

CancerD2 ver. 1 (Windows 10 対応版) の使い方

京都工芸繊維大学名誉教授

岸本 通雅

tukue@hotmail.com

1. 配布および使用条件

本プログラム(CancerD2)は第3者には開示しないでください。コピーは厳重に保管のほどお願いいたします。なおこのプログラムはサンプル画像や標準的な二次元電気泳動画像での動作は確認していますが、特殊な画像には対応できないこともあります。その場合はご連絡ください。また本プログラムはこれまで様々な条件で試されそのたびに変更したものですから下記の機能以外にも様々な使い方が可能ですが、動作は確認できていませんのでうまくいかないこともあると思います。また手動操作によるスポット修正の部分にはまだ一部不具合が残っている可能性があります。修正オプションはいろいろありますが、相関図作製段階以前はできるだけ本説明書の流れに沿われることを推奨します。もしおかしい動作をするようであればご連絡ください。なお本プログラムは戸田年総先生のご厚意によりデバッグ、マニュアル作成作業に協力して頂きました。この共同作業により、かなり使いやすくなりました。厚く御礼申し上げます。

2. インストール

日本電気泳動学会より配布されたインストール用のフォルダ『smartimager』を、Windowsのドライブ C: の直下にコピーして下さい。推奨 OS は Windows 7 ですが、Windows xp、Windows 8 および Windows 10 でも動作することを確認しております。

3. 準備段階

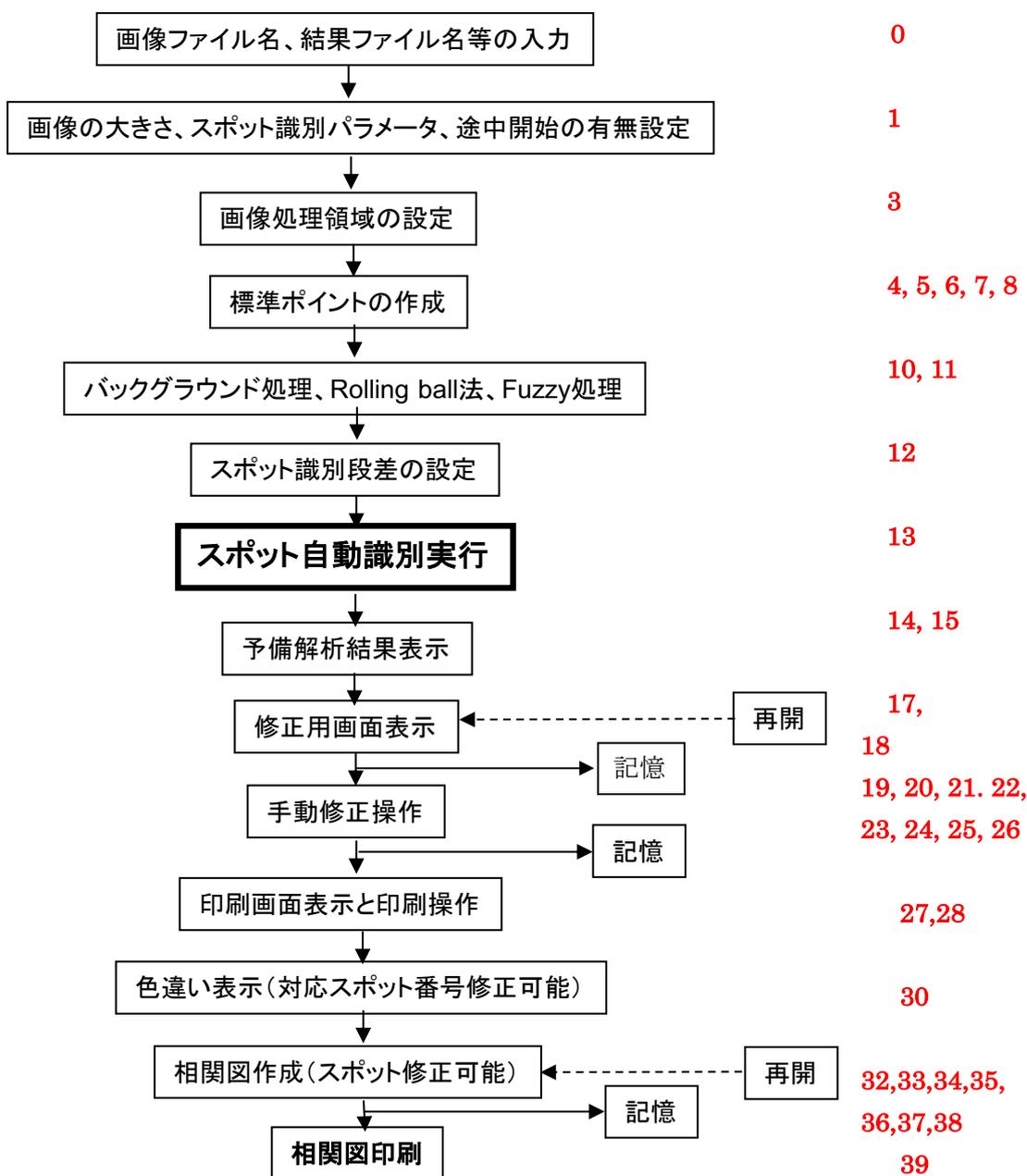
本プログラムは2枚の画像ファイルを解析し、比較検証するためのものです。デジタルカメラやスキャナーで取り込んだ画像を市販の画像編集ソフト(たとえば Paint Shop Pro)を用いて大きさ約 800×600 pixel (実行時に変更可能)、8 bit グレースケールで bmp ファイルとして保存してください。最近のデジタルカメラの画素数は非常に大きくなっており、その場合は画像編集ソフトのトリミング機能などを用いて、解析したい領域のみを切り取って、上述の様に処理することにより、画像の精度を落とすことなく詳細な解析が可能です。保存先は C:\smartimager\2DE で、ファイル名は半角 8 文字以内としてください。またこのフォルダに InPut.txt (中身は 600,800,2,240 で、cancerd2.exe を実行すると最初にこれらの解析条件が提示され修正・確認を行います) を必ず入れておいてください。

4. 解析手順の概要

解析手順のフローチャートを以下に示します。

(準備段階 インストール、各種ファイルのコピーなど)

画面番号

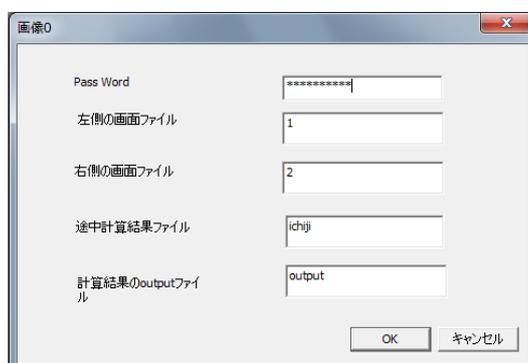


このプログラムの特徴の一つは、前回の解析結果を途中の段階で記憶させておけば、次は始めからやり直さなくても途中から再開できることにあります。フローチャートに示すように、大まかには前処理、スポットの自動識別、手動による修正、印刷、関連図の作成、関連図印刷といった構成です。解析手順の詳細は以下に記述します。解析途中の段階で現在行っている解析手順が全体から見てどのような位置にあるかを確認したいときは、その位置の画面番号を確認して、上のフローチャートの右に示した画面番号から、対応する解析手順の位置を参照してください。

5. 実行手順

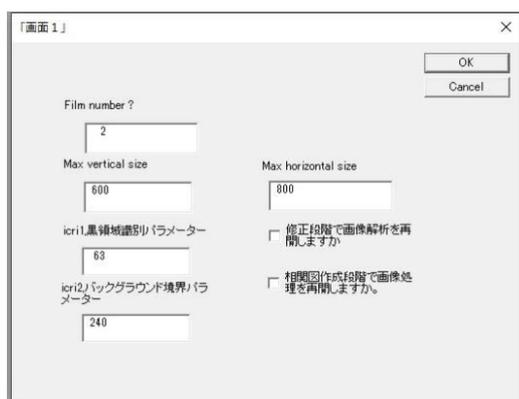
画像データファイルを上述の手順でセットしたことを確認したあと、**cancerd2.exe** をダブルクリックして実行させてください。最初に下図のような **Dialog** が画面中央に現れますので、日本電気泳動学会より配布されたプログラムに固有のパスワードを入力してください。

画面 0



「左側画像ファイル」および「右側画像ファイル」には、準備段階で **C:\¥smartimager¥2DE¥** に保存したファイル名を記入して下さい。デフォルトのまま 1 および 2 としますと、プログラムと一緒に配布されたサンプル画像が処理されます。「途中経過ファイル」では、後述の「画面 1 8」において解析途中のデータを記憶させる際のファイル名を指定します。デフォルトの **ichiji** のままでも構いませんが、複数の組み合わせでご自分の二次元電気泳動画像を処理し、途中から解析を再開する場合には、解析ごとに個別のファイル名をつけておかれると便利です。「解析結果ファイル」では、「画面 3 8」において、解析結果を記憶させる際のファイル名を指定します。デフォルトの **output** のままでも構いませんが、各スポットの定量値などがテキストファイルとして保存されますので、ご自分の画像を処理される際は解析ごとに個別のファイル名をつけておかれることをお勧めします。(ファイル名をつけられた場合は次からこのファイルを使うことになりますから、このファイル名を記憶しておき、次に立ちあげた時、画面 0 でそのファイルを指定して下さい。) ここで「OK」をクリックすると、次の「画面 1」が現れます。(このとき「修正段階で再開」にチェックを入れると「画面 1 7」(8 ページ) から、「相関図作成段階」にチェックを入れると「画面 3 2」(1 2 ページ) から解析が再開されます。)

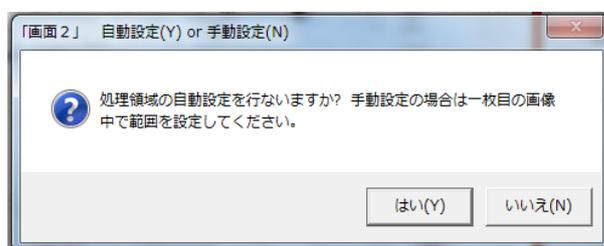
画面 1



画面1において **File number?**とあるのは、解析する画像ファイルの数を問うているのです。ここでは2つの画像を比較解析しますのでそのままにしておいてください。またここで実際に解析を行う画像ファイルの縦横サイズがデフォルト値（600×800 ピクセル）より大きく異なっているようでしたら、ピクセルの数値を変更してください。このプログラムは 1000×1000 ピクセルでも十分耐えられると思いますが、ディスプレイからの画像のはみ出しが大きくなりますので、後の扱いが少し面倒となります。icri1 パラメーターは、「画面7」以降で行う2つの画像を重ね合わせる為の標準スポットを選び出す際に使います。30～50個程度のなるべく重ならないスポットが出てくるのが望ましいです。したがって黒に近い数値をいれればよく（256階調ですので黒は0 白は255です）、通常はデフォルトのままでよいと思います。またこの値は「画面6」で変更できます。icri2 はバックグラウンドとスポット領域との境界色を示すパラメーターです。したがって白（255）に近い値がよいのですが、余り近いとノイズまたはバックグラウンドのわずかな起伏まで拾ってしまうので、通常はデフォルト値辺りがよいと思います。しかし薄いスポットが重要な場合には255に近づけるべきです（255に近い程スポット数が多くなります）。

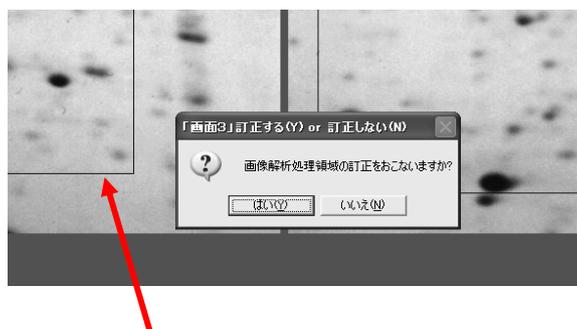
設定を確認した後「OK」ボタンを押すと、次のような画面が表示されます。

画面2



ここでは処理領域を自動設定するか手動で設定するかを選択します。通常は「いいえ」を押し、手動による設定を行ってください。手動による設定は左側の画像を用いドラッグ操作で行います。まずマウスを処理領域の左上の端の位置に持っていき左ボタンを押したまま右下端の位置までドラッグして、右下端で左ボタンを押している状態を解除します。すると下の画面が出てきます。

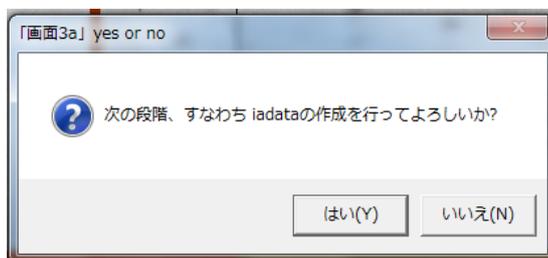
画面3



左側の画像にはドラッグでできた四角の線があります。右の画像には少し大き目の領域を示す四角の線が表示されますが、解析上右画像の領域を大きめにとる必要があるからです。ここでこの画面を見て両方の領域が画像枠からはみ出していたり、解析困難な領域を含んで

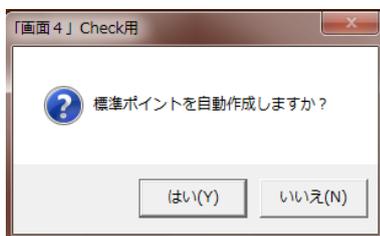
いたりしないかチェックします。とくに不都合がなければ「いいえ」をクリックし、領域を修正する必要がある場合は「はい」をクリックして下さい。修正する場合は四角の線をクリックすると線の色が緑色に変わりますので、クリックした状態でドラッグすると位置を変更できます。また角をクリックすると縦横の線の位置を同時に変えられます。左側の領域も右の領域も自由に修正できます。ただし後の解析のため左側の画像の領域は、右側の画像の領域に含まれるように注意して下さい。それが終わったら右クリックして次の画面に移ります。

画面 3 a



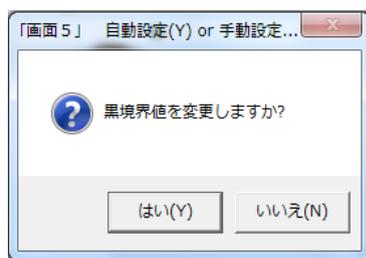
画面 3 a で「はい」を押すとスポット領域の割り出しが開始され、2～3秒して次の画面が現れます。

画面 4



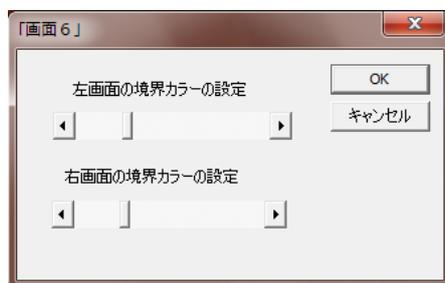
画面 4 では「いいえ」をクリックして下さい。標準ポイントとは2つの画像を重ね合わせるのに使う、対応するスポットをいいます。5～7ペアのポイントをなるべく画像全体に分散させて指定するのが理想的です。「いいえ」を押すと次の画面に移ります。

画面 5



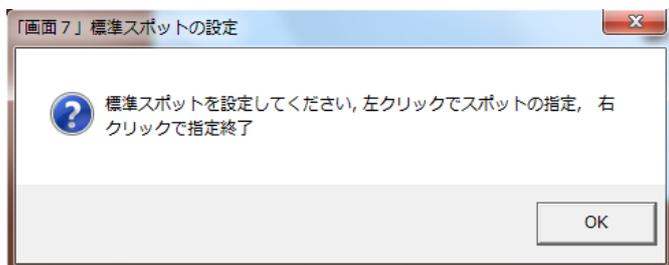
この画面ではスポット領域として認識された部分を黒で示し、バックグラウンドを白で示しています。両画像に10個以上のスポットが現れて、かつスポット同士が過度に重なっていないならば「いいえ」をクリックして下さい。そうでなければ「はい」をクリックします。「いいえ」をクリックすると画面7に進みます。「はい」の場合は次の画面が現れます。

画面 6



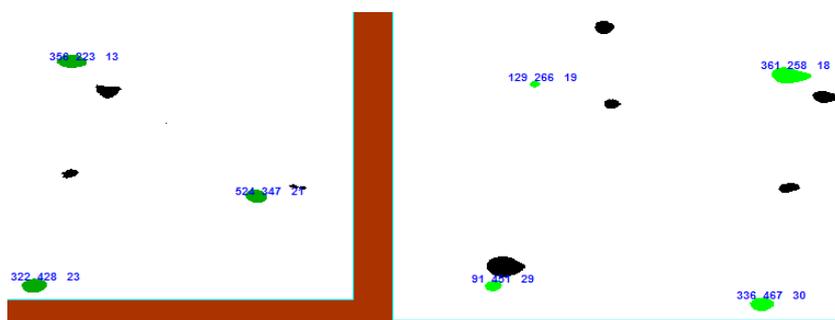
スポットを多く出したときはスライドを右にずらし、重なるスポットが多く全体的にスポット領域を小さくしたいときはスライドを左にずらして下さい。「OK」をクリックすると「画面5」に戻りますので、今度は「いいえ」をクリックします。

画面7



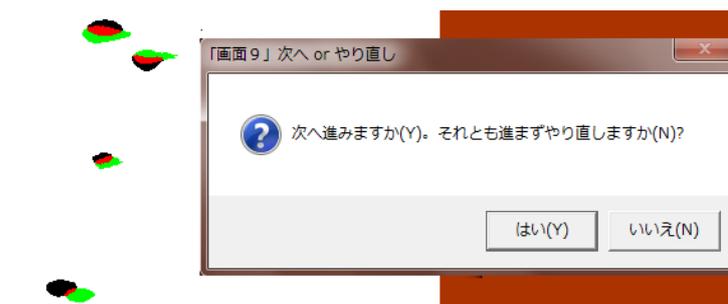
「OK」をクリックすると挿入画面が消えますので、マウスを操作して標準スポットを決めていきます。

画面8



まず左側の画像で一つのスポットをクリックするとそのスポットの色が緑色に変わりその位置に座標と仮のスポット番号が表示されます。次に右側の画像で対応するスポットをクリックするとスポットの色が黄緑色に変わります(画面8)。位置座標と仮のスポット番号が表示されます。この際スクリーン右上隅にある表示様式指定で全体表示をクリックし、カーソルが使えるようにしておくとお便利です。同様の操作を繰り返して、標準スポットとして5から7ペアのスポットを決めます。これらの位置はなるべく偏らないように画像全体に配置して下さい。この作業が終わったら下のカーソルを左端に戻し(もしカーソルが使えない場合には、左向きの矢印キーを押して画面を左隅に寄せて)、マウスの右ボタンをクリックすると次のような画面が現れます。

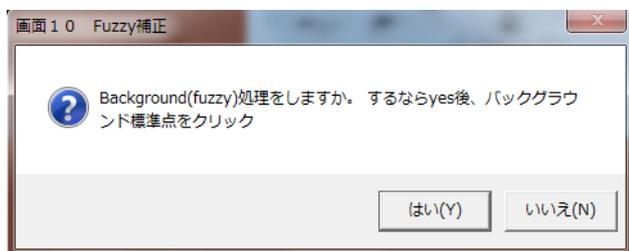
画面9



ここでは左に前の画面8にあった二つの画像が重ね合わさって表示されます。スポットが重

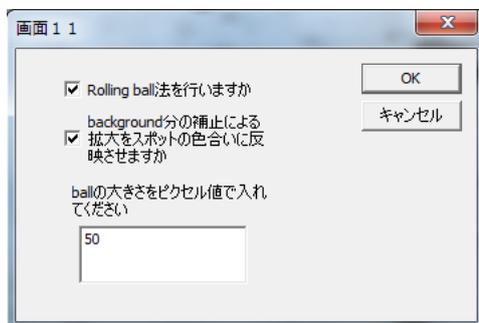
なっている部分は赤色になります。選んだ標準スポットがほぼ重なっていれば以後の解析は順調にいきますので「はい」をクリックします。「いいえ」をクリックするともう一度標準スポットを選ぶ操作に戻りますが、この場合は白黒画面ではなく元のグレースケールの画像で標準スポットを選ぶことになります。この場合も操作は画面8の説明とほぼ同じですので説明は省略します。「はい」をクリックすると次の画面が出てきます。

画面 1 0



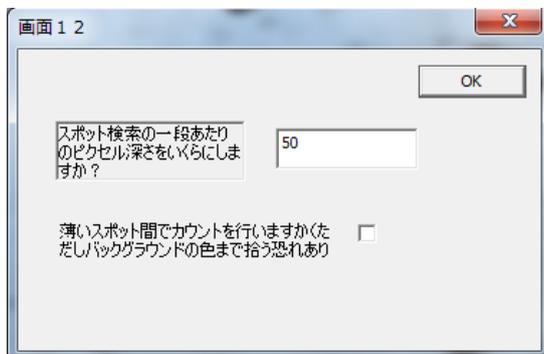
通常 Fuzzy によるバックグラウンド処理はあまり有効ではありませんので「いいえ」をクリックします。すると次の画面に移ります。

画面 1 1



Rolling ball 法によるバックグラウンド処理は強力なので、通常はそのまま「OK」とします。ただ ball の大きさが小さすぎると ball がスポットの中に入り込む影響が大きくなるのでもう少し大きくとる方が安全かもしれません（例えば 50～100 ピクセル）。ピクセル値を入力し「OK」とすると、しばらくして次の画面が現れます。

画面 1 2



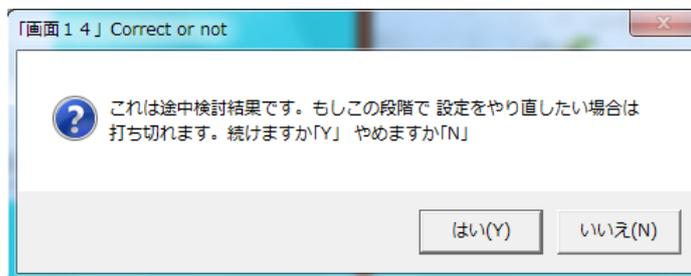
ここではスポットの検出感度を設定します。数値を小さくし、下の「薄いスポット・・・」にチェックを入れることにより薄いスポットまで解析できるようになりますが、画像の揺れなど単なるノイズまでスポットとして認識する危険が増します。逆に数値が大きすぎると、薄いスポットや小さなスポットは無視されます。「OK」を押すと次の表示が現れます。

画面 1 3



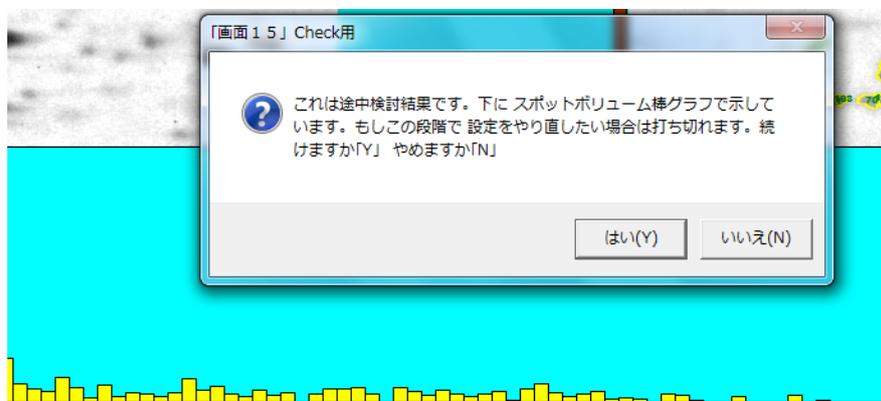
画面の指示通り数 10 秒待つと次の画面に変わります。

画面 1 4



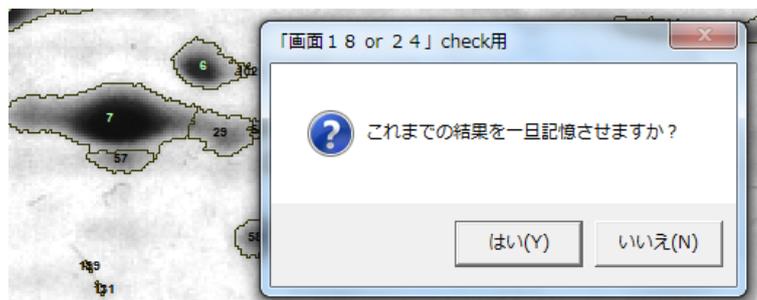
これは予備的な解析結果です、このまま解析を続ける時は「はい」としてください。

画面 1 5



これも予備的な解析結果です。解析を続ける時は「はい」として下さい。すると次のよ うな画面が現れます。これからいよいよ解析結果を詳細に再検討するなどして、正確に解析を 行っていきます。

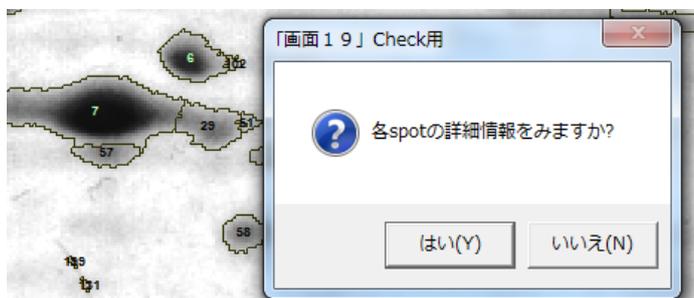
画面 1 8



ここで記憶を促す画面が現れます。「はい」をクリックするとこれまでの結果が記憶され、 次回のプログラム開始においてここまでの解析結果をそのまま使い、途中からスタートする

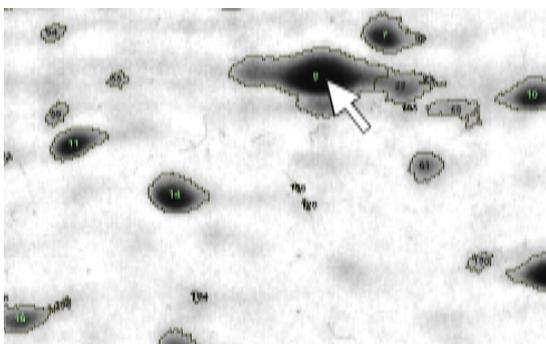
ことができます。(画面0で指定した「途中経過ファイル」に記憶されます。)
「はい」を押すと dialog が消え、しばらくそのまま待つと次の画面に移りますので次の画面が出るまで待って下さい。記憶処理が途中で止まると、次回の操作の再開に支障が生じます。

画面 1 9



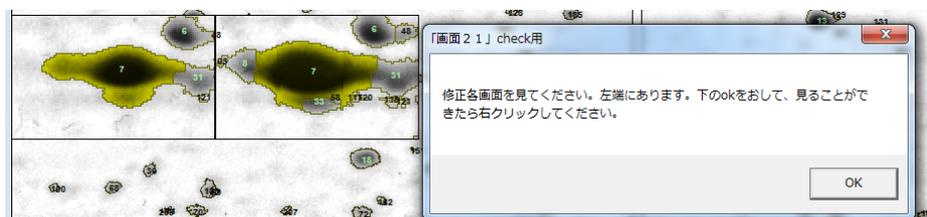
画面 1 9 では各スポットの詳細情報を見ながら必要に応じて修正を行うために「はい」をクリックします。

画面 2 0



邪魔な挿入画面が消えますので、上図のように見たいスポット番号の上にカーソルを合わせ、左クリックして下さい。下図のような画面に変わります。

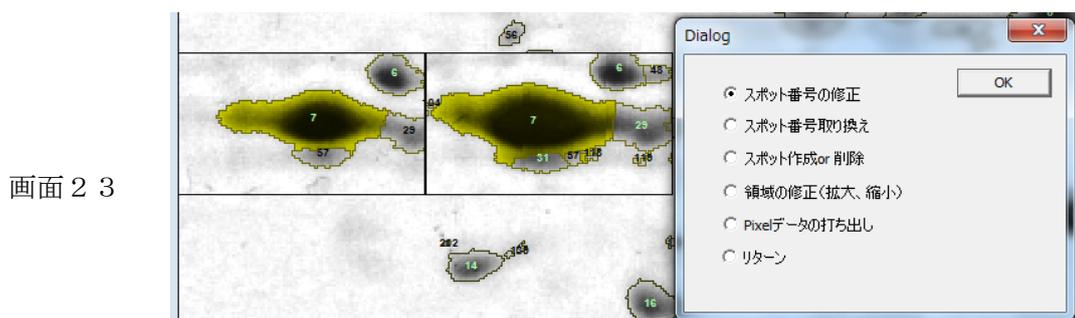
画面 2 1



ここで「OK」ボタンを押すと挿入画面が消えますので、カーソル操作や左矢印ボタンで画面を左に寄せ、クリックした番号に対応したスポットが左側の小さな四角枠の図で黄色がかかった色で表示されているか確認してください。なお右側の小さな枠にあるスポットは黄色で囲まれていなくてもかまいません。確認できたら右クリックしてください。画面 2 2 が出てきます。この右クリックが早すぎると出ませんのでそのときは少し待って右クリックを繰り返してください。



ここでは、修正するスポットの表示倍率が小さすぎるか大きすぎるかを見て、修正操作がやりやすい倍率を入力し「OK」を押します。もし前の確認段階で不都合があれば「キャンセル」を押してください。「OK」を押すと次の表示が現れます。

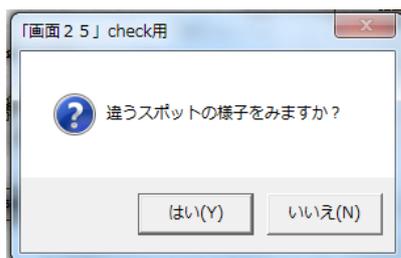


ここでスポットの修正の種類を選択します。修正しない場合は「リターン」を選択します。選択し終わったら「OK」をクリックします。今回は修正しませんのでマウスの左クリックで「リターン」を選択し、「OK」ボタンを押します。(修正可能ですが説明がかなり複雑になりますので後でします。[修正する場合は1 6 ページ](#))



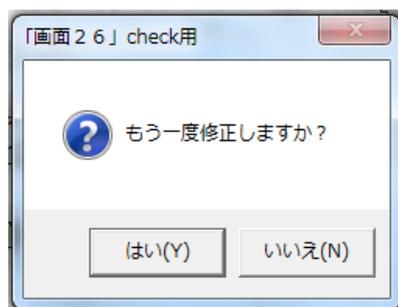
この画面でもまた途中記憶ができますが、修正をおこなっていないので今回は「いいえ」を押して次の「画面 2 5」に進みます。修正を行った場合には「はい」を押すと、前回「画面 1 8」の操作で行った記憶と置き換わります。

画面 2 5



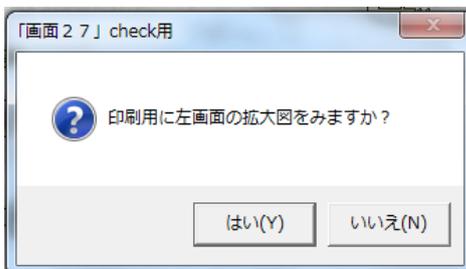
違うスポットについて作業するか聞いてきますので必要なら「はい」、修正を終えるのなら「いいえ」とします。今回は「いいえ」で次へ進みます。

画面 2 6

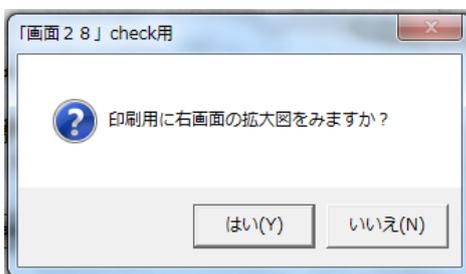


確認のためもう一度修正を繰り返すか聞いてきます。ここでは「いいえ」とします。

画面 2 7

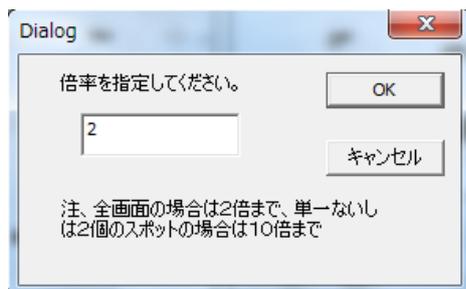


画面 2 8



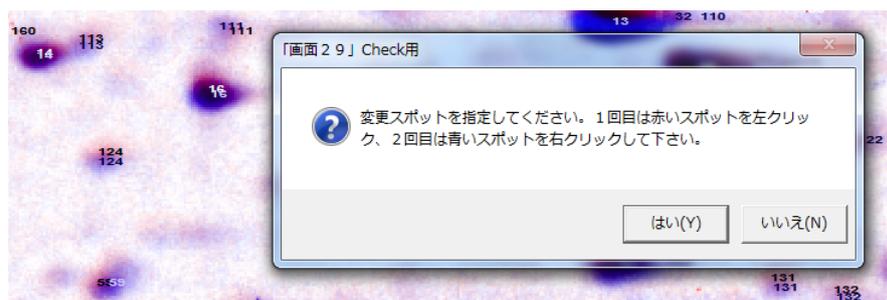
ここで、印刷用に画像の拡大表示を行うか聞いてきます。1回目は左側の画像、2回目は右側の画像です。拡大表示画像をプリントあるいは保存するときは、「はい」とすると倍率指定ダイアログが出ますから、1倍から5倍までの範囲で指定した後、プルダウンメニューの「File」から、「Print」または「Save」を選んで下さい。拡大表示画面でリターンキーを押すと、次に進みます。「画面 2 7」「画面 2 8」で「いいえ」とした時、あるいは「はい」として印刷操作が終わると再び表示倍率を尋ねる画面が現れます。

画面 2 9



この画面は2枚の画像を色違いで重ね合わせて表示する時の倍率をたずねるものです。適当な倍率（1または2）を指定して「OK」をクリックしてください。

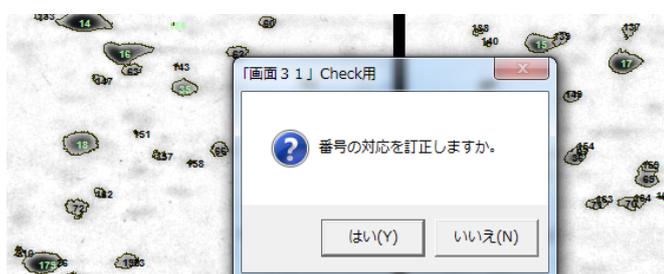
画面 3 0



ここではスポット番号の変更を指示します。これは同じペアであるはずのスポットに違う番号が振られている時などに行う操作です。これらの操作を行う場合については後で説明します（19ページ）。今回はそれら一連の操作を行わないので「いいえ」を押します。

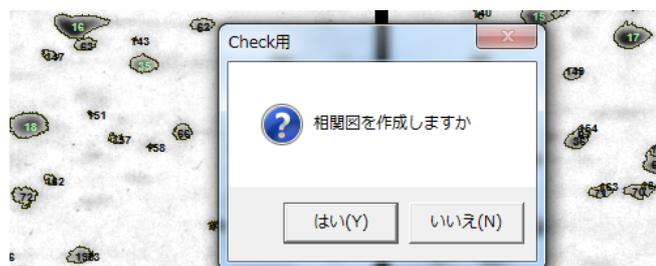
再びスポット領域修正画面の表示倍率を設定する「画面 1 7」が現れますので、表示倍率を1か2として「OK」を押します。

画面 3 1



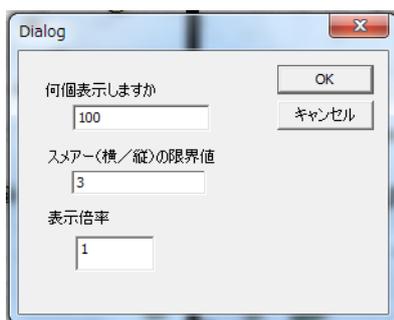
すると、上図の画面が現れ、スポット番号の対応を訂正するか聞いてきますので、訂正がなければ「いいえ」を押します。

画面 3 2



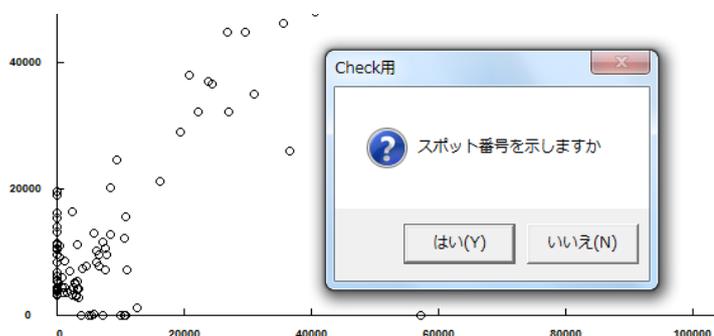
ここで2つの画像間のスポット定量値の相関図を作成するか聞いてきますので、「はい」とします。

画面 3 3



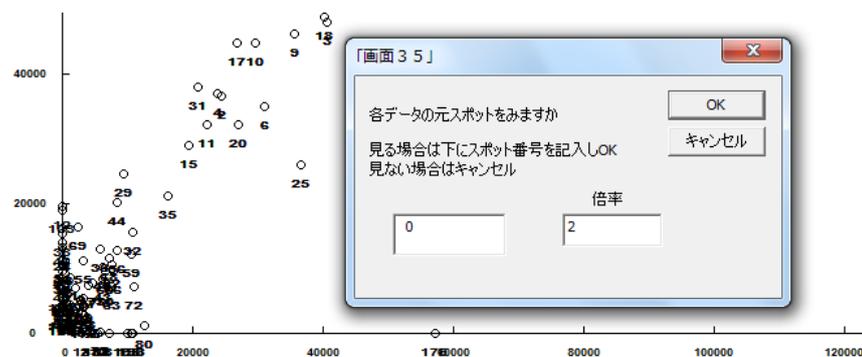
この Dialog 画面では、次の相関図 (画面 3 4) を作成する際の条件を設定します。ここで設定するスポットの表示数は、実際に処理されたスポット数より多い必要があります (初期値は 100 ですが、500 くらいにしたほうが良いです) 「OK」 を押すと次の Dialog 画面で実際に処理されたスポットの数が表示されますので、指定値がスポット数より多いことを確認して「OK」を押して下さい。次の画面 34 では「はい」とします。

画面 3 4



相関図の横軸は第 1 画像 (左画像) 上のスポットのボリューム値、縦軸は第 2 画像 (右画像) 上のスポットのボリューム値を示します。丸で示した位置の各座標が対応するスポットのボリューム値を示します。この画面で「はい」をクリックすると各丸に対応するスポット番号が表示されます。

画面 3 5

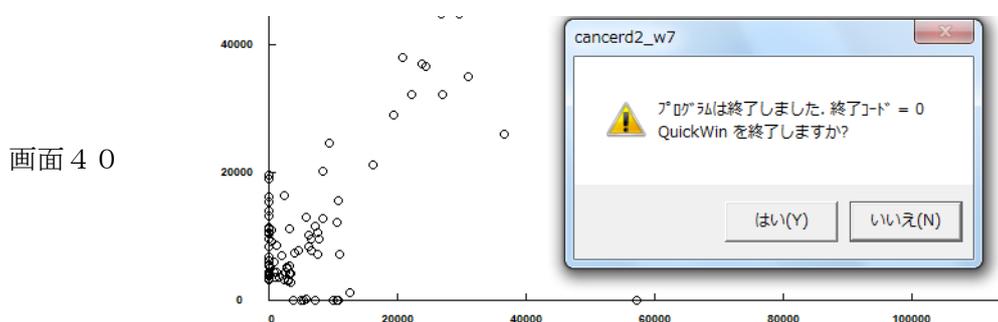


ここで確認したいスポットの番号と表示倍率を指定し「OK」を押すと「画面 3 7」のよ

とデータファイルが壊れ、次回の解析で途中からの再開ができなくなります。

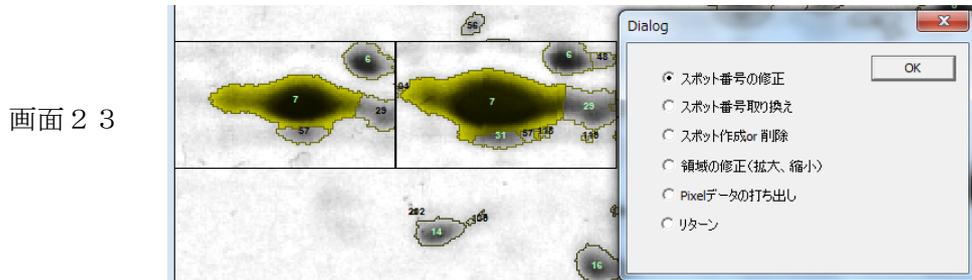


この画面で相関図を印刷するか聞いてきます。印刷する場合は「はい」をクリックしてプルダウンメニューから **File -->print** と操作して下さい。印刷が終わったらリターンキー (**Enter**) を押して、次の終了画面に移ります。

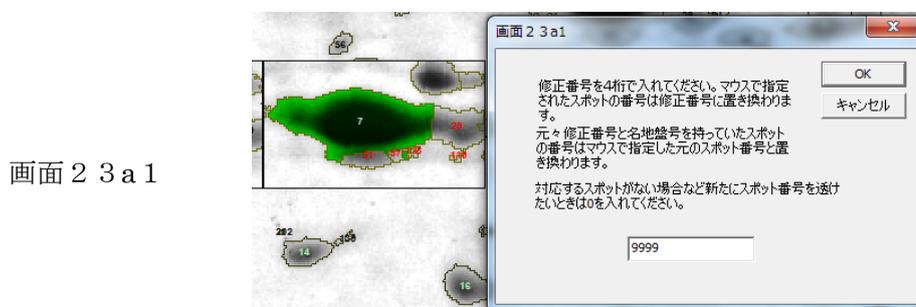


これで解析は全て終わりました、ご苦労様です。最後に「はい」を押してください。解析によって得られた各スポットのボリューム値等は「**smartimager**」フォルダ内の「解析結果ファイル(output.txt 等)」にあります。スペースで区切られたデータ (**number, x, y, vol, area**, 平均の黒さの項目) をエクセルなどで開いてお使い下さい。先に左側画像のデータが、その後右側の画像のデータが表示されています。

ここからは「画面23」または「画面37」で修正オプションを選んだときの操作方法について説明します。（「画面37」では背景が相関図ですが、以下の操作手順は同じです）

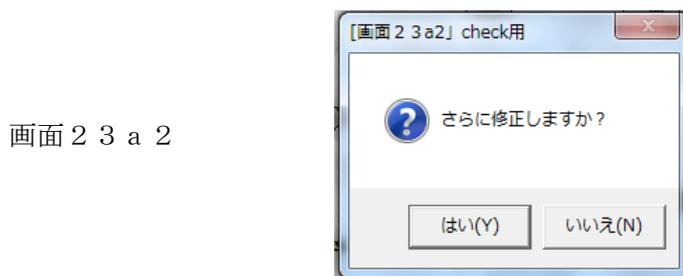


ここでは、画面23（10ページ）のDialogで一番上すなわち「スポット番号の修正」を選んだとします。するとDialogが消えますので、小枠（右側）内で対象とするスポットの番号を「クリック」します。そのスポットの色が緑色になり次の画面23a1が出ます。（相関図表示（14ページの画面37）の段階でスポットの修正を行った場合は、最初の背景画面が相関図ですが、手順は画面23からの修正操作と全く変わりません。一連の操作が終わると、13ページの「画面34」に戻ります。）



ここで選んだスポットの修正番号を記入して「OK」ボタンをクリックするとスポットの番号が修正番号に変わります。しかし注意すべきはその修正番号がほかのスポットの番号と一致した場合です。この場合はほかの番号が修正前の元の番号だと解釈して、ほかの番号に元の番号が入ってしまいますので注意してください。（番号が入れ替わります）

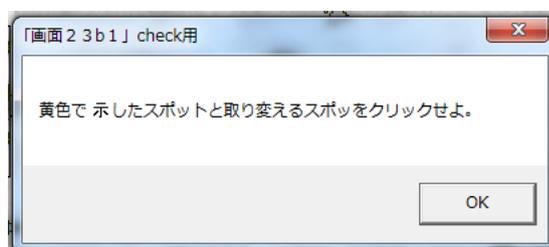
なおもう一枚の画面（左側の画面）ではなにも変わりません。従って対応する番号がもう一枚の画面にある場合はそれも修正するかどうか検討する必要があります。ここで確認のために次の画面が出ます。修正を続ける場合は、「はい」としてスポット選びから同じ操作をします。



この画面 2 3 a 2 は修正番号をもう一度修正するときには使うため、修正がおわっていただければ必要ありませんので、「いいえ」を押してください。画面 2 4 に戻りますので、ここで修正データを一旦記憶させて下さい。

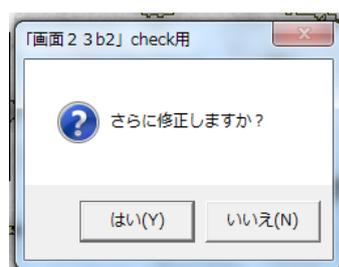
次に画面 2 3 において「スポット番号取り換え」を選んだ場合について説明します。まず画面 2 3 b 1 が現れますので、「OK」を押して次に進んで下さい。

画面 2 3 b 1



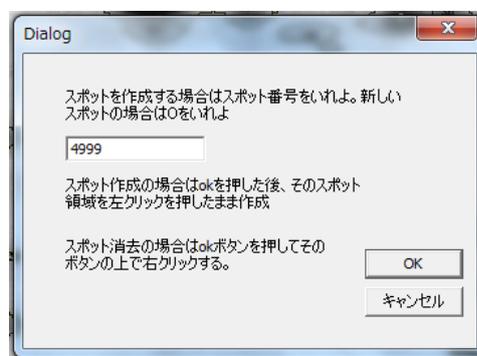
「スポット番号取り換え」は微小な位置のずれを前提にしていますから、訂正操作は小さな枠内で行うしかできません。すなわち黄色に変色したスポットの番号を別のスポットの番号と取り替える時は、対応するスポットを枠内で探してクリックします。枠内に一部でも表示されていれば取り換え可能ですが、枠内に全くなければ修正できません。クリックすると次の確認画面が出てきますが、通常は「いいえ」を押して画面 2 3 に戻ります。

画面 2 3 b 2



次に画面 2 3 において「スポットの作成 or 削除」を選択した場合について説明します。

画面 2 3 c 1



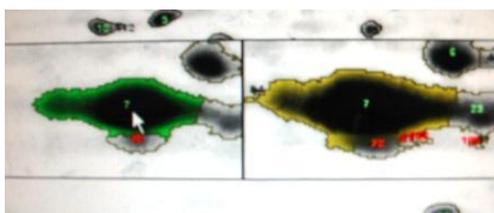
スポットを新しく作成する場合は、Dialog の指示に従いスポット番号を記入して「OK」とし、その位置にマウスイカーソルを持っていき、左クリックしたままドラッグして領域を塗っていくと（色が変わります）その部分の領域がスポットとなり指示した番号がつきます。

削除する場合は「OK」を押して、削除したいスポットの番号の位置でマウスを右クリッ

クします。その段階で番号が消えます。再び確認の Dialog が現れますので「いいえ」として
ください。画面 2 4 に戻りますので、修正データを一旦記憶させて下さい。

次に画面 2 3 で領域の修正（拡大、縮小）を選んだ場合の操作について説明します。まず
画面 2 3 d 1 のような画面が出てくるので領域を拡大ないし縮小するスポットの位置を 左
クリックするとそのスポットが緑色に変色します。その後左クリックしたままドラッグする
とその軌跡がスポット領域に加わっていきます。反対に右クリックしたままドラッグすると
その軌跡がスポット領域でなくなります。

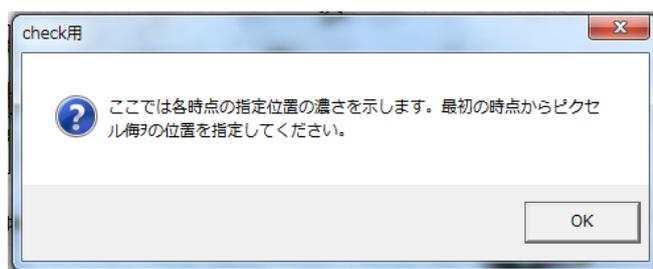
画面 2 3 d 1



十分修正がなされた段階で左ボタンをダブルクリックしてください（ダブルクリックする
前にカーソルを動かすと、その軌跡も選択されてしまいますのでご注意ください）。さらに修
正するか聞いてきますから「いいえ」を押して画面 2 4 に戻り、一旦記憶させます。

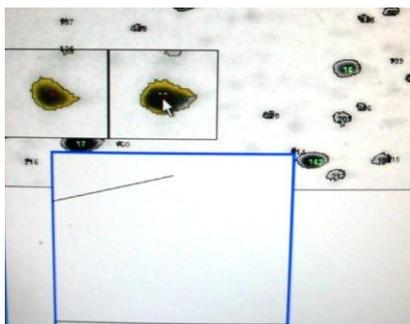
次に画面 2 3 でピクセルデータの打ち出しを選択した場合の操作について説明します。選
択して「OK」とすると下の画面 2 3 e 1 が表示されます。

画面 2 3 e 1



2 画像で対応すると思われる位置を順次左クリックします（「最初の時点」とあるのは左画
像のことです）。するとそれらの位置のピクセル値が折れ線グラフで示されます。

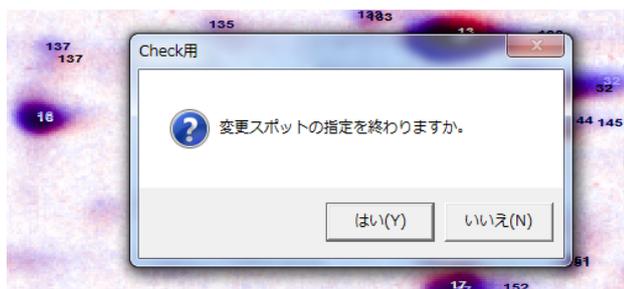
画面 2 3 e 2



ここで左クリックか右クリックすると確認画面が現れますので、「はい」をクリックして画面
2 4 に戻ります。

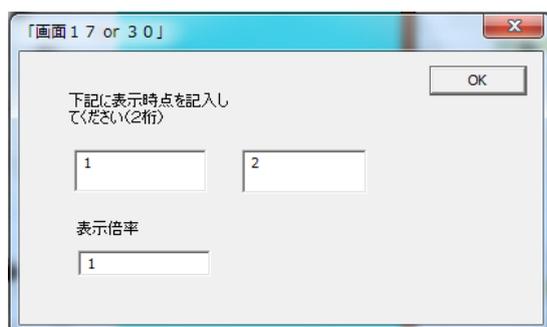
=====
ここでは、「画面30」（12ページ）で「はい」として修正操作に入った場合の操作を述べます。この操作は同じペアであるはずのスポットに違う番号が振られている時などに行います。まず対象とするペアの赤いスポットを左クリックし、次に青いスポットを右クリックします。するとスポットペアの指定が終わったか聞いてきます。「いいえ」をクリックすると「画面30」に戻り別のペアの修正を行うことができます。よければ「はい」をクリックします。

画面30a

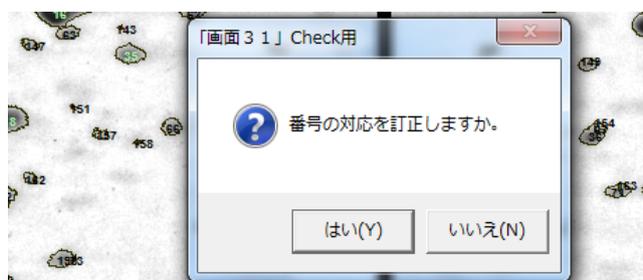


再びスポット領域修正画面の表示倍率を設定する「画面17」が現れますので、表示倍率を1か2として「OK」を押し、「画面31」（12ページ）に進みます。

画面17



画面31



これ以降は12ページをご覧ください。

(2019年8月2日改訂版)