

第八章 進んだ処理: 光学濃度を解析する

この練習では、Image-Proの輝度校正ツールと輝度(濃度)解析ツール(ラインプロファイル)を紹介します。

ここでは、以下の操作を行ないます。

- 電気泳動ゲルの画像を開く
- 輝度スケールを光学濃度に校正する
- 白レベルと黒レベルを設定する
- ゲル画像内の縞の濃度を測定する(ラインプロファイル)



この練習には、約15分かかります。

準備: Image-Proをまだ起動していない場合は、ここでImage-Proを起動します。Image-Proのアプリケーションウィンドウがアクティブになったら、練習を開始できます。

■ 画像を開く

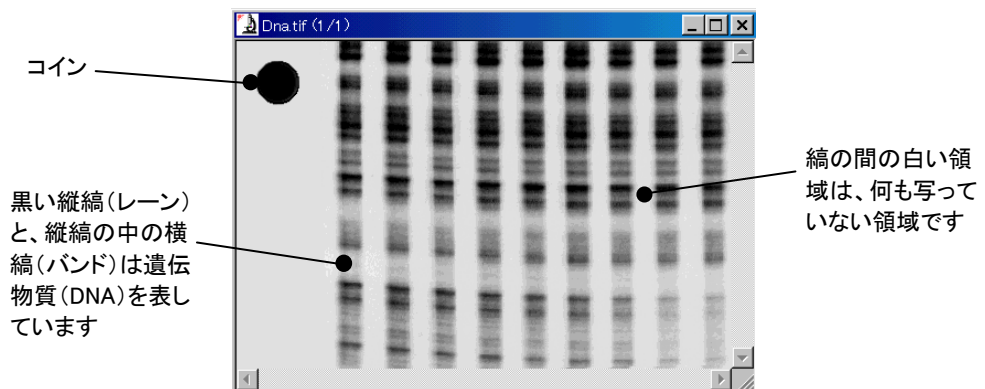
ここでは、DNAの電気泳動ゲルの画像を使用します。画像はライトボックス内で、光源をゲルの背面から当てて撮影したものです。画像はゲルを透過する光量を反映しています。

1. *File* (ファイル)メニューから、*Open* (開く)コマンドを選択します。

Open File (ファイルを開く) ダイアログボックスが表示されます。

2. Image-Proのアプリケーションフォルダ(通常はCDドライブに”IpWin...”という名称で生成されています)にあるImagesフォルダから”Dna.tif”ファイルを開きます。

”Dna.tif”の画像ウィンドウが開きます。画像内の黒い縞はDNAを表しています。



画像の左上の黒丸は、ゲルの上に載せたコインです。この部分は、光を全く透過していません。反対に、縞の間の白い領域は、光をそのまま透過しています。

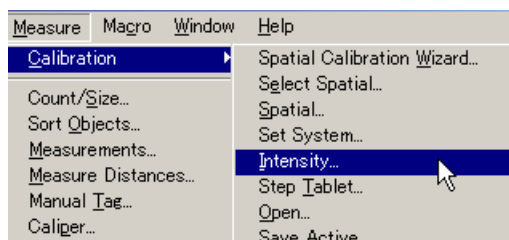
■ 輝度スケールを光学濃度に較正する

ここでは輝度の値が濃度を表すように、Image-Proの輝度スケールを較正します。

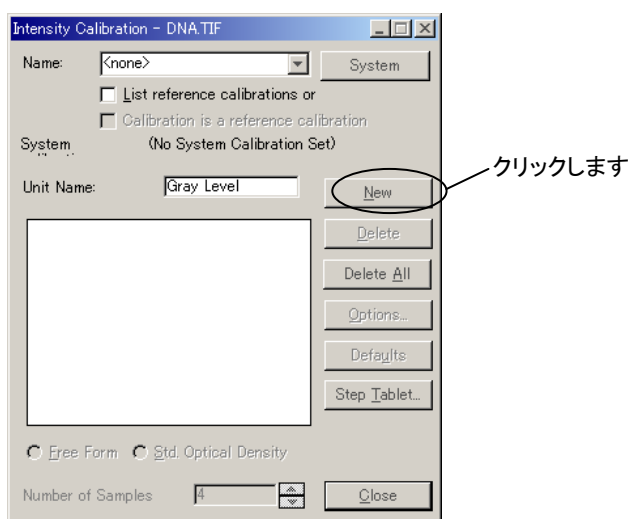
1. *Measure* (測定)メニューから、*Calibration* (較正)コマンドを選択します。

Calibration コマンドのサブメニューが表示されます。

2. ポップアップメニューから、*Intensity*(輝度較正)コマンドを選択します。



Intensity Calibration (輝度較正)のダイアログボックスが表示されます。

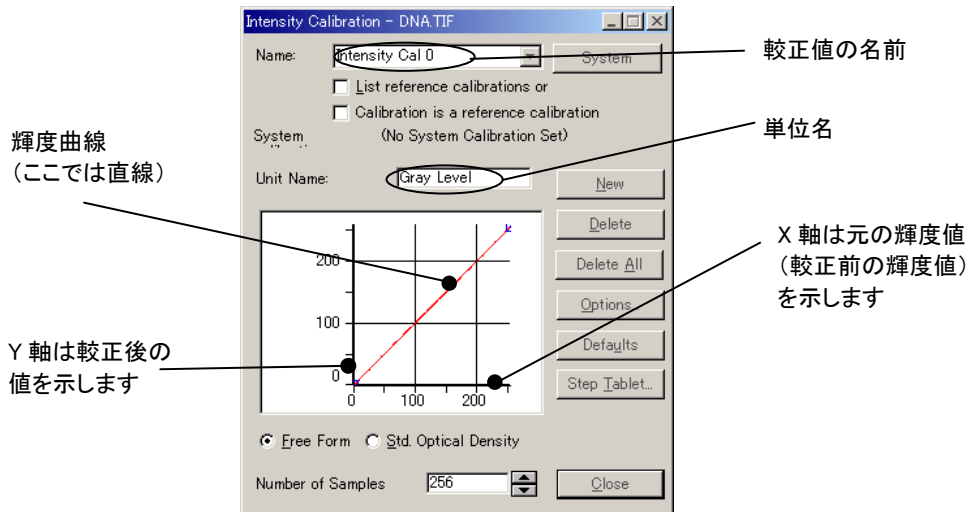


3. *New* (新規)ボタンをクリックします(上図)。

輝度曲線が表示され、*Name*(名前)欄に *Intensity Cal 0* と表示されます。*Unit Name* (単位名) 欄には *Gray Level* (グレイレベル) と表示されます(次ページ図)。

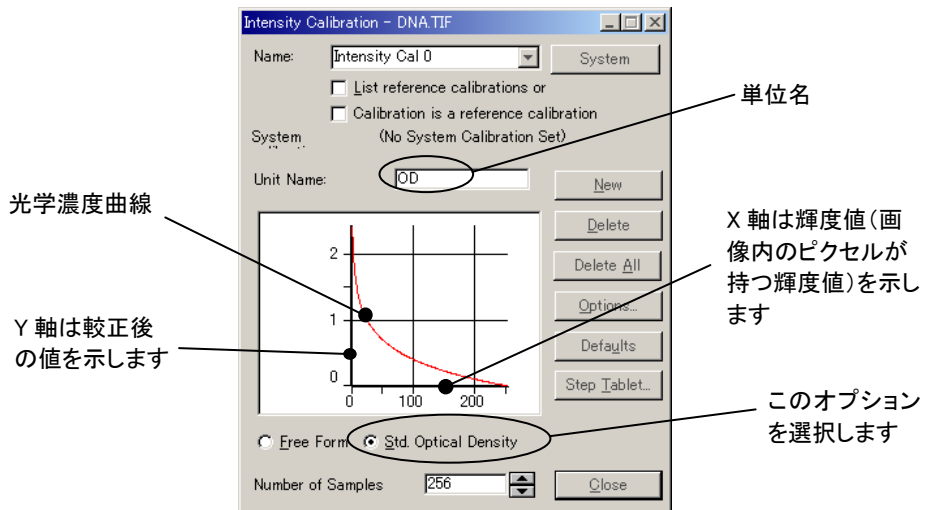
Name(名前) 欄は、これから作成する較正值の名前です(必要なら、*Intensity Cal 0* の文字を消して、半角英数文字で別の名前をタイプして下さい)。

輝度曲線は、輝度スケールに対する較正の結果を表示します。X軸は元のままの輝度値(画像から読み出された値)、Y軸は較正によって変化した値を示します。



4. Std. Optical Density (標準光学濃度) オプションをクリックして選択します。

輝度曲線が、濃度／輝度の関係を示すグラフ (光学濃度曲線) に変わります。Unit Name (単位名) 欄には OD (光学濃度) と表示されます。



光学濃度のスケールは、物質内部を通過する光が指数的に減少することを示しています。お分かりのように、光学濃度曲線は輝度スケールと反比例しています。つまり、輝度が小さいと濃度の値は大きくなり、輝度が大きいと濃度が小さくなります。したがって、画像内のピクセルが暗いほど、物質 (ここではDNA) の濃度は高くなります。

>> 次のステップ「黒と白のレベルを指定する」に進みましょう。

■ 黒と白のレベルを指定する

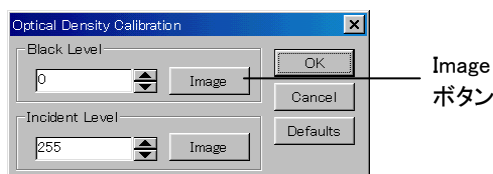
ここでは、「黒」(光が全く透過していないことを示す)のレベルと「白」(物質が全くないことを示す)のレベルをゲル画像内で設定します。

画像の左上隅にある黒丸を使用して、黒レベルを設定します。黒丸は、ゲルに固体のオブジェクト(コイン)を貼り付けることにより撮影したもので、この領域は光を全く透過していません。

黒丸の下、何もない領域(白い領域)を使用して、白レベルを設定します。この領域は、物質が何もないときの輝度を表しています(全光量がゲルを透過してカメラに到達しています)。

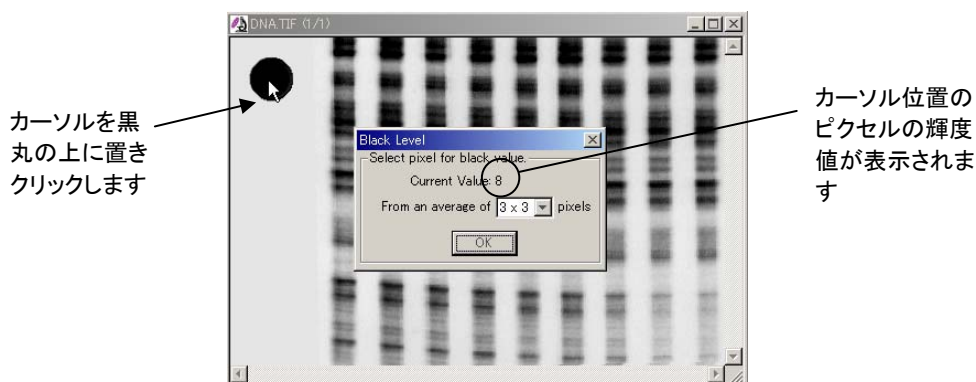
1. Intensity Calibration ダイアログボックスにある Options(オプション)ボタンをクリックします。

Optical Density Calibration (光学濃度の校正)ダイアログボックスが表示されます。



2. Black Level (黒レベル)欄の Image (画像で設定)ボタンをクリックします。

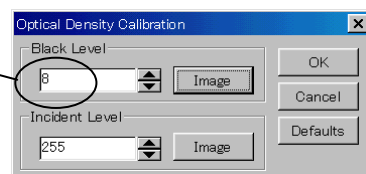
Black Level (黒レベル)メッセージボックスが表示されます。



3. カーソルを、画像の左上の黒丸に置き、マウスの左ボタンをクリックします。Black Level メッセージボックスに「8」が表示されたら(上図)、OKボタンをクリックします。

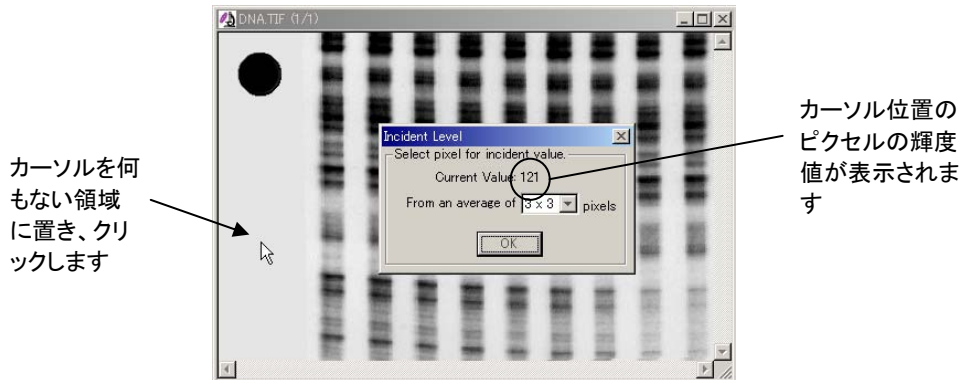
Optical Density Calibration ダイアログボックスが再び表示され、Black Level (黒レベル)欄に「8」と表示されます。

黒レベルが「8」と表示されます



4. *Incident Level* [飽和(白)レベル]欄の Image(画像で設定)ボタンをクリックします。

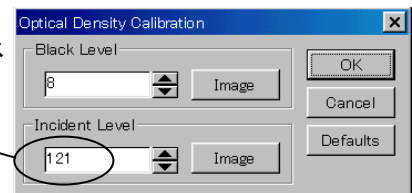
Incident Level [飽和(白)レベル]メッセージボックスが表示されます。



5. カーソルを、画像の左端にある何も無い領域に移動し、マウスの左ボタンをクリックします(上図)。Incident Level メッセージボックスに「121」と表示されたら、OKボタンをクリックします。

Optical Density Calibration (光学濃度の較正)ダイアログボックスが再び表示され、*Incident Level* [飽和(白)レベル]欄に「121」と表示されます。

飽和(白)レベ
ルが「121」と
表示されます

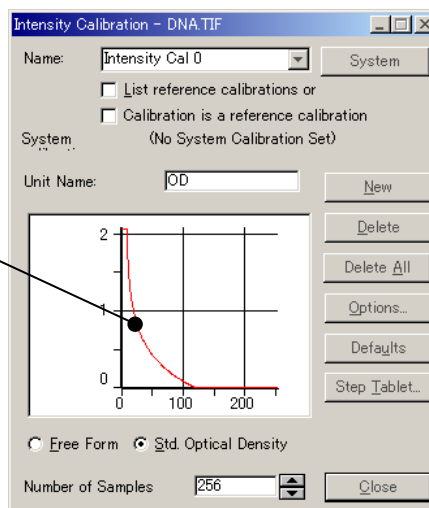


6. OK ボタンをクリックします。

Intensity Calibration (輝度較正)ダイアログボックスが表示されます。

濃度曲線の両端の値は、先ほど指定した黒レベル(「8」)と白レベル(「121」)に設定されます。

上記の白黒レベル
の設定が、濃度曲
線に反映されます



7. 次に、画像に輝度校正が適用されたかを確認します。画像上にカーソルを置き、右クリックしてコンテキストメニューを表示させ、*Information*(情報)コマンドを実行します。

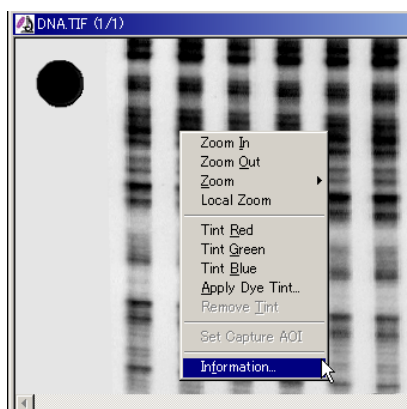
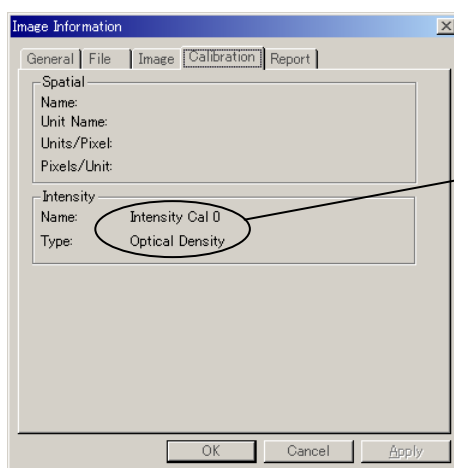


Image Information(画像情報)ダイアログボックスが表示されたら、Calibration(校正情報)タブを前面に出し、*Intensity*(輝度校正)欄に適用した輝度校正情報が表示されているかを確認します。



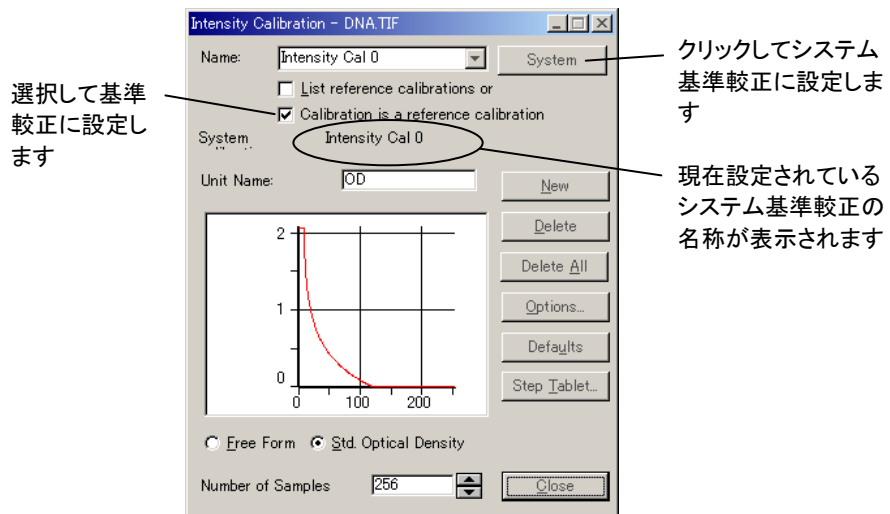
適用した輝度校正が表示されているか確認します

確認後、OKボタンをクリックして当該ダイアログボックスを閉じます。

8. *Intensity Calibration*(輝度校正)ダイアログボックスの *Calibration is a reference calibration*(校正を基準校正にする)オプションを選択します(次ページ図)。

これで、作成した輝度校正が「基準校正」に設定されます。基準校正とは、Image-Proに自動登録され、Image-Proを終了しても保持される校正データのことです。

注記: 基準校正に設定しない校正データは、Image-Proを終了すると消滅します。



9. (任意) *System*(システム)ボタンをクリックして、校正を「システム基準校正」に設定します。

System Calibration(システム基準校正)欄に校正データの名称が表示されます。

システム基準校正は基準校正の一種で、これが設定されていると、以降 Image-Pro で画像を開いたり取り込んだりしたときに、画像に自動適用されます。

10. Close(閉じる)ボタンをクリックします。

Intensity Calibration (輝度校正)ダイアログボックスが閉じます。

注記:

- 輝度校正は、通常、画像データ形式別に作成して適用します。8ビットグレースケール画像に対して行った輝度校正を16ビット形式の画像などに適用すると、正しい測定結果が得られなくなりますのでご注意ください。
- 基準校正は、Image-Proのアプリケーションフォルダ(通常はCドライブに”IpWin...”という名称で生成されています)下にある *IpRef.cal* というファイルに自動保存されます。
- 設定した較正值は、*Measure* (測定)メニューの *Calibration* (校正)で表示される *Save Active* (現在の較正值を保存)コマンドまたは *Save All* (全ての較正值を保存)コマンドを用いて任意のファイル(拡張子 *.cal)に保存でき、必要なときに呼び出して再使用できます。
- 輝度校正で指定した輝度測定の単位は、画面下部のステータスバー(1-12ページを参照)に表示されます。

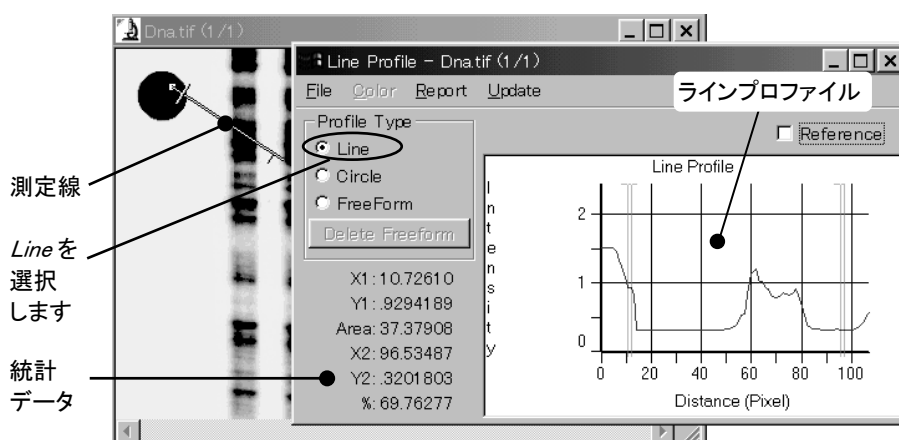
>> 次のステップ「縞の濃度を測定する」に進みましょう。

■ 縞の濃度を測定する(ラインプロファイル)

ここでは、*Line Profile* (ラインプロファイル)コマンドを使用して、ゲル画像に写っているDNAの1つの縦縞(レーン)の濃度を測定し、その濃度をラインプロファイルのグラフにプロットします。*Line Profile* コマンドは、画像内の測定線上にある各ピクセルの値をプロットします。ここでは、直線の測定線上のピクセルの濃度を測定します。

1. *Measure* (測定)メニューから *Line Profile* (ラインプロファイル)コマンドを選択します。

Line Profile - Dna.tif (ラインプロファイル - Dna.tif)ウィンドウが表示され、“Dna.tif”の画像ウィンドウの左上隅に、斜めの「測定線」が現れます。



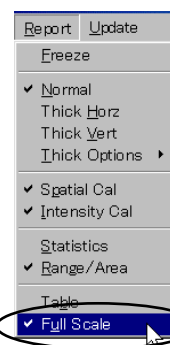
Profile Type (プロファイルの形式)欄で *Line* (直線)が選択されていることを確認して下さい。選択されていないときは、クリックして選択して下さい。

注記: 上の *Line Profile* ウィンドウでは、ラインプロファイル・グラフの他に統計データが表示されています。*Report* (レポート)メニューの表示オプションの設定によっては統計データが表示されないことがありますが、この練習では特に問題ありません。

2. *Line Profile* ウィンドウの *Report* (レポート)メニューで、*Full Scale* (フルスケール)オプションを解除します(クリックして✓印を外します)。

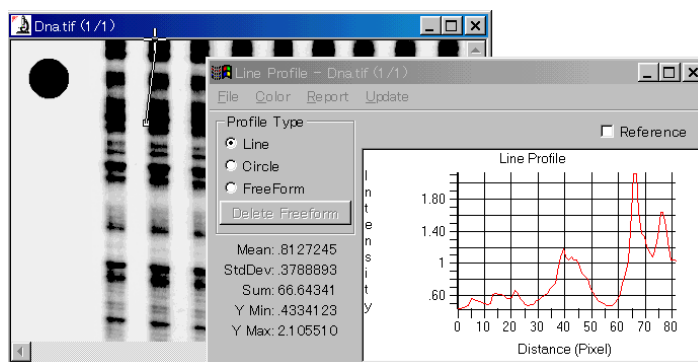
グラフのY軸の目盛りが、プロファイル曲線の最小値と最大値に合わせて調節されます。

クリックして✓印を外します

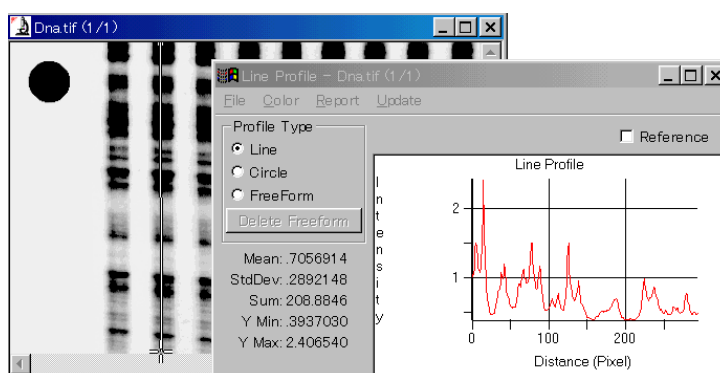


3. 次に、測定線の上端を、左から 2 本目の縦縞の上端まで移動します。

これを行なうには、まずカーソルを測定線の一端に当て、カーソルが十字形になったらドラッグします。



4. 同様に、測定線の下端を、左から 2 本目の縦縞の下端まで移動します。



ドラッグが終了すると、測定線は次のようになります。

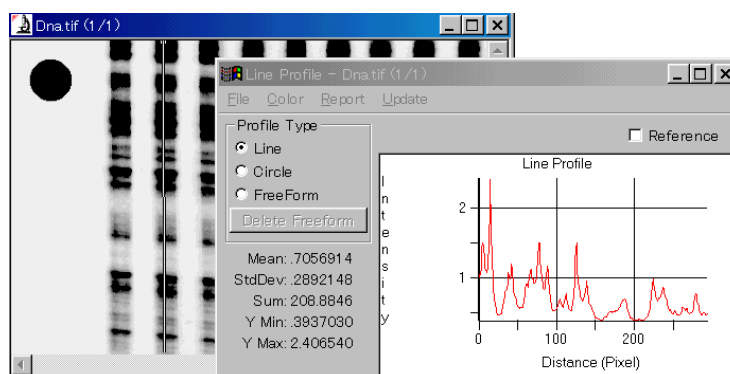
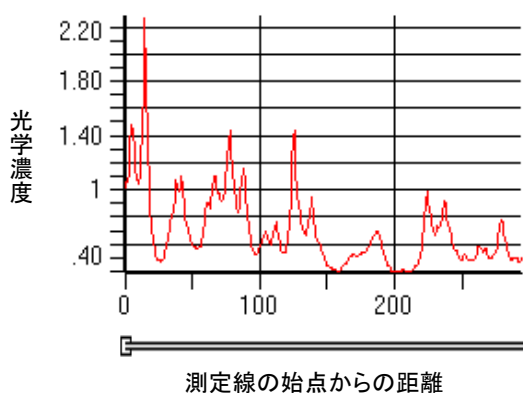



Image-Proは、縞の上端から下端までの濃度を測定してプロットします。縞の濃度はラインプロファイル・グラフに表示されます。



上のラインプロファイルの Y軸は光学濃度(OD)、X軸は測定線の始点からの距離を表しています。測定線は、コブ () が付いている端が始点です。

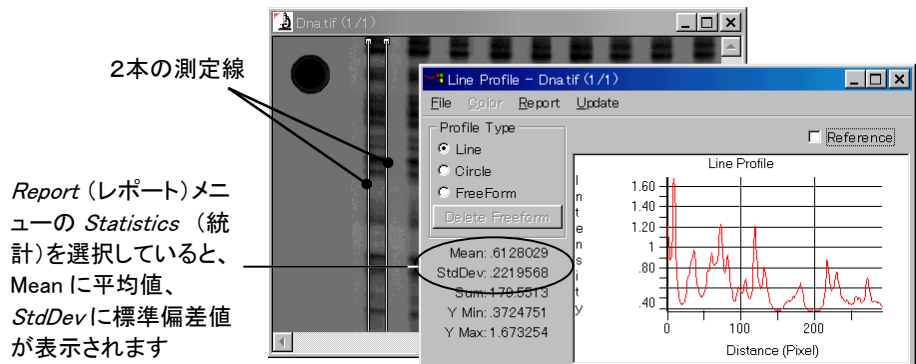
- 最後に、開いている画像ウィンドウとダイアログボックスを全て閉じ、Image-Proを終了します。

File (ファイル) メニューから *Exit* (終了) コマンドを選択します。

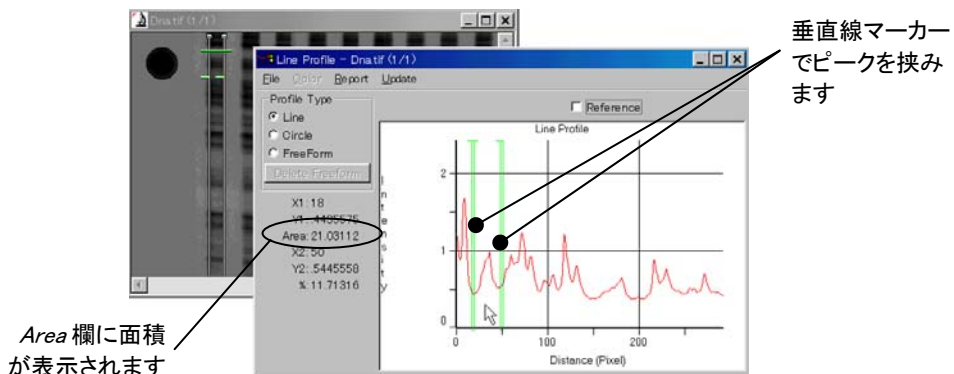
これで画像ウィンドウが自動的に閉じ、Image-Proが終了します。

光学濃度測定に関するその他の情報

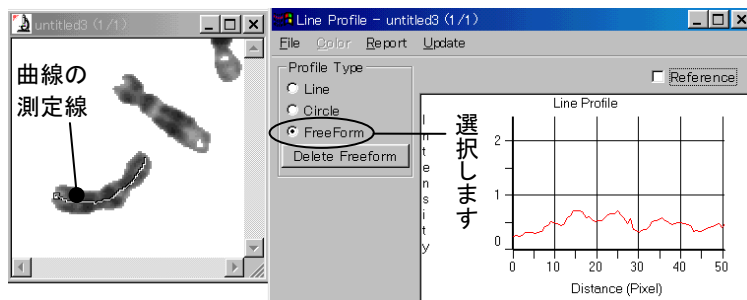
- ◆ 積分光学濃度 (integrated optical density) を測定する場合は、Count/Size(カウント/サイズ)ダイアログボックスの *Measure* (測定)メニューで *Select Measurements* (測定項目)コマンドを実行し、*Measurements* (測定項目)欄から *IOD* (積分光学濃度)を選択して、Count/Sizeで測定を行なって下さい。
- ◆ 上の例では直線の測定線で濃度を測定しましたが、Image-Proではこの他にも次のようなラインプロファイル測定オプションを利用できます。
 - 2本の垂直・水平線に挟まれた領域の平均濃度プロファイル: *Line Profile* ウィンドウの *Report* (レポート)メニューから *Thick Vert* (垂直シックプロファイル)または *Thick Horz* (水平シックプロファイル)を選択することで測定します。
 - 2本の測定線間の平均値または標準偏差の測定: 平均値を測定するときは、*Report*(レポート)メニューの *Thick Options*(シックプロファイルのオプション)から *Average*(平均)を選択します。標準偏差を測定するときは、*Thick Options*から *Std Dev*(標準偏差)を選択します。



- ラインプロファイル・グラフのピークの面積(積分値)の測定: *Line Profile*ウィンドウの *Report*(レポート)メニューから *Range/Area*(レンジ/面積)を選択し、グラフ内に表示される2本の垂直線マーカーでピークを挟みます。垂直線マーカーに挟まれたピークの面積が、グラフの左側の統計データ欄に表示されます



- 自由曲線の濃度プロファイル: Line Profile ウィンドウの *FreeForm* (自由曲線) オプションで測定します。*FreeForm* をクリックして選択し、マウスで曲線の測定線を引きます。線の終端でダブルクリックし、線を確定します。



測定線を引き直すときは、Delete Freeform (自由曲線を削除) ボタンをクリックします。

- 円環の測定線の濃度プロファイル: Line Profile ウィンドウの *Circle* (円環) オプションを選択して測定します。
- 背景の減算: 一本の測定線を基準線 (画像の背景) に設定し、その値をもう一本の測定線の値から減算して背景の減算を行なうことができます。これを行なうには、まずはじめの測定線を背景に置いてから Line Profile ウィンドウの *Reference* (差分を表示) オプションを選択し、つぎに測定線を任意の位置へ移動します。
- 2本のプロファイルの比較: 一本のラインプロファイルを固定してから測定線を移動し、もう一本のラインプロファイルを同時に表示して、2本を比較することができます。これを行なうには、まずはじめの測定線を位置決めしてから Line Profile ウィンドウの *Report* (レポート) メニューの *Freeze* (フリーズ) を選択し、次に測定線を任意の位置へ移動します。
- プロファイルデータの数値表示: ラインプロファイルは、*Report* メニューの *Table* (表) を選択すると数値で表示できます。数値データは、Line Profile ウィンドウの *File* (ファイル) メニューのコマンドで外部へ出力できます。