

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

長野 章宏¹ 青木 工太¹ 西野 美都子¹ 福島 愛子¹ 岩崎 憲治^{2,6} 廣瀬 未果² 古澤 力^{3,4}
アンドレイ グルシニコフ¹ 越後 富夫⁵ 西野 邦彦¹ 八木 康史¹

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。形態変化と遺伝子の関係を解明するためには、細菌株の形態の違いを定量的に評価する必要がある。本稿では、細菌株の形態の違いを識別する課題に取り組み、識別結果を解析することで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、外膜の形状や細菌内の異染小体（顆粒）の有無等に表れているが、外膜部分の像が不明瞭なものも多く、細菌の輪郭を抽出することは難しい。また、試料作製における固定や染色の影響により、同じ株の細菌であっても見え方が大きく異なる場合がある。そこで、電子顕微鏡画像データのばらつきに頑健な畳み込みニューラルネットワーク (CNN) を提案する。また GradCAM を用いた CNN の注目領域の可視化から、細菌株ごとに形態的特徴を分析する。

キーワード：多剤耐性菌、透過型電子顕微鏡、形態、CNN、可視化

Classification of Microscopy Images of Drug-Resistant Strains and Comparison of Their Morphological Features

NAGANO AKIHIRO¹ AOKI KOTA¹ HAYASHI-NISHINO MITSUKO¹ FUKUSHIMA AIKO¹ IWASAKI KENJI^{2,6} HIROSE MIKA²
FURUSAWA CHIKARA^{3,4} ANDREY GRUSHNIKOV¹ ECHIGO TOMIO⁵ NISHINO KUNIHICO¹ YAGI YASUSHI¹

¹ 大阪大学 産業科学研究所
Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, 8-1 Mihogaoka, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan.

² 大阪大学 蛋白質研究所
Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

³ 理化学研究所
RIKEN, Center for Biosystems Dynamics Research, 6-2-3 Furuedai, Suita, Osaka 565-0874, Japan.

⁴ 東京大学
Universal Biology Institute, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Tokyo 113-0033, Japan.

⁵ 大阪電気通信大学
Osaka Electro-Communication University, 18-8 Hatsucyou, Neyagawa, Osaka 572-8530, Japan

⁶ 筑波大学 生存ダイナミクス研究センター
University of Tsukuba TARA Center Life Science Center for Survival Dynamics, Tsukuba Advanced Research Alliance, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan.

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]。さらには、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。我々は最終目標を達成するための前段階として、パッチ画像を用いた畳み込みニューラルネットワーク (CNN) による細菌株の識別および、各細菌株における特徴的な部分の特定を行ったが [12]、下記のような課題が残されていた。

- 実験に用いていたデータセットは1つの培養から作成された1つのグリッド (3.2で詳細に説明) から撮影されたものであるため、培養の過程で生じるばらつきに関して頑健とは言えない。
- パッチ画像を用いて識別しているため、細菌の全体形状の情報が識別に使用されていない。
- 特徴的な部分の特定をクラスタリングと目視で行っているため、CNNが実際にその部分に注目しているかどうか不明である。

本研究では、培養やその後の試料作成過程で生じるばらつきを評価するために作成した新たなデータセットに対して、細菌の全体形状を考慮したニューラルネットワークによる細菌株の識別を行い、その性能を評価する。また、Grad-CAM [13] を用いて CNN の注目領域の可視化を行い、各細菌株における特徴的な部位について検討する。

2. 関連研究

CNN が抽出した特徴を理解するための方法として、出力に対して誤差逆伝播法を適応し、識別に有効なピクセルを可視化する手法 [14] [15] や、特徴マップと学習済みの重みや勾配を用いて対象のクラスの注目領域を可視化した class activation map (CAM) を作成する手法 [16] [13]、ネットワーク内に入力の中の部分に注目すれば良いかを学習する機構を組み込む Attention と呼ばれる手法 [17] [18] などがある。

電子顕微鏡に対して機械学習手法を適用した先行研究として、神経系の透過型及び操作型電子顕微鏡画像から軸索とミエリン鞘のセグメンテーションを行う研究 [19] や、クライオ電子顕微鏡画像から単一粒子を認識する研究 [20] などが挙げられるが、我々の先行研究 [12] を除いて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。

3. 電子顕微鏡画像

3.1 節で解析に用いた細菌、3.2 節で試料作成と撮影時の設定、3.3 節にて電子顕微鏡画像について述べる。

3.1 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、薬剤に対して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) に対して耐性を持つ株 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らなければ、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。

3.2 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した。培養時のばらつきを評価できるデータセットであることを示すために、本節では、試料作成の手順について説明する。全体の流れを図 1 に示す。

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。このエポキシ樹脂包埋されたものをブロックと呼ぶ。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。その切片を指示幕 (グリッド) に乗せ、重金属 (酢酸ウラン、鉛) 染色を行うことで、透過型電子顕微鏡で観察できるようになる。撮影には 2kx2k CCD カメラと、連続撮影が可能なソフトウェアを使用した。このソフトウェアを使用すると、グリッド内の局所領域から連続して複数の画像を取得することが可能となる。このように一度に取得された画像群を1ショットとする。

電子顕微鏡は以下のように設定し、撮影を行った。

- 加速電圧は 80kV
- スポットサイズは 1
- 対物レンズ倍率は 3000 倍
- 絞りは 3(40 μ m)
- 露光時間は 1.0 秒

3.3 株間の違い

各株の電子顕微鏡画像を図 2 に示す。ただし、実際には 16 ビットの画像を $\mu \pm 3\sigma$ の範囲の輝度値で正規化して、8 ビット画像に変換している。ここで、 μ と σ はそれぞれ、画像内の輝度値の平均と標準偏差である。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、



図1 試料作成の流れ

Fig. 1 Flow chart of extracting single cell

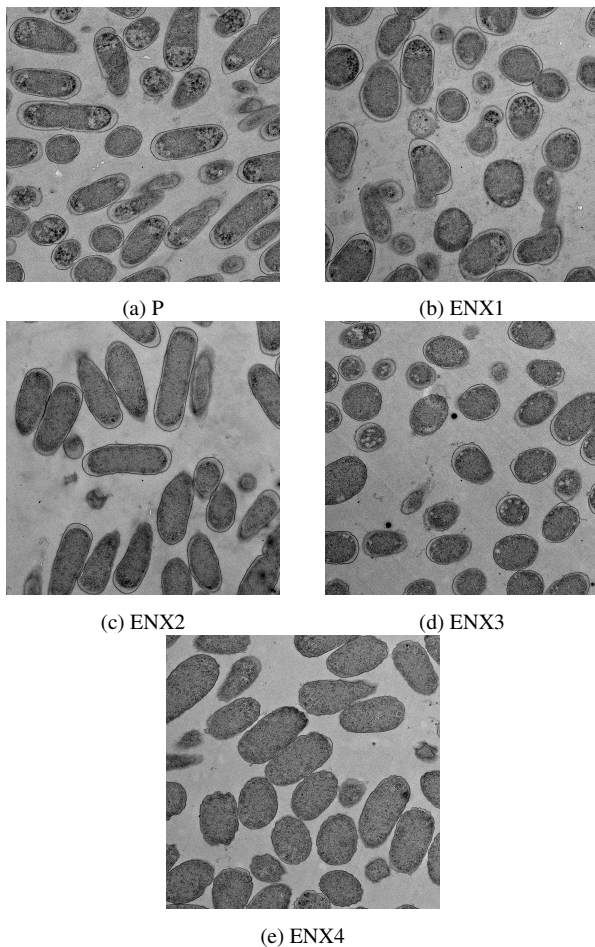


図2 各株の電子顕微鏡画像

Fig. 2 Electron microscopic images of each strain

外膜の形状、顆粒の有無、色味などに違いが見られた。顆粒、ペリプラズム、ブレブの例を図3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。

4. 薬剤耐性株の識別

本研究では、薬剤耐性株の識別のために、畳み込みニューラルネットワーク (CNN) を用いる。CNN の特徴の一つとして、特徴量すらも学習するということがある。これは、人間が設計した特徴量を入力として学習を行う、従来の機

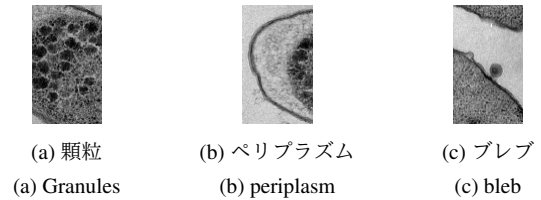


図3 顆粒、ペリプラズム、ブレブの例

Fig. 3 Examples of granules, periplasm, and bleb image

械学習の手法とは大きく異なる。そのため、細菌の外膜形状や細胞内の特徴など、人間では設計することが難しい特徴を抽出することが期待できる。耐性菌と非耐性菌との2クラス分類を通して、耐性菌が持つ特徴的な部分や形状を特定する。

提案手法では、電子顕微鏡画像からシングルセル画像を作成し、シングルセルとそのシングルセル画像から作成したパッチを組み合わせることで CNN モデルの学習を行う。また、提案手法の比較のため、パッチ単位で識別を行う場合と精度を比較した。本章では、4.1 節でシングルセル画像の作成方法、4.2 節でパッチ画像の作成方法について説明する。

4.1 シングルセルの抽出

シングルセル抽出は以下の手順で行う (図4)。

- (1) 元画像に対して大津の二値化 [21] を適応する。大津の二値化とは輝度値ヒストグラムの分離度が最大となる値を閾値として、画像を二値化する方法である。
- (2) watershed 法を用いてシングルセルのセグメンテーションを行う。セグメンテーション結果から、回転を考慮して矩形で切り取った細菌画像のそれぞれに対して、以下の操作を行う。
- (3) 画像の大きさに対する閾値によって、小さな細菌を除去する。
- (4) 式 (1) の条件を満たす画素を含む場合、その画像を除去する。

$$|I(x, y) - I_{average}| < Threshold \quad (1)$$

ここで、 $I(x, y)$ は画像の x, y 座標における輝度値、 $I_{average}$ は画像内の輝度値の平均を表す。ゴミや汚れを含む場合や、局所的に電子線が照射された場合などに、局所的に画素値が極度に高く、または低くなるため、式 (1) によってそれらの画像を除去できる。

- (5) 複数個の細菌を含む画像を以下のように除去する。
 - (a) 矩形で切り取った細菌に対応するマスク画像を正方形にリサイズする。
 - (b) リサイズしたマスク画像と円形のマスク画像とのパターンマッチングを行い、複数の細菌を含む画像を除去する。複数の細菌を含む場合、そのマスク画像は円形とは異なる可能性が高い。
- (6) 除去されなかった画像に対して $\mu \pm 3\sigma$ の範囲の輝度値で正規化して、8 ビット画像に変換する。

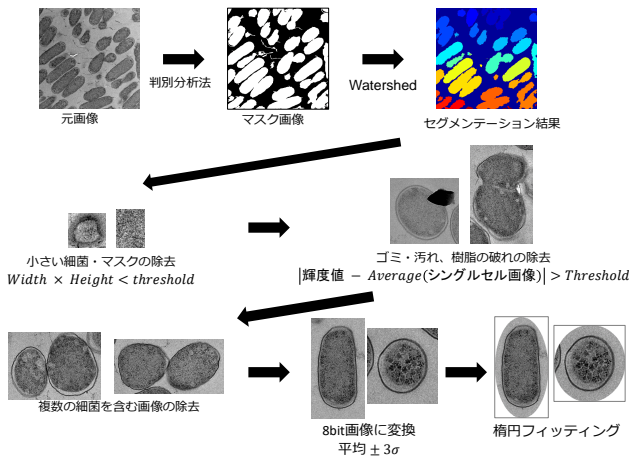


図4 シングルセル抽出の流れ

Fig. 4 Flow chart of extracting single cell

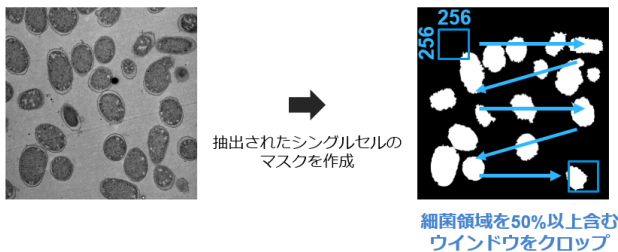


図5 パッチ画像の作成

Fig. 5 Patch selection

(7) 楕円のフィッティングを行い、背景部分を除去する。
以上の手順によって得られるシングルセル画像を CNN モデルの学習に使用する。

4.2 パッチ画像の作成

パッチ画像作成の流れを図5に示す。4.1節で説明した方法によって抽出したシングルセルから、背景とシングルセルを表す2値のマスク画像を作成する。

マスク画像上を 256×256 の大きさのウィンドウを32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細胞領域が含まれるかどうかを判定する。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。一方、本研究では耐性菌株の特徴的な構造を特定することが目的であるため、細菌の部分に限定せずにパッチを作成する。よって、ウィンドウ内の細胞部分の割合が50%以上であるとき細胞を含むものとし、パッチとして切り取る。パッチに対して、マスク処理による背景領域の除去は行わない。

4.3 提案手法

本節では、細菌の全体形状の特徴とより詳細な部分特徴の両方を抽出するためのネットワークについて説明する。

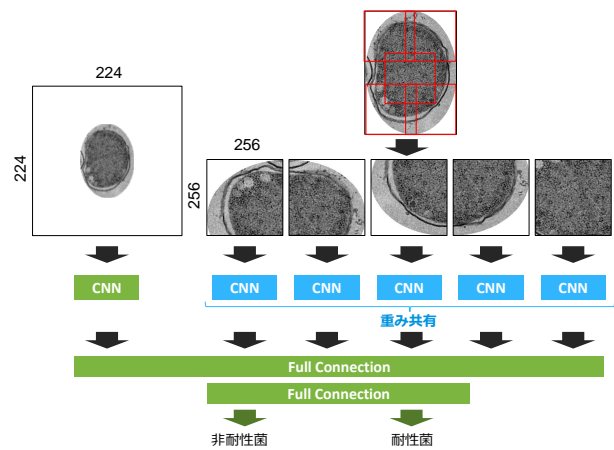


図6 シングルセルとパッチから特徴を抽出するネットワーク

Fig. 6 Network architecture to extract features from single cell and patch image.

実装には Pytorch [22] を用いた。

4.3.1 シングルセルとパッチを入力とするネットワーク

細菌の全体形状と、より詳細な部分特徴の両方を抽出するために、図6に示すネットワークを提案する。縮小したシングルセル画像と、縮小前のシングルセル画像から作成した5枚のパッチを、それぞれ異なるネットワークに入力する。シングルセル側のネットワークは細菌の全体形状や大きさを抽出することが目的であり、パッチ側のネットワークはより詳細な部分特徴を抽出することが目的である。それぞれのネットワークが抽出した特徴を結合し、全結合層への入力とする。ここでは、5枚のパッチから特徴を抽出するネットワークは重みを共有する。

シングルセル画像とパッチ画像の大きさはそれぞれ 224×224 と 256×256 とした。また、シングルセル画像とパッチ画像のネットワークには AlexNet [23] を使用した。1つ目の全結合層のユニット数は71,936、2つ目の全結合層のユニット数は4096、最終層のユニット数は2とした。また、畳み込み層の活性化関数は Relu [24] を使用した。

4.3.2 シングルセル

シングルセル側のネットワークに対して、以下のような画像を入力とする。はじめに、シングルセルの長軸の長さでソートした後、上位0.5%の細菌は、分裂途中の細菌や、分裂せずに異常に長くなってしまった細菌であることが多いため、除去する。0.5%という値は実験的に決定した。次に、シングルセルの向きと画像の大きさを揃えるために次のような変換を行う。最も長いシングルセルの長軸が224になる比率を計算し、全てのシングルセルをその比率でリサイズする。今回は全てのシングルセルの長軸と短軸を0.216倍した。さらに、シングルセルの長軸方向が画像の横軸と垂直になるように回転させた後、シングルセルの中心が画像中心と同じになるように移動させる。この処理により、細菌の形状の違いや大きさの違いを保存したまま、

表 1 各セットの元画像の枚数

Table 1 The number of original images in each dataset

	P	ENX1	ENX2	ENX3	ENX4
Set1	972	936	900	900	900
Set2	900	900	900	900	900
Set3	900	900	900	900	900

表 2 各セットのシングルセルの枚数

Table 2 The number of single cell images in each dataset

	P	ENX1	ENX2	ENX3	ENX4
Set1	9,280	6,158	3,803	9,253	6,702
Set2	9,262	5,886	4,255	10,357	4,589
Set3	7,834	5,634	3,404	10,192	5,274

入力画像の大きさを揃えることができる。

4.3.3 パッチ

パッチ側のネットワークに入力する画像は、詳細な部分特徴を抽出することが目的であるため、リサイズする前のシングルセル画像から作成する。このとき、シングルセルの各辺の長さがパッチよりも小さい場合、パッチを作成できない。あるいは、辺の長さがパッチの大きさと同じ場合、作成する 5 枚のパッチ画像が全て同じになってしまう。これらの問題を解決するために、シングルセルの各辺について、パッチの大きさの 2 倍より小さい場合、パディングを行うことにする。

5. 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 節で識別結果について述べる。5.3 節で各株に特徴的な部位について考察を行う。

5.1 実験設定

5.1.1 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。菌株ごとに異なるブロックを 3 個用意し、3 セット分のデータセットを作成し、3 分割交差検証を行う。これにより、固定・樹脂包埋・染色時に生じるデータのばらつきに対する評価が可能である。染色時のばらつきをカバーするために、1 ブロックあたり、5 グリッドから 5 から 7 ショット分のデータを取得した。各 Fold において、2 セット分のデータを Training 用のデータセットとし、そこから 1 割をランダムに選択し、Validation 用のデータセットとする。残りの 1 セットは Test 用のデータセットとする。各セットに含まれる元画像の枚数を表 1 に、シングルセルの枚数を表 2 に、パッチの枚数を表 3 に示す。

5.1.2 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

表 3 各セットのパッチの枚数

Table 3 The number of patch images in each dataset

	P	ENX1	ENX2	ENX3	ENX4
Set1	337,251	270,169	137,575	279,307	335,014
Set2	330,505	251,379	175,905	308,839	213,267
Set3	291,494	237,150	140,870	306,850	252,623

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 0.0001 とし、5 エポックの間、Validation Loss が改善しない場合に $\frac{1}{10}$ 倍にする。学習は 100 エポック行う。また、ミニバッチ学習を行い、ミニバッチ数は 64 とする。最適化関数には Adam [25] を使用した。Loss 関数には cross entropy を使用し、各データセット内の各クラスのデータの比率で重み付けを行った。また、パッチ画像については、学習データが膨大であり、毎エポック全てのデータを学習に使用すると非常に時間がかかる。そのため、今回は 1 エポックごとに、Training 用データと Validation 用データから、それぞれランダムに 10,000 枚ずつ選択し、そのエポックの Training 用データ、Validation 用データとした。実験で使用するネットワークは ImageNet [26] での事前学習が行われたものを使用する。

5.2 結果

提案手法、シングルセルのみで学習を行った場合、パッチのみで学習を行った場合との比較を行う。シングルセルのみ、及び、パッチのみでの学習の際に使用するネットワークには AlexNet を使用した。

各フォールドに対して、下記の計算式により、Accuracy, Sensitivity, Specificity を求め、評価を行った。正解した耐性菌を TP(True positive)、間違えた耐性菌を FP(False positive)、正解した非耐性菌を TN(True negative)、間違えた非耐性菌を FN(False negative) とする。

$$\text{Accuracy} = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$$

$$\text{Sensitivity} = \frac{TP}{TP + FP}$$

$$\text{Specificity} = \frac{TN}{TN + FN}$$

それぞれの値を表 4 に示す。全ての手法において、Accuracy と Sensitivity は全ての手法で同様の結果が得られている。しかしながら、Specificity に関して fold2 の結果が非常に低い。このことに関して、5.3 節において、追実験を行った結果とともに考察する。fold1, fold3 に関しては、シングルセルとパッチを組み合わせた提案手法が最も良い結果となった。

表 4 識別結果

Table 4 Classification result

	Fold1	Fold2	Fold3
	Accuracy		
シングルセル	0.862	0.802	0.861
シングルセル+パッチ	0.916	0.826	0.882
パッチ	0.894	0.835	0.841
	Sensitivity		
シングルセル	0.889	0.964	0.924
シングルセル+パッチ	0.933	0.989	0.909
パッチ	0.919	0.963	0.881
	Specificity		
シングルセル	0.775	0.350	0.690
シングルセル+パッチ	0.860	0.374	0.806
パッチ	0.814	0.445	0.726

5.3 考察

5.3.1 Grad-CAM による可視化

CNN の注目領域を確認するために、Grad-CAM [13] を用いて注目領域の可視化を行った。Grad-CAM は可視化したいクラスのみ 1 で他はゼロのラベルを使って誤差逆伝播を行い、可視化に使用したい層の勾配を求める。その勾配に対して global average pooling [27] を行い、その結果を重みとして、その層の各特徴マップとの重み付き和を取り、class activation map(CAM) を求める。その後、CAM に ReLU [24] を適応し、負の値を 0 に丸めた後、元画像の大きさにアップサンプリングする。数式で表すと下記のようになる。式中の c は可視化するクラス、 i, j は特徴マップの各ピクセル、 Z はピクセル数、 $k = 0, \dots, K$ であり K は特徴マップの個数である。 $\frac{1}{Z} \sum_i \sum_j$ は global average pooling を表す。 y^c は c を表す部分が 1 で、それ以外の部分が 0 の 1 次元ベクトルである。 $\frac{\partial y^c}{\partial A_{i,j}^k}$ は y^c の A^k における勾配を表す。 σ_k^c は特徴マップ A^k に対する重みを表す。 CAM^c はクラス c に対する特徴マップを表す。

$$CAM^c = \sum_k \sigma_k^c A^k, \quad \sigma_k^c = \text{ReLU} \left(\frac{1}{Z} \sum_i \sum_j \frac{\partial y^c}{\partial A_{i,j}^k} \right)$$

このようにして、入力画像の注目領域を可視化することができる。しかしながら、今回提案したネットワークはシングルセルと、5 枚のパッチ、合計 6 枚の画像の入力がある。そのため、単純に Grad-CAM を適応しただけでは、6 枚の入力のうちどの部分が最も特徴的と捉えられているかわからない。そこで、シングルセルの CAM と、5 枚のパッチの CAM 全てについて、次式により、最小値が 0 最大値が 1 となるように正規化を行った。式中の CAM は class activation map であり、 $n = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6$ であり、 CAM_n はシングルセルの CAM と 5 枚のパッチの CAM のどれか一つを表しており、 CAM_{all} はそれら全ての CAM を表す。また、 i, j は CAM の各ピクセルを表す。シングルセルと 5 枚のパッチの CAM 全ての中の最大値と最小値を使って可視

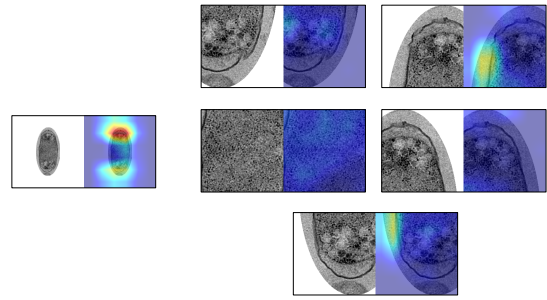


図 7 fold1 の非耐性菌のテストデータに対して注目領域を可視化した図 [非耐性菌クラスのスコアは 1.00]

Fig. 7 CNN's attention area to fold1's non-resistant data [the score is 1.00]

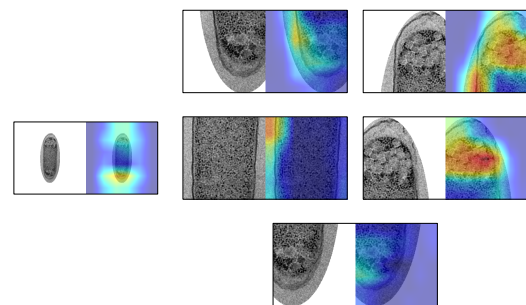


図 8 fold2 の非耐性菌のテストデータに対して注目領域を可視化した図 [非耐性菌クラスのスコアは 0.999]

Fig. 8 CNN's attention area to fold2's non-resistant data [the score is 0.999]

化することで、パッチとシングルセルのどちらがより注目されていたかを確認することができる。

$$CAM_{n_normed} = \frac{CAM_n - \text{Min}(CAM_{i,j,all})}{\text{Max}(CAM_{i,j,all}) - \text{Min}(CAM_{i,j,all})}$$

この方法によって可視化を行い、次のような結果が得られた。なお、シングルセル、パッチの 2 つのネットワークのそれぞれ最後の畳み込み層から得られる特徴マップを使用した。fold1, fold3 のテストデータの親株は図 7 のように、シングルセルの顆粒部分が主に発火しているものが多い。また、fold2 のテストデータの親株は図 8 のようにシングルセルの顆粒部分に加え、パッチ画像の顆粒部分も発火しているものが多い。fold1, fold3 においても fold2 の結果のように、パッチの顆粒部分が発火しているものもあるが、枚数は少ない。一方、耐性菌株のデータは図 9 のように、シングルセルのみが発火しているものがほとんどであった。以上より、耐性菌株の判定にはシングルセルから得られる情報が重要であり、パッチ画像から得られる情報は非耐性菌と判定することに役立っていると推測される。しかしながら、表 4 の識別結果から、情報が増えても識別に有効に働くかはデータセット次第であると言える。

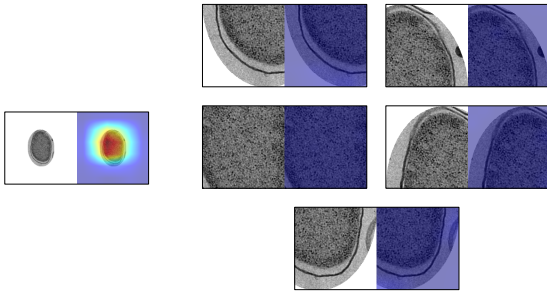


図9 fold1のENX1のテストデータに対して注目領域を可視化した図 [耐性菌クラスのスコアは1.00]

Fig.9 CNN's attention area to fold1's resistant data [the score is 1.00]

表5 ブロックを混合した場合の識別結果

Table 5 Classification result about dataset which mixed each block.

	Fold1	Fold2	Fold3
	Accuracy		
シングルセル	0.879	0.872	0.877
シングルセル+パッチ	0.922	0.929	0.933
	Sensitivity		
シングルセル	0.929	0.924	0.927
シングルセル+パッチ	0.921	0.933	0.965
	Specificity		
シングルセル	0.736	0.724	0.735
シングルセル+パッチ	0.927	0.917	0.838

5.3.2 各ブロック由来のデータを混合した場合の実験

5.2節で示したように、fold2の結果だけが非常に悪い。そこで、各ブロック由来のデータがトレーニングデータに含まれている場合について実験を行った。つまり、全てのブロックから作成されたデータセットを3分割し、それらを入れ替えて Training, Validation, Test用のデータセットとして交差検証を行う。それ以外の実験設定は5.1節と同じである。結果を表5に示す。セットごとにブロックを分けた場合と比較すると、トレーニングデータが少ないにも関わらず、fold間の結果のばらつきは少ないことがわかる。したがって、ブロックごとにデータに大きなばらつきが生じていると考えられる。さらに、シングルセルのみの識別結果よりも、提案手法の方が全てのfoldにおいて Accuracy と Specificity は大きく向上し、Sensitivity も同等、または向上していることから、シングルセル画像にパッチ画像を組み合わせる提案手法の有効性が示された。

今後の課題として、データセットを拡張する場合、1つのブロックから多くの枚数のデータを取得するよりも、複数のブロックからデータを取得した方が効果的であると考えられる。

5.3.3 識別結果の解析

さらに fold2 の親株の識別結果が悪い原因を分析するために、ショットごとの Accuracy を求めた。ショットごと

表6 fold2のテストデータの非耐性菌のグリッド4のショット単位の Accuracy

Table 6 Accuracy per shot of grid4 of fold2's non-resistant data

Shot1	Shot2	Shot3	Shot4	Shot5
0.350	0.604	0.191	0.185	0.236

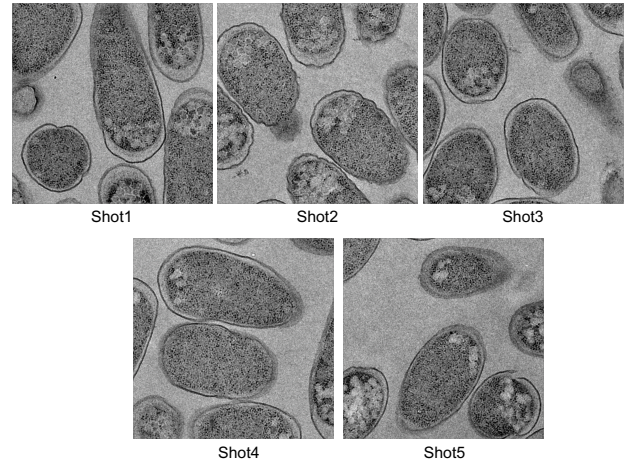


図10 fold2のグリッド4の各ショットの非耐性菌株の画像例

Fig.10 example of non-resistant data of each shot of fold2's grid4

の Accuracy は以下のようにして計算した。

$$Accuracy_{shot} = \frac{\text{ショット由来の正解したシングルセルの個数}}{\text{ショット由来のシングルセルの個数}}$$

これにより、親株内でもショットによって正答率が大きく異なることがわかった。シングルセルのみで学習した場合の一部の結果を表6に示す。パッチのみ、および、パッチとシングルセルを組み合わせて学習した場合とも、図6と同様であった。これら各ショットの画像を図10に示す。正答率が高いshot2の親株は外膜が他のショットに比べてガタガタとし、また、正答率が低いショットは両端の部分以外にも外膜と細胞質の間に隙間を持つものが多いという傾向がある。シングルセルのみの識別では、縦横それぞれ約1/4倍されているため、これらの違いがどの程度識別に影響を与えるかわからないが、これらも fold2 の識別率が低かった原因の1つと言えそうである。同じグリッドでも撮影する位置によって細菌にばらつきがあるということがわかる。データセットを拡張する場合には、同一グリッドでも様々な場所からデータを取得した方が効果的であると考えられる。

6. 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として、透過型電子顕微鏡画像で撮影された細菌株に対して、細菌の全体形状の特徴とより詳細な部分特徴を考慮した CNN による識別手法を提案した。

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、パッチのみとシングルセルのみ、提案手法の3種類の方法

について識別実験を行った。3つの全てにおいて、fold2の結果が他のfoldと比較して悪いという結果になった。また、提案手法とパッチのみとシングルセルのみの結果を比較しても、結果が改善するかどうかはfoldによって異なっていた。Grad-CAMを用いて各株に特徴的な部分の推定と推定結果の分析を行い、今後データセットを構築する上で重要となるであろう知見を示した。

今後の課題として、データセットを拡張すること、細菌の形状と詳細な特徴を抽出できる新たなアルゴリズムの開発が必要である。また、展望としては他の薬剤に対する耐性株の解析も行う必要がある。

謝辞

本研究の一部は、大阪大学・蛋白質研究所 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。また、電子顕微鏡データを取得するにあたり、大阪大学・産業科学研究所 総合解析センターの皆様にご協力いただきました。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., Tolmashy, 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- β 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] Akihiro, N., Kota, A., Yuna, T., Mitsuko, N., Kunihiko, N.,

- Chikara, F., Kenji, I., Tomio, E. and Yasushi, Y.: Classification of Microscopic Images of Drug Resistant Strains Using Convolutional Neural Networks, *Computer Vision and Pattern Media* 207 (2017).
- [13] Selvaraju, R. R., Cogswell, M., Das, A., Vedantam, R., Parikh, D. and Batra, D.: Grad-CAM: Visual Explanations From Deep Networks via Gradient-Based Localization, *The IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV)* (2017).
- [14] Springenberg, J. T., Dosovitskiy, A., Brox, T. and Riedmiller, M.: Striving for simplicity: The all convolutional net, *arXiv preprint arXiv:1412.6806* (2014).
- [15] Smilkov, D., Thorat, N., Kim, B., Viégas, F. and Wattenberg, M.: Smoothgrad: removing noise by adding noise, *arXiv preprint arXiv:1706.03825* (2017).
- [16] Zhou, B., Khosla, A., Lapedriza, A., Oliva, A. and Torralba, A.: Learning deep features for discriminative localization, *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, pp. 2921–2929 (2016).
- [17] Xu, K., Ba, J., Kiros, R., Cho, K., Courville, A., Salakhudinov, R., Zemel, R. and Bengio, Y.: Show, attend and tell: Neural image caption generation with visual attention, *International conference on machine learning*, pp. 2048–2057 (2015).
- [18] Schlemper, J., Oktay, O., Chen, L., Matthew, J., Knight, C., Kainz, B., Glocker, B. and Rueckert, D.: Attention-Gated Networks for Improving Ultrasound Scan Plane Detection, *arXiv preprint arXiv:1804.05338* (2018).
- [19] Zaimi, A., Wabartha, M., Herman, V., Antonsanti, P.-L., Perone, C. S. and Cohen-Adad, J.: AxonDeepSeg: automatic axon and myelin segmentation from microscopy data using convolutional neural networks, *Scientific Reports*, Vol. 8, No. 1, p. 3816 (2018).
- [20] Zhu, Y., Ouyang, Q. and Mao, Y.: A deep convolutional neural network approach to single-particle recognition in cryo-electron microscopy, *BMC Bioinformatics*, Vol. 18, No. 1, p. 348 (online), DOI: 10.1186/s12859-017-1757-y (2017).
- [21] 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).
- [22] Paszke, A., Gross, S., Chintala, S., Chanan, G., Yang, E., DeVito, Z., Lin, Z., Desmaison, A., Antiga, L. and Lerer, A.: Automatic differentiation in PyTorch, *NIPS-W* (2017).
- [23] Krizhevsky, A., Sutskever, I. and Hinton, G. E.: ImageNet Classification with Deep Convolutional Neural Networks, *Adv. Neural Inf. Process. Syst.*, pp. 1097–1105 (2012).
- [24] Nair, V. and Hinton, G. E.: Rectified linear units improve restricted boltzmann machines, *Proceedings of the 27th international conference on machine learning (ICML-10)*, pp. 807–814 (2010).
- [25] Kingma, D. P. and Ba, J.: Adam: A method for stochastic optimization, *arXiv preprint arXiv:1412.6980* (2014).
- [26] Deng, J., Dong, W., Socher, R., Li, L.-J., Li, K. and Fei-Fei, L.: ImageNet: A Large-Scale Hierarchical Image Database, *CVPR09* (2009).
- [27] Lin, M., Chen, Q. and Yan, S.: Network in network, *arXiv preprint arXiv:1312.4400* (2013).