# Spiso-3D 操作マニュアル (USA Patent 8,077,945 B2)

Section 1. 序論 "Spiso-3D"は、神経細胞の3次元画像に基づき、神経スパインの形態解析を数理的+自動的に行うソフトウェアである。 東京大学大学院・川戸研究室で開発され、科学技術振興機構 BioInfomatics プロジェクトにも採択された。

樹状突起とスパインを表す 輝度関数 I(x) を Taylor 展開すると:

$$I(\mathbf{x} + \varepsilon \mathbf{u}) = I(\mathbf{x}) + \varepsilon I'(\mathbf{u}) + \frac{1}{2}\varepsilon^2 I''(\mathbf{u}) + = I(\mathbf{x}) + \varepsilon \cdot gradI \cdot \mathbf{u} + \frac{1}{2}\varepsilon^2 \mathbf{u}^t \mathbf{H}\mathbf{u} + \dots$$

$$= I(\mathbf{x} + \varepsilon \mathbf{u}) = I(\mathbf{x}) + \varepsilon (g_+ u_+ + g_- u_-) + \frac{1}{2} \varepsilon^2 (\lambda_+ u_+^2 + \lambda_- u_-^2) + \dots$$

ここで  $\lambda_{+}$  と  $\lambda_{-}$  ( $\lambda_{+} > \lambda_{-}$ ) はヘステンソル **H** の固有値であり, **u** はその方向の 単位ベクトルである。 まず、スケールスペース法を用いて樹状突起のトレースを行 う。この際、 $\sigma$ -コンボリューションぼかしを利用して凸凹を減らし、境界度積の計算によ り樹状突起の中心・直径を求める。次に、2次微分の行列 **H** のヘステンソルを用いて 負の曲率を探す。全ての座標軸で負の曲率となる部分が閉じたスパイン「頭部」が占 める領域である。この領域の中心をスパイン中心とする。スパインの頭部の大きさは直 径で評価するが、直径はスパイン境界から中心に至る距離画像値の2倍として算出す る。また、スパインの中心からそのスパインに最も近い樹状突起に下ろした垂線を、ス パインネックとする。このようにして得られた樹状突起と、スパイン頭部及びネックとを合 わせて最終的な神経シナプスの形態が得られる。(スパイン=シナプス後部)

理論的な詳細説明は Cerebral Cortex (2011) 21:2704-2711, Mukai et al. として出版 されている (Open Access)。

#### First round analysis can be finished within 2 min !!

 $\rightarrow$  manual correction is necessary to obtain good head diameter values.

Spiso runs on Windows 10, 7, XP, Vista, using tif image file (256×256 ~1024×1024), See Sec 4. Java 6, Java 3D が必要. 内部 graphic card を使用すること、外部 graphic card は外すさないと、解析で拡大縮小操作が極端に遅くなる.

\* Full version of Spiso を配布します← Google 検索「スパイン解析」で現れ down-load 出来る \*よく使われる手動解析プログラム Neurolucida との誤差は 2%以内だし、 更に Spiso-3D は輝度に依存せず形態を正確に解析、個人の主観ではなく客観的な解析が出来る 点 で ず っ と 優 れ て い る 。 参 考 Kawato's laboratory Homepage http://kawato-glia.sakura.ne.jp 目次

Section 1, Introduction

Section 2, 2-1 Password の取得, 2-2 Spiso-3D Image analysis Section 3, Spiso handling keys とその機能 Section 4, Image and System requirements 必要な CPU の性能 Section 5, Important buttons on Main Bar and Windows for analysis Section 6. Results of analysis exported to an excel file Section 7, よくある質問とその答え

Spine + Spice = Spiso



#### Section 2. Spiso3D 操作説明

## 2-1 Spiso の起動のためには、まず Pass Word を取得する。

 まず、顧客のPCが持っている MACアドレス(Physical Address)を調べる このためには、

[スタート]→[プログラム]→[アクセサリ]から、[コマンドプロンプト]を起動して、

ipconfig -all

と入力すると、

Physical Address.....:00-24-E8-18-6C-AA(例) のように複数出てくる

(2) 得られた Physical Address....: 00-24-E8-18-6C-AA など全てを東大川戸にメイルで送る

kawato@bio.c.u-tokyo.ac.jp

(3) 東大で Pass word を作成して 顧客に送る

(4) Spiso-3D.exe を クリックすると ①認証画面が現れて Pass Word を要求してくるので、

ここに Pass word を入力する → Spiso-3D は正常に動き出す。[PC は Internet につなぐこと]



Internet の種類を切り変えると Pass word が変化するので注意

2-2 Spiso-3D による解析

## (1) Spiso-3D が起動すると、以下の Main Bar 画面が出てくる。



(2) [Open Image]で 8 bit tif file の解析画像を選び、クリックするすると、ファイルが読み込まれて、 以下のような画面が出る。

<注意> ここで 8 bit tif file を作成するまでには以下の操作が必要である:共焦点顕微鏡の画像(\*.slm 等) を→ デコンボリューションして[AutoDeblur software (MicroCybernetics, USA)] 16bit tif file を得る→ Image J を用いて画像のコントラストを調整して良い S/N画像にする→ 16 bit tif file を 8 bit tif file に変換する。

<注意> Metrics 値を入力しておく。上の例では X,Y 軸 0.043  $\mu$ m/pixel , Z 方向の 0.45  $\mu$ m optical slice distance が入っている → 5(ウ) Metrics 参照 p11



(3) [MAX-XY]をクリックして、MAX-XY 画面で樹状突起のトレースを行う。



Dendrite Detection Mode  $\ \ \check{\mathbb{C}}$ 

(4) をクリックして樹状突起のトレースを自動的に行う。



(5) 自動検出では、樹状突起画像が細すぎると途中途切れたり、大きな輝度を持つ樹状突起でない部分や別の樹状突起が検出されることがあるので、Edit, Dendrite Mode に移り修正を行うことが必要である。 →画像の拡大・移動方法は Section 3 を見る

まず、余分なノード(赤い丸)の削除の仕方、つなぎ方について説明する。

削除の仕方は、例えば正しくない赤ノードを削除するには、これらのノードの内のどれか一つを選択(マウスの左クリック)して、[Shift]キーを押しながら右クリックすると、このノード群を一気に削除できる。 もし、一つずつ削除したい場合は、ノードを選択した状態で、ポインタをノード領域内に置いたまま右クリックする。

次に、つながりのないノード群間をつなぐには、ノード群の片方の端にある水色のノードを選択して、 ノードを増やしていき、最後に別の水色のノードとつなぐ。ノードの置き方は、画像上に左クリックす るだけでよい。(操作に失敗したら Ctrl+Z で元に戻し、再操作する)

ここで気をつけなければいけないのは、このノードを樹状突起部分の存在する z 座標の断層画像 を選んで置くことである(そうしないと樹状突起が跳ぶ)。断層画像を移動するには、[Alt]キーを押 しながら、ホイールを回転させる。そして、目的とする樹状突起部分が最大輝度・最も広い領域を 持つ画像上にノードを置くようにすると、うまく接続される。

以上の操作により、以下のような3次元的に完全につながった樹状突起画像を得る。



(6) スパインの自動検出を行う。スパイン検出には「stack version」を選択しておいてから、 Detect mode で(6) をクリックする。



自動スパイン検出が行われると、元画像が悪い場合、本当のスパインでない小さなノイズがスパインとして検出されたり、スパインの直径が本当の大きさと異なる場合があるので、これを Edit, Spine Mode に移り修正を行う。



ノイズスパインの削除方法は、樹状突起ノードの場合と同じである。多数のスパインを一気に削除 するには、[Shift]キーを押しながら、マウスの右クリックしながら、削除したい領域を選択して、クリッ クを離すと一気に削除できる。検出できなかったスパインを追加するには、樹状突起ノードの追加 と同じ方法である。→画像の拡大・移動方法は Section 3 を見る。またスパイン頭部直径の修 正は、ノードの選択→マウスのホイールを使用 → スパインサイズの変更 で実行できる

スパインを追加したり直径を修正するときは、z 座標の断層画像を選んで行うことが必要。断層画像 を移動するには、[Alt]キーを押しながら、ホイールを回転させる。そして、目的とするスパイン頭部 が最も広い領域を持つ z 画像上にノードを置き、修正するようにする。

修正後は以下のようにきれいな画像が得られる。 Orange 色がスパイン



(7)[File] タブを選択し→(8)[Export] をクリックすると、解析結果を数値出力できるが→



(8) file 形式を excel に指定しないとうまく出力できないので注意。(すべてのファイル形式では 出力失敗する)。Excel ファイル中には3つのタブが存在するが、最後の[summary]タブに結果がま とまっている。

	A	B	C	) F	F G	н		K I	M N
1	Number of Spine	Dendrite Length	Density -0	.2 0.2-0.3	0.3-0.4 0.4-0.5	0.5-0.6	0.6-0.7 0.7-0.8	0.8-0.9 0.9-1.0	1.0-
2	51	48.14846276	1.059223848	0 5	21 20	) 2	2 1	0 0	0
3									
4	Scale	Sensitivity	Distance				<b>_</b>		
5	2.41	1.53	<u> </u>						
6			\						
7			\						
8									
9	neck_length	count				7 .0 /			
10	0.0-0.2	0				へへて	ン與部但住	万中の出ノ	J 結果(µm)
11	0.2-0.4	1		•					
12	0.4-0.6	1		1.0	N NRT				
13	0.6-0.8	8	1.	総スパイ	ン数				
14	0.8-1.0	12							
15	1.0-1.2	8	9	<b>枯</b> 世空主	の長さ				
10	1.2-1.4	9	<u> </u>	1到1八天龙	UVKC				
17	1.4-1.6	5			-				
18	1.0-1.8	4	3.	スバイン	′ 密度				
15	1.8-2.0	0							
20	2.0-2.2	0							
21	2.2-2.4	1							
44	2.4-2.0	2							
23	2.0-2.8	0							
24	2.8-3.0	0							
20	3.0-3.2	0							
20	2428	0		<u>_ スパ</u>	インネック	長分布の	の出力結果		
20	28.20	0				K J m			
20	2 9 4 0	0							
20	40.42	0							
21	4.2-4.4	0							
22	4.4.4.8	0							
33	4 8-4 8	0							
34	4.8-5.0	0							
35	5.0-5.2	0				+			
36	5.2-5.4	0							
37	5.4-5.6	0							
38	5.6-5.8	0					i		
39	5.8-6.0	0							
40	6.0-6.2	0							
41		-							
42									
43									
44									
45									
46									
14	4 b bl mod		mon ( 💝						
14	real real	pixersum	mary Ca						

これらの結果データを用いて、以下のパラメタが得られる。

1. 全スパイン密度 2.スパイン頭部直径分布 3.各スパイン密度 4.スパインネック長分布

ここで得られる、スパインネック長は、スパイン中心から最近接の樹状突起ノードを2つ見つ ける→この2点に対し垂線を下ろし、この線分の長さをネック長と定義。このように定義 することで、スパイン頭部直径やデンドライトの太さに依存しない算出方法を採用した。 なので、画像上の正しいネック長は、デンドライト半径を引かないといけない。 - true neck length = exccel 出力 neck length - dendrite node radius - spine radius\_

## (9)3次元 model

3D image model を表示するには File → Import excel file → Select 3D image. この 3D image model で、変なスパインや樹状突起の跳び点を見つけたら Edit で修正をする



この 3D 像を回転させて、調べることにより、スパインが正しく検出されているかを、一目で検査できる。また樹状突起がスムースに検出されているかも検査できる。異状に跳び出たスパインや、樹状 突起ノードの跳びが見つかることがあり → Edit で再修正する。

### Section 3. Spiso プログラム操作 key の一覧と、その機能

- ① 共通 kev
  - Alt+ホイール → 画像の z 方向の移動
  - Ctrl+ホイール → 画像の拡大・縮小
  - Ctrl+カーソル移動 → 画像を動かす
  - Ctrl+Z → 修正操作に失敗したときなど、直前画面に戻し再操作する

Qes スパインの手動修正を行うとき、画像を拡大すると、Spiso の動作が極端に遅くなって、作 業が進まないという問題が起きることがある。→ Ans これは外付けの graphic card のせい です。解決するには、外付けの graphic card 配線をはずし、内臓 graphic card を使用する配線に する、で早くなる。このとき画像の分解能が悪くなったら、画面の解像度を調節して解像度を上 げれば、良くなる(マウス右クリックで「画面の解像度」が出る)。 デスクトップ PC は画像 を綺麗に見せようとして、たいていは外付けの graphic card を使用するモードになっていて、こ れが動作を遅くする原因になっている。

② 樹状突起 key

ノード内でクリック → ノードの選択 選択+選択したノード外で左クリック → 選択したノードと連結したノードの追加 (追加後そのノードが選択される) 選択+選択したノード内で左クリック(押しっぱなし)+カーソル移動 → ノードの移動 選択+選択したノード以外のノード上で左クリック

→ 選択されたノードとカーソル上のノードを結合

選択+選択したノード内で右クリック → ノード削除 選択+選択したノード外のノード上で右クリック → その2つの連結を削除 選択+選択したノード外で右クリック → 選択解除 選択+ホイール → ノードサイズの変更

### ③ スパイン key

スパイン内で左クリック → スパイン選択 スパイン外で左クリック → スパイン追加(追加後そのスパインは選択状態となる) 選択したスパイン内で左クリック(押しっぱなし)+カーソル移動 → スパイン移動 選択+選択したスパイン上で右クリック → スパイン削除 選択+選択したスパイン外で右クリック → スパイン解除 右クリック(押しぱなっし) → スパイン削除(消しゴム機能) 右クリック+Shift → スパイン削除(範囲) 選択+ホイール → スパインサイズの変更 直径の修正に使用

## Section 4. Spiso に必要な PC 性能

1. パソコンの推奨環境 Windows のみ Macintosh はだめ

- (ア)CPU: Pentium 4 3GHz 以上、あるいは、それと同等の能力を有するプロセッサ
- (イ)メモリ:2GB以上
- ① 画像サイズが 1024×1024 の時は、必須条件
- ② 2GB 以下でも動作するが解析速度が大幅に低下する可能性あり

(ウ) OS: Windows XP、Vista, Win 7 での起動確認

- (エ) Java のバージョン: 6.0 以上必須。 Java は internet から自動 version-up できる
- (才)Java3D 必須

(カ) 内臓 graphic card を使用すること。 外付け graphic card は画像拡大時に動作が極端に遅 くなるので、配線を外す。 デスクトップで画像解像度を最高に上げれば image は綺麗に見える。

#### 2. 解析可能な画像

(ア)画像サイズ:XY-axis: 256×256 ~ 1024×1024 , Z-axis 16-20 stacks

- (イ)長方形状の画像も解析可能
- (ウ)扱える画像のタイプ:tiff のみ
- (エ)検出時間
  - ① 画像が小さい程検出速度は上昇、検出精度は低下する

- ② 解析時間は、2分以内である。 但し以下の条件
- 1. マシンスペック: CPU 2.53GHz、メモリ 4GB
- 2. 画像サイズ:1024×328(16枚)の画像
- 3. Stack Version を用いる

### Section 5. 解析上 ウィンドウに現れる重要なボタン・タブの説明

	Spiso	
I	File Analyze Demo Help	
	Open Image MAX-XY MAX-XZ MAX-YZ MAX-ALL 3D-Demo X: # m/pixel 0.043 Y: # m/pixel 0.043 Zdistance	0.45 Exit

#### 5-1. MAX projection buttons

MAX-XY Button  $\rightarrow$  open Max-XY Projection Window

MAX-XZ/YZ Button  $\rightarrow$  open Max-XZ, Max-XZ Projection Window

### 5-2. Metrics

Ratios of X,Y, Z images to true scale should be set in MAX-XY Projection Window.

" Click Metrics  $\rightarrow$  click Change  $\rightarrow$  Insert numbers in the Change Metrics Window  $\rightarrow$  Apply "

X, Y metrics :  $\mu$ m/pixel (1 pixel = 0.43  $\mu$ m for Zeiss confocal microscopy LSM PASCAL,

at high zoom (3.0) with a 63x water immersion lens, NA 1.2

Z metrics  $0.45 = 0.45 \mu m$  apart between z-axis stacks

These ratio values are used in display of MAX-XY/XZ/YZ Projection Windows

## 5-3. MAX-XY Projection 解析 ウインドウ

💑 G:¥spine解析¥2009年度 CORT実験¥粕谷 終¥200nM CORT 60 終¥contrast¥10_09080202.tif: XY			
	Cursor Position X: 43817 Y: 258	0 Z:0.0	
	Spine Information		
	PositionX		
	PositionY		
The second se	PositionZ		
	Diamiter		
	Detect Edit Filter	File Metrics Image	
	Dendrite Detection		
	Stack Jump 🔹		
	Scale(µm)	2.41	
	Execute Dendrite Detection		
	Spine Detection		
	Stack Version	•	
	Sensitivity	1.53	
	Distance(µm)	60	
	Parameter	1.0	
	Execute Spine Detection		

(ア)Cursor Position:キャンパス上でのカーソルの位置情報が実測値で表示される。

(イ) Spine Information:キャンパス上で選択されたスパインの位置情報・直径を表示する。





1. Dendrite Detection

ア)最上部パネル:デンドライトノードのz方向の閾値が指定できる(現在指定なし)。

- Stack Jump 
  ·Threshold
- イ) 真ん中パネル: Scale ボタンを押すとデンドライト検出のスケール変更のためのテキスト ボックスの編集可能・不可能が切り替わる。
- ウ)最下部パネル:ア)、イ)のパネルで指定されたアルゴリズム、パラメータに基づいてデ ンドライトの自動検出を実行する。

### **2.Spine Detection**

- ア)最上部ボックス:スパイン検出アルゴリズムを選択する。
  - ・Stack Version…スパインの z 軸方向の位置は、対象スタック面とする。
  - •Basic Tuning (Distance Noise)
  - Basic Tuning Plus
  - ·High Detail Stack
  - •High Detail
- イ)2番目パネル:Sensitivityボタンを押すとスパイン検出感度の変更のためのテキスト

ボックスの編集可能・不可能が切り替わる。

- ウ)3番目パネル:Distanceボタンを押すとデンドライトからのスパイン検出領域の変更の ためのテキストボックスの編集可能・不可能が切り替わる。
- エ)4番目パネル: Parameter ボタンを押すと、スパインのグループ化の条件が変更される。
- オ)最下部パネル:ア)~エ)のパネルで指定されたアルゴリズム、パラメータに基づい

てスパインの自動検出を実行する。スパインの自動検出は、デンドライトの自動検出、手動によるデンドライトの指定が行われた後でないと正しく実行されない。

#### <u>5-4 Edit タブ</u>

- 1. Mode Select: モードの選択。dendrite、spine、spine classify の3種。各モードを選択す ると、手動で操作を行うことができるようになる。
- 2. Undo ボタン: 一つ前の状態に戻る。デフォルトでは 100 回まで undo 可能。
- 3. Redo ボタン:やり直し。
- 4. Adjust ボタン: 画像サイズを現在のキャンバスサイズに合わせる。
- 5. Backgound ボタン:背景をスタック画像とMax-XY Projection 画像で切り替える。
- 6. Hide Spine ボタン: スパインの表示を隠す。
- 7. Hide dendrite ボタン: デンドライトの表示を隠す。
- 8. Classify ボタン:スパインのサイズからスパインのタイプ (Stubby、Mushroom、Thin)を自動分類する。2007年12月時点では、スパインのサイズのみでしか判定していない。現時点では不要であるように思われる。もし、残すとしたらスパインタイプを small、middle、large で自動分類するぐらいであろう。そうすることで、画像状態での解析結果を見て、スパインの大きさなどを捉えることができる程度であろうか。
- 9. Edit Scale:スパインの直径を変化させるときの変化幅を設定する。

デフォルトでは、0.5 ピクセル=0.0215 μm となっている。

#### <u>5-5 Filter タブ</u>

1. Spine Diameter Filter

(ア) Change Range ボタン: 最小値(Lower)と最大値(Upper)の値を設定する。

(イ) Filter ボタン: 直径が Lower から Upper の範囲のスパインのみ残す。
 現最新版では、機能停止状態である。

#### 2. Dendrite Width Filter

(ア) Change Range ボタン: 最小値(Lower)と最大値(Upper)の値を設定する。

(イ) Filter ボタン: デンドライトのノードの直径を Lower から Upper の範囲内に収まるように変更する。

#### 5-6 File タブ

- 1. Export タブ: キャンバス上のモデル(デンドライト、スパイン)を外部ファイルに出力する。
- 2. Import タブ:外部ファイルのモデルをキャンバス上に読み込む。
- 3. SaveImage ボタン: キャンバス上のデータ(背景画像・モデル)を画像として保存する。
- 4. 3Dimage ボタン: キャンバス上のモデルを 3D モデルで表示する。
- 5. Close ボタン: Max-XY Projection の解析画面を閉じる。
- 6. Histgram タブ: 光量のヒストグラムを表示する。この機能は、spine 検出を Basic Tuning (Light Noise)を使用して、閾値を0で行う。その後、このボタンを押すと、グラフが表示される。
- 7. Smoothing level: smoothing の level をここで変えることができる。デフォルトでは、 スムージングは2回に設定されている。
- 8. Del.LightNoise タブ: ????

### <u>5-7 Metrics タブ</u>

1. Metrics (画像と実測値の比率)を表す。Change ボタンを押すと Metrics を変更できる。

### <u>5-8 Imge タブ</u>

1. 画像のサイズ情報(縦・横のピクセル数、スタック数)を表示する。

## Section 6. 解析結果の出力

(ア)解析結果

(1) デンドライトの情報



(3) その他の情報





(注意) Excel 出力の、スパインネック長は、スパイン中心から最近接の樹状突起ノードを2つ 見つける→この 2 点に対し垂線を下ろし、この線分の長さをネック長と定義。このように 定義することで、スパイン頭部直径やデンドライトの太さに依存しない算出方法を採用した。従って、画像上の正しいネック長は、デンドライト半径を引かないといけない。 • true neck length = excel 出力 neck length - dendrite node radius - spine radius

true neck length は 精神疾患では伸びたりする可能性が報告されているので、重要なパラ メタである。

## Section 7, よくある質問と その答え

別のファイルに作成