

# 畳み込みニューラルネットワークを用いた 電子顕微鏡画像における薬剤耐性菌株の識別

長野 章宏<sup>1</sup> 青木 工太<sup>1</sup> 武内 優奈<sup>1</sup> 西野 美都子<sup>1</sup> 西野 邦彦<sup>1</sup> 古澤 力<sup>2,3</sup> 岩崎 憲治<sup>1</sup>  
越後 富夫<sup>4</sup> 八木 康史<sup>1</sup>

**概要:** 近年、複数の抗菌薬への耐性を持つ病原菌（多剤耐性菌）が出現し、世界的な問題となっている。耐性菌に関する様々な研究が行われる中、細菌が耐性を獲得する過程で形態が変化することが明らかとなってきた。どのような遺伝子の変化により細菌の形態が変化するかは生物学的に興味深い問題であるが、いまだに解明されていない。そこで、形態変化と遺伝子との関係を解明することを最終目標とし、本研究では最終目標を達成する最初の段階として、形態の違いで細菌株を識別することに取り組む。そして、識別結果を解析し、各株間の相違点を明らかにする。各株間の形態学的な特徴は、外膜の形状や顆粒（細菌内の大きめの粒粒）の有無等に表れているが、外膜部分がにじんでいるものも多く、細菌の輪郭を抽出することは難しい。さらには、同じ株の細菌であっても、試料作製の過程で行われる処理により、見え方が大きく異なる。そこで、これらの問題を解決するために、本論文では、透過型電子顕微鏡画像からパッチを作成し、畳み込みニューラルネットワーク (CNN) を用いてパッチの識別を行い、その結果をもとに元画像の株を推定する手法を提案する。提案手法の性能評価を行い、元画像単位で 0.983 もの高い識別率を得ることに成功した。また、CNN の中間層の出力を使用して、パッチをクラスタリングすることで、各株に特徴的な部分の特定を試みた。

**キーワード:** 多剤耐性菌, 透過型電子顕微鏡, 形態, CNN, クラスタリング

## Classification of Microscopic Images of Drug Resistant Strains Using Convolutional Neural Networks

NAGANO AKIHIRO<sup>1</sup> AOKI KOTA<sup>1</sup> TAKEUCHI YUNA<sup>1</sup> NISHINO MITSUKO<sup>1</sup> NISHINO KUNIHIKO<sup>1</sup> FURUSAWA CHIKARA<sup>2,3</sup>  
IWASAKI KENJI<sup>1</sup> ECHIGO TOMIO<sup>4</sup> YAGI YASUSHI<sup>1</sup>

**Abstract:** Bacteria which have resistance to multiple antibacterial drugs (multidrug-resistant strains) have appeared recently, which is becoming a global issue. Recent studies have shown that morphological features of bacteria can be altered in the resistance-gaining mechanism. Our final goal is to clarify relationships between drug resistance and morphological alternation. Morphological features tend to emerge in the shape of a cell wall, a granule, and so on. It is, however, difficult to extract a feature from a cell wall which is blur in many cases. Furthermore, the appearance of bacteria captured by a transmission electron microscope (TEM) is greatly different even in a same strain. This difference is caused by the process of making samples. In this paper, we propose an approach for the classification of TEM images of multi-drug resistant strains based on patch aggregation. In the training phase, patches extracted from TEM images are fed into a convolutional neural network (CNN). In the test phase, the confidence scores of a patch is obtained by the trained network, and then the class label of a TEM image is predicted by aggregating the scores of patches extracted from the image. We conduct experiments to demonstrate the effectiveness of our approach and achieved a high classification accuracy of TEM images. To investigate strain-specific features, we perform clustering of patches based on the output of a intermediate layer in the trained CNN, and demonstrate differences in morphological features among strains.

**Keywords:** multidrug-resistant strain, transmission electron microscope, morphology, convolutional neural networks, clustering

## 1. はじめに

1929年のフレミングによるペニシリンの発見に始まり [1], 様々な細菌に対する抗生物質が開発され, 感染症の治療に広く使われてきた. しかし, 近年では多剤耐性緑膿菌 (MDRP) やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) といった, 複数の薬剤に対して耐性を持つ多剤耐性菌が出現し, 問題となっている [2] [3] [4] [5]. さらに, スーパー耐性菌と呼ばれるさらに多くの薬剤に対して耐性を持つ多剤耐性菌が出現している [6] [7] [8]. 2010年3月にインドで多剤耐性大腸菌による感染が確認された [9] 一方で, 2017年1月13日には米国疾病予防管理センター (CDC) により, アメリカ国内で使用可能な26種類の抗生物質に耐性を持つ肺炎桿菌に感染し, 70代女性が死亡したという報告がなされ [10], 多剤耐性菌の出現はすでに世界的な脅威となっている.

近年, 鈴木らにより, 研究室内で薬剤耐性菌を作成する手法が開発された [11]. さらに, 鈴木らが作製した耐性菌を電子顕微鏡で観察すると, 耐性を獲得する前の親株, 各耐性株間で形態的な違いが見られることが明らかとなった. これは, 薬剤耐性を獲得する過程で, 細菌の形態に変化が生じたためだと考えられる. 本研究では, 鈴木らが作製した細菌を使用し, 薬剤耐性獲得と形態変化との関係の解明を最終目標とする. そして, 今回は最終目標を達成するための前段階として, 細菌株の識別と各株で特徴的な部分の特定を行った結果を報告する.

形態の特徴を取得するためには, 細菌の構造が詳細に表れている画像を解析に使う必要がある. したがって, 光学顕微鏡画像よりも情報量の多い透過型電子顕微鏡画像を用いて解析を行う.

顕微鏡画像の解析に関する研究として, CNN と RNN を用いた細胞分化の推定 [12] がある. また, 深層学習を使用して遺伝子解析を行う研究として, Denoising Autoencoders を使用して乳がんの遺伝子発現データから鍵となる遺伝子を抽出する研究 [13] や, CNN を使用して DNA とタンパク質の関係性を解析する研究 [14] などがある. 筆者らの知る限り, 薬剤耐性菌の形態の解析に関する研究は行われていない.

本論文の構成を述べる. 3章で解析に使用した細菌株と, 電子顕微鏡画像の違い, 画像中に見られる株間の違いについて述べる. 4章で畳み込みニューラルネットワークを用

表1 株間の相違点

Table 1 Differences between strains

株	外膜	顆粒	全体の形状	その他
P	滑らか	多い	楕円	ペリプラズムがある
ENX1	凹凸	多い	歪んだ楕円	-
ENX2	滑らか	少し多い	楕円, 長い	ペリプラズムがある
ENX3	凹凸, ぼやけている	少ない	楕円	ブレブがある
ENX4	凹凸	少し多い	楕円	ブレブが多い

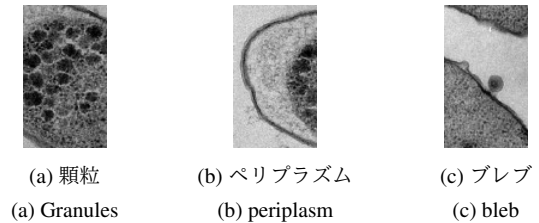


図1 顆粒, ペリプラズム, ブレブの例

Fig. 1 Examples of granules, periplasm, and bleb image

いた, 株間の識別手法について述べ, 5章で実験の設定と結果について述べる. 6章で本論文のまとめと今後の課題・展望について述べる.

## 2. 電子顕微鏡画像

3.1節で解析に用いた細菌, 3.2節で撮影時の試料の作製法, 3.3節で撮影時の設定について述べる.

### 2.1 解析に使用した耐性菌株

鈴木ら [11] により作製された細菌株の内, 耐性を持たない親株 (大腸菌 MDS42, 以降 P) と, エノキサシン (以降 ENX) という薬剤に耐性を持つ株 ENX1 から ENX4 を用いて解析を行った. 実際の臨床で得られた細菌を用いなかった理由は, 臨床ではどのような株の細菌から変異し, 耐性を獲得したかがわからないからである. どのような親株から変異したかが分かなければ, 親株と耐性株とを比較することができず, 耐性菌特有の構造を特定することはできない.

### 2.2 電子顕微鏡画像の撮影

解析に用いた画像は, 透過型電子顕微鏡により撮影された. 試料の固定法には高圧急速凍結固定法を用い, オスミウムとアセトンにより凍結置換を行った後, エポキシ樹脂包埋を行う. そして, 樹脂を重合させるために 60°C のオーブンで2日間加熱する. その樹脂から, 細菌部分を 0.5nm 四方の正方形, 厚さ 80nm の切片を作製する. そして, この切片を重金属 (酢酸ウラン, 鉛) 染色を行った後, 透過型電子顕微鏡 (使用機は JEM-2100) で観察を行うことで得られる. 撮影には 2kx2k CCD カメラ UltraScan 1000 が使用された.

電子顕微鏡は以下のように設定された.

- 加速電圧は 80kV

<sup>1</sup> 大阪大学  
Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan

<sup>2</sup> 理化学研究所  
RIKEN, Suita, Osaka 565-0874, Japan

<sup>3</sup> 東京大学  
Tokyo University, Bunkyo, Tokyo 113-8654, Japan

<sup>4</sup> 大阪電気通信大学  
Osaka Electro-Communication University, Neyagawa, Osaka 572-8530, Japan

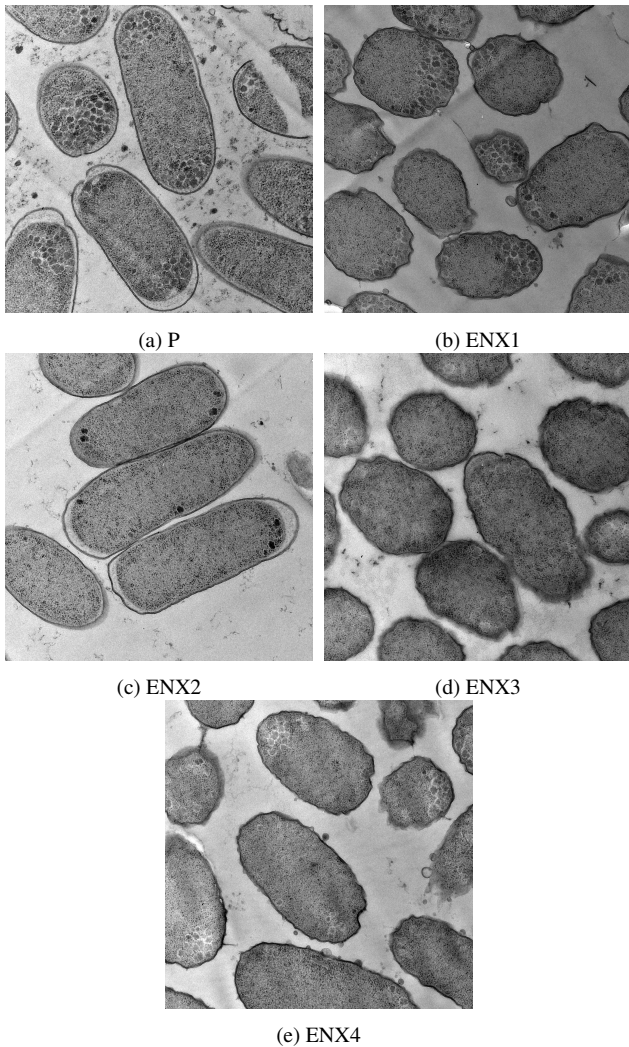


図2 各株の電子顕微鏡画像  
Fig. 2 Electron microscopic images of each strain

- スポットサイズは 2
- 対物レンズ倍率は 6000 倍
- 絞りは 3(20  $\mu$  m)
- 露光時間は 2.0 秒

### 2.3 株間の違い

各株の電子顕微鏡画像を図2に示す。ここでは、実際には32ビットの画像を、画像処理ソフトウェア Image-J を用いて8ビットに変換したものを掲載している。一枚の画像中に映っている細菌は、すべて同じ株の細菌である。各株間で観察された相違点を表1に示す。各株間で外膜の形状に大きな違いがあった。顆粒、ペリプラズム、ブレブの例を図1に示す。それぞれ、顆粒は細胞内の粒々、ペリプラズムは外膜と内膜との隙間、ブレブは外膜中の泡状の突起のことである。

## 3. 畳み込みニューラルネットワークを用いた薬剤耐性株の識別手法

本論文で提案するアルゴリズムの流れを図3に示す。本

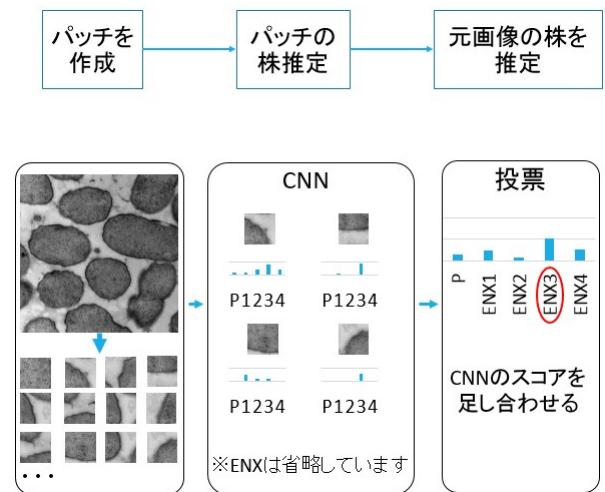


図3 提案手法の流れ

Fig. 3 Flowchart of the proposed method

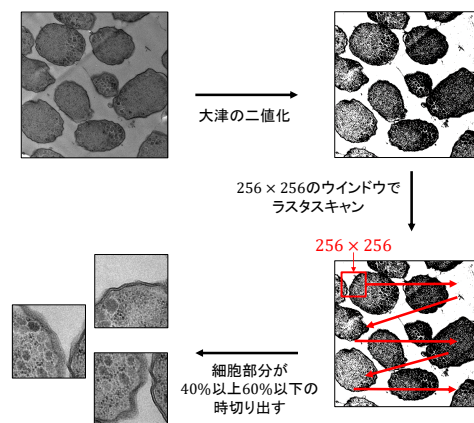


図4 パッチ作成の流れ

Fig. 4 Flowchart of the patch creation

章では、4.1節でパッチ画像の作成方法、4.2節でパッチおよび、元画像に対する株の識別について詳しく説明を行う。

### 3.1 パッチ画像の作成

パッチ作成の流れを図4に示す。顕微鏡画像上を一定の大きさのウィンドウでラスタスキャン順に走査し、細胞部分がウィンドウ内にある場合に、パッチとして切り取る。大津の方法で元画像を二値化し、各画素を前景部分と背景部分に判別することで、ウィンドウ内に含まれている前景部分の割合から、細胞部分が含まれているかどうかを判定する。

大津の二値化 [15] とは、以下の数式を用いて輝度値ヒストグラムの分離度が最大となる値を求め、その値を閾値として二値化を行う方法である。以下では、閾値  $t$  でヒストグラムを二極化したときに、閾値よりも輝度値が小さい画素の集合をクラス 1、閾値よりも輝度値が大きい画素の集合をクラス 2 と定義する。また、クラス 1 の画素数を  $\omega_1$ 、平均を  $m_1$ 、分散を  $\sigma_1$ 、クラス 2 の画素数を  $\omega_2$ 、平均を  $m_2$ 、

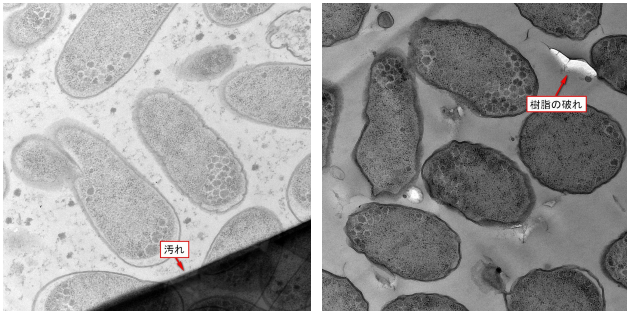


図 5 汚れ

図 6 樹脂の破れ

Fig. 5 The image having smudge Fig. 6 The image having tear of resin

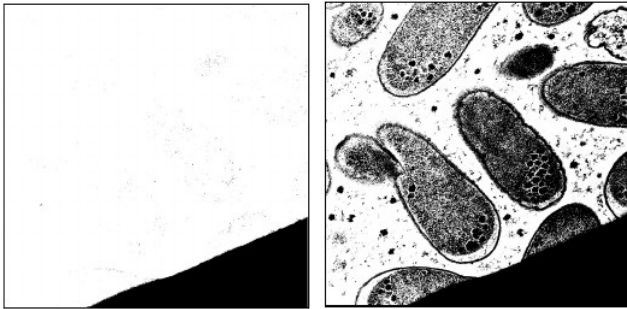


図 7 修正前

図 8 ヒストグラムの範囲を限定

Fig. 7 Before fix

Fig. 8 After limiting the range of the histogram

分散を  $\sigma_2$ 、画像全体の画素数を  $\omega_1$ 、平均を  $m_1$ 、分散を  $\sigma_1$  と定義する。この時クラス間分散  $\sigma_w^2$  は (1) 式で表される。

$$\sigma_w^2 = \frac{\omega_1 \sigma_1^2 + \omega_2 \sigma_2^2}{\omega_1 + \omega_2} \quad (1)$$

また、クラス内分散  $\sigma_b^2$  は 2 式で表される。

$$\sigma_b^2 = \frac{\omega_1(m_1 - m_t)^2 + \omega_2(m_2 - m_t)^2}{\omega_1 + \omega_2} = \frac{\omega_1 \omega_2 (m_1 - m_2)^2}{(\omega_1 + \omega_2)^2} \quad (2)$$

$\sigma_t^2$  は  $\sigma_t^2 = \sigma_b^2 + \sigma_w^2$  と表すことができる。よって、クラス間分散とクラス内分散の比である分離度  $\frac{\sigma_b^2}{\sigma_t^2}$  は (3) 式となる。

$$\frac{\sigma_b^2}{\sigma_t^2 - \sigma_b^2} \quad (3)$$

ここで、画素全体の分散である  $\sigma_t^2$  は閾値  $t$  に関係なく一定の値であるため、 $\sigma_b^2$  が最大となる閾値を求めればよいことになる。 $\sigma_b^2$  の分母も  $t$  に関係なく一定の値であることを考慮すると、(4) 式が最大となる閾値  $t$  を求めればよい。

$$\omega_1 \omega_2 (m_1 - m_2)^2 \quad (4)$$

電子顕微鏡画像に大津の二値化を適用する際に、いくつか問題点がある。それは、図 5 に示すような汚れや樹脂の破れが画像中に含まれていることである。

汚れや樹脂の破れの部分の輝度値は細胞部分や背景部分とは大きく異なる傾向がある。そのため、例えば図 7 のように汚れの部分が多く含む画像に対して大津の二値化を適用すると、汚れの部分とそれ以外の部分に分離されてしま

う。本論文で用いているデータセットには、樹脂の破れを多く含む画像はなかったが、汚れを多く含む場合と同様に、二値化によって樹脂の破れとそれ以外に分離されると考えられる。

背景部分と細胞部分の画素が取り得る輝度値の範囲は、全ての画像に対する輝度値の分布から推定でき、本論文で用いているデータセットの場合、各株とも 2000 から 7500 までの範囲であると推定される。このようにして、汚れや樹脂の破れの部分を除き、背景部分や細胞部分であると推定される画素のみに大津の二値化を適用することで、汚れを多く含む図 5 のような画像に対しても、図 8 のような二値化が可能である。

3.3 節で述べたように、株間では細胞内よりも外膜の形状や顆粒の有無に特徴があるため、外膜部分と顆粒部分が株の識別に有効だと考えられる。顆粒は細胞質の中心部分ではなく、外膜付近にあることから、外膜部分を含むようにパッチを作成すればよい。

前述の方法で二値化した画像上を、 $256 \times 256$  の大きさのウィンドウを 50 画素ずつ動かしながら、それぞれの位置でウィンドウ内に外膜部分が含まれるかどうかを判定する。二値化画像中の輝度値が 0 (黒) の画素を細胞、輝度値が 255 (白) の画素を背景と定義し、ウィンドウ内の細胞部分の割合で判定を行う。ウィンドウ内の細胞部分の割合が 40% から 60% であるとき外膜部分を含むものとし、パッチとして切り取る。割合を変更することで、細胞の外膜部分だけでなく、細胞質などを含むように切り取ることも可能である。

### 3.2 パッチ単位での株の識別

顕微鏡画像から作成されるパッチを P, ENX1, ENX2, ENX3, ENX4 の 5 クラスに識別するため、畳み込みニューラルネットワークを用いる。物体カテゴリ認識の分野で大きな成功を収めたネットワークの一つに、AlexNet [16] がある。これは 2012 年の ILSVRC (ImageNet Large Scale Visual Recognition Challenge) というコンテストで 1000 クラスのカテゴリ認識において優勝したネットワークであり、CNN を使用しない従来手法の識別精度を大きく上回った。

本論文では、AlexNet を元に、図 9 で示すパッチ識別ネットワークを構築した。図 9 中の Conv, Pool, Norm, Fc はそれぞれ畳み込み層、プーリング層、正規化層、全結合層を表している。カーネルとは、畳み込み層のフィルタやプーリング層の小領域のことである。カーネルは画像 (2 次元配列) 上を移動させながら適用され、このときの移動間隔をストライドとして設定する。活性化関数は神経細胞の性質をモデル化したものであり、畳み込み層の出力や全結合層の各ユニットの出力に対して適応する。本ネットワークでは、畳み込み層と fc8 以外の全結合層で正規化線形関数 (Rectified Linear Unit: ReLU) [17] を用いている。



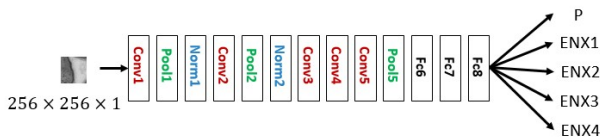


図9 パッチ株識別ネットワーク

Fig. 9 Patch classification network

fc8はこのネットワークの出力層であり、多クラス分類を行うため、ソフトマックス関数を用いる。プーリング層では、カーネル領域中の最大値をとる最大プーリングを用いる。正規化層は入力画像全体のコントラストと明るさを調節するための層で、本ネットワークでは Local response normalization(LRN) [16]を用いる。全結合層では、fc6のユニット数を4096、fc7のユニット数を4096、fc8のユニット数を5とする。また、fc6、fc7では、学習時に各ユニットを確率的に無視することで過学習を緩和させる効果が得られるドロップアウト [18]を行う。その確率はfc6で0.5、fc7で0.25とする。

ネットワークの重みのパラメータを  $w$  とし、これを教師データを使って繰り返し更新することで、パッチの株識別機を学習させる。  $N$  枚のパッチ画像からなる集合を  $P_1, P_2, P_3, \dots, P_N$  とする。また、各パッチに対応する教師データを  $(d_1, d_2, d_3, \dots, d_N)$  とする。教師データの各要素  $d_n$  は二値の値を5個並べたベクトルであり、それぞれが P, ENX1, ENX2, ENX3, ENX4 のラベルを表している。このベクトルの要素の内、対応するラベルがパッチの正解株であったときは1となり、不正解株の時は0となる。例として、正解が ENX1 の時、  $d_n$  は式5のように表すことができる。

$$d_n = (01000)^T \quad (5)$$

fc8層の出力を  $v$  とすると、  $v$  の成分は5つの値からなるベクトルとなる。1枚の入力画像と重みパラメータの組  $(P_n, w)$  と対応する教師データラベル  $d_n$  を用いると、交差エントロピーは式6で求まる。

$$E(w) = - \sum_{n=1}^N \sum_{k=1}^5 d_{nk} \log v_k(P_n, w) \quad (6)$$

これを誤差関数として最小化させることで、fc8の出力  $v$  が教師データの値に近づくように重み  $w$  が更新される。最小化には確率的勾配法 [19]を用いて行い、勾配計算には誤差逆伝播法 [20]を用いる。

### 3.3 画像単位での株の識別

画像単位での株の識別は、パッチ単位での識別の結果を用いて行う。画像  $I_n$  からパッチを  $M$  枚切り取ったとすると、その集合は  $(P_1, P_2, P_3, \dots, P_M)$  と表すことができる。パッチを識別するために学習されたネットワークに、パッチ  $P_m$  を入力したときの出力をスコアと呼び、  $v_m$  と表す。

画像  $I_n$  に対するスコア  $s_n$  は式7のように求める。

$$s_n = \sum_{m=1}^M v_m \quad (7)$$

$s_n$  の中で最も値が大きい要素に対応するラベル(株)を画像  $I_n$  の識別結果とする。

## 4. 実験

5.1節で実験のデータセットと学習の設定を説明し、5.2節でパッチ単位の識別結果、画像単位での識別結果について述べる。5.3節でクラスタリング結果について考察する。

### 4.1 実験設定

#### 4.1.1 データセット

電子顕微鏡画像を使用して、形態特徴による耐性菌株の識別の有効性を検証するために、パッチ単位の識別率および、画像単位の識別率を評価する。

各株300枚の電子顕微鏡画像を用意し、3分割交差検証を行う。分割後の2つのデータセットを合わせて学習用として各株200枚の画像があり、テスト用のデータセットとして各株100枚の画像がある。学習用とテスト用のデータセット間に画像の重複はない。学習用データセットの画像から作成されたパッチについて各株10,000枚をランダムに選び、ネットワークに入力するための学習用データとする。また、テスト用データセットの画像から作成されたパッチについて、ランダムに選んだ各株2,000枚の画像を検証用のパッチとし、画像単位の識別はテスト用のすべてのパッチを使って評価する。

#### 4.1.2 学習の設定

CNNを含むニューラルネットワークモデルには様々なハイパーパラメータが含まれ、その設定は学習に大きな影響を与える。本実験では、学習係数の初期値を0.0005とし、10,000イテレーションごとに $\frac{1}{2}$ 倍にする。学習は50,000イテレーション行う。また、ミニバッチ学習を行い、ミニバッチ数は200とする。学習データは合計で50,000枚あるので、250イテレーションで1エポックとなり、学習は200エポックになる。収束性能を良くするためにモメンタム項 [20]を使用し、モメンタム係数を0.9とする。

### 4.2 結果

5.1.1項で述べた設定で学習を行った時の各データセットの学習曲線を図10に示し、テスト用のパッチとテスト用の元画像の識別結果を表2に示す。パッチ全体での精度は約84%であったが、画像単位での正解率は98%を超えており、高い識別精度を達成した。提案手法は電子顕微鏡画像の撮影の仕方によって生じる切片の違いに頑健であると言える。

パッチ単位と元画像単位のそれぞれについて、株ごとに

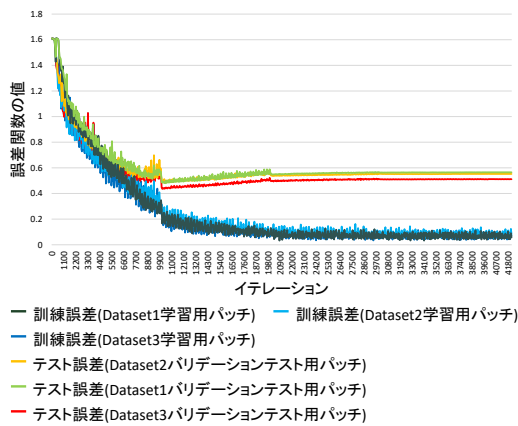


図 10 各データセットの学習曲線

Fig. 10 The learning curb of each data set

表 2 各データセットの識別結果

Table 2 Classification result of each dataset

データセット	テスト用パッチ	元画像
Dataset1	0.845	0.980
Dataset2	0.846	0.982
Dataset3	0.850	0.988
平均	0.847	0.983

表 3 パッチ単位での平均識別結果

Table 3 Average Classification result of patches

		推定ラベル				
		P	ENX1	ENX2	ENX3	ENX4
正解ラベル	P	0.813	0.063	0.080	0.007	0.036
	ENX1	0.047	0.753	0.026	0.019	0.157
	ENX2	0.063	0.018	0.907	0.001	0.011
	ENX3	0.005	0.014	0.003	0.953	0.024
	ENX4	0.027	0.133	0.010	0.016	0.810

表 4 画像単位の平均識別結果

Table 4 Average Classification result of original images

		推定ラベル				
		P	ENX1	ENX2	ENX3	ENX4
正解ラベル	P	0.957	0.020	0.023	0.000	0.000
	ENX1	0.000	0.987	0.007	0.000	0.007
	ENX2	0.017	0.000	0.983	0.000	0.000
	ENX3	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
	ENX4	0.000	0.003	0.000	0.000	0.997

評価した識別結果を表 3 と表 4 に示す。表 4 は各データセットについて、テスト用の元画像の識別結果である。表の行は正解の株を表し、列は推定された株を表しており、各要素は割合を表している。

各パッチを入力としたときの fc8 層（出力層）の値をスコアとして昇順にソートし、どの部分（パッチ）が高いスコアを出しているかを確認した。

表 3 より、パッチ単位では ENX2 と ENX3 を高い精度で識別できていること、ENX1 と ENX4 を誤識別する割合が他の株と比べて高いことが分かる。ENX3 の識別率が高い

のは、パッチ画像ではなく、電子顕微鏡画像で見たときに ENX3 の外膜に他の株には見られない特徴があるためだと考えられる。

図 2 に示すように、電子顕微鏡画像では P と ENX2 の外膜形状は似ているが、これらの株を互いに誤識別する割合と、他の株との誤識別率の間に顕著な差は見られなかった。図 11 に示すように、P のパッチにはごみを含むものが多くあり、ごみを P の特徴として学習し、ENX2 のパッチにはごみが少なかったため、P と ENX2 を識別できたのではないかと考えられる。実際に、P のパッチで ENX2 と推定されたパッチの中で、高いスコアのパッチには、例として図 12 に示すように、ごみがほとんどなかった。また、ENX2 のパッチで P と推定されたパッチでは、図 13 に示すように、背景部分にごみがあったり、霧のようなものがかかっていたりするパッチが多かった。P のパッチにごみが多数含まれていた原因は、使用した P の電子顕微鏡画像中に元々、ごみが多数入っており、また、ごみの輝度値が細胞部分の輝度値と類似していたため、ごみを含むパッチを取り除くことができなかったためである。ごみが株の特徴として学習されないようにするためには、ごみを含まないデータセットを使用する必要がある。マスク画像としてごみを含む部分を切り取らないようにするといった、パッチ作成アルゴリズムの改良や、あらかじめごみの少ない画像を選び、パッチを作成することなどを今後検討する。

ENX1 と ENX4 を互いに誤識別する割合が高かった。これは、細菌全体の形状の特徴を抽出できないことと、ブレブの特徴を抽出できなかったことが原因だと考えられる。ENX1 と他の株の相違点として、ENX1 は細菌全体の形状が歪な楕円形であるという点があげられる。しかし、元の顕微鏡画像からパッチを切り取って入力とし、ネットワークの学習を行っているため、細菌全体の形状を表現する特徴を抽出することは難しい。顕微鏡画像の目視による確認では、ENX4 は他の株に比べてブレブが多いと言えるが、ブレブの数そのものはそれほど多くない。また、ENX4 ほどではないものの、ENX1 にもブレブは表れているので、ブレブを含むパッチは現在、ENX1 と ENX4 のどちらかであると推定される。そのため、ブレブのバリエーションを十分に学習できていない可能性が高いと考えられ、画像を回転するなどして学習データを増やすことを今後検討する。これにより、ブレブを含むパッチを ENX4 の特徴として抽出したり、ENX1 らしいブレブ、ENX4 らしいブレブといったブレブごとの特徴を抽出できる可能性がある。

### 4.3 考察

学習されたネットワークが各パッチからどのような特徴を抽出して識別しているのかを確認するために、テスト用のパッチに対して、出力層のひとつ前の fc7 層の出力に基づいてクラスタリングを行い、各クラスに含まれる各株

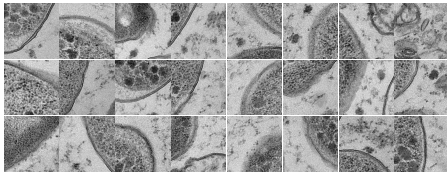


図 11 P のパッチの一部  
Fig. 11 Part of P patches

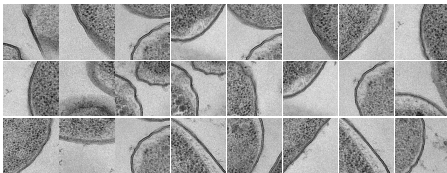


図 12 正解が P で ENX2 と推定されたパッチの一部  
Fig. 12 Part of P patches which are classified as ENX2

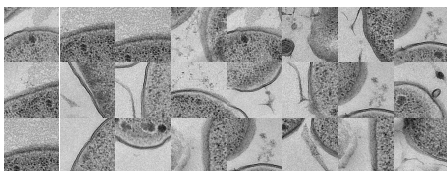


図 13 正解が ENX2 で P と推定されたパッチの一部  
Fig. 13 Part of ENX2 patches which are classified as P

のパッチの割合を求める。fc7 層の出力 (4096 次元) に対して、主成分分析によって次元数を削減したのち、 $k$  平均法によるクラスタリングを行う。各株ごとに顆粒、外膜などに特徴が表れていると考えられるため、クラスタ数は 15 とした。そして、クラスタ中心と各データとの距離の計算にはユークリッド距離を使用した。クラスタリングを行った結果、特定の株のパッチが多く集まるクラスタが得られた。各クラスタに含まれる株の割合を図 14 に示す。円グラフの番号はクラスタ番号を表しており、円グラフの中の数値は各株が占める割合を表している。以下では、各株が集まるクラスタの特徴について述べる。

P が 90% 含まれるクラスタ 11 について述べる。図 15 はクラスタ 11 に含まれるパッチの一部を抜粋したものである。クラスタ 11 にはペリプラズムと顆粒を多く含むパッチが集まっている。したがって、顆粒とペリプラズムが P の特徴だと考えられる。また、クラスタ 3 とクラスタ 6 にも P が 90% 以上含まれているが、クラスタ 3 は状態の悪い細菌が写っているパッチが多く、クラスタ 6 はごみを含むパッチが多い。よって、状態の悪い細菌とごみも P の特徴として抽出されていると考えられる。なので、次回学習を行うときはごみを含むパッチを除外することを検討する。

ENX1 が 77% を占めるクラスタ 10 について述べる。図 16 はクラスタ 10 に含まれるパッチの一部を抜粋したもので

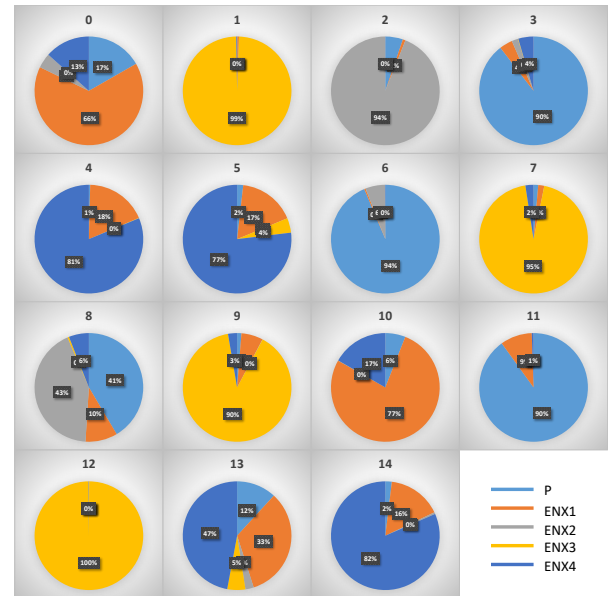


図 14 各クラスタに含まれる株の割合  
Fig. 14 Rate of strains included in each cluster

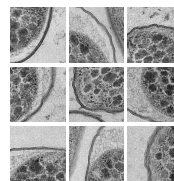


図 15 クラスタ 11 の一部  
Fig. 15 Part of cluster 11 patches

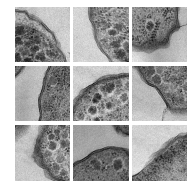


図 16 クラスタ 10 の一部  
Fig. 16 Part of cluster 10 patches

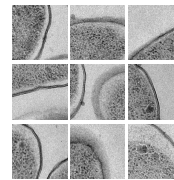


図 17 クラスタ 2 の一部  
Fig. 17 Part of cluster 2 patches

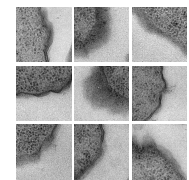


図 18 クラスタ 9 の一部  
Fig. 18 Part of cluster 9 patches

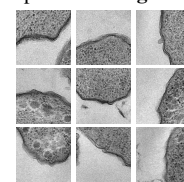


図 19 クラスタ 14 の一部  
Fig. 19 Part of cluster 14 patches

ある。クラスタ 10 には、顆粒を多く含むパッチと、顆粒を含まない外膜だけのパッチの両方が含まれる。以上から、ENX1 の特徴として、顆粒と外膜形状の二つが考えられる。ENX2 が 94% 以上を占めるクラスタ 2 について述べる。図 17 はクラスタ 2 に含まれるパッチの一部を抜粋したものである。両方のクラスタとも同じようなパッチが集まっている。これらのクラスタに集まったパッチは顆粒をほとんど含まない、滑らかな外膜のパッチである。ただし、外膜がくっつきりしているものと滲んでいるものの両方が含ま



れているので、外膜形状が識別に使われているものの、外膜が滲んでいるかどうかはあまり考慮されていないのではないかと考えられる。

ENX3 を多く含むクラスタは複数あるが、どのクラスタも傾向は同じだったため、クラスタ 9 について述べる。クラスタ 9 の内の 90% を ENX3 が占めている。図 18 はクラスタ 9 に含まれるパッチの一部を抜粋したものである。このクラスタに含まれているパッチの外膜はぼやけており、黒い。よって、細菌の外膜の形状や色味が特徴として抽出されていると考えられる。

ENX4 が 81% を占めるクラスタ 14 について述べる。図 19 はクラスタ 14 に含まれるパッチの一部である。どちらのクラスタにも外膜が粗いパッチが含まれており、顆粒のあるものと無いものの両方が含まれていた。外膜の形状を見て ENX4 だと識別したのではないかと考えられる。

## 5. おわりに

本論文では、薬剤耐性獲得と形態変化の関係を解明することを目標に、透過型電子顕微鏡画像で撮影された耐性菌株を識別するための手法を提案した。顕微鏡画像から切り出されるパッチの識別器として、畳み込みニューラルネットワーク (CNN) を用いた。CNN により得られるパッチに対するスコアを足し合わせることで元画像を識別する。提案手法の有効性を評価するため 3 分割交差検証を行い、パッチ単位の平均精度で 0.847、画像単位では 0.983 を達成した。また、CNN の出力を各パッチの特徴量としてクラスタリングを行い、各株に特徴的な部分の特定を試みた。

今後の課題として、試料の作成および固定における再現性を確認することが挙げられる。また、他の薬剤に対する耐性株の解析や、薬剤耐性菌に共通する特徴について調べることなどが重要な課題である。

## 6. 謝辞

本研究の一部は、大阪大学・タンパク質研究所 共同利用・共同研究拠点 7 事業のクライオ電子顕微鏡共同利用研究の支援を受けて実施されました。心より感謝致します。

## 参考文献

- [1] Fleming, A.: On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*, *Br. J. Exp. Pathol.*, Vol. 10, pp. 226–236 (1929).
- [2] 中條俊博, 広瀬崇興, 熊本悦明, 塚本泰司, 上原信之, 丸田浩, 小六幹夫, 松田啓子: 尿路分離菌におけるニューキノロン系抗菌薬に対する耐性菌出現状況, *感染症学雑誌*, Vol. 64, No. 11, pp. 1416–1424 (1990).
- [3] Barber, M.: Naturally Occurring Methicillin-Resistant Staphylococci, *Microbiol.*, Vol. 35, No. 2, pp. 183–190 (1964).
- [4] Barber, M.: Methicillin-resistant staphylococci, *J. Clin. Pathol.*, Vol. 14, No. 4, pp. 385–393 (1961).

- [5] World Health Organization: The Evolving Threat of Antimicrobial Resistance (2012).
- [6] Prabhavathi, F.: Antibacterial Discovery and Development, *Nat. Biotech.*, Vol. 24, pp. 1497–1503 (2006).
- [7] Lin, J., Nishino, K., Roberts, M. C., Tolmasky, M., Aminov, R. I. and Zhang, L.: Mechanisms of Antibiotic Resistance, *Front. Microbiol.*, Vol. 6, p. 34 (2015).
- [8] Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O. and Balaban, N. Q.: Distinguishing between Resistance, Tolerance and Persistence to Antibiotic Treatment, *Nat. Rev. Micro.*, Vol. 14, pp. 320–330 (2016).
- [9] Deshpande, P., Rodrigues, C., Shetty, A., Kapadia, F., Hedge, A. and Soman, R.: New Delhi Metallo- $\beta$  Lactamase (NDM-1) in Enterobacteriaceae, *J. Assoc. Physicians. India*, Vol. 58, pp. 147–149 (2010).
- [10] Chen, L., Todd, R., Kiehlbauch, J., Walters, M. and Kallen, A.: Pan-Resistant New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumoniae*, *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, Vol. 66, No. 1, p. 33 (2017).
- [11] Suzuki, S., Horinouchi, T. and Furusawa, C.: Prediction of Antibiotic Resistance by Gene Expression Profiles, *Nat. Commun.*, Vol. 5 (2014).
- [12] Buggenthin, F., Buettner, F., Hoppe, P. S., Ende, M., Kroiss, M., Strasser, M., Schwarzfischer, M., Loeffler, D., Kokkaliaris, K. D., Hilsenbeck, O., Schroeder, T. and Marr, F. J. T. . C.: Prospective identification of hematopoietic lineage choice by deep learning, *nature methods*, Vol. 14, pp. 403–406 (2017).
- [13] Tan, J., Ung, M., Cheng, C. and Greene, C. S.: UNSUPERVISED FEATURE CONSTRUCTION AND KNOWLEDGE EXTRACTION FROM GENOME-WIDE ASSAYS OF BREAST CANCER WITH DENOISING AUTOENCODERS, *Pacific Symposium on Biocomputing 2015*, pp. 4–8 (2015).
- [14] Zeng, H., Edwards, M. D., Liu, G. and Gifford, D. K.: Convolutional neural network architectures for predicting DNAProtein binding, *Bioinformatics*, Vol. 32, No. 12, pp. 121–127 (2016).
- [15] 森俊二, 大津展之: 認識問題としての二値化と各種方法の検討, *情報学 CVIM 研報*, Vol. 1977-CVIM-015, No. 34, pp. 1–12 (1977).
- [16] Krizhevsky, A., Sutskever, I. and Hinton, G. E.: ImageNet Classification with Deep Convolutional Neural Networks, *Adv. Neural Inf. Process. Syst.*, pp. 1097–1105 (2012).
- [17] Jarrett, K., Kavukcuoglu, K., Ranzato, M. and LeCun, Y.: What is the Best Multi-Stage Architecture for Object Recognition?, *Proc. IEEE Int. Conf. Comput. Vis.*, pp. 2146–2153 (2009).
- [18] Srivastava, N., Hinton, G., Krizhevsky, A., Sutskever, I. and Salakhutdinov, R.: Dropout, *J. Mach. Learn. Res.*, Vol. 15, No. 1, pp. 1929–1958 (2014).
- [19] Bousquet, O. and Bottou, L.: The Tradeoffs of Large Scale Learning, *Adv. Neural Inf. Process. Syst.*, pp. 161–168 (2008).
- [20] Rumelhart, D. E., Hinton, G. E. and Williams, R. J.: Learning Representations by Back-Propagating Errors, *Nature*, Vol. 323, pp. 533–536 (1986).