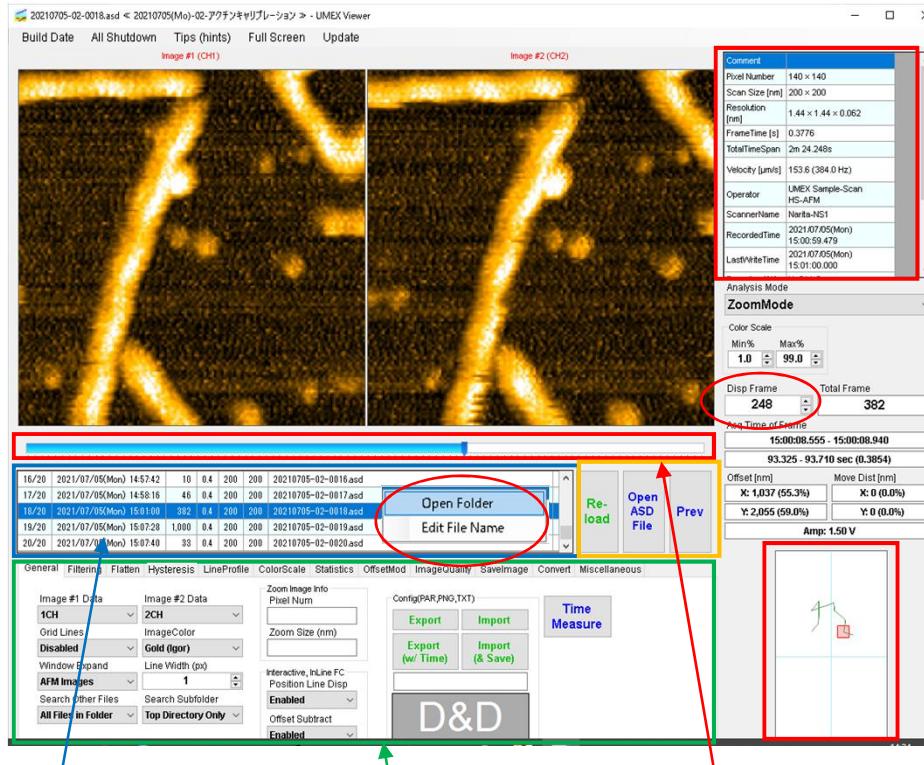


Quickstart Guide

UMEX Viewer Quick start Guide

1. ASDファイルのOpen



ファイル名表示欄

・FileをDrag & Dropし、File名を選んで左clickするとImageが表示される。

パラメーター編集タブ欄

ポジションスライダー

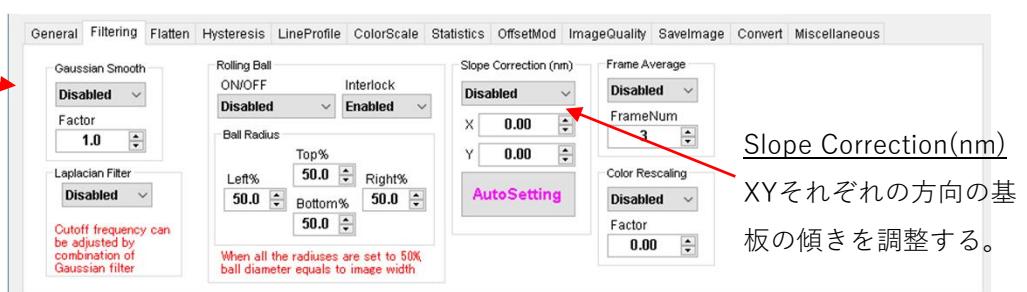
Click & Drag、Disp Frameの▲▼で移動。
※Disp Frameに入力することも可。
※キーボードの矢印キーでも移動可。
〔Shift + →〕 = 早送り
〔Shift + Ctrl + →〕 = さらに早送り

2. スムージングと傾き補正

Filtering

フィルターをかけたり、傾きを補正する機能

Gaussian Smooth →
ぼかし具合をFactor値
▲▼で調整する。



Slope Correction(nm)
XYそれぞれの方向の基板の傾きを調整する。

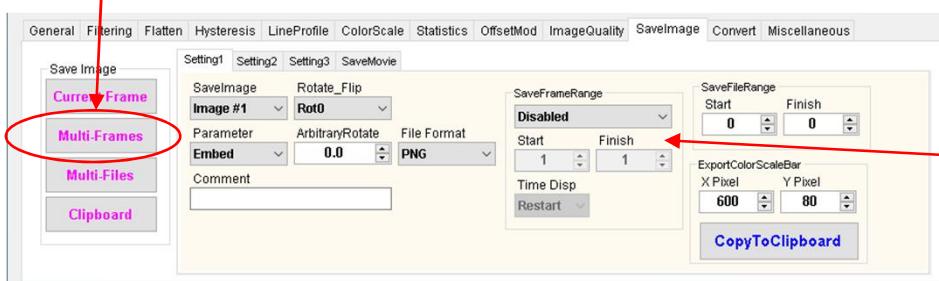
3. 画像の保存

Save Image

画像の保存設定。

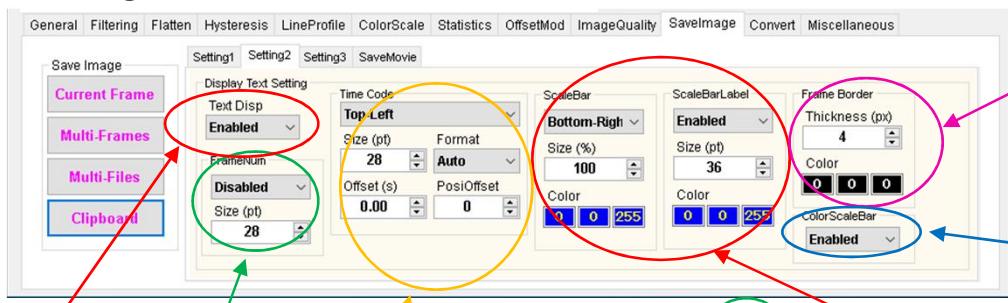
Save Image

Multi-Frames…開いているファイルのSaveFrameRangeで指定したすべてのFrameを保存。



Save Frame Range
保存するFrame範囲
を指定する。

Setting 2 表示するテキストの設定



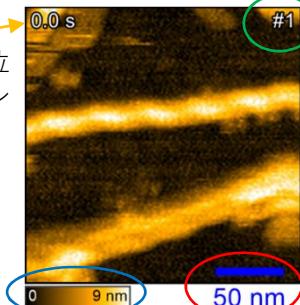
枠線の幅、色を
指定する。

カラースケールバー
の表示を指定する。

まずEnabledに
変更する。

時間表示をする位
置、表示スタイル
等を指定する。

Frameナンバーの
表示を指定する。



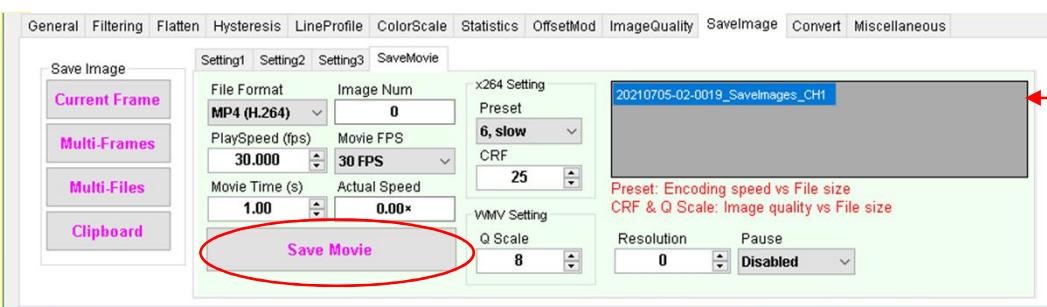
スケールバーとスケル
バーラベルを表示する位置、
サイズ、色を指定する。

4. 動画の保存

Save Image

Save Movie 動画保存の設定 (先にMulti-Frameで保存した画像をもとに動画を作る設定)

※Save Movie の機能を使用するときは、あらかじめ[UMEX Viewer Installer.exe]から configフォルダに[ffmpeg.exe]を解凍しておかなければならない。



Drag&Drop
Multi-Framesで画像
を保存すると自動で
設定される。あるいは
保存済のフォルダ
をD&Dしても良い。

File Format

MP4の方が圧縮率は高いが、PowerPointに埋め込むときはうまく再生されない場合があるので、
その場合、WMVを推奨。

PlaySpeed (fps) & Movie Time (s)

Image Numと連動。SpeedかTimeどちらかを設定する。

Full Instruction Manual

UMEX Viewer Guide

<1> メイン画面

Tips

UMEX Viewer

- LineProfileとzoomboxは、マウスホイールボタンで消去される。
- LineProfileはShiftキーを押しながら使うとまっすぐな線となる。
- LineProfileのデータは図内で右clickメニューからexportできる。
- FlattenExcludeRegionとOffsetModの描画サイズは、イメージ上でマウスホイールを操作することで調整できる。
- 数値Boxの値はマウスホイールの操作で大まかな調整ができる、右clickしながらホイールを回すことで微調整できる。

All Shutdown
全てのWindowを一度に閉じることができる。

Build Date
パス名をクリックするとプログラムのあるフォルダーを開くことができる。

Tips (hints)

Full Screen
Image部分が拡大表示される。解像度の低いノートPCやプロジェクターでの表示に便利。

Update
最新Ver.をダウンロードできる。

ファイル名表示欄

- FileをDrag & Dropすると、File名、撮影日時、frame数、Frame Time、Scan Sizeが表示される。
- Folder毎D&Dすると、Folder内の全ASDファイルが読み込まれる。
- File名を選んで左clickするとImageが表示される。右clickすると右クリックメニューが表示され、そのFileが入っているフォルダを開くことや、File名やFolder名の変更ができる。

Reload…同じフォルダー内に新しく生成されたFileを再読み込む。

Open ASD File…指定したFileを開く。

Prev…前回起動時に読み込んだFileを呼び出す。

パラメーター編集タブ欄

ポジションスライダー
Click & Drag、Disp Frameの▲▼で移動。
※Disp Frameに入力することも可。
※キーボードの矢印キーでも移動可。
〔Shift + →〕 = 早送り
〔Shift + Ctrl + →〕 = さらに早送り

<2> パラメーター編集タブ詳細

General

File表示に関する全般的な設定

Grid Lines

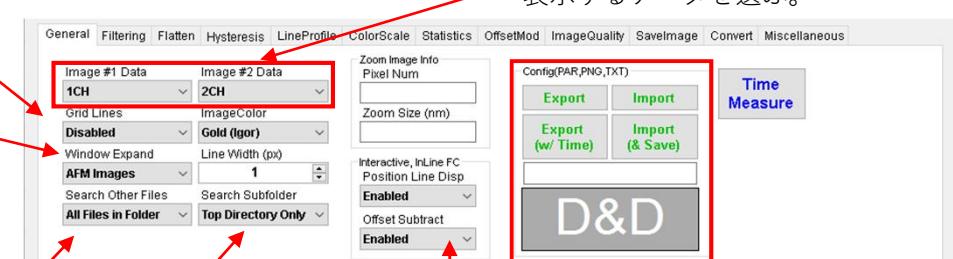
グリッドラインの種類を選ぶ。

Window Expand

マウスドラッグでウィンドウサイズを変更した際の拡大したい表示枠を選ぶ。

Search Other Files

FileをDrag & Dropするときに、
folder内のすべて
を選ぶか、選択したFileのみにする
かを選ぶ。



Search Subfolder

FileをDrag & Dropするときに選択したFolderのみにするか、他のFolderも対象にするか。

Interactive, InLine FC

Interactiveモードで測定した場合に使用する機能。
サンプルを叩く強さを変える。
抑え込んだときの場所を確認できる。

Image #1 Data Image #2 Data
表示するデータを選ぶ。



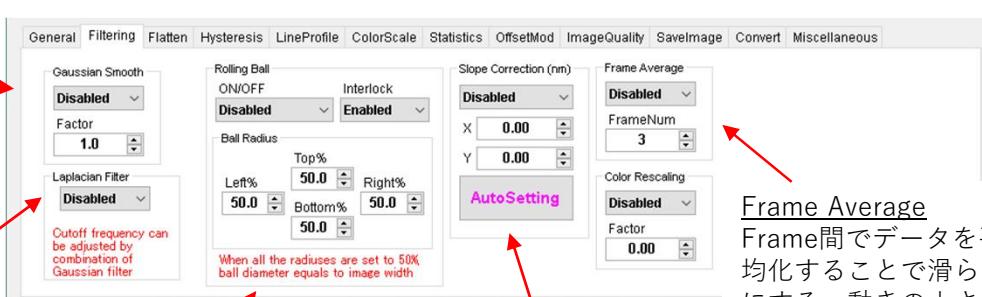
Config(PAR,PNG,TXT)

パラメーターなどの設定をexport,importする。
Export…上書き保存する
Export (w/Time) …時間入りの別名で保存する。
Import…D&Dしたパラメータファイルを読み込む。
Import (& Save) …設定を読み込み、Imageを保存。
(複数のファイルをまとめて画像保存したい場合)
…ExportするときFile名にTextを追加できる。
D & D…importしたいFileをDrag & Dropする。

Filtering

フィルターをかけたり、傾きを補正する機能

Gaussian Smooth
ぼかし具合をFactor値
▲▼で調整する。



Laplacian Filter
異なる高さの表面上にある分子のコントラストを揃えるために使用。
あるいは輪郭を強調するためにも使用。
Gaussian Smoothと組み合わせて使用する。

Rolling Ball

表面形状像の下からボールを接触させながら転がせた後で、その軌跡を元データから差し引くことでバックグラウンドの起伏を抑えるフィルター。

脂質膜の上など大きく起伏のある表面を平坦に見せるために使用。

Frame Average

Frame間でデータを平均化することで滑らかにする。動きの小さなデータに効果的。

(rectangularよりも triangularの方が残像を抑えられる)

Slope Correction(nm)
XYそれぞれの方向の基板の傾きを調整する。

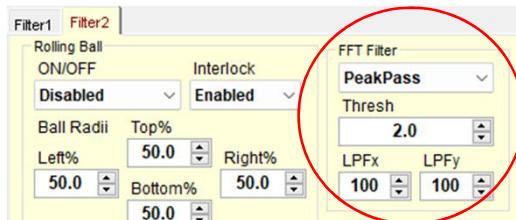
FFT Filter

使用方法

FFTにより周波数ドメインに変換した後に、Threshで設定した閾値以上のあるいは以下のデータをゼロデータで置換する。その後、逆FFTにより実空間像に戻す。

PeakPassあるいはPeakStopに設定した後に、イメージが所望の状態になるように、Threshの値をマニュアルで調節して使用する。LPFを使って、イメージにローパスフィルターを併用してかけることもできる。

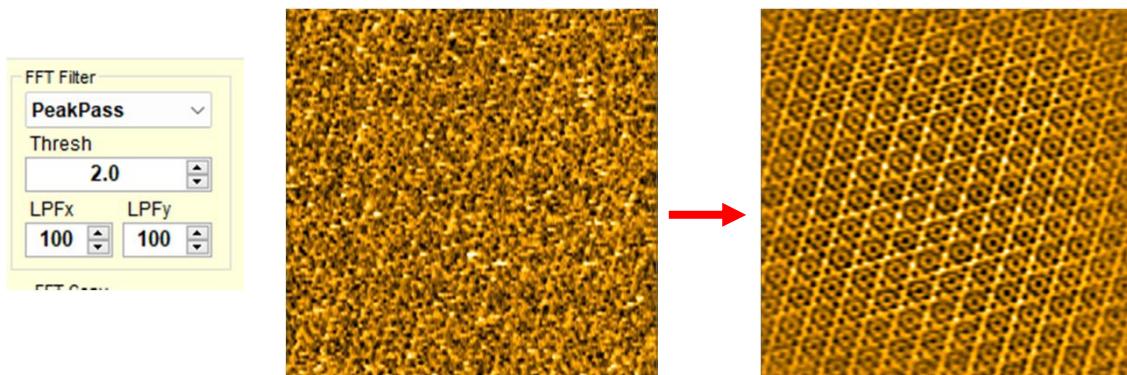
重要：予め、Flattenをかけた状態で使用しないとうまく動作しないので注意する。



PeakPass

周波数ドメインにおいて、設定した閾値以上の大きさのピーク以外のデータをゼロにする。

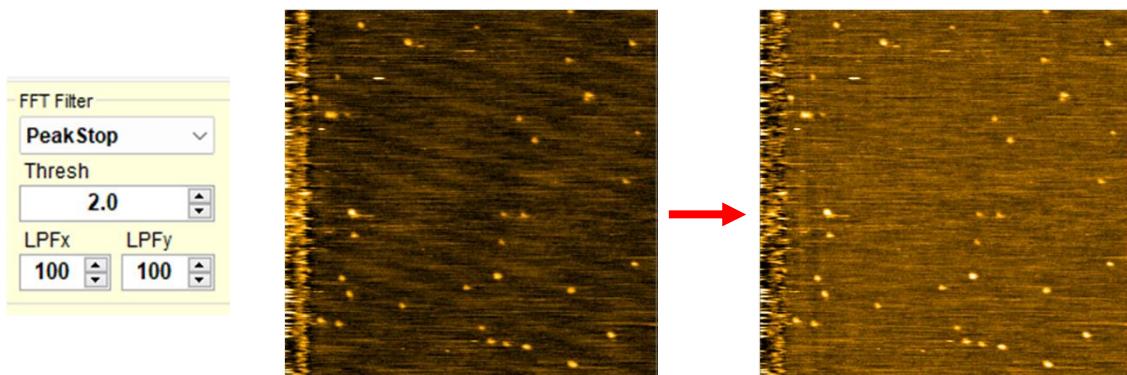
二次元結晶格子などの周期的構造を観察する際に、探針の条件が悪く、格子が明瞭に見えない場合に、格子をクリアに可視化するために使用する。アネキシン-V試料を使った、スキャナーのキャリブレーションにおいて重宝する。



PeakStop

周波数ドメインにおいて、設定した閾値以上の大きさのピークをゼロにする。

装置の故障や機械的振動などにより、イメージに周期的なノイズが乗ってしまう場合に、ノイズを除去するために使用する。可能であれば、ノイズの原因を突き止めて、解決する方が良い。



Flatten

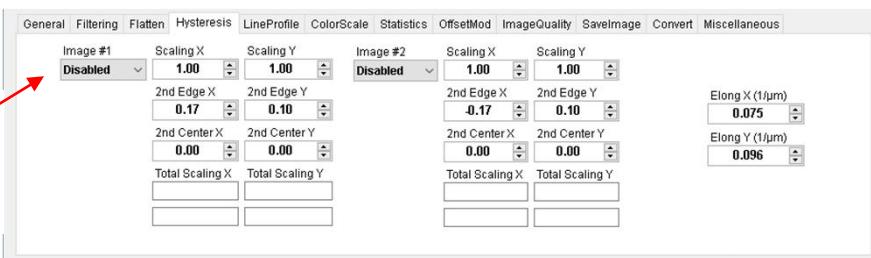
高速スキャンした際にリンギングがひどい時や、Tip-Scan AFMの場合に使用する機能。
→説明は今後作成する予定。



Hysteresis

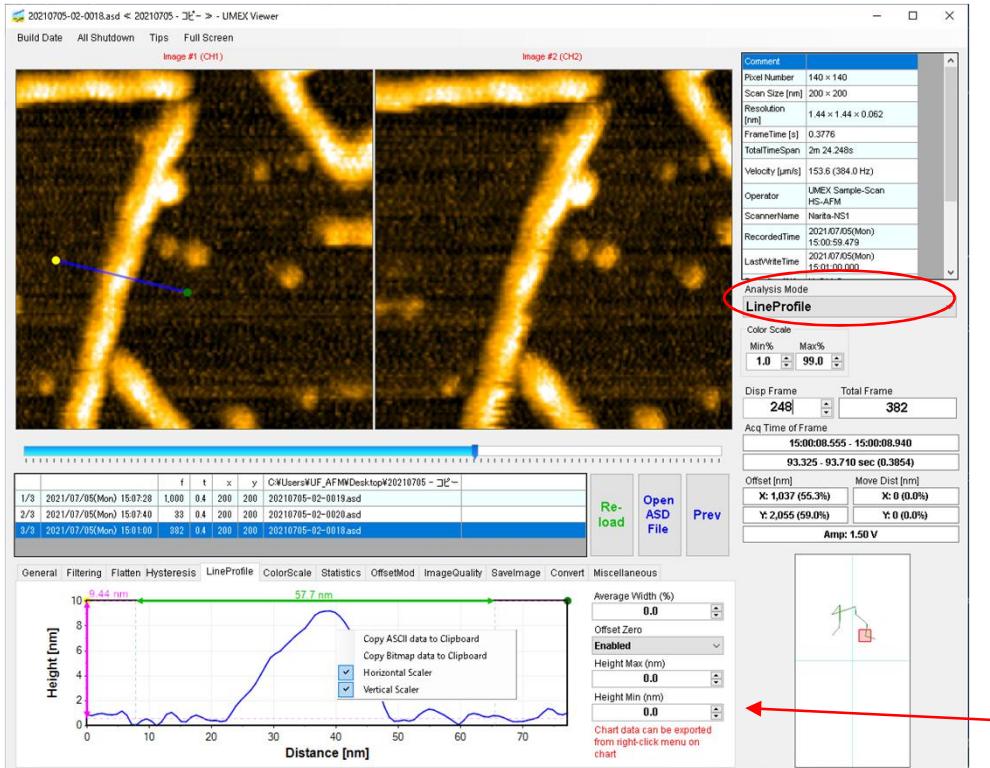
ピエゾのヒステリシスによる画像のゆがみやスケーリングを補正する。

大きなスキャン範囲のときに
顕著に現れるピエゾの非線形性
を補償するために用いる。
Enabledにすると補正される。



LineProfile

指定したライン上のデータを得る。



→Analysis ModeをLineProfileにする。

→測定したいところを指定する。

起点…左click

中点…左click

終点…右click

指定解除…ホイールclick

ポイント挿入…ポイントをマウスで選択しながらEnterキー

ポイント削除…ポイントをマウスで選択しながらDeleteキー

- ・グラフ内で右clickするとコンテキストメニューが表示される。

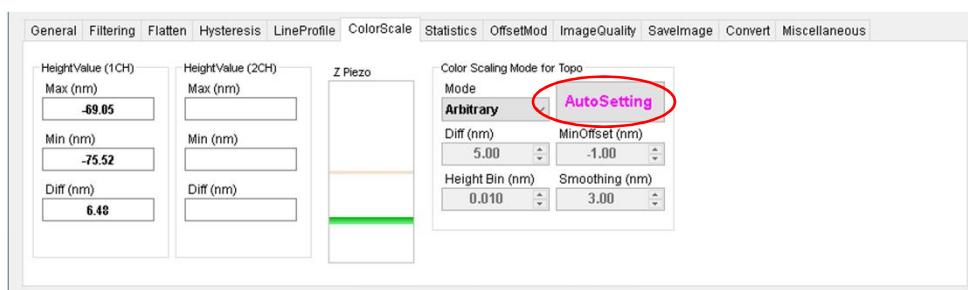
Copy ASCII data to Clipboard…起点からの距離と高さのデータをクリップボードにコピーする。
(Excelに貼り付けて使用する)。

Copy Bitmap data to Clipboard…Bitmap データをクリップボードにコピーする。

Horizontal Scalar…距離の計測バー表示 (⇨の長さをドラッグ移動することで距離を計測できる。)
Vertical Scalar…高さの計測バー表示 (⇨の長さをドラッグ移動することで高さを計測できる。)

ColorScale

色調を調整する。

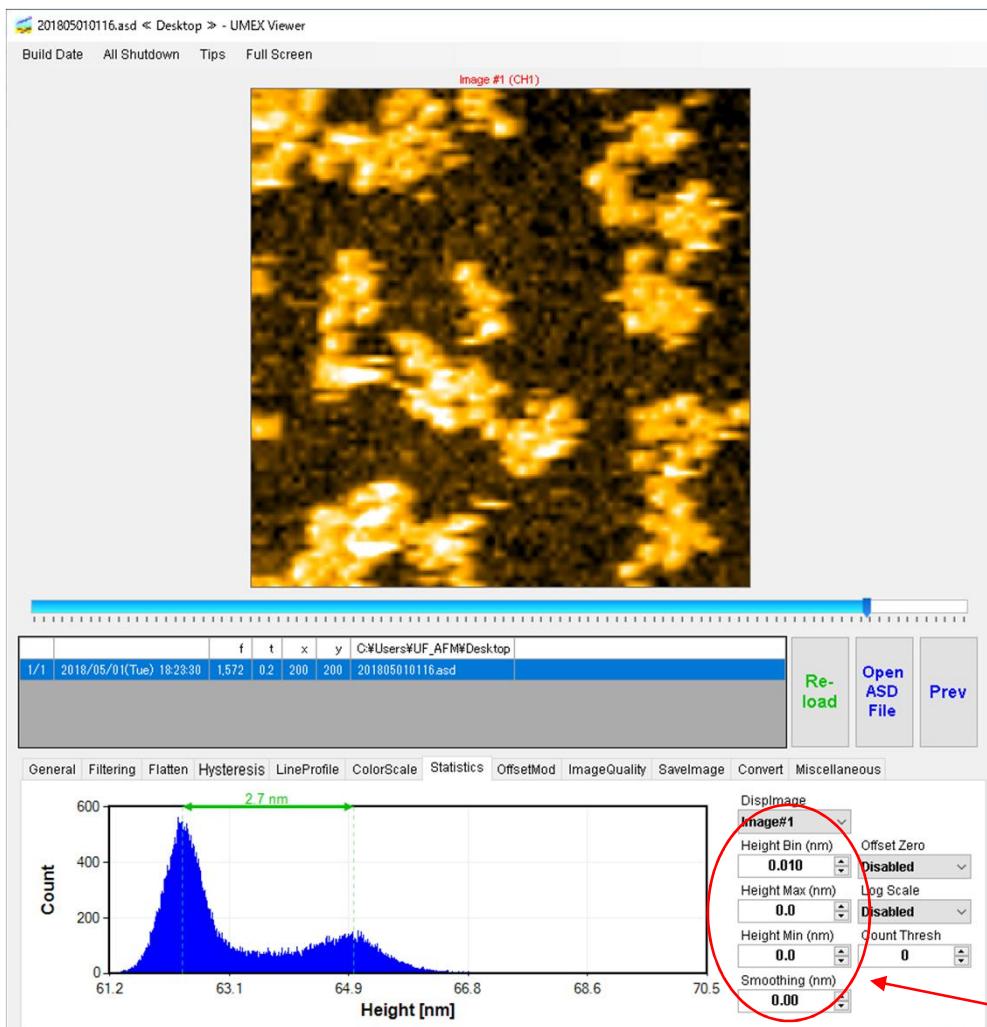


Color Scaling Mode for Topo

Auto Setting…Peak Ref Modeで自動的に明るさを調整する。(平坦な基板があるときに有効)
Autoでうまく調整できないときは、Modeを変えてみるとよい。

Statistics

画像を構成するピクセルの高さの分布を得る。

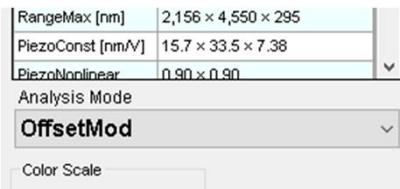


上のグラフで左のピークが基板高さ、右のピークは分子の高さを反映している。そのため、分布の2つのピークの距離から、指定したframe内の基板とサンプルの高さの差分を見積もることができる。(基板が水平であることが大前提)

※脂質膜などの二つ以上の平坦な表面が同時に出ていているケースに使用する。また、表面ラフネスを見積もるためにも使用する。

OffsetMod

画像の高さ修正機能。ラインノイズを消したい時や、リングングが激しくFlattenがうまく動作しない場合に使用する



Analysis ModeをOffsetModに変更すると、イメージ上でカーソルが青い四角に変更される。

- 左クリック…高さを手動で修正することができる。
- 右クリック…修正した領域を解除することができる
- ミドルクリック…現在フレームの設定を全削除する
- ホイール…青い四角のサイズを変更することができる。



All Reset

全フレームのOffsetModの設定を削除する場合に使用する。

OffsetMod ON

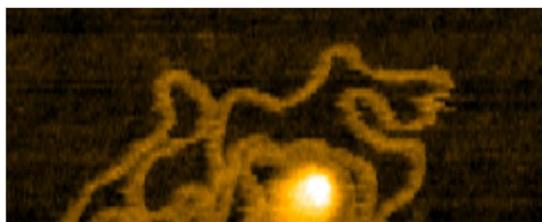
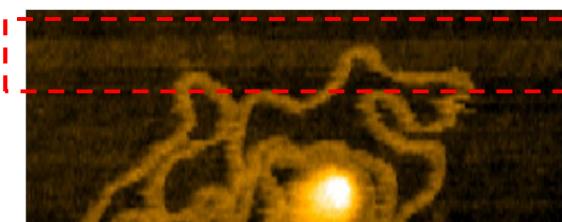
一時的にOffsetModの変更を非表示にしたい場合にOFFにする。

Mode

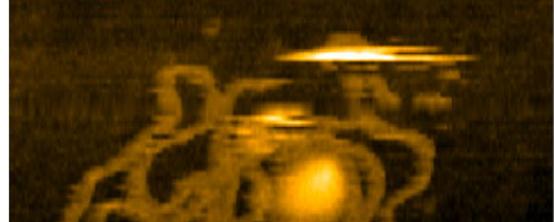
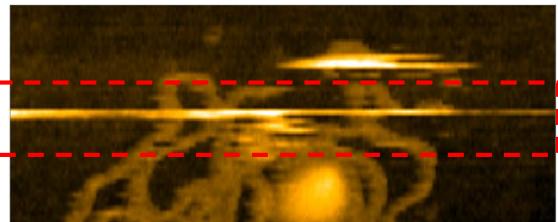
以下の3つの中からモードを選択する。

- IncreDecre…クリックしたライン全体の高さを増大or減少させる。Amountで増減の量を設定する。
- Flatten …クリックしたラインのみに対して、局所的なFlattenをかける。Degreeで次数を設定する。HeightThreshは、設定した閾値よりも高い領域からFlattenを除外するための設定。
- Interpolate …クリックしたラインに対して、上下のピクセルデータから線形補間したデータを代入する。WSxMの「Remove Lines」に相当する。

IncreDecre or Flattenが最適なケース
(ラインノイズ上に表面形状が見られる)

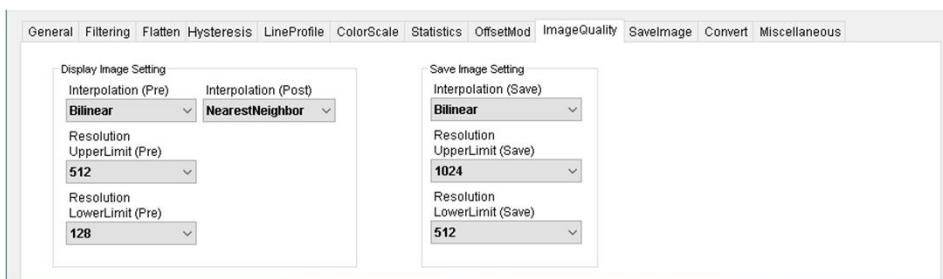


Interpolateが最適なケース
(ラインノイズ上に表面形状が見られない)



設定した情報は、ConfigのExportボタンで保存し、Importボタンで復元することができる。

ImageQuality 画像の品質を設定する。



Display Image Setting

Interpolation▼▲で補間方法を選ぶ。
(下に行くほど滑らかになる。)
ノイズが多いデータの場合、不自然な画になるのでBilinearの方が良い。

Interpolation ▼▲

Auto…自動調整
NearestNeighbor…最寄りの点
Bilinear…縦横それぞれ2点
Lanczos2…4点
Lanczos3…6点

Pixel数が小さすぎる時に補間して大きくする。

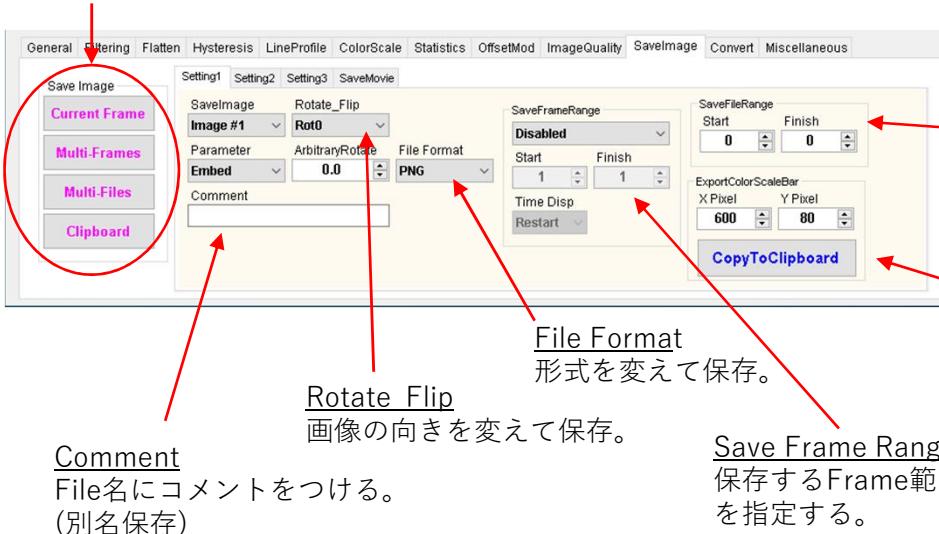
LowerLimitでPixel数がいくつ以下になると、補間するかを設定する。
UpperLimitで、最大で何Pixelまで補間するかを設定する。

Save Image 画像の保存設定。

Setting1 保存スタイルの設定

Save Image

Current Frame…現在表示されているFrameを保存。
Multi-Frames…開いているファイルのSaveFrameRangeで指定したすべてのFrameを保存。
Multi-Files…SaveFileRangeで指定したすべてのFileを保存。
Clipboard……現在のFrameをクリップボードにコピー。

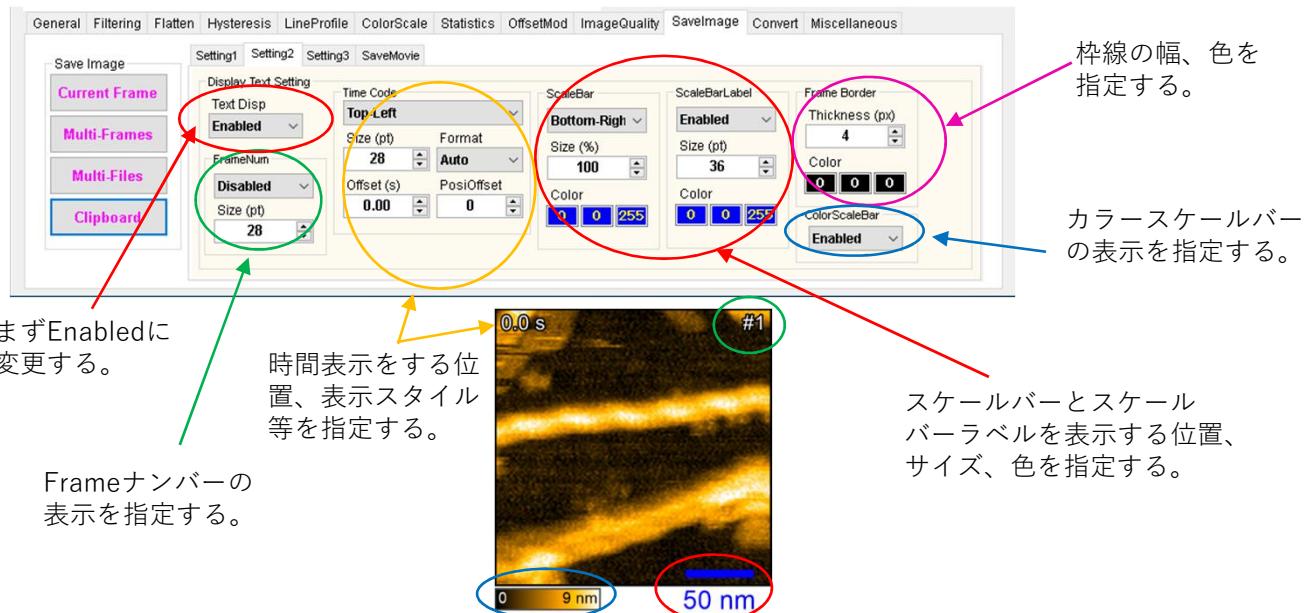


Save File Range
保存するFileを指定する

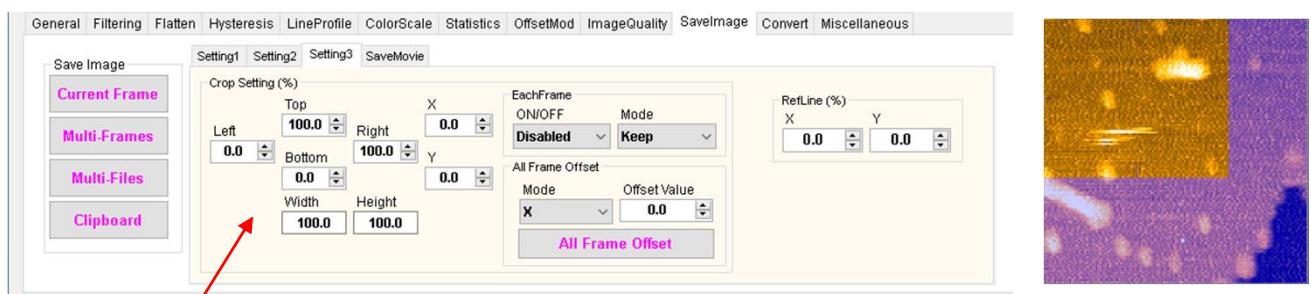
Export Color Scale Bar
カラースケールバーの大きさを指定し、クリップボードにコピーする。
Illustratorに貼り付けて使用する。



Setting 2 表示するテキストの設定

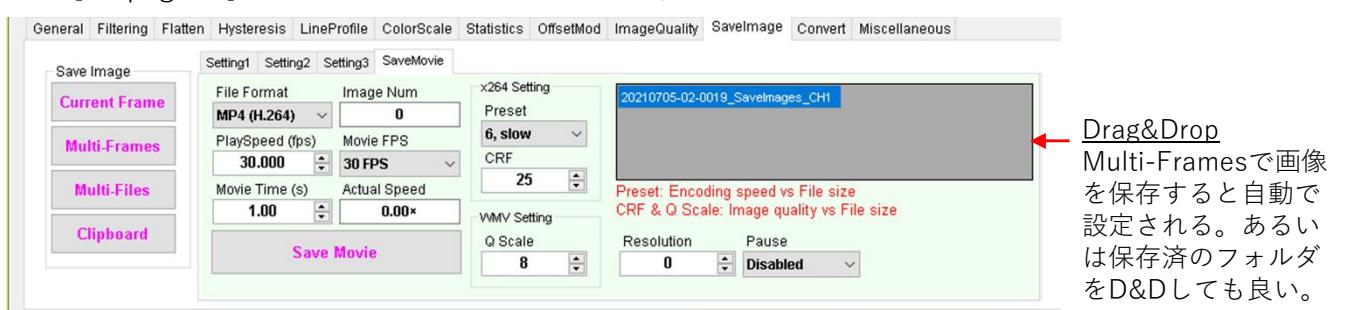


Setting 3 トリミングの設定



Save Movie 動画保存の設定 （先にMulti-Frameで保存した画像をもとに動画を作る設定）

※Save Movie の機能を使用するときは、あらかじめ[UMEX Viewer Installer .exe]からconfigフォルダに[ffmpeg.exe]を解凍しておかなければならない。



File Format
MP4の方が圧縮率は高いが、PowerPointに埋め込むときはうまく再生されない場合があるので、その場合、WMVを推奨。

PlaySpeed (fps) & Movie Time (s)
Image Numと連動。SpeedかTimeどちらかを設定する。

Image Num
画像の枚数を表示。

Movie FPS
一般的に30~60。

Save Movie
指定した条件でMovieを作り保存する。

x264Setting Preset
Slowにするほど時間がかかりFile サイズが小さくなる。

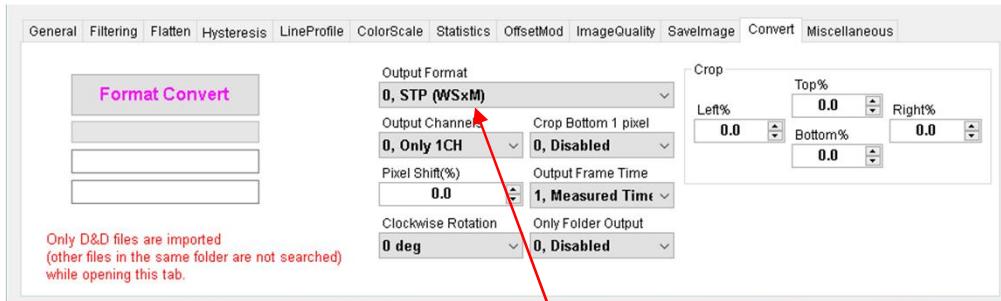
CRF
低いほど画質がきれい。高いほど画質が汚い。25前後を推奨。

WMV Setting
Q-Scale
数値が大きいほど画質が落ちる。Fileサイズに関わる。

Resolution
File サイズを小さくしたいときに使用。解像度を下げる。

Convert

asd.Fileを別のファイル形式に変更する。



Output Format

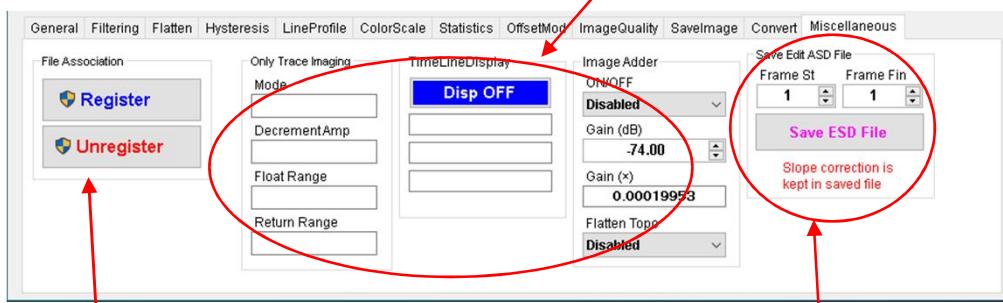
1. STP (WSxM)
2. ASC (SPIP, Gwyddion)
3. GSF (Gwyddion)
4. CSV (Mathematica)
5. XLSX (Time Line)

形式を指定した後、Format Convertを押す。

Miscellaneous

その他の設定。

通常使用しない設定



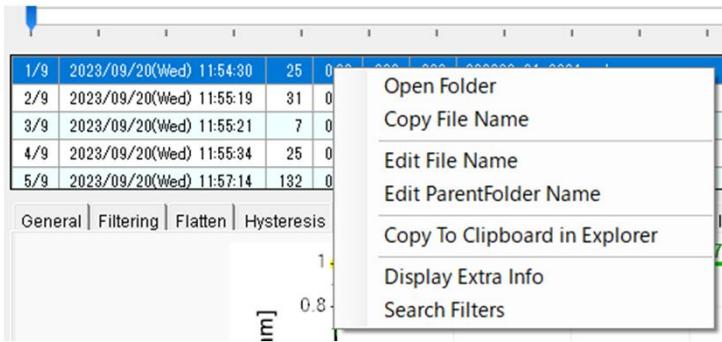
File Association

エクスプローラー上で
Asd.Fileをダブルクリック
した時に開くソフトとして
UMEX Viewerを登録する。

Save Edit ASD (ESD) File

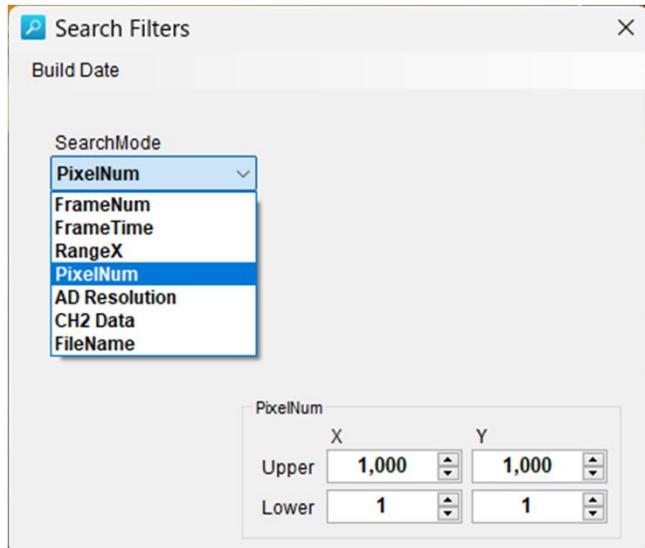
Asd.Fileから必要なフレーム
だけを取り出して保存する。
Slope Correctionで傾きを調
整した状態で保存可能。

File List Context Menu



ファイルリストの上で右クリックするとコンテキストメニューが表れる。

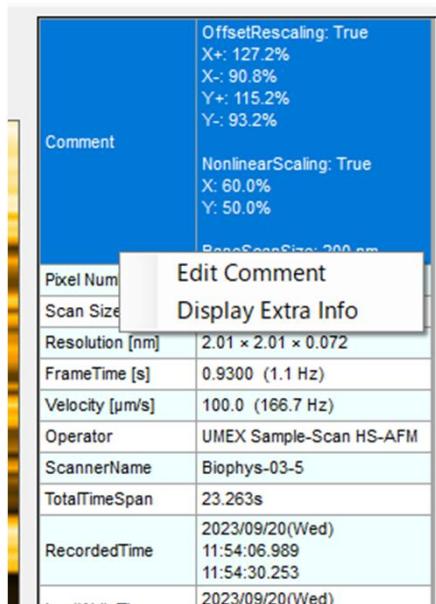
- Open Folder…選択したASDファイルのあるフォルダーをExplorerで開く。
- Copy File Name…選択したASDファイルのファイル名をクリップボードにコピーする。複数ファイルを選択した場合には、選択した全ファイルのファイル名をコピーする。
- Edit File Name……ファイル名を編集するためのダイアログを表示する（データ解析しながら、データのメモ書きを記入するために使用）。
- Edit ParentFolder Name……ASDファイルのあるフォルダーの名前を編集するためのダイアログを表示する。
- Copy To Clipboard in Explorer ………選択したASDファイルをコピーする。Explorerの右クリックメニューで「貼り付け」すると、選択したファイルを別のフォルダーにコピーすることが可能。（解析しながら、ファイルをピックアップして別のフォルダーに集めたい場合に使用）
- Display Extra Info ………ファイルリストに、スキャナー名やスキャン速度など、普段、表示されない情報を表示する。
- Search Filters ………D&Dでフォルダーを読み込ませた際に、設定したパラメータに該当するファイルのみをファイルリストに表示する。



Search Filtersダイアログ

- FrameNum
 - FrameTime
 - RangeX
 - PixelNum
 - AD Resolution
 - CH2 Data
 - FileName
- などのオプションを選択して、上限や下限を設定する。

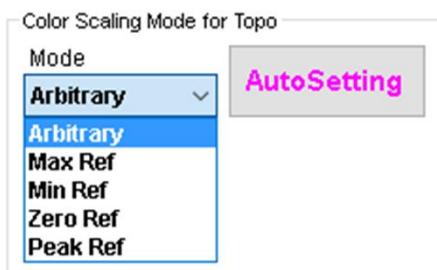
File Property Context Menu



ファイルプロパティーにおいて、右クリックするとコンテキストメニューが表れる。

- Edit Commentコメントを編集して、元のASDファイルを書き換える
- Display Extra Info通常、表示されないAD RangeやAD Resolutionなどに関する情報を表示する。

イメージカラーの調節方法1

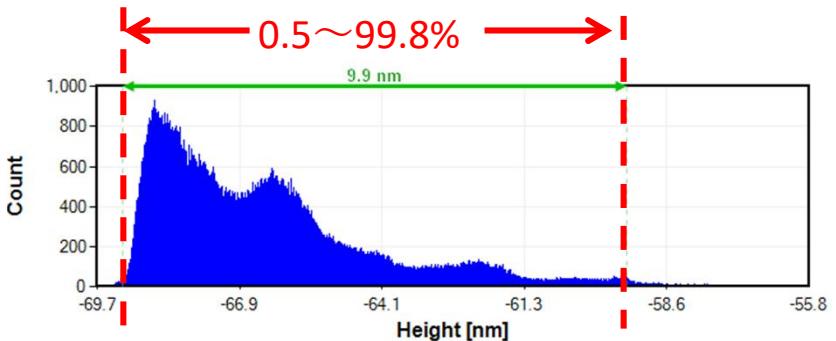
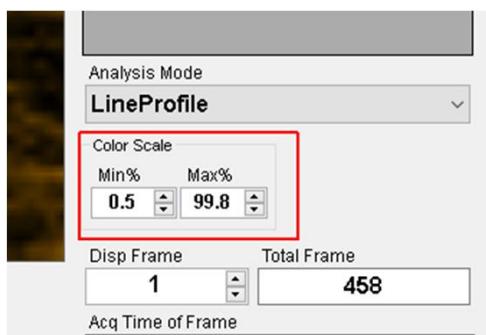


- Arbitrary
- Max Ref
- Min Ref
- Zero Ref
- Peak Ref

左の5つのモードから選択する。通常は、**Arbitrary**を選択しておき、全ての画像の高さスケールを揃えたい場合のみ、それ以外のモードを選択する。

全ての画像のカラースケールを揃えたい場合、まず**Peak Ref**を試してみて、うまくいかない場合のみ、他のモードを試してみると良い。

• Arbitrary



左図にあるように、ウインドウ右端の「Color Scale」でカラーコントラストを設定する。ここで設定するMin%とMax%とは、右図にあるように輝度値のヒストグラムをとり、全ピクセル数を100%とした時、輝度の低いピクセルから数えて0.5%のピクセルを輝度値最小 (=0)、高い方から数えて99.8%のピクセルを輝度値最大 (=255) にするという意味を表す。そのため、Min%とMax%にそれぞれ0%と100%を設定すると、画像中の最小輝度を0、最大輝度を255に設定するという意味である。

「Arbitrary」モードを設定した状態で、PNGやBMP画像として出力すると、画像毎に高さスケールが異なってしまう。後から、それぞれの画像ファイルの高さスケールを調べたい場合、画像ファイルをテキストエディタにD&Dで読み込ませる。Diff Zがカラーのフルスケールを表している。

PNGファイルの場合、ファイルのヘッダーに情報が書き込まれている。

```

ファイル(E) 編集(E) 表示(V) 検索(S) ウィンドウ(W) マクロ(M) その他(O)
PNG↓
2↓
3↓
4 IHDR B B HC テクニク WtExtDescription UTF8↓
5↓
6 PNG_Version: 1.01↓
7 Output Program: UMEX Viewer↓
8 Program Build Date: 2022/05/04 8:55:01↓
9 File Output Date: 2022/05/12 11:19:11↓
10↓
11 Original File Name: 20220302-07-0004_OTI.asd↓
12 Frame Num: 1 / 19↓
13↓
14 X Pixel: 100↓
15 Y Pixel: 100↓
16 X Amplitude: 300 nm↓
17 Y Amplitude: 300 nm↓
18 Max Z: -44.97633 nm↓
19 Min Z: -56.97611 nm↓
20 Diff Z: 11.99978 nm↓
21 Frame acquisition time_(HS-AFM): 0.3071565 sec↓
22 Each_DateTime_(HS-AFM): 2022/03/02 15:06:50.931↓
23↓
24 # FormControlParameters↓
25 Form1.NumericUpDownUp4: 10↓
26 Form1.NumericUpDownUp5: 98↓

```

BMPファイルの場合、ファイルのフッターに情報が書き込まれている。

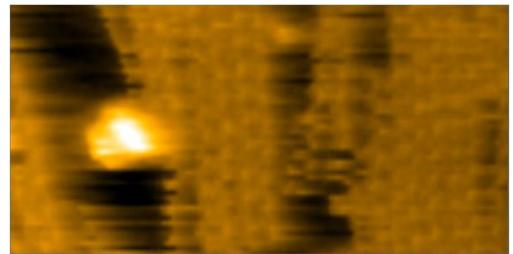
```

ファイル(E) 編集(E) 表示(V) 検索(S) ウィンドウ(W) マクロ(M) その他(O)
2855 17:2AAA@BDGGGB?<:9:<?BDGGGB?:51,+-04:@TLLJFA:2
2856 @?=<;;<=?@?-951,-158<@?>;9630-+++/26;AGMRWZ:2
2857 G↓
2858 PTWEJ%"((&#_ZVRQQSVXYXUONC↓
2859 OSVYFJ!!#?!#+17:HOT ekqw]・痘侯所・ユ煙試
2860 Puz $(+,+)%!WSPNQQTNXWURONNORVY% "#%%%"!!"§-
2861 NRWY$("./-*&!*ISPOPRTWYYXVTITVY%"$&()**+,+,+-1↓
2862 ↓
2863 PNG_Version: 1.01↓
2864 Output Program: UMEX Viewer↓
2865 Program Build Date: 2022/05/04 8:55:01↓
2866 File Output Date: 2022/05/12 11:20:14↓
2867 ↓
2868 Original File Name: 20220302-07-0004_OTI.asd↓
2869 Frame Num: 1 / 19↓
2870 ↓
2871 X Pixel: 100↓
2872 Y Pixel: 100↓
2873 X Amplitude: 300 nm↓
2874 Y Amplitude: 300 nm↓
2875 Max Z: -44.97633 nm↓
2876 Min Z: -56.97611 nm↓
2877 Diff Z: 11.99978 nm↓
2878 Frame acquisition time_(HS-AFM): 0.3071565 sec↓
2879 Each_DateTime_(HS-AFM): 2022/03/02 15:06:50.931↓
2880 ↓
2881 # FormControlParameters↓
2882 Form1.NumericUpDownUp4: 10↓

```

• ColorScaleRegion

右図のように、イメージ中に大きな構造物があつたり、表面クラック（周りよりも低い領域）があると、カラースケーリングがそこで引っ張られてしまうことがある。ColorScale Regionを設定すると、カラースケーリングのための輝度値の取得する場所を制限できるために、こういうケースでも所望のコントラストが得ることができる。

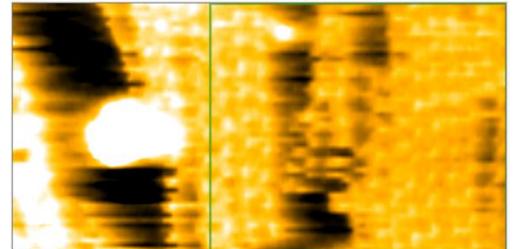


カラースケーリングの右側の領域設定を調節する。SaveモードのCrop Settingと同じで、イメージのBottomとTopがそれぞれ0～100%、LeftとRightがそれぞれ0～100%を表す。

Color Scale Region (%)

Top	100.0
Left	40.0
Bottom	0.0
Right	100.0

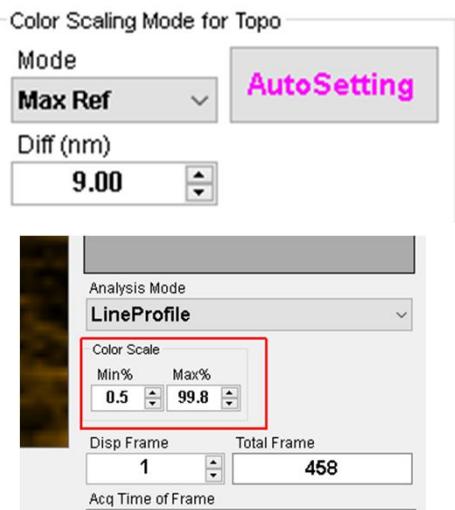
RegionDisp ON



右図のように設定した状態で、Region DispをON状態にすると、イメージ上で除外領域を確認することができる。これにより、大きな構造物を除外したカラースケーリングが得られた。

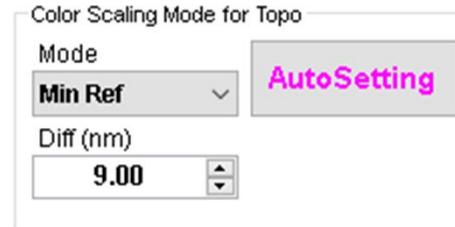
イメージカラーの調節方法2

• Max Ref



「Color Scale」のMax%で設定した輝度値を最大輝度値 (=255) として、高さスケールが「Diff(nm)」で設定した値になるように最低輝度値 (=0) を設定する。Offset(nm)で輝度値全体にオフセットをかけることができる。

• Min Ref



「Color Scale」のMin%で設定した最小輝度値 (=0) として、高さスケールが「Diff(nm)」で設定した値になるように最大輝度値 (=255) を設定する。Offset(nm)で輝度値全体にオフセットをかけることができる。

• Zero Ref



Flattenにより設定された高さゼロの点から、「MinOffset(nm)」差し引いた高さを最小輝度値 (=0) として、高さスケールが「Diff(nm)」で設定した値になるように最大輝度値 (=255) を設定する。このモードでは必ず、Flattenを有効にする必要がある。

イメージカラーの調節方法3

• Peak Ref

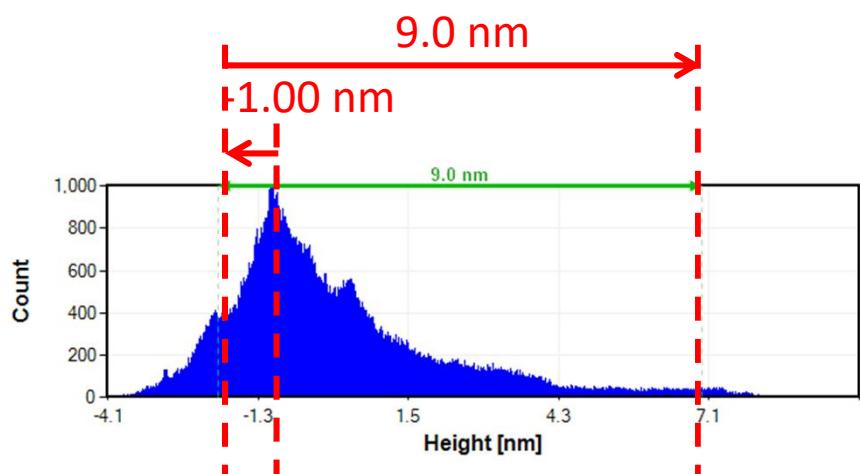
Color Scaling Mode for Topo

Mode
Peak Ref

Diff (nm) MinOffset (nm)
9.00 **-1.00**

Height Bin (nm) Smoothing (nm)
0.010 **3.00**

Select Peak
Disabled

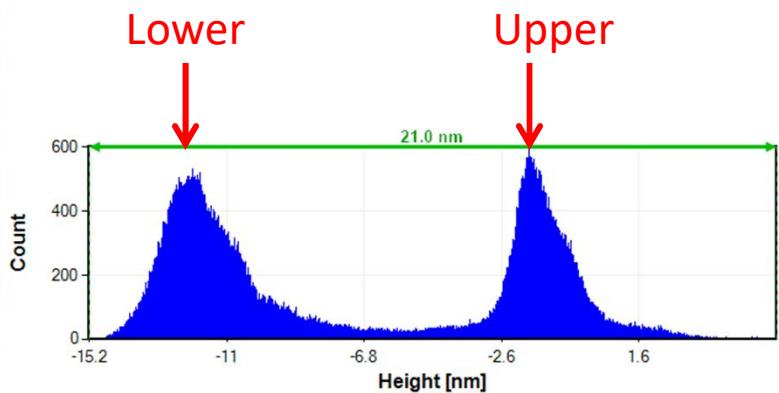
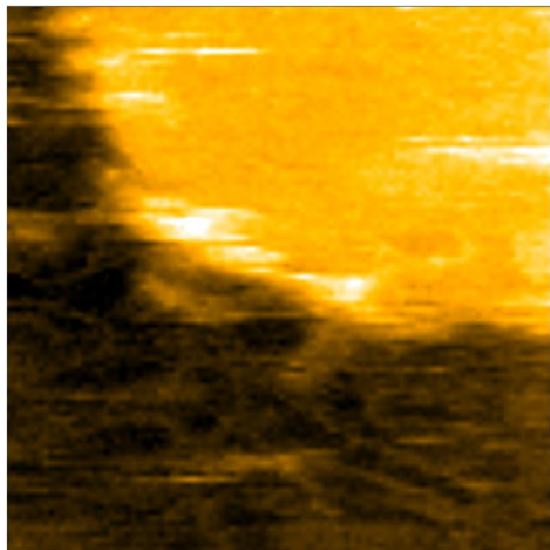


ヒストグラム上での最大ピーク位置から、「MinOffset(nm)」差し引いた高さを最小輝度値 (=0) として、高さスケールが「Diff(nm)」で設定した値になるように最大輝度値 (=255) を設定する。

「Height Bin (nm)」や「Smoothing (nm)」は基本的にはデフォルト値で良いが、カラースケーリングがうまくいかない場合、値を適当に変化してみると良い。

「Select Peak」はピークが一つしかない場合（つまり基板表面が一つしか見えていない場合）には、Disabledのままで良い。

以下のデータのように、二つの表面が同時に表れる場合、ピークが二つ表れ、画像毎に最大ピークが遷移する場合がある。こういったケースのみ、「Select Peak」で、輝度値の高い方のピーク（Upper）か、低い方のピーク（Lower）のどちらを基準にするかという設定を行う。

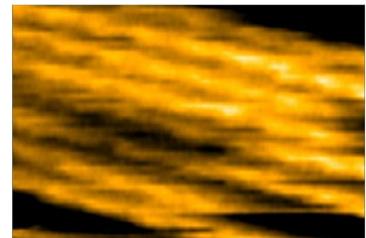


イメージカラーの調節方法4

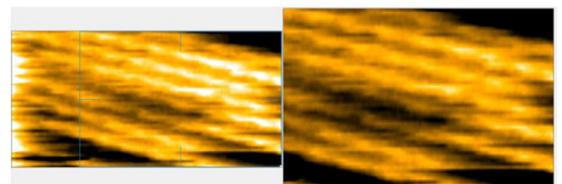
・分子が表面を覆ったケースの設定

基板が露出している場合には、PeakRefが有効だが、右図のように表面全体をアクチンフィラメントが覆っている場合などに、ヒストグラムのピークがブロードになってしまう。そのため、ピークがうまく検出できず、フレーム毎にコントラストが変化してしまうケースがある。

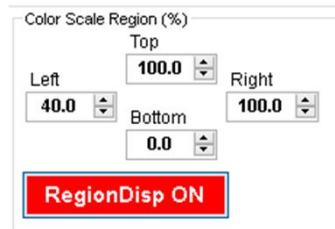
このような場合には、Max/MinRefを用いる。以下ではMaxRefを例にして説明を行う。



1. OTIモードを用いている場合、イメージの左端に明るい領域が現れてしまうため、Zoomモードを用いて、左側をクロップしたイメージを生成する。



2. 一部フレームにのみ、OTIモードやリンクングのために、イメージの左端や右端に明るい領域が現れる場合、Zoomモードを使ってクロップすると正常なフレームまで画角が小さくなってしまう。その場合、Crop Scale Regionで除外領域を設定すれば良い。通常は、Leftに10%、Rightに90%を設定するとうまくいくことが多い。



3. 最適化したいフレームを表示し、Arbitraryモードの状態で、Color ScaleのMin%とMax%を調節して、ちょうどイメージコントラストを最適化する。



4. ColorScaleモードをMaxRefに変更し、AutoSettingボタンを押す。すると、最適化された状態で最大高さと最小高さの差分値がDiffに自動で入力される。

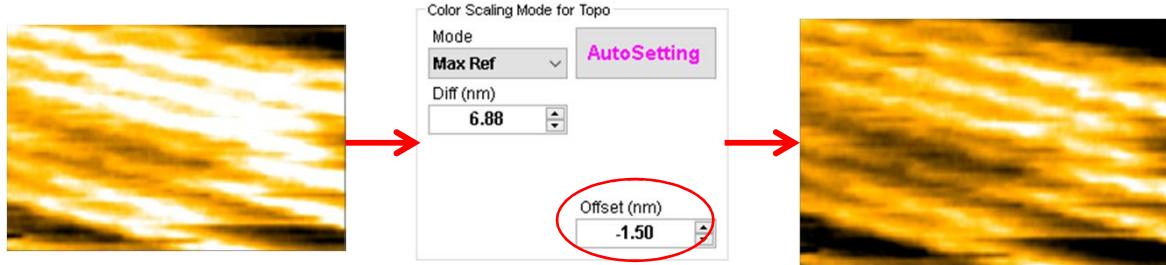


5. この状態で、フレームを動かしてコントラストが変化しないかチェックを行う。アクチン上に吸着物が出たり消えたりする場合には、吸着物の輝度値を除去する必要がある。そのため、ColorScaleのMax%を80～90%くらいまで小さくする。この値は吸着物が表面を覆う範囲によって最適値が異なるため、後で調節する必要がある。



•分子が表面を覆ったケース(続き)

6. Max%を小さくすると、イメージが明るくなり、白飛びする。そのため、Offset(nm)を減らし、画像を輝度が最適になるように調節する。最後にフレームを動かして、コントラストがフレーム毎に変化しないか確認を行う。

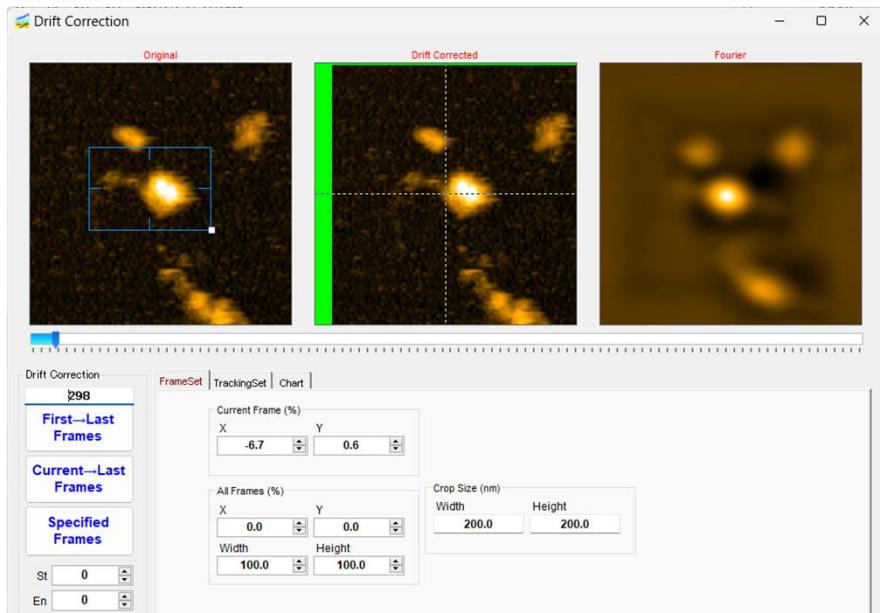


7. もし、それでもコントラストが変化するようなら、Max%を調節する。コントラストが変化してしまうフレームを確認し、吸着物が消えるイメージの場合にはMax%が小さく過ぎるので85～95%に上げてみる。逆に吸着物が表れるイメージの場合には、Max%が大きすぎるので、60～70%に下げてみる。その後、フレームを動かして、コントラストが変化しないことを確認しながら、Max%を調節する。変化しないことを確認できたら、Offsetの再度調節する。それでも駄目な場合には、MinRefを試してみる。

ドリフト補正

動画ファイルを作成する際に、分子の位置がフレームおきに変化すると、見栄えが悪いため、常にイメージの中心に位置するようにドリフト補正するのが好ましい。実験中にできる限り、手動でドリフト補償した上で、ソフトウェア上でドリフト補正を行うのが望ましい。

1. SaveImageタブのSetting3タブを開く。
2. CropSettingでイメージのクロップエリアを設定することができる。
3. デフォルトでは、EachFrameがDisabledになっているので、全フレームを一括してクロップ設定が反映される。これをEnabledにすることで、フレーム毎にクロップ設定を保存できるようになる。
4. 手動で調節するのが難しい場合には、テンプレートマッチングを用いた自動トラッキングを行う。先に、FlattenやSmoothingなどの設定を行っておく。その後に、Drift Correctionボタンを押す。

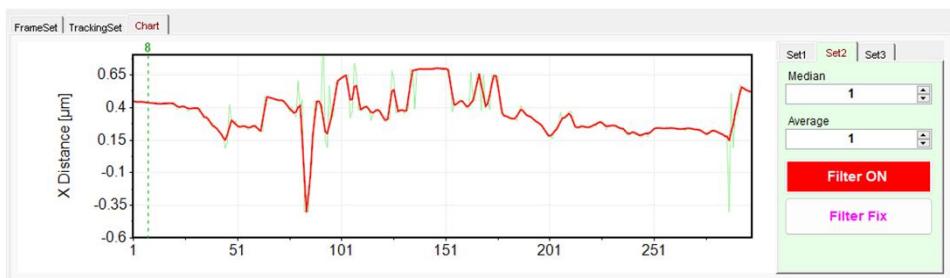


1. ウィンドウの上半分にイメージが表示される。左から順に、オリジナルのAFMイメージ、ドリフト補正後のAFMイメージ、2Dフーリエ像、となる。
2. FrameSetタブのAll FramesのWidthとHeightを出力したい画像サイズに設定する（トラッキング後に変更することもできる）。
3. まず、左端のウィンドウで、バウンディングボックスを操作し、トラックしたい分子を覆うようにサイズと位置を調節する。
4. ウィンドウ左下にある三つのいずれかのボタンを押すことでトラッキングが開始される。
 1. First→Last Framesボタン：開始フレームから最終フレームまでトラッキング
 2. Current→Last Framesボタン：現在開いているフレームから最終フレームまでトラッキング
 3. Specified Framesボタン：ボタンの下のStやEnで設定したレンジのフレームのみトラッキング
5. ドリフト補正されたイメージが中央のイメージに表示されるので、カーソルキーを使って、うまく補正されているか確認を行う。

• ドリフト補正がうまくいかない場合

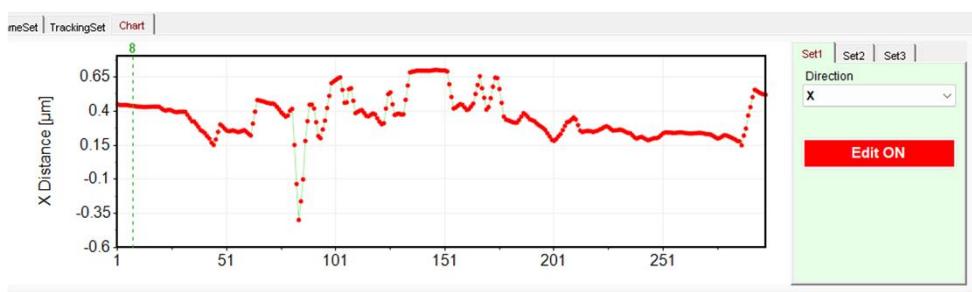
- 途中のフレームまではうまくトラッキングできるが、それ以降のフレームはトラッキングが外れてしまう場合→トラッキングの外れてしまったフレームから、Current→Last Framesボタンを押すことで再度トラッキングを行う。
- ドリフト量がバウンディングボックスよりも大きい、あるいは極端にドリフト量が小さい場合→TrackingSetタブを開き、Search Regionを調節し、トラッキングを再度行う。
- パルス的に一部のフレームが動いてしまう場合→ChartタブのSet2タブを開き、MedianやAverageなどのパラメータを調節する。
- フィルターを調節しても、一部のフレームがトラッキングから外れてしまう場合→ChartタブのSet1タブを開き、EditボタンをONに切り替え、チャート上でずれたフレームの調節を行う。
- 目的分子でうまくいかない場合には、ゴミなどでトラッキングした後に、FrameSetタブのAll Framesで目的分子がイメージ中央になるように位置を調節する。

• Chart Filter



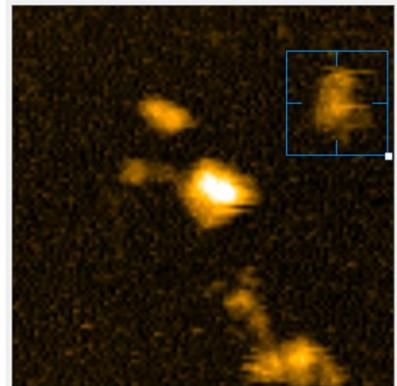
- フィルター前と後の軌跡がそれぞれ緑と赤ラインで表示される。チャート上で破線をドラッグすることで目的のフレームに移動することができる。
- ラインが滑らかになるようにMedianとAverageフィルターの数値を調節する。
- パルス的なノイズが大きい場合にはMedianを大きくする。ランダムな変動が大きい場合にはAverageを大きくする。あまり数値を大きくし過ぎると、大きくドリフトした場合に追隨しなくなるため、大きくならないように気をつける。

• Chart Edit



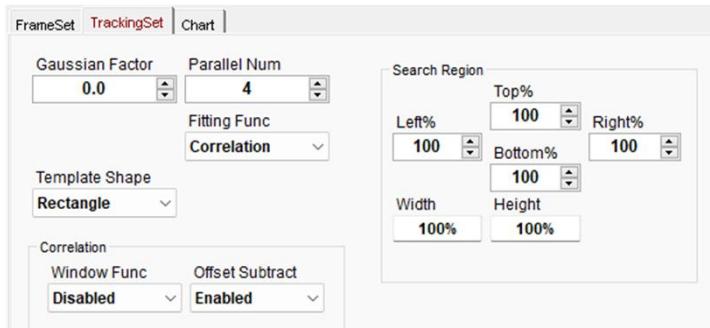
- チャートをマウス操作で直接編集することができる。
- EditボタンをONにすることで、編集可能な状態となる。フィルターを有効にしていた場合は、ダイアログが表示される。OKボタンを押すと、フィルター設定が元データに反映され、元データが書き換わってしまうため、フィルターの調節が完了してからチャート編集を行う。
- チャートが赤丸と緑ラインに切り替わる。赤丸をドラッグすることで、それぞれのフレームの位置を調節することができる。シフトキーを押しながら、マウスドラッグすることで、複数のポイントを同時選択でき、操作することもできる。

• Frame Set



1. Current Frameで現在開いているフレーム位置を調節することができる。チャートEditでも編集できるが、ここでは数値的に編集することができる。
2. All Framesで全フレームの位置やサイズを調節することができる。
3. 目的分子がうまくトラッキングできない場合には、右図のようにゴミなどをトラッキングしておいて、All Framesで目的分子が中央になるように調節すると良い。

• Tracking Set



1. 左半分の設定は開発用なので、基本的には使用しない。
2. 右のSearch Regionにおいて、分子のサーチ範囲を設定することができる。デフォルトの100%の状態だと、あるフレームの分子をサーチするために、前フレームにおける分子位置を中心として、バウンディングボックスと同じサイズの領域に絞って分子のサーチが行われる。この値を100%以外の値にすることでサーチ範囲を変更することができる。
3. 分子のサイズと比べて、ドリフトが大きい場合には、100%よりも大きな値を設定する。
4. 目的分子の近くに分子があり、そちらにトラッキングが移ってしまう場合には、100%よりも小さな値を設定する。

フレームフッターを削除する方法

ASDファイルのフォーマットでフレームヘッダーにはデフォルトで32byteが割り当てられている。インタラクティブモードやOTIモードのフレーム毎の情報を保存するには、32byteでは足りないため、フレームヘッダーサイズを拡張する必要があった。ASDファイルヘッダーには、フレームヘッダーサイズを指定する箇所が存在するため、拡張可能な仕様になっている。しかし、Kodecでは、このフレームヘッダーサイズをうまく読み込める仕様にはなっていなかった。そのため、Kodecとの互換性を保つため、フレームヘッダーサイズを32byteに固定したままで、フレームフッターを導入することにした。

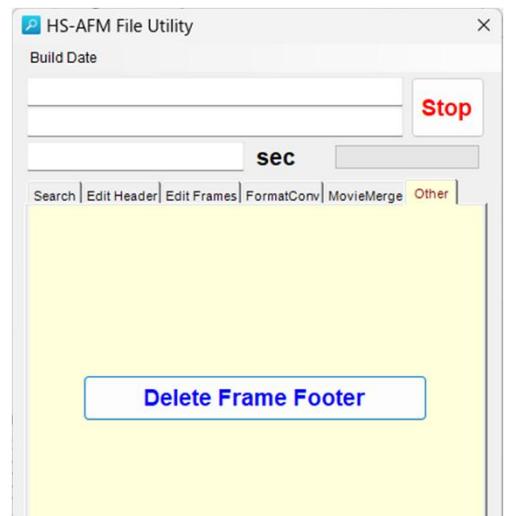
ヘッダーにあるフレームヘッダーサイズには、フレームヘッダー (=32byte) + フレームフッターサイズが格納されている。

ImageJのプラグインなどでは対応している一方で、NanoLoczなど対応していないソフトも存在する。

そのため、フレームフッターを削除することで、非対応のソフトへの対応が可能となる。

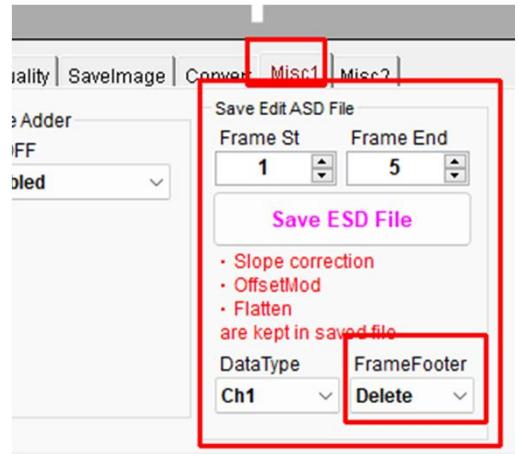
• 複数ファイルを変換する場合

「HS-AFM File Utility」を使って、Delete Frame Footerボタンを押すことで、複数ファイルor複数フォルダーを一括で変換することができる。



• 単一ファイルを変換する場合

「UMEX Viewer」を使って、「Save Edit ASD File」でESDファイルを保存する時に、FrameFooterのオプションをDeleteに設定すると、フレームフッターを削除した状態で保存できる。



ImageJでデータを開く方法

ImageJでは、様々な解析機能が揃っており、便利である。

ImageJはデフォルトでは、ASDファイルを直接開くことができないが、以下の方法で開くことができる。

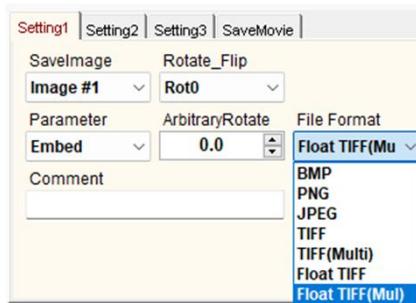
いずれの場合も、各種フィルタリングやドリフト補正などが反映された状態で保存できる。

Float TIFFで保存する方法

SaveImageで画像を保存する際に、BMPやPNGフォーマットで保存すると、直接開くことができる。しかし、これらの形式は、汎用的な画像ビューアと互換性があるメリットがあるものの、データの輝度値の階調が255であるため、Z方向の分解能が低下してしまう上に、明るい箇所や暗い箇所のデータが飛んでしまうので、ImageJの定量的な解析には向かない。

そのため、Float TIFFあるいはFloat TIFF (Mul)フォーマットを選択して保存すると、浮動小数点形式でデータの分解能を落とさずに保存できるため、ImageJの解析に向いている。

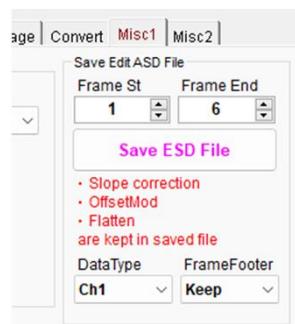
ただし、無圧縮で保存されるため、高解像度で保存すると、非常にファイルサイズが大きくなるので、PCのメモリー容量が十分でないと保存できない場合がある。その場合、保存時に表示されるメッセージボックスに従って、元の解像度で保存した方が良い。



ASDを直接開く方法

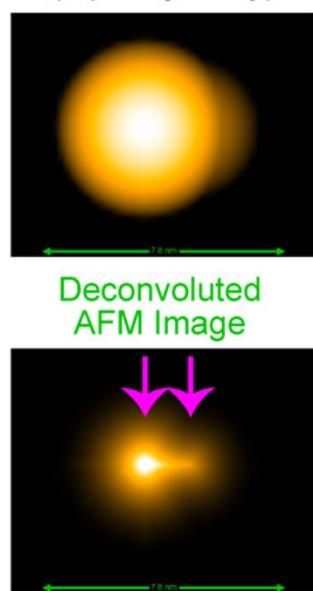
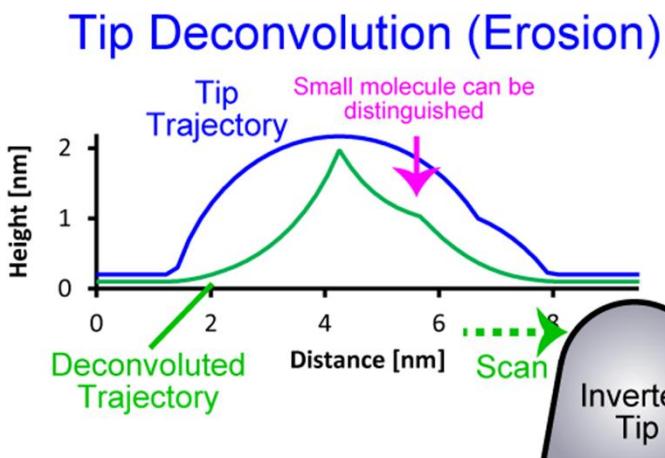
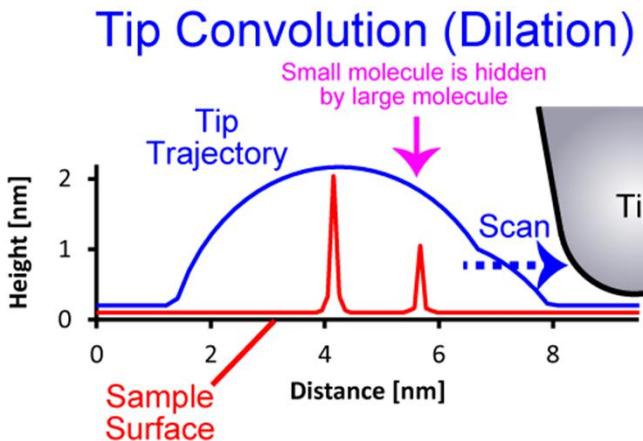
ImageJ PluginsのLoad_ASD_32bit_FooterEnabled_RtraceEnabled.javaをImageJにインストールすると、ASDファイルをImageJで直接開けるようになる。

また、ESD形式で保存すると、設定したフレームのみ保存できるため、解析に便利である。



Tip Deconvolution1

Case for Small biosample



AFMでは数ナノメートルの曲率半径をもった探針を使って試料表面をなぞりながら計測するため、数ナノメートルのサイズの分子が近接して存在する場合、大きい方の分子の影響により小さい方の分子が隠れてしまい、小さい分子の位置がイメージから目視できなくなる。このように、探針効果により見かけ上の試料表面形状が異なって見えるプロセスのことを「Tip Convolution (Dilation)」と呼ぶ。

逆に、この探針効果を除去するプロセスのことを「Tip Deconvolution (Erosion)」と呼ぶ。Tip Deconvolution フィルターでは、得られた表面形状像を逆さにした探針を使って、下からなぞるようにして走査する。これにより得られる探針軌跡は、探針効果を除去したイメージを得ることができる。分子の真横の隙間には探針が入り込むことができないため、完全に元の分子形状を復元することはできないが、隠れて見えなかつた小さな分子の位置を確認できるまでは復元することができる。

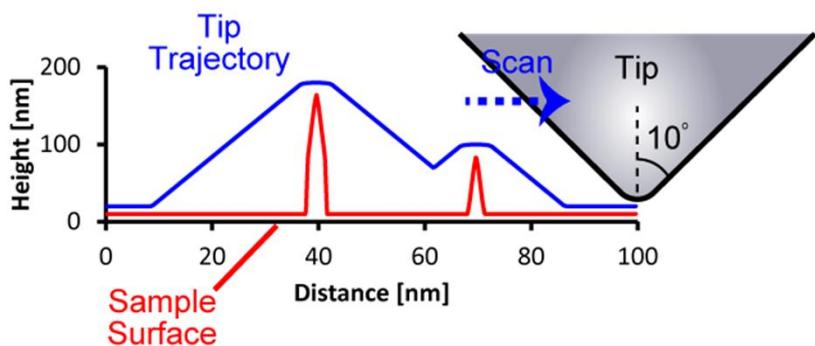
UMEX Softwareでは、円錐形状の針の先端に半球形状の探針が付いた構造を仮定しているが、実際の測定では、探針異方性があったり、ダブルチップがあつたりなど、単純な形状ではないケースも多い。そのため、AFMイメージから探針形状を推定する「Blind Tip Reconstruction」と呼ばれるアルゴリズムも開発されている。ただし、シミュレーションイメージとは異なり、実際のAFMイメージには、ノイズであつたり、フィードバックエラーなど非理想的な効果があるため、探針形状が不安定になってしまうことが多い。また、もし完全に探針形状を推定できたとしても、上記で述べたように、完全に元の試料表面を復元できるわけではないため、単純な探針形状を仮定したフィルターで当面は十分だと考えている。

応用例：分子複合体に結合したコイルドコイル長の測定や、分子複合体の体積の時間変化の解析など。

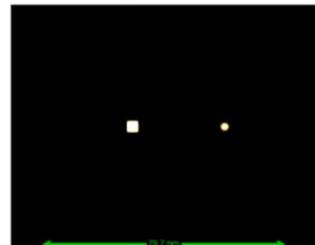
Tip Deconvolution2

Case for large biosample

Tip Convolution (Dilation)

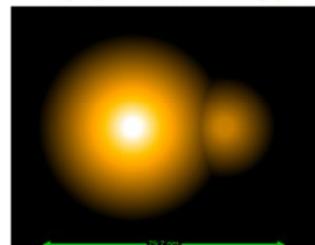
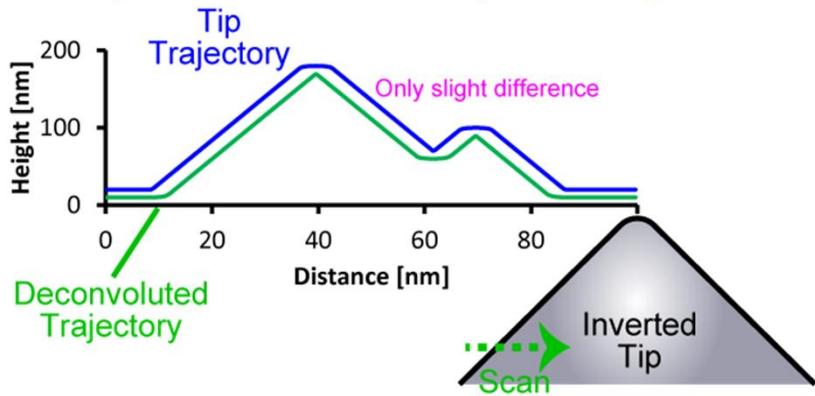


Sample Surface

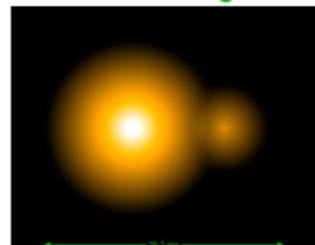


AFM Image
(Tip Trajectory)

Tip Deconvolution (Erosion)



Deconvoluted
AFM Image



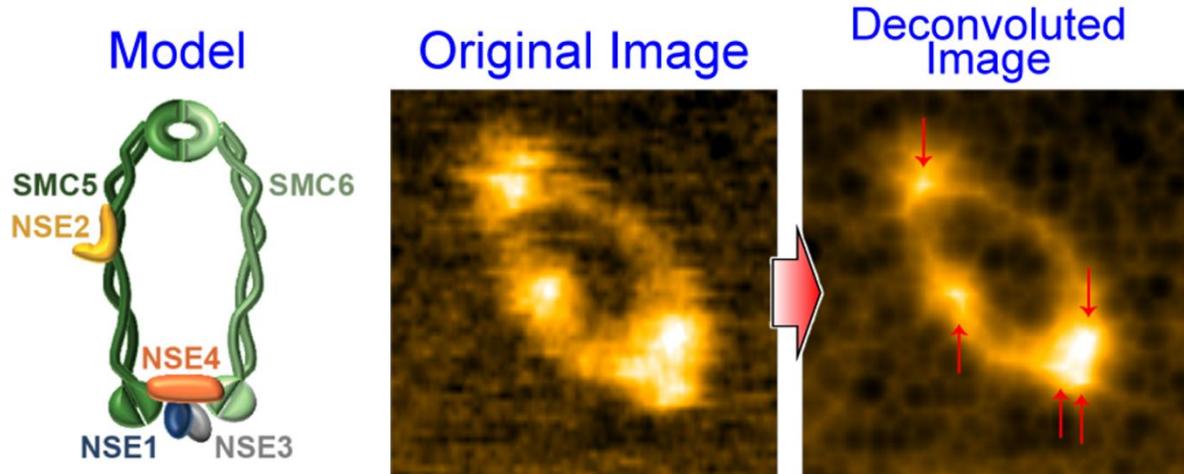
一方で、観察する分子が100 nm以上となり、探針曲率半径よりも十分に大きい場合には、得られるイメージは探針先端ではなく、探針側面の円錐部分の形状を反映したものとなる。探針が球形の場合には、tip deconvolutionは効果的に働くが、円錐形状になると、tip deconvolution前と後の形状像に差異が小さくなり、あまり大きな効果が得られなくなる。そのため、小さな分子系においてのみ有効なフィルターであると言える。高速AFMの場合、EBD探針を使っており、Cone Half-Angleは10°程度であるため、tip deconvolutionを使わずとも、元の試料表面から大きくは違わないとも言える。

Reference

- J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol. 102 (1997) 425.
- Ultramicroscopy 94 (2003) 19–29.

Tip Deconvolution3

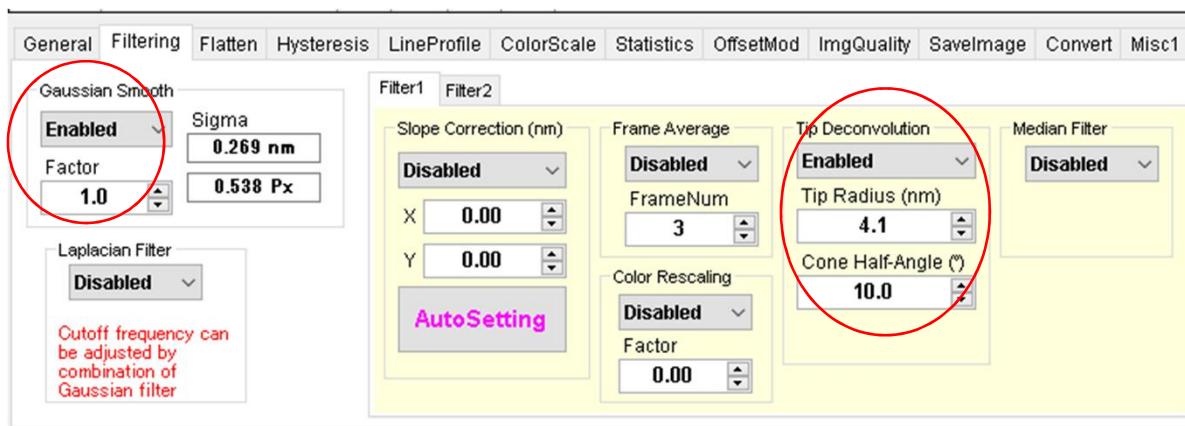
実際の測定例



SMC5/6の結果を例にして説明する。この分子は六量体からなり、NSE4やNSE1、NSE3の複合体を形成する。コイルドコイルドメインの長さなどの分子長を解析するためには、ドメインの中心位置を特定する必要がある。しかし、これらのドメインの輝点は探針曲率半径の分だけ広がっている上に、これらの輝点が重なって観察されるため、ドメインの中心位置の正確な位置をAFM像から特定するのは難しい。

そのため、この実験結果に対して、Tip Deconvolutionフィルターをかけると、輝点のサイズが小さくなり、輝点の中心位置が容易に特定できるようになった。これをみると、元のAFMイメージで確認される輝点の位置からわずかにずれた位置に分子の中心位置が来ることが分かる。

使い方



まず、Gaussian SmoothをEnabledにし、Factorを1.0に設定する。

その後、Tip DeconvolutionフィルターをEnabledにする。基本的には、Tip Radiusのみを変化させて、イメージが自然になるように設定する。典型的には、2~6 nmぐらいの値を用いれば良い。

Cone Half-angleも設定することが可能だが、EBD探針を用いている限りは、10°以外に変更する必要はない。

ノイズの影響により、基板表面が蜘蛛の巣のように見える場合には、Median FilterをEnabledにするとこの影響を低減することができる。