

令和 7 年 4 月 25 日

令和6年度 共同研究報告書

研究代表者： 橋本 弘司

1. 研究課題名	日本語表記：ローソニア感染症抗体検査を補助するAI判定プログラムの開発 英語表記：Development of an AI judgment program to assist anti- <i>Lawsonia intracellularis</i> antibody test.		
2. 研究期間	令和 6 年 4 月 1 日 ~ 令和 7 年 3 月 31 日		
3. 共同研究者	氏 名	機関・所属部署名	職 名
	橋本 弘司	熊本大学大学院生命科学研究部	助教
	上村 涼子	宮崎大学農学部	教授
4. 研究目的	<p>豚のローソニア感染症はグラム陰性、微好気性、偏性細胞内寄生菌である <i>Lawsonia intracellularis</i> (Li) の糞口感染による増殖性腸炎である。回腸炎の主要な原因菌であり、重篤症状の場合、急激な腸管内出血と重度の貧血、黒色タール様便の排泄等が認められ、この場合の死亡率は50%にのぼることもあり、大きな経済損失をもたらしている。抗体検査は主に血清の間接蛍光抗体法で行われているが、今回、スライドグラスに固定した菌体を抗原とした新たな検査法の確立を目指している。現在、陽性判定の際、顕微観察に多くの時間を割いているため、AIによる画像検査を導入し、効率化をはかることを目的とする。</p>		
5. 研究内容・成果	<p>【材用・方法】</p> <p>1. ローソニア感染豚の免疫染色による判定に用いる sSAB 抗原固相化法の検討 従来の固相化法は、生ワクチンに含まれる抗原となるローソニア菌の分布にムラがあり顕微鏡観察に支障があったため、抗原のスライドグラスへの固相化法の改良を試みた。エンテリゾール® イリアイティス FC 生ワクチンの粉末を DW で 2.5% に懸濁し、3,000rpm で 5min 遠心しワクチンに含まれる細胞塊などの夾雑物を取り除いた後、上清を 13,000rpm で 5min 遠心して菌を集め、同量の DW で懸濁した。この菌液を高撥水印刷スライドグラス (10well, Matsunami) に 20μl/well に滴下し風乾した。次にスライドグラスの well に冷アセトンを滴下し、固定と脱脂を行い固相化した。風乾後、豚血清検体を用いて sSAB 法を実施した。</p> <p>2. AI による画像解析法の検討 顕微鏡観察による豚のローソニア感染の判定に多くの時間を割かれているため、AI を用いた判定を導入して効率化を実現するため、撮像条件、画像処理、プログラムの最適化を行った。AI 判定に用いたサンプルは従来の固相化法によって免疫染色を終えたスライドグラスを用いた。撮像は well の中心付近とし、恣意的なバイアスを排除するように努めた。陽性検体、陰性検体それぞれ 50 検体、合計</p>		

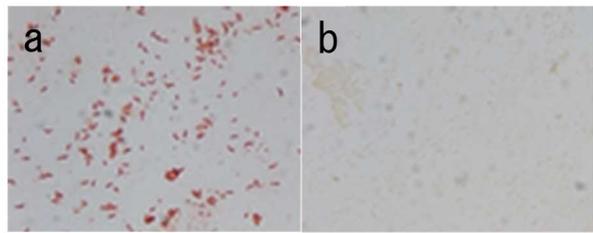


Fig. 1 判定プログラムに用いた a:陽性検体と、b:陰性検体の一例

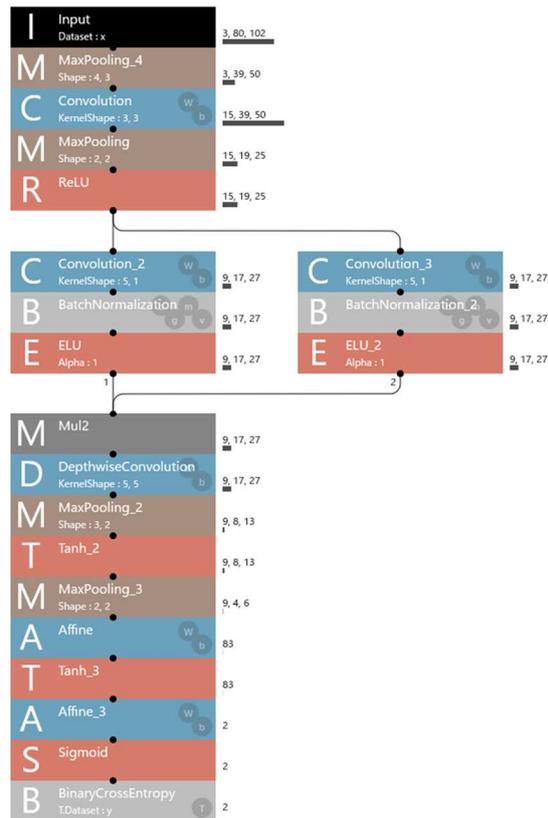


Fig. 2 判定プログラムに用いたプログラム

100枚の1,920 x 1,088 pixel、フルカラー画像をオリジナルデータとした。各画像を横4 x 縦2に8分割後、画像サイズを102 x 80 pixelにダウンサイズし、Sony Neural Network Console(NNC)への入力画像として使用した(Fig.1)。合計800枚の入力画像をTraining-560枚、Validation-140枚、Test-100枚に分け、判別プログラムを作成し判定させた(Fig.2)。構造自動探索を有効にし、学習反復世代数500、バッチサイズ120とした。

【結果および考察】

1. 改良した固相化の評価

従来法による固相化に用いたワクチンは、あらかじめ規定濃度でワクチンを希釈し冷蔵保存したものを用いていたため、経日変化に伴い抗原性が失われる傾向が疑われた。改良した固相化法を用いた結果、夾雑物の量が少なくなり、風乾の過程による菌体の筋状のムラは残るものの抗原となるローソニア菌の濃度も均一となり、well間の差が目立たなくなった。このことは、今後、ローソニア感染の判定をルーチン化するにあたり、顕微鏡観察が容易になることが見込まれる。一方、新たな固相化法により処理したものでsSAB法を実施したところ、従来法で陰性判定された血清を含め、すべて陽性判定となった。新たな固相化法では、ワクチンを用事調整しているため、抗原性が良く保持され、ワクチンに含まれるローソニア菌以外の抗原にも検体血清中の抗体が反応したか、検体血清を無希釈で使用しているため、血清中の成分による非特異反応が強く出たものと考えられる。今後、検体血清の希釈濃度を検索することでこれら

の問題が解決できるものとする。

2. NNCによる判定

判定プログラムは入力層、中間層、出力層で構成し、入力画像が人工ニューロンで処理され、陽性、陰性判定を行う構造とした。構造自動探索を有効にし、約20時間の運用後、最も判定結果が良かったプログラムをFig.2に示す。CUDA機能のあるグラフィックボード搭載のノートPC(GP66 Leopard)で、学習から判定までの時間は約90秒であった。陽性的中率42/50、陰性的中率27/50、正解率69%であった。プログラムの入力画像には、従来の固相化法により陽性、陰性判定が確定している検体、各50検体を用いた。画像分割後、800枚の入力画像を判定プログラムに入力した。一般にAIを用いた画像診断には1万~10万枚の教師データが必要とされるため、今回使用したデータ数では充分では無かったものと思われる。臨床検査精度管理調査(2020)によると、顕微鏡観察による識別正答率は約90%と報告されている。今後、改良した固相化法によるサンプルを用い、サンプル数の確保、つまり、画像の質と量を確保する事により、ヒトの識別率を超えることが可能になるとと思われる。また、AIを使用する事により、顕微鏡観察時に必要な判

定の熟練度や、ルーチン化による時間と労力の軽減がはかれると考える。さらに、少ないサンプル数でも、Fijiのような画像処理ソフトで、ローソニア菌体のサイズを基準にした二値化処理をした画像をNNCの入力画像とすることで、正解率を向上させられるかもしれない。

※ 必要に応じて、枠を広げて記載してください。

6. 成果となる論文・学会発表等
(※参考となる資料を添付してください。)

特になし