

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08827

研究課題名(和文) 機械学習・人工知能による多剤耐性菌のモデル化と自動判別技術開発

研究課題名(英文) Discrimination of multi-drug resistant bacteria by machine learning.

研究代表者

西野 美都子 (Nishino, Mitsuko)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：30510440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多剤耐性菌の出現は現代の世界的な問題であり、感染症を克服することは医学的重要課題の一つである。耐性菌の出現を抑制する手法を開発することは急務であると共に迅速な検出法の開発が求められている。本研究は、細菌の多剤耐性化過程において形態学的変化が生じていることに着目し、機械学習を用いて耐性菌の画像判別法を確立することを目的とした。エノキサシン耐性菌株を用いて電子顕微鏡画像の機械学習判別の開発に取り組んだ結果、90%以上の高い精度で画像判別が可能な学習アルゴリズムの構築に成功した。さらに、耐性菌の構造的特徴を抽出し可視化させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多剤耐性菌による感染症は世界的な問題であり、医療現場において耐性菌の出現を予測し感染拡大防止を講じる対策法の開発が重要な課題となっている。本研究は人工知能による画像識別法を用いて薬剤耐性菌の自動判別を行う学習アルゴリズムの構築に成功した。この成果により、多剤耐性化プロセスで生じる形態の変化から耐性菌の出現を予測し、院内感染拡大予防に役立つ情報基盤が提供できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The emergence of multidrug-resistant bacteria is a global problem of today, and overcoming infectious diseases is one of the important medical issues. There is an urgent need to develop a method for suppressing the emergence of resistant bacteria, and a rapid detection method is required. The purpose of this study is to establish the image discrimination method of resistant bacteria using machine learning, paying attention to the morphological changes occurring in the process of multidrug resistance of bacteria.

As a result of working on the development of machine learning discrimination of electron microscope images using enoxacin resistant strains, we succeeded in image discrimination with accuracy of 90%. Furthermore, we succeeded in extracting and visualizing the structural features of resistant bacteria.

研究分野：細菌学、細胞生物学

キーワード：多剤耐性菌 電子顕微鏡 機械学習

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、複数の抗生物質への耐性をもつ病原菌(多剤耐性菌)の出現が世界的に大きな問題となっており、医療現場において、簡便かつ迅速に多剤耐性菌が検出できる方法や、耐性菌の出現を逸早く予測し感染拡大防止を講じる対策法の開発が急務な課題となっている。細菌の薬剤耐性化は、抗生物質の持続的投与により細菌に突然変異が生じる事で引き起こされる。多剤耐性菌を克服するためには、細菌の薬剤耐性化機構および、耐性菌が出現するメカニズムを理解し、それらを抑制する新しい手法を開発することが急務となっている。一方、細菌の多剤耐性化へのプロセスは、ゲノムや薬剤排出トランスポーター等耐性化に関わる因子、細胞状態の変化が複雑に絡み合っており、その全貌は未だ理解されていない。

2. 研究の目的

多剤耐性菌による感染症を克服することは医学的重要課題の一つであるが、多剤耐性菌が出現するメカニズムについては未知な点が多く、世界で様々な研究が行われる。このような背景において、我々は細菌が薬剤耐性を獲得する過程で形態学的変化が生じていることに着目した。薬剤耐性化過程でどのような遺伝子の変化により細菌の形態が変化するのは生物学的に興味深い問題であるが、明らかにされていない。さらに、形態変化と遺伝子の関係を解明するためには、菌株間の形態学的差異や特徴を定量的に評価する必要がある。我々は、薬剤耐性能を持たない感受性菌株と薬剤耐性菌株との形態学的相違点を明らかにするため、電子顕微鏡を用いてこれら菌株の多量の形態情報を取得し、機械学習による画像判別法を確立することを目的とした(図1)。そして、耐性化過程で生じる遺伝子的、形態学的変化に関わる情報を取得し、機械学習によるこれらの情報の融合とモデル化を行い、人工知能による薬剤耐性能自動判別技術基盤を構築することを目指す。

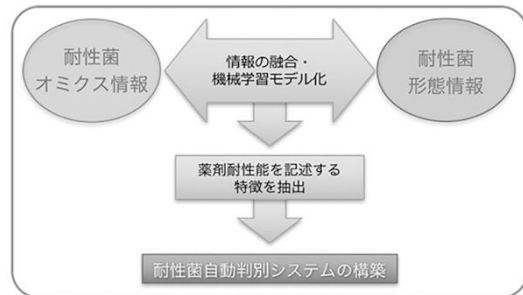


図1. 機械学習による耐性菌判別技術開発

3. 研究の方法

多剤耐性菌について、連携研究者である理化学研究所・古澤力研究グループにより作成された耐性菌進化株(Suzuki *et al*, *Nat. Commun.* 2014)を用いて実験を行なった。まず、作用機序の異なる4種の薬剤(エノキサシン、アミカシン、セフィキシム、クロラムフェニコール)に対する耐性菌株をM9培地にて培養後、光学顕微鏡を用いて観察した。その結果、エノキサシン耐性株について、非耐性株と比較して概形が顕著に球形に変化していることが判明した。次に、エノキサシン耐性株の形態の詳細について電子顕微鏡を用い解析した。

電子顕微鏡観察するためには試料を固定する必要がある。そこで本解析に適した固定法を検討した。まず、生物試料の固定に一般に広く用いられている化学固定を試みた。菌株を培養後、グルタルアルデヒド固定またはケレンベルガー法固定(R-K固定法)を行い、エタノール脱水の後エポン樹脂包埋した。それぞれのエポンブロックから厚さ80nmの切片を作成し重金属にて染色後に電子顕微鏡観察を行った。その結果、細菌の内部構造の一部欠落や破壊が認められた。これは大腸菌が細胞壁を有しているため、固定剤の浸透性が悪く内部構造の保持が不良であると考えられた。次に、先端的固定法である急速凍結固定法を検討した。急速凍結固定は連携研究者である蛋白質研究所(現筑波大学)・岩崎憲治博士の協力を得て、同研究所に設置されている圧急速凍結装置・凍結置換装置を用いて行った。それぞれの株について複数回凍結固定を行い、凍結置換後にエポン樹脂包埋した。3種類の固定法により作成された非耐性菌試料の電子顕微鏡画像を図2に示す。エポンブロックから作成した切片を観察した結果、均一な細菌膜構造と内部構造が観察され、化学固定に見られたような構造の一部欠落や破壊は認められなかった。したがって、凍結固定は化学固定よりも内部構造の保持が良好であると結論づけられた。以上の結果から、細菌の電子顕微鏡

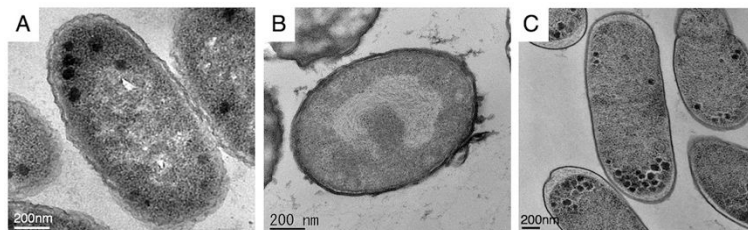


図2. 異なる固定法による非耐性菌の断面像の比較 (A) グルタルアルデヒド固定, (B) R-K 固定, (C) 加圧急速凍結固定

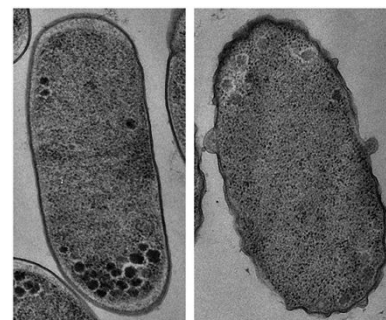


図3. 非耐性菌(左)とエノキサシン耐性菌(右)の電子顕微鏡像

解析のための試料作成において、加圧凍結装置・凍結置換装置が有効であると判断し、以降、この方法を用いて作成した試料で解析を行うこととした。電子顕微鏡観察の結果、非耐性菌と比較してエノキサシン耐性菌において外膜の形状が異なっていることが示唆された(図3)。

次に、エノキサシン耐性株と非耐性株(親株)のサンプルから多量の電子顕微鏡画像を取得し機械学習による判別を試みた。画像判別には産業科学研究所・青木工太博士(連携研究者)の協力を得た。エノキサシン耐性株4株、非耐性菌からそれぞれ複数個のエポブロック用いて超薄切片を作成し、フォームパール支持膜とカーボン蒸着を施したグリッドに回収した。電子顕微鏡画像はCCDカメラを用いて撮影し、自動連続撮影ソフトウェア(Shot Meister)を用いた。1グリッドあたりおよそ200枚撮影し、グリッドごとの染色のバラツキをカバーするために1試料(ブロック)あたり5枚のグリッドから撮影した。エノキサシン耐性菌株4系統を1ブロックずつ、親株を2ブロック、計6ブロックを1データセットとし、3セット作成した。これらデータセットを用いて各セットをトレーニングデータとテストデータで入れ替え、3分割交差検証を行い、試料作成で生じる画像データのバラツキに対しての頑健性を評価した。元画像から細胞部分を50%以上含む領域のパッチ画像を多数作成し機械学習判別に用いた。さらに、機械学習より出力された特徴から判別の根拠となった構造をGrad-CAM(Gradient-weighted class activation mapping)により可視化させた。

4. 研究成果

上記の方法で取得した画像データセットを用いて、エノキサシン耐性菌株の識別を畳み込みニューラルネットワーク(CNN)を用いて行い、耐性菌株と非耐性菌株の2クラス判別を行った(図4)。100万枚のパッチ画像について、トレーニング用データとバリデーション用データからランダムに2万枚ずつ選択しミニバッチ学習を行った。学習の際に使用するネットワーク、AlexNetの各畳み込み層の最後に



図4. 画像判別に用いたCNNアーキテクチャー

Batch Normalizationを加えたものを使用した。パッチ画像をネットワークに入力し、3分割交差検証の各分割に対して精度および、感度、特異度、AUCを求めモデルの評価を行った。その結果、全ての項目について90%以上の評価精度を得ることができ、学習モデルがバラツキを含んだ画像データに対して頑健であることが明らかとなった。Grad-CAM法により判別の根拠となった注目領域を可視化させた結果、非耐性菌株においては、細胞内極部の顆粒構造が特異的に発火していた。一方で、エノキサシン耐性菌株について、多くが細胞膜に注目が集中し発火していた。また、一部の株においては、細胞膜に加えて内部構造も発火しており、この構造は必ずしも顆粒ではなかった。

以上、本研究により薬剤耐性菌は遺伝子のみならず、形態学的にも非耐性菌から変化していることが明らかとなった。そして、深層学習において、ノイズが多い電子顕微鏡画像の判別は困難であったが、本研究で初めて高い精度で耐性菌の画像判別に成功した。今後、この学習モデルを発展させることで、様々な耐性菌の画像判別やクラス分類、特徴抽出が可能になると考えられる。抽出された画像の特徴量と遺伝子情報を紐付けすることが今後の重要な課題であるが、それができるようになれば、多剤耐性化プロセスで生じる形態の変化から耐性菌の出現を予測することが可能となる。

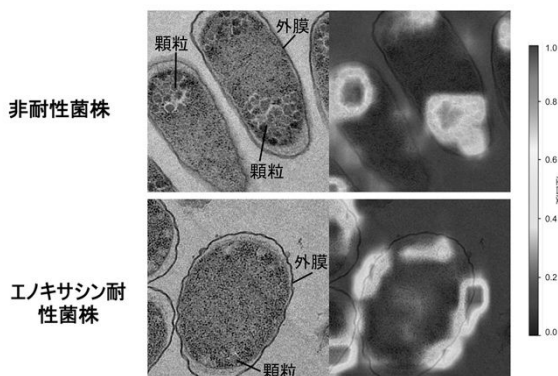


図5. Grad-CAMによる注目領域の可視化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato, A., Hayashi-Nishino, M., Shakuno, T., Masuda, J., Koreishi, M., Murakami, R., Nakamura, Y., Nakamura, T., Abe-Kanoh, N., Honjo, Y., Malsam, J., Yu, S., and Nishino, K.	4. 巻 7
2. 論文標題 The Golgin protein Giantin regulates interconnections between Golgi stacks.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front. Cell Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2019.00160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長野章宏、青木工太、西野美都子、福島愛子、岩崎憲治、古澤力、アンドレイ グルシニコフ、越後富夫、西野邦彦、八木康史
2. 発表標題 電子顕微鏡画像における薬剤耐性菌株の識別と形態的特徴の比較
3. 学会等名 第215回情報処理学会コンピュータビジョンとイメージメディア研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤あやの、杓野拓斗、西野-林美都子、西野邦彦
2. 発表標題 ゴルジタンパク質であるGiantinはゴルジ体ゾーンの形成に関与するか？
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuto Shakuno, Mitsuko Hayashi-Nishino, Kunihiro Nishino and Ayano Sato
2. 発表標題 A 3D modeling of Golgi stacks in giantin knockdown cells.
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayano Satoh, Hideyuki Suzuki, Mitsuko Hayashi-Nishino, Kunihiko Nishino and Yuta Nishina
2. 発表標題 Characterization of the novel inhibitor for protein secretion.
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長野章宏、青木工太、武内優奈、西野美都子、西野邦彦、古澤力、岩崎憲治、越後富夫、八木康史
2. 発表標題 量み込みニューラルネットワークを用いた電子顕微鏡像における薬剤耐性菌の識別
3. 学会等名 第207回CVIM研究発表会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	古澤 力 (Furusawa Chikara) (00372631)	国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー (82401)	
連携研究者	岩崎 憲治 (Iwasaki Kenji) (20342751)	大阪大学・たんぱく質研究所・准教授 (14401)	現筑波大学教授
連携研究者	青木 工太 (Aoki Kota) (90447532)	大阪大学・産業科学研究所・特任講師 (14401)	