

## ■ Original article

# AI 活用を指向した細胞形態変化による *Chlamydia trachomatis* 感染の判定に関する検討

小武海麻衣<sup>1,2</sup>、松村有里子<sup>1</sup>、森屋恭爾<sup>1</sup><sup>1</sup> 東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科<sup>2</sup> 聖路加国際病院

## Study on Identification of Chlamydia Infection by Cell Morphological Change for AI Application

Mai Kobukai<sup>1,2</sup>, Yuriko Matsumura<sup>1</sup>, Kyoji Moriya<sup>1</sup><sup>1</sup> Division of Infection Prevention and Control, Tokyo Healthcare University Postgraduate School.<sup>2</sup> St. Luke's International Hospital.

### 要旨

**背景:** 性器クラミジア感染症は、*Chlamydia trachomatis* による感染症である。実験的研究における感染の判定は蛍光抗体染色で行われているが、視覚的同定に依存しており煩雑な方法である。

**目的:** クラミジア感染した宿主細胞の判定に AI を活用するための基盤研究として、蛍光抗体染色を行うことなく宿主細胞の形態変化からクラミジア感染の有無を検討した。

**方法:** 常法に従って培養した McCoy 細胞または HeLa229 細胞に *C. trachomatis* Serovar E VR-238B<sup>TM</sup> を感作して CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。24 時間毎にギムザ染色した観察標本を作製し、顕微鏡画像を取得した。細胞のサイズは、画像解析ソフト Image J<sup>®</sup> を使用して、細胞の面積、長辺、および短辺をピクセル値として計測した。

**結果:** 非感染細胞では、培養 24 時間後に細胞質がわずかに繊維状に伸びた細胞が観察された。その長さは培養時間依存的に伸長し、培養 72 時間以降ではほとんどの細胞で繊維状に伸びた細胞質が観察された。一方、感染細胞では、培養 24 時間後に細胞質内顆粒を有する細胞が観察され、その細胞数は培養時間依存的に増加した。培養 96 時間後では細胞外にも顆粒が多数観察された。細胞の長辺と短辺の比は、非感染細胞は培養時間によらず 5.2 ± 0.8 であったが、感染細胞は培養 24 時間で 7.2 ± 3.2 で最大となり、48 時間以上の培養で小さくなった。その比は、培養 72 時間以上で感染細胞の方が非感染細胞より有意に小さかった。

**結論:** 細胞形態変化からクラミジア感染を判定できる可能性が示唆された。

Key word : 性感染症 (Sexual Transmitted Infections)、クラミジア トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)、ギムザ染色 (Giemza Stain)、AI 画像解析 (Artificial Intelligence Image Analysis)

## 1. はじめに

性感染症の中で最も患者数が多い性器クラミジア感染症は、*Chlamydia trachomatis* (以下、クラミジア) による感染症である。我が国での感染症発生動向調査における定点当たりの報告数は、男女ともに 2002 年をピーク

に減少傾向にあったが、2016 年には増加に転じ、それ以降ゆるやかな増加傾向が続いている<sup>1)</sup>。クラミジアに感染して 1～3 週間経過すると、男性では尿道炎と精巣上体炎を、女性では子宮頸管炎と骨盤内炎症性疾患を発症するが、男女ともに無症状または無症候の保菌者が多数存在する。さらに女性への重大な後遺症として、骨盤内炎症性疾患により不妊症になることや、妊娠中に感染

することで流産および早産のリスクがあることが知られている<sup>2)</sup>。こうした影響は現代の少子化の進行を助長する深刻な社会問題となりうることから、クラミジア感染を拡大させないためにも、医療機関において無症候感染者を発見することが重要である。

性器クラミジア感染症の診断方法には、分離培養法、遺伝子検査法（核酸増幅法）、抗原検出法、血清診断法などがある<sup>3)</sup>。日本性感染症学会の性感染症診断・治療ガイドライン（2016）<sup>4)</sup>では、男性のクラミジア検出法には検体として初尿を用い、女性のクラミジア検査法には子宮頸部の分泌液または擦過検体を用いて、感度と特異度が高い核酸増幅法（Polymerase Chain Reaction：PCR）により検査することが記載されている。この方法は2010年に発行された米国のCenters for Disease Control and Prevention（CDC）のガイドライン<sup>5)</sup>でも推奨されている信頼性の高い検出法である。現在、妊娠30週までに実施される性器クラミジアスクリーニング検査<sup>8)</sup>ではPCR法が用いられていることが多い。女性の検査法には、感度は劣るが、短時間で結果が出るといった利点があることから酵素抗体法なども用いられている。治療には、マクロライド系抗菌薬であるアジスロマイシン（Azithromycin: AZM）1,000 mgの1回経口投与、または妊婦には投与しないのが原則とされるがニューキノロン系抗菌薬であるレボフロキサシン（Levofloxacin: LVFX）500 mgの経口投与を1日1回7日間行うことが推奨され、治療の判定には、投薬開始2週間後の病原体の陰転化の確認により行われる<sup>4)</sup>。しかし、近年、クラミジア性尿道炎に対するAZMの臨床効果が低下しているとの報告が散見される<sup>8,9)</sup>。Manhartらの報告<sup>8)</sup>では治療効果の判定が2～5週間であり、PCRを用いた2週間での判定では偽陽性の症例が含まれる可能性があること、Kissingerらの報告<sup>9)</sup>でも再感染の可能性があることが示唆されており、AZMの臨床効果の低下がマクロライド耐性菌によるものかどうか不明である。実際、AZMによる投薬治療後の検査における陽性者は、マクロライド耐性菌によるものかパートナーからの再感染か判別することは困難である。これまでにマクロライド耐性*C. trachomatis*は、他の細菌と同様にマクロライド耐性を示す23S rRNA遺伝子の変異を有することが示されていることから<sup>10)</sup>、遺伝子変異の有無により耐性菌であるかどうかを判定することが可能である。しかし、遺伝子変異の有無による耐性化の判定は現実的ではなく、簡便に

薬剤感受性試験が行える新たな検査方法が望まれる。

クラミジアは真核生物の円柱上皮細胞内でのみ増殖可能である偏性細胞内寄生性細菌であることから、実験的研究における感染の判定には、宿主細胞を蛍光抗体染色（Direct Fluorescent Antibody：DFA）して封入体数を計測する方法が採用されている<sup>6)</sup>。しかし、DFAによる判定には蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡が必要であり、高価な研究設備の整備が求められることに加えて、染色した標本の保存期間が限られている欠点を有する。さらに、DFAによる判定は視覚的同定に依存しており、菌体の非特異的な発色を区別して個々の粒子の確認を行うため熟練が必要となる。技術者に依存する判定誤差は、近年、多くの分野において活発に研究が進められている人工知能（Artificial Intelligence: AI）の活用により低減させることが可能であると考えられる。我が国では2017年に厚生労働省が設置した「保健医療分野におけるAI活用推進懇談会」において、開発を進めるべき領域に「画像診断支援」が選定されたことから<sup>11)</sup>、クラミジア感染した宿主細胞の判別にも活用することが期待される。AIを用いて画像判定するためには、膨大な画像データの中から特定のルールを学ぶ深層学習<sup>12)</sup>を行うことが必要である。そこで本研究では、クラミジア感染した宿主細胞の判別にAIを活用するための基盤研究として、DFAを行うことなく宿主細胞の形態変化からクラミジア感染の有無を検討することとした。

## 2. 方 法

### 2.1 供試菌株と宿主細胞

供試菌株には*C. trachomatis* Serovar E VR-348B<sup>TM</sup>を用いた。宿主細胞にはMcCoy細胞 ATCC CRL-1696<sup>TM</sup>またはHeLa229細胞 ATCC CCL-2.1<sup>TM</sup>を用いた。細胞培養の培地には、10% Fetal Bovine Serum（FBS、ニチレイバイオサイエンス株式会社）を添加したイーグルMEM培地「ニッスイ」（E-MEM、日水製薬株式会社）を使用した。*C. trachomatis*をMcCoy細胞にて培養・増殖を行い、培養上清を4℃、3000 rpmで10分間遠心分離した上清を-80℃で保存されクラミジア保存液を実験前に解凍して供試した。

### 2.2 実験方法

CO<sub>2</sub> インキュベーター（37℃、5% CO<sub>2</sub>）内で3～5日

間培養した細胞から  $10^4$  cells/mL の細胞懸濁液を調整した後、12 穴組織培養用マイクロプレート（付着性細胞用、IWAKI）の各穴に 1 mL 入れ、CO<sub>2</sub> インキュベーター（37°C、5% CO<sub>2</sub>）で 3-5 日間培養した。30~40% コンフルエント状態であることを確認後、培養上清を除去して E-MEM 培地 1 mL とクラミジア保存液 100 μL を接種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター（37°C、5% CO<sub>2</sub>）で培養した。陰性対照には何も添加せず、クラミジア保存液添加群と同時間培養した細胞を用いた。各培養時間においてギムザ染色した観察標本を、200 倍または 630 倍の倒立顕微鏡（DMIL LED Fluoro、Leica 社製）下で観察し、顕微鏡画像を取得した。

ギムザ染色は、well 内の培地を除去して冷風で乾燥した後、メタノール（LC/MS 用、富士フィルム和光純薬株式会社）で固定し冷風で乾燥した試料に、ギムザ染色液（顕微鏡用、メルク株式会社）を添加して 2 分間染色した。染色液を除去して水道水中で優しく振盪洗浄した後、冷風で乾燥して観察標本を作製した。

細胞のサイズ計測には、画像解析ソフト Image J<sup>®</sup>（アメリカ国立衛生研究所）を使用し、倍率 630 倍で観察した顕微鏡画像の中から全容が確認できる細胞を無作為に 10 サンプル選択し、細胞の面積および細胞の長辺と短辺をピクセル値として計測した（図 1）。有意差検定は、Student t 検定にて行った。

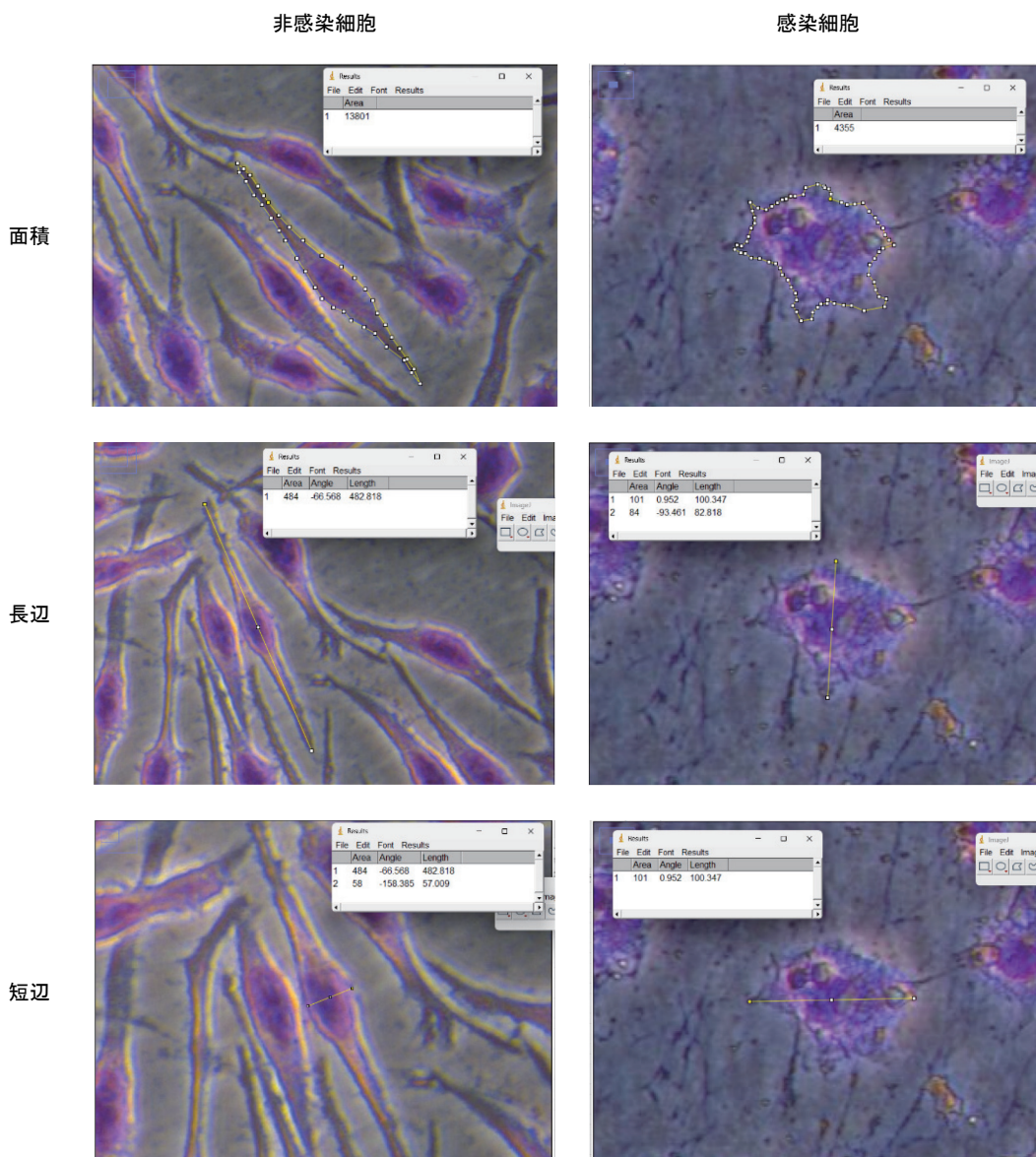


図 1 細胞の面積、長辺、および短辺の計測

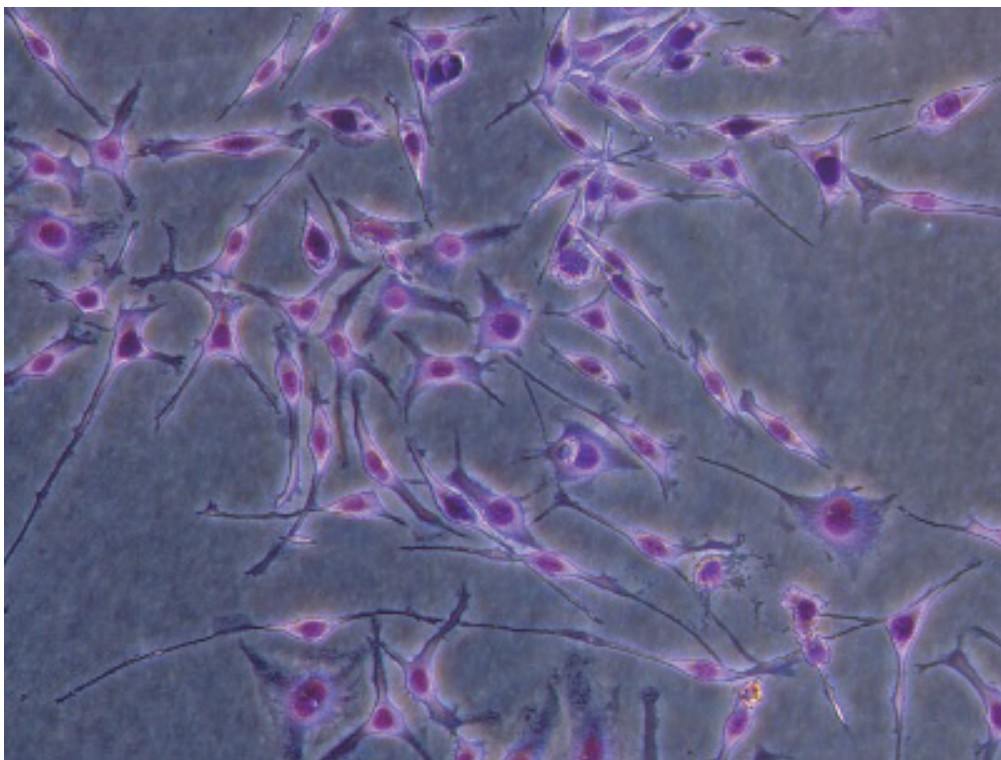
培養 72 時間後にギムザ染色を行ったときの顕微鏡画像（観察倍率 630 倍）を用い、ImageJ<sup>®</sup> 画像解析ソフトで細胞の面積、長辺および短辺の長さをピクセル値にて計測した。

### 3. 結 果

#### 3.1 各培養時間における顕微鏡画像

クラミジア存在の有無で McCoy 細胞を 72 時間培養してギムザ染色後、倍率 200 倍で観察した時の顕微鏡画像を図 2 に示す。クラミジア非共存下で培養した非感染細胞は、核が濃紫色に染色され、細胞質が繊維状に伸び

(a) 非感染細胞



(b) 感染細胞

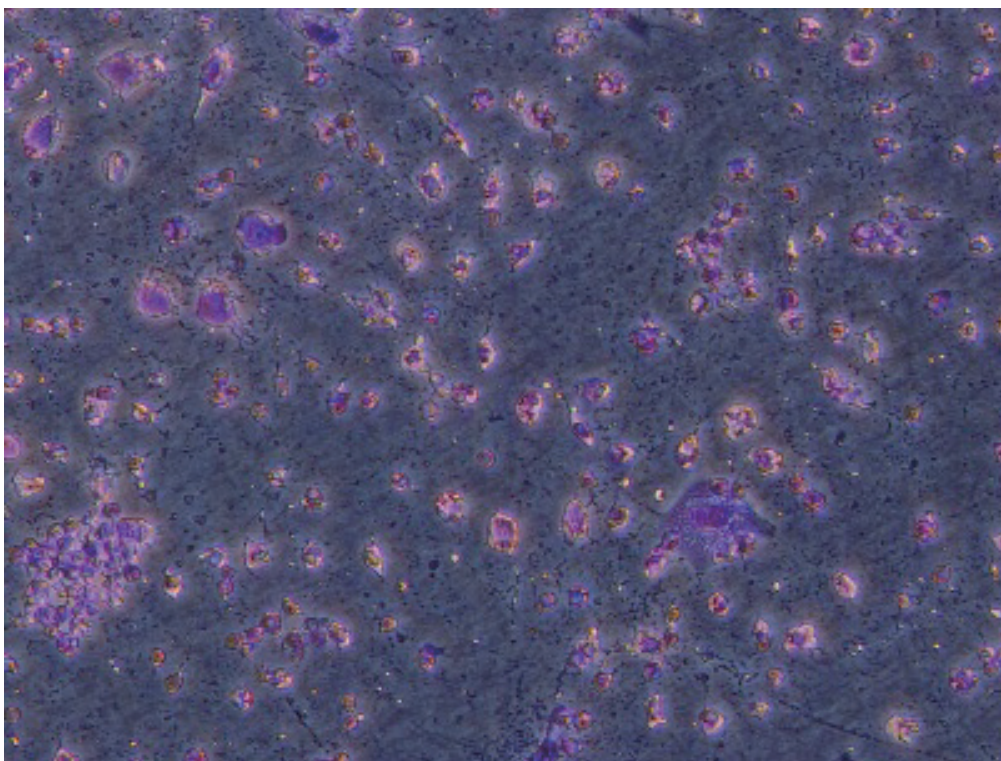


図 2 培養 72 時間後にギムザ染色を行ったときの顕微鏡像 (観察倍率 200 倍)

ているのが観察された (図 2(a))。一方、クラミジア共存下で培養した感染細胞は、核は濃紫色に染色されるものの、繊維状に伸びた細胞質を持つ細胞はほとんど認められず、染色されないまたは薄紫色に染色される小さな粒子が多数観察された (図 2(b))。HeLa229 細胞を用い

た場合は、ギムザ染色後の染色液を洗浄除去しきれず、解析可能な観察標本が得られなかったため、以降の実験では宿主細胞として McCoy 細胞を用いることとした。

培養時間を变化した時の、倍率 630 倍で観察した顕微鏡画像を 図 3 に示す。非感染細胞では、培養時間によら

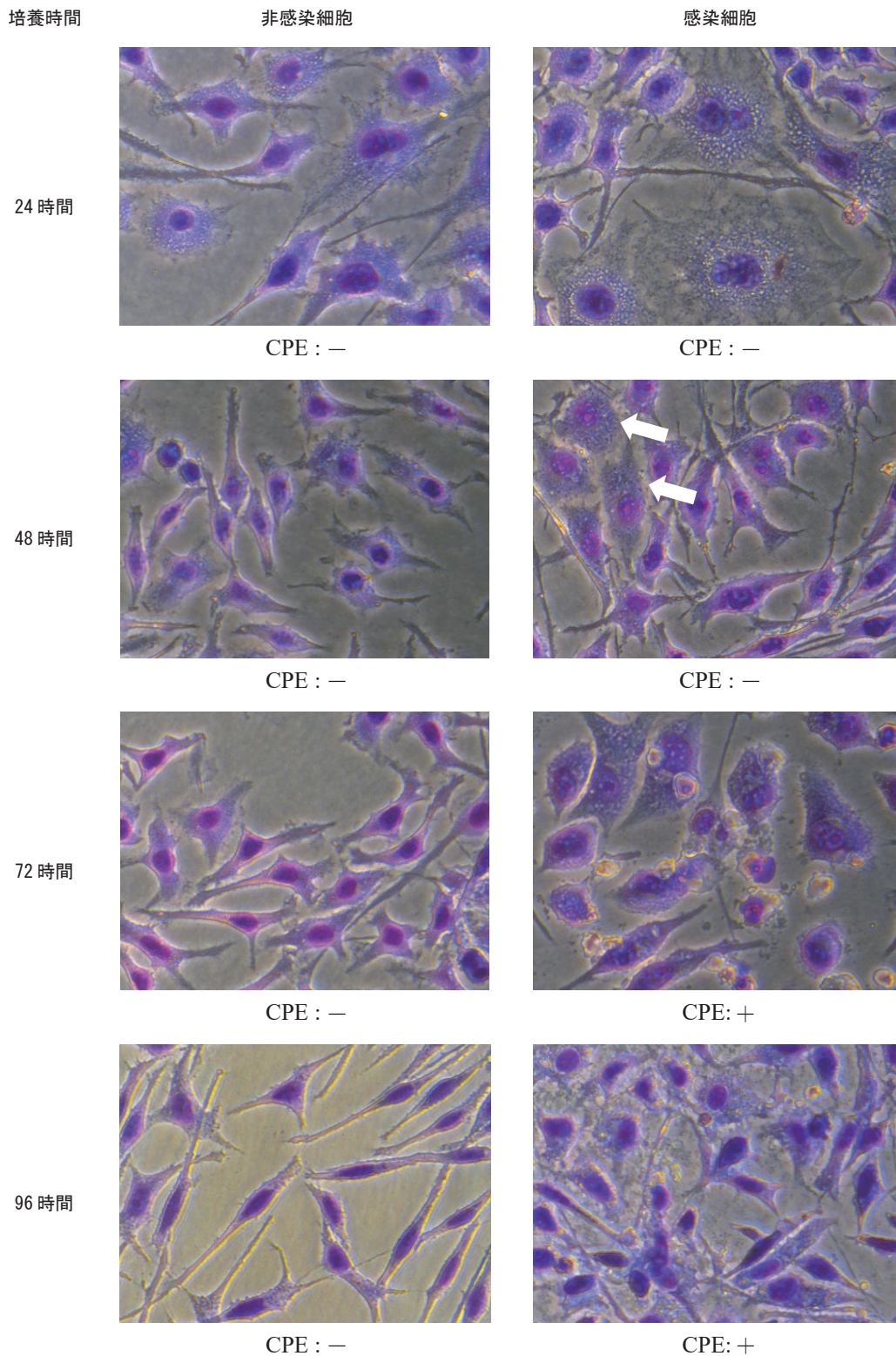


図 3 ギムザ染色後の細胞の顕微鏡像 (観察倍率 630 倍)

矢印は細胞質内顆粒を示す。

CPE: Cytopathic effect、CPE が認められない場合：-、CPE が認められた場合：+

ず濃紫色に染色された核が観察された。また、培養 24 時間後では細胞質がわずかに繊維状に伸びた状態の細胞が観察され、その長さは培養時間が長くなるとともに伸長し、培養 72 時間後ではほとんどの細胞で長く繊維状に伸びた細胞質が観察された。一方、感染細胞では、いずれの培養時間でも濃紫色に染色された核が観察されたものの、培養 24 時間後には核と細胞質の間に薄紫色に染色される細胞質内顆粒を有する細胞が観察された。さらに培養時間が長くなると、細胞質内顆粒を有する細胞数が増えるのに対し、繊維状に伸びた細胞質をもつ細胞はほとんど観察されず、肥大した細胞も認められた。培養 96 時間後では、融合した細胞や細胞質内顆粒を有する細胞に加えて、細胞外にも顆粒が多数観察された。

非感染細胞では観察した全ての培養時間で細胞変性効果 (Cytopathic effect: CPE) は認められなかったのに対し、感染細胞では培養 24 時間と 48 時間で CPE が認められなかったものの、培養 72 時間以上で CPE が認められた。

### 3.2 各培養時間における細胞の面積

ImageJ 画像解析ソフトで計測した細胞の面積を図 4 に示す。非感染細胞は培養時間によらず、 $17729 \pm 3648$  (平均値  $\pm$  SD) ピクセルであったが、感染細胞は培養 24 時間後が  $45180 \pm 52412$  (平均値  $\pm$  SD) ピクセルで最大であった。この時、2 個の細胞が 100,000 ピクセル以上で、その平均値は 146202 ピクセルであったのに対し、それ以外の 8 個の細胞の面積は、 $19924 \pm 3807$  (平均値  $\pm$  SD) ピクセルであり、細胞の面積は 2 群存在した。培養時間が長くなると、培養時間依存的に面積は小さくなるものの、培養 72 時間を境に再度大きくなった。

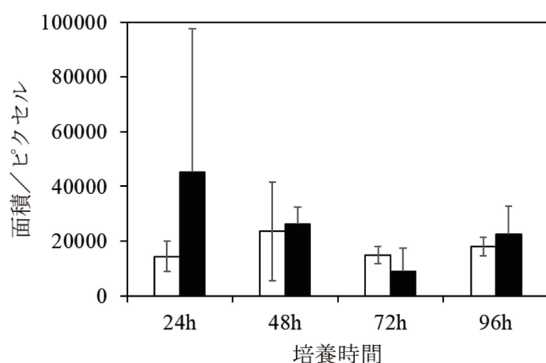


図 4 各培養時間における細胞面積 (n=10)  
□：非感染細胞、■：感染細胞

### 3.3 各培養時間における細胞の長辺と短辺

ImageJ 画像解析ソフトで計測した細胞の長辺と短辺の長さを図 5 に示す。観察した全細胞の長辺の平均値は、非感染細胞では  $432 \pm 105$  (平均値  $\pm$  SD) ピクセル、感染細胞では  $392 \pm 337$  (平均値  $\pm$  SD) ピクセルとなり、感染細胞にばらつきを認めた。全細胞の短辺の平均値は、非感染細胞で  $104 \pm 61$  (平均値  $\pm$  SD) ピクセル、感染細胞で  $125 \pm 68$  (平均値  $\pm$  SD) ピクセルとなり、それぞれ培養時間によらず同程度の値を示した。感染細胞の長辺に着目すると、培養時間 24 時間で  $744 \pm 468$  (平均値  $\pm$  SD) ピクセルで最長となるものの細胞によるばらつきがあり、1500 ピクセル以上を示す細胞が 2 個、500 ピクセル以下を示す細胞が 3 個あった。培養時間が長くなると、培養 48 時間で  $387 \pm 103$  (平均値  $\pm$  SD) ピクセル、培養 72 時間で  $135 \pm 90$  ピクセルと短くなったが、培養 96 時間では  $301 \pm 134$  (平均値  $\pm$  SD) ピクセルとなり、培養 72 時間を境に再度長くなった。

長辺と短辺の比をとると、図 6 に示すように、非感染細胞は培養時間によらず  $5.2 \pm 0.8$  (平均値  $\pm$  SD) となる一方、感染細胞は培養 24 時間では  $7.5 \pm 3.2$  (平均値  $\pm$  SD) で最大となったが、48 時間以上の培養では  $2.2 \pm 0.5$  (平均値  $\pm$  SD) と小さくなった。また、培養 48 時間以上でその比は感染細胞の方が非感染細胞より小さ

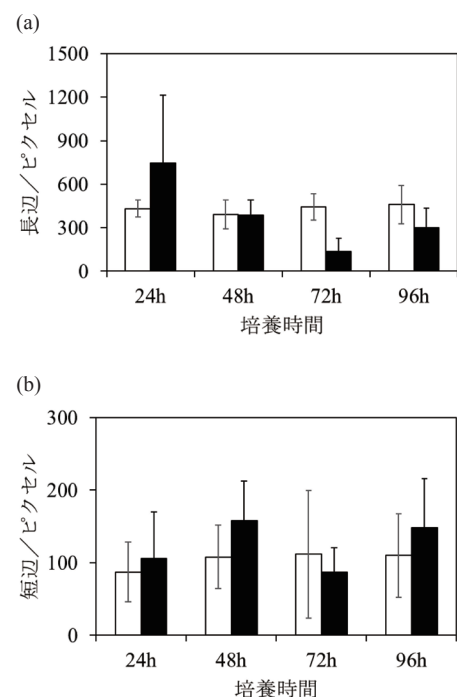


図 5 各培養時間における細胞の長辺 (a) と短辺 (b) (n=10)  
□：非感染細胞、■：感染細胞

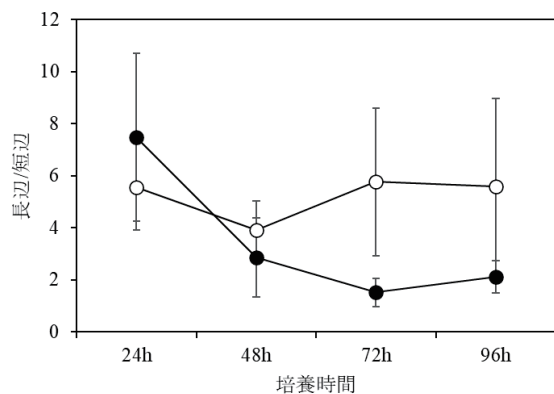


図6 各培養時間における McCoy 細胞の長辺と短辺の比 (n=10)  
○：非感染細胞、●：感染細胞

くなり、培養 72 時間および 96 時間で有意差を認めた ( $p < 0.01$ )。

#### 4. 考 察

研究において、クラミジア感染した宿主細胞の判別には、一般的に DFA により封入体数を計測する方法が用いられている<sup>6)</sup>。しかし、判定には菌体の非特異的な発色を区別して個々の粒子の確認を行うことから技術者の熟練が必要である。この問題を解決する方法として、AI を用いた画像判断が挙げられる。特に AI による深層学習により感染の有無の判別が可能となるが、深層学習には膨大な画像データが必要となる<sup>12)</sup>。DFA による画像データを採用するには蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡など高価な装置が必要であるため、膨大な画像データを収集することは困難である。そこで、通常の光学顕微鏡より感染細胞の有無を判定できれば、深層学習に用いる画像データの取得段階のハードルが下がるものと考えられる。クラミジアの増殖過程は、(1) Elementary Body (EB) 期に宿主細胞に吸着・侵入して宿主細胞の細胞質内に封入体を形成する、(2) その封入体内で Intermediate Form (IF) 期を経て Reticulate Body (RB) 期となり、分裂・増殖を繰り返す、(3) 再び IF 期から EB 期にもどり、宿主細胞を破壊して放出され新たな感染が起こり (1) から (3) の過程を繰り返す増殖環である<sup>13)</sup>。この増殖環においてクラミジアは宿主細胞内に封入体を形成することから、細胞の形態変化からクラミジア感染の有無を判別できるものと予想される。

クラミジア感染後 24 時間では、宿主細胞内で基本小体が二分分裂を繰り返し、封入体は宿主細胞の半ばを占める状態である<sup>13)</sup>。本研究においてギムザ染色した感染

細胞の顕微鏡画像には、核と細胞質の間に薄紫色に染色される細胞質内顆粒を有する細胞や細胞の辺縁が不均一になっている細胞が観察された。辺縁の不均一性は非感染細胞でも観察されたことから、細胞質内顆粒の存在はクラミジア感染によるものと推定されるが、辺縁の不均一性は感染細胞に特異的に見られる現象ではないと考える。感染細胞の細胞面積は、観察した培養時間中で最大値を示し (図 4)、感染細胞の長辺が非感染細胞より長く、短辺は非感染細胞と同程度の長さであることから (図 5)、細胞面積の増大は長辺の伸長によるものである。これまでに、クラミジアが EB 期で宿主細胞に侵入後、12 時間後に RB の増殖が始まり、24 時間以降に RB は封入体囊胞の限界膜に近接することが報告<sup>13)</sup> されていることを勘案すると、細胞面積の増大は RB の増殖によるものと考えられた。

感染後 48 時間は、宿主細胞内で基本小体が網様体へと変化し、再び基本小体に戻り、細胞内でクラミジアが増殖を繰り返す状態である<sup>13)</sup>。感染 48 時間後の感染細胞の顕微鏡画像には、細胞質内顆粒を有する細胞が感染 24 時間後より多く確認された (図 3)。これまでに McCoy 細胞に *C. trachomatis* を感染させて 48 時間後の位相差顕微鏡観察において、McCoy 細胞の細胞質内に封入体が多数形成されていることが報告されている<sup>14)</sup> ことから、感染 24 時間後と同様に細胞質内顆粒はクラミジアの封入体であるものと推定された。細胞面積は感染 24 時間後より小さくなった (図 4)。これは細胞の長辺が短くなったこと (図 5) に由来し、長辺と短辺の比が培養 48 時間で急激に減少して  $2.8 \pm 1.5$  となることから、増殖環の完成に向けて細胞の形態が円形に近づいていることが示唆された。

感染後 48 ~ 72 時間後には細胞破壊と共にクラミジアの細胞外への放出が起こり増殖環が完了する状態である<sup>13)</sup>。感染 72 時間後の感染細胞の顕微鏡画像では、24 時間および 48 時間後には観察されなかった細胞の球状化や縮小、宿主細胞に吸着する構造物の出現が観察された (図 2、3)。また、細胞面積と細胞の長辺が観察した培養時間の中で最小値を示した (図 4、5)。クラミジアの増殖過程で発生する基本小体は  $0.36 \pm 0.02 \mu\text{m}$  であり、その後成熟した基本小体は封入体へと変化するとともに約  $10 - 15 \mu\text{m}$  と大なる<sup>15)</sup>。クラミジア自体を光学顕微鏡で観察することは出来ないが、成熟した基本小体は観察可能であることから、宿主細胞に吸着する構造物

は、増殖した基本小体が再構成した封入体、または細胞外に放出された基本小体が凝集したものであると推測される。

感染 96 時間後は増殖環が完了していることから、多数のクラミジアが細胞外に存在する状態である。感染 96 時間後の感染細胞で観察された細胞外に存在する多数の顆粒は、感染 72 時間後と同様の細胞外に放出された基本小体の凝集体であると推測される。以上より、細胞の形態変化の中でも、長辺と短辺の比がクラミジアの増殖環と関係していることから、AI の深層学習に用いるデータとして DFA を行わない顕微鏡画像が有用であることが示唆された。

クラミジアはウイルスと同様に生きた細胞内でしか増殖することが出来ないことから、ウイルス感染の判定と同様の方法で感染の有無を判定できるものと考えられる。ウイルス感染により細胞に生じる変化には、球状化 (rounding)、収縮 (shrinkage)、屈折性の増加 (increased refractility)、融合 (fusion)、凝集 (aggregation)、接着性の喪失 (loss of adherence)、溶解 (lysis) が挙げられ<sup>16)</sup>、これらの現象が様々に組み合わさることでクラミジア感染を視覚的に判定するために、同条件にて培養した非感染細胞と比較して CPE で評価した。

この方法でクラミジアによる感染を判定すると、感染 72 時間後に CPE が認められたことから、目視にて判別可能な細胞の形態学的変化は 72 時間後に起こることが示唆された。これは、長辺と短辺の比において感染細胞と非感染細胞を  $p < 0.01$  で有意差が認められ始めた培養時間と同じであることから、顕微鏡画像で感染の判定に長辺と短辺の比を活用可能であることが示唆された。深層学習データとして、クラミジア感染 72 時間後で感染の有無が判別可能であるが、有意差は認められないものの、感染後 48 時間に短辺が長くなる現象が認められていることから (図 5(b))、感染後 48 時間の画像でも判別可能である可能性が考えられる。今回採用した細胞はそれぞれ 10 細胞であるため、判別の精度は高いとは言えない。さらに感染力価が不明なクラミジア保存液を使用していること、感染後の細胞の DFA による観察を行っていないため感染細胞内の封入体の有無が不明なこと、および観察画像における感染率が不明な点が本研究の限界としてあげられる。

これまでに、クラミジア性尿道炎に対する AZM の臨床効果の低下が報告されており<sup>8,9)</sup>、AZM の臨床効果の

低下がマクロライド耐性菌によるものかどうか不明であることが問題点として挙げられている。本研究では、クラミジア感染の有無を宿主細胞である McCoy 細胞の形態変化から判別しており、培養系内に抗菌薬を共存することで薬剤感受性試験を行うことが可能であると考えられる。これまでに日本化学療法学会、日本感染症学会、日本臨床微生物学会、日本環境感染学会の四学会合同で行われた抗菌薬感受性サーベイランスにおいて *C. trachomatis* に対して Hela 細胞を用いた 9 薬剤の薬剤感受性試験が実施されている<sup>18)</sup>。このサーベイランス結果と本研究で提案する形態変化からの判定結果を比較することで、本法の薬剤感受性試験への適用の可能性が示されることが期待される。

これまでに、培養細胞を用いた点眼薬に含まれる抗菌薬の細胞毒性試験において、LVFX を含む Cravit<sup>®</sup> が、眼由来培養細胞に対して 0.05% 濃度において 60 分間の接触で毒性を認めず、0.25% 濃度において細胞生存率が 60 ~ 80% となり、0.5% 濃度において 20% 以下の細胞生存率で細胞毒性を呈することが報告されている<sup>17)</sup>。LVFX の最高血中濃度 ( $C_{max}$ ) は  $5.73 \pm 1.20$  mg/mL、血中薬物濃度-時間曲線下面積 ( $AUC_{0-t}$ ) は  $44.96 \pm 6.10$   $\mu\text{g} \cdot \text{hr/mL}$  であることから<sup>19)</sup>、血液 1 mL を 1 g と仮定すると、LVFX の  $C_{max}$  は 0.0006%、 $AUC_{0-t}$  は 0.004% となり、いずれも細胞毒性を呈する濃度より極めて低い濃度である。クラミジアの薬剤感受性を評価する際には、 $C_{max}$  または  $AUC_{0-t}$  に薬剤濃度を設定することから、細胞に影響を与えることなくクラミジアの薬剤感受性を評価できる。以上より、本研究における細胞形態変化からクラミジア感染を判定する画像判別は、クラミジアの薬剤感受性評価試験への応用の可能性が示唆された。

本研究で宿主細胞の形態変化からクラミジア感染の有無の判別の可能性を示したことは、AI を用いたクラミジア感染の判別方法を構築するための礎となり、今後、感染率と宿主細胞の形態との関係を検討し、AI による深層学習に耐えうる画像取得のための条件設定を行うことで、AI 画像判別によるクラミジア感染の判定に必要な深層学習データの取得が可能となる。培養ではわずかな微生物でも増幅されるため、無症候性感染などの検出に適している<sup>20)</sup> ことから、将来的には、従来、技術者の経験値で行われていたタスクを自動化し AI による画像判別が、臨床における診断の一助となることが期待される。



## 5. 結 論

クラミジア接種 72 時間以降に宿主細胞の長辺と短辺の比がクラミジアの増殖環と関係していることから、DFA を行わずに細胞の形態学的変化から感染を判定できることが示唆された。また、クラミジア感染による細胞の形態学的変化は、クラミジアの薬剤感受性試験系に適用可能であることが示唆された。

### ■謝辞

本研究を行うにあたり、技術的な御指導を頂いた東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 感染制御学領域の岩澤篤郎教授に感謝いたします。

### ■利益相反

利益相反はない。

### ■引用文献

- 国立感染症研究所, 「性器クラミジア感染症の発生動向」 2023 年 6 月 19 日 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/chlamydia-std-m/chlamydia-std-idwrs/12086-chlamydia-16jun.html> (閲覧日 2024 年 1 月 20 日)
- World Health Organization, 「Treatment of Chlamydia trachomatis」 2016. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/246165/9789241549714-eng.pdf?sequence=1> (閲覧日 2024 年 1 月 10 日)
- 岩破一博. 性器クラミジア感染症. 京府医大誌 2013; 122: 433-446.
- CDC, 「Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines」 *MMWR* 2010. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5912a1.htm> (閲覧日 2024 年 1 月 31 日)
- 「性感染症 診断・治療 ガイドライン 2016」日本性感染症学会誌 2016;27. Supplement. <https://jssti.jp/pdf/guideline-2016.pdf> (閲覧日 2024 年 1 月 31 日)
- 高橋 聡. *Chlamydia trachomatis* とその診断法. 日臨微生物誌. 2018; 28:77-82.
- 厚生労働省. 第 1 回 保健医療分野における A I 活用推進懇談会資料 <https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000148680.html> (閲覧日 2024 年 1 月 31 日)
- 妊婦に対する健康診査についての望ましい基準 (◆平成 27 年 03 月 31 日厚生労働省告示第 226 号 [https://www.mhlw.go.jp/web/t\\_doc?dataId=82ab4662&dataType=0&pageNo=1](https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=82ab4662&dataType=0&pageNo=1) (閲覧日 2024 年 9 月 27 日)
- Manhart L E, Gillespie C W, Lowens M S, Khosropour C M, Colombara D V, Golden M R, *et al*: Standard treatment regimens for nongonococcal urethritis have similar but declining cure rates: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 2013; 56: 934-42.
- Kissinger P J, White S, Manhart L E, Schwebke J, Taylor S N, Mena L, *et al*. Azithromycin Treatment Failure for Chlamydia trachomatis Among Heterosexual Men with Nongonococcal Urethritis. *Sex Transm Dis* 2016; 43: 599-602.
- Misyurina O Y, Chipitsyna E V, Finashutina Y P, Lazarev V N, Akopian T A, Savicheva A M, *et al*. Mutations in a 23S rRNA gene of Chlamydia trachomatis associated with resistance to macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1347-49.
- Amitojdeep Singh, Sourya Sengupta, Vasudevan Lakshminarayanan. Explainable Deep Learning Models in Medical Image Analysis. *J. Imaging* 2020; 6: 52; doi:10.3390/jimaging6060052.
- 石井英昭. McCoy 細胞における生殖器由来 *Chlamydia trachomatis* 増殖環の超微形態学的研究. 感染症誌 1988;62: 85-96.
- 細村泰夫. McCoy 細胞における生殖器由来 *Chlamydia trachomatis* 増殖環に対する Minocycline の阻害効果に関する研究. 感染症誌 1990;64: 310-320.
- 計良恵治, 堀内文男, 武田 敏, 椎名義雄, 橋爪 壮, 吉沢花子. Chlamydia 感染症の形態的研究 - Chlamydia 感染培養細胞の超微形態 - . 日臨細胞誌. 1987; 26(1): 49-56.
- Pfeiffer JK, Condit RC, Schoggins JW, Howley PM, Knipes DM, Enquist MW, *et al*., Fields virology, 7th ed. vol 4, fundamentals, Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins, PA; 2024; 21-49.
- Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y. In vitro assessment of the cytotoxicity of six topical antibiotics to four cultured ocular surface cell line. *Biocontrol Sci* 2012; 17: 93-9.
- Takahashi S, Hamasuna R, Yasuda M, *et al*. Nationwide surveillance of the antimicrobial susceptibility of *Chlamydia trachomatis* from male urethritis in Japan. *J. Infect. Chemothera.* 2016; 22: 581-586.
- 医薬品インタビューフォーム. 「広範囲経口抗菌剤 日本薬局方 レボフロキサシン錠 日本薬局方 レボフロキサシン錠」 <https://image.packageinsert.jp/pdf.php?mode=1&yjcode=6241013F2063> (閲覧日 2024 年 9 月 30 日)
- CDC, 「Recommendations for the Prevention and Management of Chlamydia trachomatis Infections」 1993. [https://www.cdc.gov.translate.google/mmwr/preview/mmwrhtml/00021622.htm?\\_x\\_tr\\_sl=en&\\_x\\_tr\\_tl=ja&\\_x\\_tr\\_hl=ja&\\_x\\_tr\\_pto=wapp](https://www.cdc.gov.translate.google/mmwr/preview/mmwrhtml/00021622.htm?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=ja&_x_tr_hl=ja&_x_tr_pto=wapp) (閲覧日 2024 年 1 月 31 日)

## Study on Identification of Chlamydia Infection by Cell Morphological Change for AI Application

Mai Kobukai<sup>1,2</sup>, Yuriko Matsumura<sup>1</sup>, Kyoji Moriya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Division of Infection Prevention and Control, Tokyo Healthcare University Postgraduate School.

<sup>2</sup> St. Luke's International Hospital.

### Background

Genital chlamydia infection is caused by *Chlamydia trachomatis*. A fluorescent antibody staining, which is a cumbersome method that relies on visual identification, is commonly used to determine cellular infection in research.

### Objective

As a fundamental study for utilizing AI to determine chlamydia-infected host cells, the presence or absence of chlamydia infection was examined from morphological changes in host cells without fluorescent antibody staining.

### Methods

McCoy cells or HeLa229 cells cultured according to normal methods were sensitized with *C. trachomatis* Serovar E VR-238B<sup>TM</sup> and cultured in a CO<sub>2</sub> incubator. Every 24 hours, Giemsa-stained observation specimens were prepared, and microscopic images were acquired. Cell size was measured as pixel values of cell area, long and short sides using Image J<sup>®</sup> image analysis software.

### Results

In uninfected cells, slightly fibrous elongated cytoplasm was

observed after 24 hours of culture. The length of the elongated cytoplasm was time-dependent, and after 72 hours of culture, fibrous elongated cytoplasm was observed in most of the cells. In contrast, cells with intracytoplasmic granules were observed in infected cells after 24 hours of culture, and the number of such cells increased in a time-dependent manner. After 96 hours of culture, many granules were also observed outside the cells. The ratio of long to short sides of cells was  $5.2 \pm 0.8$  for uninfected cells regardless of incubation time, while the ratio for infected cells reached a maximum of  $7.2 \pm 3.2$  at 24 hours of incubation and became smaller after 48 hours or more of incubation. The ratio was significantly smaller for infected cells than for uninfected cells at 72 hours or more of culture.

### Conclusions

It was suggested that chlamydial infection could be determined from cell morphology changes.

**Keywords:** Sexual Transmitted Infections; *Chlamydia trachomatis*; Giemza Stain; Artificial Intelligence Image Analysis