

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05965

研究課題名（和文）バーチャルスライドを用いた牛呼吸器病症候群病理診断データベースの構築

研究課題名（英文）Construction of a database for histopathological diagnosis of bovine respiratory disease complex using whole slide images

研究代表者

木村 久美子（Kimura, Kumiko）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・グループ長

研究者番号：30391444

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：牛呼吸器病症候群（BRDC）の病理組織学的診断精度向上のために、バーチャルスライド（WSI）を用いたデータベースを構築した。111症例352枚の組織標本をWSI化し、それぞれの画像に症例の詳細情報や病理組織学的所見等のメタデータを付与した。収集症例は壊死性肺炎、化膿性肺炎、肉芽腫性肺炎および間質性肺炎など様々で、関与する病原体の組み合わせも多岐にわたっている。症例は農研機構の専用サーバに保存し、検索システムを使って症例検索が可能である。また、SSL-VPN接続によって外部から閲覧することが可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バーチャルスライド（WSI）はデジタルデータとして病理組織標本全体を観察することができる。すなわち成書に掲載されている典型病変の切り取り画像とは異なり、一枚の切片上の多様性を確認することができる。牛呼吸器病症候群では複数の要因が様々に関与し、複雑な病変を形成していることからWSIを活用したデータベースの構築は、過去の様々な症例の病理組織像を比較することを可能にし、病理学的診断の効率化および標準化が可能になる。また、それぞれの画像に症例の詳細情報、病理組織学的所見および病原検査結果等がメタデータとして付与されているため、病理組織学的検査の学習用資料としても活用が可能である。

研究成果の概要（英文）：To improve the accuracy of histopathological diagnosis of bovine respiratory disease complex (BRDC), a database using whole slide images was constructed. WSIs were created from 352 tissue specimens from 111 cases, and metadata such as case information and histopathological findings were added to each image. The collected cases varied from necrotizing pneumonia, purulent pneumonia, granulomatous pneumonia, and interstitial pneumonia to a wide variety of combinations of pathogens involved. WSI images and metadata were stored on the servers of the National Agriculture and Food Research Organization. Cases can be retrieved by a search system and viewed externally via an SSL-VPN connection.

研究分野：獣医病理学

キーワード：バーチャルスライド 牛呼吸器病症候群 データベース 病理組織学的診断 獣医病理

## 1. 研究開始当初の背景

牛の呼吸器病症候群 (BRDC) は、ウイルス、細菌等の感染性因子だけでなく、非感染性因子など様々な要因が複雑に関わり合って引き起こされる牛の呼吸器障害の総称である。BRDC は、環境ストレスや管理ストレスによって呼吸器粘膜の保護機能が脆弱化したところにウイルスあるいは細菌等が一次感染し、更に常在細菌等の二次感染によって重度の呼吸器障害を引き起こすことが多い。家畜共済統計によると、呼吸器系疾患による子牛の死廃頭数は、病傷事故頭数の約 40% を占めており、その経済的損失は大きい。例えば、肉牛の呼吸器系疾患による死廃事故の被害額は、少なく見積もっても肉牛生産規模全体の 2% にあたる 200 億円になるともいわれている。

BRDC には Bovine herpesvirus 1, Bovine parainfluenza virus 3, Bovine respiratory syncytial virus (BRSV), Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), Bovine adenovirus, Bovine coronavirus, *Pasteurella* spp., *Mannheimia* spp., *Histophilus somni*, *Trueperella pyogenes*, *Mycoplasma* spp. など様々な病原体の関与が知られており、これらが複合的に感染することによって重篤化する。呼吸器系疾患を正しく診断し対策を講じることは、呼吸器系疾患による死廃頭数を減らすことに繋がる。

しかし、複数の病原体が混合感染している BRDC では、分離される病原体と病理学的所見が一致せず、確定診断に至らない症例も多く認められる。例えば、多種類のグラム陰性菌とグラム陽性菌が病理組織切片上に混在して確認される症例では、病原学的検査において一部の病原体のみが検出される事例が多く、複雑な病理組織学的特徴から、検出されなかった関連病原体を類推することは非常に難しい。

現在普及しているほとんどの病理アトラスは、典型病変の限局的な画像を掲載しているため類似疾病の検索や診断への活用が難しい。近年開発されたバーチャルスライドシステムでは、病理組織標本全体を観察することが可能であり、病変の多様性を確認できる。病因の特定が困難な BRDC 症例について、病理組織学的所見から検索可能なデータベースの構築は、過去の症例と病理組織所見を比較でき、病理学的診断の効率化および標準化が可能になると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、病理組織学的所見が複雑な BRDC をターゲットとして、病理組織像を比較できるバーチャルスライドデータベースを構築し、組織所見から容易に類似疾病の抽出を可能にすることである。組織所見をキーワードとして、家畜疾病の病理組織学的診断の経験歴にかかわらず、データベース利用者が類似症例を抽出し、各症例のメタデータから追加すべき検査項目等の情報を収集できるシステムの構築を目指す。これによって病理組織診断の効率化、診断精度の向上 (標準化) が見込まれる。また、類似症例の持続的な蓄積によって、BRDC に関与する病原体や組織学的特徴が明らかになり、BRDC の病理組織像が体系化される。

## 3. 研究の方法

(1) データベース登録用標本の選別と修復：農研機構動物衛生研究部門で開催している「家畜衛生研修会」で検討された症例から、牛の呼吸器疾患の症例を抽出し、標本の状態を確認した。再染色等が必要な標本については、修復を行なった。

(2) 病理組織標本のバーチャルスライド (WSI) 化、メタデータの作成および登録：選別した

病理組織標本(スライドグラス標本)をWSI化した。また、これらの症例について再鏡検し、病理組織学的所見、病理組織学的診断名を確認した。特徴的所見はキーワードとして抽出した。これらの情報に個体情報(品種、年齢、臨床症状等)、病理解剖学的検査結果、有用な追加検査情報などをメタデータとして保存した。

- (3)新たに収集された症例の病理組織学的解析とデータベースへの登録:新たに入手できた症例等パラフィンブロックの入手が可能な症例については、必要に応じて特殊染色や免疫組織化学的染色等を実施し、データベースへの登録を行なった。
- (4)病理組織学的診断用家兔血清の作成:BRDCの二次病原体として検出頻度が高い *Trueperella pyogenes* について、新たにポリクローナル抗体を作製し、免疫組織化学的特異性を検証した。
- (5)遠隔地からの活用(試験的運用):取り込んだWSI画像を用いてWebを用いたディスカッションを実施した。また、構築したデータベースへのアクセス・試験的活用を家畜保健衛生所の病理担当者に依頼した。

#### 4. 研究成果

- (1)本研究期間を通して111症例352枚のWSI画像を登録した。これらの画像はSSL-VPN接続によって外部から接続が可能な農研機構の専用サーバ内にフォルダを作って保存した(現在、当該サーバへのアクセスは都道府県家畜保健衛生所病理担当者に限定されている)。メタデータは、R5年度に別プロジェクトで開発したメタデータ検索システムを活用できるように体裁を修正し、登録した(図1)。

- (2)収集した症例の品種は黒毛和種が半数を占め、交雑種を合わせると肉用種が7割近くを占めていた(図2)。また年齢については6ヶ月齢以下が4割を占めていた(図3)。肺炎の種類については壊死性肺炎および化膿性肺炎を主病変とする肺炎が半数を占めていたが、間質性肺炎や肉芽腫性肺炎も収集できた(図4)。関与する病原体は、肺炎の病原体として多く観察される *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis*, *Histophilus somni*, BRSV が10%から15%の症例で検出され、2次病原体として検出されることが多い *Trueperella pyogenes* についても約10%の症例から検出された。しかし、これら病原体の組み合わせは多岐に渡り、単独に検出されるものから複数検出されるものまで約55種類の組み合わせが観察された。引き続きDBの症例数を拡充させる必要があると考えられた。



図1 検索結果表示例:症例の詳細とともに各種染色標本のサムネイルが表示される。

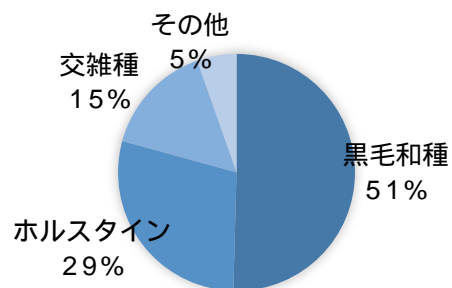


図2 品種内訳

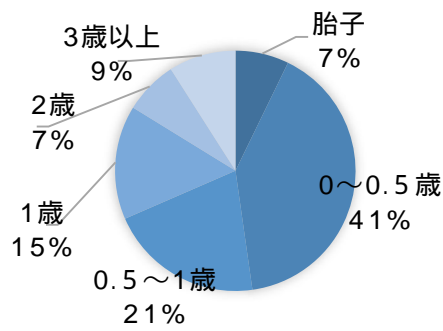


図3 年齢内訳

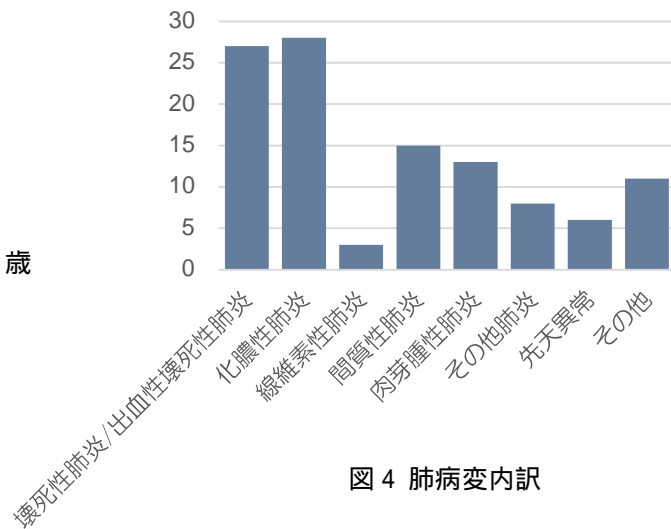


図4 肺病変内訳

(3) 免疫組織化学的解析をするための力価の高い抗 *T. pyogenes* 家兔血清が得られた。本抗体は特異性が高く、*Mannheimia haemolytica* や *Pasteurella multocida* 等の肺炎起因菌を含む31種類の細菌との交差反応の検索では、*Fusobacterium necrophorum* を除き、顕著な交差反応はみられなかった。*F. necrophorum* については抗体の希釈やグラム染色の併用によって識別が可能であると考えられた。

(4) 病性鑑定依頼を受けた牛の肺炎症例について、Web 会議システムを介して WSI 画像の共有を行い、検査結果についての解説およびディスカッションを行なった。また、農研機構サーバのアカウント登録済み都道府県病理担当者には、あらかじめ WSI 画像を閲覧していただき、その後に Web を活用してディスカッションを行なった。従来の回答方法では、診断に重要な部分のみの撮影画像が送付されていたため、WSI 画像を活用した本取組では、症例の病変を広く観察することが可能となり、症例の病態をより詳細に理解できるようになったとの感想を得た。また、アカウント登録した病理担当者には検索システムを用いたデータベースの試験活用も依頼し、好評を得た。さらに、感染試験症例等の特定の病原体のみに対する病変、健康畜の組織、胎子の組織等の DB への登録も有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ken Inoue , Yasuhiro Takashima , Shinji Hirano, Kumiko Kimura	4. 巻 101
2. 論文標題 Granulomatous pneumonia in a cow infected with Toxoplasma gondii	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102870
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2024.102870	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鈴田史子、寺山好美、浦川 了、熊谷飛鳥、木村久美子	4. 巻 75
2. 論文標題 黒毛和種子牛の牛アデノウイルス4型感染を伴うCandida albicans , Aspergillus属菌及び接合菌による深在性真菌症	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本獣医師会雑誌	6. 最初と最後の頁 e18-e23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12935/jvma.75.e18	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村久美子
2. 発表標題 牛の感染症の病理（呼吸器症状を主徴とする疾病を中心に）
3. 学会等名 令和4年度家畜保健衛生所病性鑑定技術検討会（病理部門）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤 智, 鈴木 康則, 木村 久美子, 大塚 幹弘, 高井 伸二
2. 発表標題 繁殖和牛に発生したロドコッカス・エキイ感染症の一事例
3. 学会等名 日本獣医師会学術集会 中部地区学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木村久美子、加藤 智
2. 発表標題 牛の肺：牛のRhodococcus equiによる化膿性肉芽腫性肺炎
3. 学会等名 第10回 日本獣医病理学専門家協会学術集会・スライドフォーラム（第63回獣医病理学研修会）
4. 発表年 2023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
研究協力者	稲富 素子  (Inatomi Motoko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------