

レーザーコンフォーカル顕微鏡 (Bio-Rad MRC-1024) の使い方

1998年5月7日 鈴木健史

基本的注意事項

- レーザー管は非常に高価なもので、しかも消耗品で寿命があります (800~1000時間程度の寿命で約100万円)。画像解析プログラムを使用し始めたときや、ファイルのコピーのときなどレーザーを40分以上行わないときはレーザー管の電源スイッチをoffにしてください。しかし、レーザー一点灯時に回路にかなりの負担がかかるので、あまりに頻繁にon/offを繰り返さないでよいように計画的に使用してください。(撮影する度に画像解析を行わないで、それぞれまとめて行うようにする)
- レーザーシャーププログラムは大量のRAMを消費し、足りない分はハードディスクを仮想メモリとして使用します。通常ハードディスクに200メガバイト以上の空きがないとスムーズな動作が不可能になり頻繁にフリーズするようになります。またハードディスクに200メガバイト以上の空きがないとMO1枚分のコピーでも1時間近くの膨大な時間を費やすようになります。特にZ-seriesを撮影するとわずか数視野でMO1枚分の200メガバイトを越えてしまいます。現在ハードディスク上に約780メガバイトしか空きがありません。以上の理由から、**いかなる場合でもハードディスク上に撮影した画像ファイルを残しておくことを禁止します。**
- MO1枚分の画像ファイルがたまったら、その都度MOにコピーし、ハードディスクからそれらの画像ファイルを消去すると、処理スピードが低下せずスムーズに作業を継続できます。
- フォーカスマーターがonの時は、フォーカス調節つまみを手動で回さないでください。
- コンピュータの終了は必ずシャットダウンプログラムを起動後に行ってください。シャットダウンプログラムをせずにコンピュータの電源を落とすと、ハードディスクが損傷する恐れがあります。
- 画像ファイルを保存する際に、Comment欄にはピリオド(小数点も含む)は決して書き込まないでください。レーザーシャーププログラムが認識しなくなります。
- モニタの輝度色調などの設定は、カメラ撮影装置にあわせていますので絶対に変えないでください。
- カメラ撮影装置の撮影ボタン以外のスイッチには手を触れないでください。(現在Kodakエクタクローム100、および各種35 mmモノクロフィルムに設定をあわせています)
- レーザーコンフォーカル顕微鏡使用時に何か異常な点がありましたら、必ず管理者(細胞構造・鈴木健史・内線8842)に連絡してください。
- 使用後に下記の作業を行ってください。
 - ・ 使用記録帳に記録する。
 - ・ 対物レンズのオイルを拭き取る。
 - ・ 接眼レンズのカバーをする。
 - ・ ノマルスキー用のU-AM・U-DICTフィルターを差し込む。
- 初めて使う人は、ログインネームとパスワードを登録し、使用上のルールを説明しますので管理者に依頼してください。(複数の人間で一つの登録を使い回さないでください)

. Power on

- ◇ 右下の無停電装置のメインスイッチを入れる。
- ◇ レーザー電源の鍵を90°右にまわす。
- ◇ 必要に応じて水銀ランプ・顕微鏡のスイッチを入れる。

. レーザーシャープの起動

- ◇ モニタの画面の下方にあるフローティングパレットにある「Acquisition」アイコンをクリックし、レーザーシャーププログラムを起動する。

- ◇ レーザーを使用しない場合、となりの「Processing」アイコンをクリックする。（別のプログラムが立ち上がる。すでにAcquisitionで起動している場合そちらを使った方がよい。両方のプログラムが起動した状態では動作スピードが落ちる）
- ◇ LoginウィンドウのLogin name欄の右端にある三角印のボタンをクリックし、自分のLogin nameを選択する。
- ◇ Passwordを入力しAcquisition画面を起動する。

． Acquisition画面の設定

右上段画面の撮影設定（Image Collection）

- ◇ Speed = スキャンスピード．通常はNormalでよい．Slowを選択すると約3倍の時間をかけてスキャンするので、弱いシグナルを観察するときに効果的であるが、退色が速くなり電氣的ノイズを受けやすくなる。
- ◇ Collection Filter = DirectまたはKalman．（通常はDirectでよい）
DirectでNが1の場合、1回スキャンしたデータがそのまま表示される．退色を抑えることができるがノイズが混入することがある．KalmanでNが3の場合、3回のスキャンの平均データが表示される．ノイズの少ない画像が得られるが退色は速くなる．z-シリーズの撮影にはむいてない。
- ◇ Objective = 対物レンズに必ずあわせる．
対物レンズにあわせないとスケール計算ができなくなるだけでなく、フォーカスマーター作動時に対物レンズを傷つける恐れがあるので注意する。
- ◇ Factor = 1
- ◇ N = スキャン回数．
Directの場合は1，Kalmanの場合には2以上の適当な数にする．
デフォルトでは0になっているので注意する．0の場合、レーザーを照射すると、手動でレーザーをストップするまで照射し続けてしまう。
- ◇ zoom = 対物レンズによって最大ズーム倍率が決まっている．
100倍油浸の場合、1.5倍まで．このズームは光学的ズームなので解像度を高くすることができるが、スキャンする面積が小さくなるため退色が速くなる．ズームによって大きくしたい視野はPanパネルの矢印ボタンを押すことによって設定できる。
- ◇ Pan = 視野を移動させるコントロールパネル．
ズームする視野を設定したり、ボックスサイズを大きくしているときにモニタに表示する視野を設定できる．中央の・ボタンを押すと視野を中央に戻すことができる。

右中段画面のポジション設定（Focus Motor）

- ◇ ラジオボタンをonにするとフォーカスマーターが作動可能になり、offにすると解除される．顕微鏡観察時には必ずoffにすること。
- ◇ Position = 現在の位置．上あるいは下矢印をクリックすることによってサンプルステージの位置を上下に移動できる．フォーカスマーターを解除すると0.00に戻る。
- ◇ Z-step = フォーカスマーターを作動させるときの1クリックごとのPositionの移動距離，あるいはZ-seriesを撮影するときのオプティカルセクション間の距離の設定。

Z-seriesを撮影するときには下記の設定を行う

- ◇ Z-start = Z-seriesを撮影するときのスタート位置の設定．フォーカスマーターで任意のポジションを決定し、F7 Z-startのボタンをクリックするとそのポジションをスタート位置に設定できる．フォーカスマーターを解除した後は設定し直す必要がある。
- ◇ Z-stop = Z-seriesを撮影するときのストップ位置の設定．フォーカスマーターで任意のポジションを決定し、F7 Z-stopのボタンをクリックするとそのポジションをストップ位置に設定できる．フォーカスマーターを解除した後は設定し直す必要がある。

右中下段画面のポジション設定（DEFAULT）

- ◇ PMT = 3本のフォトマルチプライヤーチューブ（Photo Multiplier Tube = 光電管）の各種設定を行

うコントロールパネルを表示させる。

- ◇ Transmission = 顕微鏡下部に装備している透過光検出器 (Transmitted Light Detector = TLD) の設定を行うコントロールパネルを表示させる。この設定で、ノマルスキー像などの明視野像をとることが可能となるが、きれいな像はとれない。
- ◇ Mixer = 赤・緑・青の3つのミキサーにどのフォトマルチプライヤーチューブの像を割り当てるのかを設定するコントロールパネルを表示させる。

□ ここより下の設定 (Laser , PhotoMultiplierTube 1 ~ 3 , Mixer) は、最上段のメニューバー内にある Setting で、色素名を選択することによって自分の設定を呼び出すことができる

右中下段画面のポジション設定 (Laser)

- ◇ Excitation Filterを左のボタンを押して選択する。
 - 488 nm = FITC系色素の励起に使用 (FITC , DTAF , SYBR Green I など)
 - 568 nm = ローダミン系色素の励起に使用 (TRITC , Cy3 , PI , YO-PRO-1 など)
 - 647 nm = Cy5系色素の励起に使用 (Cy5 , TO-PRO-3 , TOTO-3 など)
 - 488+568 = FITC系色素とローダミン系色素を同時に励起できる。蛍光の漏れに注意が必要。
 - All Lines = 488 , 568 , 647 nm の 3 つの励起光を同時に照射する。一回のスキャンで3重染色したサンプルの蛍光像を同時にとらえることができるが、退色が速く蛍光漏れが発生しやすいので注意が必要。
- ◇ Power = 照射するレーザーの強度を調節する。
 - 100% , 30% , 10% , 3% , 1% , 0.3% の光を通すNDフィルターによって、レーザー光の強度を調節する。100% レーザーの場合、シグナルが明るくなるが退色が速くなるだけでなく、他の蛍光色素を励起しやすく蛍光漏れが発生しやすい。逆にレーザーパワーを落とすとシグナルが弱くなるが蛍光は長持ちし蛍光漏れも抑えられる。

Photo Multiplier Tubeの設定 (PhotoMultiplierTube 1 ~ 3)

フィルターの選択

- ◇ PhotoMultiplierTube 1 = 585EFLPと605DF32の蛍光フィルターを装備している。
 - ローダミン系の赤い蛍光を観察できる。
 - 585EFLP = 585 nm 以下の波長をカットし585 nm 以上の赤い蛍光を通すフィルターで、明るいがファーレッドの色素と2重染色している場合には蛍光漏れが発生しやすいので注意が必要。
 - 605DF32 = 605 nm を中心にして上下約32 nm の波長を通過させるバンドパスフィルターで、585EFLPよりは暗いがファーレッドの蛍光色素との2重染色を行っているときにはこのフィルターを使う。
- ◇ PhotoMultiplierTube 2 = 522DF32の蛍光フィルターを装備している。
 - FITC系の緑の蛍光を観察できる。
 - 522DF32 = 522 nm を中心にして上下約32 nm の波長を通過させるバンドパスフィルター。
- ◇ PhotoMultiplierTube 3 = 680DF35の蛍光フィルターを装備している。
 - Cy5系のファーレッドの蛍光を観察できる。
 - 680DF35 = 680 nm を中心にして上下約35 nm の波長を通過させるバンドパスフィルター。

各種設定

- ◇ Iris = 共焦点像を得るためのピンホールの大きさを設定できる。
 - 通常2.0 ~ 3.5で使用する。
 - 0.7 ~ 8.0 mm のあいだで0.1 mm 刻みで設定できる。小さくするとオプティカルセクションの厚さを薄くできよりシャープな像が得られるが、暗くなる。逆に大きくすると明るい像が得られるが、オプティカルセクションの厚さが厚くなり共焦点性が失われる
- | | | |
|----------------|----|-----|
| Iris | 小 | 大 |
| 画像の明るさ | 暗い | 明るい |
| 共焦点性 | 強い | 弱い |
| オプティカルセクションの厚さ | 薄い | 厚い |
| 画質 | 良い | 悪い |

- ◇ Gain = 増幅率 .
PhotoMultiplierTubeに届いた信号をどのくらい増幅してから画面に表示するかの指標で , 通常 900 - 1500に設定する .

Gain	小	大
画像の明るさ	暗い	明るい

- ◇ BLev. = Bluck Level . 通常0でよい .
Bluck LevelはPhotoMultiplierTubeに光が全く当たっていないときに , 真の黒色を表示するために使い , 顕微測光を行うときは厳密に調整する必要がある . バックグランドレベルを下げる時にも使用可能 . -5 ~ 5程度の間で変化させれば十分な効果が得られる .

BLev.	小	大
バックグランド	真黒	グレー
画像の明るさ	暗い	明るい

- ◇ Low Sig = シグナルが非常に弱いときにこのチェックボックスをクリックするとシグナル強度をデジタル処理によって増幅できる . コントラストがきつくなり , 像がざらつく傾向があるので注意が必要 .

Mixerの設定 (Mixer A, B, C)

- ◇ Mixer A = 赤い擬似カラーを割り当てるミキサーで , 通常ローダミン系の赤い色素のシグナルを割り当てる . ローダミン系の赤い色素は , PhotoMultiplierTube 1で検出するので , PMT 1 を100 (%) にし , PMT 2 とPMT 3 は0にする .
- ◇ Mixer B = 緑の擬似カラーを割り当てるミキサーで , 通常FITC系の緑の色素のシグナルを割り当てる . FITC系の緑の色素は , PhotoMultiplierTube 2で検出するので , PMT 2 を100にし , PMT 1 とPMT 3 は0にする .
- ◇ Mixer C = 青い擬似カラーを割り当てるミキサーで , 通常Cy5系のファーレッド色素のシグナルを割り当てる . ファーレッドの色素は , PhotoMultiplierTube 3で検出するので , PMT 3 を100にし , PMT 1 とPMT 2 は0にする .
- ◇ 他のPhotoMultiplierTubeで検出すべきシグナルが漏れている場合には , そのチューブの値を-10 ~ -20程度にすると蛍光漏れを解消することができる . このテクニックを利用する際には , 十分なコントロール染色をしておかないと , 共局在を見誤る恐れがあるので注意する .
- ◇ Mix Mode = 通常はPMT (PhotoMultiplierTube) でよい . 使わない色 (ミキサー) に Transmissionモードで撮影する明視野像を割り当てたいときには , TLD (Transmitted Light Detector) にする .

Transmitted Light Detector (TLD) の設定

- ◇ Gain = 増幅率 .
TLDに届いた信号をどのくらい増幅してから画面に表示するかの指標 .

Gain	小	大
画像の明るさ	暗い	明るい

- ◇ BLev. = Bluck Level .

BLev.	小	大
バックグランド	真黒	グレー
画像の明るさ	暗い	明るい

- ◇ TLDを使うときは , 顕微鏡の右下奥 (フォーカスモーターの奥の方) にあるレバーを下げてTLDへの光路を開く .
- ◇ 微分干渉フィルターをセットし , レーザーを照射しながら干渉板の向きや絞りを調整してよく見えるところを探す .

メニューバーでの設定

- ◇ Box = 撮影する視野のピクセル数を設定する .
通常512 × 512でよいが , 論文掲載用などの高解像度の写真が必要なときは1024 × 1024にする .

- ◇ Setting = 各蛍光色素にあわせたLaser , Photo Multiplier Tube , Transmitted Light Detector , Mixerの各種設定を登録保存する .
Irisの大きさやGainなど視野ごとに変化させる必要のある設定は , プルダウンメニューにあるSaveコマンドでその都度保存する . (これを忘れると , Setteingを変えたときに元の設定に戻るので注意)

表示画面の切り替え

- ◇ 表示画面をダブルクリックすると全面モードとマルチチャンネルモードを切り替えられる .
- ◇ 全面モードでは1024×1024のボックスサイズの画像をほぼ全部表示できるが , 1チャンネルのみの表示になる .
- ◇ マルチチャンネルモードでは512×512のボックスサイズの画像をほぼ全部表示でき , Mixer A~Cまでと3色をマージしたフルカラーのチャンネルの4チャンネルを同時に表示する . 1024×1024のボックスサイズの画像では1/4の面積しか表示されない . この時 , 表示したい視野はPanコントロールパネルで選ぶ .

．サンプルの撮影

顕微鏡をセットアップし , サンプルを観察しレーザー顕微鏡で撮影する視野を探す .

- ◇ フォーカスマーターは必ずoffにしておくこと . (キーボードのMボタンを押すとフォーカスマーターのOn/offを切り替えられる)

光路の切り替え

- ◇ ノマルスキー微分干渉像用のU-AM・U-DICTを抜く .
- ◇ キューブを" "にする .
- ◇ 接眼レンズユニットの右側の棒を引き抜き , 光路を接眼レンズからカメラに切り替える .

Settingメニューで色素を選択する

- ◇ Cy5 Single/FITC Single/Rhodamine Singleを撮りたい蛍光にあわせ選択する .

レーザースキニング

- ◇ ImageCollectionウィンドウの上にあるボタンバー内の「太陽マーク」のアイコンをクリックする .
- ◇ あるいはスペースバーを一回押す . (「太陽マーク」のクリックに対応する)
- ◇ space barで撮影できないときは「太陽マーク」のクリックで撮影すると次からはスペースバーでとれるようになる .
- ◇ フォーカスマーターをonにし , Positionを上下させ , その都度にスキャンし最もよいイメージを選ぶ .
- ◇ 撮影設定でNを0にした場合 , 「太陽マーク」のアイコンをクリックするとレーザーが照射し続ける . これを止めるためには , もう一度「太陽マーク」のアイコンをクリックすればよい .

画像の保存

- ◇ ボタンバーの「フロッピー」のアイコンをクリックしSaveウィンドウを呼び出す .
- ◇ 多重染色の場合 , Filenameは一時的にARED/AGREEN/ABLUEにしておくといよい . (2回目以降は , 上書きしてよいかというエラーメッセージが表示されるようになるので , その都度OKのボタンを押し上書き保存する . この場合 , Commentは空白のままにする)
- ◇ このSaveをしないで次のスキャンを行うと , 前の画像は失われるので注意 .
- ◇ 後でマージする必要のない画像 (シングル染色像など) は , ここで正式のファイルネームを付けて保存する . この場合 , ファイルネームは英数字で6文字以内にする . それを超える情報はCommentに書き込む .
- ◇ Commentには絶対にピリオド (小数点を含む) を使用してはいけない . (Commentにピリオドを入れるとレーザーシャーププログラムで読めなくなってしまう)
- ◇ Commentの例 . (できるだけ細かいところも書き込んだ方が後でわかりやすい)

980501 Rat Kidney GLUT5 (Signal-) No,1
Iris = 2,7 (小数点を使いたいときはコンマを使う)
red = rabbit anti-rat GLUT5 antibody (LRSC)
zoom = 1,5

ボタンバー右端にある「太陽マーク」をクリックしAcquisition画面に戻り、次の撮影を行う。

. Z-seriesの撮影

Z-start・Z-stopの設定

- ◇ 視野を選び、Positionを変えながら、スキャンする。
- ◇ サンプルの上限と下限を見つけ、そのポジションでZ-startボタンあるいはZ-stopボタンを押し、オプティカルセクションの開始点と終了点を設定する。(多重染色の場合、それぞれの色素で上限と下限を確認しておく)
- ◇ 設定したら撮影終了までフォーカスマータをoffにはいけない。

Z-seriesの撮影

- ◇ メニューバーのCollectをクリックし、プルダウンメニューから Z/Time/Sequential Seriesを選択し、Z-series Parameter設定ウィンドウを呼び出す。
- ◇ Z-series Parameter設定ウィンドウのOptionsボックス内のSave to fileのチェックボックスをチェックする。
- ◇ Save asをクリックしFilenameウィンドウを呼び出す。
- ◇ 保存したい画像が赤いチャンネル (Save outputボックスでMixer Aがチェックされている) ならば "ARED", 緑 (Mixer B) ならば "AGREEN", 青 (Mixer C) ならば "ABLUE" と仮のファイルネームをつける。OKボタンを押しZ-series Parameter設定ウィンドウに戻る。
- ◇ Z-start, Z-stop, が設定したとおりになっているか確認する。
- ◇ Number of imagesに示されている数字がオプティカルセクションの枚数となる。希望するオプティカルセクション数にするために、Z-stepをここで調整する。
- ◇ OKボタンを押すと自動的にZ-seriesを撮影し始める。
- ◇ 多重染色の場合、同じ視野、同じZ-series設定で、Settingで色素だけを選択しなおして各チャンネルの像を撮影する。
- ◇ 多重染色の場合、Processing画面に移行しマージし正式のファイルネームを付ける。

. 多重染色の画像の重ね合わせ (マージ)

画像の重ね合わせ

- ◇ 同じ視野 (Positionも) でSettingで色素をかえて赤, 緑, 青の3枚 (あるいは赤, 緑の2枚) の像を撮影する。
- ◇ 同一視野で全種類の画像取り込みが済んだら、右上の「3D」のアイコンをクリックし、Processing画面に移行する。
- ◇ 最後に取り込んだ画像が残っているので閉じる。(ウィンドウ左上隅のボタンをダブルクリックするか、シングルクリックの後にCloseを選ぶ)
- ◇ 左上のボタンバー内の3色の紙が重なっているアイコンをクリックし、Pic Merge画面を呼び出す。
- ◇ Red/Green/Blueのファイルを選択する。(この時File NameをARED等にしてあると常に最上段に目的のFileが出てくるのでさがす手間が省ける)
- ◇ Mergeボックスで、3色の場合は3 pics, 2色の場合は2 picsのラジオボタンをチェックする。
- ◇ Createボックスは常に24 bitのラジオボタンをチェックする。
- ◇ OKボタンを押し、マージ像を作製する。

マージ像の保存 (一時的にARED等と名付けたファイルに、本当のファイルネームを付ける)

- ◇ メニューバーからSave asを選び、Saveウィンドウを呼び出す。

- ◇ ファイルネームは英数字で6文字以内にする．それを越える情報はCommentに書き込む．
- ◇ Commentには絶対にピリオド（小数点を含む）を使用してはいけない．（Commentにピリオドを入れるとレーザーシャーププログラムで読めなくなってしまう）
- ◇ Commentの例．（できるだけ細かいところも書き込んだ方が後でわかりやすい）
 - 980501 Rat Kidney GLUT5 (Signal-) No,1
 - Iris = 2,7（小数点を使いたいときはコンマを使う）
 - red = rabbit anti-rat GLUT5 antibody (LRSC)
 - green = FITC-phalloidin
 - blue = TOPRO3
 - zoom = 1,5
 - Z-step = 0,5 μm

．レーザーシャープの終了

- ◇ ボタンバー右端にある「太陽マーク」をクリックし，Processing画面からはAcquisition画面に戻る．
- ◇ メニューバーの左上隅の緑のボックスをダブルクリックする，あるいはシングルクリックの後にCloseを選ぶ．
- ◇ Loginウィンドウが開いたら，「Close LaserSharp」ボタンを押す．
- ◇ 自分の撮影した画像はハードディスクに入れたままにしてはいけない．必要なファイルは自分のMOディスクにコピーし，ハードディスクのファイルは必ず消去すること．

注意：

レーザーシャーププログラムは大量のRAMを消費し，足りない分はハードディスクを仮想メモリとして使用します．通常ハードディスクに200メガバイト以上の空きがないとスムーズな動作が不可能になり頻繁にフリーズするようになります．またハードディスクに200メガバイト以上の空きがないとMO1枚分のコピーでも1時間近くの膨大な時間を費やすようになります．特にZ-seriesを撮影するとわずか数視野でMO1枚分の200メガバイトを越えてしまいます．現在ハードディスク上に約780メガバイトの空きがありますが，半日の仕事でこれ以上の画像を撮影することもしばしばあります．以上の理由から，**いかなる場合でもハードディスク上にファイルを残しておくことを禁止します**．また，使用中もMO1枚分のデータがたまったらMOにコピーし，その都度ハードディスクを空にすることを勧めます．

．撮影した画像のMOへの移動

MOの準備

- ◇ MOはDOS/Vフォーマット済みの230メガバイトのものを使用する．（Windowsフォーマットでもよい．これらのディスクはMacintoshでの読み書きが可能で，PhotoShop等で画像を加工したいときに都合がよい．未フォーマットのディスクも本システムで初期化すれば使用できるが，Macintoshでの読み書きができなくなるので注意）

ディレクトリの作製

（下記の方法で作製したディレクトリ以外はレーザーシャープで認識されないので注意．OS/2モードで作製したフォルダにファイルを移動することはできるが，このフォルダ内のファイルはレーザーシャープで認識されなくなる）

- ◇ OS/2画面を呼び出す．（レーザーシャープ画面左上隅の小さい四角印のボタンをクリックする．あるいはレーザーシャーププログラムを終了する）
 - ◇ フォーマット済みのMOをコンピュータに挿入する．
 - ◇ フローティングパレットにある「OS2 window」をクリックし，DOS画面を呼び出す．
- 新しいMOを初めて使用するとき．
- ◇ e: と入力しリターンキーを押しEドライブ（MO）に入る．

- ◇ md SUZUKI (=スペース, =リターン, md = make directory ; 「SUZUKI」というフォルダを作製する)
- ◇ cd SUZUKI (cd = change directory ; 「SUZUKI」フォルダに入る)
- ◇ md 980501 (「SUZUKI」フォルダ内に「980501」という日付フォルダをつくる)
- ◇ exit (終了し, OS/2画面に戻る)

これまで使用していたMOに新しい日付フォルダを加えたいとき.

- ◇ e: (Eドライブに入る)
- ◇ cd SUZUKI (「SUZUKI」フォルダに入る)
- ◇ md 980502 (「SUZUKI」フォルダ内に「980502」という日付フォルダをつくる)
- ◇ exit (終了し, OS/2画面に戻る)
- ◇ フローティングパレットにある「Drive E」ボタンをクリックし、MO内にフォルダがつけられたか確認する.

画像ファイルのMOへの移動

1, ファイルマネージャプログラムの起動

- ◇ フローティングパレットにある「File Manager」ボタンをクリックしFile Manager画面を呼び出す.
- ◇ メニューバーから「window」を選択し、「New window」を選ぶ.
- ◇ 画面上に2つのウィンドウが呼び出されている状態にする.
- ◇ 「window」から「Tile」を選択する。(2つのウィンドウがきれいに並べられる)
- ◇ 片方のウィンドウのボタンバーから「e:」を選択し、MOを呼び出す.
- ◇ MOウィンドウ内の自分の名前フォルダをダブルクリックしフォルダを開く.
- ◇ 本日の日付フォルダをダブルクリックし、右側のウィンドウに内容を表示させる。(この時点では中身は空になっている)

2, MOへのコピー

- ◇ Cドライブ(ハードディスク)のウィンドウの「LS_USER」フォルダをダブルクリックし、登録ユーザーフォルダを表示させる.
- ◇ 自分のフォルダをダブルクリックする.
- ◇ 自分のフォルダ内にある「Images」フォルダをダブルクリックし、撮影した画像ファイルを表示させる.
- ◇ 保存したいファイルを選択する。(複数のファイルを選択するときはshiftキーを押しながらクリックする.最初に選択したファイルとshiftキーを押しながら選択したファイルに挟まれたファイル全てが選択される.離れている複数のファイルを,それぞれ選択することはできない)
- ◇ 画面左下に選択したファイルの総数と容量が表示されるので、MOの残量内であることを確認する。(MOの残量はMOウィンドウをクリックしアクティブにすると左下に表示される)
- ◇ 選択されたファイルを、MOウィンドウの右側のウィンドウにドラッグする.
- ◇ コピーが始まる.200メガバイトで通常15~20分かかる。(ハードディスクに十分な余裕がないと膨大な時間を費やすので注意)
- ◇ 終了したらMO挿入部位の右下のボタンを押し、MOを取り出す
- ◇ 保存したいファイルがさらにあるときは、新しいMOを挿入しコピーする.

3, ハードディスクに残っている画像ファイルの消去(作業終了時に必ず行うこと)

- ◇ ハードディスクに残っている画像ファイルを選択する.
- ◇ メニューバーのFileプルダウンメニューからDeleteを選択する.
- ◇ 以後指示に従って消去する.(Yes to allを選択すると一気に消去してくれる)

4, ファイルマネージャプログラムを終了する

- ◇ 画面左上隅のボックスをダブルクリックする.あるいはシングルクリックしてCloseを選択する.

. Macintoshで読めるファイルへの変換

レーザーシャーププログラムのProcessing画面を呼び出す.

- ◇ レーザーシャープが起動しているときはAcquisition画面のボタンバーにある「3D」をくりくす

る。レーザーシャープが起動していないときはOS/2画面のフローティングパレットにある「Processing」ボタンをクリックする。

画像の変換

- ◇ ボタンバーの左端のFile Openのアイコンをクリックし、変換したい画像を呼び出す。
- ◇ メニューバーのFileプルダウンメニューのExportを選択する。
- ◇ Save As Filname欄の星印のところに新しいファイル名を記入する。(英数字6文字まで)
- ◇ File extension欄にApple Computer PCT format (PCT)を選択する。
- ◇ DriveはEを選択する。(後でMOにコピーする場合はCドライブのままでもよい)
- ◇ Saveボックスの適当なラジオボタンをチェックする。(Z-seriesの全てのSectionの変換にはかなりの時間がかかる。Z-series全てをMacintoshに移しても、3次元解析はMacintoshのプログラムでは行えないので、レーザーシャーププログラムで3次元解析済みの画像のみをプレゼンテーション用にPCTファイルに変換する)
- ◇ Multi-Image Outputボックスの適当なラジオボタンをチェックする。
- ◇ PaneボックスのMをチェックする。(M=Merge像、単色の画像の時はその色をチェックする)
- ◇ OKボタンを押す。画像の変換にはかなり時間がかかる。
- ◇ 変換した画像はMacintosh・PhotoShop等の画像解析プログラムで加工できる。

・コンピュータの終了(コンピュータの終了は必ずシャットダウンプログラム実行後行ってください)

- ◇ レーザーシャーププログラムを終了し、OS/2画面に戻る。
- ◇ フローティングパレット左下隅にある「Shut down」ボタンを押す。
- ◇ Shut down is completedと書いてあるメッセージウィンドウが表示される。
- ◇ 右下の無停電装置のメインスイッチを約1秒間押し電源を切る。

・コンピュータがフリーズしたとき、あるいはレーザーシャーププログラムが突然終了してしまったときの対処法

- ◇ コンピュータがフリーズしたとき。
 - ・ [Ctrl]・[Alt]・[Delete]の3つのキーを同時に押して、強制的に再起動させる。
 - ・ コンピュータが再起動したら、フローティングパレットの「Shut down」ボタンを押す。
 - ・ Shut down is completedと書いてあるメッセージウィンドウが表示される。
 - ・ 右下の無停電装置のメインスイッチを約1秒間押し電源を切る。
 - ・ 1~2分待ち、コンピュータを起動させる。
 - ・ プログラムを起動し、作業をやり直す。
- ◇ レーザーシャーププログラムが突然終了してしまったとき。
 - ・ フローティングパレットの「Shut down」ボタンを押す。
 - ・ Shut down is completedと書いてあるメッセージウィンドウが表示される。
 - ・ 右下の無停電装置のメインスイッチを約1秒間押し電源を切る。
 - ・ 1~2分待ち、コンピュータを起動させる。
 - ・ プログラムを起動し、作業をやり直す。

[Ctrl]・[Alt]・[Delete]の強制再起動だけでも作業に戻れるますが、フリーズや突然のプログラム終了などの症状が頻繁に起きやすい状態のままです。一回電源を落として再起動させた方が安定して作業が行えます。また、特定の作業によって、ほとんど必ずフリーズしてしまうことがあります。プログラム上のバグですので、ノートに記録するか管理者に報告してください。メーカーにソフトウェアの改善を要求する際の参考にします。