



AID EliSpot リーダーシステム	ELR02
AID EliSpot リーダー HR	ELHR01
AID EliSpot 評価システム	EL02
AID EliSpot ソフトウェア	Version 3.1

ハンドブック & テクニカルマニュアル

Version 3.1-1.0

© AID Autoimmun Diagnostika GmbH 2003

www.elispot.com



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

目次

第1章 ハードウェア	5
1.1 セットアップ	5
1.1.1 セットアップ	5
1.1.2 セットアップ時のシステムテスト	5
1.2 システムの詳細	7
1.2.1 はじめに	7
1.2.2 AID EliSpot リーダーシステム ELR01	8
1.2.3 AID EliSpot リーダーシステム ELR02	10
1.2.4 AID EliSpot リーダー HR ELHR01	15
1.2.5 AID EliSpot 評価システム EL02	16
1.3 データ処理	17
1.3.1 ドライブ	17
1.3.2 ネットワーク接続	18
1.3.3 モデムサポート	18
1.4 AID EliSpot リーダーユニットの保守	19
1.4.1 はじめに	19
1.4.2 ネオンリング照明（電球）の交換	21
1.4.3 ヒューズの交換	24
1.5.1 ミリメートル当たりのピクセル数	25
1.6 安全注意事項	27
1.7 リーダーに標準添付されない製品	28
1.7.1 EliSpot プレートおよび試薬	28
1.7.2 コンピュータメディア	28
1.7.3 AID マスタープレート	28
1.7.4 AID 付属部品、アップグレードまたは交換用部品	29
第2章 各部の詳細	31
2.1 [File] メニュー	32
2.1.1 オプション	33
2.1.2 ステージ	39
2.1.3 カウント設定	40
2.1.4 ディレクトリからのカウント	46
2.1.5 プレートのプロパティ	46
2.2 [Selection] メニュー	47
2.3 [View] メニュー	48

2.3.1 ツールバーの表示／非表示	48
2.3.2 ステータスバーの表示／非表示	48
2.3.3 ヒストグラムの表示	49
2.3.4 ウィンドウのスクリーンショット保存	50
2.4 [Camera] メニュー (2.10 節も参照)	50
2.5 [Run] メニュー	51
2.6 [Window] メニュー	51
2.7 [Data] メニュー	52
2.7.1 アッセイの表示	52
2.7.2 データファイルの表示／保存／印刷	53
2.7.3 Excel スクリプトとして保存	53
2.7.4 Excel で開く	54
2.7.5 EliStat でプレートを開く	54
2.7.6 dBase ファイルとして保存	55
2.8 [Help] メニュー	56
2.9 ツールバー	58
2.9.1 プレート全体表示のツールバー	58
2.9.2 ウェル表示のツールバー	60
2.10 カメラドライバ	64
2.10.1 DBS カメラドライバ	64
2.10.2 FireWire カメラドライバ	64
2.10.3 Sony カメラドライバ	65
2.11 EliStat : EliSpot データ分析用 MS Excel ツール	67
2.11.1 はじめに	67
2.11.2 [Analysis] ページ	69
2.11.3 [Create Evaluation Method] ページ	70
2.11.4 [Create Plate Layout] ページ	70
第3章 操作方法	73
3.1 ルーチン設定でのシステム操作	73
3.1.1 操作の開始	73
3.1.2 EliSpot プレートの読み取り	74
3.1.3 [Selection] メニューの使用	76
3.1.4 異なるカウント設定の使用	77
3.2 ルーチン試験用のシステムセットアップ	79
3.2.1 ステージのキャリブレーション	82
3.2.2 カメラの調整	84

3.2.3 フォーカス	86
3.2.4 カウント設定	87
3.2.5 カウント設定の使用	89
3.2.6 白色プレート（PVDF または ニトロセルロース）用の調整	90
3.2.7 透明プレート（ELISA）用の調整	90
3.3 EliSpot ユーザーの管理	92
3.4 臨床試験における AID EliSpot リーダーシステムの管理	92
3.5 発表データのプレゼンテーション	94
第 4 章 トラブルシューティング、用語集、注記	96
4.1 トラブルシューティング	96
4.2 誤差	99
4.2.1 はじめに	99
4.2.2 よくある問題	99
4.2.3 スポット分析の精度	100
4.2.4 周縁部を含める／含めない	101
4.2.5 カウント結果の再現性の判定	101
4.2.6 サイズ	102
4.3 用語集	103
4.3 注記	105
4.3.1 商標について	105
4.4 保証書：契約条件	106
4.5 AID 連絡先	107

第 1 章 ハードウェア

1.1 セットアップ

1.1.1 セットアップ

通常、AID EliSpot リーダーシステム/HR のセットアップは当社の担当者が行います。ご自身でセットアップを行う必要がある場合は「システムの詳細」の節を参照してください。装置を動かすときは、必ず付属のねじまたはプラグでリーダーユニットのステージを固定して、リーダーに重大な損傷を与えないようにしてください。装置が低温または高湿の場所に保管されていた場合は、装置が室温に達するまで数時間待ってから作業してください。まず電源ケーブルを接続し、次にキーボード、マウス、モニタ、プリンタを接続します。ここで一度起動して、モニタとプリンタが正しく動作することを確認するとよいでしょう。コンピュータ/コントロールユニットの電源を切って、リーダーユニットに接続します。下記の手順にしたがって、EliSpot リーダーシステムをテストします。必要に応じてネットワークに接続します（1.3.2 節を参照）。

1.1.2 セットアップ時のシステムテスト

各種のチェックを実行して、システム機能が完全に働いていることを確認する必要があります。以下のリストは AID の標準テスト手順です。

1.1.2.1 目視検査

すべてのケーブルに屈曲、絶縁不良がなく、正常な状態であることを確認します。装置全体をチェックして目に見える損傷がないか確認します。装置内容が見積書、注文書、付属品リストと一致しているか確認します。また装置のシリアルナンバーが QC 文書と一致しているかも確認します。

1.1.2.2 稼働

1 枚または数枚のプレートを試験的に読み込み、ステージ、カメラ、カウント設定を調整します。プレート文書を保存します。プレートフォ

ルダを参照できるように CD-ROM に転送します。AID EliSpot マスター
(例 : No. 33) を使用して機能を確認します。

1.1.2.3 設置の正式完了

当社の担当者とお客様が QC 文書に署名します。モデムサポートをインストールする場合は、機密保持文書にも署名します。CD-ROM と書類を AID に送付します。

1.2 システムの詳細

1.2.1 はじめに

AID EliSpot リーダーシステムは、96 ウェルの EliSpot プレートをセミオートで解釈するコンピュータベースのシステムです。日常的に簡単にお使いいただけるよう設計されており、再現性のある結果を短時間で提供するため、ルーチン試験に EliSpot を役立てていただくことができます。本システムは、5.8 mm のウェルを備えたすべての標準マイクロタイタープレートに対応しています。また 2.5 mm の小容量プレートや、やや大きなウェルサイズの ELISA プレートの読み取り用にセットアップすることもできます。

AID EliSpot リーダーは EliSpot データを読み取り、解釈し、デジタル保存するシステムです。EliSpot アッセイは種類によりスポットパターンが異なるため、サイトカインや試験の種類に応じて、専用の設定が用意されています。これらの設定は、ユーザーの希望に応じて変更、選択することができます。

AID EliSpot リーダーはプレートのウェルを読み取るリーダーユニットと、リーダーに接続されたコンピュータ/コントロールユニットとで構成されます。リーダーユニットには、高性能ビデオカメラ、ウェルをカメラ視野内に移動する 2 軸スキャンステージが搭載されています。コンピュータ/コントロールユニットはリーダーユニット稼動用 PC で構成されます。旧バージョンのリーダーは、コンピュータ/コントロールユニットにフレームグラバカードとスキャンステージのモーターコントロールカードを搭載しています。より最近のモデルは FireWire ホストコントローラカードを備えており、ステージをシリアルまたは USB 接続で操作します。

AID EliSpot リーダーシステムには、モニタとプリンタも含まれます。AID はモデム 1 台、無停電電源装置 1 台、バーコードスキャナ 1 台に加え、各種の部品を提供しています。これらの部品については、専用のマニュアルを参照してください。部品は AID に相談なく交換しない

てください。システム性能を損なうおそれがあります。過去に、コンピュータ／コントロールユニットが AID が供給する以外の装置（例：ELISA リーダー）の操作に使用されることがよくありました。AID はこのような使用に対し一切責任を負いません。保証が無効になります。

1.2.2 AID EliSpot リーダーシステム ELR01



AID EliSpot リーダーシステム ELR01

AID EliSpot リーダーシステムの第 1 号モデルで、少数しか販売されていません。縦型の Pixera または DBS カメラを搭載した背の高いリーダーユニットと、グラブカード、Windows NT を搭載した Pentium II または III プロセッサコンピュータ／コントロールユニットとで構成されます。Isel ステージドライブ、フロッピーディスク、MO ドライブを搭載。AID EliSpot ソフトウェアアップデート 3.1 を使用するには、新しいコンピュータを購入する必要があります（Pentium III、Windows 2000 または XP）。

リーダーユニット ELR 01 の技術仕様

装置付属のスペックシートおよびリーダー背面の仕様ラベルを参照してください。

寸法：設置面積 幅 40 cm×奥行 50 cm、高さ 53 cm、重さ 24 kg

電源入力：700 mA/240 V

DBS Falcon カメラ、768×576 ピクセル

1/3 インチ CCD 用 6.5 mm 特注レンズ、C マウント、距離 50～70 mm

衝撃保護機能搭載 Isel 2 軸 精密ステージ

ネオンリング照明または冷光リング照明（ネオンリング照明にアップグレードする必要があります）

ケーブル：固定または取り外し式カメラケーブル、IseI ステージケーブル、標準電源ケーブル。参照できるようにハンドブックを保管しておいてください。

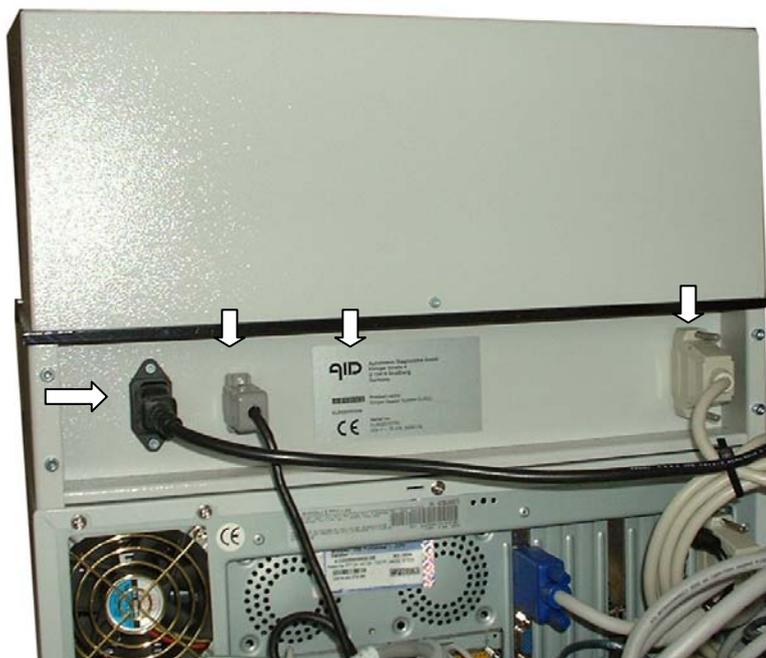
1.2.3 AID EliSpot リーダーシステム ELR02



AID EliSpot リーダーシステム ELR02。最新モデルのコンピュータ/コントロールユニットは黒色です（左）。

1.2.3.1 DBS カメラ/Isel ステージ搭載のリーダーユニット ELR02

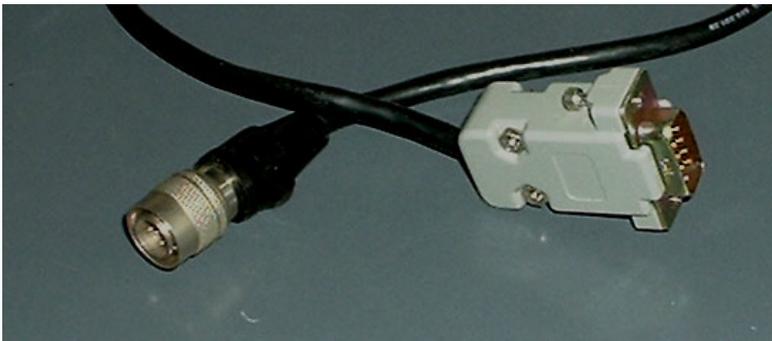
横型の DBS カメラを搭載した小型リーダーユニットと、グラバーカード、Windows 2000 または NT、Isel ステージドライブを搭載した Pentium II または III コンピュータ/コントロールユニットとで構成されます。AID EliSpot ソフトウェア 3.1 を使用するには Windows 2000 または XP へのアップデートが必要です。AIDにご相談ください。



コンピュータ/コントロールユニットの上に乗った DBS タイプの EliSpot リーダーユニット背面。リーダーユニット各部（左から）：電源ケーブルおよびソケット（ヒューズホルダなし）、カメラケーブルおよびソケット、仕様ラベル、Isel ステージコントロールケーブルおよびソケット。



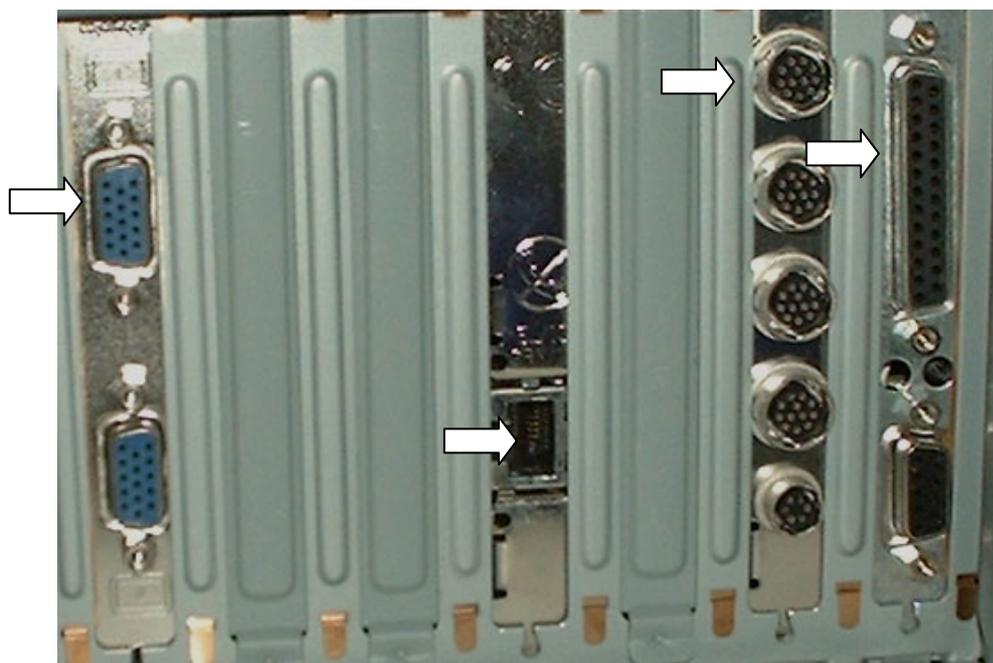
ケーブルを差し込んでいないDBSタイプのリーダーユニット背面。
左から：電源ソケット、カメラソケット、仕様ラベル、Iselソケット。



DBS カメラケーブルはリーダーユニットのカメラポートをコンピュータ/コントロールユニットのグラバカードに接続します。



Isel ステージケーブルはリーダーユニットをコンピュータ/コントロールユニットのIsel モーターコントロールカードに接続します。



コンピュータ/コントロールユニットのポート（左から）：グラフィックカードのモニタソケット、Ethernet カードのネットワークソケット、グラバカードのカメラケーブルソケット、コントローラカードの Isel ステージケーブルソケット。

1.2.3.2 Sony カメラ/Isel ステージ搭載のリーダーユニット

横型の Sony カメラ、Isel ステージドライブを搭載した小型リーダーユニットと、FireWire アダプタ、Windows 2000、FireWire カメラドライバを搭載した Pentium III コンピュータ/コントロールユニットとで構成されます。AID EliSpot ソフトウェア 3.1、Windows 2000 パッチ 1 および 2 までアップデートできます。それ以上の Windows 2000 パッチはインストールしないでください。



FireWire ケーブル



Isel ステージケーブル

1.2.3.3 Sony カメラ/QuadPack ステージ搭載のリーダーユニット

横型の Sony カメラ、QuadPack ステージドライブを搭載した小型リーダーユニットと、FireWire アダプタ、Windows 2000 パッチ 1~3、Sony カメラドライバを搭載した Pentium III または IV コンピュータ/コントロ

ールユニットとで構成されます。AID EliSpot ソフトウェア 3.1 にアップデートできます (QuadPack および FireWire カメラドライバを搭載しているシステムは、AID にご依頼くだされば、Sony ドライバにアップグレードしてシステム安定性を向上できます)。



ELR02-c 背面 (左から) : ヒューズ付き 240 V または 120 V 電源ケーブルソケット、FireWire カメラケーブルおよび仕様ラベル、ステージドライバ用シリアルポートケーブルソケット。

リーダーユニット **ELR 02** の技術仕様

装置付属のスペックシートおよびリーダー背面の仕様ラベルを参照してください。

寸法 : 設置面積 42.5 cm×42.5 cm、高さ 25 cm、重さ 12.8 kg

電源入力 : 250 mA/240V または 500mA/120V

Sony カラーデジタルカメラ、640×480 ピクセル、FireWire

1/3 インチ CCD 用 6.5 mm 特注レンズ、C マウント、距離 50~70 mm

衝撃保護機能搭載 QuadPack 2 軸精密ステージ

ネオンリング照明

ケーブル : 固定 FireWire ケーブル (カメラ)、ツイストシリアルポートケーブル (ステージ)、標準電源ケーブル

1.2.3.4 ノート PC タイプ

FireWire カメラおよび QuadPack ステージを搭載した ELR02 モデルは、ノート PC をコンピュータ/コントロールユニットとして使用することができます。PC は AID が提供します。



ノート PC システム

リーダーユニット ELR 02 (ノート PC) の技術仕様

装置付属のスペックシートおよびリーダー背面の仕様ラベルを参照してください。

寸法：設置面積 42.5 cm×42.5 cm、高さ 25 cm、重さ 12.8 kg

電源入力：250 mA/240 V または 500 mA/120 V

Sony カラーデジタルカメラ、640×480 ピクセル、FireWire

1/3 インチ CCD 用 6.5 mm 特注レンズ、C マウント、距離 50~70 mm

衝撃保護機能搭載 QuadPack 2 軸 精密ステージ

ネオンリング照明

ケーブル：固定 FireWire ケーブル (カメラ)、ノート PC 用 12 V 外部電源入力付き FireWire アダプタ、ツイストシリアルポートケーブル (ステージ)、標準電源ケーブル

1.2.4 AID EliSpot リーダー HR ELHR01



AID EliSpot リーダーHR

ELHR01

横型の Sony 高解像度 (high resolution; HR) カメラ、QuadPack ステージドライブを搭載した小型リーダーユニットと、FireWire アダプタ、Windows 2000 パッチ 1~3、Sony カメラドライバを搭載した Pentium IV コンピュータ/コントロールユニットとで構成されます。AID EliSpot ソフトウェア 3.1 にアップデートできます。

リーダーユニット **ELHR 01** の技術仕様

装置付属のスペックシートおよびリーダー背面の仕様ラベルを参照してください。

寸法：設置面積 42.5 cm×42.5 cm、高さ 25 cm、重さ 12.8 kg

電源入力：250 mA/240 V または 500 mA/120 V

Sony カラーデジタルカメラ 1280×960 ピクセル、FireWire

1/3 インチ CCD 用 6.5 mm 特注レンズ、C マウント、距離 50~70 mm

衝撃保護機能搭載 QuadPack 2 軸精密ステージ

ネオンリング照明

ケーブル：固定 FireWire ケーブル (カメラ)、ツイストシリアルポートケーブル (ステージ)、標準電源ケーブル

1.2.5 AID EliSpot 評価システム EL02

AID EliSpot 評価システムは、AID EliSpot リーダーシステム（～HR、～Robot）が収集したデータを保存、再分析、表示、印刷するシステムです。通常、データ転送はネットワーク、ZIP ディスク、CD-ROM を利用して行います。AID EliSpot リーダーユニットよりも後に購入した場合、評価システムはリーダーユニットを操作できるように設定されています。

AID EliSpot 評価システムは、以下で構成されます。

- ・ コンピュータ／コントロールユニット（Pentium IV、512 MB RAM、CD-ROM ライタ、ネットワークカード）
 - ・ 15 インチ TFT モニタ
 - ・ プリンタ、ケーブルセット、キーボード、マウス
- システムには以下がプリインストールされています。
- ・ MS Windows オペレーティングシステム
 - ・ MS Office
 - ・ AID EliSpot ソフトウェア LITE バージョン
 - ・ AID EliStat 統計モジュール

1.3 データ処理

1.3.1 ドライブ

AID EliSpot リーダーシステムのコンピュータ/コントロールユニットは、さまざまなドライブ、データ転送システムを搭載しています。

1.3.1.1 フロッピーディスクドライブ

フロッピーディスクドライブは標準 DOS 形式、容量 1.4 MB のディスクに対応しています。サイズの小さなファイルには便利ですが、プレートフォルダは保存できません。

1.3.1.2 ZIP ドライブ

AID は外部 (USB) または内部 (コンピュータ/コントロールユニット内蔵) の 100 MB ZIP ドライブを使用します。ZIP ディスク 1 枚あたり 20 個のプレートフォルダが保存できます。DOS 形式。

1.3.1.3 MO ドライブ

光磁気 (MO) ドライブは速度が遅く、メディアも高価です。しかし、MO ディスクは長期間のデータ保存に大変適しています。MO ディスクは最大 640 MB のデータを保存できます。MO ドライブはご希望に応じて AID が提供します。

1.3.1.4 CD-ROM ライタ (CDRW)

CD-ROM を焼くためには、Nero などの専用ソフトウェアが必要です。専用のマニュアルを参照してください。CD-ROM は最大 700 MB のデータを保存することができます。CD-ROM は安価で取り扱いが簡単ですが、データ保存の安全性は完全ではありません。データのバックアップに使用する場合は、2 枚以上のコピーを作成されることをお勧めします。

1.3.1.5 USB メモリースティック

AID では提供していませんが、各社からさまざまな容量の製品が販売されています。データの移動用には 128 MB のメモリースティックをお勧めしますが、保存用にはお勧めしません。Windows 2000 では、メモリースティックにドライバは必要ありません。

1.3.2 ネットワーク接続

AID のコンピュータ/コントロールユニットには、Ethernet カードが必ず搭載されています。ただし、システムをネットワークに接続するときはご自身の責任で行ってください。ネットワーク接続はご自身の IT サポート担当者に行っていただく必要があり、システム性能が損なわれた場合、AID は一切責任を負いません。ネットワークはデータのバックアップ目的のみに使用し、システムをインターネットポータルとして多目的に使用されないことをお勧めします。AID では、ご希望に応じてデュアルブート機能をインストールしています。これにより、システムの 2 つのディスクパーティションのうちの 1 つを起動して EliSpot を行い、もう 1 つでネットワークに接続することができるようになります。

1.3.3 モデムサポート

AID では、ご希望に応じてリーダーシステムに標準の USB 56 k モデムを提供しています。モデムを近くの電話線ソケットに差し込めば、AID のサポート担当者がシステムをリモート操作できるようになります。ご使用システムのデータに AID がフルアクセスできるようになるため、機密保持契約が必要となります。詳しくは AID までお問い合わせください。

1.4 AID EliSpot リーダーユニットの保守

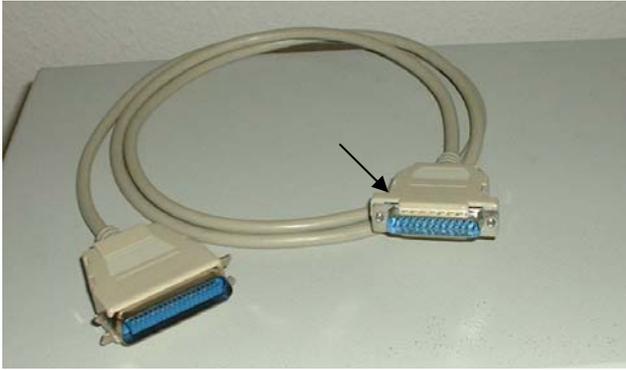
1.4.1 はじめに

リーダーユニットは保守をほとんど必要としません。ユーザーは、以下に記載する以外の保守作業を行わないでください。乾いた布で装置に付いたほこりを拭き取ります。さらにきれいにしたい場合は、水または 70% エタノールで濡らした布で丁寧に拭きます。清掃するときは、電源ケーブルをリーダーユニットから抜いておいてください。



システムの移動時にはねじ（ハイライト部分）でステージが固定されています。

装置を動かすときは、必ず付属のねじまたはプラグでリーダーユニットのステージを固定して、リーダーに重大な損傷を与えないようにしてください。



プリンタケーブル



両端が同じ Isel ステージケーブル

リーダーシステムに Isel カードステージを取り付けるときは、ステージドライブケーブルとプリンタケーブルを間違えないようにしてください。マザーボードまたは Isel カードが損傷するおそれがあります。ステージドライブケーブルはプリンタケーブルに似ていますが、両端に同じプラグが付いています。プリンタケーブルは両端のプラグが異なります。詳しくは AID の技術サポートまでお問い合わせください。

1.4.2 ネオンリング照明（電球）の交換

ネオンリング照明の交換時期は、使用開始後約 2 年です。六角レンチ、ねじ回し、新品のネオンリング照明を準備します。



ツール



交換用ネオンリング照明

リーダーユニットの電源を抜きます。電源が間違いなく切断されていることを確認してください。リーダーユニットから電源を切断したら、フードを固定している 3 本の六角ねじを取り外します。



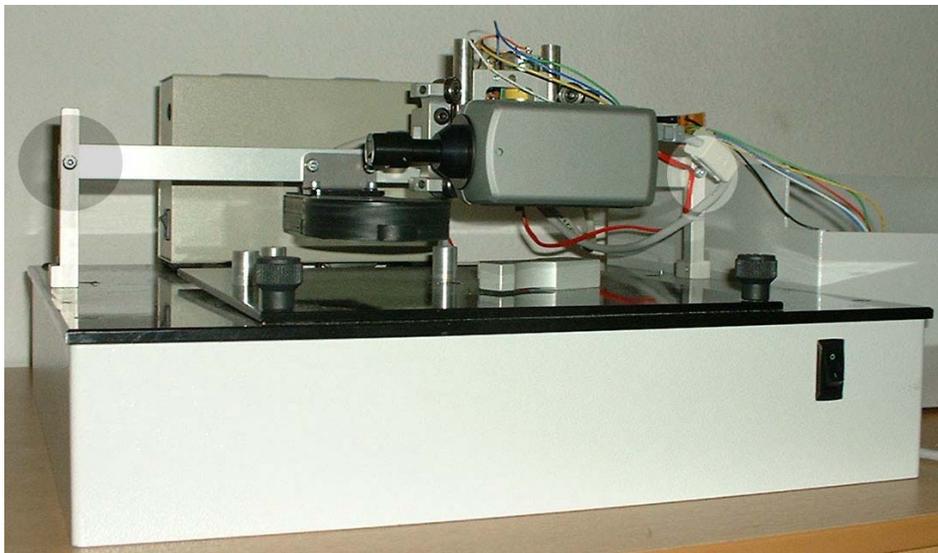
六角レンチでフードを開けます（矢印）。

リーダーユニット本体に繋がるフォーカススイッチのケーブルを引き抜かないよう注意しながら、慎重にフードを持ち上げます。



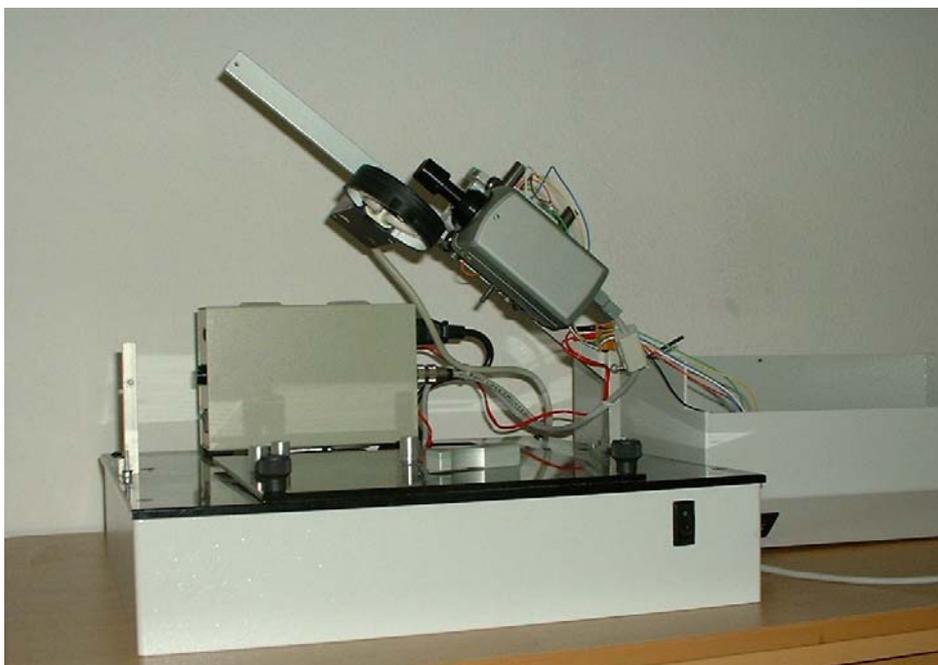
ケーブルを切断しないように注意します（ハイライト部分）。

カメラと照明ユニットは、両端に立っている垂直な支持棒の上に横たわる細長い金属板で支えられています。リーダーユニットに向かって左側の金属板の固定ねじを取り外し、次に右側の金属板の固定ねじを緩めます。



カメラ/照明ユニットを固定している 2 つのねじ (ハイライト部分)。六角レンチで緩めることができます。

金属板を 45° の角度に持ち上げ、ねじを締めます。リング照明の位置を確認します。



この位置でネオンリング照明を取り外すことができます。

ネオンリング照明を固定しているクリップを開き、照明を取り外します。交換用照明を取り付けます。ネオンリング照明は素手で触れないようにしてください。



ネオンリング照明のカバーを持ち上げて外します。

金属板を固定している右側のねじをもう一度緩めます。次に左側の金属板の固定ねじを取り付け、両方のねじを締めます。フードを元の位置に取り付け、フードを固定していたねじをすべて戻します。六角レンチで締めるのは、必ずすべてのねじを取り付けてからにしてください。電源に接続し、スイッチを入れ、そのまま 30 分以上放置します。必要な場合は、ステージの再キャリブレーションを行います。

1.4.3 ヒューズの交換

時折、リーダー背面のヒューズの交換が必要な場合があります。リーダーユニットから電源を切断します。リーダーユニットのソケットアセンブリに、ねじ回しで開けることができる小さなヒューズコンパートメントがあります。必要な場合は新しいヒューズと交換してください。AID に連絡して、ヒューズが飛んだ原因が技術的な問題ではないことを確認してください。リーダーユニット内部には、AID のサービス担当者しか触ることができないヒューズがもういくつかあります。



ヒューズアセンブリ



旧モデルにはこのヒューズコンパートメントがありません。

1.5.1 ミリメートル当たりのピクセル数

1 スポットの描写に使用されるピクセル数を知っておくことは重要です。電子画像は個々のピクセル（画素）で構成されます。ピクセルの色はそれぞれ独自の色ですが、大きさは均一です。高解像度の画像—画像 1 枚あたりのピクセル数が多い—では、スポットのより正確な認識、計算を行うことができますが、画像ファイルのサイズが大きくなり、画像分析時間も長くなります。低解像度の画像ではより高速な処理ができ、ハードディスクまたはその他のメディアへの保存サイズが小さくて済みます。

リーダーの画像に描写されるウェルのサイズを決定するために、AID マスタープレート、ルーラーまたはグレード付きペーパーのようなグレードの付いた製品を使用することができます。 写真を選択し（プレートドキュメントフォルダを保存し、フォルダから Windows Explorer で画像を取り出します）、Adobe Photoshop などの画像編集ソフトウェアにロードします。画像から規定した部分（例：ウェルの直径、ルーラーの 1 mm）のみを切り取ります。画像サイズをピクセル単位で決定します。

ピクセルとミリメートルの比率を決定するパラメータはいくつかあります。一番大きく影響するのはカメラの解像度です。カメラの CCD チップは、カメラが生成できる最大ピクセル数を決定します。AID EliSpot リーダーは、各種の CCD チップを用いたさまざまなカメラを使用しています。カメラについては専用のマニュアルを参照してください。ビデオカメラに使用されている光学部品は通常、CCD チップのサイズ（例：1/3 インチ）と光学部品と観察対象（EliSpot プレート）との間に必要な距離とで定義されます。したがって、光学部品が CCD チップに反映されるウェルのミリメートル数を決定します。

フォーカスにも役割があります。すべての AID リーダーは深い焦点深度を備えているので、膜面が理想的な焦点面より少し上または下にずれていても、焦点の合った画像としてスポットが表示されます。ただ

し、光学部品とウェルの距離はウェルの見掛け上のサイズに影響しますのでご注意ください。



アンダーフォーカス フォーカス オーバーフォーカス

次に画像を EliSpot ソフトウェアで切り取ります。たいていのチップは長方形の画像サイズを備えていますが、EliSpot のウェルは円形なので、必要となるのはほぼ正方形の画像です。

AID EliSpot リーダーシステムの現行モデルに採用されている Sony のカメラでは、チップ位置を調整することが可能です。AID では通常、直径 5~10 mm のウェル全体が表示されるようにチップを調整します。つまり、一般的に使用される 5~6 mm のウェルは、画像全体に表示されません。このような種類のプレートしか使用しない場合は、これらのプレート用にカメラを調整するよう当社担当者にお申し付けください。カメラの CCD 位置の調整は、リーダーユニットのフードを取り外し、カメラ側面の小さなねじを調節して行います。

1.6 安全注意事項

作業は、本マニュアルの該当項目を読んでから開始してください。マニュアルの内容をよく理解していない、あるいは当社担当者による適切な訓練を受けていない場合に、良い結果を得ることは難しいでしょう。不適切な使用により、システムに損傷を与えてしまうおそれもあります。

AID EliSpot リーダーシステムは慎重に取り扱ってください。高電圧部品が含まれているため、危険な場合があります。湿気や高温は避けてください。システムの操作は室温環境で行われることをお勧めします。AID の書面による許可がある場合を除き、いかなる部品も修理しないでください。システムの移動やセットアップを行うときは、必ずマニュアルを参照してください。装置を動かすときは、必ず付属のねじまたはプラグでリーダーユニットのステージを固定して、リーダーに重大な損傷を与えないようにしてください。

AID または最寄りの販売代理店に確認せずにソフトウェアをインストールしたり、Windows アップデート/パッチを適用したりしないでください。

AID EliSpot リーダーシステムにはいくつかのハンドブックや技術文書が付属しています。プリンタ、モニタ、コンピュータあるいはそれらの部品に関する文書です。システム付属のハンドブックはすべて、本書の一部として適宜参照していただく必要があります。旧システムをお持ちの場合は、参照できるよう以前のハンドブックも必ず保管しておいてください。

1.7 リーダーに標準添付されない製品

1.7.1 EliSpot プレートおよび試薬

AID EliSpot アッセイキットは AID および AID 販売代理店から購入していただけます。しかし、AID EliSpot リーダーシステム/HR はほとんどのアッセイキットを読み取ることができます。www.elispot.com に AID AliSpot アッセイキットの一覧が掲載されています。

1.7.2 コンピュータメディア

お使いのシステムの構成に応じてフロッピー、ZIP、MO ディスクまたは CD-ROM の購入が必要な場合があります。また、プリンタ用の A4 用紙、また交換用のインクカートリッジが必要です。詳しくはプリンタのマニュアルを参照してください。

1.7.3 AID マスタープレート

AID はご希望に応じてマスタープレートを提供しています。マスタープレートは、リーダーシステムの性能を試験するために設計された人工の EliSpot プレートです。単純なシステムチェックから、より複雑な「障害コース」まで、当社の開発に使用したリーダー用の各種の変異体が含まれています。

マスタープレートを使用するときは、ユーザーを作成してプレートを読み取り、カウントして、その結果をプレート付属の文書と比較します。

1.7.4 AID 付属部品、アップグレードまたは交換用部品

応急処置キット TH1

ハードディスクおよびソフトウェアインストール

ネオンリング照明

ヒューズ

テクニカルマニュアル（本ハンドブックにも収載）

アップグレード／交換用コンピュータ／コントロールユニット P3A

Pentium III、256 または 512 MB RAM

CD ROM ライタまたは MO ドライブ

グラバカード、Isel ステージモーターコントロール

ネットワークカード

アップグレード／交換用コンピュータ／コントロールユニット P3B

Pentium III、256 または 512 MB RAM

CD ROM ライタ

FireWire ホストアダプタ、Isel ステージモーターコントロール

ネットワークカード

アップグレード／交換用コンピュータ／コントロールユニット P4A

Pentium IV、512 MB RAM

CD ROM ライタ

FireWire ホストアダプタ、QuadPack ステージ用シリアルポート

ネットワークカード

アップグレード／交換用コンピュータ／コントロールユニット（HR または ViruSpot） P4B

Pentium IV、1 GB RAM

CD ROM ライタ

FireWire ホストアダプタ

ネットワークカード

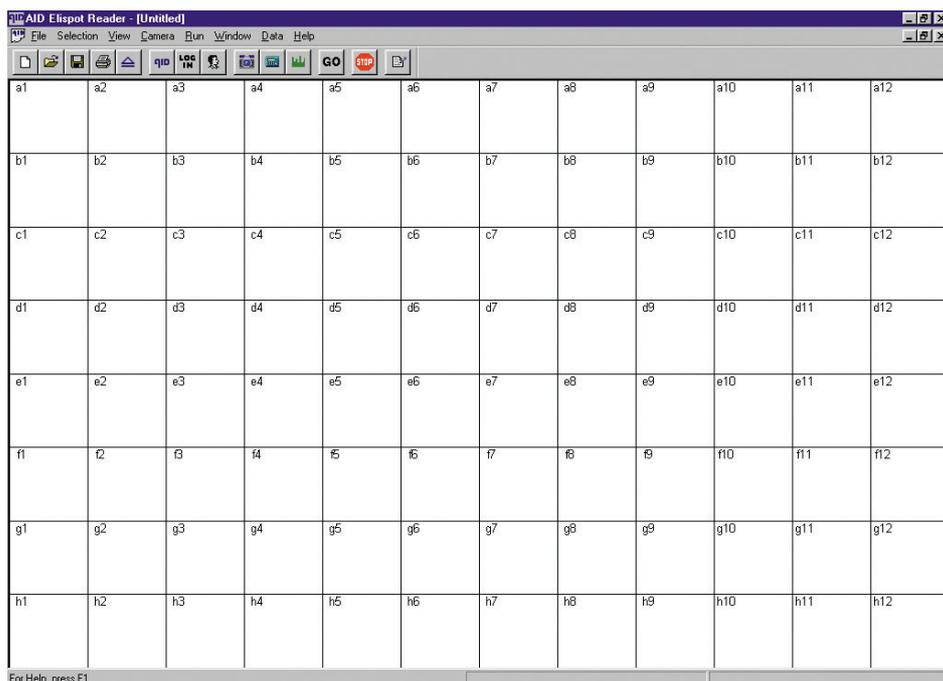
無停電電源装置（UPS） UPS02

変圧器 T1

110 V~220 V

第 2 章 各部の詳細

AID EliSpot ソフトウェア V 3.1 の機能は、すべてプルダウンメニューまたはポップアップメニューで表示されます。よく使う機能はツールバーのアイコンにも表示されます。ツールバーはプレート全体表示のときと、1 ウェル表示のときとで内容が異なりますのでご注意ください。以下の節で、プルダウンメニューの機能を順に説明していきます。



2.1 [File] メニュー

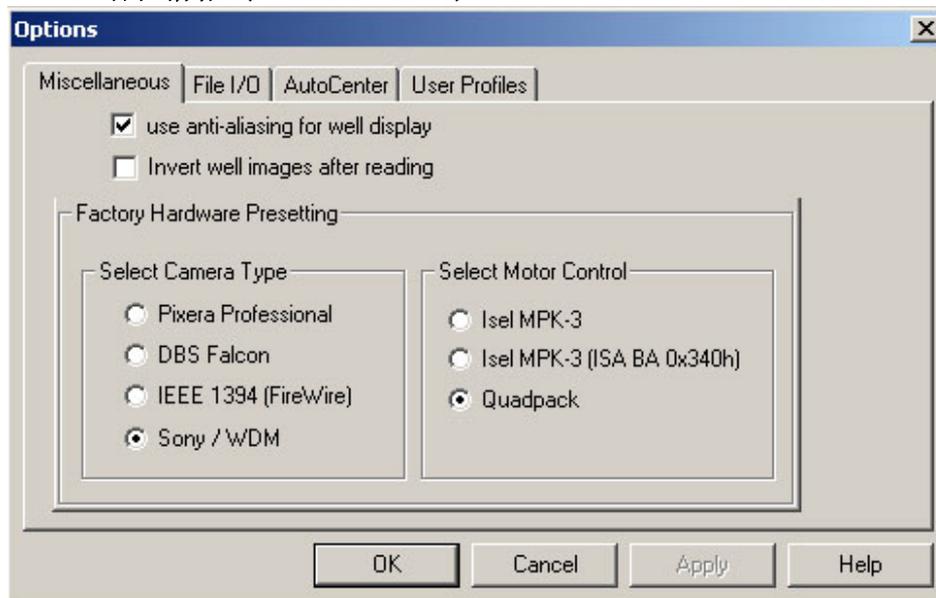


プレートの作成、ロード、保存、印刷といった一般機能は [File] メニューに表示されます。メニューにはさらに、システムセットアップとデータ処理を行ういくつかの特別な機能が含まれます。これらの機能については、以下の節で詳しく説明します。

2.1.1 オプション

[Options] ダイアログボックスで、システムの一般調整、システムユーザーの管理を行うことができます。

2.1.1.1 各種情報 (Miscellaneous)



Invert well images after reading

有効にしてください。この機能はウェル底面が透明な EliSpot プレートを使用しているときに有効です。通常、AID EliSpot ソフトウェアは白色の背景に暗い色のスポットを想定しています。しかし底面が透明な EliSpot プレート (ELISA プレート) では、暗い背景に明るいスポットになります。標準の EliSpot プレートに白い膜が付いたプレートを使用するときは、この機能を無効にしてください。

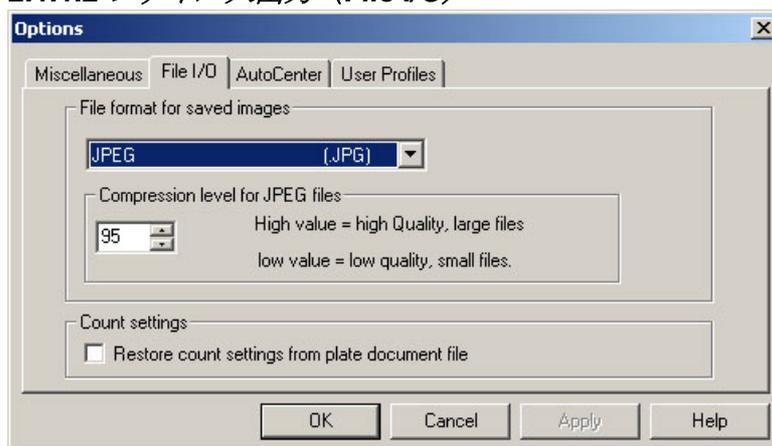
Factory Hardware Presetting

カメラの種類やステージモーターコントロールの種類などのハードウェア設定を指定します。このダイアログボックスは通常はロックされているため、設定は変更できません。これらの設定はご使用のハードウェアにしたがって行われていなければならない、ダイアログの設定が誤っている場合、システムは動作しません。

Use anti-aliasing for well display

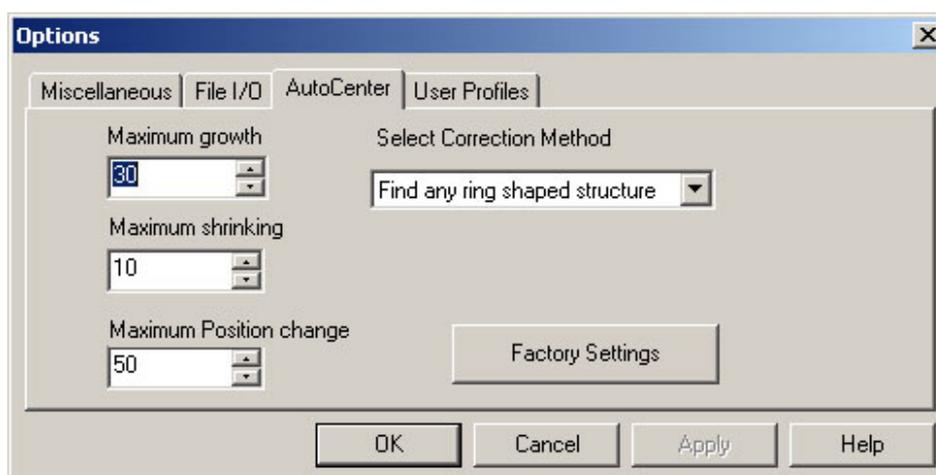
この機能を選択してアンチエイリアス処理を使用すると、ウェルの表示品質が向上します。

2.1.1.2 ファイル入出力 (File I/O)



[File format for saved images] でウェル画像の保存形式を選択します。JPEG、TIFF、Windows ビットマップ形式が選択可能です。初期設定では小さいサイズで高画質のウェル画像を提供できる、JPEG 形式が選択されています。また [Compression level for JPEG files] で JPEG ファイルの圧縮レベルを変更できます。設定値が高いほど画像は高画質になり、サイズが大きくなります。初期設定値 95 では、スポット数にもよりますが、1 ウェルの画像 1 枚が約 50~60 KB になります。この条件でプレート全体を保存した場合、サイズが約 5~6 MB になります。プレートと一緒にカウント設定を保存したい場合は、[Count settings] 機能を有効にします。この機能は AID ソフトウェアのユーザー管理機能を使用していない場合に特に有効で、保存済みのプレートに初期設定されている最新のカウント設定を復元できます。使用しているカウント設定はプレート履歴画面にも表示されるため、文書作成のためにこの機能を使う必要はありません。[File I/O] ダイアログボックスは、管理者権限を持つユーザーがログインしたときにしか表示されませんので、ご注意ください。

2.1.1.3 オートセンター (AutoCenter)



EliSpot アッセイに使用するマイクロタイタープレートの製造には一定の許容誤差が認められており、また許容誤差はスキャンステージによってもいくらか増加します。正確にキャリブレーションされるのはプレートコーナーのウェル (A1、A12、H12) のみで、その間のウェルの座標は補間されるため、上記のような許容誤差が原因でウェルのなかに「ずれている」ように見えるものが出てくる可能性があります。オートセンター機能はこの位置ずれを補正する機能です。最適な設定は AID により提供されています。オートセンター機能は [Calibrate Stage] メニューで選択/選択解除できます。

注記：[Run] メニューからデータを読み取った後でオートセンター機能を実行することもできます。

Maximum growth

この機能は、カウント領域（関心領域、AOI）を編集するもので、選択されたカウント領域が小さすぎるときに使用します。見掛け上のウェルサイズを予想より小さくするために EliSpot プレートを曲げたときにこのようなことが起こる可能性があります。初期設定値は 30% です。

Maximum shrinking

この機能は、カウント領域（関心領域、AOI）を編集するもので、選択されたカウント領域が大きすぎるときに使用します。見掛け上のウェルサイズを予想より大きくするために EliSpot プレートを曲げたときにこのようなことが起こる可能性があります。初期設定値は 10% です。

Maximum position change

この機能は、ステージキャリブレーション時に AOI が予想される位置にない場合に、検索領域を定義します。初期設定値は 50% です。

Select Correction Method

プレートの種類に応じてさまざまな補正方法を使い分けることが有効な場合があります。初期設定では「Find any ring shaped structure」が選択されています。

Factory Settings

AID 設定をオートセンター機能向けに戻します。

[AutoCenter] ダイアログボックスは、プログラムに管理者権限でログインしているときにしか表示されません。

2.1.1.4 ユーザー管理 (User Profiles)

( ボタンでも使用可能)

AID EliSpot ソフトウェアは、ユーザー管理機能を備えています。これにより、各ユーザーはそれぞれ独自の設定でシステムを使用できます。以下のデータをユーザーごとに設定できます。

- カウント設定
- カメラ設定 (Sony/WDM カメラ搭載システムのみ*)
- ステージキャリブレーション
- 表示オプション

*注記：お使いのカメラ（ドライバ）を確認するには、[Option] → [Miscellaneous] を選択します。[Factory Hardware Presetting] ダイアログボックスでシステム設定を確認できます。

Create new User

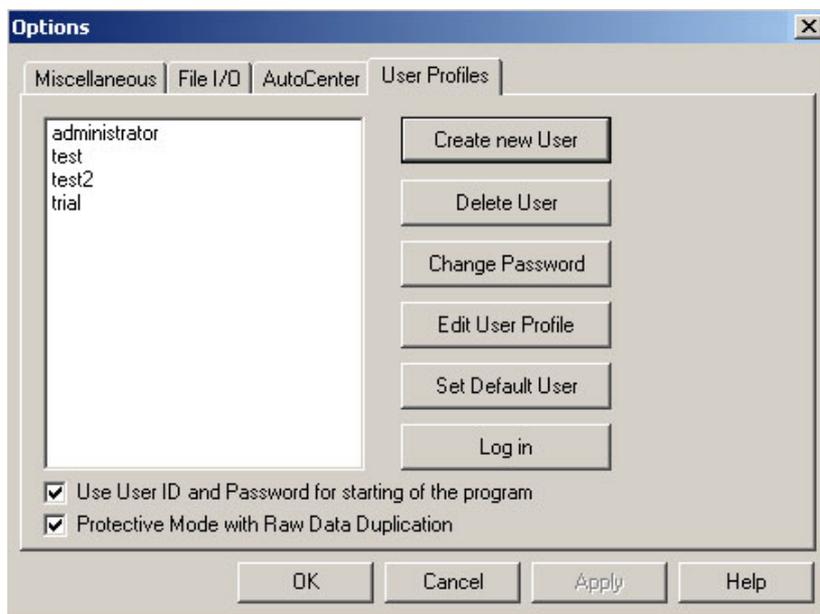
新しいユーザーを作成する場合は、ログオンユーザーが [Create new User] ボタンを選択し、ダイアログボックスに新しいユーザーのユーザー名とパスワード（オプション）を入力します。新しいユーザーがユ

ユーザーリストに追加されます。初期設定では、新しいユーザーのソフトウェアの操作権限は制限されており、設定を変更することはできません。

各機能へのフルアクセスを実現するには、管理者権限が必要です。管理者権限を持つユーザーだけが、ほかのユーザーに管理者権限を付与できます。管理者ユーザーがログインしてユーザーリストから新しいユーザーをクリックして選択し、ユーザープロファイルを編集すれば、新しいユーザーにすべての設定を変更する権限を付与できます。

新しいユーザーのソフトウェア操作の権限を制限するかどうかは、管理者権限を有するユーザーが決定します。新しいユーザーに許可する操作は、対応するオプションボックスをクリックして選択します（下図を参照）。

ソフトウェアのバージョンによってはあと 2 つ余分にチェックボックスがある場合があります。[Protected mode for clinical trials] と [Log-in on start-up] です。



Delete User

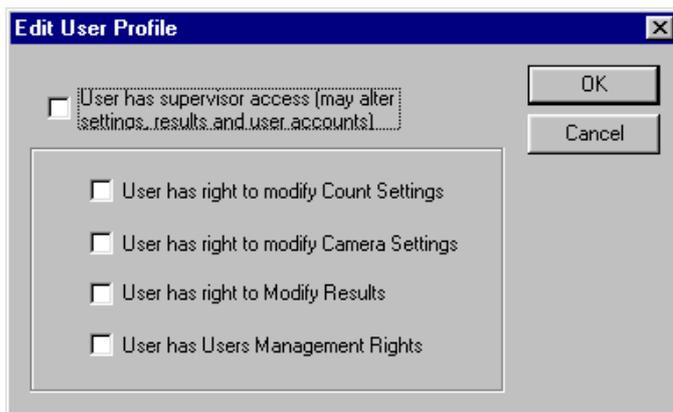
管理者権限を有するアクティブユーザーは、ほかのユーザーを削除することができます。安全のために、ソフトウェアが削除を確認するダイアログボックスを表示します。

Change Password

ユーザーは自身のパスワードを変更することができます。パスワードを変更するには、ログインして旧パスワードを入力する必要があります。どのユーザーも、ほかのユーザーのパスワードを変更することはできません。

Edit User Profile

管理者権限を有するユーザーには、ほかのユーザーのユーザープロファイルを変更する権限があります。ただし、自身のプロファイルは変更できませんので、ご注意ください。



Set Default User

管理者権限を有するユーザーは、デフォルトユーザーを選択できます。デフォルトユーザーは、プログラムの起動時に自動ログインされるユーザーです。デフォルトユーザーは、パスワードなしでプログラムの使用を開始することができます。

ユーザーログイン

ユーザーログインにはいくつかの方法があります。[User Manager] ダイアログボックスのユーザーリストから自分の名前を選択して、[Log in]

を押すか、ツールバーのボタンをクリックしてログインすることができます。いずれの場合でも、ソフトウェアは現在のユーザーのログオフを行い、新しいユーザーをログインさせます。ここでパスワードの入力が求められる場合もあります。

ユーザーはそれぞれ独自のカウント設定、キャリブレーション設定、および（システムにより異なりますが）カメラ設定を持っています。

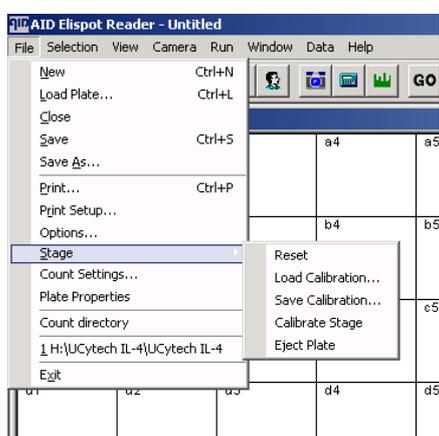
ソフトウェアへのログインのパスワード保護

ソフトウェアへのログインをパスワードで保護することができます。パスワード保護する場合は、[Use User ID and Password for starting of the program] ボックスを選択します。



2.1.2 ステージ

[File] メニューの [Stage] の上にマウスを置くと、EliSpot リーダーのステージ操作に関するすべてのオプションを表示したサブメニューが表示されます。



2.1.2.1 ステージのリセット (Reset)

リセット機能で、ステージをリセットすることができます。カウントステージが右上に移動します。移動には数秒かかります。通常はソフトウェアが自動的にステージリセットを始動するため、この機能は必要ありません。しかしステージの動作異常時など、この機能が有効な場合があります。

2.1.2.2 ステージのキャリブレーション (Calibrate Stage)

ステージキャリブレーションを行うダイアログボックスは 3.2.1 節で詳しく説明します。

2.1.2.3 キャリブレーションのロード (Load Calibration)

何らかの理由で初期設定のキャリブレーションファイル「stage.ini」を使用したくない場合は、別のキャリブレーションファイルをロードすることができます。キャリブレーションファイルは通常、ユーザー独自のものですが、ファイルを移動してほかのユーザーのデータをインポートすることもできます。

2.1.2.4 キャリブレーションの保存 (Save Calibration)

キャリブレーションファイルは通常、[Calibrate Stage] ダイアログボックスから直接保存できます。しかし、[File] メニューからファイルを保存することも可能です。

2.1.2.5 プレートの取り出し (Eject Plate)

( ボタンでも使用可能)

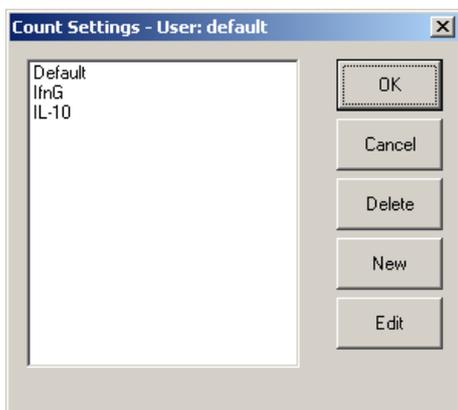
[Eject Plate] を選択すると、ステージがユーザーの手前に移動し、簡単にプレートを交換できます。[Eject Plate] を再クリックすると、ステージが反対方向に移動します。また、次のプレートの読み取り時にはステージリセットを始動させます。

2.1.3 カウント設定

( ボタンでも使用可能)

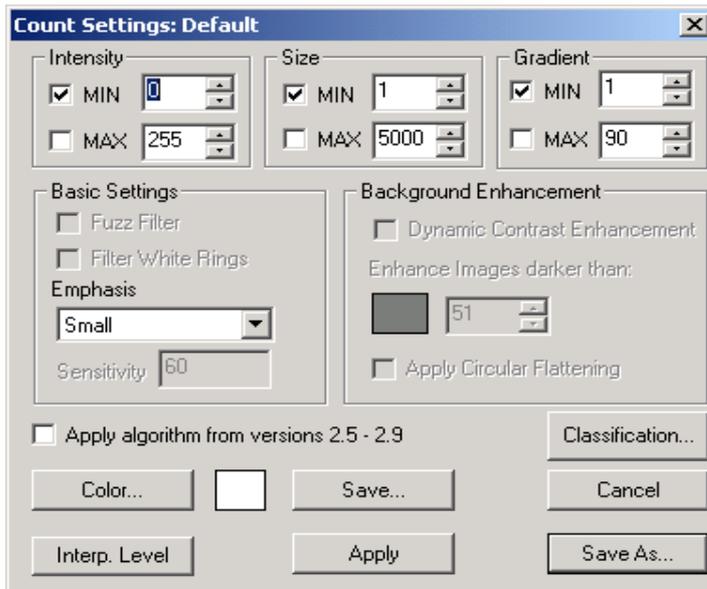
EliSpot アッセイにはさまざまな種類があり、2 つの研究室で行った場合、同じ種類の試験であってもそれぞれのプレートのスポットの特徴

が一致することはほとんどありません。したがって、設定をあらかじめ定義しておいて、その設定を EliSpot アッセイの解釈時に使用する必要があります。これは [Count Settings] ダイアログボックスで行うことができます。ここでは、設定の作成、編集、削除、および希望する名前での設定の保存ができます。



新しい設定を作成するには、[New] ボタンを押します。既存の設定から設定を作成することもできます。その場合は、リストからソース設定を指定してから [New] ボタンをクリックします。まず、新しい設定に名前を付けるよう要求されます。名前を入力すると、リストボックスに新しい設定が表示されます（ダイアログボックスを一旦閉じてから開かないと表示されない場合があります）。リストから特定の設定を選択しなかった場合は、新しい設定のソースには初期設定が使用されます。

[Edit] ボタンで新しいステージ設定を編集することができます。ダイアログボックスに変更を入力し、[Save] ボタンを押します。



このダイアログボックスは、EliSpot ソフトウェアで最も重要なダイアログボックスです。ここでデータを解釈するための基本設定のすべてを選択、操作できます。調整はスポットのサイズ (size)、輝度 (intensity)、勾配 (gradient) について行うことができます。スポットの最小値、最大値を入力します。[MIN] を有効にすると、選択値以上の輝度、サイズ、または勾配のスポットがすべてカウントされます。[MAX] を有効にすると、選択値未満のスポットがすべてカウントされます。[MIN] と [MAX] を使用して、スポットとしてカウントする対象物の範囲を定義します。

変更を永久的に保存するには、[Save...] を押します。元の設定を変更せずに、現在表示されている設定で新しい設定を作成するには、[Save As...] を押します。[Apply] は、[Emphasis] を変更したときにのみ押します (再カウントが行われます)。カットオフ値を変更した場合は、[Apply] を押す必要はありません。

2.1.3.1.1 輝度の最小値／最大値 (Intensity)

カウントするスポットの輝度 (暗さ) のしきい値を設定します。カウントされるスポットは、そのピークの輝度と周囲の背景との間に差がなければなりません。スポットの輝度は、背景に対する相対的な明度の単位で測定されます。明度の範囲は 0 (白) ~255 (黒) です。IFN γ

アッセイの場合、開始値は 20～25 前後が適当ですが、設定値はアッセイの種類やユーザーの選択に大きく左右されます。

2.1.3.1.2 サイズの最小値／最大値 (Size)

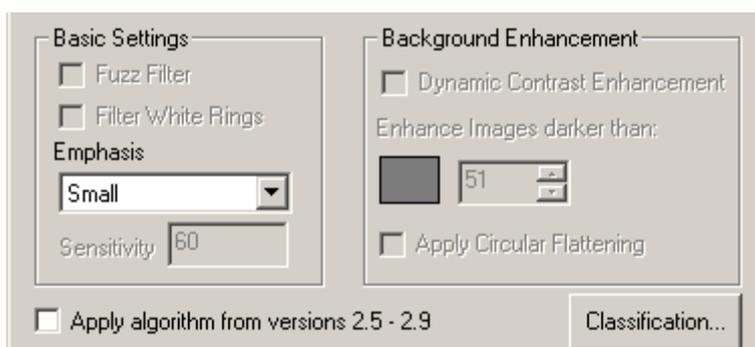
スポットとして認識するのに必要な対象物の最小サイズをピクセルで設定します。この値よりも小さな対象物はスポットとみなされません。設定値の範囲は 1～1000 です。IFN γ アッセイの場合は、開始値は 50 前後が適当です。しかし、サイズに関しては個々の設定がアッセイの種類やユーザーの選択に左右されることはほとんどありません。

1 スポットのサイズは、 $1/100 \text{ mm}^2$ (0.01 mm^2) 単位で計算されます。1 mm^2 は $10,000 \times 1/100 \text{ mm}^2$ と同じです。これらは近似値であって、補正しなければならない場合がありますのでご注意ください (1.5 節を参照)。

2.1.3.1.3 勾配の最小値／最大値 (Gradient)

勾配の機能も、スポットを特徴づけるためのパラメータです。正しい EliSpot の輝度はほぼガウス分布にしたがったものとなり、スポット中心で輝度が最大になり、端に向かうにつれ減少していきます。勾配値は背景輝度に対する最大輝度のタンジェントにより規定される角度 ($0^\circ \sim 90^\circ$) で表されます。勾配値が高いほどスポット中心と端の輝度差が大きくなります。

選択値以上のスポットをすべてカウントしたい場合は、[MIN] を有効にします。初期設定では [MIN] が選択されています。選択値未満のスポットをカウントしたい場合は、[MAX] を有効にします。スポットのカウント対象範囲は [MIN] と [MAX] で定義します。



2.1.3.1.4 基本設定 (Basic Settings)

AID EliSpot ソフトウェア 3.0 のリリース以後は、[Basic Settings] のダイアログ部分は [Emphasis] 機能のみで構成されています。ユーザーはここでスポットが IL-10 産生細胞のように非常に小さいのか、B 細胞のように非常に大きいのかを定義できます。選択範囲は小さい順から「Tiny」「Small」「Big」「Huge」です。どの設定が適切かは、試験の種類により異なります。開始時の推奨設定は「Small」です。バージョン 3.0 で採用されている新しいアルゴリズムからは、背景の強調が不要になりました。

旧バージョンのアルゴリズムで計算を行いたい場合は、[Apply algorithm from versions 2.5-2.9] を有効にします。有効にすると、[Fuzz Filter]、[Filter White Rings] (常に OFF を推奨) および [Background Enhancement] が使用可能になります。AID はこれらの旧アルゴリズムの使用を推奨しませんので、これらのバージョンはサポートの対象外になります。しかし、長期間にわたる研究など、新しいソフトウェアの機能を利用しながら、過去のアルゴリズムを使い続けたい場合もあります。

2.1.3.1.5 分類 (Classification...)

分析に利用する機能です。さまざまな基準にもとづいてスポットを分類することができます。分類機能は「二色法」での評価 (例: スポットを赤と青で分類する) などを可能にします。また、サイズ (スポットの大小) や、その他希望に応じた基準による分類が可能です。

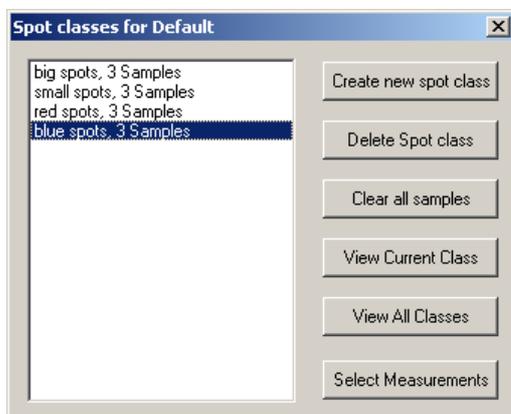
この機能を使用するには、まずスポットクラスを作成しなければなりません。スポットクラスの作成は、[Create New Spot Class] フィールドで行います。クラス名を入力するダイアログボックスが表示されます。新しいスポットクラスがダイアログボックス左側のリストボックスに表示されます。スポットクラスの特徴を確定するには、[Select Measurement] ボタンをクリックします。ダイアログボックスが表示され、スポットの選択基準の重みを変更できるようになります。ソフトウェア

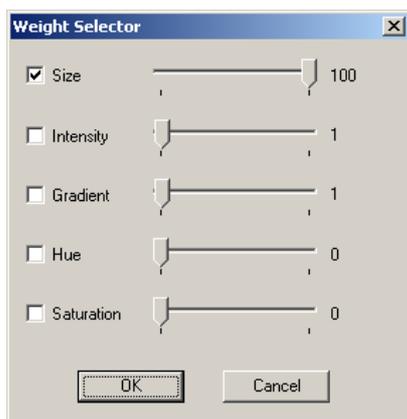
にはスポットをどの基準でクラスに分類するかの優先順位があらかじめ設定されています。たとえば、二色法による試験では、勾配よりも色や輝度にもとづいてスポットの特徴を決定することが重要です。サイズの異なる 2 つのスポットクラスを作成したい場合は、図のように [Size] を有効にして、[Weight Selector] を 100% にします。

クラスの設定が終了したら、スポットクラスの [Dialog] フィールドでスポットクラスをマークして希望するウェルを開き、プレート上にあるそのクラスの代表的な（ウェル内の）スポットをクリックします。ソフトウェアがスポットのカウントを実行し、特徴を「学習」します。[Clear all samples] ボタンを押すと、スポットクラスは残したまま、スポットクラスの例が削除されます。スポットクラスを削除するには、[Delete Spot class] ボタンを使用します。

ウェル内で特徴を指定したスポットのみを表示するには、[View Current Class] ボタンを押します。選択したクラスのスポットのみにクロスマークが表示されます。もう一度すべてのクラスを表示するには、[View All Classes] ボタンを押します。1 ウェルレイアウト内の情報リストにスポット分類結果が表示されます。

重要：分類試験を終了するときには、必ず [View All Classes] ボタンを選択してください。この機能を一度選択すると、もう一度選択するまでは現在のクラスのみが表示され続けます。





2.1.4 ディレクトリからのカウント

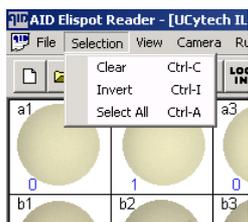
[Count directory] サブメニューで、ハードディスクに保存されているプレートを再カウントすることができます。ユーザーはプレートフォルダを保存しているハードディスク上のフォルダの位置を指定し、プレートの再カウントを行うフォルダを選択するよう要求されます。ソフトウェアが自動的にプレートデータをロードし、選択した設定でプレートの再カウントを行い、新しいプレートデータを選択したフォルダに保存します。この機能は、カウント設定を変更したために大量のプレートの再分析が必要な場合に便利です。

2.1.5 プレートのプロパティ

[Plate Properties] メニューでダイアログで、プレートに説明を入力することができます。プレートの種類や抗生物質など、数年後このプレートの結果を開いたときに役立つような情報を何でも記入してください。短いコメントを準備しておいて、フィールドにコピー&ペーストすることもできます。入力したプレートのプロパティは、Excel シートや data.txt にもエクスポートされます。

このダイアログで、履歴ファイルを開くことができます。履歴ファイルは操作中に自動作成されるファイルで、プレートに対して行った操作、適用した設定などの詳細が記録されます。ユーザーがこのファイルを編集することはできません。

2.2 [Selection] メニュー



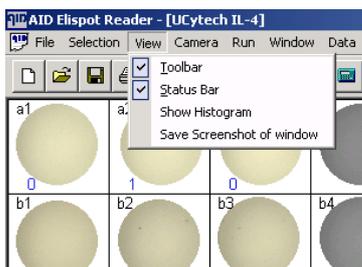
このメニューで個別のウェルについて作業するか、ウェルのグループについて作業するかを選択することができます。複数のウェルをマーキングして（左マウスボタンをクリックし、ボタンを押したままウェルの上を移動します）、プレートの一部を選択することができます。

Clear: 選択されたウェルをすべて削除します。

Invert: 選択を反転します。

Select All: プレートの全ウェルを選択します。

2.3 [View] メニュー



このメニューでは、ツールバー、ステータスバー、ヒストグラムの表示／非表示を切り替えることができます。またデータをプレゼンテーションに利用するために、スクリーンショットを作成する機能があり、現在のスクリーン内容を .jpg ファイルで保存することができます。

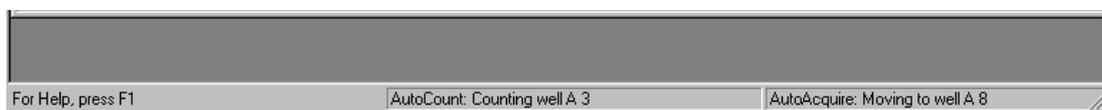
2.3.1 ツールバーの表示／非表示

[Toolbar] でツールバーの表示／非表示を選択できます。ツールバーはプログラムウインドウの一番上にあり、よく使われる機能がアイコンで表示されています。

2.3.2 ステータスバーの表示／非表示

[Status Bar] でステータスバーの表示／非表示を選択できます。ステータスバーはアプリケーションのメインウインドウの一番下にあります。ここにはアプリケーションのステータスを示すメッセージが表示されます。ステータスバーは 3 つの領域に分かれており、左側には一般的なメッセージ、右側にはステージ移動、カメラ画像の取得に関するメッセージ、中央にはカウントに関するメッセージが表示されます。[Auto Read + Count] を実行すると、画像取得状況が右側に表示され、カウントスレッドの状態が中央に表示されます。時には、カウント処理のほうが画像取得よりも長い時間を要する場合があります、その場合はすべての画像を取得してからカウントスレッドが動作することになります。これは作業領域が 512 MB 未満のコンピュータシステムをお使い

のときに特によくみられる現象です。該当する場合は、AID の担当者に連絡し、RAM のアップデートを依頼してください。

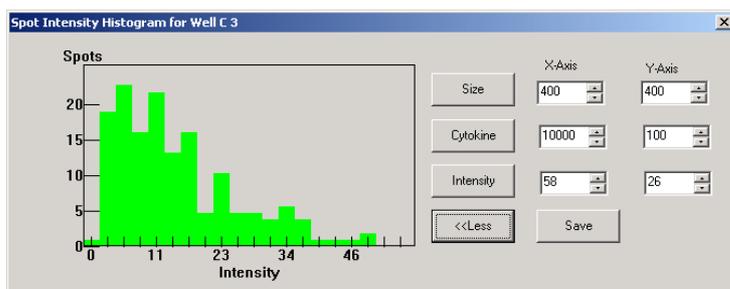


2.3.3 ヒストグラムの表示

[Show Histogram] 機能で、スポットのサイズ、輝度、サイトカイン分泌量などのさまざまな特性を表示することができます。ウェルのカウントが終わっている場合、サイズのヒストグラムは常に 1 ウェルレイアウト内の情報リストに表示されます。プレート全体レイアウトでヒストグラムを使用する場合は、希望するウェルをクリックして、どのウェルのヒストグラムを表示するのかをソフトウェアに指示します。いずれの場合にもダイアログボックスが開き、選択したウェルのヒストグラムが表示されます。

ヒストグラムダイアログボックスの表示は、ウェル表示ウィンドウを有効にしたり、プレート表示中のウェルをクリックしたりして別のウェルを選択すると変更されます。

試験の種類によってはスポットの特徴範囲が大きく異なり、ヒストグラム表示の X および Y 目盛りを調整する必要がある場合があります。このような場合は、[More] ボタンをクリックして、初期設定では表示されていないダイアログボックスの右側部分を表示します。試験に適した設定が見つかったら、[Save] ボタンを押して設定を保存することができます。

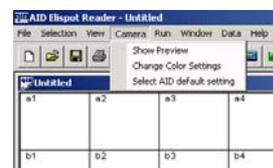


2.3.4 ウィンドウのスクリーンショット保存

[Save Screenshot of window] 機能を使って、プログラムの各段階で表示されるウィンドウのスクリーンショットを保存することができます。これはデータのプレゼンテーションに役立つ可能性があります。スクリーンショットは JPEG ファイルとして保存され、ほかのアプリケーション（例：MS PowerPoint）にエクスポートすることができます。

2.4 [Camera] メニュー（2.10 節も参照）

このメニューで各種のカメラ設定を変更することができます。ダイアログボックスの表示は、お使いの EliSpot リーダーシステムに搭載されたカメラの種類により異なります。

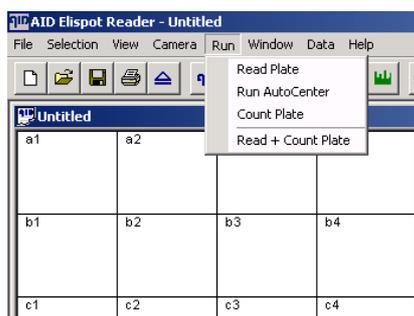


本節では、Sony カメラを使用している場合に表示されるダイアログボックスを説明します。

[Show Preview] を選択すると、カメラの現在の視野が表示されます。プレート読み取り中、カウント実行中のステージの動作をリアルタイムで観察できます。マウスを右クリックして表示されるメニューを選択すると、プレビューサイズを全体表示と半分表示の間で切り替えることができます。

[Change Color Settings] メニューで、各種のカメラ設定を変更できます。2.10 節を参照してください。

2.5 [Run] メニュー

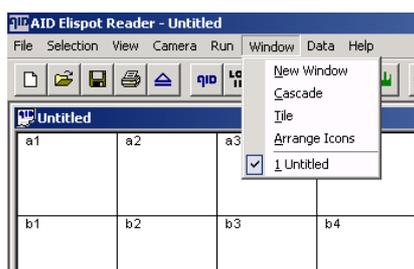


[Run] メニューにはプレート全体を読み取り、カウントする機能があります。たいていの場合、それらの処理は 1 ステップで行われますが、時にはプレートの読み取りとカウントを別々に行わなければならない場合があります。

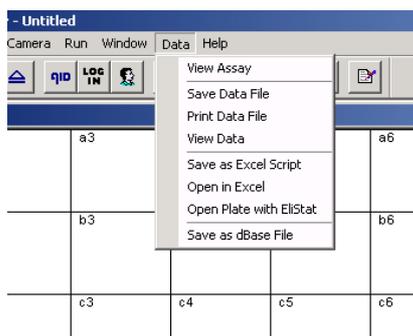
[Calibrate Stage] メニューで何らかの理由でオートセンター機能を無効にしていた場合、ここでオートセンターを実行することができます。読み取りとカウントは、ツールバーの [GO] ボタンを押せば簡単に実行できます。

2.6 [Window] メニュー

[Window] メニューには、ほかの MS Windows ベースのプログラムでお馴染みの機能がすべて揃っています。ロードされている別の EliSpot プレートに表示を切り替えることもできます。

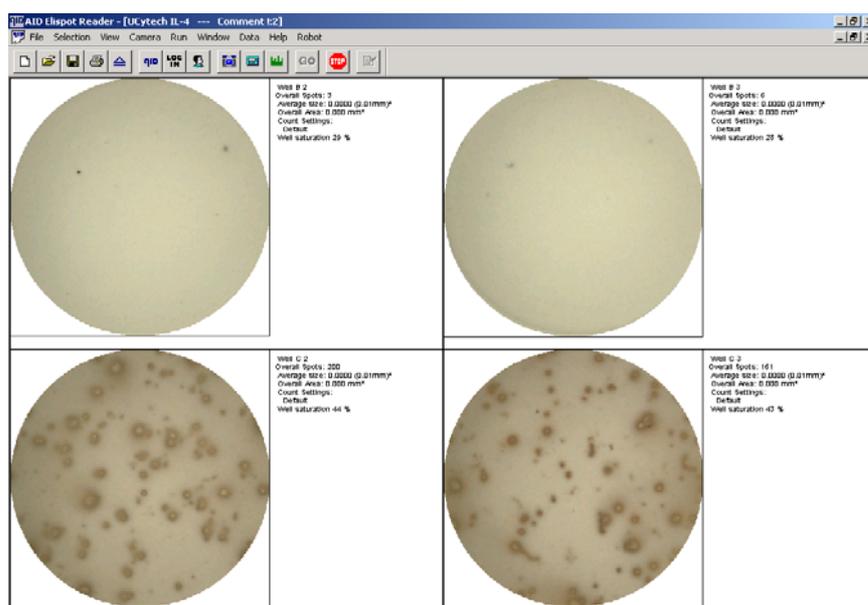


2.7 [Data] メニュー



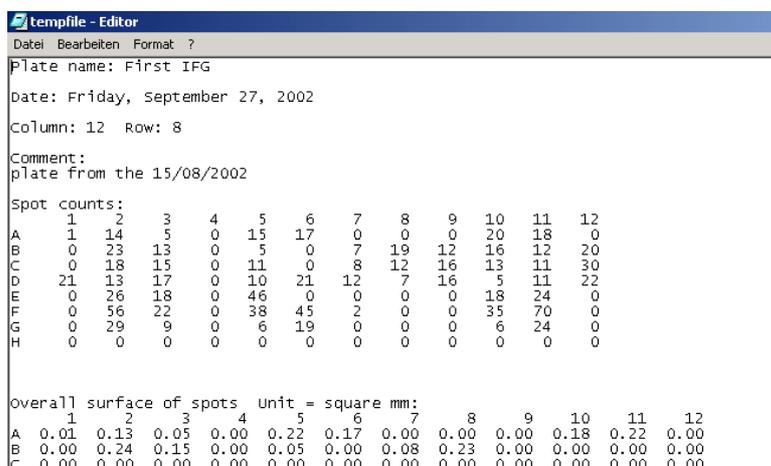
2.7.1 アッセイの表示

[Data] メニューにはデータの分析とプレゼンテーションに必要な機能がすべて揃っています。[View Assay] 機能は選択したウェルを表示するのに便利な機能です。この機能で、プレゼンテーションのために ElisSpot プレート上で実際には隣り合っていないウェルを並べて表示することができます。この機能を使うには、希望する複数のウェルをクリックして選択して、[View Assay] を選択します。選択したウェルが横に並んだ画面が表示されます。ここで、ウェルを印刷したり、ウインドウのスクリーンショットを作成してほかのアプリケーション（例：Word、PowerPoint）で使用できるように JPEG ファイル形式で保存したりすることができます。



2.7.2 データファイルの表示／保存／印刷

カウントセッション中、AID ソフトウェアはプレートに関するすべてのデータを含むテキストファイルを自動作成します。このファイルには、プレートの一般情報（例：名前、読み取り日など）に加え、スポット数、スポットの平均表面、スポットの輝度など、各ウェルに関連するデータがすべて含まれています。さらに、ウェルについて作成したコメントがある場合は、すべてこのテキストファイルに表示されます。初期設定では、このファイルは作成されたプレートフォルダ中に「data.txt」というファイル名で保存されます。ほかの名前で保存したい場合は、[Save Data File] オプションを選択します。[View Data] をクリックすると、Microsoft Editor が起動し、テキストファイルの内容が表示されます。統計プログラム EliStat を使用する場合は、data.txt ファイルをロードしてプレートの分析を進めることができます。



The screenshot shows a window titled "tempfile - Editor" with a menu bar (Datei, Bearbeiten, Format, ?). The content displays plate information: "Plate name: First IFG", "Date: Friday, September 27, 2002", "Column: 12 Row: 8", and a comment "plate from the 15/08/2002". Below this is a table of "Spot counts:" with columns 1-12 and rows A-H. At the bottom, there is a table for "overall surface of spots Unit = square mm:" with columns 1-12 and rows A-H.

Spot counts:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	14	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	0	23	13	0	5	0	7	19	12	16	12	20
C	0	18	15	0	11	0	8	12	16	13	11	30
D	21	13	17	0	10	21	12	7	16	5	11	22
E	0	26	18	0	46	0	0	0	0	18	24	0
F	0	56	22	0	38	45	2	0	0	35	70	0
G	0	29	9	0	6	19	0	0	0	6	24	0
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

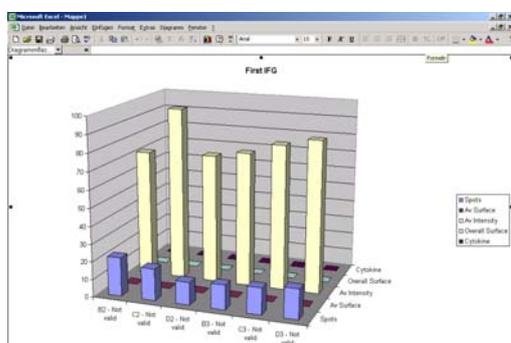
overall surface of spots Unit = square mm:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.01	0.13	0.05	0.00	0.22	0.17	0.00	0.00	0.00	0.18	0.22	0.00
B	0.00	0.24	0.15	0.00	0.05	0.00	0.08	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00
C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

2.7.3 Excel スクリプトとして保存

MS Excel マクロのプログラミングの知識のあるユーザーは、データを Excel スクリプトとして保存してマクロを作成し、Excel で分析を進めたい場合があります。これは [Save as Excel Script] 機能を使用すれば実行可能です。

2.7.4 Excel で開く

[Open in Excel] はすべての関連データを MS Excel ワークブックにエクスポートするための機能です。[Open in Excel] をクリックすると、EliSpot ソフトウェアが作成したデータが直接 Excel に転送され、EliSpot のデータにもとづいたダイアグラムが作成されます。ウェルを選択していないときは、プレート全体のデータが Excel にエクスポートされ、ウェルをクリックして選択しているときは、選択したウェルのデータのみが転送されます。この段階で、EliSpot ソフトウェアからのすべての関連データが Excel ワークシートに転送されているので、データを使用して各種の分析を行うことができます。



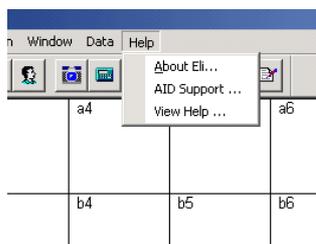
2.7.5 EliStat でプレートを開く

EliStat は MS Excel ベースのプログラムであり、EliSpot データをエクスポートすることができます。[Open in Excel] 機能と対照的に、[Open Plate with EliStat] 機能では EliSpot ソフトウェアと同じ 96 ウェルのレイアウトでデータが取得されます。EliStat で、各種の統計分析を行ったり、マスタープレート进行分析したり、プレートレイアウトを作成したりすることができます。レイアウト作成機能は、抗原や患者に対し同じレイアウトで作業をする機会が多い場合に便利です。EliStat については、2.11 節を参照してください。

2.7.6 dBase ファイルとして保存

[Save as dBase File] オプションは、MS Access のような専門のデータベースプログラムにデータを転送したい場合に便利です。EliSpot ソフトウェアは、市販されているすべてのデータベースプログラムが対応している dBase III 形式のファイルを作成します。

2.8 [Help] メニュー



このメニューでは、お使いの EliSpot ソフトウェアの情報と本マニュアルを参照することができます。

装置やソフトウェアに問題が生じた場合、AID の担当者がお使いのソフトウェアのバージョンをお伺いする場合があります。この情報は [About Eli...] メニューで確認することができます。以下のようなダイアログボックスが表示されます。



[AID Support...] をクリックすると、AID EliSpot Web サイトへの訪問を勧める以下のような情報ボックスが表示されます。Web サイトでは、AID EliSpot リーダーのユーザー登録や、新製品情報、EliSpot ソフトウェアおよび EliStat ソフトウェアのアップデート情報の入手ができます。



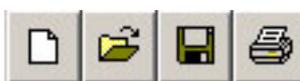
2.9 ツールバー

2.9.1 プレート全体表示のツールバー



一番左側のアイコングループは、ファイル入出力（I/O）用の標準的なアイコンです。

その次のアイコングループは、プログラムとユーザー情報にもとづくアイコンです。



左から：

文書（プレート）を新規作成します。

保存されたプレートをディスクから開きます。

プレート文書を保存します。

文書を標準設定されたプリンタまたは選択した別のプリンタで印刷します。現在表示中のウェルを1ページに印刷します。



プレートを取り出します。



プログラム情報：使用ソフトウェアの著作権、リリース日、バージョン番号などの情報を含むダイアログボックスを開きます。



ログイン：ユーザー名とパスワードを入力するダイアログボックスを開きます。



EliSpot ユーザーの管理を行います。



カメラ設定を変更できます。



カウント設定を設定します。



ヒストグラム：ヒストグラムダイアログボックスを開きます。ヒストグラムについては、ヒストグラムの節を参照してください。



GO：プレートの読み取りとカウントを行います。

最初にプレート名の入力が求められる場合があります（プロテクトモード時）。



停止：プログラムが動作を停止します。1クリック以上の操作が必要な場合があります。



プレートプロパティ：名前、コメント、履歴を表示（および編集）することができます。

2.9.2 ウェル表示のツールバー



左から：



ウェル画像を保存します。



文書を印刷：現在表示中のウェルを 1 ページに印刷します。



プログラム情報：使用ソフトウェアの著作権、リリース日、バージョン番号などの情報を含むダイアログボックスを開きます。



ログイン



ユーザー管理



カメラ設定



カウント設定



ヒストグラム：ヒストグラムダイアログボックスを開きます。ヒストグラムについては、ヒストグラムの節を参照してください。



スポット輪郭の表示：クリックすると、スポット表示モードをスポット輪郭表示に切り替えます。保存されたプレートでは使用できません。

スポット表面の表示：スポット表示モードをスポット内を塗りつぶすよう設定します。保存されたプレートでは使用できません。

クラスタ輪郭の表示：スポット表示モードをスポットのクラスタを輪郭線で囲むよう設定します。保存されたプレートでは使用できません。
クロス表示：クロスマークを表示してスポットをマークします。保存されたプレートでは使用できません。

ウェル表示における表示モード

ウェル表示では、スポットをマークするモードが3つあります。各スポットのピークに「×」マークを表示することができます。3つの輪郭オプションは、一度に1つしか選択できないオプションです。選択している表示オプションのアイコンを再クリックすると、選択が無効になって輪郭がなくなります。クロスマーク表示は輪郭オプションとは独立して有効/無効にできます。したがってどの輪郭モードでもクロスマークを表示/表示解除することができます。クロスマークや輪郭の表示色が試験結果の色と似ていて見にくい場合は、[Change Color] アイコンをクリックしてダイアログボックスを表示し、それらの色を変更することができます。クロスマークが表示されるのは、保存されたプレートを表示しているときだけです。



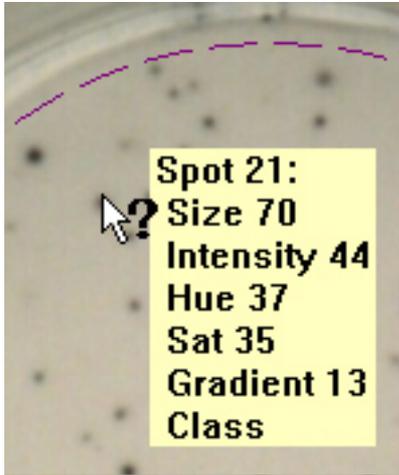
マーカー追加：ウェル画像をマウスの十字カーソルでクリックして、スポットマーカーを手動で追加できます。



スポット消去：ウェル内をクリックして、スポットマーカーを手動で消去することができます。



スポット情報：スポットの情報モードを設定します。「？」マークのマウスカーソルでスポットをクリックすると、ステータスバーにスポットのパラメータが表示されます。これは初期設定ツールです。



カウント済みのスポットには黄色のフラグ、（しきい値外にあるなどの理由で）検出済みではあるがカウントされていないスポットには赤色のフラグが表示されます。



色の変更：ダイアログボックスが開き、スポットマーカークラウドの色を変更することができます。



ウェル画像拡大：カーソルを拡大ツールに変更します。ウェル画像をクリックすると、その画像が拡大されます。拡大表示を解除するには、マウスを右クリックして [Zoom Out] を選択するか、Esc ボタンを押して、1:1 のウェル表示に戻します。

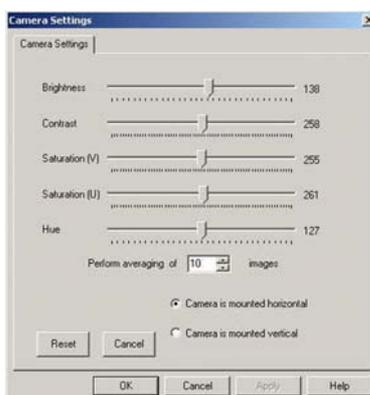


コメント：選択しているウェルに関するコメントを入力します。
コメントは `data.txt` に表示されます。これは臨床試験に便利な機能です。
編集したウェルにはコメントを入力しましょう。

2.10 カメラドライバ

注記：Sony のカメラはコンピュータ／コントロールユニットにより個別に認識されます。リーダーユニットとコンピュータ／コントロールユニットを初めて繋ぐときは、カメラドライバをインストールしなければなりません。インストール方法を記載した別のマニュアルがありますので、お問い合わせください。

2.10.1 DBS カメラドライバ



カメラを中間的なコントラストに調整します。[Saturation (V)] と [Saturation (U)] を調整して、中立的なカメラのカラーレスポンスを実現します。ELR02 には「horizontal」を、ELR01 には「vertical」を選択します。[Brightness] をプレートに合わせて調整します。[Perform averaging of XX images] には、速度を重視する場合は 6～12 枚の画像、良質の生データ取得を重視する場合は 12～24 枚の画像をお勧めします。

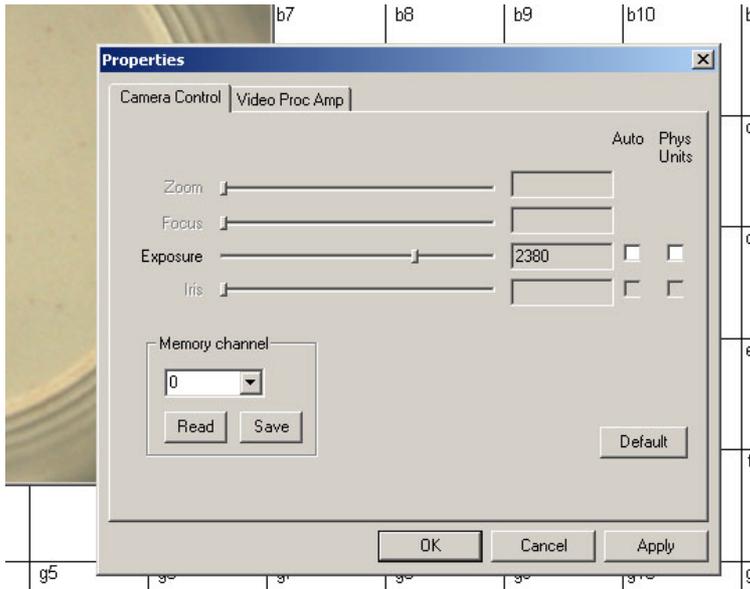


このダイアログは、[File] メニューからも開くことができます。

2.10.2 FireWire カメラドライバ

Sony ドライバと同じですが、ダイアログは 1 つにまとめられています。

2.10.3 Sony カメラドライバ

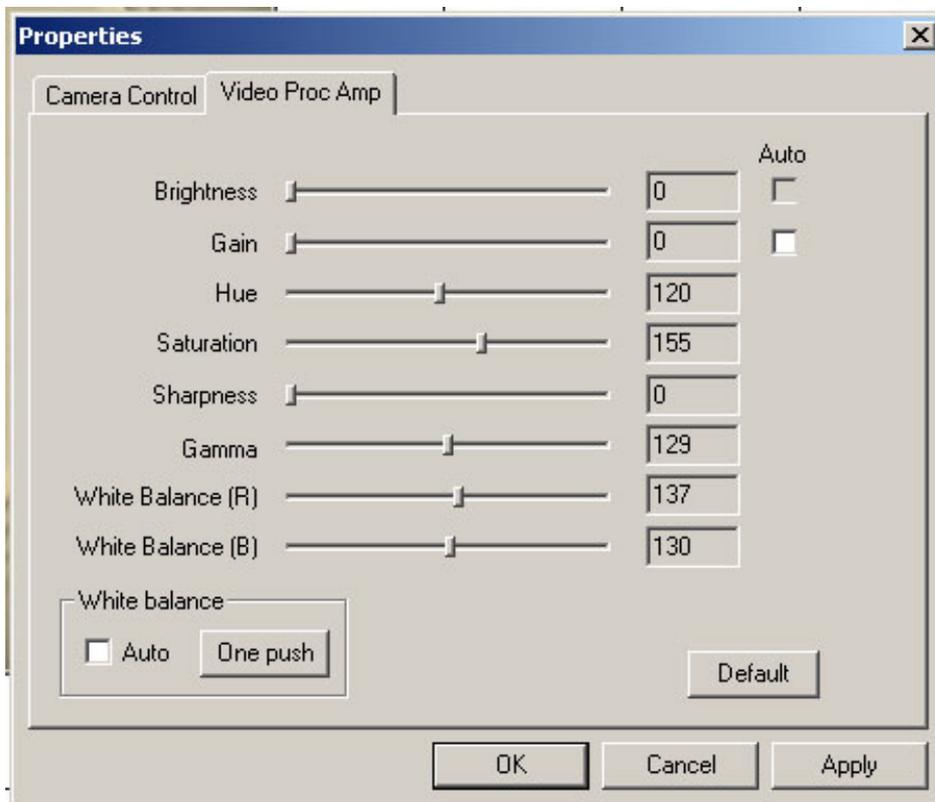


[Exposure] は最後に設定します。これはセットアップ終了後に暗闇でのプレートの違いによる差を補正するために使用しなければならない唯一のコントロールです。

[Memory channel] 機能はこのソフトウェアでは操作できません。

[Auto] 機能は使用しないでください。

このドライバは Isel ステージの装置では動作しません。



[Brightness] と [Gain] は光を増加する方法です。これらの値は「0」に設定されることをお勧めします。[Saturation] は画像の彩度を調節します。「0」は白黒表示、「255」は完全カラー表示です。

EliSpot では、スポットにアーチファクトが存在するような印象を与えるため、[Sharpness] は「0」にします。

3段階の [Gamma] コントロールで画像のコントラストを調節します。

ELR02 をお使いの場合は、標準プレートには中間の位置を設定します。

HR システムをお使いの場合は、中間または左側の位置を設定します。

[White Balance] は、ウェルの背景が白色またはライトグレーになるように設定します。

このダイアログの [Auto] 機能は使用しないでください。

2.11 EliStat : EliSpot データ分析用 MS Excel ツール

2.11.1 はじめに

AID EliStat は EliSpot データの解釈を支援するために作成された MS Excel 2000 マクロベースの統計評価プログラムで、AID EliSpot 3.1 以降のバージョンで使用できます。プログラムを開始するには、EliSpot ソフトウェアの [Data] メニューから [Open plate with EliStat] をクリックします。すべての EliSpot データが EliStat に転送され、分析が行えるようになります。EliSpot ソフトウェアに接続せずに Excel テンプレート「EliStat.xlt」を起動しても、EliStat を使用することができます。

本節では、プログラム操作の概要を説明します。詳しい操作方法については、プログラムの各ワークシートの [Help] ボタンをクリックすると表示されるオンラインヘルプを参照してください。プログラムはバージョン 1.0 のトライアル期間にあるため、提供される機能は変更されていきます。変更に関する最新情報は、オンラインヘルプを参照してください。また当社 Web サイト、www.elispot.com から EliStat プログラムのアップデート版をダウンロードすることができます。

[Main] メニューページ

EliStat プログラムを開始すると、直接起動、EliSpot ソフトウェアからの起動に関わらず、[Main] メニューが表示されます。メニューには以下のボタンが表示されます。

Analyze plate

プログラムの [Analysis] ページを開きます。データが 96 ウェルプレート形式で表示されます。レイアウトの種類のほか、分析の種類を選択することができます（[Analysis] ページの節も参照してください）。

Load a plate from hard disk

この機能では、すでに保存されている EliSpot プレートからデータをロードすることができます。選択したプレートのフォルダを開いて、

「data.txt」をロードします。EliStat プログラムにすでにデータがある場合は、プログラムがデータを上書きするかどうかを確認します。AID の data.txt 形式ではないファイルを開こうとしたときは、エラーメッセージが表示されます。

Evaluate AID Master plate

AID マスタープレート使用時には、この機能を使用して EliSpot リーダーシステムをアライメントすることができます。

Create Plate Layout

ワークシートが開き、プレートレイアウトを操作できます。新しいレイアウトを定義したり、古いレイアウトを編集したり、あるいは使用していないレイアウトを削除したりすることができます（[Create plate layout] ページの節も参照してください）。

Create Evaluation method

ワークシートが開き、データに使用したい分析方法をあらかじめ定義することができます。「ハンドメイド」の方法を定義することも、MS Excel が提供する統計ルーチンなどを使用することもできます（[Create evaluation method] ページの節も参照してください）。

Quit EliStat

このボタンをクリックすると、プログラムが閉じます。

Exit to EliSpot

プログラムを終了し、AID EliSpot ソフトウェアに戻ります。

Contact AID

メッセージボックスが開き、EliStat のバージョン情報を表示します。

2.11.2 [Analysis] ページ

このページには、カウント処理により作成されたすべてのデータのほか、ロードされたプレートの基本情報（例：プレート名、読み取り日）が表示されます。カウントデータは 96 ウェルのプレート形式で表示されます。初期設定では各ウェルのスポット量が表示されています。しかし、プレートの右側のページにあるオプションボタンをクリックすると、スポットの輝度、サイトカイン分泌量および平均表面を表示することができます。今後行うすべての分析が現在のプレート内容の影響を受けることにご注意ください。

このページの下半分で、このプレートで分析を行うレイアウト、評価方法、患者を選択することができます。選択し、[Analyze] ボタンを押すと、ソフトウェアが設定にしたがい結果を計算します。新しいページが開き、結果が表示され、印刷、保存できるようになります。

分析の基本手順

1. プレート右側のオプションボタンで分析するデータ（例：カウントされたスポット群）を選択します。
2. このプレートで分析するレイアウト、評価方法および患者を選択します（レイアウトと評価方法は先に定義しておきます）。
3. [Analyze] ボタンを押します。
4. データを印刷、保存します。
5. [Main] メニューに戻るか、異なる患者で新しい分析を実行します。

重要：プログラムはレイアウトと評価方法の一貫性を確認しません。その代わりに、選択された設定でデータを分析できないときは、エラーメッセージが表示されます。したがって、ユーザーは責任を持って一貫性のあるレイアウトと方法を作成し、それらが一致するときのみ使用してください。

2.11.3 [Create Evaluation Method] ページ

このページで、データの分析方法を定義することができます。各種のウェル（陰性対照、陽性対照、サンプルプローブ）について、プロパティを選択することができます。

たとえば、プログラムに陰性対照でカウントしたスポットをサンプルプローブから差し引きしたいときは、[Negative controls] ダイアログボックスのプロパティで [Always subtract from probes] を有効にします。

すべての種類のウェルについて、分析で許容する標準誤差（standard error of the mean; SEM）を定義することができます。分析の SEM 値が選択値より大きい場合は、結果表示で警告メッセージが表示されます。[Consider test wells as positive] ダイアログボックスで、結果を陽性と判定する状態に関する規則を定義することができます。

選択が終了したら、[Save] ボタンを押し、その評価方法に名前を付けて保存します。作成された方法が EliStat ソフトウェアの [Analyze] ページ、および MS Excel の統計パッケージ中の一部のツールで使用できるようになります。

2.11.4 [Create Plate Layout] ページ

EliStat のレイアウトは EliSpot のプレートと等しく、各ウェルはサイトカイン、抗原、患者の ID 番号のパラメータですでに定義されています。さらに、各ウェルにはサンプルの種類に関する情報（例：陽性／陰性対照、空のウェルまたはサンプルプローブ）が含まれています。

このようなレイアウトは、プローブ位置が常に等しいプレートを使用する機会が多い場合、たとえば、陰性対照は常に A1 および B1 ウェル、陽性対照は A2 および B2、抗原を有するサンプルプローブは A3 および B3 などと決まっているような場合に特に便利です。このような場合は、EliStat のレイアウトを定義しておき、マウスクリック 1 つでそのレイアウトを特定のプレートの分析レイアウトに使用することができます。

EliStat ソフトウェアの [Create Plate Layout] ページでは、このようなレイアウトを作成することができます。このページで基本的に実行できるのは、新しいレイアウトの作成です。このために 96 ウェルの空のプレートが準備されていますので、必要な情報を供給してレイアウトを作成します。

まず、[Display plate layout for...] リストボックスでウェルに定義したい情報の種類を選択します。左マウスボタンをクリックし、プレート上をドラッグして対象となるウェルを選択します（横に並んでいない複数のウェルを選択したい場合は、[STRG] ボタンを使用することもできます）。選択が終了したら、[Define selection] ボタンをクリックします。ダイアログボックスが表示され、ウェルの内容を指定することができます。[OK] で確認し、上記の手順を繰り返します。選択はすぐにプレート表示に反映されます。リストボックスで異なるパラメータに切り替えることもできますが、混乱を避けるためにまず 1 つのパラメータ（例：ウェルの種類）でプレート全体を設定し、次に別のパラメータに切り替える方法をお勧めします。

情報の入力が終了したら、ダイアログボックスでレイアウトに名前を付けて、ハードディスクに保存します。作成されたレイアウトが、ソフトウェアの [Analyze] ページで使用できるようになります。

注記：EliStat ソフトウェアは設定の確認を行いませんので、一貫性のあるレイアウトが作成されていることを必ず確認してください。

[Create EliStat Layout] ページのボタン

Menu: レイアウトを保存せずにメインメニューに戻ります（現在のデータは失われます）。

Save: 編集したレイアウトまたは新しいレイアウトに加えた変更を保存します。レイアウトは、レイアウト用プレートにすべてのパラメータ情報を設定し、名前を付けた場合にしか保存できませんのでご注意ください。

Print: 表示されているレイアウトを印刷します。

Load: レイアウトをハードディスクからロードします。
Delete: 表示されているレイアウトをハードディスクから削除します。

Reset displayed layout: (レイアウト作成中) 表示されているプレートのパラメータを削除します。

Reset layout: (レイアウト作成中) レイアウトを完全に削除します。

Define selection: (レイアウト作成中) ウェルの内容を指定するダイアログボックスが開きます。

注記：ハードディスクには設定例としてプリインストールされた「AID Layout Test.lay」が保存されています。このレイアウトを評価方法「AID Method Test.met」とプレート「AID Testplate」と一緒に使用して、プログラムの操作を学習してください。

第 3 章 操作方法

3.1 ルーチン設定でのシステム操作

本節では、プリセットされた設定でシステムを安全に操作する方法を説明します。以下のような Windows コンピュータの使用方法に習熟しておく必要があります。

- Windows にログインする。
- ファイルを開く／保存／印刷するダイアログを操作する。
- マウスの左クリック、右クリックを行う。
- ファイルの拡張子（txt, xls, ini, plt）を区別する。
- Windows を安全にシャットダウンする。

3.1.1 操作の開始

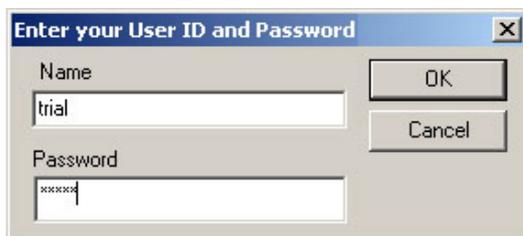
リーダーユニットのスイッチを入れます。数秒後、照明が点灯します。短い休憩を挟むときなどは、ネオンリング照明（電球）の寿命が縮まりますのでリーダーのスイッチを切らないでください。照明が最大輝度に達するまで 5～10



分待機します。モニタとプリンタの電源が入っていることを確認します。正面の大きなボタンを押してコンピュータ／コントロールユニットを起動します。Windows が起動し、場合によってはログインを要求します。Windows デスクトップにある AID プログラムのボタンを探します。



ボタンを左マウスボタンでダブルクリックします。プログラムがログインユーザー名とパスワードを要求する場合があります。ログインしない場合は、「default」ユーザーとしてプログラムに入ります。



空の EliSpot 文書が開いたプログラムウインドウが表示されます。システムを初めて操作する場合は、すこし時間をとってマウスでツールバーのボタンの上を移動し、ポップアップ表示される説明を読みます。



3.1.2 EliSpot プレーートの読み取り

取り出しボタン  を押します。リーダーの正面に立ち、ウェル A1 が左奥に来るようにプレートを挿入します。プレートがステージにしっかり固定されていることを確認します。底ゴムの付いたプレートを使用している場合は、読み取り前に取り外します。

ツールバーの  ボタンを押します。リーダーが撮像を開始し、オートセンター機能を使ってウェルをセンタリングし、初期設定のカウント設定を使用してスポットをカウントします。新しくウインドウが開き、1 番目のウェル (A1) が表示されます。問題がないか確認し、ウェルウインドウを閉じます。

装置の動作中、ツールバーの  ボタンを押して [Properties] ダイアログボックスを開きます。コメントを入力します (プレートの種類、抗体ペア、細胞など)。プレートを保存するときに名前が付けられます。

注記：この時点でプレートの違いによって、プレート表示が明るすぎたり暗すぎたりする場合は、マウスで平均的なスポ

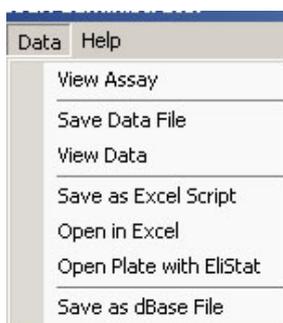
ットを含むウェルを選択し、右クリックします。move-to コマンドで移動し、[Camera] メニューから [Change Color Settings] を選択します。[Exposure] (シャッター速度) で最適な画像に調整し、再度読み取りとカウントを行います。

この操作をよく行う場合は、プレートコメントに露出 (exposure) 値をメモしておきます。

ウェルのセンタリングがずれている場合は、ステージキャリブレーションに問題がある場合があります。[File] → [Stage] → [Reset] でステージをリセットし、再度読み取りを行います。それでもうまくいかない場合は、別のキャリブレーションをロードするか、ステージキャリブレーションをもう一度行わなければならない可能性があります。

読み取りとカウントが終了したら (一番下のステータスバーを参照します)、文書を保存します。ツールバーの保存ボタン  を押すか、[File] メニューから [Save] を選択します。ダイアログが表示され、プレートの保存場所と保存名を表示します。

ツールバーの印刷ボタン  を押します。プレート全体と各ウェルの小さな画像、および左下にカウント結果を表示したページが 1 枚印刷されます。これは EliSpot プレートの直接データの記録であり、ファイルに保管しておきます。タスクバーの  ボタンを押してプレートを取り出します。



この時点で、テキストファイルや MS Excel にデータをエクスポートすることもできます。エクスポートする場合は、[Data] メニューから

[View Data] を選択してテキストファイルを表示します。この方法で EliSpot の結果を 1 ページにコンパクトに収めることができます。Excel にデータをエクスポートするには、[Data] メニューから [Open in Excel] を選択します。Excel が開き、複数のシートを持つ新規ドキュメントにデータが自動表示されます。Excel プログラムウインドウを閉じます。ダイアログが表示され、データを保存するか確認されます。名前を入力して [Save] を押します（ヒント：EliSpot プログラムの [Save] ダイアログでプレート名を入力するときに、ハイライトして Ctrl + C でコピーしておけば、この [Save] ダイアログで Ctrl + V を使って入力することができます）。

また、データの計算、編集が行える Excel のプラグイン、AID ELISTAT にデータをエクスポートすることもできます。AID プログラムでドキュメントウインドウを閉じます。まだ読み取りを行うプレートがある

場合は、[File] メニューから [New] を選択するか、ツールバーの  ボタンを使用して新しい空のドキュメントを開き、上記の手順を繰り返します。

3.1.3 [Selection] メニューの使用

全部ではなく一部のウェルに操作を行いたい場合は、選択機能を使用することができます。[Selection] メニューを選択します。[Selection] メニューでは 3 つの選択を行うことができます。1. 全ウェルを選択、2. 選択の解除、3. 選択の反転、です。またキーボードの Ctrl + A および Ctrl + C コマンドでもすべてのウェルを選択／選択解除することができます。一部のウェルのみを選択したい場合は、選択するウェルを（左マウスクリックで）選択します。もう一度左マウスクリックすると、選択が解除されます。選択されているウェルは背景が青色で表示され、選択されていないウェルは白色で表示されます。マウスでドラッグして複数のウェルを一度に選択することもできます。ウェルを選択して

から [Selection] メニューに戻り、選択を反転することができます。キーボードのコマンド、Ctrl+I でも同様の操作が行われます。

ヒント：選択されていないウェルをマウスで右クリックすると、（選択可能なメニューリストを表示した）ポップアップメニューが表示されます。選択されているウェルでも同様の操作を試してみてください。ポップアップメニューに表示されるメニューリストの内容が変わっています。

残り半分が空のため、プレートの右半分のみを読み取りたい場合は、右半分のウェルがある部分をマウスで左クリック&ドラッグして選択します。次に、選択されたウェルの 1 つをマウスで右クリックします。ポップアップリストが表示されます。[Read and Count] を選択します。リーダーが選択されたウェルのみの撮像とカウントを行います。

ヒント：プレートが曲がっているときの解決策
曲がっているプレートを挿入し、左半分を押し下げます。左半分のウェルを選択します。選択部分の読み取りとカウントを行います。[Eject] を選択しますが、プレートは取り出さずに右側を押し下げます。Ctrl + I を押して、読み取りとカウントを繰り返します。通常と同様の方法で保存します。

3.1.4 異なるカウント設定の使用

あらかじめ設定されたカウント設定をプレート全体に適用する、またはプレートの一部に適用する必要があります。プレート全体、またはプレートの一部を選択し、選択した部分にマウスポインタを動かします。右マウスボタンをクリックして、[Count Settings] を選択します。選択可能なカウント設定のリストが表示されます。左マウスクリックで希望する設定を選択します。カウント設定はカラーコード化されており、選択された設定に応じてウェルに小さなカラーボックスのラベル

が表示されます。プレートの残りの部分にも、続けてカウント設定を選択できます。選択を消去してプレートの別の部分を選択するか、または選択の反転機能を使用します。

ヒント：ウェルに適したカウント設定を使い分けることは、結果の完全な文書化に役立ちます。

[Open] ダイアログで以前に保存されたプレート文書に戻ることもできます。プレートフォルダを探し、左マウスボタンをダブルクリックしてプレート文書（例：name.plt）を開きます。

変更を行ったときは、[File] メニューの [Save As...] コマンドでプレートを別名保存したい場合があります。このときディスク容量を節約するために、ウェルの特徴の一部は保存されませんのでご注意ください。各ウェルのスポット数および位置は保存されますが、スポットの輪郭は保存されません。保存されたプレートからデータをエクスポートする場合、プレートの再カウントを行わない限り、テキストまたは Excel 文書では測定の一部が欠けた状態になります。

文書形式に関する注記：通常、画像は画像品質と圧縮比のバランスが良い jpg ファイルとして保存されます。しかし jpg 圧縮はロスレス圧縮ではないため、保存画像は取得画像に比べて品質がやや単純化されます。これにより、スポットのカウント結果が初回カウント時と再カウント時で若干変動することがあります。

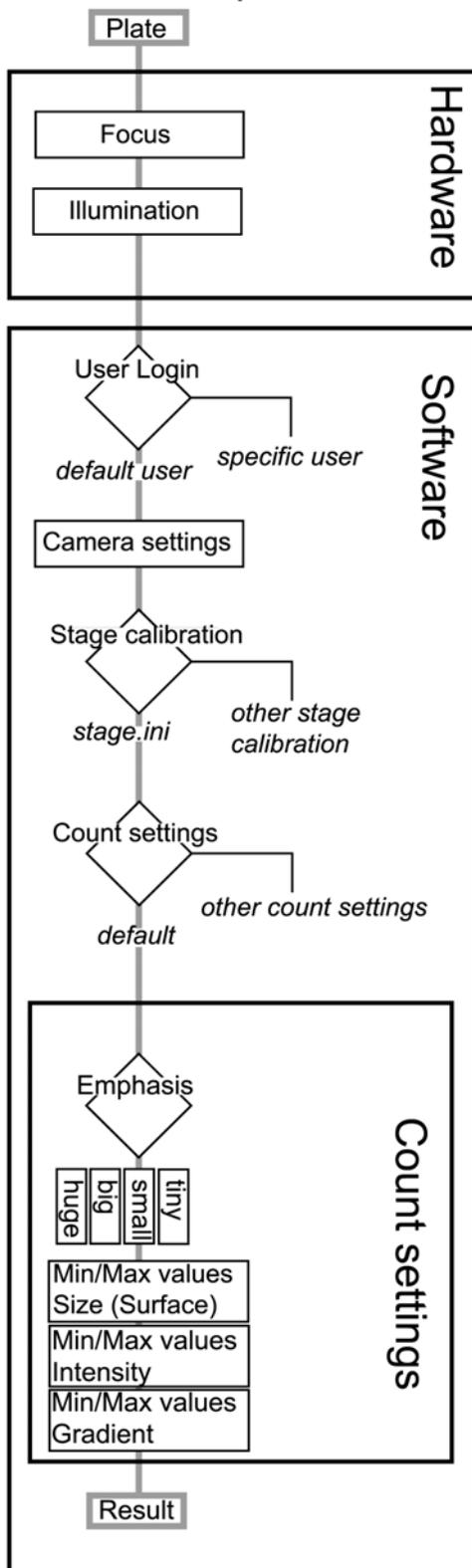
この問題は、ファイルサイズが大きくなるという欠点がありますが、画像データの保存形式を bmp または tiff にすることで回避できます。臨床試験データは tiff または bmp 形式で保存してください。

3.2 ルーチン試験用のシステムセットアップ

本節では、AID EliSpot リーダーシステムで 1 種類以上のプレートを使用する、カウント設定を作成・管理する、カメラを設定するためのセットアップおよびキャリブレーション方法を説明します。これらを行うには、これまでの節に説明した操作を行えることが必要です。また、科学実験に関する以下のような経験が必要です。

- EliSpot によくあるアーチファクトを見分ける
- 分析に含める／除外するスポットを判定する
- 品質管理の問題を決定する

What leads to a spot count result?



フォーカス
スイッチ

EliSpot プレーートの各ウェルについて高品質画像を得ることは、非常に重要です。本物のプレートは経時変化により大幅に色褪せるためです。プレート文書を一度ハードディスクや

ほかのメディアに保存したら、何度分析を行っても情報が失われることはありません。

まず、プレートにしっかり焦点が合っている必要があります。これは完全にハードウェアの問題なので、特に複数の人々が装置を使用している場合は、ワークセッションのたびにフォーカスを確認する必要があります。フォーカスはリーダーユニットの上下スイッチで調整できます。システムの光学系は、焦点深度が非常に深いため、少々のはずれは問題ではありません。しかし、著しく曲がったプレートを読み取るような場合には、特別な予防措置を講じておく必要があります。

リーダーをフォーカスさせるには、プレートを挿入し、プレートを読み取り、目に見えるスポットのある、中心近くのウェルを選択します。move-to コマンドを使用して、このウェルをカメラプレビュー画面に表示し、カメラのフォーカスを調整します。プレートの種類が異なれば、レイアウトも周縁部の寸法も異なります。そのため、読み取るパターンは、ステージキャリブレーションダイアログで使用されているプレートの種類に合わせて調整しなければなりません。この時点で、関心領域（AOI、すなわちカウント領域）の直径も設定します。これは、試験の種類によってはほとんどのスポットがウェルの周縁部に集中することがあるため、スポットのカウント結果に大きく影響します。ユーザーはこれらを含めるか除外するかを決定しなければなりません。オートセンター機能もステージキャリブレーションの設定によりコントロールされます。

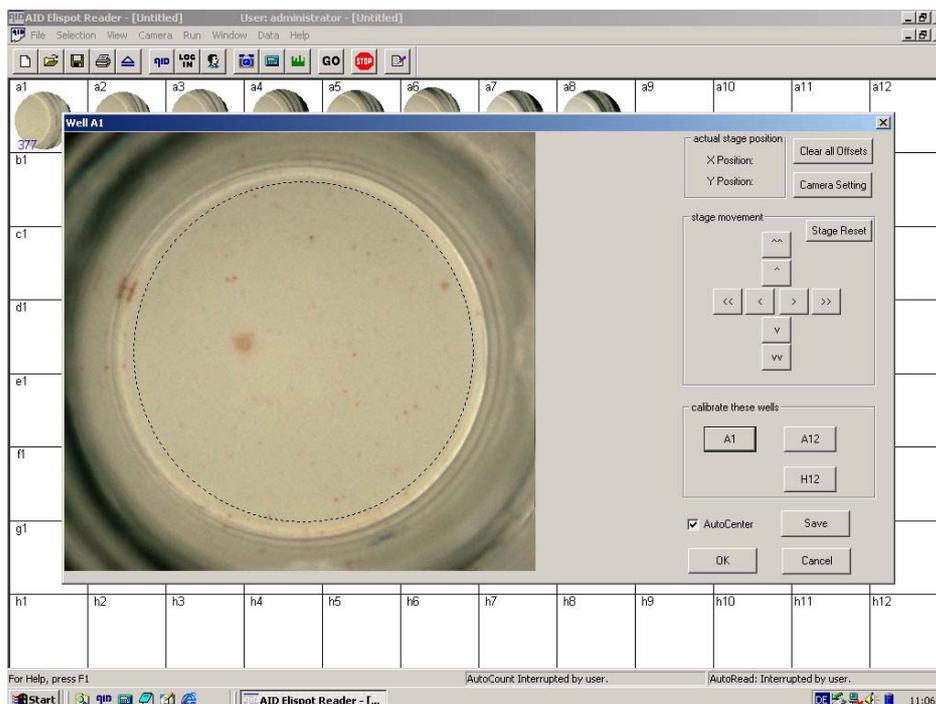
カメラ設定もウェルの表示が自然になるように調整します。色調とコントラストを調整することができます。これはスポットのカウントにも多少影響しますが、重要なのは露出（シャッター速度）を正しく設定することです。これは写真の明

るさを左右するため、背景が真っ白ではなくやや色づいた状態になるように調整します。写真が明るすぎる場合は、小さなスポットが消えてしまいます。暗すぎる場合は、スポットの検出能が全体的に低下します。ステージおよびカメラの設定はユーザーごとに異なるため、プレートや試験の種類ごとにログインユーザーを使い分けると有効な場合があります。

3.2.1 ステージのキャリブレーション

- ステージキャリブレーションファイルは小さな .ini ファイルの集まりで、プレートのレイアウト、カウント領域のサイズ、オートセンター機能の ON/OFF をコントロールします。
- ステージのキャリブレーション設定はユーザーごとに作成されます。
- 初期設定ファイルは stage.ini です。

EliSpot プレートはメーカーや種類によってレイアウトが若干異なっており、それに合わせてリーダーをキャリブレーションする必要があります。1種類またはそれ以上のプレートに対してリーダーをキャリブレーションし、キャリブレーション設定を複数の .ini ファイルに保存することができます。これらの .ini ファイルで、キャリブレーションを繰り返さなくてもある種類のプレートから別の種類のプレートに切り替えることができます。ユーザーがプログラムを起動してログインしたときは、初期設定ファイルである stage.ini ファイルが使用されます。一番よく使うプレートの種類の設定を stage.ini として保存しておくといでしょう。



プレートを挿入し、[Stage] → [Calibrate Stage] を選択し、[A1] をクリックします。矢印ボタンを使ってウェルをセンタリングします。点線の円をウェルの中央に移動し、希望するサイズを決定します。たいていの試験では、ウェル周縁部のスポットを除外することが推奨されます。プログラムバージョン 2.5~2.9 からのカウント設定を使用する場合は、周縁部は常にカウントから除外しておいてください。[A12] に移動し、矢印ボタンを使ってウェルをセンタリングします。次に [H12] に移動し、矢印ボタンを使ってウェルをセンタリングします。特定のプレート用にステージをキャリブレーションしたら、キャリブレーションデータを保存します。[Stage] → [Save Calibration...] を選択します。[Save As...] ダイアログボックスが表示されます。希望するファイル名でキャリブレーションデータを保存します。ソフトウェアが使用する初期設定のキャリブレーションファイルは stage.ini という名前です。キャリブレーションデータを stage.ini で保存する場合、そのデータは初期設定データとして使用され、ソフトウェア起動時に毎回ロードされるようになります。

保存されているキャリブレーションデータを使用したい場合は、プルダウンメニュー [Stage] → [Load Calibration...] でデータをロードするこ

とができます。[Load] ダイアログボックスが開きます。ロードされたキャリブレーションファイルがすぐに有効になります。

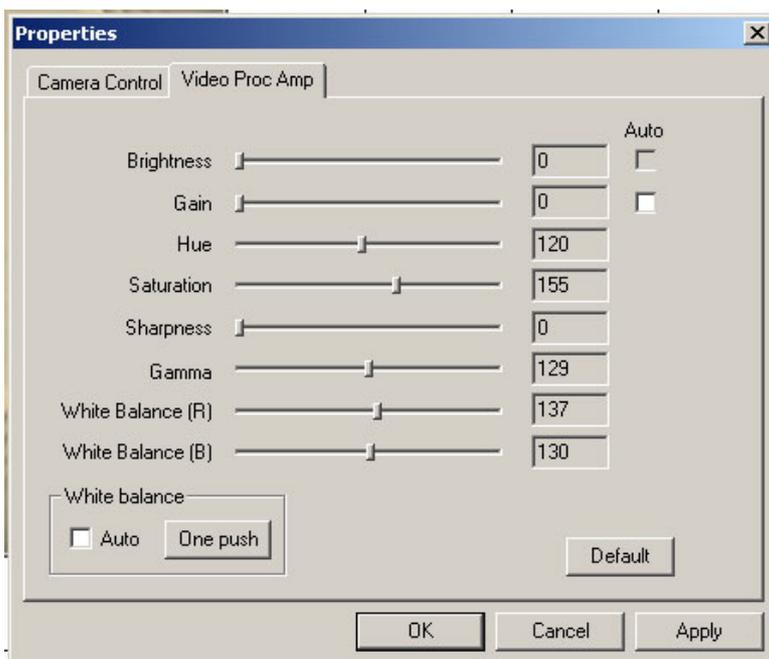
注記：ステージのキャリブレーション設定はユーザーごとに作成されます。キャリブレーションデータを操作するときは、必ず正しいユーザー名で AID EliSpot プログラムにログインしていることを確認してください。

各種のステージ設定をロードすることを避けたい場合は、プレートの種類ごとにユーザー設定を行い、プレートに応じたユーザー名でログインします。

注記：カウント領域すなわち AOI のサイズを決定するには、ノートパッドで stage.ini を開き、以下の式を計算します。
 $(\text{right border}) - (\text{left border}) = (\text{number of pixels diameter})$
ノートパッドを閉じます。変更は保存しないでください。

3.2.2 カメラの調整

プレートの読み取りを行います。陰性対照、陽性対照のいずれでもない、スポットを含んでいるウェルを選択します。右マウスボタンをクリックしてコンテキストメニューを表示し、[実際の UI と一致しているかご確認ください。] を選択します。  でカメラ設定ダイアログを開き、カラーレスポンスの調整を行います。

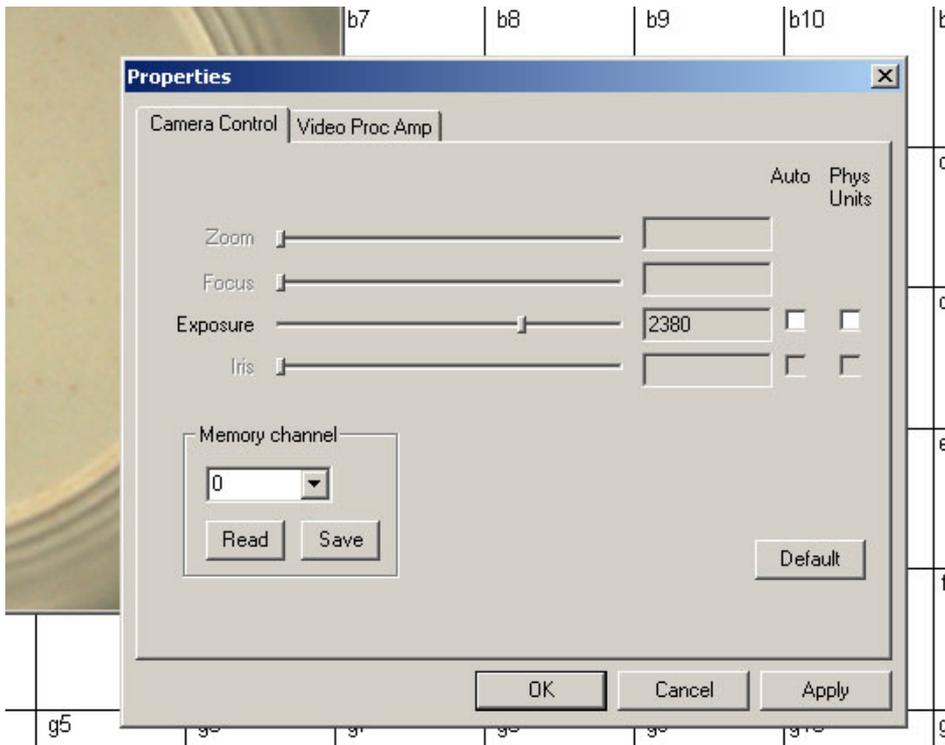


Sony カメラドライバのカメラ設定ダイアログ—ほかのドライバについては、2.10 節を参照してください。

[Gain]、[Brightness]、[Sharpness] は「0」、コントラストは中間、カラーレスポンス ([White Balance]) は自然な描写に設定されることをお勧めします。これらの設定は後で変更しないでください。現在の設定を下の表に記入します。

Brightness:	Sharpness:
Gain:	Gamma:
Hue:	White Balance (R):
Saturation:	White Balance (B):

プレートの違いによる差を調整する必要がある場合は、露出（シャッター速度）のみを変更します。[Exposure] の設定をゆっくりと動かしながら、ライブ画像の変化を観察します。ウェル内部の背景が均一なライトグレーになるよう調整することをお勧めします。



注記：[Memory channel] の設定は無視します。

[Exposure] の最小設定は 2060（物理単位で 1/32）です。[OK] を押すと、変更が user.cfg に保存されます。[Cancel] を押しても現在のセッション中は変更したデータが使用されます。

カメラドライバのバージョンによっては、複数枚の画像を 1 枚に調整するよう選択できます（DBS カメラ）。データ取得速度を重視する場合は 6～12 枚の画像を選択し、正確な画像を重視する場合は 12～24 枚の画像を選択します。

3.2.3 フォーカス



プレートの中央にあり、スポットを含んでいるウェルを選択します。カメラプレビュー画面を呼び出し、リーダーユニットのボタンでフォーカスを調整します。上記のステージキャリブレーションを再度実行します。

3.2.4 カウント設定

画像を取得後は、カウント設定がスポットカウントの方法を定義します。[Count Settings] ダイアログの内容を理解し、設定を正しく操作、適用することは非常に重要です。

EliSpot プレートで何をスポットとしてカウントするかについて、「黄金律」は存在しません。たとえば、IFN- γ プレートでは、さまざまなサイズのスポットが現れます。そのうちの一部は確実に T 細胞ではなく APC によって産生されています。この場合、試験とその結果に対する科学的知識にもとづいてアルゴリズムを見つけ出し、スポットと思われるものに最も近いものを分画する必要があります。したがって、実験に応じてカウント設定を調整する必要があります。スポットのカウントは論理的な手順にしたがって行われます。最初のスポットは使用されているアルゴリズムにもとづいて検出されます。アルゴリズムは [Count Settings] ダイアログの [Emphasis] で確認することができます。また、希望に応じて以前のソフトウェアリリースのアルゴリズムを使用することができます。アルゴリズムが検出したスポットはすべて左マウスボタンでクリックし、ボタンを押したままにして表示することができます。色付きのフラグが開き、スポットの説明を表示します。

[Count Settings] ダイアログを表示するには、プレート全体表示のツールバーのボタンを押すか、ウェルを開き、その中央を右マウスクリックして、コンテキストメニューから [Count Settings] を選択します。このダイアログボックスで、プログラムにスポットとして認識させる画像要素のサイズと輝度のアルゴリズムとしきい値を定義します。ご使用のソフトウェアバージョンによってはほかのパラメータを含めることができます。

アルゴリズムの種類が、大きなスポットを 1 スポットとみなすか、スポットのクラスとみなすかを決定します。同様に、スポットサイズの計算もアルゴリズムの種類により異なる場合があります。設定によって、小さなスポットをより簡単に検出するようしたり、大きなス

スポットを小さなスポットに分けないようにしたりすることができます。アルゴリズムを決定するには、[Emphasis] に「Small」などを選択し、[Apply] を押します。「Tiny」や「Big」でも同じ操作を行って、観察しているスポットに最も近い設定を決定します。

次に、検出されたスポットはすべてしきい値のシステムに送られ、必要条件を満たさないスポットはすべて破棄されます。マウス ( ツール) を使えば、これらのスポットが黄色ではなく赤色のフラグで表示されます。以前のソフトウェアリリースでは、その後、各種のフィルタでさらにスポットの破棄を行っていました。

ユーザーは、プレート全体表示で表示されるそれぞれのカウント設定に、異なる色を選択しなければなりません。

Fluff Filter: (2.5~2.9 のアルゴリズムでのみ使用可能) この機能を有効にすると、毛髪や綿毛に似たものがないか画像を検索し、膜に入った亀裂など、スポットよりも大きな画像要素を取り除きます。このようなアーチファクトのある領域が洗い出され、「偽の」スポットがカウントされないようになります。[Fluff Filter] はスポットのカウントに支障をきたす状況を生み出す可能性があります。この機能はユーザーが有効にするか無効にするかを決定してください。

Background Enhancement: (2.5~2.9 のアルゴリズムでのみ使用可能) このオプションはコントラストを強調することにより、過度に現像されたウェルを強調するのに使用します。このオプションは、小さなスポットが濃い色のウェルのなかで見えなくなってしまうなど、場合によっては誤った結果をもたらす可能性があります。このオプションは無効にすることができます。

Emphasis: ほとんどの場合、「Small」が一番良い結果になります。

「Huge」の強調はメモリを大量に消費するため、プログラムがクラッシュする場合があります。

Level of interpretation: 非常に暗いウェルの場合は、スポットのカウントレベルが低くなることがあります、その場合、Excel シートに表示される結果が事実と異なるものになってしまいます。この問題の対策として、

信頼性のあるウェルのカウントを行える彩度レベルを決定する必要があります。これは試験の種類、さらには使用しているカラーレスポンスの種類により変わります。[Level of interpretation] ダイアログに値を入力します。制限値から大きく外れたスポットは無効としてマークされます。

3.2.5 カウント設定の使用

カウント設定はユーザーごとに作成され、ユーザーが定義して IFN-G、IL-4、IL-5、IL-10、Multicolor など、好きな名前で保存することができます。必要に応じて新しいカテゴリを作成することもできます。カウント設定はプレート内の個別のウェルまたはウェルのグループに選択的に指定することができます。プレート全体または一部に設定が選択、適用されていないときは、初期設定が適用されます。

カウント設定は紙に記録して保存しておいてください。各ユーザーが以下のような表を作成されることをお勧めします。

名前 日付	Emphasis	Min/Max Size	Min/Max Intensity	Min/Max Gradient	Level of Interpre- tation	マーカー色
IFN-g 4/4/2003	small	20/2000	15/90	5/90	70%	red
IFN-g 5/5/2003	big	80/2000	18/90	5/90	70%	red
IL-4	small	0/900	3/40	0/90	50%	blue

3.2.6 白色プレート（PVDF または ニトロセルロース）用の調整

白色プレート（筐体が白色プラスチック製のプレート）は透明プラスチックプレートと同じように使用できますが、ウェルとウェルの境界線とのコントラストが低くなります。そのため、プレート内のウェルの一部または全部でオートセンター機能がうまく働かない可能性があります。カメラを透明プレートより明るめに調整します。それでもオートセンター機能がうまく働かない場合は、もう一度慎重にキャリブレーションを行い、オートセンターを無効にします。このキャリブレーションデータを `whiteplate.ini` に保存します。

また、システムのルーチン実行手順を変更して、最初に（オートセンターなしで）読み取りを行ってプレートを保存し、次に [Run] メニューから [AutoCenter] を実行してカウントを行うようにすることもできます。変更が終了したら保存します。これにより、旧バージョンのソフトウェアで発生していたシステムクラッシュの問題が解消されます。

3.2.7 透明プレート（ELISA）用の調整

この種類のプレートに対しては新しいユーザーを作成されることをお勧めします。以下の節を参照してください。プレートを挿入します。

[File] → [Options] メニューを開き、[Invert Image] を選択します。[File] → [Stage] → [Calibrate Stage]を開きます。白色の背景または反転画像でステージをキャリブプレートし、オートセンターを無効にして、キャリブレーションデータを `clear.ini` として保存します。白色の背景を削除します。[Run] メニューから [Read Plate] を選択します。目に見えるスポットを含むウェルを選び、コンテキストメニューの `move-to` コマンドを使ってウェルをカメラの下に移動します。[Camera] メニューから [Show Preview] を選択します。リーダーユニットのスイッチを使用してフォーカスを調整します。もう一度プレートの読み取りを行います。[Camera]

メニューから [Change Camera Settings] を開きます。コントラストが最適になるよう調整し、フォーカスを確認します。

ステージのキャリブレーションに戻ります。もう一度白色の背景でステージをキャリブレートし、[AutoCenter] は無効のまま、キャリブレーションデータを `clear.ini` に保存します。プレートの読み取りを行います。[Run] メニューのコマンドを選択してオートセンター機能を適用します。プレートのカウントを行います。カウントが成功した場合は、ステージキャリブレーションに戻って [AutoCenter] を有効にします。もう一度キャリブレーションデータを `clear.ini` に保存し、次に `stage.ini` に保存します。カウント設定を調整します。プレートのカウントを行います。[GO] ボタンでプレートの読み取りとカウントを行います。[Save] で通常どおり保存します。

3.3 EliSpot ユーザーの管理

本節では、EliSpot ソフトウェアのユーザーアカウントのセットアップ方法を説明します。

以下の設定はユーザーごとに作成されます。

- ・ カメラオプション：カラーレスポンス、コントラストなど（Sony カメラのみ）
- ・ ステージキャリブレーション
- ・ カウント設定
- ・ ウェルの表示オプション（マーカー色、輪郭色、モード）

ソフトウェアのインストール直後は、「default」ユーザーしかアクセスできません。このユーザーには EliSpot の設定およびユーザーを管理する権限があります。ユーザーを追加するには、ツールバーの [Manage Users] ボタンをクリックします。ダイアログが開き、ユーザーの作成、命名、パスワード設定が行えます。ユーザープロフィールを編集して、新しいユーザーに自身の設定を変更する権限を与えます。ダイアログを閉じます。当社がお勧めする方法は、まず管理者権限を持つユーザーを作成してすべての権限を付与して、次に管理者ユーザーとしてログインしてデフォルトユーザーの権限を変更し、管理者のみが新しいユーザーを作成できるようにすることです。新しいユーザーは「default」ユーザーと同じ設定で作成されますので、「default」を適切にセットアップしてから新しいユーザーを作成されることをお勧めします。

3.4 臨床試験における AID EliSpot リーダーシステムの管理

臨床試験に使用するには、AID EliSpot リーダーシステムを確実にセットアップ、操作する必要があります。また、FDA の規定など、作業に適用される法規についての知識も必要です。AID EliSpot リーダーシステムは 21CFR Part 11 をはじめとする複数の国際規格に準拠しています。

AID EliSpot ソフトウェア 3.1 は、臨床試験専用の機能を備えています。まず「default」ユーザーでログインし、お使いのプレートや試験の種類に応じてリーダーをセットアップし、必要に応じてステージ、カメラ、カウンタの設定を編集します。次にユーザー管理情報を設定します。

注記：設定可能なパスワードは文字と数字で 8 文字以内です。

まずパスワードを設定して「administrator」ユーザーを作成し、管理者権限を与えます。次に「administrator」権限でログインし、「default」ユーザーを編集してユーザー管理権限を取り消します。[User Management] ダイアログで、スタートアップ時のログインとプロテクトモードに関するチェックボックスをチェックします。リーダーを操作する予定のユーザーのために、「trial」などの新しいログイン名（とパスワード）を作成します。上記のとおり、新しいユーザーはいつも「default」ユーザーと同じ設定で作成されるため、もう一度カウンタ、カメラ、ステージ設定を行う必要はありません。「trial」ユーザーを編集して、すべての権限を取り消します（あるいは、カメラ調整の権限は許可してもよいでしょう）。「trial」を初期設定のログインユーザーにします。「default」ユーザーはもう削除しても構いません。さらに AID EliSpot マスタープレート（例：Master Plate 33）の読み取り用に「master」というログイン名を作成します。

また、ユーザー管理に関する以外のすべての設定を変更できる「test」というログイン名を作成することをお勧めします。これでこのログイン名を利用して、試験用の設定はそのまま、さまざまな設定をテストできるようになります。マスターロットを使用している場合にも、特別なカウンタ設定が必要なため、専用のログイン名を作成します。

Protected mode: 追跡可能な結果を確実に得ることができます。読み取りとカウンタのコマンド（[GO] ボタン）を選択すると、プログラムが最初に文書の名前を要求します。読み取りとカウンタの終了後、文書がハードディスクに自動保存されます。プレートフォルダに数値データセットの複製が保存されます。

「trial」ユーザーは保存されたプレートの最初のカウント結果を変更し、そのデータを同じフォルダに保存することができません。「trial」ユーザーが保存されたプレートの再カウントを希望しても、新しいファイル名でプレートを保存することができません。ただし、設定を変更すれば再カウントを行うことができます。この時点で印刷したり、Excel や data.txt にエクスポートしたりしないよう注意しなければなりません。[Well Properties] ダイアログに監督者が編集したウェルにコメントを入力されることをお勧めします。このダイアログはツールバーのボタンで呼び出すことができます。

履歴：履歴（history）ファイルは自動作成されるファイルで、手動で編集することはできません。プレートを使用したセッションはすべて記録され、[Plate Properties] ダイアログで表示することができます。

試験の監督者は、形式は問いませんが以下の条件を満たす場合にのみデータを承認してください。

1. データが「trial」もしくは「administrator」のログイン名で取得されたものである。
2. data.txt、Excel シート、dbf ファイル、プリントアウト、ハードディスク上の生データにあるデータの内容が一致している。これは、データセットをプレート文書の履歴ファイルと比較することで簡単に確認することができます。

3.5 発表データのプレゼンテーション

AID EliSpot ソフトウェアには、プレゼンテーション用ツールがいくつか備わっています。[View] メニューのコマンドで、希望するウィンドウのスクリーンショットを作成することができます。このスクリーンショットは jpg ファイルとして保存されるため、Word や PowerPoint 文書に貼り付けることができます。また、Windows 添付のイメージング

ソフトウェアや Adobe Photoshop などの画像編集ソフトウェアを使ってスクリーンショットを編集することができます。

プレートの代表的なウェルを表示したい場合は、ご希望の数だけウェルを選択し、[Data] メニュー（以前は [Assay]）から [View Assay] を選択します。表示データのスクリーンショットを作成または印刷することができます。スクリーンショットは Adobe Photoshop などの画像編集ソフトウェアで編集することができます。

第4章 トラブルシューティング、用語集、注記

4.1 トラブルシューティング

システムが正しく動作しない場合は、Windows を終了し、コンピュータの電源を切って再起動してください。

リーダーが動作しない：

電源が入っているか確認してください。リーダーのヒューズを確認してください（AID の技術サポートまでお電話ください）。

リーダーの電灯が点灯後、しばらくして消える：

ネオンリング照明の寿命です。交換してください（AID の技術サポートまでお電話ください）。

Windows を再インストール後、リーダーが動作しなくなった：

お客様ご自身で Windows の再インストールまたはアップデートを行うと、リーダーユニットが動作しなくなります。添付のすべてのソフトウェアメディアおよびライセンス番号とともに、コンピュータ／コントロールユニットを AID に送付し、再インストールを依頼してください。

リーダーユニットまたはコンピュータ／コントロールユニットを交換後、カメラが正しく動作しない：

Sony カメラはカメラドライバソフトウェアが個別に認識します。コンピュータ／コントロールユニットにカメラを初めて接続したときは、

ドライバの再インストールが必要な場合があります。AID に指示を要求してください。

コンピュータが起動しない：

電源が入っているか確認してください。AID の技術サポートまでお電話ください。

ソフトウェアアップデートでリーダーシステムが動作しない：

ソフトウェアアップデートのインストール後、[File] → [Options] でハードウェア設定を確認しなければならない場合があります。いろいろな設定を試してみるか、AID までお電話ください。Windows NT システムをアップデートされる場合は、AID にご連絡ください。

コンピュータの動作が遅い：

システムディスク (C:) の容量を確認してください。空き容量が 500 MB を切ると Windows の動作が遅くなります。ネットワーク管理者にコンピュータ/コントロールユニットがネットワークに接続しているかどうか確認してください。ネットワークが原因で、操作できないほどコンピュータの動作が遅くなる場合があります。このような場合は、AID にソフトウェアの再インストールをご依頼ください。また、ご希望に応じてリーダーの操作とネットワークへの接続を切り替えることができるデュアルブート設定も行っています。ELR02 の場合は RAM を 512 MB にアップグレードしてください。

ステージが動かない/異常音がする：

ステージのプラグとねじが正しく固定されているか確認してください。ケーブルがソケットに正しく差し込まれているか確認してください。問題が解消しない場合、特に問題が断続的に発生する場合は、Isel カードを交換してください (AID の技術サポートまでお電話ください)。

EliSpot プレートの読み取りや解釈に問題がある場合は、試験的にプレートの読み取りを行い、電子メールでプレートフォルダを送付してください。このとき、すべてのウェルの読み取る必要はありません。すべて読み取ると、文書サイズが 5 MB を超え、当社のメールサーバーがすぐに停滞してしまいます。データを検証し、考えられる解決方法をご提案させていただきます。

4.2 誤差

本節では、EliSpot プレーートのオートカウント時にどのように誤差が発生するか、またその対処方法を説明します。

4.2.1 はじめに

EliSpot プレーートを目視または解剖顕微鏡の助けを借りて読み取る作業は、プレート 1 枚あたり約 1 時間の時間、あるいはカウント対象のスポット数が多い場合はさらに多くの時間を要します。一般に、研究者やオペレータによる目視のカウントでは、直感的にスポット検出が行え、正確な結果が得られるというメリットがあります。しかし、スポットのサイズや輝度のしきい値を目視のみで定義するのは非常に困難です。当社の経験では、人によるプレートのカウント結果の誤差は、同じプレートを複数回カウントした場合で、約 30% です。また、先入観のないカウントの実施も非常に困難です。AID EliSpot リーダーシステムのような自動システムは、非常に高速かつ誤差のない分析を行うことができます。

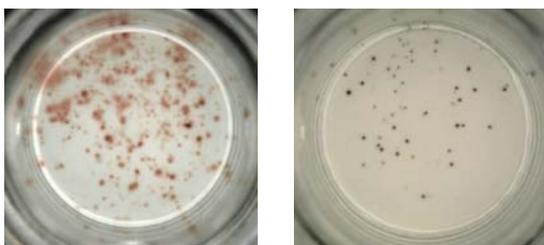
4.2.2 よくある問題

原則として、目で正確にカウントできないウェルをリーダーでより正確にカウントすることはできません。分析時ではなく試験時に解決しなければならない問題もあります。

ウェルの背景色の彩度がきわめて最大値に近いときは、小さなスポットが背景色によって見えなくなったり、大きなスポットに巻き込まれてしまいます。AID EliSpot ソフトウェアにはこれを解消する特別な機能があります。[Count Settings] ダイアログで、ウェルの最大彩度を経験的に正確なカウントが行えると予想される値に設定することができます。設定値よりも暗いウェルはプレート全体表示で赤色の背景色でマークされ、Excel シートには「not valid」と表示されます。EliSpot プレーートの陽性対照ウェルが非常に暗い場合、問題は発生しません。「試験」ウェルが暗すぎる場合は、これらのウェルの試験結果がウェルあ

たりの明確なスポット数ではなく「+++」であることを意味する可能性があります。

スポットのカウントは、輪郭がはっきりしているほうが、ぼやけているものよりも正確です。これは試験の種類、さらにはコーティングの品質に著しく影響されます。ウェル内のスポットは、コントラストが高いほど高い再現性が得られます。



低コントラスト 高コントラスト

カウントが特に困難なのは、スポットの分布が不規則なウェル、スポットが融合した斑点を含むウェルです。



スポットが融合した斑点

EliSpot 分析によくあるもう 1 つの問題は、ウェルへの塵埃や毛髪の混入です。これらはスポットとして余分にカウントされてしまいます。

このような場合は、プレートを全体表示モードで表示して、明らかに過大評価されたスポットを見つけ出し、余分なスポットを手動



() で消去します。

4.2.3 スポット分析の精度

1 つのスポットを詳細に分析する場合、計算を行うためにはそのスポットの直径が少なくとも 5~7 個のピクセルで描写されていなければなりません。つまり、小さなスポットは検出されても、上記のサイズより小さい場合は正確に説明されないということです。

4.2.4 周縁部を含める／含めない

EliSpot ウェルの分析でよくある問題として、ウェルの周縁部の取り扱いがあります。試験の種類によっては周縁部に特徴が表れるため、EliSpot の結果が正しく表示されない可能性があります。中心よりも周縁部にスポットが集まることのほうが多い場合やウェルの周縁部に融合したスポットがある場合は、ステージをキャリブレーションして周縁部を除外することをお勧めします。2.9 形式のカウント設定を使用している場合は、必ずいつもこの設定にしておいてください。[Filter White Rings] は使用しないでください。



アーチファクトの例：スポットがウェルの中央ではなく周縁部に存在しています。

4.2.5 カウント結果の再現性の判定

上記の点を考慮して、同じプレートの読み取り、カウントを行います。カウントは 3 回以上行います。回数が多いほど正確さは増します。次に Excel などではこれらの結果を集計し、カウント結果の毎回のばらつきを評価します。検討中の試験の種類や質によって結果は異なりますので、ここでは具体的な数字は提示できません。

時にはソフトウェアが目視での判断と異なるカウント／カウント除外結果を出していることに気付かれることもあります。こうした誤差はカウント結果の約 1~2% に過ぎないので、分析速度の向上を考えれば小さな代償とお考えください。

保存されたプレートの再カウント結果は変動すべきではありませんが、ばらつきがないことを保証することはできません。最初のカウントがもとにするカメラの直接画像と、jpg 形式で保存された画像とは、画質がわずかに異なります。このため、カウント設定が同じでも、初回カ

ウントと再カウントとの間で結果がわずかに変動する可能性があります。

4.2.6 サイズ

サイズ測定には補正係数が必要な場合があります。また、いくつかのパラメータにも影響されます。1.5 節を参照してください。

4.3 用語集

AOI

関心領域 (area of interest) 、すなわちカウント領域です。これは画像処理業界の標準用語で、画像処理の対象となる画像内の領域を意味します。EliSpot ソフトウェアでは、AOI は円形で囲まれた領域でウェルの底面を指示します。すべての画像処理機能は AOI の外側の領域を無視します。

オートセンター

EliSpot ウェルに合わせて AOI を自動調整する画像分析機能です。

CCD

電荷結合素子 (charge coupled device) 。ビデオカメラに内臓された受光チップの名前です。

JPEG

静止画像データ圧縮方式の標準化専門家委員会 (Joint Photographic Expert Group) により定められた規格であり、写真画像の不可逆圧縮を対象とする規格です。ウェル画像を JPEG 形式で保存すると、選択圧縮レベルに応じて保存容量が 5~10 分の 1 に減少します。欠点はこの種の圧縮が画像の劣化を伴うことで、画像を拡大しても、元の画像と同じ画像にはなりません。画質を劣化させずにウェル画像を保存しなければならない場合は、出力ファイル形式に BMP または TIFF を選択する必要があります。

MO ディスク

光磁気ディスク (magneto optical disk) 。大容量データの保存に適した信頼性のあるメディアです。MO ディスク 1 枚には、CD 1 枚とほぼ等しい 600 MB のデータを格納することができます。画像を圧縮すれば、1 枚のディスクに EliSpot プレート 60 枚分のデータを格納できます。

MO ディスクは速度が遅い、やや高価であるなどの理由で最近はあまり使われていませんが、信頼性があり、データの長期保存に適しています。

ピクセル

ビデオ画像は規定数の独立した画素で構成されます。こうした画素の 1 つ 1 つをピクセルと呼びます。AID EliSpot リーダーシステムでは、1 ピクセルのサイズは約 0.01 mm です。しかし、多量のピクセルにより描かれるウェルは、正確に描写するために個別に決定する必要があり、その描写は焦点面の位置によって変動します。

スポットの輝度

スポットの輝度は明度の単位で測定されます。明度の範囲は 0（白）～ 255（黒）です。

スポット全体表面

ウェル内部のスポットの全体表面は、平方ミリメートル (mm^2) で測定されます。

スポット表面／スポット領域

1 スポットの表面は、1/100 平方ミリメートル (0.01 mm^2) で測定されます。

1 mm^2 は $10,000 \times 1/100 \text{ mm}^2$ と同じです。

サイトカイン分泌量

サイトカイン分泌量が仮想単位で測定されます。1 単位は $(0.01 \text{ mm})^2$ で表した表面 \times スポット輝度です。

FireWire

USB に似たポート／ケーブルシステムですが、より高速です。技術的には SCSI をベースにしています。

パッチ、サービスパック

Microsoft 社は自社のソフトウェアリリースのバグを修正するためにパッチを発行しています。これらは通常、インターネットからダウンロードして入手します。.exe ファイル形式で提供され、システムや Office プログラムに自動的にインストールされます。これらをインストールするときは、まずマニュアルを熟読してください。または、AID の技術サポートまでお電話ください。

4.3 注記

4.3.1 商標について

Windows NT™、Windows 2000™、DirectX™、ActiveX™、Windows Script、Windows Scripting Host、Microsoft® Excel™ は Microsoft Corporation の登録商標です。Adobe および Photoshop は ADOBE, Inc. の商標です。Intel® および Pentium® は Intel Corporation の登録商標です。MMX™ は Intel Corporation の商標です。

4.4 保証書：契約条件

AID と直接お取引される場合は、以下の条件が適用されます。販売代理店や取次店、その他の第三者から購入される場合は、各社に条件をお問い合わせください。当社から直接提示した条件は、本節の記載条件に優先します。これらの条件の条項が、適用法令により無効になる場合が生じて、残りの条項は有効です。

保証範囲

顧客の設備において装置が受領されてから 2 年間は、すべての部品が保証の対象となります。保証範囲は、顧客と AID 間の運賃を含む、すべての部品費および作業費です。

制限事項

AID の書面による同意なしにコンピュータ／コントロールユニットにソフトウェアをインストールすると、保証が無効になります。装置設置後、3 カ月以内に装置代金の支払いがない場合、保証を一時中断する場合があります。AID の書面による許可なしに修理を試みた場合、保証が無効になります。保証には電球、ハードドライブおよび付属の交換可能なコンピュータメディアは含まれません。

法的責任

製造者は、以下のいずれについても責任を負いません。1. 装置の使用により生じた損害、2. 修理中のダウンタイム、3. 装置の故障によるデータ損失。

4.5 AID 連絡先

製造者：

AID Autoimmun Diagnostika GmbH
Ebinger Str. 4
72749 Strassberg
GERMANY

付加価値税（VAT）番号 DE 144847 487

CEO Dr. Volkmar Schöllhorn

商業登記番号

アルプシュタット登記裁判所、HRB 725

問い合わせ先

Tel : +49 7434 9364 0

Fax : +49 7434 9364 40

www.elispot.com

電子メール：info@elispot.com

販売代理店：

取扱商品に関するお問合せは…

取扱店



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部（お問い合わせ）

TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619

TEL : (03) 5632-9620