



Title	Using novel micropore technology combined with artificial intelligence to differentiate Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis
Author(s)	森村, 歩
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/98619
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏名 Name	森村 歩
論文題名 Title	Using novel micropore technology combined with artificial intelligence to differentiate <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Staphylococcus epidermidis</i> (人工知能と融合したマイクロポア技術を用いた <i>Staphylococcus aureus</i> と <i>Staphylococcus epidermidis</i> の識別)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕 病原性細菌を同定する方法は、従来の培養に基づく微生物学的検査、核酸検査、および質量分析に大別される。従来の微生物学的検査では細菌の分離・同定に数日を要する。また、核酸検査と質量分析は比較的迅速で信頼性が高いが、訓練を受けた技術者を必要とする。さらに、質量分析には高価な機器が必要である。従って、病原性細菌を同定するための新しく安価で簡便な技術の開発が必要とされており、今回我々はマイクロポア技術と機械学習を組み合わせることにより <i>Staphylococcus aureus</i> と <i>Staphylococcus epidermidis</i> を識別する方法を開発することを目的とした。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 臨床的に分離同定された <i>S. aureus</i> 50株（メチシリン感受性黄色ブドウ球菌：MSSA 25株、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌：MRSA 25株）と <i>S. epidermidis</i> 50株と、標準株であるATCC 6538（MSSA）・ATCC BAA-1756（MRSA USA 300）・ATCC BAA-1707（MRSA MW2）・ATCC 12228（ <i>S. epidermidis</i> ）を培養し、無菌のPBSで懸濁した菌液を実験に用いた。微細加工技術により50nm厚窒化ケイ素フィルムに3μm径のポアを開けたものをプラスチック製の流路に配置、Ag/AgCl電極を流路に設置したマイクロポアモジュールのcisチャンネルには菌液を、transチャンネルにはPBSを注入し、流路のAg/AgCl電極で-0.1ボルトの電圧をかけポアを菌が通過する際のイオン電流波形を測定した。一菌株あたり、3分間ずつの測定を3回行い、また、測定ごとに新しいモジュールを使用した。機械学習においては、まず専用ソフトウェアを用いてノイズを除去しイオン電流の波形パルスを切り出した後、専用サーバー上で特徴量を抽出した。10分割交差検証を行い、最適化したAIモデルの性能評価を行った。実験に用いた菌液の濃さと、測定されたイオン電流のパルス数に相関はなく、どの測定においても十分な菌量が確保されていた。測定ごとに15,000の波形を収集し機械学習に用いた。波形単独で識別させたところ、識別の正確性を表すF値=0.59であり、ランダムであることを示す0.5を超えていたため両者は識別可能だと判断した。次に、種レベルでの識別を正確に行うため、株ごとの機械学習をおこなった。最良のF値が得られるトレーニングセットを決定し、菌株が <i>S. aureus</i> と <i>S. epidermidis</i> のいずれに属するかを判定させる識別器を作成するため、電流や時間といった個々の独立した変数に加えて全体の分布を利用するアセンブル学習を行った。アセンブル学習で作成された識別器のF値は0.93だった。計測されたサンプルを2群に分割し、片方をトレーニングデータセット、もう片方をテストデータセットとしてホールドアウト法で識別した。一株あたり3回の計測結果のうち2つ以上で正答した場合を「正答」と定義した。その結果、 <i>S. aureus</i> の感度は96.4%と高く、また、標準株であるATCC株も <i>S. aureus</i> と <i>S. epidermidis</i> ともに正答、ROC曲線のAUC=0.94と高い値を示し、検査方法として優れていることが示された。ポアを通過する際に電流に影響を与える細菌の大きさと表面の形状を調べるため、98 hPaの低気圧条件において走査型電子顕微鏡で観察を行ったところ、 <i>S. epidermidis</i> ・ <i>S. aureus</i> 共に球形かつ直径0.6 μm から 1.0 μmの範囲であり、顕微鏡像を目視で観察した限りでは形態と大きさに関して違いは見られなかった。特徴量の分布を検討したが、得られたデータポイント数、波形の電流値、ピーク位置に大きな差は見られなかった。また、イオン電流に影響を与えるゼータ電位を、 <i>S. aureus</i> 10株と <i>S. epidermidis</i> 10株について、Zetasizer™を用いて測定したが、有意差は見られなかった。ただし、各菌の分布は異なっているように見えた。識別器がどの特徴量を特異的に参照しているかは不明ながら、全体の分布を参照するアセンブル学習の結果高い識別性能が得られたと考えられた。	
〔総括(Conclusion)〕 マイクロポア装置と機械学習を融合させた細菌同定法は、従来の生化学・分子生物学・質量分析から独立した全く新しい手法であり、今回の <i>S. aureus</i> と <i>S. epidermidis</i> の識別ではAUROC=0.94で <i>S. aureus</i> の感度96.4%という高い正確性を得られた。臨床応用が期待される。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 森村 歩

論文審査担当者	(職)	氏名
主査	大阪大学教授	忍那 賢志
副査	大阪大学教授	松岡 悠美
副査	大阪大学教授	飯田 哲也

論文審査の結果の要旨

本研究は、類似の形態を持つ細菌である *Staphylococcus aureus* と *Staphylococcus epidermidis* を迅速に区別する新しい手法を提案している。従来の細菌同定法では数日を要することが一般的であり、迅速かつ信頼性の高い判別方法の必要性が高まっている。研究チームは、マイクロボア技術と機械学習を組み合わせ、特定のトレーニングを必要とせず、低コストで実施可能な同定法を開発した。この手法は、ROC曲線下の面積が0.94と非常に高い精度を示し、これら2種類の細菌を迅速に区別できることを実証した。この技術は、特に遠隔地や開発途上国での細菌感染症の診断と治療を容易にする可能性があると思われる。また、この研究は、AIを支援とした臨床微生物学における診断方法の有用性を示しており、迅速な細菌同定により、感染症患者への適切な治療の提供が可能になることを示唆している。これは、抗微生物薬の適切な使用を促進し、公衆衛生上の大きな脅威である抗微生物薬耐性の問題への対応にも寄与すると期待される。

以上のことから、本研究は博士（医学）の学位授与に値するものと考えられる。