

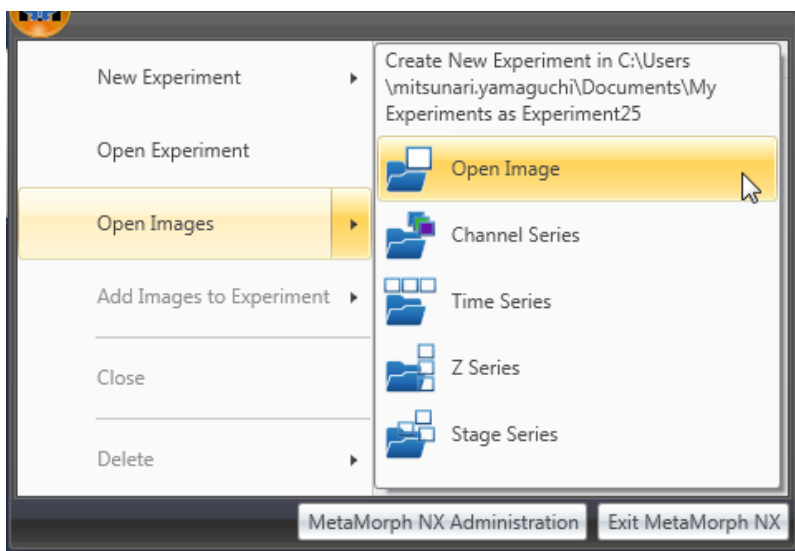
## MetaMorphNX のファイル Load について

MetaMorphNX ではファイルの Load はウィンドウ左上のアイコンより行います。



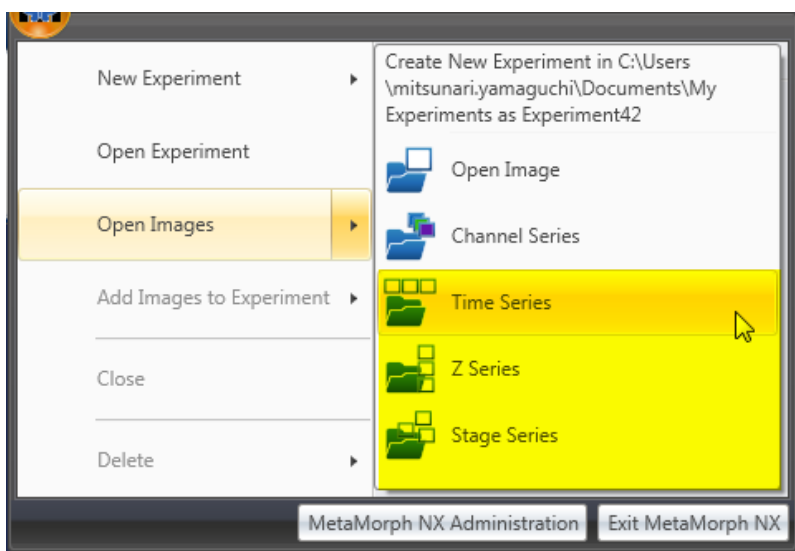
### 1. シングルプレーン(1枚画像)

Open Image→Open Image で対象ファイルを選択します。



### 2. Stack ファイル(タイムラプス、Z軸スタックなど)

Open Image→Time Series、Z Series、Stage Series など、開く Stack ファイルがどの次元情報の物か選択してください。



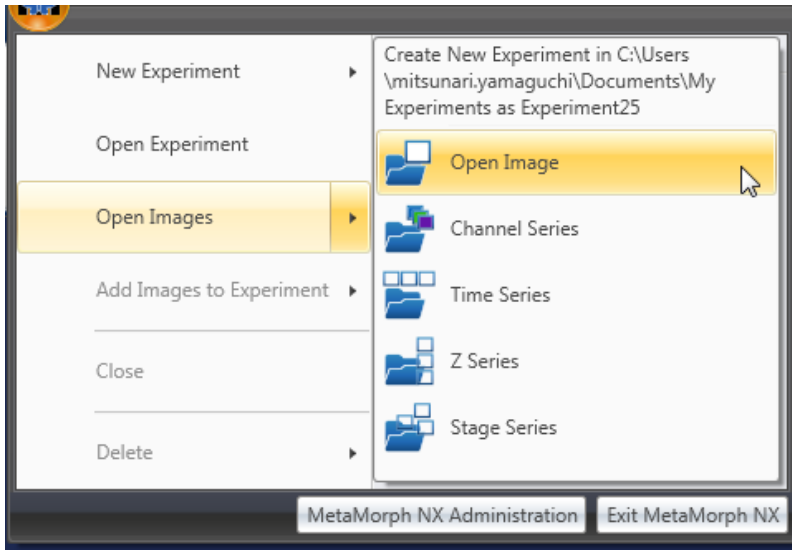
\*Stack ファイルは Open Image→Open Image でも Load 可能ですが、その場合、すべて Z Stack ファイルとして取り扱われます。

\*連番のファイル(例 : Image001.tif, Image002.tif, Image003.tif...)の場合、次元情報に沿ったシリーズで対象となる連番ファイルすべてを選択することで、Stack ファイルとして Load できます(従来の MetaMorph の Buld Stack に近いイメージです)

### 3. 多次元データフォーマット

(MetaMorph の.nd フォーマットや他社製 LSM フォーマットデータ等)

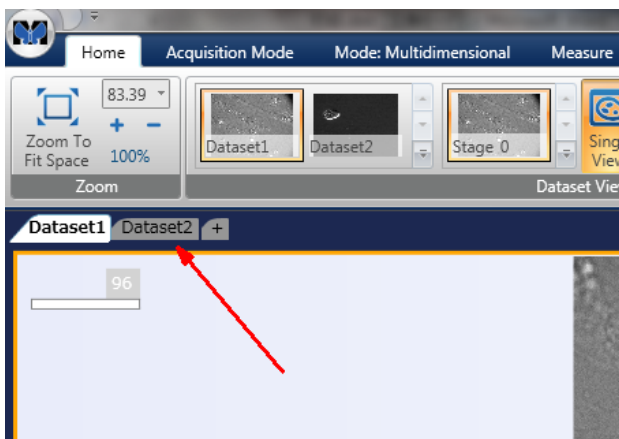
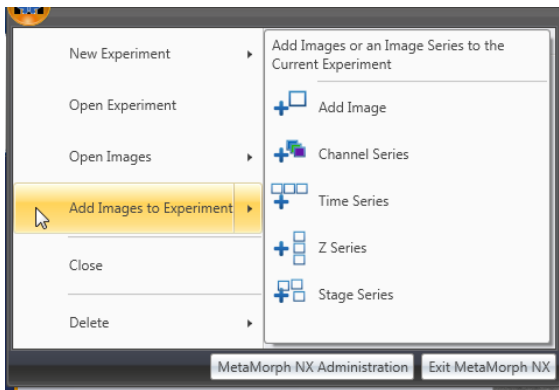
Single Plane 同様、Open Images→Open Image にて.nd ファイルおよび各社 LSM ファイルをしてして開いてください。



### 4. Add Images to Experiment について。

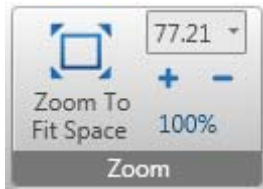
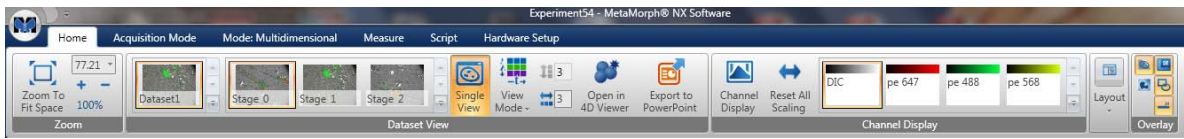
現在 Load しているデータに別シートで別の画像を Load したい場合に選択します。

追加されたイメージは新たな Dataset タブにて展開されます



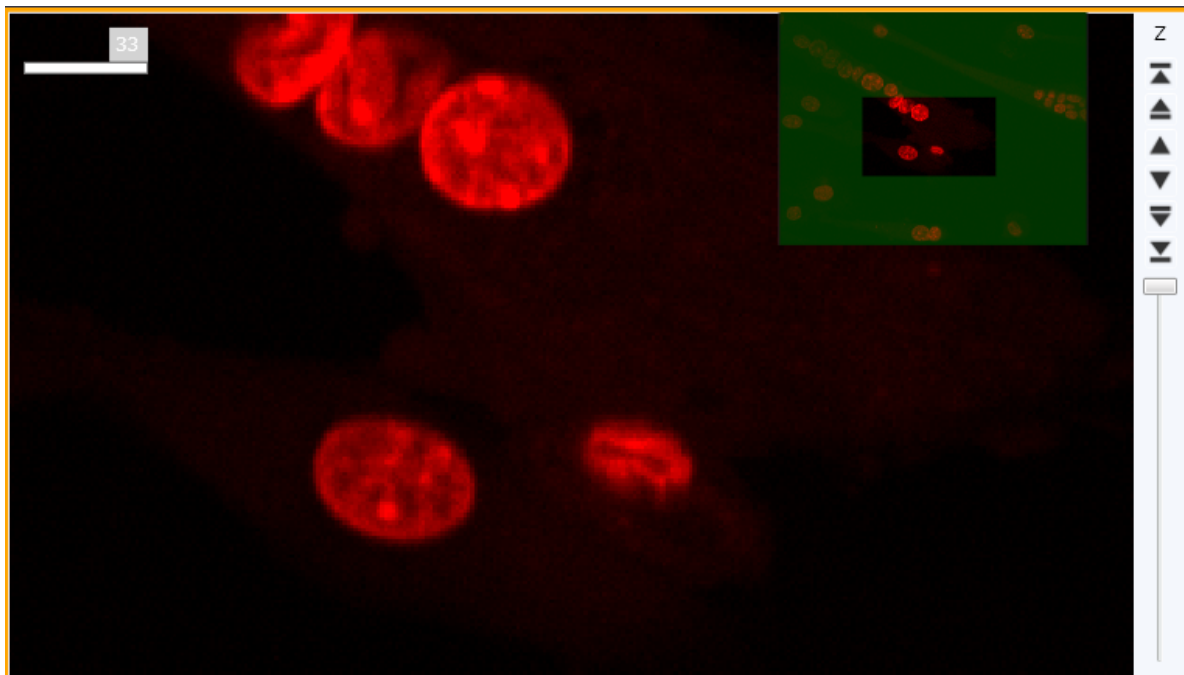
## MetaMorphNX のウィンドウについて

\* Home : 主に画像の表示形式の設定を行います

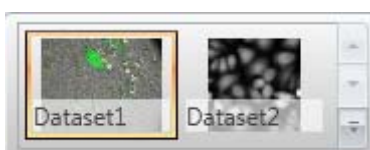


Zoom 設定。マウスのスクロールホイールでも設定可能です

Zoom を行うと右上に Zoom プレビューウィンドウが表示され、どの領域を拡大しているか確認ができます。また、このプレビューウィンドウから表示エリアを移動することも可能です。



Dataset View : 多次元データの表示、データセットの表示の切り替えなどを行います。



Dataset の切り替え

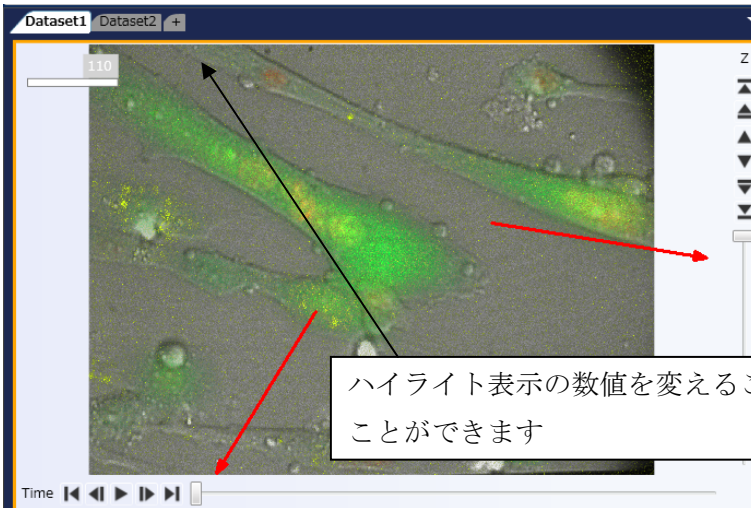


多点データの、表示ステージポイントの切替

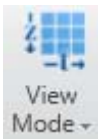


Single View : ウィンドウは1枚の画像で表示されます。

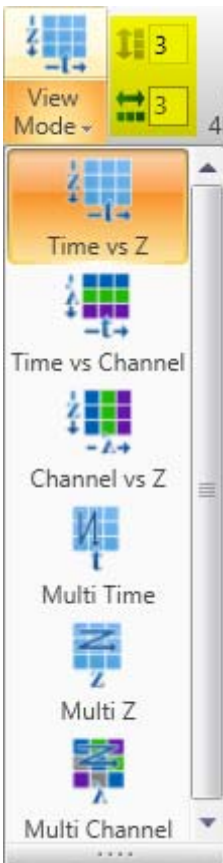
Z スタック、t スタックはスライダーが表示され、任意のプレーンで表示されます。



ハイライト表示の数値を変えることで、タイルの縦、横の枚数設定を行うことができます



View Mode を選択すると以下の表に各種表示形式を選択することが可能です。



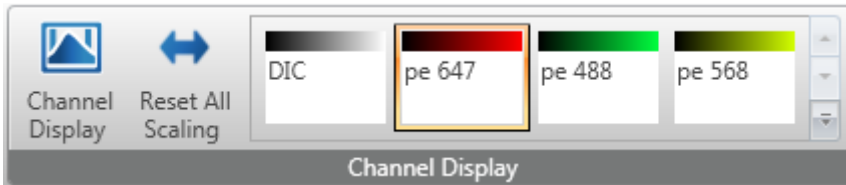
また、ウィンドウ最下部にある Filmstrip では View Mode を切り替えることで、任意次元のデータを連続表示することが可能です。表示された各画像をクリックすることで、その次元データを表示することが可能です



多次元データおよび Z スタックファイルを 3 次元表示形式で展開します



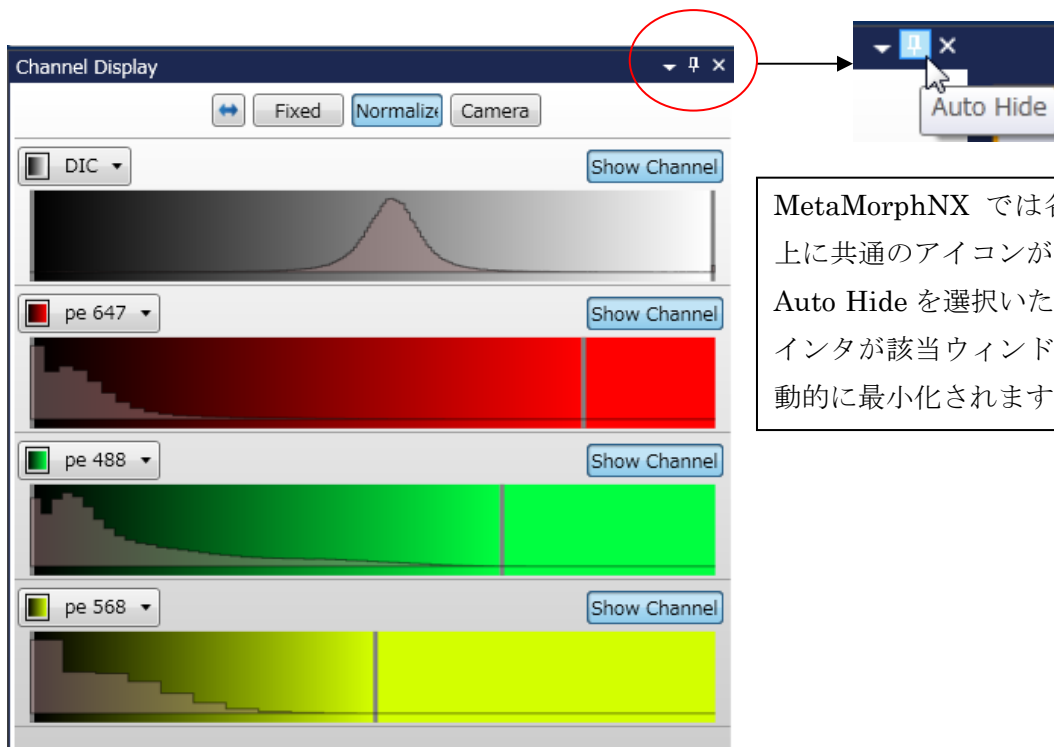
現在表示中の画像を Power Point に出力します。



Channel Display 各波長ごとのスケール調整、疑似カラーの設定を行います。



表示スケールレンジの調整のウィンドウを別ウィンドウにて表示します。



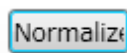
MetaMorphNX では各種ウィンドウ右上に共通のアイコンがあります。  
Auto Hide を選択いただくと、マウスポインタが該当ウィンドウの外に出ると自動的に最小化されます



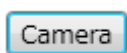
表示レンジを最適値に設定します(従来の Auto Scale に該当します)



表示レンジを指定した輝度絶対値の範囲内に固定します

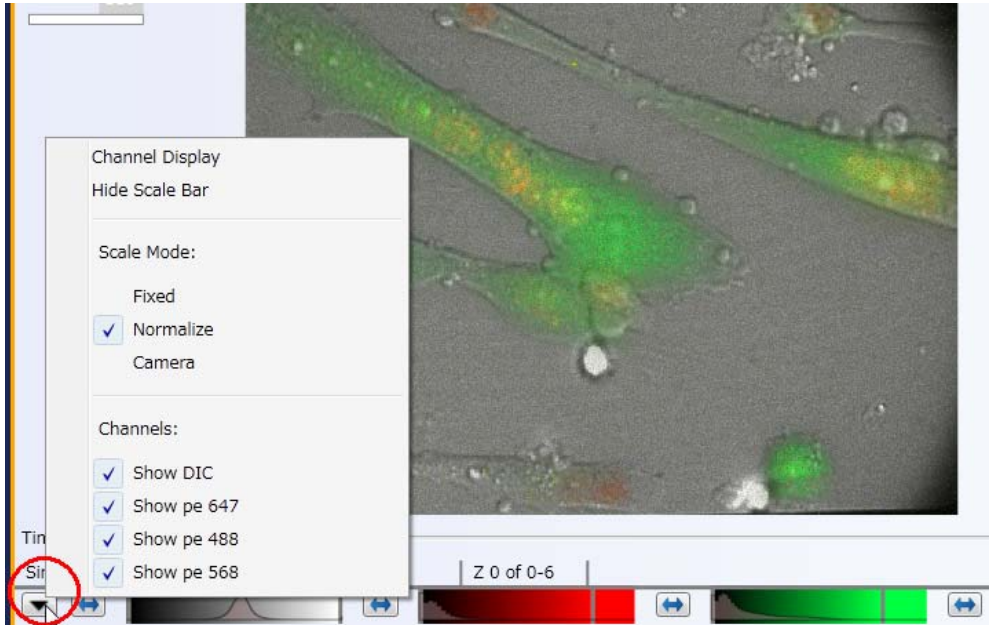


表示レンジを指定したその画像が持つ輝度の存在比率で指定します



表示レンジを撮影したカメラのフルレンジで表示します

Dataset ウィンドウ下部にあるアイコンからも同様の操作が可能です。



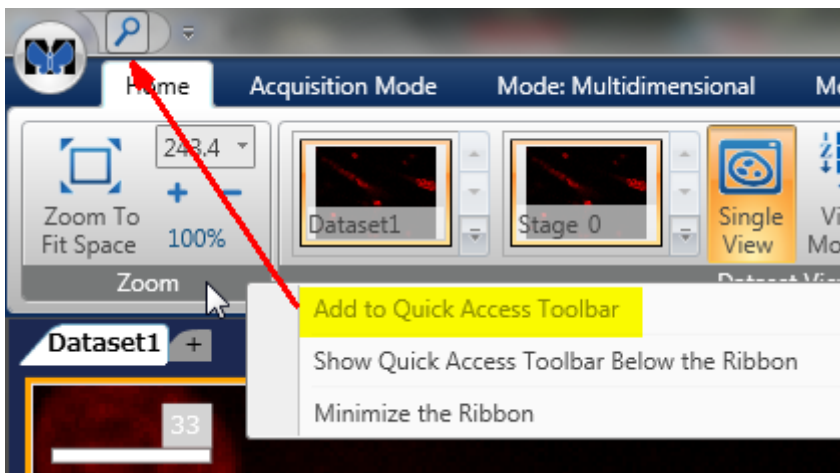
画面レイアウトのリセットを行います



画像上および Dataset 上のオーバーレイ表示の切り替えを行います

それぞれのツールバーの名称のエリアでマウス右クリックを押すことで、サブメニューが表示されます。

Add to Quick Access Toolbar を選択することで、常時選択可能なショートカット”Quick Access Toolbar”を作成することができます。これは NX のリボンメニューすべてに共通です。



\*Acquisition : 撮影の基本設定を行います。(今回は割愛させていただきます)

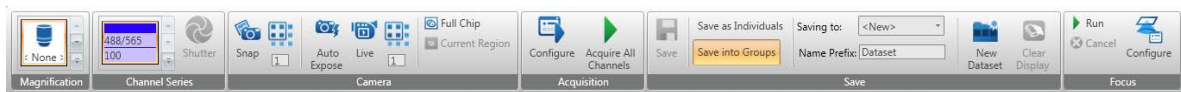


Acquisition Mode で Multidimensional Acquisition か Interactive Acquisition を選択することで、Acquisition のリボンが変更されます

### Multidimensional Acquisition



### Interactive




\*Measure : 画像解析を行います



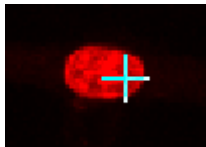
1. Region Measurement : 指定した領域”ROI”の計測。特に時系列データの解析に適しています。

- Region Tool より、目的とする Region を画像上の任意領域に作成します。



\*  Create an auto region は NX で新たに追加された機能です。

輝度情報に基づき、ソフトがある程度対象エリアの領域を認識し、自動で作成します。



ポインタを対象物上に置いて…

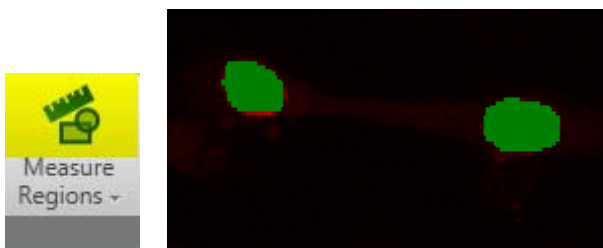


クリックすることで、領域に沿った ROI を作成します

なお、連続でROIを作成する場合はAltキーを押しながらクリックしてください。  
以下の領域をクリックすることでこれら詳細操作について表示されます



2. Measure Regions のアイコンをクリックすると Region Measurement を実行します。計測された領域はハイライト表示されます

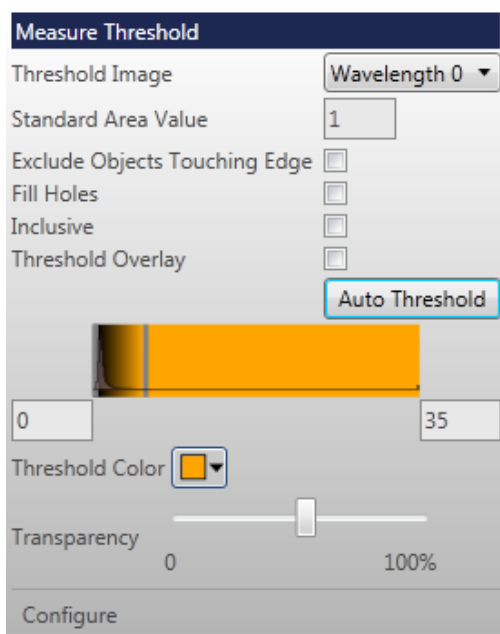




3. Measure Threshold : 輝度閾値で定義された領域を計測します



Threshold ツールから Measure Threshold の文字のある下半分の領域をクリックすると、下記ウィンドウが表示されます。このウィンドウから Threshold の設定を行います。Threshold の領域表示は Threshold Overlay のアイコンで切替可能です



Threshold の設定が完了後、Measure Threshold の上側をクリックすることで計測を行います。



また、Convert to Regions アイコンをクリックすると Threshold の領域に Region を作成します。MetaMorph の Create Region around objects 機能に該当します



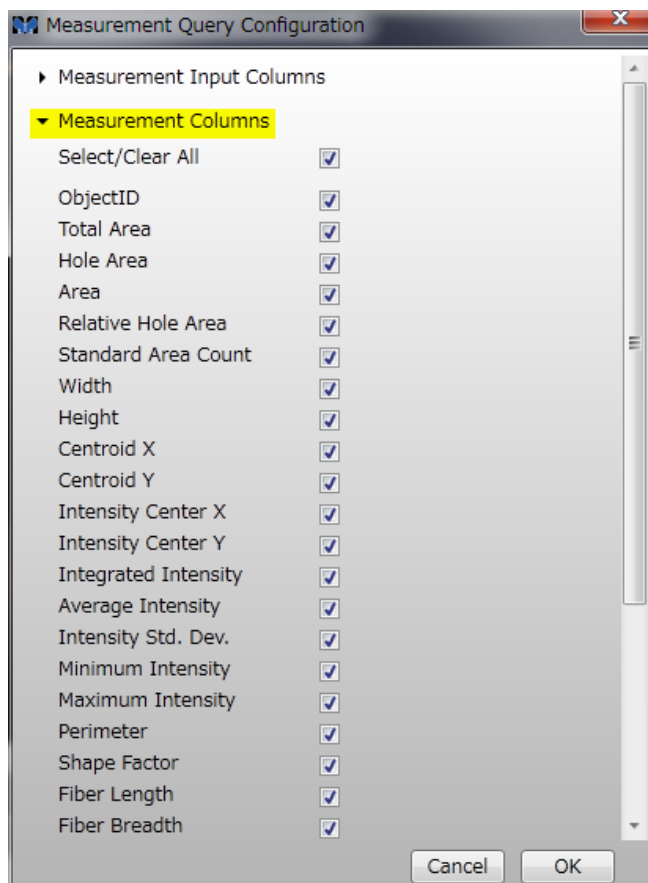
## 計測後の処理について

4. 対象が時系列データ、Z軸データ、多点データの場合、**Measure Range**にチェックを入れることで対象枠を広げることができます。



5. **Measurement Set**では過去の計測の履歴が表示され、履歴リストから任意のポイントに復帰することが可能です。

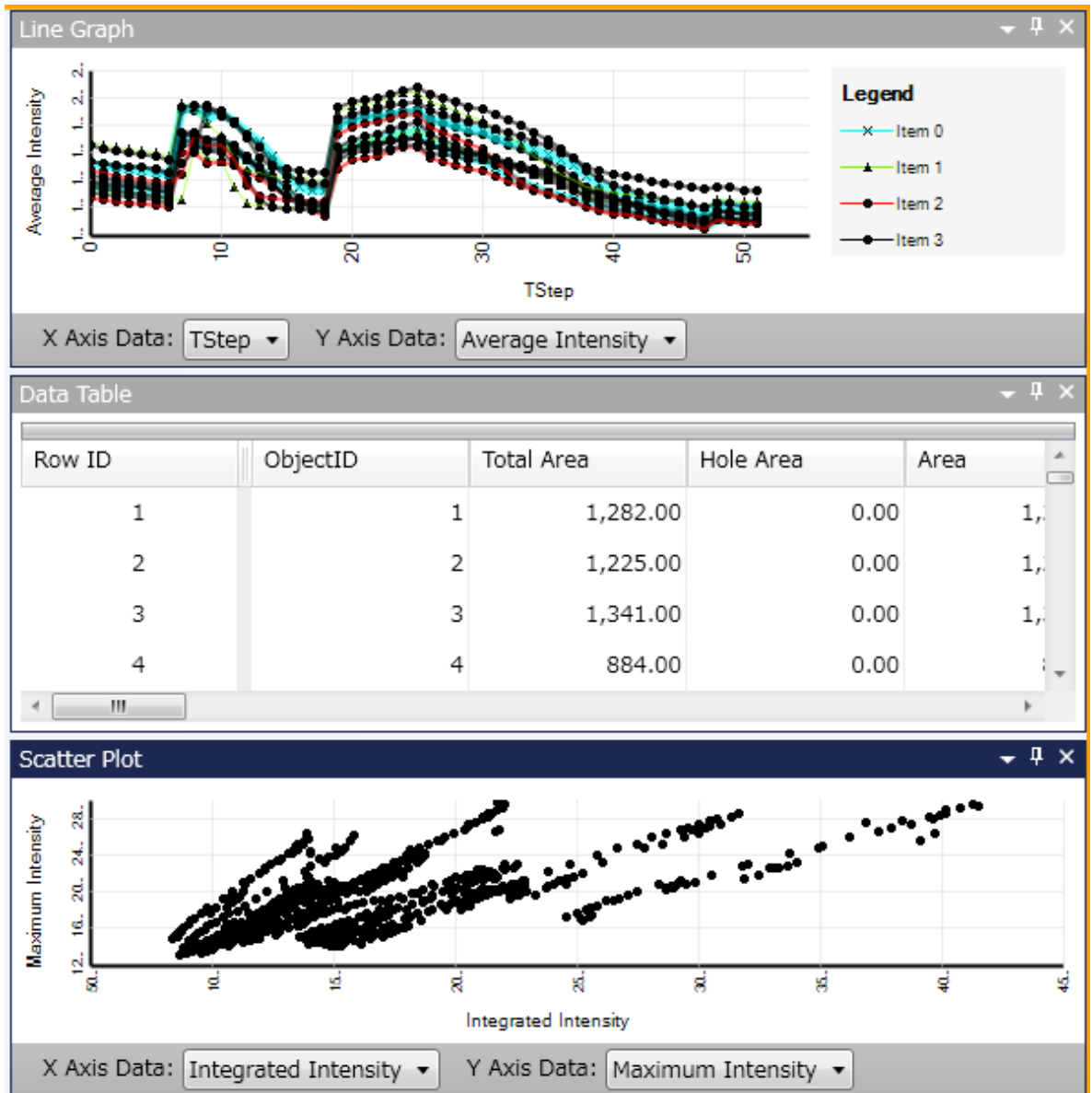
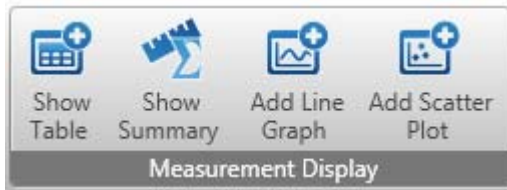
また、**Configure Results**では解析後に、解析結果を表示するリストの選択などが行うことができます。



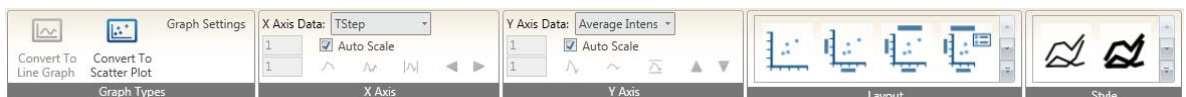
\*Measurements Columns は使用した解析モジュールごとに内容がその都度変更します。

計測結果の表示、出力について

6. 各計測モジュールで計測されたデータは Measurements Display で表示することが可能です。

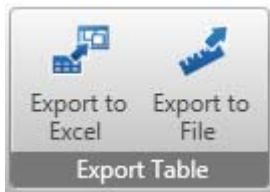


Graph はグラフ表示後追加されるグラフリボン、もしくはグラフ上で右クリックで表示される Graph Settings で表示の詳細セットを行うことができます



7. データの出力について

データ解析後、**Show Table**、**Show Summary** を選択いただくと、下記の **Export Table** アイコンがアクティブになります。



解析結果を続けて同じファイルに出力する場合は **Export to Excel** を、主力と同時に保存する場合は **Export to File** を選択してください。

\* **Export to Excel** で連続して出力すると、それぞれ別シートで出力されます

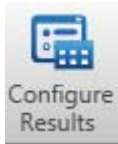


## MetaMorph NX の解析応用

### ・Filter 機能について

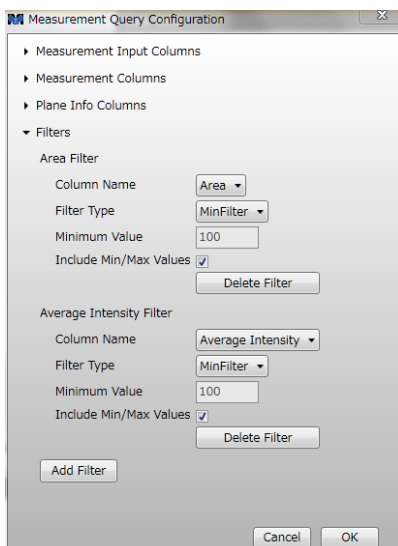
NX では解析後のデータをさらにふるい分けすることが容易に行えます。

1. 解析後、(Measurement Region、Measure Threshold)、Measure リボンにある Configure Results を選択します



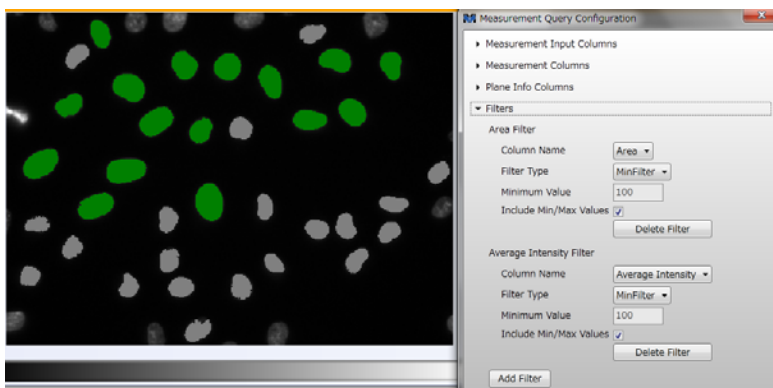
2. Configure Results ウィンドウにて、Column Name からふるい分けに使うパラメーターを選択し、Filter Type からフィルタの種類(MinFilter、MaxFilter、RangeFilter、MatchFilter、NullDataFilter)を選択します。

複数のフィルタを使う場合は  ボタンでフィルタを追加することができます。



設定後、OK ボタンを押すことで、Filter を適用します。

Filter を適用すると、緑(解析対象)とグレー(Filter の範囲外)に区分されます



・Morphology Filter について

MetaMorph および MetaMorphNX には Morphology Filter 機能が装備されています。

MetaMorph では Process メニューより、MetaMorphNX では後述する Create Module 機能の中で使用が可能です。

これらのフィルタを理解することで、解析時の前処理や解析結果の精度向上にもつながります。

なお、2012 年 3 月現在では MetaMorphNX には MetaMorph で使用可能なフィルタのすべてを移行しておりませんので、ご了承ください

Morphology フィルタは主に以下のような働きをします

- ・ノイズの削除。
- ・不均一な輝度を持つ背景の補正。
- ・興味のあるオブジェクト以外のイメージの除去。
- ・興味のあるオブジェクトの増強および定義

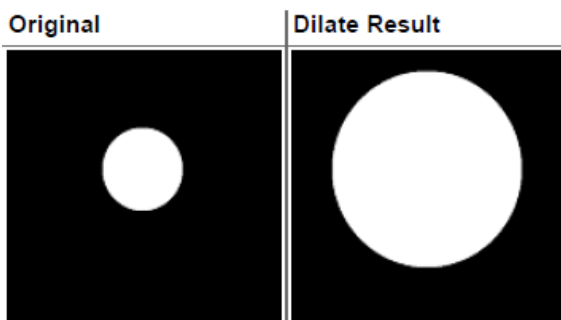
注意:

Morphology Filter で処理できる画像は 2bit(Binary),8bit/16bit のグレースケール画像のみとなります。また、Binary イメージは一部のフィルタのみしか効果がございません(Open,Close フィルタなどは有効)

・Dilate and Erode フィルタ

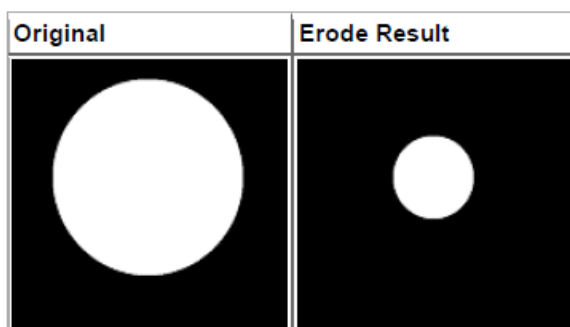
Dilate フィルタ…明るいところを指定したピクセル分膨張させます

**Dilate**



Erode フィルタ…暗いところを指定したピクセル分膨張させる

**Erode**



Dilateは明るい部分が膨張し、その境界が滑らかになります。明るい部分が繋がったり、明点中に暗部がある場合、塞がることがございます。

Erodeはその逆となります。

従いまして、このフィルタではオブジェクトのサイズが変化します

#### ・Open and Closeフィルタ

Openフィルタ、Closeフィルタはサイズや形状解析用の最も一般に用いられているフィルタです。Dilate/Erodeフィルタに似ていますが、Dilate/Erodeは細かいノイズがあると、ノイズまで拡大しますが、Open/Closeフィルタではシミやノイズのみを除去することが可能です。また、これらのフィルタは、オブジェクトのオリジナルの形およびサイズを維持します。

Openフィルタ	Closeフィルタ
画像中の白い(輝度の高い)ノイズやシミなどを除去します	画像中の暗い(輝度の低い)ノイズやシミなどを除去します
処理後、残ったエリアは現画像と比較して原則的に同サイズとなります	処理後、残ったエリアは現画像と比較して原則的に同サイズとなります
表面同士で接合したような輝度の高いスポットはそれぞれの形状を維持しつつ、境界面で離合されます	輝度の高いオブジェクト内にある暗点や暗いシミなどを穴埋めすることができます
処理後、現画像の詳細な形状情報などを維持したい場合はReconstruction機能を使用してください	処理後、現画像の詳細な形状情報などを維持したい場合はReconstruction機能を使用してください

#### Filter Shape

Filter Shapeおよびサイズは、局所的にイメージを滑らかにし単純化するために、計算が行なわれる各ピクセルのまわりの空間の近隣を定義します。

#### Circle:

一般に、生体サンプルでの画像中のほとんどのオブジェクトは直角あるいは多角形など定義的な形状を持たない傾向があるので、Circleは生体サンプルのイメージのための最も適切なフィルタ形です。



Diamond: 3x3ピクセルを最小サイズとして、ダイヤモンド状のエリアを1ブロックとして処理を行います。

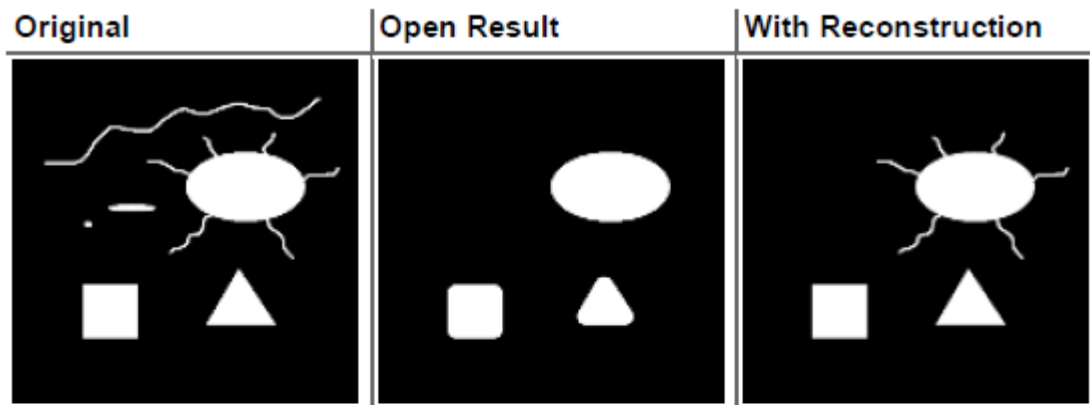


Square: 3x3ピクセルを最小サイズとして、正方形のエリアを1ブロックとして処理を行います。

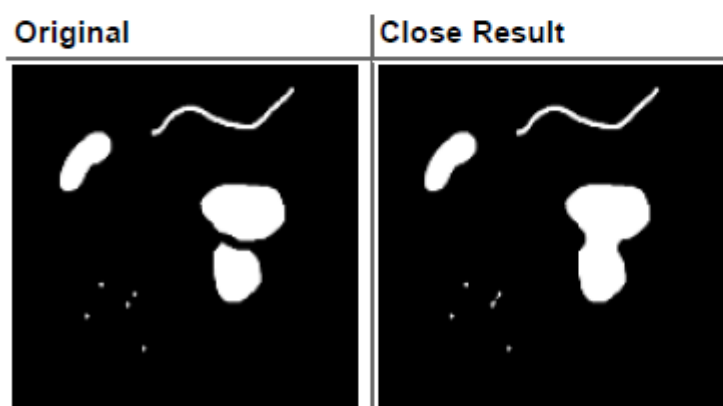
#### Area:

形状ではなく、処理対象の明/暗部の面積以下のエリアを対象とした処理を行います。形状とは無関係の為、処理後のオブジェクトの変形を抑えることが可能です。

## Open



## Close



### Reconstruction

チェックを入れることで、オブジェクトの現画像の形状を可能な限り維持しつつ処理を行うことができます。



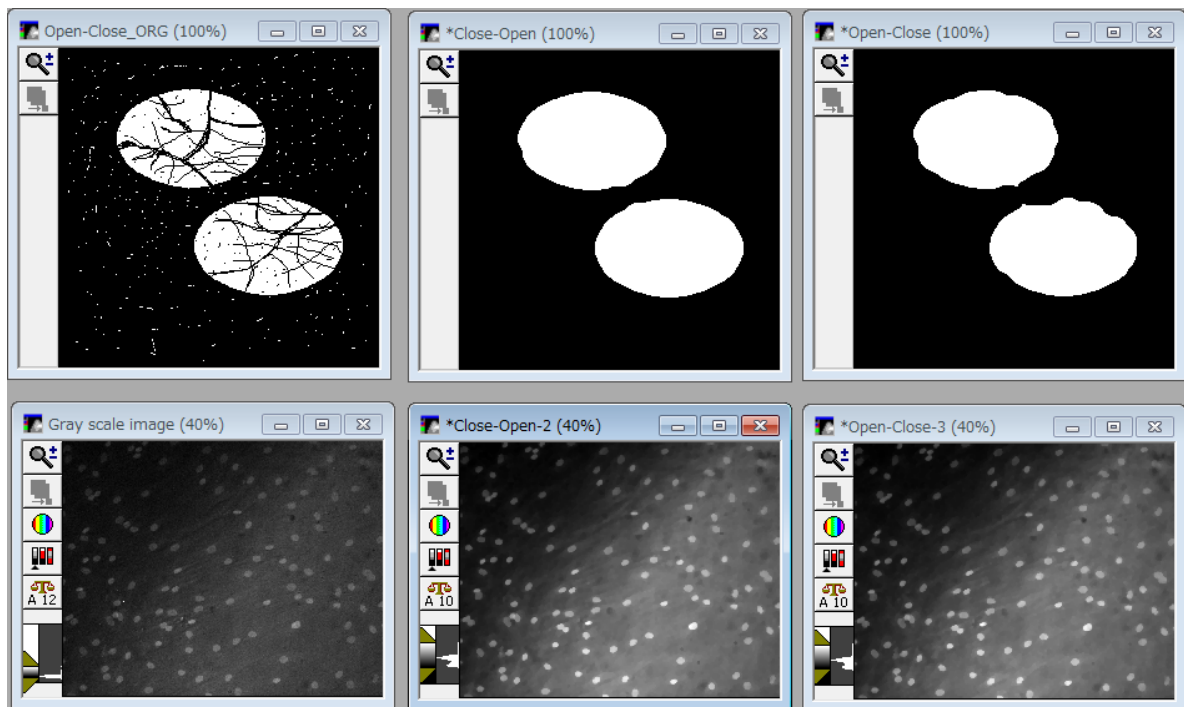
・Open-Close, Close-Open, Center

これらのフィルタは、画像中の「白、黒」両方の物体に対してフィルタを施します。

たとえば、Open-CloseフィルタははじめにOpen フィルタを施して白いノイズを除去し、その後にClose フィルタを施して黒いノイズを除去します。

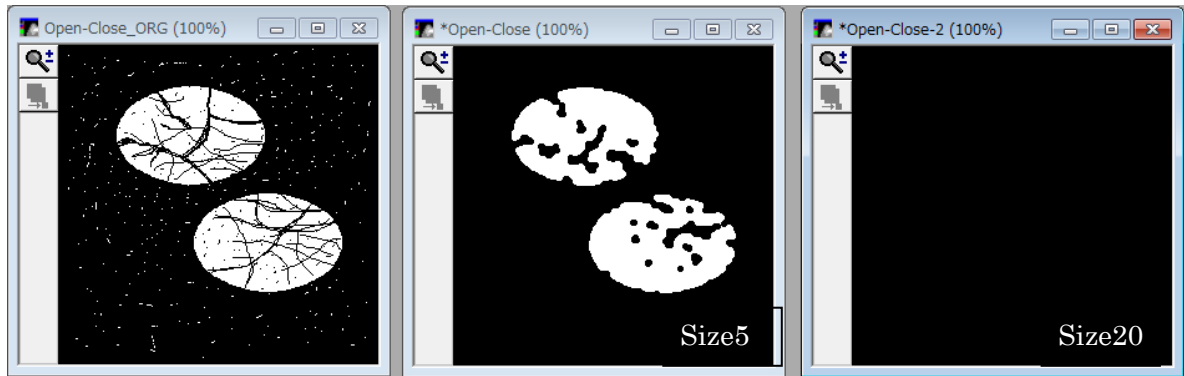
Open-Close	Close-Open	Center
Openフィルタの後、Closeフィルタを実行	Closeフィルタの後、Openフィルタを実行	Open-CloseとClose-Openフィルタを併用
白いノイズを除去後、黒のノイズを除去	黒いノイズを除去後、白のノイズを除去	Open-CloseとClose-Openをそれぞれ実行し、それら2つのイメージの中間値を用いる
白い部分の平滑化を行った後、指定したフィルタ形状、サイズに基づき黒い部分の平滑化を行う	黒い部分の平滑化を行った後、指定したフィルタ形状、サイズに基づき白い部分の平滑化を行う	白黒ともに平滑化を行う

Open-CloseとClose-Openフィルタはフィルタの順番が異なるだけですので、得られる画像は見た目ほとんど同じケースもございますが、フィルタの順番が異なるため、得られる画像がグレースケールの場合、相互の画像で輝度の相違がみられる場合がございます。

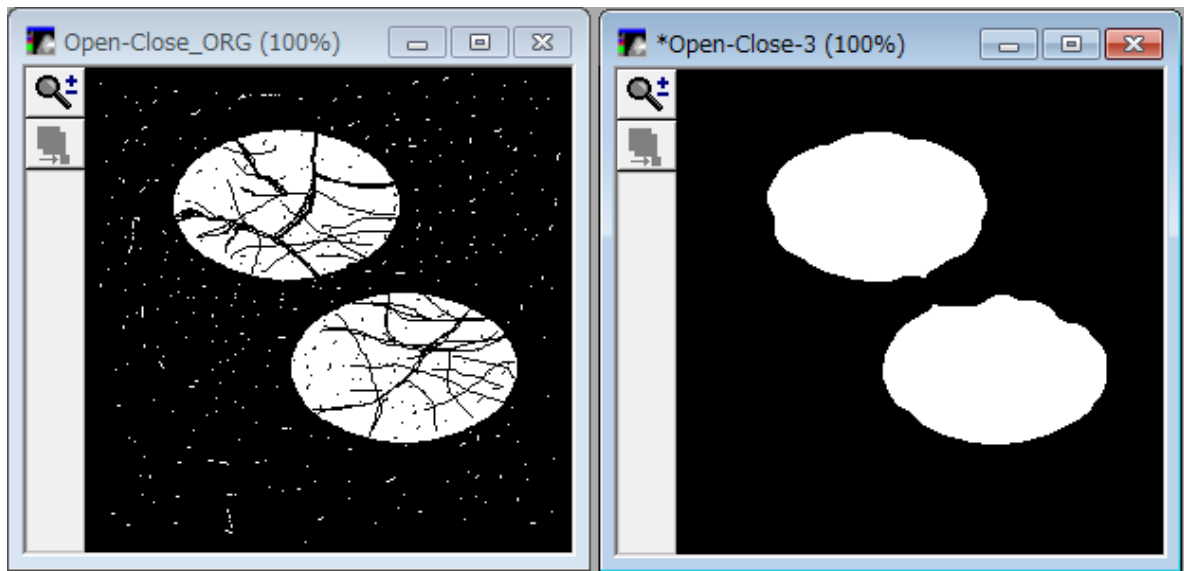


## Open-CloseとClose-OpenフィルタにおけるUse sequential filteringについて

フィルタサイズによっては小さいと処理が完全でない場合がございます。しかし、大きくするとすべて消えてしまったりする場合がございます



こういう場合、Use sequential filteringが役に立ちます。



Use sequential filtering は 小さな物体を初めに除去し、徐々にフィルタサイズを設定値まで拡大していきます。これにより、細かな部分は除去しながら、大きな物体のみを見つけやすくします。この処理には多少時間がかかります。またClose-Open、Center、Lomo フィルタ(MetaMorphのみ)でも使用できます。

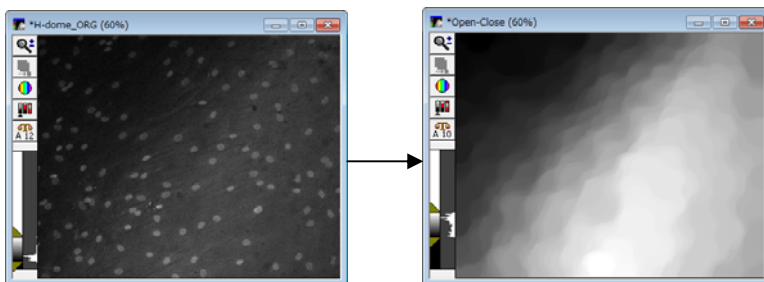
Center フィルタは、Open-Close 画像、Close-Open 画像、オリジナル画像の3つの画像における、それぞれのピクセル位置においての、中間値を表示したものです(平均値ではございません)。

明るい部分と暗い部分を同時になめらかにします。ただし、Lomo フィルタ(MetaMorphのみ)の方が、よりなめらかな効果が得られます。



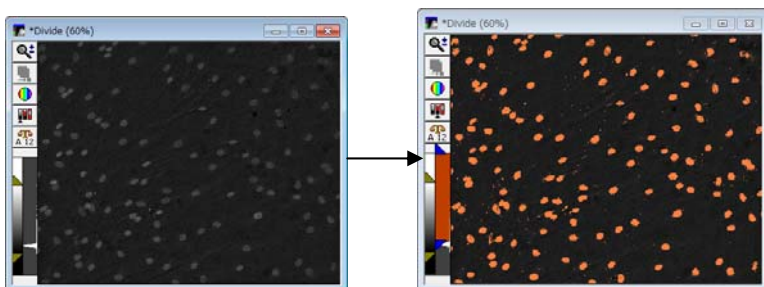
Open-Closeフィルタの例:

下記のように背景にムラのある画像において、フィルタサイズを大きく(Size50、Use sequential filtering使用)して処理を行うと



細胞の明るいスポットを除去し、背景のムラのみを平滑化した画像が得られます。

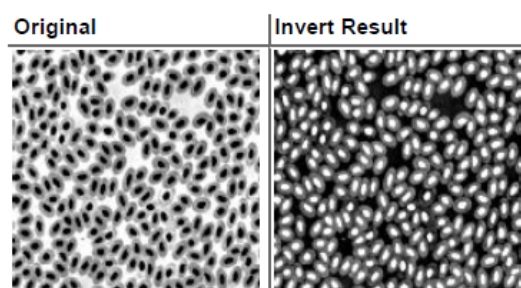
得られた画像を使って現画像で画像間での割算処理を行うと



背景ムラを除去した均一な画像を得ることができ、Thresholdでのセグメントが容易になります。

#### •Invert

明暗を逆転するフィルタです

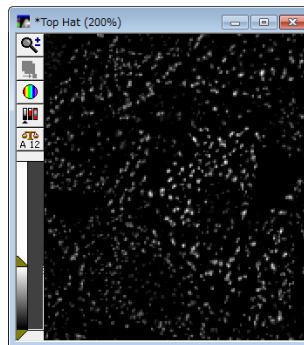
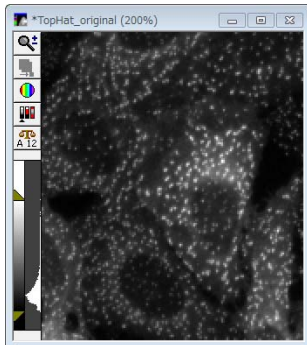


## ・Top Hat and Bottom Hat

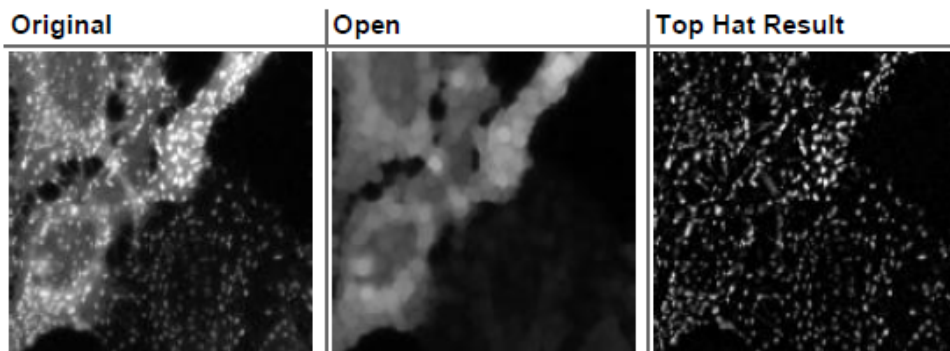
Top Hatフィルタは不均一な背景から小さな明るい点を検知します。

反対にBottom Hatフィルタは不均一な背景から小さな暗い点を明るい点にして検知します。

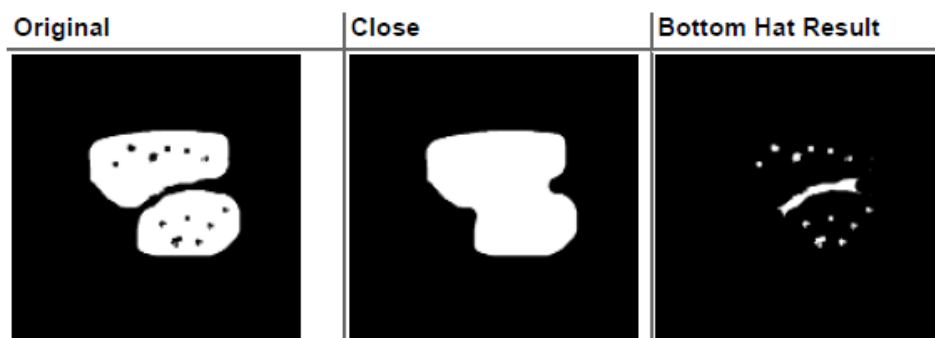
これらのフィルタは機能上、ノイズに非常に敏感に反応しますので、あらかじめOpen/Closeフィルタなどで、ノイズを除去することで、効率を向上させることができます。



これらのフィルタはFilter Shapeで設定した形状、大きさのものを画像上から取り除く作用をします。つまり、Top Hatフィルタの場合、現画像にOpenフィルタをかけた物を使って、現画像から差し引いた画像を作ることになります。



## Bottom Hat



Top Hat/Bottom Hatフィルタはこのような細胞表面上の顆粒計測などに非常に有効に機能します。

## •HDome and HBasin

H-dome (H-basin)フィルタは、グレースケールの画像中の、局所的に明るい(暗い)部分の形状を際立たせます。

H-dome フィルタ : 不均一な暗いバックグラウンドを除去します。

H-basin フィルタ : 不均一な明るいバックグラウンドを除去します。

目的とする明るい部分と背景との輝度差が明確な場合、このフィルタは非常に有効です。

また、輝度差での定義ではなく、明るい部分がスポット状である場合は、Top Hat/Bottom Hatを使用することを推奨します。

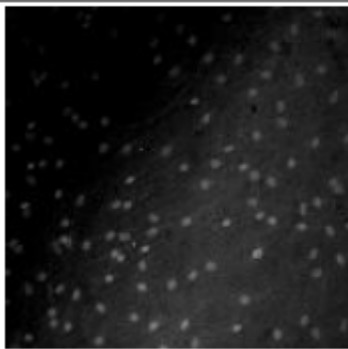
これらのフィルタを使用するにあたって、除去したい背景と、残したいシグナルとの輝度差を求め、Intensityにその数値をおよそで入力してください



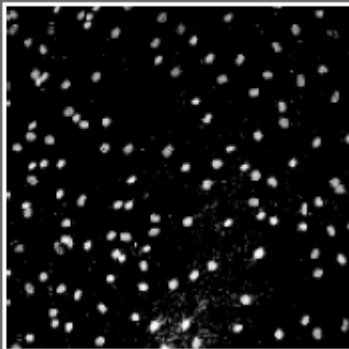
右の図であれば、細胞のシグナルが593、背景が495となりますので、輝度差はおよそ100となります

### HDome

Original

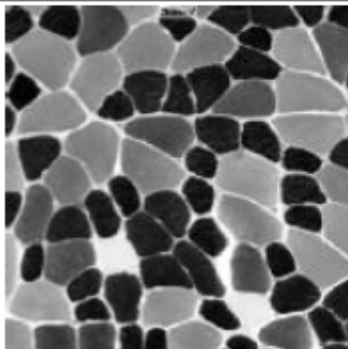


HDome Result

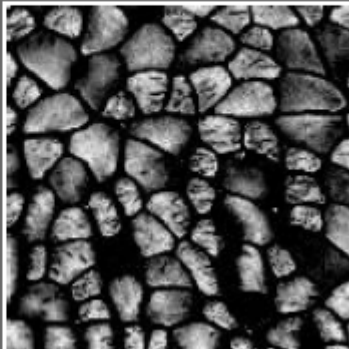


### HBasin

Original



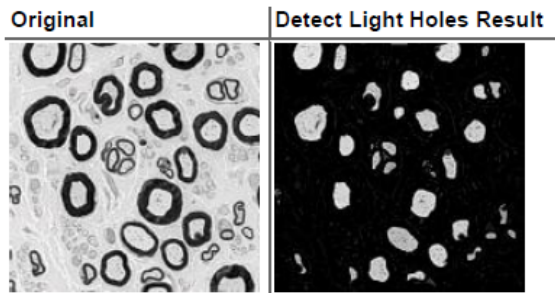
HBasin Result



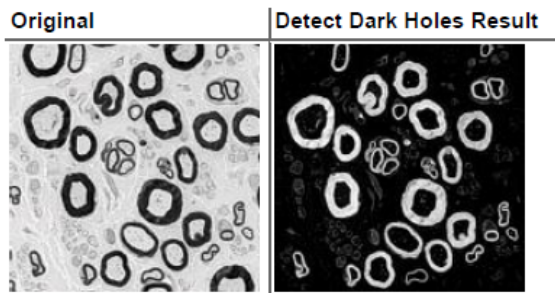
## ・Holes

Holes フィルタは、オリジナル画像のHole 部分を自動的に埋めたり、抽出したりします。  
細胞内腔面積や、血管断面積など閉鎖的に囲まれた部分の領域を抽出するのに有効です

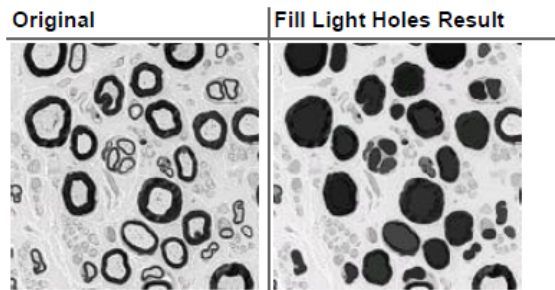
### Detect Light Holes



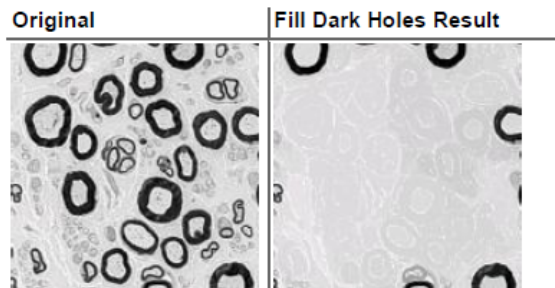
### Detect Dark Holes



### Fill Light Holes



### Fill Dark Holes

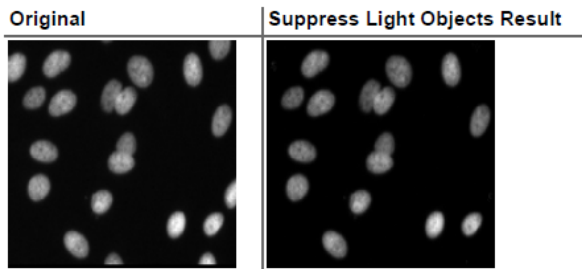


## ・Border Objects

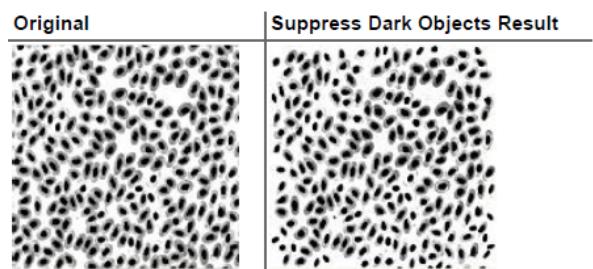
Border Objects フィルタは、画像枠にかかる明るいオブジェクトを削除したり、抽出したりすることができます。

Border Objects Option	機能
Suppress Light Objects	画面枠にかかる明るいオブジェクトを削除します
Detect Light Objects	画面枠にかかる明るいオブジェクト以外を削除します
Suppress Dark Objects	画面枠にかかる暗いオブジェクトを削除します
Detect Dark Objects	画面枠にかかる暗いオブジェクト以外を削除します

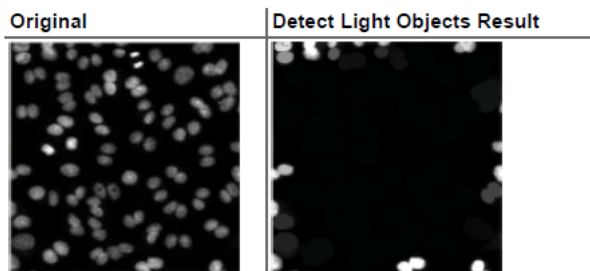
### Suppress Light Objects



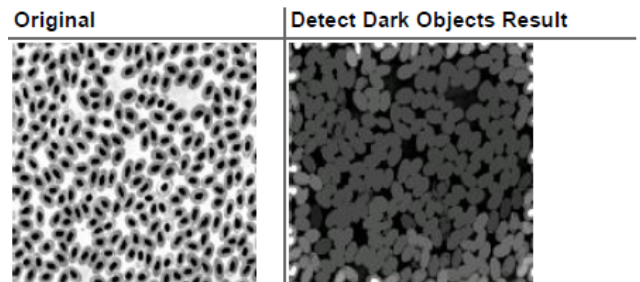
### Suppress Dark Objects



### Detect Light Objects



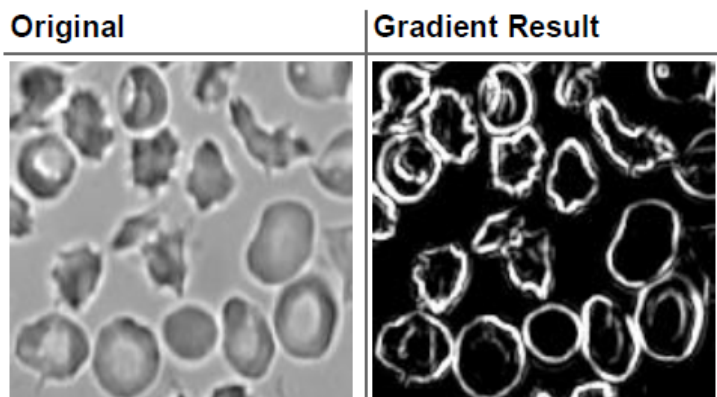
### Detect Dark Objects



## ・Gradient

Gradientフィルタはイメージ中の明るいおよび暗領域の間のオブジェクトの境界(すなわち輪郭)を表示します。

細胞膜の領域の抽出などに有効ですが、ノイズの影響を受けやすいため、ノイズの多い画像はこのフィルタを使用する前に、ノイズ除去を行うことを推奨します



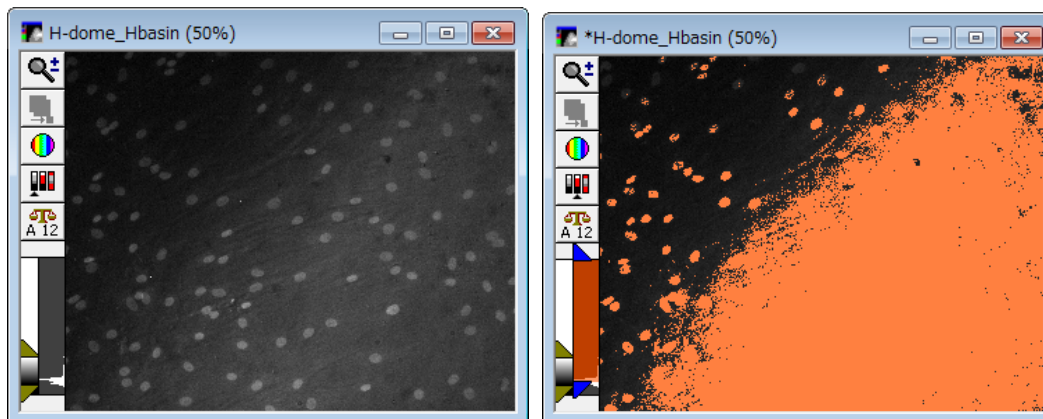
## MetaMorphNX Create Moduleについて

MetaMorphNXではCreate Moduleと呼ばれる、フィルタ処理や解析などの各ツールを任意に組み合わせたオリジナルの解析ツールを作成することができる機能を有しています。  
これにより、複雑な前処理を必要とする解析もユーザーサイドで簡単にマクロ化することが可能です。

手順として以下の例題で実際にCreate Moduleで作成してみます。

例題:

下図の写真において、背景ムラを除去し、細胞の個数カウントを行いなさい



この画像は背景にムラがあるため、このままThresholdを実行しても上図のようにうまくいきません。

解析前にフィルタ処理を行い、背景ムラを除去します。

使用するフィルタはH-Domeであれば簡単にできますが、今回はClose-Openフィルタを使って、画像演算も合わせた手順で操作することになります。

フィルタ処理は以下のフローとなります。

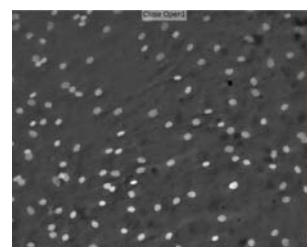
- ① 元画像にClose-Openフィルタを実行



- ② 元画像から①で作成した画像で減算処理を行う(ムラが除去できる)

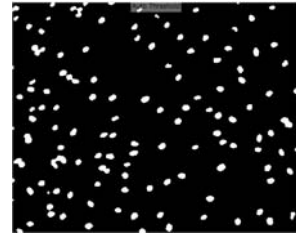


- ③ ②で作成した減算画像にはまだ細かいノイズが残っているの  
で、再度Close-Openフィルタを実行する

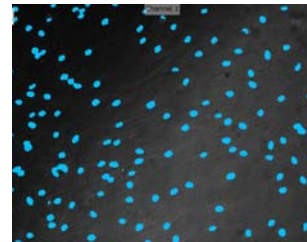




④ ③で作成したClose-Open画像にThreshold処理を行う



⑤ ④のThresholdマスクを使って元画像を解析する

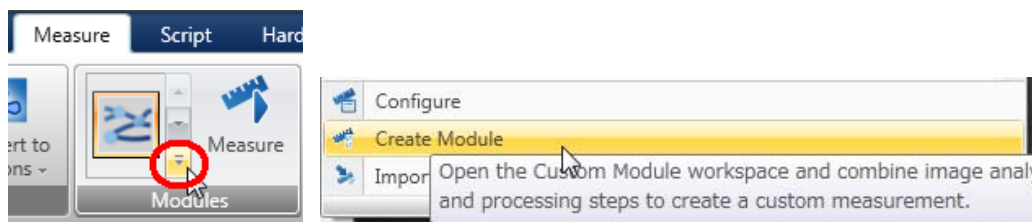


以上の流れを実際にCreate Moduleでマクロ化してみます。

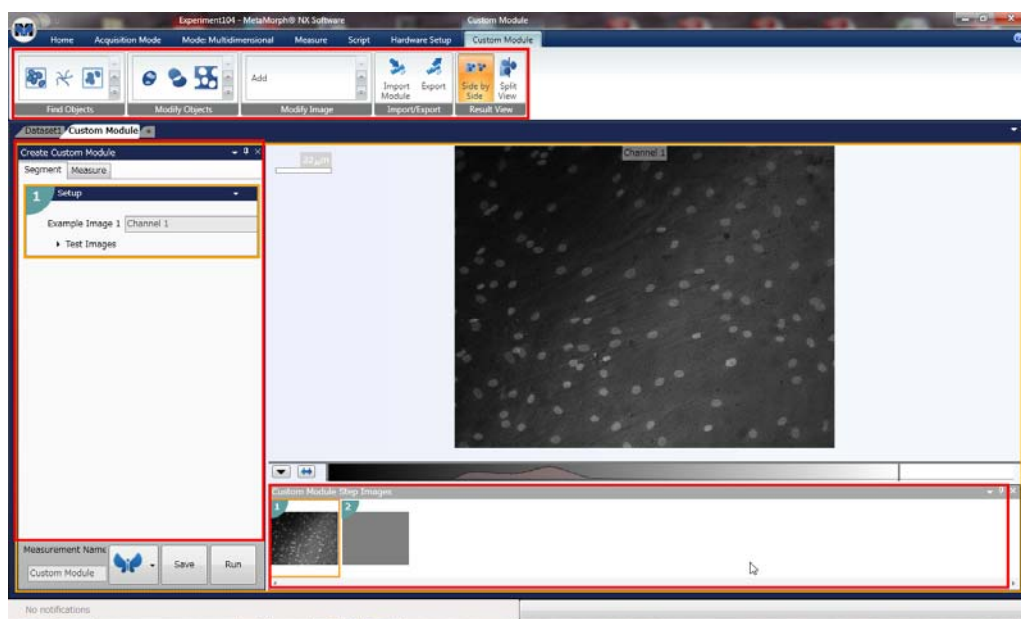
手順:

1. 対象画像をLoadします。

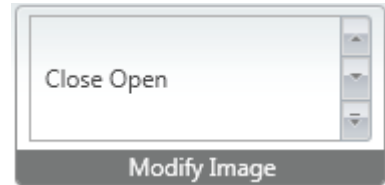
2. MeasureタブのModulesの中にある下図の部分をクリックします。各Moduleが表示されますので、下部にあるCreate Moduleを選択します。



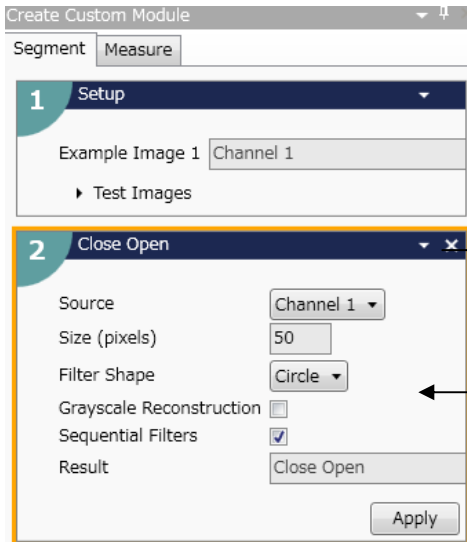
3. Create Moduleを起動すると次項のようにCustom Moduleリボンが追加表示され、左にはCreate Custom Moduleウィンドウが、下部にはCustom Module Step Imageが表示されます



4. では、まず元画像に対してClose-Openフィルタを実行します。  
左のCreate Custom ModuleウィンドウはSegmentを選択いただき、上部リボンメニューのModify ImageからClose-Openを選択してください

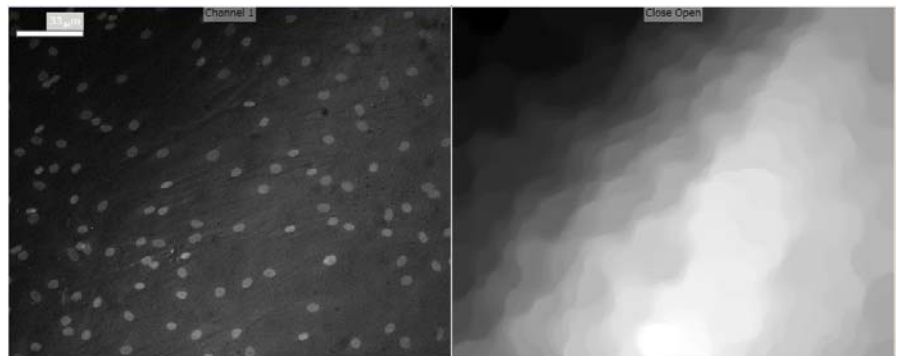


左のCreate Custom Moduleウィンドウに下図のようにClose-Openフィルタモジュールブロックが追加されます。まずは下図の設定にしてください

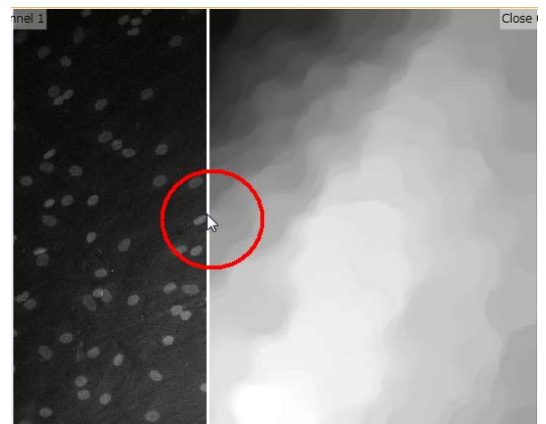


1Setup で選択されたソースイメージを  
2Close Open でソースとして選択しています。  
左の設定では指定されたフィルタサイズ、形状で実行し、それで作成されたResultは“Close Open”という名称になるという事を示しています

Applyボタンを押すとフィルタ処理が実行されます  
処理が実行されると右図のように処理前が左、処理後が右に表示されます。



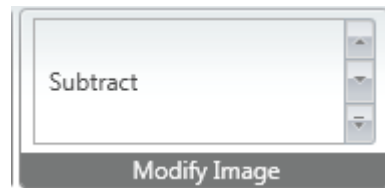
この時、上部リボンメニューにある、Result ViewのSplit Viewを押すことで、現画像とResultが一画面に表示されますが、真ん中の境界線をドラッグすることで、処理前、処理後の比較表示位置を自由にスライドさせることができ、フィルタの効果を確認することが容易になります



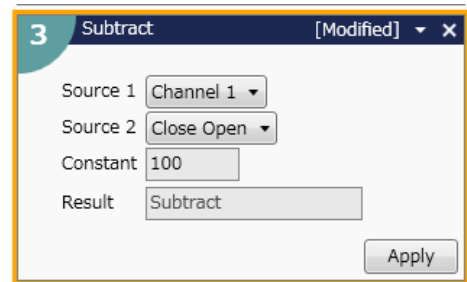
また、ウィンドウ下部のCustom Module Step Imageにはこれまでの処理過程を過程順で確認できます



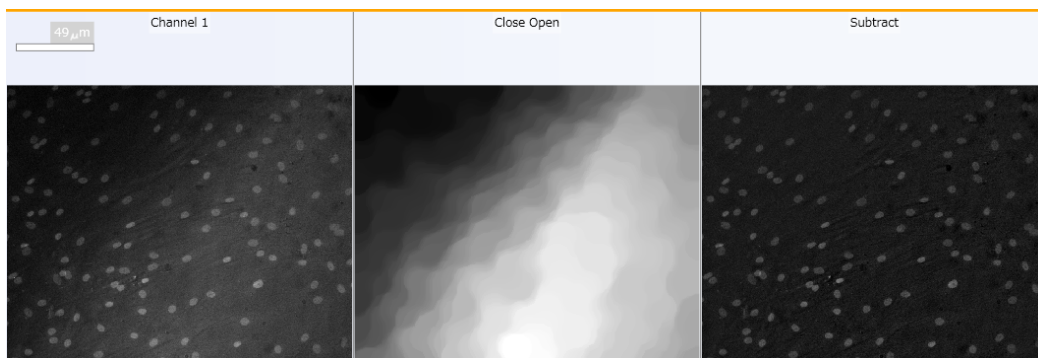
5. では次は現画像から新たに作成されたClose-Openの画像で減算処理をします。  
Modify ImageからSubtractを選択してください



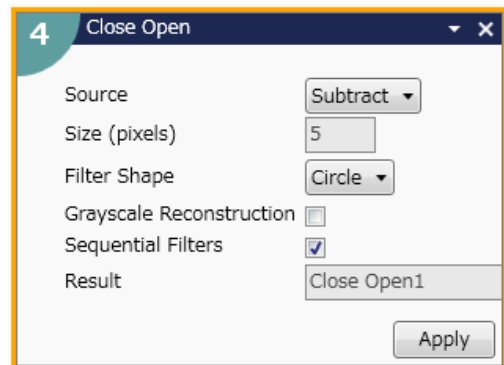
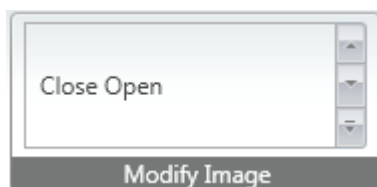
6. Subtractでは(Source1-Source2)となりますので、右図のように設定します。  
引き算では輝度の過度の低下を抑えるため、Constantで100程度の値を入力します  
(Source1+100)-Source2 となります。



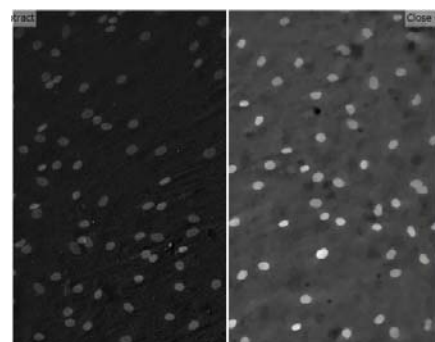
7. 減算処理を行うと以下のようになります。



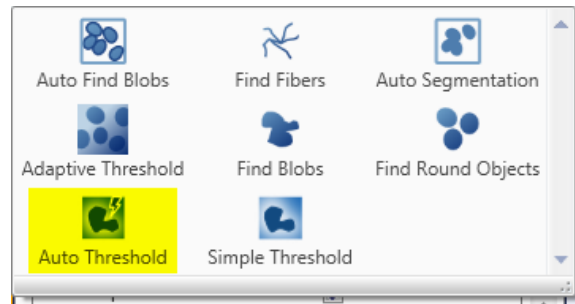
8. 次に得られたSubtractはこのままではノイズが多いので、Thresholdには不向きです。  
その為、このSubtractにもう一度Close-Openフィルタ処理でノイズを取り除きます  
Sourceを間違えないように注意してください



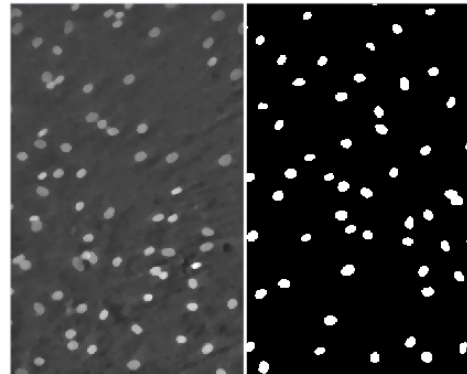
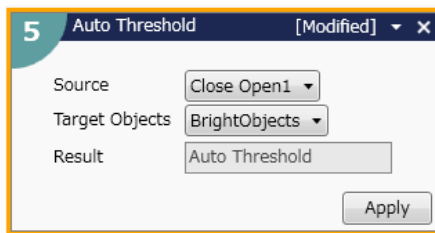
9. 右図のようにスムージングされた画像が得られます。  
右が処理前、左が処理後です



10. 次に平滑化された画像に対して Thresholdを設定します。上部リボンのFind ObjectsからAuto Thresholdを選択します。



11. Auto Thresholdでは今回は明るい細胞のシグナルを計測しますので、Target ObjectsはBrightObjectsを選択してください

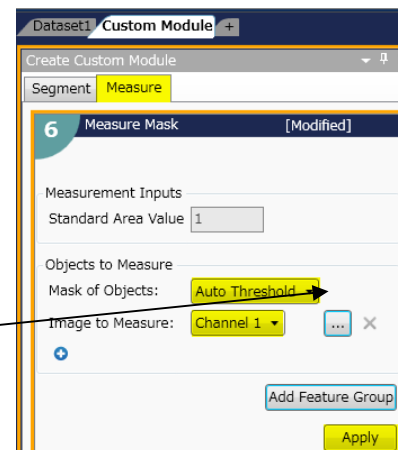


Applyボタンを押し、Split View表示にて、シグナルがきちんと得られているか確認してください。

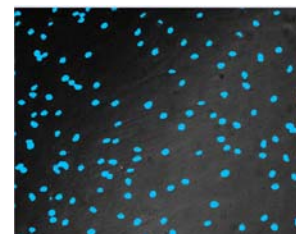
12. 次に計測を行います。Create Custom Moduleタブをクリックします。

Mask of Objectsには先ほど作成したAuto Thresholdのイメージを、Image to Measureには元画像を選択します。これで、作成したマスクを元に、Rawデータを計測することができます。

このボタンを押すことで、解析パラメーターの諸設定を行うことができます



Applyボタンを押すと解析が実行され、解析されたエリアがハイライト表示されます。



13. 最後に作成したCustom ModuleはCreate Custom Moduleウィンドウ下にある右図のアイコンから名称及びアイコンの設定をし、Saveで保存ができます。



実行する場合はRunボタンを押してください

14. 保存したモジュールはMeasureリボンのModuleに追加されます。  
また保存されたModuleはImport Moduleで読み込むこともできます。  
作成されたModuleを編集する場合は右上のアイコンをクリックしてください

