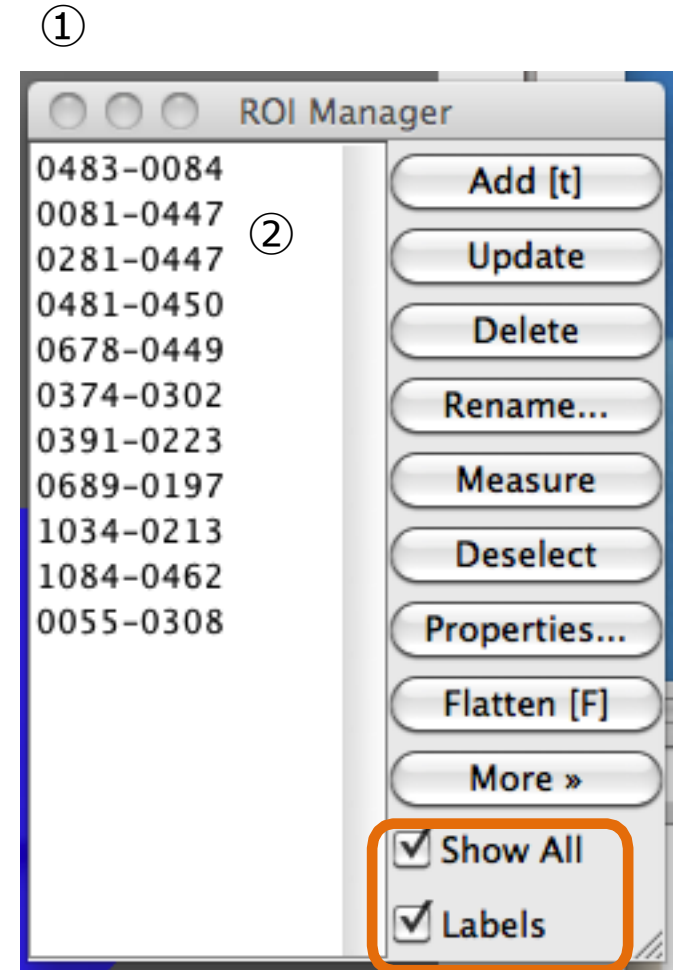


Step2. 罫いを登録

① Analyze > Tools > ROI ManagerでROI Managerウィンドウが表示される。
同一画像に複数のROIを設定したり、異なる画像に同一のROIを設定したい場合に便利である。
ROIを移動することもできる。

② 領域選択を行った状態でROI ManagerのAddボタン（またはキーボードの“t”）を押すと、選択領域がROIとして登録される。
登録されたROIは自動的に数字とハイフンからなる名前が付くが、分かりにくければPropertiesから名前を変更することもできる

③ Show AllとLabelsに✓を入れておくと使いやすい。



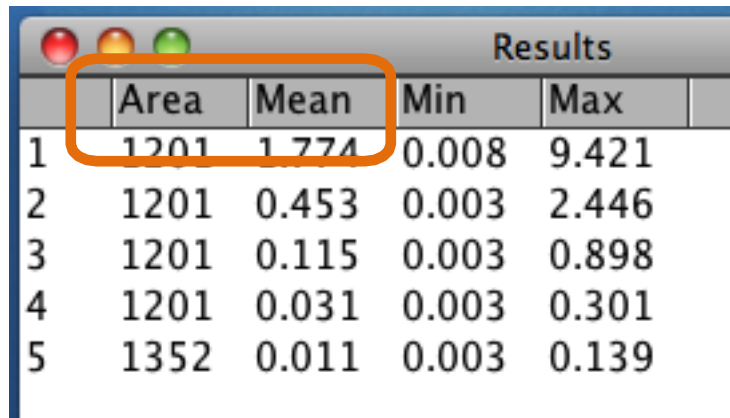
③

Step3. 囲い内のシグナル量（PSL）を測定

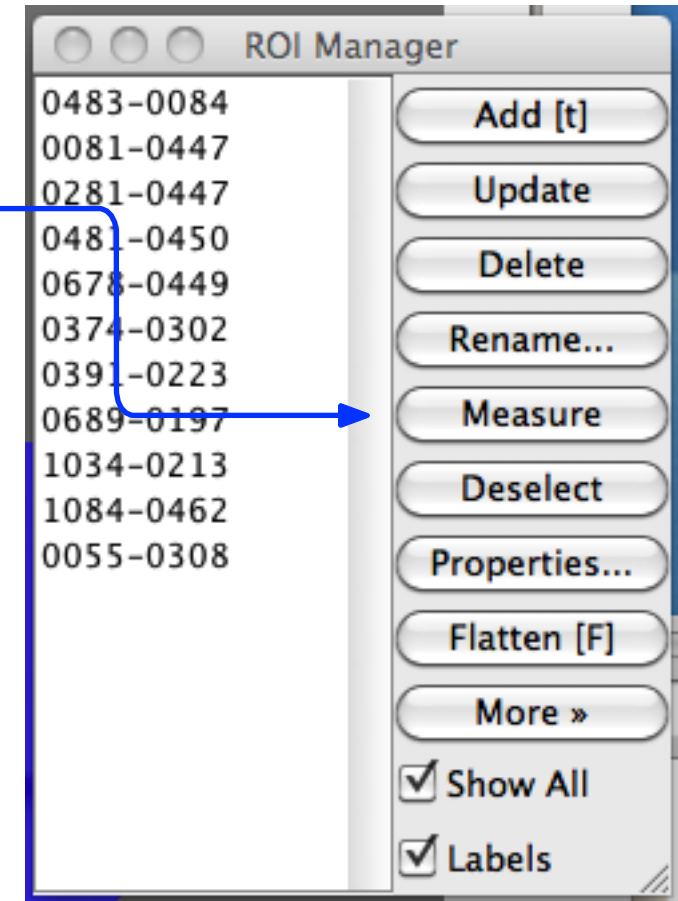
全てのROIを登録したら、ROI Managerで登録されたROIを全て選択し、Measureボタンを押すと定量結果が表示される

（File > Save Asで保存する）。

今回の場合は Area と Mean が必要な情報。



	Area	Mean	Min	Max
1	1201	1.774	0.008	9.421
2	1201	0.453	0.003	2.446
3	1201	0.115	0.003	0.898
4	1201	0.031	0.003	0.301
5	1352	0.011	0.003	0.139

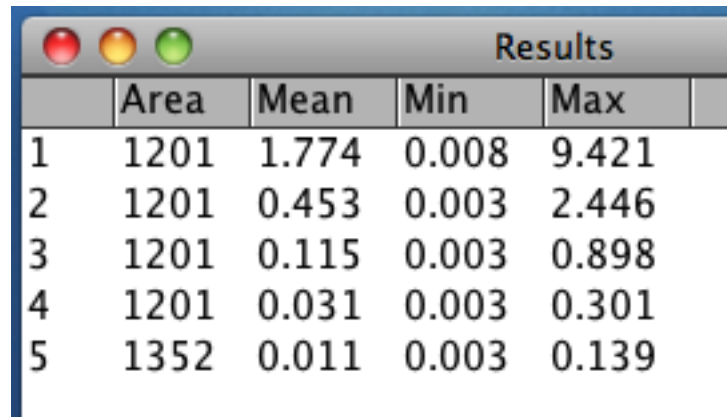


※ Area, Meanが表示されていない場合は、測定結果のツールバーにある Results > Set Measurements > Area, Mean gray valueの2つにチェック。

Step4. 検量線（PSL-Bq）を作成

Area と Mean の積がROI内部のシグナルの総和を示す。

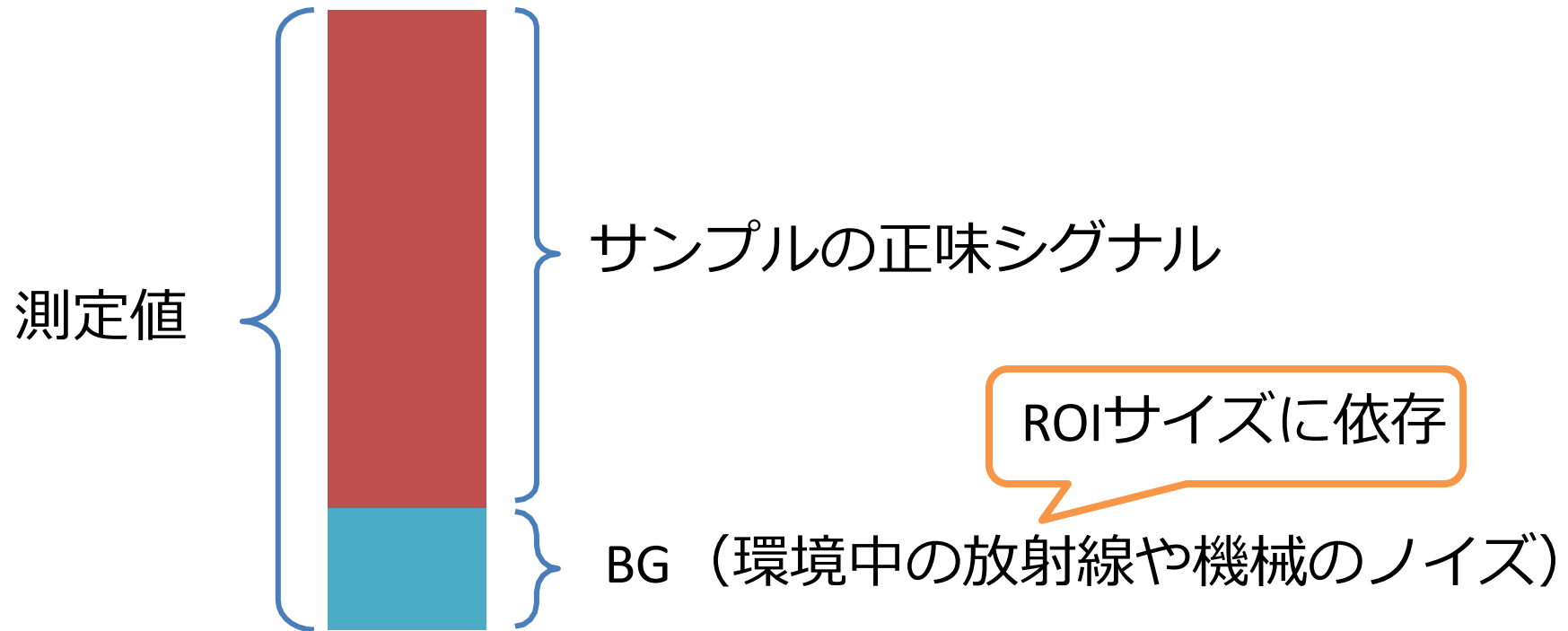
シグナル強度は試料の放射能に比例するため、
標準溶液のスポット（濃い方からそれぞれ 1000, 200, 40, 8 Bq）のROIのシグナル強度から
検量線を作成することで、アルミプレートのROIの放射能が算出できる。



	Area	Mean	Min	Max
1	1201	1.774	0.008	9.421
2	1201	0.453	0.003	2.446
3	1201	0.115	0.003	0.898
4	1201	0.031	0.003	0.301
5	1352	0.011	0.003	0.139

Step5. ノイズ（バックグラウンド）の除去

IPは環境放射線によって常にシグナルを蓄積する。この影響を除外するため、IP上のサンプルが存在しない位置にROIを設定し、バックグラウンドのシグナル強度を算出し、これを各サンプルのROIの値から減算する必要がある。



サンプルの正味シグナル強度

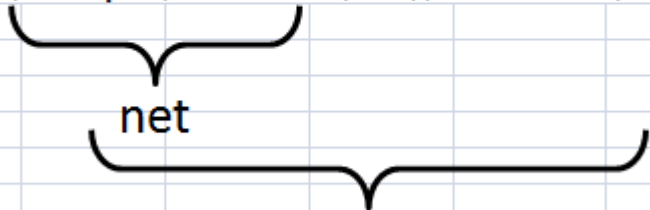
$\text{Mean}(\text{Sample}) \times \text{Area}(\text{Sample}) - \text{Mean}(\text{BG}) \times \text{Area}(\text{Sample})$

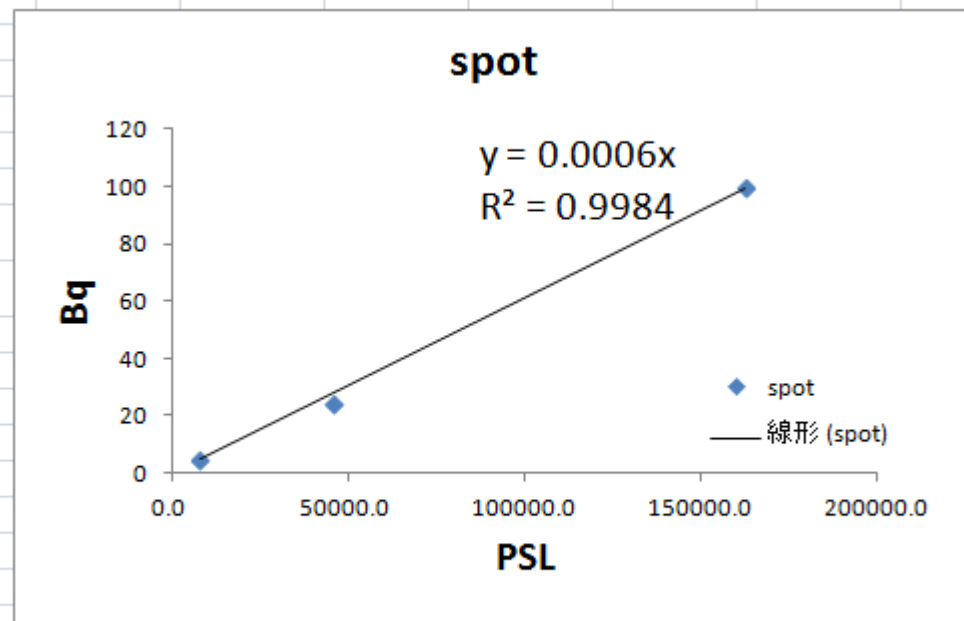
つまり..... $(\text{Mean}(\text{Sample}) - \text{Mean}(\text{BG})) \times \text{Area}(\text{Sample})$

Step6. 検量線からサンプルのBqを算出

標準溶液のスポットから検量線を作製

→ PSLからBqに変換が可能となる。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1		Area	mean	net	Total									
2	100	6367	25.525	25.5	162415.8									
3	25	6367	7.142	7.1	45371.2									
4	5	6367	1.257	1.2	7901.4									
5	BG	6367	0.016											
6														
7	サンプルの正味シグナル強度													
8	(Mean(Sample) - Mean(BG)) × Area(Sample)													
9														
10														
11														
12														
13														
14														
15														
16														
17														
18														
19														

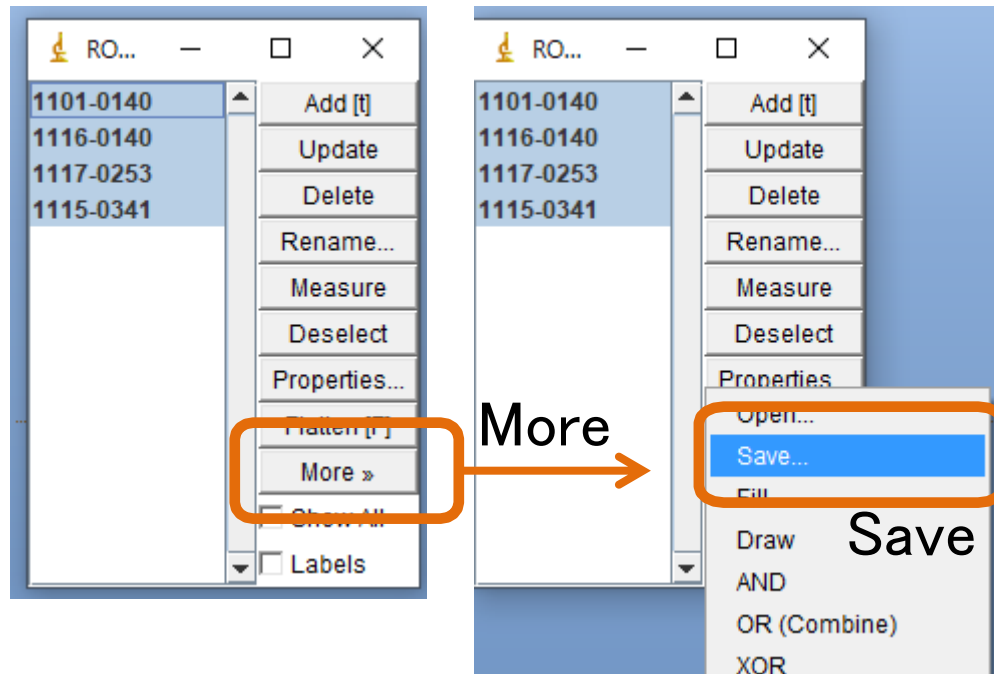


登録したROIの保存

解析した後日に、ROIの修正や追加等を行えるように、登録したROIの保存を行きましょう。

(保存しないとまた最初からROIを作る必要があります)

保存したいROIを選択（基本的には全部）
青色に反転していればOKです。



1つのROIを保存した場合の拡張子はroi、複数ROIを保存した場合はzipフォルダで保存されます。

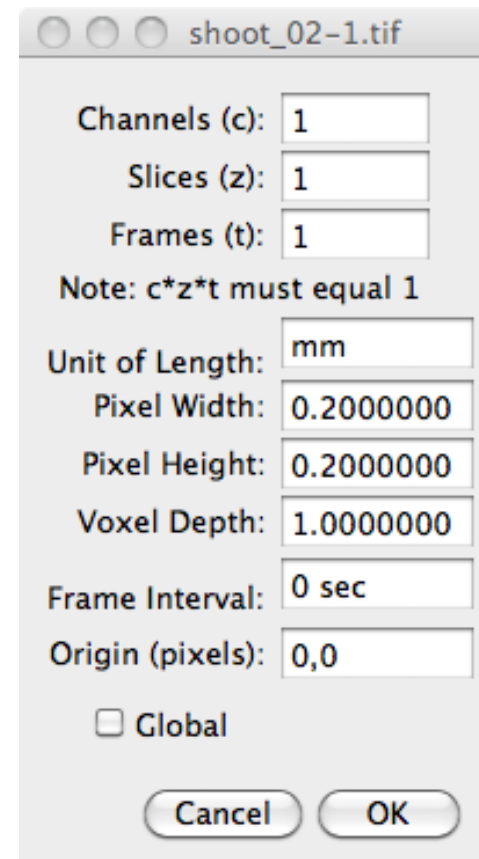
再度、ROIを表示させる場合、元画像を開いた状態で、保存したROIファイルをImageJツールバーにドロップするだけです。

スケール情報の入力

Image > Properties から画像のスケール情報を指定できる。
この実習で用いるIP画像は $200\text{ }\mu\text{m/pixel}$ でIPを読み取ったので、
Unit of length にmm、Pixel width と Pixel height に0.2を入力
してOKを押す（※1）。

この状態でAnalyze > Tools > Scale Barを実行すると、mm単
位のスケールバーを入れることができる（※2）。

なお、線分を引いた際のlengthの単位もpixelからmmに変化し
、後述の定量作業の際のArea表示も平方mm単位となる。



※1 μm を指定したい場合、「um」と入力する（ギリシャ文字のマイクロではなく小文字のuを使う）。

※2 ImageJ本来のScale Barと異なり、Fijiに含まれる「Scale Bar Plus」にはOverlay オプションがあるので✓しておくが良い。画像に直接書き込まれるのではなく、Overlayとして入力されるので、ROIマネージャー等で修正できる。



(番外編) インストール

画像解析ソフト（Fiji, ImageJ） のインストール方法

- 実習でIPを使った定量を行います。
- IP画像による定量は輝度値（色の濃さ）を測定します。その際に画像解析ソフトを使います。
- 実習に持参するPCにFijiもしくはImageJ（両者ともに無料）を予めインストールしておいてください。
- Fiji以外でも使い慣れている画像解析ソフトが既に入っている場合は、そちらを使っていたいただいても大丈夫です。



Fiji

ImageJと各種プラグインをセットにしたもの。

インストールが楽（アップデートも自動）。ダウンロード後に展開し、Fiji.appを適当な場所にコピーするだけで使える。

公式サイト <http://fiji.sc/Fiji>



ImageJ

✓医療・研究用の画像処理／解析ツール。
✓アメリカ国立衛生研究所（NIH）で開発
✓オープンソースであり、無償で入手可能。
Windows、Mac、Linuxで動作する数多くのプラグインが公開されており、機能を追加できる。

公式サイト <https://imagej.net/ij/>

- Fijiを使ってもソフト自体はImageJになります。
- 無料系画像解析ソフトは多数ありますが、論文ではImageJが圧倒的に多く信頼性が高い。
- 操作法などをWeb検索する際は、FijiとImageJの両方をキーワードとして試すと良い。

使い方はFijiとImageJは同じです。

本実習では特殊なプラグインは使用しないため、どちらでも大丈夫です。

Fijiのインストール

① 公式サイト (<http://fiji.sc/Fiji>) で Downloadをクリックする。

② 自分のOSに合わせてFijiをダウンロード。

OSの確認方法

Windowsの場合、

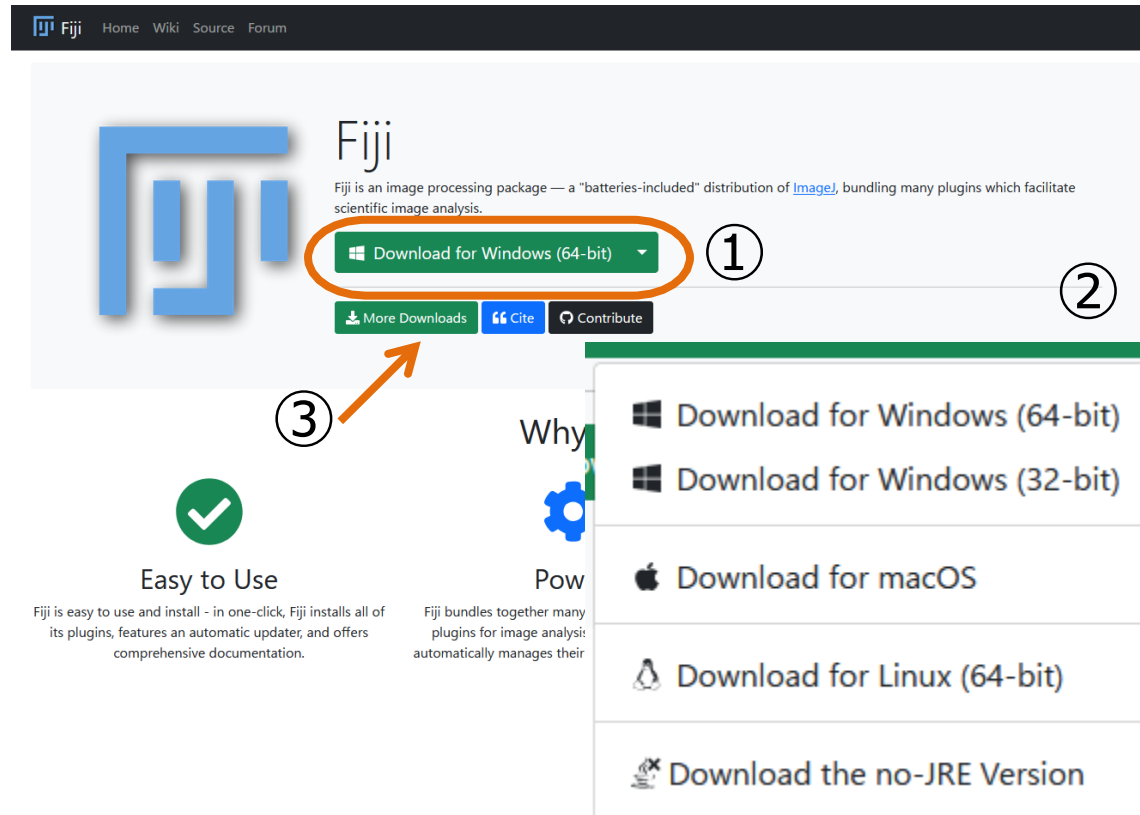
ウィンドウズキー + Pauseキーで確認



③ Fijiは常にアップデートしているため、過去の安定版が必要な時は

「More downloads」から入手。

※必要となることはほとんどないです。



Fiji インストール時の注意

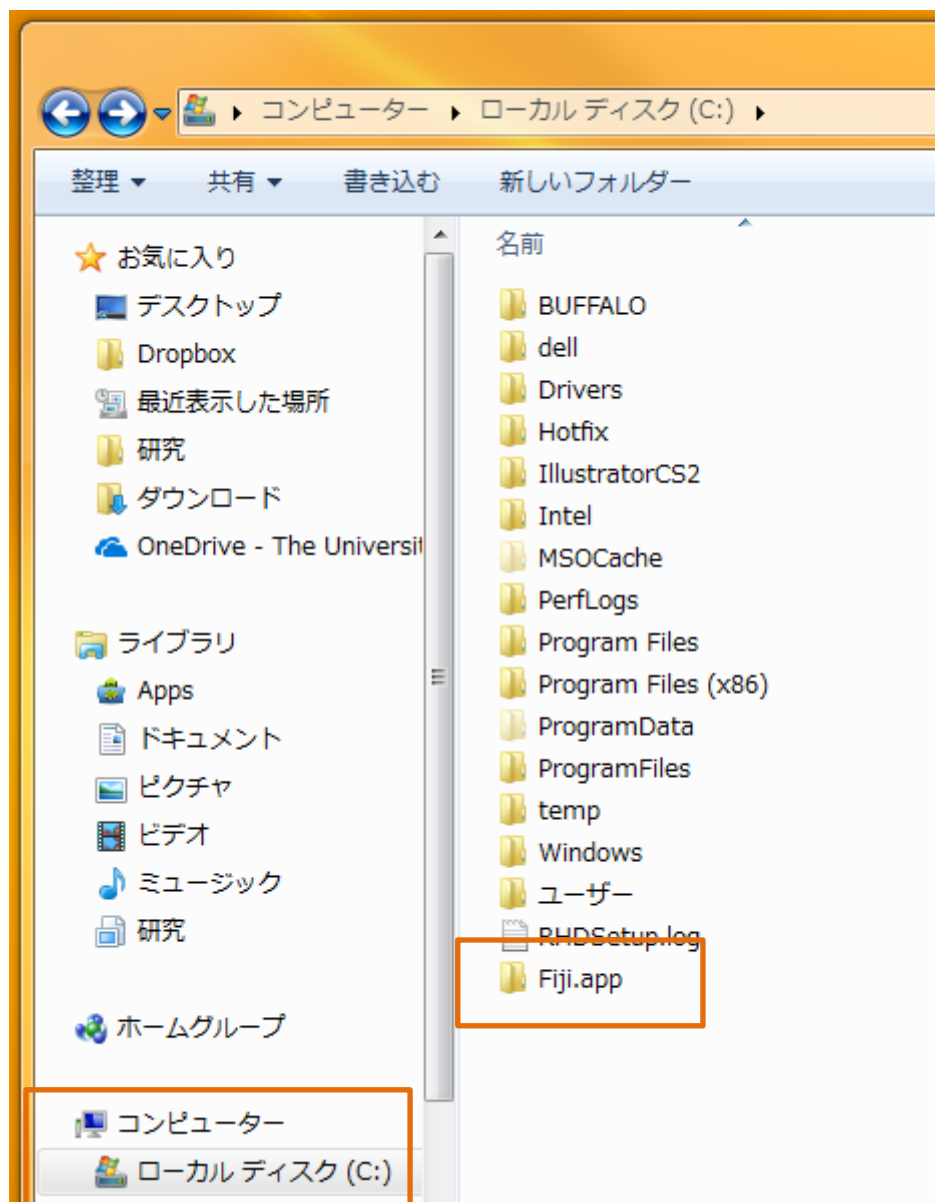
Fijiは基本的にコピーするだけで動くが、コピー先として

「日本語および空白」を含まないフォルダを選ぶ必要がある。

コンピューターのユーザー名に日本語を使っている場合、Cドライブ直下にコピーするのが無難。それ以外の場合、デスクトップにコピーするだけで動作する。**Program Files**は空白を含むので不適。

ひとまずデスクトップで動かしてみて、ダメそうならコピー先を変えてもよい。

Macの場合、Applicationsにインストールするのが無難。



ユーザー名の確認方法

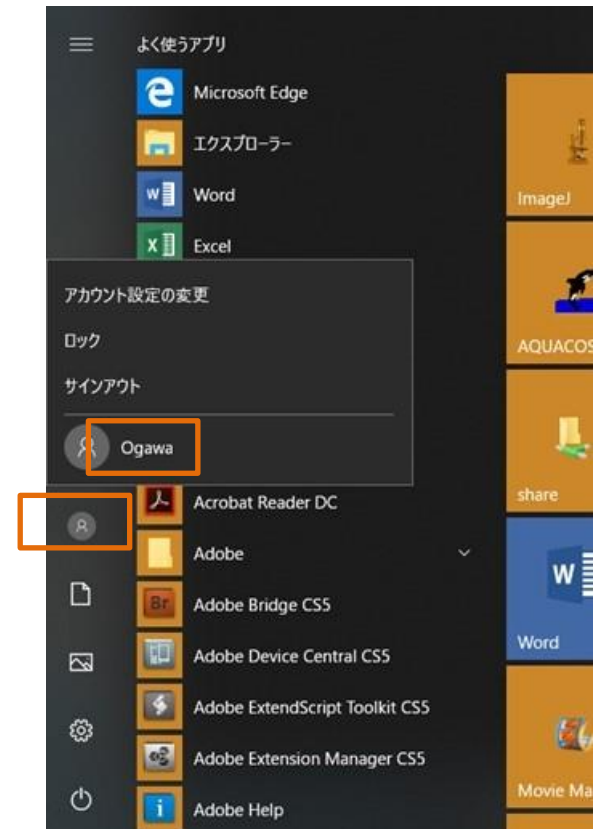
1) windows 7



2) windows 8



3) windows 10



ユーザー名に空白があっても問題なく動くことは多いですが（例：Ryohei Sugita）、日本語の場合は不具合が起きるケースが多い気がします。

半角スペースあり

Fiji 起動について

Windowsの場合

Fiji.appという名前のフォルダにある

64bitの場合：ImageJ-win64.exe

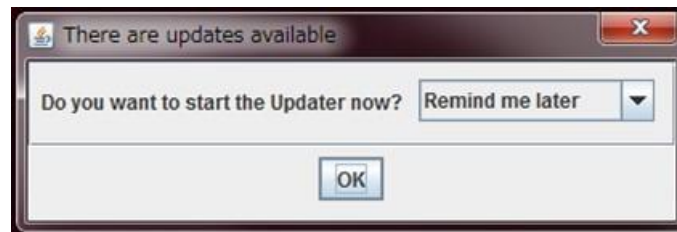
32bitの場合：ImageJ-win32.exe

をダブルクリックすると起動する。

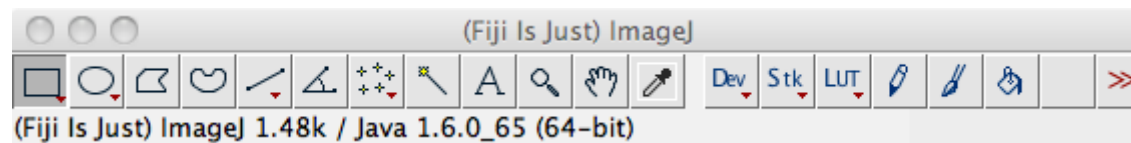
Macの場合

Fiji.appというアプリをそのまま起動。

pluginsフォルダ等にアクセスしたい場合は右クリックメニューで「パッケージの内容を表示」を選ぶとアクセス可能。



初めて起動する場合、アップデートのメッセージが出ます。
時間に余裕がない場合などは、アップデートを行わなくてもOKです。



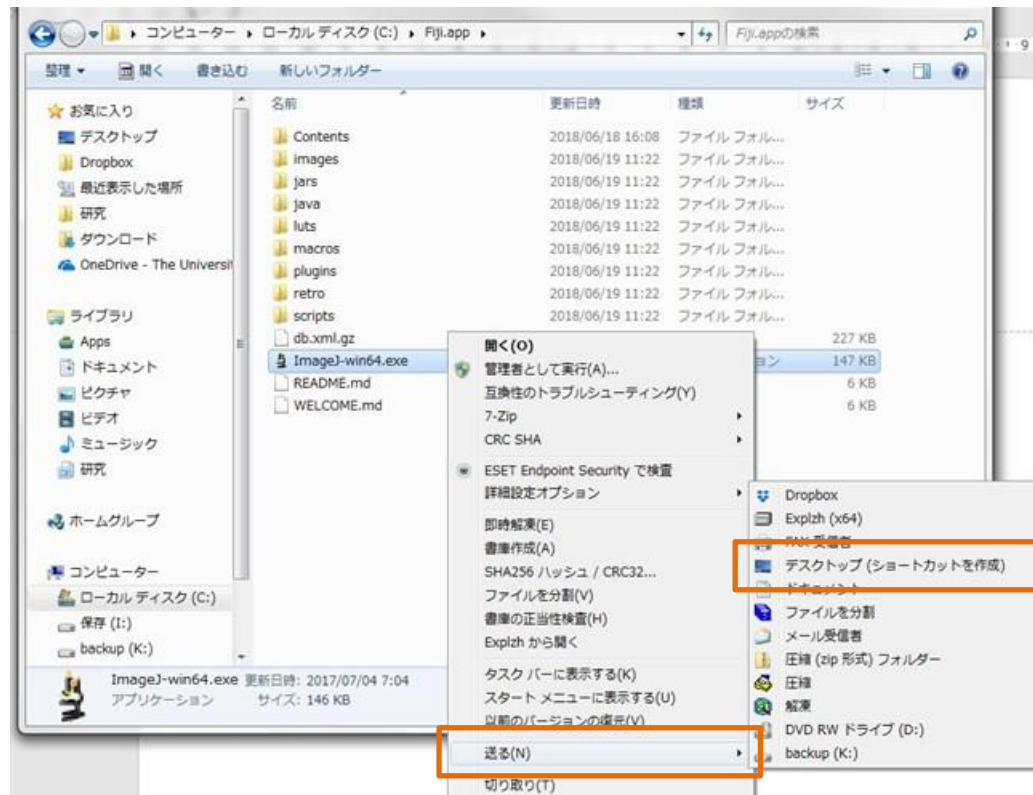
インストールがうまく行えている場合、起動すると上記のツールバーが出てきます。
出てこない場合は、インストールがうまくできていません。

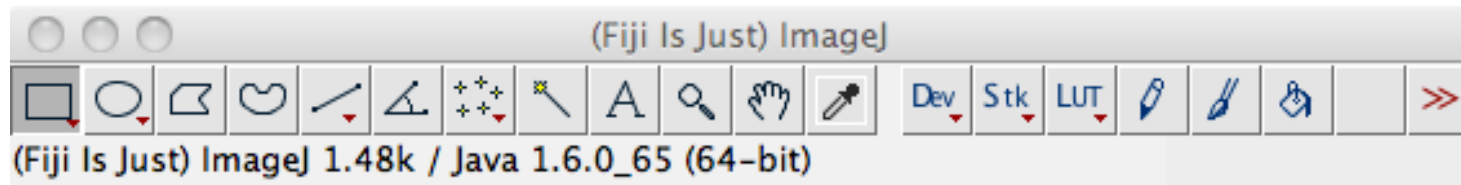
(失敗の原因はおそらくユーザー名が日本語のため)

FijiのフォルダをCドライブに移す等、試してみてください。

Fiji を頻繁に使う場合

Cドライブから起動するのは少し手間がかかるため、起動ファイルのショートカットをデスクトップに作成しておくと便利。





* Verによって、見た目は多少異なる可能性があります。

実習当日までに↑↑↑の画面がでるようにしておいてください。