

Particle Track and Analysis (PTA) Version 1.1

新井由之

September 1, 2011

Contents

1	このソフトについて	2
1.1	留意事項	2
1.2	謝辞	2
1.3	概要	2
2	インストール	3
2.1	必要なファイル	3
2.2	Mac へのインストール	3
2.3	Windows へのインストール	4
2.4	Linux へのインストール	4
3	使い方	4
3.1	とりあえず使ってみる:静止画像編	4
3.2	とりあえず使ってみる:動画編	6
4	機能説明	6
4.1	PTA Window	6
4.2	テーブル	11
4.2.1	各列の説明	12
4.2.2	メニュー項目の説明	12
5	データフォーマット	15
6	CaptImage	16

1 このソフトについて

1.1 留意事項

フリーですが著作権は放棄しません。このプラグインを使うことによるいかなる損害にも責任を負いません。

PTA Particle Track and Analysis Copyright (2010) Yoshiyuki Arai. All rights reserved.
This product includes software developed by the University of Chicago, as Operator of Argonne National Laboratory.

Minpack Copyright Notice (1999) University of Chicago. All rights reserved

This software incorporates JFreeChart, (C)opyright 2000-2009 by Object Renery Limited and Contributors.

1.2 謝辞

本 plugin の 2 次元ガウス分布のフィッティングライブラリでは、Levenberg-marquardt 法を使っており、共有ライブラリとして cminpack を組み込んでいます。

また、グラフ表示用に JFreeChart (及び JCommon) ライブラリを利用しています。

1.3 概要

名前の通り「粒子を追跡して解析する」ソフトであり、ImageJ の Plugin として働く。ImageJ で動くので基本的に OS には依存しない。機能としては

- セントロイドによる粒子検出と、二次元ガウス分布による粒子の検出が可能。フィッティング部分は JNI (Java Native Interface) により Native Application として働くので比較的高速
 - フィッティングは cminpack ライブラリの Levenberg-Marquardt 法により行っている。
- テーブルによる簡単なデータ管理
- X-Y trajectories, Intensity Trajectories 等のグラフィカルな表示
- Mean square displacement、Velocity の表示
- 検出した輝点の ROI の自由な色づけ
- text データへの書き出し

があげられる。

2 インストール

インストールというほど大層なものではないが、いくつか外部ファイルが必要なのと、OSによってそれらファイルを入れる場所が違う。

2.1 必要なファイル

- ImageJ (Ver 1.43g 以上)
 - <http://rsbweb.nih.gov/ij/> からダウンロード後、Help メニューから最新版に update すること
 - Windows の場合、32bit, 64bit それぞれに対して dll を選択する。
- jfreechart.jar
 - グラフを描画するのに必要なライブラリ
 - <http://www.jfree.org/jfreechart/> からダウンロードしてください
- jcommon.jar (jfreechart についてくる)
- PTA_.jar
 - Particle Track and Analysis の本体。おまけで Window 画面キャプチャーのツール付き
- libfit2DGauss.jnilib (for Mac), fit2DGauss.dll (for win)
 - 2次元ガウス分布でフィッティングするための Native ライブラリ。Fitting のアルゴリズムは Levenberg-marquardt 法であり、cminpack (<http://devernay.free.fr/hacks/cminpack.html>) を使っている。

2.2 Mac へのインストール

Intel CPU 搭載の MacOSX10.5 以上で動作確認済み。

- ImageJ を普通にインストール。インストール後、Help→Update ImageJ... で最新版に更新
- PTA_.jar を ImageJ の plugins フォルダに入れる (/Applications/ImageJ/plugins/)
- libfit2DGauss.jnilib を ImageJ のフォルダ (plugin ではない!) に入れる (/Applications/ImageJ)
- jcommonXXX.jar, jfreechartXXX.jar (XXX はバージョン番号) を ImageJ の plugins フォルダに入れる

ImageJ を立ち上げて、メニューの Plugins に、PTA という項目ができています。その中の PTA:Particle Track and Analysis を選んで、Threshold と PTA の Window ができれば OK。

2.3 Windows へのインストール

32bit および 64bit の ImageJ で動く。XP,Vista,7 上で動作確認

- ImageJ をインストーラでインストール。インストール後、Help→Update ImageJ... で最新版に更新
- PTA_.jar を ImageJ の plugins フォルダに入れる
- OS, ImageJ のビット数に対応した、fit2DGauss.dll を ImageJ のフォルダに入れる
- jcommonXXX.jar, jfreechartXXX.jar を ImageJ の plugins フォルダに入れる

ImageJ を立ち上げて、メニューの Plugins に、PTA という項目ができています。その中の PTA:Particle Track and Analysis を選んで、Threshold と PTA の Window ができれば OK。

2.4 Linux へのインストール

使用は可能（そのうち公開予定）。

3 使い方

3.1 とりあえず使ってみる:静止画像編

ImageJ のサンプルである Cell colony を粒子に見立てて検出してみる。

- File→Open Samples→Cell Colony (31k) を選ぶ
- Image→Type→8bit で 8bit グレースケールに変換する
- Edit→Invert を選んで階調を反転させる
- Plugins→PTA→PTA:Particle Track and Analysis を立ち上げる
- Threshold の Window で Dark background にチェックを入れる。Apply は押さないこと（データが 2 値化されてしまうので）
- PTA の [Preview] ボタンを押す。検出された粒子が Roi で選ばれる
- PTA の [Track] ボタンを押すと、粒子が検出され、テーブルが表示される

- Appearance の All チェックボックスを入れると、検出されたすべての粒子の Roi が表示される (Figure1)。

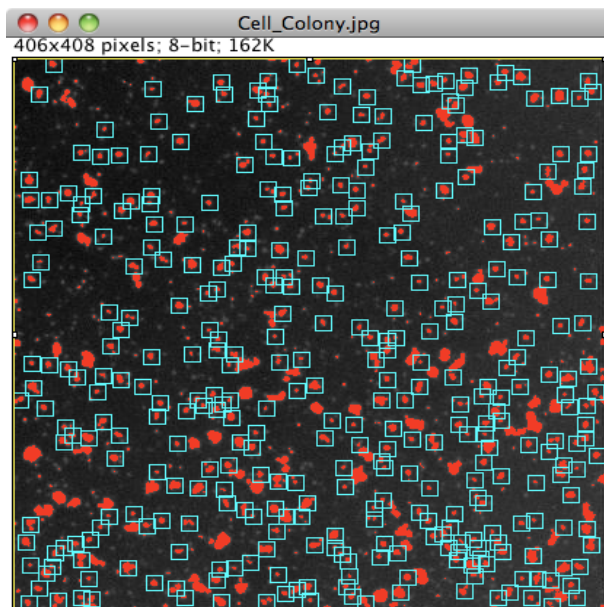


Figure 1: 検出された輝点

3.2 とりあえず使ってみる:動画編

サンプル動画 (SampleMovie.avi) を例に使う。

- File→Open... で SampleMovie.avi を選ぶ
- 開くときのオプションで、[Convert to Grayscale] を選択する
- スケールとフレーム間隔を Image→Properties... で設定する
 1. Unit of Length: um (automatically translate to μm)
 2. Pixel Width: 0.074
 3. Pixel Height: 0.074 (Pixel Width を入力すれば自動的に入る)
 4. Frame Interval: 0.05 sec
- Threshold を設定する。Dark Background のチェックを入れるだけでよい
- PTA の [Preview] ボタンを押す。検出された粒子が Roi で選ばれる

all Frames のチェックを入れる

- PTA の [Track] ボタンを押す
 - 全フレームごとに粒子の検出を開始する。全フレームとり終わったら、輝点同士をつなぐ作業を自動で行う。
- すべて終わるとテーブルが表示され、すべての軌跡が画面上に表示される。

動く粒子の検出ができたので、テーブルから点を選んで Trajectory を表示させてみる。テーブルは各列でソートが可能。

- FrameLength の列でソートをし、昇順で表示をする
- テーブルの [#13] の行 (一番上) を押す (Figure2)
- すると動画上に ROI と軌跡が表示される
- さらに Trajectories の Window (Figure3) が表示される。動画のフレームを動かすと、画面上の ROI も動き、Trajectories の Window でのクロスカーソルも動く

4 機能説明

4.1 PTA Window

Plugin の心臓部である PTA メインウィンドウについて説明をする。

1. Preview: 現在の画面に対して粒子検出をテストする
2. Track: 輝点検出を開始する

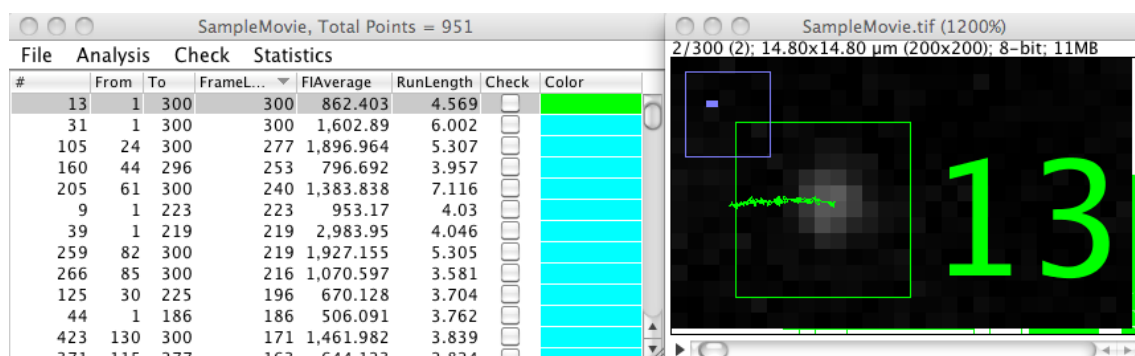


Figure 2: テーブルと対応する粒子 テーブルの各行を選ぶと、対応する粒子が表示される。複数選択すれば、複数表示される。動画は Appearance で Number を表示させた例。各列やメニューの説明は後の Section で

Tips: スキャン範囲は矩形 Roi で決めることができる。

3. 2-DGaussian Fit : 粒子を 2 次元ガウス分布でフィッティングする
4. Auto-update: Parameters 等や Threshold を変えたときに、自動的に粒子検出をテストするモード。細かい条件設定を行うときに便利。
5. All Frames: すべてのフレームに対して粒子検出を行う。
 - Nearest Particle Range, Maximum miss frame の情報に従って各フレーム間での同一粒子の連結も行う。
6. Basic: ベーシックな粒子検出の条件設定
 - (a) RoiSize (pixel): 粒子検出を行う際の RoiSize。粒子に対して小さすぎても大きすぎてもうまく検出できない。粒子の 1 割くらいの大きさがちょうどよい。
 - (b) Min Intensity :検出する最小の輝度。2D-Gaussian fitting の場合、ガウス分布の係数に該当し、セントロイドの場合、RoiSize 内の輝度の合計に該当する。
 - (c) Min Size :検出する粒子の最小値 (pixel)
 - (d) Nearest Particle Range :検出した粒子がこの値 x RoiSize 以内にいる場合、同じ粒子とみなす。重複した粒子の検証や、フレーム間で粒子をつなげるときにこの値を使う。
7. Advanced : アドバンスドな粒子検出の条件設定
 - (a) Maximum miss frame: ブリンキングなどにより、一時的に粒子が消えた場合、何フレームまで考慮に入れるかの値。
 - (b) Kurtosis: この値以上の尖度を持つ粒子を検出する。
 - (c) Iteration: 2 次元ガウス分布の際に試行を行う上限回数

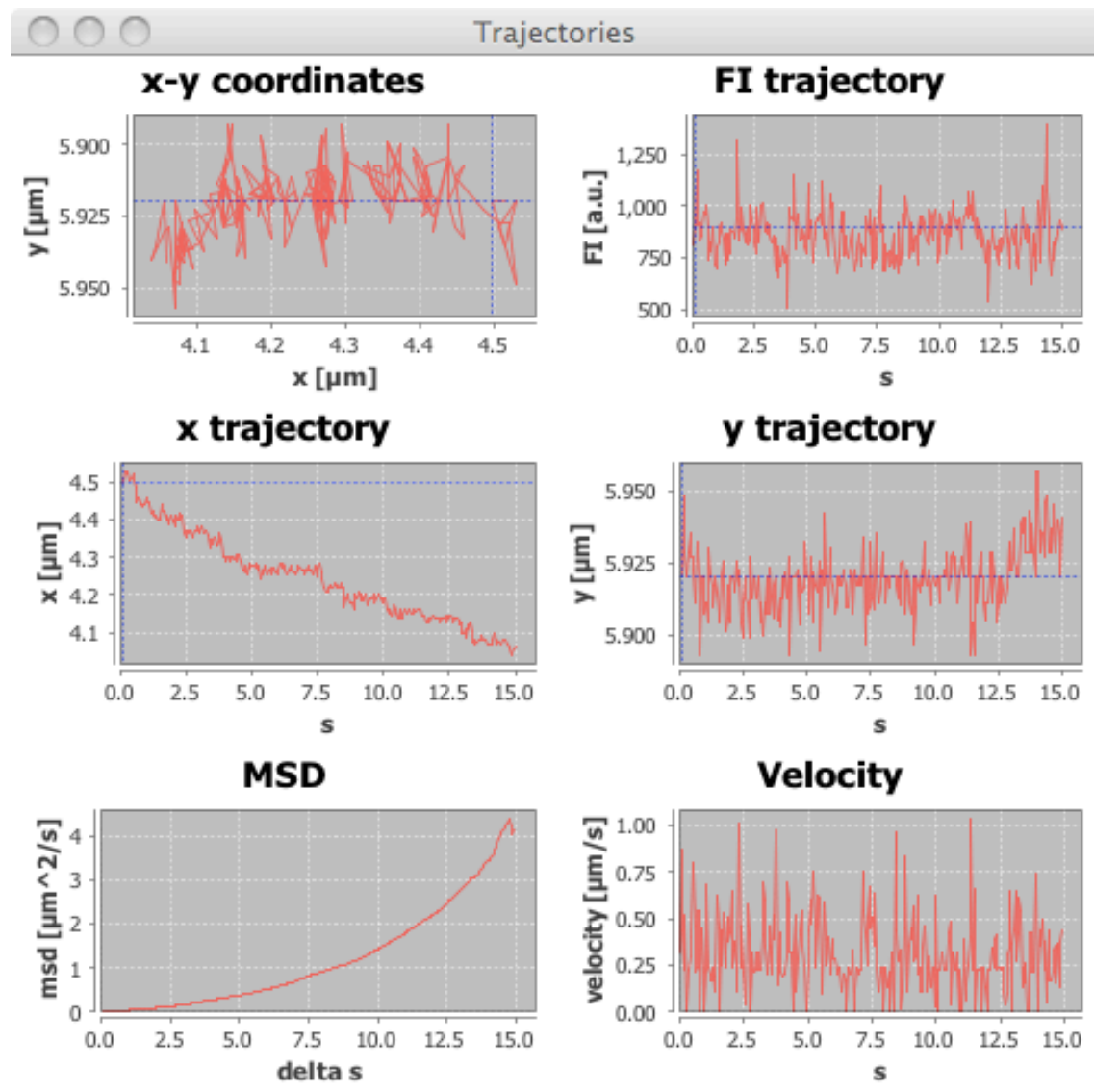


Figure 3: 粒子の各種 Trajectory データ 粒子検出前に、ImageJ の Image→Properties... でスケールや時間分解能を設定すれば、軸や単位も準じた表示になる（ただし粒子検出前のみ）

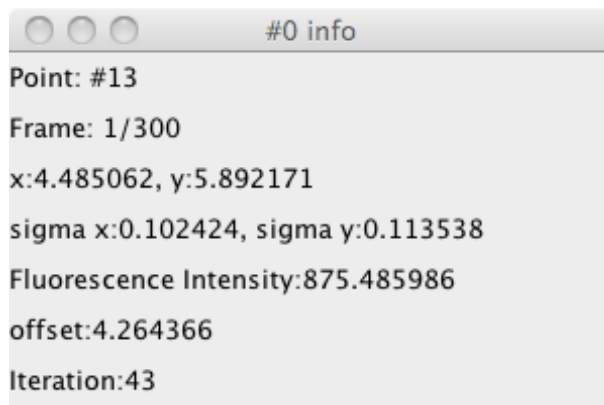


Figure 4: 粒子の Information フレームを動かせば、値も変わる。表示は、後で説明する [後から 2次元ガウス分布でフィッティング] した後の表示

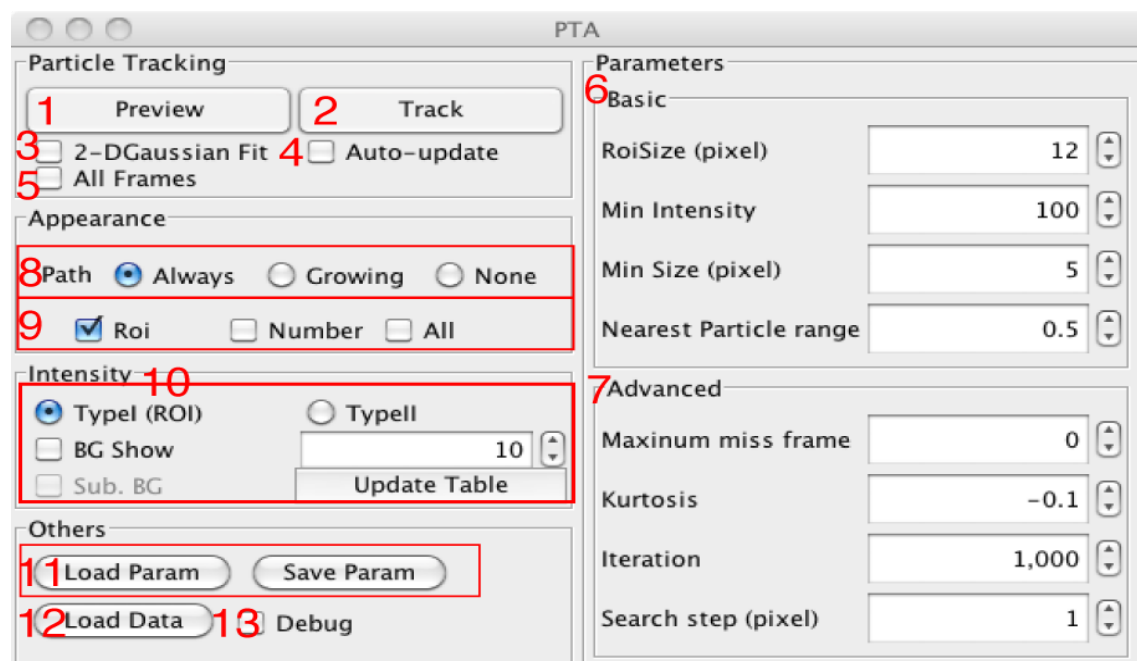
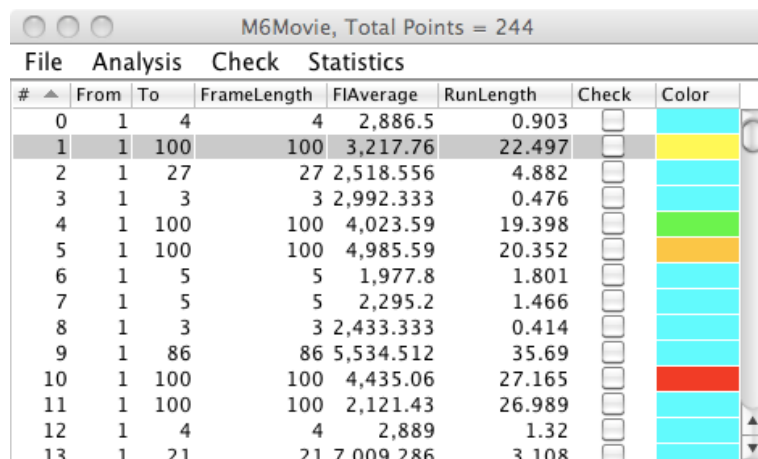


Figure 5: PTA Window メインウィンドウ

- (d) Search step (pixel): 粒子検出を行う際の、Roiを何ピクセルずつスキャンさせるかの設定。大きくなると解析速度があがるが、粒子検出を取りこぼす可能性もある。1 or 2が適当。
8. Path : 検出した粒子の軌跡の表示方法
- (a) Path : 選択した粒子のパス（粒子の軌跡）の表示方法
- Always: 常に全パスを表示する
 - Growing: フレームを進めるごとにパスを描く
 - None: パスを表示しない
9. Roi の表示の仕方
- Roi: Roi の表示の有無
 - Number: 粒子の横に番号を表示
 - 選択の有無にかかわらず、すべての粒子を表示する
10. Intensity パネル
- TypeI(Roi), TypeII:
 - o Type I(Roi): グラフの Intensity を Roi 内の輝度合計値とする
 - o Type II: 次のどちらかで表示する
2D ガウス分布フィッティングした場合; 2D ガウス分布の係数
2D ガウス分布フィッティングをしていない場合; Roi 内の閾値以上の輝度合計値（従来の表示方）
- Intensity を Roi 内の輝度を表示するか、2D ガウス分布の係数を表示するか選択（テーブルデータも変化）
- BG Show: 背景光として右の数値のフレーム分だけ、最後のフレームの Roi 位置の輝度をグラフに付け足して表示する
 - Sub. Bg: 背景光を輝度から引く
 - Update Table: テーブルデータの平均の蛍光強度に背景光の減算の有無を反映させる
11. Load Param, Save Param: パラメータをロード、セーブする
12. Load Data: テーブルの Save Table で保存したデータを呼び出す。予め対応する動画をひらいておく必要あり
13. debug : デバッグ機能 (開発者専用)

4.2 テーブル

粒子の検出が終わると、テーブル上にデータが格納される。Window のタイトルバーには、



#	From	To	FrameLength	FIAverage	RunLength	Check	Color
0	1	4	4	2,886.5	0.903	<input type="checkbox"/>	
1	1	100	100	3,217.76	22.497	<input type="checkbox"/>	
2	1	27	27	2,518.556	4.882	<input type="checkbox"/>	
3	1	3	3	2,992.333	0.476	<input type="checkbox"/>	
4	1	100	100	4,023.59	19.398	<input type="checkbox"/>	
5	1	100	100	4,985.59	20.352	<input type="checkbox"/>	
6	1	5	5	1,977.8	1.801	<input type="checkbox"/>	
7	1	5	5	2,295.2	1.466	<input type="checkbox"/>	
8	1	3	3	2,433.333	0.414	<input type="checkbox"/>	
9	1	86	86	5,534.512	35.69	<input type="checkbox"/>	
10	1	100	100	4,435.06	27.165	<input type="checkbox"/>	
11	1	100	100	2,121.43	26.989	<input type="checkbox"/>	
12	1	4	4	2,889	1.32	<input type="checkbox"/>	
13	1	21	21	7,009.286	3.108	<input type="checkbox"/>	

Figure 6: テーブル Fig2 と同じ 検出した粒子の情報が格納されている

検出をしたイメージの名前と、検出した粒子の総数が書いてある。各行を選択すると、選択した行の粒子番号に応じて画像データに Roi や軌跡が表示される。また、選択した行の Trajectories データや粒子の情報が別ウィンドウで表示される。複数行を選択した場合、複数の Roi や軌跡が同時に表示される。Trajectory などの情報は選択した最初の行のデータのみ表示される。

4.2.1 各列の説明

左列から

1. # : 検出した粒子の番号
2. From : 粒子の最初のフレーム
3. To : 粒子の最後のフレーム
4. Frame Length: 粒子のフレームの長さ
5. FIAverage : 粒子の輝度の全フレームでの平均値
6. RunLength: 粒子の総移動距離
7. Check : チェックボックス 選んだデータの記録、解析などに使う
8. Color : Roi や軌跡の色を選択できる

Tips : 各列のタイトルを選択することで、昇順、降順で並び替えることができる。並び替えは2列までキー値として使うことができるので、例えば FIAverage, Check の順にクリックすると、Check された項目で輝度の順に並べ替えることができる。

4.2.2 メニュー項目の説明

1. File : データの保存を行う
 - Save all : すべての粒子データをテキストとして書き出す
 - Save selected : 選択された粒子データをテキストとして書き出す
 - Save checked : チェックされた粒子データをテキストとして書き出す
 - Save Table as Text Data : テーブルをテキストとして書き出す上記4つは、BgShow や SubBg にチェックが付いているとデータに反映される。ポイント数が多いと処理に時間がかかる。ダイアログで選択することができる。
 - Save Table : 全て粒子データを直列化して.dat 形式で保存する。PTA Window の [load Tabel] ボタンで保存した全データを読み出すことが可能。その際、元動画を予めひらいておく必要があること、動画のファイル名を変えると開くことができなくなるので注意。
2. Analysis : 各種解析を行う
 - calc MSD : 選択したデータの平均二乗変位を求める。Dialog box で条件設定
 - delta x length for MSD cald : フィッティングを何 x(frame, sec 等) までのデータで行うか
 - Linear (true) or Poly2(false) : フィッティングを直線で行うか、2 次の多項式で行うか

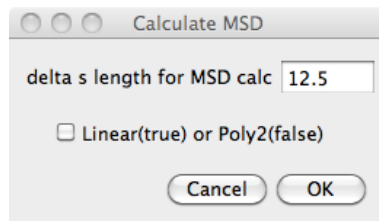


Figure 7: Calculate MSD 平均二乗変位を求める

テキスト形式で選択したデータの MSD を書き出し、Result Window にフィッティングした時の各パラメータ係数を表示する。

- calc Velocity : 選択したデータのフレーム間の速度時系列データを求める事ができる。

Tips: calc MSD, calc Velocity は複数行選択すれば、同時に解析してくれる。

- Re-fit by 2D Gauss: 選んだ粒子を 2 次元ガウス分布でフィッティングし直す (Figure 8)

Tips: 2 次元ガウス分布は基本的に時間がかかる。そこで、まずセントロイドで粒子を検出しておき、後で必要なデータだけ 2 次元ガウス分布でフィッティングをかける、といった利用に使うと便利。複数行を選択すれば、同時にフィッティング（といっても逐次だが）処理が可能。

- Extract point along LineRoi : 線分の Roi から指定した Pixel 数以内にいる粒子にチェックをつける。

— 画面上のある特定の線分上のデータのみを取り出したいときに使うと便利

3. Check : 選択範囲のチェックをつけたたり外したり反転させたりする

- Uncheck : 選択した範囲のチェックを外す
- Check : 選択した範囲にチェックを入れる
- Reverse : 選択した範囲のチェックを反転させる

4. Statistics : 輝度の平均値と SD, オフセット (背景光) の平均値と SD, Duration, Run Length, X, Y 座標の平均値と S.D. のヒストグラムを表示する (Figure 9)。ヒストグラムのビン幅はスタージェスの公式を使用。

- All points of statistics : 全ての粒子の情報を表示
- Checked points of statistics : チェックした粒子の情報を表示
- show Statics: 選択したデータの各種統計情報をテキストデータで書き出す

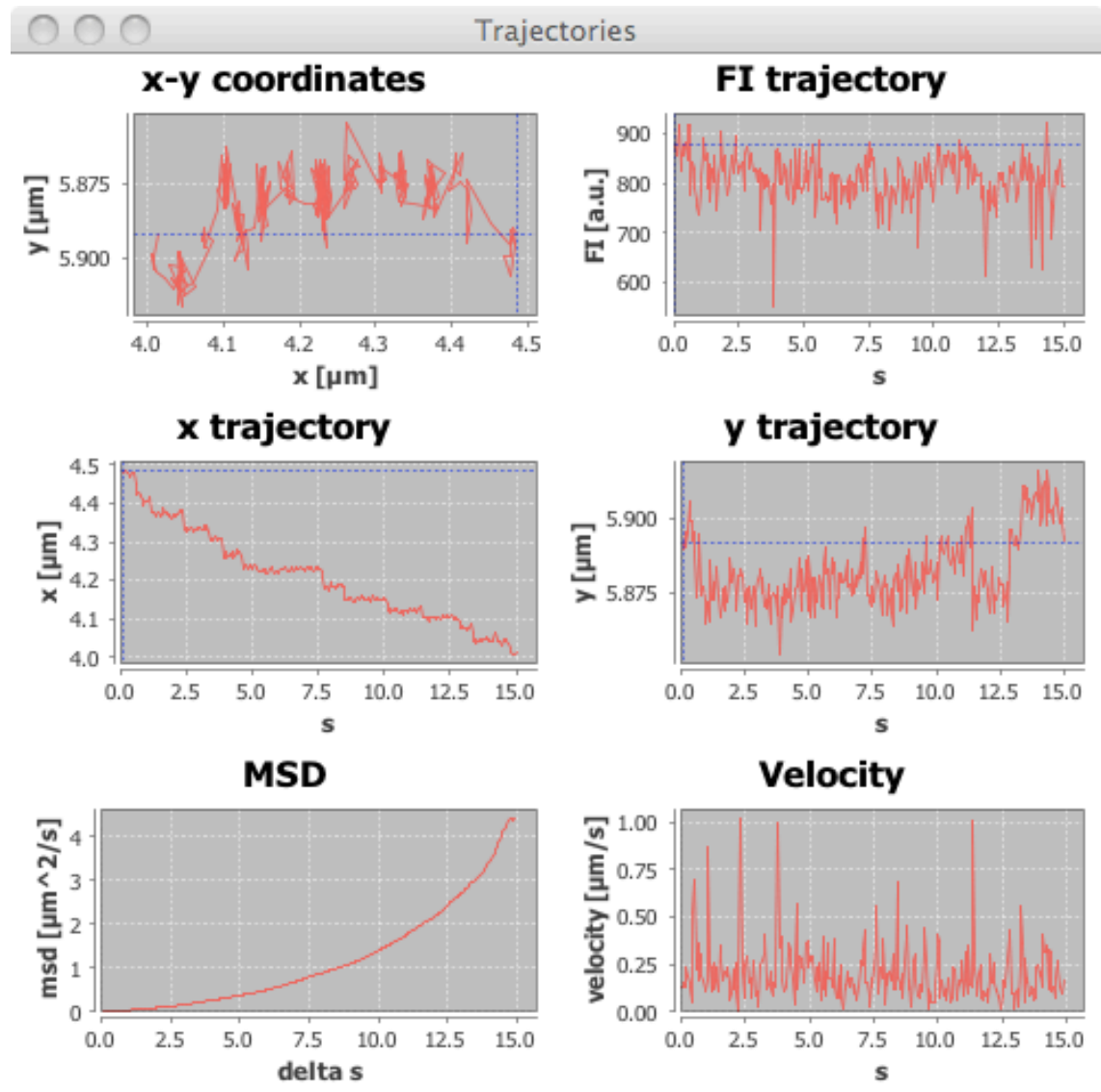


Figure 8: Figure3 のデータを、2次元ガウス分布でフィッティングし直した軌跡データ。位置精度が向上している様子がわかるだろうか

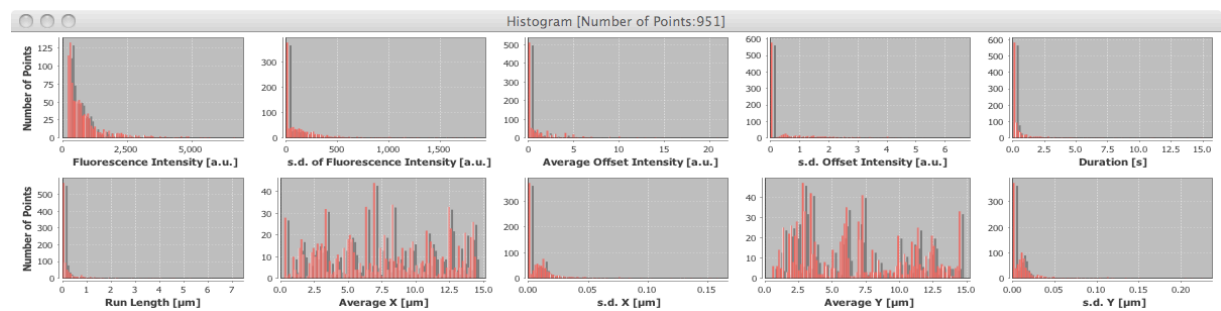


Figure 9: 各種情報のヒストグラム一覧

5 データフォーマット

テーブルの File メニューから、粒子のデータをテキスト形式で書き出すことができる。そのときのデータフォーマットを示す。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	#Point:1								
2	#Frame	x	y	sx	sy	F.I.(I)	F.I.(II)	offset	Iteration
3	1	100.955889	187.737031	1.820366	1.876283	6378	3715.209939	-3.71754	64
4	2	100.89025	187.691647	1.871149	1.987383	6859	3919.112819	-5.262425	64
5	3	100.881946	187.826788	1.861555	1.914374	6720	3788.731859	-3.140947	64
6	4	100.915884	187.771094	1.824906	1.869139	6439	3694.06277	-2.850497	64
7	5	100.874451	187.708521	1.774636	1.951668	6398	3726.770261	-4.027996	57
8	6	100.911471	187.739191	1.845544	1.873213	6429	3788.655893	-4.763821	64

Figure 10: 書き出されたテキストデータ

- #Point:[number] 粒子の number
- #Frame x y sx sy F.I.(I) F.I.(II) offset Iteration: フレーム, x 座標, y 座標, σ_x , σ_y , 輝度強度, 輝度の offset, 2次元ガウス分布の Iteration (試行) 数。F.I. (I) と F.I. (II) は、それぞれ Type I (Roi 内の強度) と Type II (2次元ガウス分布の係数もしくは Roi 内の閾値以上の強度合計値) に対応している。
- その粒子番号におけるデータが各フレームごとに各行に書き出される

データはこの繰り返しになっている。つまり、次の粒子はまた #Point からの行で始まる。データはスペース区切り。

6 CaptImage

Roi や軌跡を表示した状態で動画を作成する簡易動画作成 plugin。名前の通り、Window を各フレームずつキャプチャしてつなげているだけ（なので遅い）。だが、プレゼンテーション用途などで使える

使い方 現在表示している動画の「まま」書きだすので、Windows のサイズ、ズームの状態などもそのまま書きだす。PTA Window の Appearance の Growing を選んでおくと、粒子が動くにつれて軌跡を描画してくれる。

- 最初と最後のフレームを入力する
- OK を押すと作成開始。
- 完成まで触らない事

注意点: 単純に Window をキャプチャーしているだけなので、他の Window を動画に重ねたり、隠したりするとキャプチャがうまくいかない。