

## ImageJを用いたコロニー数計測

1

## ImageJとは？

- ImageJはNIHが開発している画像解析ソフトであり、生物学の世界では事実上の標準画像解析ソフトである。
- 様々なプラグインで機能拡張できる。
- 対応するOSはWindows, MacOS, Linuxである。それぞれのPCにインストールする際には、それぞれ注意事項がある。(別紙で解説)
- 最近はImageJをインストールしなくてもweb上で作動させることができる。つまり、PCがなくてもスマホでも作動可能となる。

2

## Web上での作動の問題点

- 機能や使えるブラウザや処理速度などの制限がある。ソフトのインストールが分からなかったり、PCを持って来れなかったりした場合にはスマートフォンやタブレットなどを用いてもよい。ただし、スマートフォンの画面は小さいため、操作性は劣る。
- ただし、スマートフォンやタブレットでの使用であっても、学生や生徒にとっては画像解析ソフトの使用に対する入り口にはなる。

3

## ImageJのHP

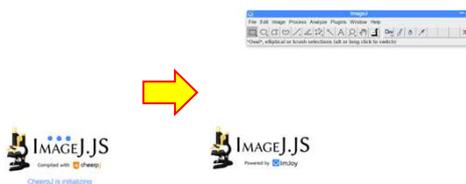


Support is available on the mailing list and on the image.sc forum. Disclaimer

- <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>
- **Run ImageJ in Browser!**をクリックするとソフトをインストールしなくてもweb上でImageJが作動するが、PCがある場合には推奨しない。PCがない場合やPCへのインストールが分からない場合だけにする。
- **Download**のリンク先からPCに必要なソフトを選択する。

4

## Run ImageJ in Browserをクリックすると



しばらく左のロゴが出てから(環境にもよるが時間がかかりかかる), 右側のImageJのコントロールパネルが出てきて、起動が完了する。

5

## ImageJの入手先



Support is available on the mailing list and on the image.sc forum. Disclaimer

- <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>
- **Download**をクリックするとソフトのdownloadのページが開く。
- **Download**のリンク先からPCに必要なソフトを選択する。

6

## 一方、PCにImageJのdownloadは



- PCのOSに合わせてソフトをdownloadする。
- インストールの詳細に関しては別紙で紹介する。
- ImageJは商業ソフトではないため、使いにくいところもある。

7

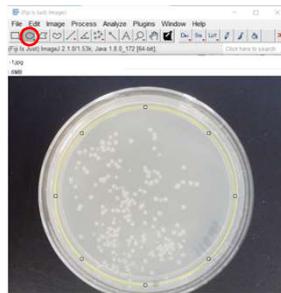
## コロニー数計測手順

- はじめに“File” → “Open...” で解析したい画像ファイル(保存済み)を開く。
- または、写真ファイルを別のソフトで開いて画像をコピーして“Edit” → “Paste”する。
- なお、**iPhoneで撮影した写真ファイルに関してはWindows PCで開けない問題がよくある。**iOSやMacOSでHEIF (High Efficiency Image File Format)という画像ファイル形式が採用され、それにつけられている拡張子は「HEIC」である。この対処法に関しては、「**光合成色素の分離**」「**科学用Freewares改4.docx**」で説明してあるので読んで対処しておくこと。

8

## コロニー数計測順(範囲指定)

- “O”を選択して、シャーレ中の計測したい部分だけを選択する。PCの場合は、Shift keyを押しながら縁を広げると円になり、押ししていないと楕円になる。円周上の口をつかむと拡大縮小可能。黄色い縁とシャーレの縁を合わせる。



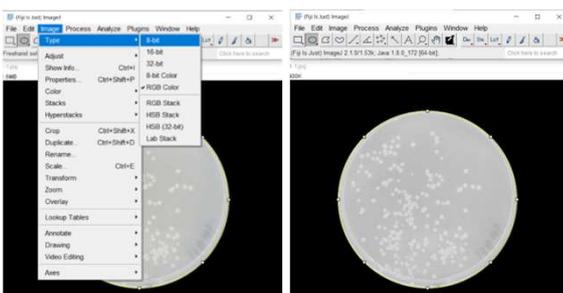
9

## “Edit” → “Clear Outside”で余分な外側部分を消す。



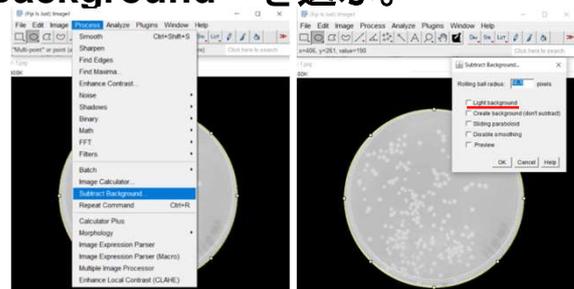
10

## “Image” → “Type” → “8-bit”を選びグレイモードにする。



11

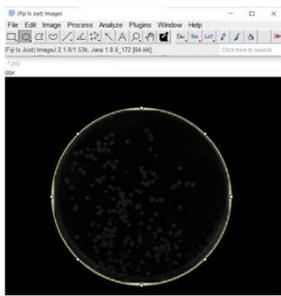
## “Process” → “Subtract Background”を選ぶ。



“Rolling ball radius:”の数値を変えても良いが、取りあえず変えない。“Light background”のチェックが付いていれば外す。

12

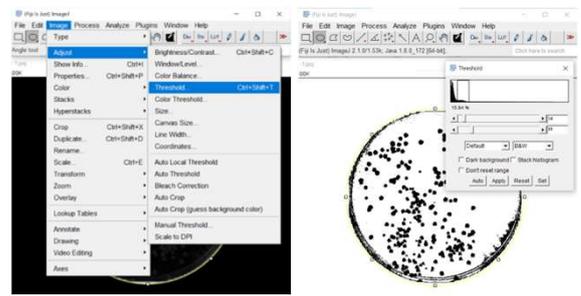
## コロニー数計測手順



- “Light background” のチェックを外し “OK”することにより、バックグラウンドが黒くなる。
- 必ずしもこの操作をしなくても良いが、取りあえずはチェックを外す。

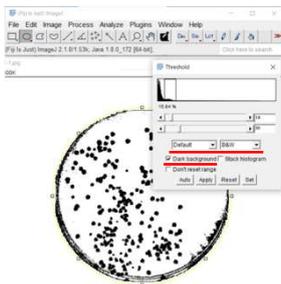
13

“Image” → “Adjust” → “Threshold...” (閾値)を選択する。



14

## コロニー数計測手順



- “Threshold” ウィンドウが表示される。
- 左のプルダウンメニューから “Default” を選択する。
- 右のプルダウンメニューから好みで “B&W” 等 (Red等でも良い) を選択する。
- “Dark background” をチェックする。

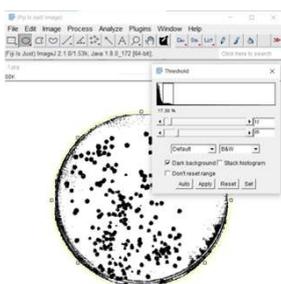
15

## コロニー数計測手順

- “Stack histogram” をチェックしない。
- ウィンドウのヒストグラムとコロニーを認識しているのかを確認しながら、スクロールバーで閾値を調節する。
- “Apply” ボタンを押す。

16

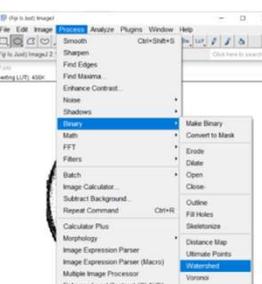
## コロニー数計測手順



- “Apply” ボタンを押した後は、×を押してウィンドウを消す。

17

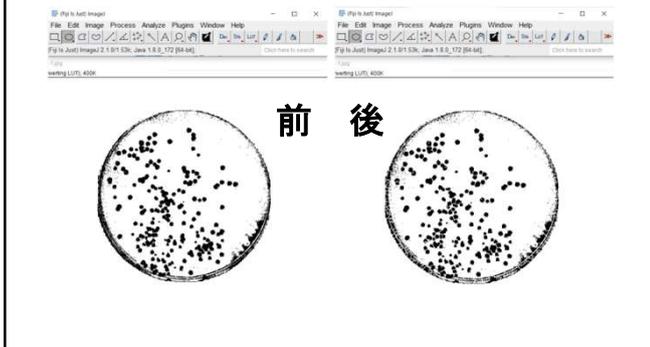
## コロニー数計測手順



- 繋がったコロニーを切り分け、別々のコロニーとして計測させるために次の操作をする。
- “Process” → “Binary” → “Watershed” で、繋がったコロニーを分割する。

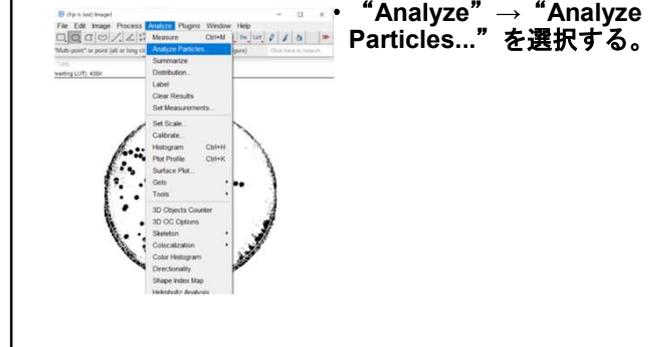
18

## Watershedの前後



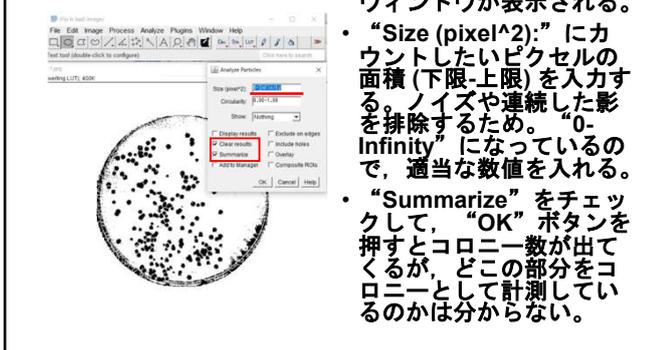
19

## コロニー数計測手順



20

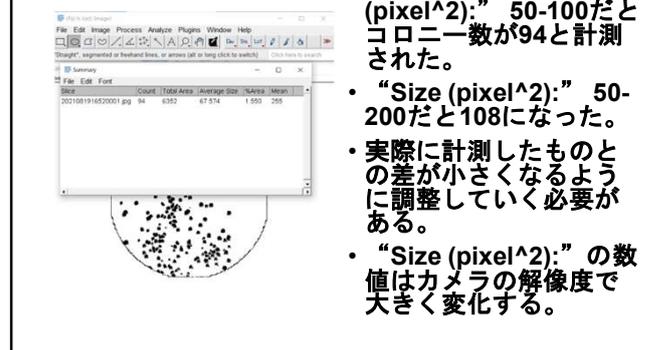
## コロニー数計測手順



- “Analyze Particles” ウィンドウが表示される。
- “Size (pixel<sup>2</sup>):” にカウントしたいピクセルの面積 (下限-上限) を入力する。ノイズや連続した影を排除するため。“0-Infinity” になっているので、適当な数値を入れる。
- “Summarize” をチェックして、“OK” ボタンを押すとコロニー数が出てくるが、どこの部分をコロニーとして計測しているかは分からない。

21

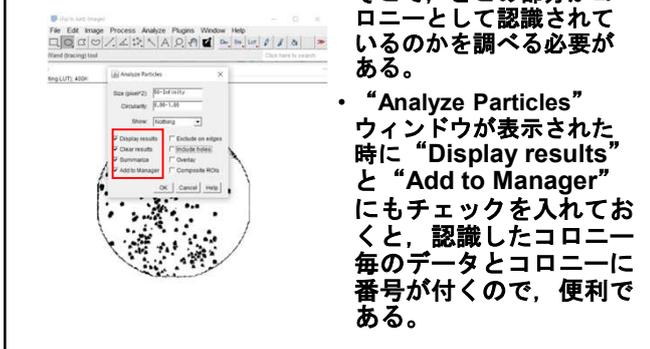
## コロニー数計測結果



- 例えば，“Size (pixel<sup>2</sup>):” 50-100だとコロニー数が94と計測された。
- “Size (pixel<sup>2</sup>):” 50-200だと108になった。
- 実際に計測したものと差が小さくなるように調整していく必要がある。
- “Size (pixel<sup>2</sup>):” の数値はカメラの解像度で大きく変化する。

22

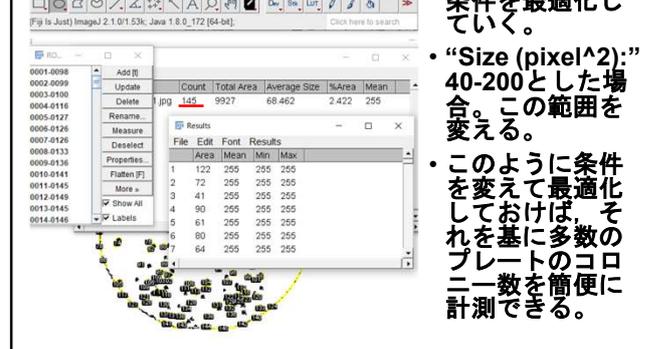
## コロニー数計測結果



- そこで、どこの部分がコロニーとして認識されているのかを調べる必要がある。
- “Analyze Particles” ウィンドウが表示された時に “Display results” と “Add to Manager” にもチェックを入れておくと、認識したコロニー毎のデータとコロニーに番号が付くので、便利である。

23

## コロニー数計測結果



- このようにして条件を最適化していく。
- “Size (pixel<sup>2</sup>):” 40-200とした場合、この範囲を変える。
- このように条件を変えて最適化しておけば、それを基に多数のプレートのコロニー数を簡単に計測できる。

24