



Title	腰椎変性疾患における新規治療と診断技術の開発
Author(s)	鈴木, 久崇
Description	配架番号 : 2908
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16416号
Issue Date	2025-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16416
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95951
Type	doctoral thesis
File Information	SUZUKI_Hisataka.pdf



学位論文

腰椎変性疾患における新規治療と診断技術の開発

(Novel therapeutic and diagnostic techniques in lumbar degenerative diseases)

2025 年 3 月

北海道大学

鈴木 久崇
Hisataka Suzuki

学位論文

腰椎変性疾患における新規治療と診断技術の開発

(Novel therapeutic and diagnostic techniques in lumbar degenerative diseases)

2025 年 3 月

北海道大学

目 次

発表論文目録および学会発表目録	・ ・ ・ ・ ・ 1 頁
要旨	・ ・ ・ ・ ・ 3 頁
略語表	・ ・ ・ ・ ・ 6 頁
緒言	・ ・ ・ ・ ・ 7 頁
第 1 章 超高純度ヒト他家骨髄由来間葉系幹細胞とアルギン酸ナトリウムの椎間板内投与が椎間板や椎間板性疼痛に与える影響	
緒言	・ ・ ・ ・ ・ 9 頁
方法	・ ・ ・ ・ ・ 12 頁
結果	・ ・ ・ ・ ・ 16 頁
考察	・ ・ ・ ・ ・ 21 頁
第 2 章 深層学習を用いて腰椎単純 X 線写真から手術を要する腰部脊柱管狭窄症を自動診断するアルゴリズムの開発	
緒言	・ ・ ・ ・ ・ 24 頁
方法	・ ・ ・ ・ ・ 26 頁
結果	・ ・ ・ ・ ・ 30 頁
考察	・ ・ ・ ・ ・ 42 頁
総括および結論	・ ・ ・ ・ ・ 45 頁
謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 46 頁

利益相反 47 頁

引用文献 48 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の学術誌に掲載された。

Hisataka Suzuki, Katsuro Ura, Daisuke Ukeba, Norimasa Iwasaki, Katsuhisa Yamada, Hideki Sudo

Injection of ultra-purified stem cells with sodium alginate reduces discogenic pain in a rat model.

Cells 2023, 12, 505

Hisataka Suzuki, Terufumi Kokabu, Katsuhisa Yamada, Yoko Ishikawa, Hiroyuki Tachi, Tomohiro Shimizu, Tsutomu Endo, Takashi Onishi, Daisuke Ukeba, Ken Nagahama, Masahiko Takahata, Norimasa Iwasaki, Hideki Sudo

Deep learning-based detection of lumbar spinal canal stenosis using convolutional neural networks

The Spine Journal 24 (2024) 2086-2101

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 鈴木久崇, 浦勝郎, 山田勝久, 笠場大介, 岩崎倫政, 須藤英毅

超高純度ヒト他家骨髄由来間葉系幹細胞とアルギン酸ナトリウムの椎間板内投与は椎間板性疼痛を軽減する
第 37 回日本整形外科学会基礎学術集会
2022 年 10 月 14 日・宮崎市シーガイアコンベンションセンター

2. Hisataka Suzuki, Katsuro Ura, Katsuhisa Yamada, Norimasa Iwasaki, Hideki Sudo

Combination of ultra-purified stem cells with an alginate sodium reduces discogenic pain

Orthopaedic Research Society 2023 Annual Meeting, Dallas, Texas, USA,
February 12, 2023.

3. Hisataka Suzuki, Katsuro Ura, Katsuhisa Yamada, Norimasa Iwasaki, Hideki Sudo

Combination of ultra-purified stem cells with an alginate sodium reduces
discogenic pain

Asia Pacific Biospine Society, 2023 Melbourne (Spine week), Melbourne,
Australia, May 3, 2023.

4. Hisataka Suzuki, Terufumi Kokabu, Katsuhisa Yamada, Yoko Ishikawa,
Norimasa Iwasaki

An automatic diagnosis system with deep learning algorithm for lumbar spinal
canal stenosis using lumbar spine x-rays

Orthopaedic Research Society 2024 Annual Meeting, Long Beach, California,
USA, February 5, 2024.

5. 鈴木久崇, 山田勝久, 小甲晃史, 石川蓉子, 岩崎倫政

腰椎 X 線写真を用いた AI による腰部脊柱管狭窄症の自動診断システムの
開発

第 97 回日本整形外科学会学術総会,
2024 年 5 月 23 日・福岡市福岡国際会議場

6. 鈴木久崇, 山田勝久, 小甲晃史, 石川蓉子, 岩崎倫政

腰椎 X 線写真を用いた AI による腰部脊柱管狭窄症の自動診断システムの
開発

第 39 回日本整形外科学会基礎学術集会,
2024 年 10 月 17 日・東京都京王プラザホテル新宿

要旨

【背景と目的】

脊柱は体幹を支える主要な器官であり、椎体や椎間板、筋肉、神経組織などで構成されている。腰部脊柱管狭窄症に代表される腰椎変性疾患により慢性腰痛や下肢神経症状を来し、健康的な日常生活を大きく損なうだけでなく寿命の短縮とも関連があるといわれている。そのため、急速に高齢化が進む社会において腰椎変性疾患に対する診断、治療戦略の重要性が高まっている。そこで、本研究では腰椎変性疾患における新規治療法の開発をテーマに 1 つ目の研究を行った。さらに、テーマ①を通して「これまでより簡便な手法・技術により革新的な診療へとつなげる」という着想を得たことから、腰椎変性疾患に対する新規診断技術の開発をテーマ②として研究を行った。

テーマ①：椎間板変性は慢性腰痛の主要な原因の一つであるが、既存の治療法は椎間板変性に直接アプローチするものではなく、根治的な治療法は開発されていない。骨髄由来間葉系幹細胞（Bone marrow mesenchymal stem cell; BMSC）は椎間板変性を抑制する可能性が指摘されており、新規治療法のキーとなることが予想されている。また、これまでに我々が開発した高純度硬化性アルギン酸（Ultra-purified alginate; UPAL）ゲルは外科的に椎間板へ埋植することで椎間板組織修復能と疼痛緩和効果をもつことが示されている。一方で、ゲル化させない UPAL の局所投与に関する知見はない。そこで、ゲル化させない UPAL と高純度で高性能の BMSC である REC（Rapid expansion clone）の混合液を椎間板内へ局所投与することで椎間板組織や疼痛関連行動に与える影響を明らかにすることを目的にテーマ①として本研究を実施した。

テーマ②：腰部脊柱管狭窄症は腰椎変性疾患の中で最も多い疾患であり、プライマリケア医や脊椎を専門としない整形外科クリニックを初診することがほとんどである。診断には MRI（Magnetic Resonance Imaging）が有用だが、施設に MRI がなかったり、読影が難しかったりする場合もある。さらに、進行性の神経障害を呈する場合には、回復が困難となることが危惧されるため早期の手術が必要となる。しかし、専門医へ紹介するタイミングの判断が難しく、時に紹介・治療が遅れてしまう状況に遭遇する。腰椎単純 X 線写真であればほとんどの医療機関で撮影可能であり、画像診断と相性の良い深層学習を用いることで自動診断ができる可能性がある。この課題を解決するため、腰椎単純 X 線写真から手術を要する腰部脊柱管狭窄症を自動診断する深層学習アルゴリズムを開発することをテーマ②として本研究を実施した。

【材料と方法】

テーマ①：ラット尾椎椎間板穿刺モデルを用いて、皮切のみの sham 群、穿刺のみの punch 群、UPAL を投与した UPAL 群ならびに REC と UPAL の混合液を投与した REC+UPAL 群を作成した(各時点、各群の椎間板 n = 6)。投与 1、7、28 日後に炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-6 と神経成長因子受容体 TrkA に対する免疫組織化学染色を実施し、髄核と線維輪における陽性細胞率を算定した。また、投与 28 日後に椎間板の組織学的評価を行った。さらに、疼痛関連行動分析として Hargreaves test, von-Frey test, Tail flick test を実施した(各時点、各群 n=6)。

テーマ②：単一施設で腰部脊柱管狭窄症に対し手術加療を受けた 150 例と他の 2 施設で手術を受けた 25 例の合計 175 例を対象とし、腰椎単純 X 線側面像と腰椎 MRI、患者情報をレトロスペクティブに収集した。1 症例につき腰椎 X 線側面像の L1/2 から L4/5 までの 4 椎間ずつ ROI (Region of interest) を抽出し、合計 700 枚のデータを得た。Annotation 1 として手術レベルか否かの 2 値分類、Annotation 2 として MRI で計測した脊柱管面積を連続変数として与えた。単一施設の 125 例 500 枚を内部検証に用いて Annotation 1, 2 に関する 5 分割交差検証を行った。次に残りの 25 例 100 枚のデータを用いて、外部検証を行い学習済み CNN モデルの予測性能を評価した。また、他施設 25 例 100 枚のデータを用いて追加外部検証を行った。さらに、特徴量の多い領域を可視化する Grad-CAM やマルチタスク学習、内部-外部クロス検証も行った。

【結果】

テーマ①：REC+UPAL 群、UPAL 群は髄核と線維輪いずれにおいても、punch 群に比べて TNF- α 、IL-6、TrkA 陽性細胞率が有意に低値であった。ただし、1 日目と 7 日目では REC+UPAL 群の TNF- α 、IL-6、TrkA 陽性細胞率は UPAL 群よりも有意に低値であった。また、REC+UPAL 群、UPAL 群では punch 群に比べて組織変性が有意に抑制された。疼痛関連行動分析では、REC+UPAL 群、UPAL 群はともに punch 群に比べて Hargreaves test と von-Frey test では潜時が有意に長く、Tail flick test では有意に短縮した。また、2 日目の Hargreaves test では REC+UPAL 群は UPAL 群より有意に潜時が長かった。

テーマ②：外部検証で 5 つの学習済みモデルによって算出された手術レベルか否かの予測は、AUC が 0.90、精度 82% という結果であった。さらに、脊柱管の実際の面積と予測面積との相関係数は 0.69 であった。Grad-CAM では椎間板後方や椎間関節への集積が高かった。追加外部検証では、わずかに精度のばらつきがみられたものの、外部検証とほぼ同等の結果だった。また、マルチタスク学習や内部-外部クロス検証でも結果は同等であった。

【考察】

テーマ①：REC と UPAL の混合液や UPAL は椎間板組織損傷に起因する炎症性サイトカインや神経成長因子受容体の発現、および、椎間板組織変性を抑制することで、疼痛軽減にも作用した可能性が示唆された。REC+UPAL 群と UPAL 群の比較においては、REC+UPAL 群ではより早期から炎症性サイトカインや神経成長因子受容体の発現を抑制しており、疼痛関連行動の変化も抑制されていることから REC による上乘せ効果が生じていることが示唆された。

テーマ②：腰椎単純 X 線から 80%程度の確率で手術を要する脊柱管狭窄を診断しており、臨床応用が可能な水準と考えられる。Grad-CAM では椎間板後方や椎間関節に特微量が多かったことから腰部脊柱管狭窄症の病因となる変性変化を適切に捉えている可能性が示唆された。また、追加外部検証やマルチタスク学習、内部-外部クロス検証でも同等の結果であり、汎用性の高いアルゴリズムである可能性が示唆された。

【結論】

REC と UPAL の混合液の局所投与は、椎間板組織変性の抑制だけでなく、椎間板性疼痛の軽減にも有用であると考えられた。この方法は外来で完結できる注射による治療法であり、慢性腰痛症に対する低侵襲な新規治療となり得ることが示唆された。

本研究で開発された深層学習アルゴリズムは、腰椎単純 X 線側面像から手術を要する腰部脊柱管狭窄症を 80%程度の精度で自動診断可能である。この技術は、MRI のない施設や整形外科医へのアクセスが容易でない地方において、特に有用となることが期待される。また、専門医への紹介を後押しすることで診断や治療の遅れを解決する新技術となる可能性を秘めており、実用化が期待される。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AF	annulus fibrosus
AUC	area under the curve
BMSC	bone marrow mesenchymal stem cell
CNN	convolutional neural network
G	gauge
HE	Hematoxylin & Eosin
IL-6	interleukin-6
LSCS	lumbar spinal canal stenosis
MRI	magnetic resonance imaging
NGF	nerve growth factor
NLR	negative likelihood ratio
NP	nucleus pulposus
NPV	negative predictive value
PLR	positive likelihood ratio
PNG	portable network graphics
PPV	positive predictive value
REC	rapid expansion clone
ROC	receiver operating characteristic
SE	standard error
SD	Sprague-Dawley
SO	safranin O
TNF- α	tumour necrosis factor- α
TrkA	high-affinity tyrosine kinase A
UPAL	ultra-purified alginate gel

緒言

体幹を支持する脊柱において、椎間板や神経組織は重要な構成要素であるが、腰椎は荷重がかかり、可動性も大きいことから年齢とともに変性変化を来することが多い。腰椎変性疾患により慢性腰痛や下肢神経症状を来すと、健康的な日常生活を大きく損なうだけでなく寿命の短縮にも関連があるといわれている (Hoy et al., 2010, Fatoye et al., 2019, Errico et al., 2004, Balagué et al., 2007)。急速に高齢化が進む社会において腰椎変性疾患に対する診断、治療戦略の重要性が高まっている。そこで、腰椎変性疾患における新規治療と診断技術の開発を進めるべく、本研究では2つの仮説をもとに研究を行った。1つ目は骨髄間葉系幹細胞と超高純度アルギン酸ゲルの混合液は椎間板性疼痛を軽減するという仮説を立てた。そして1つ目の研究で得た簡便な手法による革新的な医療技術という着想をもとに、2つ目として腰椎単純X線写真から腰部脊柱管狭窄症の有無を自動診断できるという仮説を立てた。

腰椎椎間板の変性は腰痛の主要な原因の一つであり (Noriega et al., 2017, Orozco et al., 2011)、重度の腰痛は日常生活に支障をきたすため大きな健康問題につながる (Hoy et al., 2010, Fatoye et al., 2019, Errico et al., 2004, Balagué et al., 2007)。椎間板変性による慢性腰痛には保存治療や手術治療が行われるが (Noriega et al., 2017, Orozco et al., 2011, Orozco et al., 2011)、既存の治療法は椎間板変性や椎間板性疼痛の原因に直接アプローチするものではなく、根治的な治療法は確立されていない。そのため慢性腰痛を改善する新しい治療法の開発が必要とされている。

我々はこれまでに、ヒツジの椎間板摘出後の間隙に超高純度アルギン酸 (Ultra-purified alginate gel; UPAL) ゲルと高性能の骨髄由来間葉系幹細胞 (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells; BMSCs) である REC (Rapid expansion clone) を埋植することで、椎間板組織修復が促されることを報告し (Ukeba et al., 2022, Ukeba et al., 2020)、ラットの尾椎穿刺モデルにおいて、UPAL ゲルが椎間板変性や椎間板性疼痛を軽減することを報告した (Ura et al. 2021)。しかし、ゲル化させない UPAL に関する知見はない。また、椎間板性腰痛に BMSCs の局所投与が有用であるという報告が散見されるが、まだ臨床応用に至っていない (Noriega et al., 2017, Orozco et al., 2011, Mesoblast Phase 3 Trial 2021)。そこで、ゲル化させない UPAL と REC の混合液を局所投与することで椎間板性疼痛を軽減できるのではないかと仮説を立てた。本研究テーマ①として、ラット尾椎穿刺モデルを用いて UPAL と REC の混合液を椎間板内へ局所投与することで椎間板組織や疼痛関連行動に与える影響を明らかにすることを目的とした。

また、腰部脊柱管狭窄症 (Lumbar spinal canal stenosis: LSCS) は、腰椎変性

疾患の中で最も多い疾患であり、下肢神経麻痺を引き起こすと自立した健康的な生活を送る上で大きな障害となる（Djurasovic et al., 2010）。手術治療は極めて有効だが、進行性の神経障害を呈する場合、手術治療が遅れると回復が困難となる可能性があるため早期診断が極めて重要である（Djurasovic et al., 2010, Weinstein et al., 2007）。一般的に、LSCSの患者は脊椎外科を専門としないクリニックを受診することがほとんどである。診断には磁気共鳴画像（Magnetic resonance imaging: MRI）が最も有用であるが（de Schepper et al., 2013, McDonald et al., 2015）、MRI検査が必要か、手術が必要かの判断は非専門医にとっては困難な場合も多い。さらに、地方ではMRI装置のない医療施設も多く、早期のMRI検査自体が困難な場合もある。そのため多くの医療施設で撮影が可能な単純X線写真を用いて、専門医への紹介を要する腰部脊柱管狭窄症を自動判定することができるシステムの開発は非常に有用となることが考えられる。

ディープラーニング（深層学習）の一つである畳み込みニューラルネットワーク（Convolutional neural network: CNN）では、画像認識において大きな利点がある（Alex et al., 2017）。深層学習を用いた様々な画像診断の精度を評価するメタアナリシスでは、臨床的に許容できる精度に相当していることから、深層学習を画像診断に用いる妥当性が報告されている（Aggarwal et al., 2021）。脊椎疾患では、これまでに頸椎単純X線写真から頸椎症性脊髄症を検出するためのCNNは報告されているが（Maki et al., 2020, Lee et al., 2022, Tamai et al., 2023）、腰椎単純X線写真からLSCSを検出するためのCNNに関する文献はほとんどない。そこで、深層学習は腰椎単純X線写真からLSCSを識別できると仮説を立てた。本研究テーマ②として、手術が必要なLSCSの有無を腰椎単純X線写真から自動診断するCNNを用いたアルゴリズムを開発し、その精度を検証することを目的とした

第1章 超高純度ヒト他家骨髄由来間葉系幹細胞とアルギン酸ナトリウムの椎間板内投与が椎間板や椎間板性疼痛に与える影響

緒言

腰痛は約70%の人が一生のうちに経験し、重度の腰痛は日常生活に支障をきたすため大きな健康問題の一つである (Hoy et al., 2010, Fatoye et al., 2019, Errico et al., 2004, Balagué et al., 2007)。特に、慢性的な腰痛は、生活の質の低下や平均余命の短縮に直接関係していると言われている (Fatoye et al., 2019)。椎間板変性は腰痛の主な原因の一つである (Noriega et al., 2017, Orozco et al., 2011)。椎間板変性による慢性的な腰痛の治療戦略には理学療法、運動療法、薬物療法などがあり、保存的治療が不十分な場合は手術が行われる (Noriega et al., 2017, Orozco et al., 2011)。理学療法と薬物療法は、患者の約20%で腰痛を改善できるとされ (Orozco et al., 2011)、脊椎手術も腰痛軽減に一定の効果がある。しかし、既存の治療法は椎間板変性や椎間板性疼痛の原因に直接アプローチするものではなく、慢性腰痛症に対する根治的な治療法は確立されていない。そのため慢性腰痛を改善する新しい治療法の開発が必要とされている。

椎間板は髄核 *nucleus pulposus* (NP) と線維輪 *annulus fibrosus* (AF) で構成されている。髄核の細胞外マトリックスは、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、II型コラーゲンから成り、細胞外マトリックスは高度に水和しているため、髄核は圧縮力の加わる荷重下で水圧を分散させる機能がある (Frith et al., 2013)。椎間板の変性は、水分の喪失と細胞外マトリックスの分解によって特徴付けられ、これにより脊柱の全体的なバイオメカニクスが変化する (Frith et al., 2013)。さらに、変性した椎間板組織は栄養供給が乏しく、細胞分裂能力が低いため、生体内では自然には再生しない (Lee et al., 2014)。よって、髄核細胞を再生させる治療法は、椎間板機能を回復させるための非常に魅力的な戦略であり、革新的な腰痛治療法となる可能性がある (Zeng et al., 2015, Yamada et al., 2013, Sudo et al., 2011, Sudo et al., 2010)。

椎間板の炎症は、急性期腰痛の最も重要な要因と考えられている (Buchner et al., 2007, Chou et al., 2007, Miyagi et al., 2012)。慢性期の椎間板の炎症は、*neoinnervation* と呼ばれる線維輪の内層へと知覚神経の浸潤を引き起こし、それは椎間板性疼痛として知られる重要な因子である (Freemont et al., 2002)。Tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-6 (IL-6)、nerve growth factor (NGF) などの炎症性メディエーターは、腰痛患者の椎間板内で上昇している (Burke et al., 2002, Kraychete et al., 2010, Ura et al., 2021)。さらに、TNF- α と IL-6 は NGF の産生を増加させ、これらの変化が椎間板性疼痛の発生に寄与している (Lotz et al., 2006,

Aoki et al., 2004, Woolf et al., 1997)。NGFは、高親和性 tyrosine kinase A (TrkA) 受容体を介してその作用を発揮し、椎間板への神経浸潤を引き起こす (Freemont et al., 2002, Patel et al., 2000)。したがって、TNF- α 、IL-6、TrkA、および椎間板における neoinnervation の抑制は、椎間板性疼痛の治療標的となりうる。

生体材料をベースとした組織再生療法は、椎間板変性に対する新たな治療法として有効である可能性がある (Yamada et al., 2013, Sudo et al., 2011, Ura et al., 2021, Mohd et al., 2018, Tsujimoto et al., 2018)。我々は以前、非細胞性の生体吸収性超高純度アルギン酸(Ultra-purified alginate gel; UPAL)ゲルが、ラットの尾椎穿刺モデルにおいて、椎間板変性を予防し、椎間板性疼痛を軽減することを報告した (Ura et al. 2021)。さらに、骨髄由来間葉系幹細胞(Bone marrow-derived mesenchymal stem cells; BMSCs)は、椎間板変性による慢性腰痛症患者に有用であるという既報も散見される (Noriega et al., 2017, Orozco et al., 2011, Mesoblast Phase 3 Trial 2021)。第 III 相試験では、椎間板変性による慢性腰痛患者を同種 BMSC で治療した場合、生理食塩水やヒアルロン酸で治療した場合に比べて、椎間板性疼痛が有意に軽減したことが示されている (Mesoblast Phase 3 Trial 2021)。

しかし、臨床研究に使用されるBMSCsは、非分化性の汚染細胞を含むため、所見がばらついたり、矛盾したりする危険性がある (Yoshikawa et al., 2010, Mabuchi et al., 2013, Morikawa et al., 2009, Houlihan et al., 2012, Mabuchi et al., 2016, Harada et al., 2021, Pittenger et al., 1999)。これらの問題を克服するため、細胞表面マーカーの発現に基づいたシングルセルソーティングを用いて細胞を分離し、遺伝子的に安定で超高純度であり、Good Manufacturing Practice(GMP)に準拠したクローン形成BMSCs (Rapid Expansion Clone; REC)が開発された (Mabuchi et al., 2013, Morikawa et al., 2009, Houlihan et al., 2012, Mabuchi et al., 2016, Harada et al., 2021)。我々はこれまでに、RECが細胞増殖能、細胞サイズの均一性、および細胞表面抗原の発現の点で、市販のヒトBMSCsと比較して優れていることを報告した (Ukeba et al., 2022)。また、RECとUPALゲルを混合埋植することで、in vivoのウサギおよびヒツジの椎間板切除モデルにおいて、椎間板再生をさらに促進することも示した。これは、UPALゲルがキャリアとして細胞の漏出を防ぎ、BMSCの活性化を補助することを示している (Ukeba et al., 2022, Ukeba et al., 2020)。

この研究では、RECとUPALの混合液の椎間板内投与が椎間板性疼痛を軽減するという仮説を立てた。我々はこれまで、椎間板ヘルニア術後の空隙にUPALゲルを埋植するという方法を用いてきたが、UPALをゲル化させない状態ならば、手術ではなく注射によって椎間板内に投与することができる。UPALゲルと同様に、残存する髓核細胞やRECの活性化を助けることによって、椎間板性疼痛を軽減し、椎間板再生を誘導することが期待される。すなわち、RECとUPALの混合液を外来レベルで椎間板内に局所投与することが、椎間板変性に起因する慢性

腰痛症に対する新たな治療戦略として期待される。本研究では、RECとUPALの混合液の局所投与が椎間板組織、炎症性サイトカイン、疼痛関連行動に及ぼす影響を、ラット尾側穿刺モデルを用いて評価した。

方法

1. ラット尾椎穿刺モデルの作成

すべての動物実験は、北海道大学動物実験委員会（17-0122）の承認を受け、ARRIVEガイドラインおよびNational Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animalsに従って行った。雌性Sprague-Dawley（SD）ラット（12週齢、260-300g、n=60）を使用した。実験前に12時間の明暗サイクルを持つ標準的な実験室条件下で、 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ のケージで7日間調整した（Ura et al., 2021）。各ケージに3匹のラットを飼育し、実験中は無菌的に処置した。

先行研究と同様のラット尾椎穿刺モデルを用いて、免疫組織化学的分析、組織学的分析、および疼痛関連行動評価を行った（Ura et al., 2021, Mohd et al., 2018）。ラットを以下の4群に無作為に割り付けた：sham群（皮膚切開のみ）、punch群（髄核穿刺のみ）、UPAL群（髄核を穿刺した後にUPALを注射）、REC+UPAL群（髄核穿刺後にRECとUPALの混合液を注射）。ラット1匹に対し、尾椎（Co）4/5-5/6を用い、各群はラットn=3、椎間板n=6とした。既報のように、乾燥した線維状のUPAL（400-600mPa/s, Mochida Pharma Co. Ltd., Tokyo, Japan）を生理食塩水（0.9%, Otsuka）に溶解して2%（w/v）UPAL溶液を調製した（Ura et al., 2021）。凍結状態のGMP準拠REC（Japan tissue engineering Co. Ltd., Aichi, Japan）を 37°C の温浴中で解凍し、最終細胞濃度が $1 \times 10^6/\text{ml}$ となるように2%（w/v）UPAL溶液と混合した（Ukeba et al., 2022）。

5%isofluraneの吸入による麻酔導入の後、ketamineとmedetomidineの混合物（ketamine : medetomidine = 75 mg/kg : 0.5 mg/kg）の腹腔内注射によって麻酔を維持した。Co4/5-5/6レベルの尾背部皮膚および結合組織に縦切開を行い、18G針を用いて、Co4/5および5/6の髄核に線維輪を介して穿刺した（穿刺径:1 mm、深さ:2 mm）（Ura et al., 2021）。この直後に、26G針のマイクロシリンジ（Hamilton, Reno, NV, USA）を用いてUPAL溶液（椎間板あたり4 μL ）またはREC/UPAL混合液（椎間板あたり4 μL 、最終濃度 $1 \times 10^6/\text{ml}$ ）を、穿刺とは別経路から椎間板内に注入した。このモデルでは穿刺径が非常に小さいため細胞漏出の心配はないと考えるが、念のため、溶液注入中および注入後に穿刺穴から漏れがないことを確認した。注入5分後に手術部位を通常の生理食塩水で灌流し、皮膚と結合組織を縫合した。各ラットにおけるCo 4/5および5/6は同じ処置を行った（UPAL群には両椎間板にUPAL溶液を投与し、REC+UPAL群には両椎間板にRECとUPALの混合溶液を投与し、punch群は両椎間板の穿刺後、無処置のまま縫合した）。

2. 免疫組織学的評価

術後1、7、28日目にTNF- α 、IL-6およびTrkA陽性細胞率を検出するために免疫

組織化学的分析を行った。ラットをisofluraneによる深麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させ、尾全体 (Co 4/5-Co 5/6) を外科的に切除し、無菌的に軟部組織を除去して尾椎と椎間板のみを採取した。これを4% (w/v) パラホルムアルデヒドで48時間固定し、Christensen脱灰液で1週間脱灰した後、水道水で24時間洗浄してパラフィンに包埋した (Ura et al., 2021, Mohd et al., 2018, Tsujimoto et al., 2018, Xia et al., 2019)。椎間板中央で検体を横断し、切片 (厚さ5 μ m) を得た (Ura et al., 2021)。切片をxyleneで脱パラフィン化し、proteinase K (Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) と共に37°Cで15分間インキュベートした。続いて、1%過酸化水素メタノール (w/v) でブロッキングし (37°C、30分間)、2% (w/v) ウシ血清アルブミン中で室温 (23 $\pm$ 2°C) にて30分間インキュベートした。標本は以下の一次抗体と4°Cで一晩培養した；抗TNF- α マウスモノクローナル抗体 (1:50、Abcam、Cat# ab220210)、抗IL-6マウスモノクローナル抗体 (1:500、Abcam、Cat# ab9324)、抗TrkAマウスモノクローナル抗体 (1:100、Abcam、Cat# ab86474) (Ura et al., 2021, Rutges et al., 2013)。

TNF- α の分析にはHistofine® Fast Red II (1:50、Nichirei Bioscience)、IL-6の分析にはHistoGreen Substrate kit for Peroxidase (1:25、Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan)、TrkAの分析にはHistofine® DAB (1:25、Nichirei Bioscience) を用いた (Ura et al., 2021, Liu et al., 2017)。視認性を向上させる目的で細胞核の対比染色を行い、TNF- α またはTrkA染色ではヘマトキシリンを、IL-6染色ではファストレッドをそれぞれ使用した (Ura et al., 2021)。TNF- α 、IL-6、またはTrkA陽性細胞を、光学顕微鏡 (倍率40倍；Olympus, Tokyo, Japan) を用いて無作為に選んだ5つの独立した視野で別々に数えた (Sudo et al., 2011)。各染色の陽性細胞数は、NPまたはAFの各組織の細胞総数に対する百分率として計算した (Sudo et al., 2011)。すべての評価は、2人の独立した盲検観察者によって行われた。各観察者は1検体について3回の評価を行い、検体ごとの平均値を算出し、各群間の比較を行った。

3. 組織学的評価

術後28日目の椎間板変性を評価するために組織学的分析を行った。ラット尾椎椎間板 (各群ラットn=3；椎間板n=6) を免疫組織化学染色と同様の方法で採取した。椎間板は4% (w/v) パラホルムアルデヒドで48時間固定し、Christensenの脱灰液で1週間脱灰した後、水道水で24時間洗浄し、パラフィンに包埋した (Aoki et al., 2004)。椎間板の矢状断正中切片 (厚さ5 μ m) を採取し、Hematoxylin & Eosin (H&E)、Safranin-O (SO)、Alcian blue (AB) で染色して組織学的変性スコアを評価した (Rutges et al., 2013)。この半定量的組織学的スコアは、終板 (H&E/SO)、AFとNPの境界 (H&E/SO)、NPの細胞形態 (H&E)、NP細胞質 (H&E)、NP細胞外基質 (SO) の6つのカテゴリーを用いてNPとAFの解剖学的構造を評価するも

ので、それぞれ0点（非変性）から2点（重度変性）までのスコアを付け、スコアの合計は0点（正常）から12点（高度変性）まで算出した（Rutges et al., 2013）。AB染色は点数に直接関与しないが、細胞外基質の評価に適した染色であるため補助目的に実施した。全ての評価は、盲検化された2人の独立した観察者によって行われた。各観察者は、1検体について3回の評価を実施して個体の平均値を算出した上で、各群間を比較した。

4. 疼痛関連行動分析

免疫組織学的分析で術後28日目まで生存させたラット12匹（各群n=3）、および、組織学的分析に使用したラット12匹（各群n=3）の合計24匹（各群n=6）を疼痛関連行動分析に用いた。先行研究（Ura et al., 2021）に従い、侵害受容行動試験としてHargreaves、von Frey、Tail-flick試験を行った。すべての行動テストは、盲検化された同一の観察者によって実施された。ラットは試験の24時間前と直前にそれぞれ20分間ずつ試験環境に順応させた。全ての試験は、盲検化された同一の検者によって行われた。各ラットで複数回の測定を行って平均値を算出し、得られた結果を群間で比較した。

4.1 Hargreaves試験

術前2日目（day -2）および術後2日目、7日目、14日目、27日目に、Hargreaves装置（Ugo Basile Biological Instruments, Gemonio, Italy）を用いてHargreaves試験を実施した（Ura et al., 2021）。ラットをガラス板上の個々のスペースに置き、皮膚切開部とは反対側の尾の腹面に赤外線を照射し、熱刺激に対する逃避行動を示すまでの潜時を記録した（Ura et al., 2021）。ビーム強度は最大出力の50%に設定し、カットオフ時間は組織損傷を防ぐため20秒に設定した（Ura et al., 2021）。同一ラットには同じ日に4回実施し、実施間に最低1分間の休憩を挟んだ。

4.2 von Frey試験

von Frey試験は、術前2日目(day -2)と術後2日目、7日目、14日目、27日目に、dynamic plantar aesthesiometer（Ugo Basile Biological Instruments）（Ura et al., 2021）を用いて実施した。ラットを金網の床で囲まれた個々のコンパートメントに入れ、通気孔のあるキャップを尾の付け根の腹側表面（創傷の反対側）にフィラメント（直径0.5mm、ニッケルチタン合金）で刺激した（Ura et al., 2021）。刺激力は10秒間かけて0から5gまで直線的に加え、その後5gで30秒間一定に保った（Ura et al., 2021）。侵害受容反応（尾の付け根をはじく、舐める、引っ張る、振る）を示すのに必要な時間を尾引き潜時と定義し、これを感覚閾値として記録した（Ura et al., 2021, Btsh et al., 2013）。各ラットに対し、少なくとも10秒の休憩を

挟んで5回のテストを実施した。

4.3 tail flick試験

過剰な熱刺激による組織損傷を防ぐため、Hargreaves試験とは別日になるように術前1日目 (day -1) と術後3、8、15、28日目に熱流束放射計 (Ugo Basile Biological Instruments) を用いてtail flick試験を実施した (Ura et al., 2021)。胴体と四肢をタオルで覆い、尾部のみを装置に乗せて10分間馴化させた (Ura et al., 2021)。赤外線を尾の腹側表面 (尾の遠位端から5cm) に熱刺激として照射し、尾振り払い反応までの潜伏時間を記録した (Ura et al., 2021, Baba et al., 2015)。組織の損傷を防ぐため、カットオフ時間は20秒に設定した (Ura et al., 2021)。同一ラットには同じ日に4回実施し、実施間に最低15秒間の休憩を挟んだ。

5. 統計分析

すべてのデータは平均値±標準誤差 (SE) で示した。多群間比較にはone-way ANOVAとTukey-Kramer post hoc検定を用い、二群間比較には対応のないt検定を用いた。すべての統計計算はJMP Pro-version 14.0 statistical software (SAS Institute, Cary, NC, USA)を用い、有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

椎間板損傷後の UPAL ゲル埋植は炎症性サイトカイン産生を抑制する

punch群におけるTNF- α 陽性NPおよびAF細胞の割合は、術後1日目から28日目にかけて漸増した (Figure1)。UPAL群におけるTNF- α 陽性NPおよびAF細胞の割合は、術後1日目から7日目にかけて増加したが、28日目には減少した。しかし、これらの陽性細胞の割合は、すべての時点でpunch群より有意に低かった (各時点で $p<0.05$) (Figure1)。TNF- α 陽性NPおよびAF細胞の割合は、REC+UPAL群では非常に低く、術後の各時点でsham群と同程度であった。さらに、punch群より有意に低く (punch vs REC+UPAL、各時点で $p<0.05$)、UPAL群より1日目と7日目に有意に低かった (UPAL vs REC+UPAL、1日目と7日目で $p<0.05$) (Figure1)。

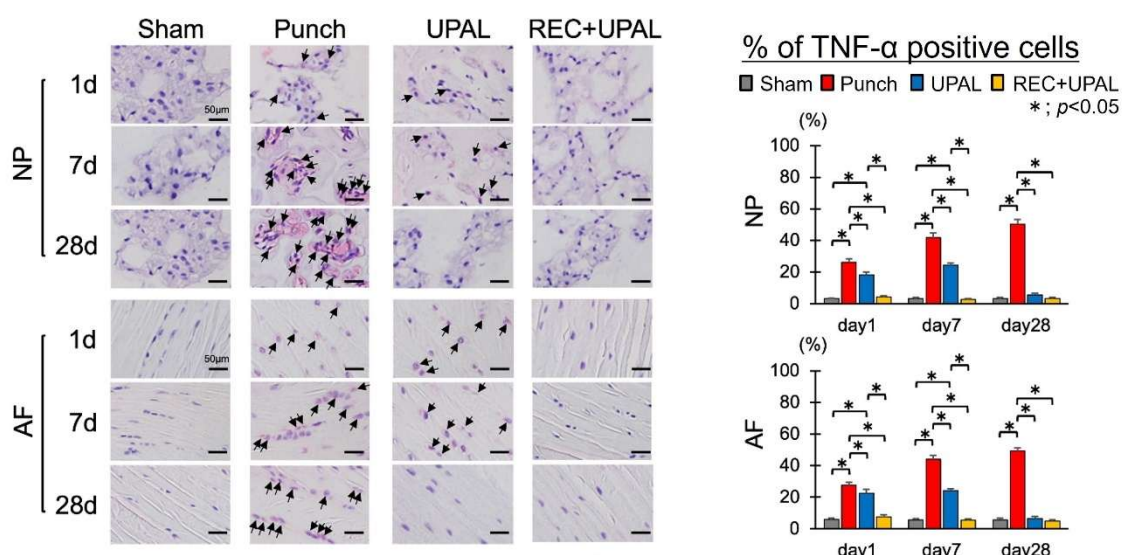


Figure 1. 椎間板髄核組織ならびに線維輪組織におけるTNF- α 陽性細胞率の評価 (スケールバー : 50 μ m, $n = 6$, 平均 $\pm$ SE, * $P < 0.05$)。TNF- α 陽性細胞は赤色に染色され、核はHematoxylinを用いて紫色に対比染色した。

IL-6陽性NP細胞およびAF細胞の割合に関しては、punch群では術後漸増の一途をたどり、UPAL群では1日目から7日目まで増加したが、28日目には減少し、TNF- α と同様の結果を示した (Figure2)。REC+UPAL群では、術後の各時点でIL-6陽性NPおよびAF細胞の割合は非常に低く、sham群と比べて有意差はなかった。またpunch群と比べて各時点で有意に低く (punch vs. REC+UPAL、各時点で $p<0.05$)、UPAL群と比べても術後1日目と7日目で有意に低かった (それぞれ $p<0.05$) (Figure3)。

これらの結果は、RECとUPALの混合液が、UPAL単独液よりも椎間板穿刺による炎症反応を抑制したことを示唆している。

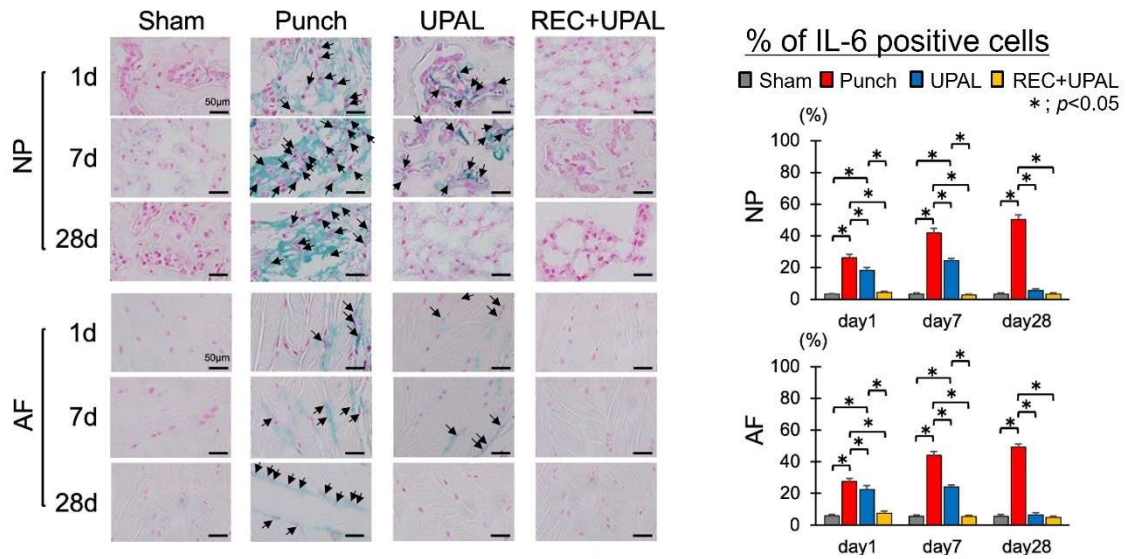


Figure 2. 椎間板髄核組織ならびに線維輪組織におけるIL-6陽性細胞率の評価（スケールバー：50 μ m, n = 6, 平均 $\pm$ SE, * $P < 0.05$ ）。IL-6陽性細胞は青緑色に染色され、核はFast redを用いて赤色に対比染色した。

椎間板損傷後の UPAL ゲル埋植は TrkA 発現を抑制する

punch群におけるTrkA陽性NPおよびAF細胞の割合は、術後1日目から28日目にかけて漸増した (Figure3)。UPAL群におけるTrkA陽性NPおよびAF細胞の割合は、術後1日目から7日目まで増加し、28日目には減少したが、punch群より有意に少なかった（各時点で $p < 0.05$ ） (Figure3)。REC+UPAL群ではTrkA陽性NPおよびAF細胞の割合は術後の各時点で、sham群と有意差がなく非常に低かった。punch群との比較ではいずれの時点でも有意に低く、UPAL群との比較でも1日目と7日目では有意に低かった（それぞれ $p < 0.05$ ） (Figure3)。

これらの結果から、RECとUPALの混合液は、UPAL単独よりも、椎間板穿刺による椎間板内でのTrkA受容体の発現を抑制したことが示唆された。

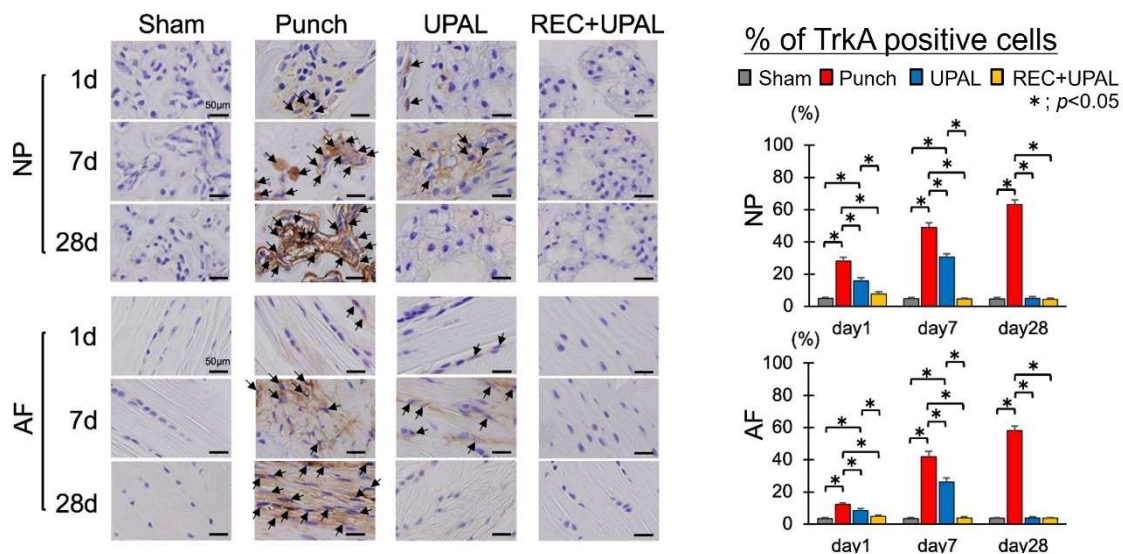


Figure 3. 椎間板髄核組織ならびに線維輪組織におけるTrkA陽性細胞率の評価 (スケールバー：50μm, n = 6, 平均±SE, * $P < 0.05$)。TrkA陽性細胞は茶色に染色され、核はHematoxylinを用いて紫色に対比染色した。

ラット椎間板損傷モデルにおいて UPAL ゲル埋植は椎間板変性を抑制する

我々は以前、UPALゲル単独またはUPALゲルとBMSCsの混合物の移植が、NP穿刺または椎間板部分切除後の動物モデルにおいて、椎間板変性を予防することを報告してきた[19,25,34,35]。しかし、ゲル化させていないUPAL溶液またはRECとUPALの混合液の椎間板変性抑制効果は未確認である。本研究では、ラット尾椎穿刺モデルの椎間板にこれらを注入し、椎間板変性に対する効果を組織学的に検討した。

椎間板の終板は、sham群では規則正しく配列していた。さらに、AF組織はよく組織化され、AFとNPの境界は明瞭で、NP細胞の凝集はなく、NP細胞質はよく組織化されていた (Figure4)。一方、punch群の椎間板は終板が著しく不規則であり、環状構造の崩壊、AFとNPの境界の不明瞭さ、NP細胞のクラスター化、NP細胞質の完全な崩壊と消失、NP組織の軟骨様組織化が認められた (Figure4)。UPAL群では、終板が規則正しく並び、蛇行しているものもあるが半環状構造が持続し、一部NP細胞のクラスター化と正常NP細胞が混在し、NP細胞質の構造が一部崩壊していた (Figure4)。一方、REC+UPAL群では、規則正しい終板、わずかに蛇行するがほぼ正常な環状構造、クラスター化をほとんど伴わない散在したNP細胞、NP細胞質構造を維持していた (Figure4)。AB染色では、punch群の椎間板はNP細胞質にわずかな染色を示したが、sham群では強い染色を示した。UPAL群とREC+UPAL群では、sham群と同様かわずかに減少していた (Figure4)。半定量的組織学的椎間板変性スコア (Rutges et al., 2013) は、術後28日目のREC+UPAL群

とUPAL群でpunch群より有意に低く（それぞれ $p<0.05$ ）、sham群、UPAL群、REC+UPAL群の間に有意差はなかった（Figure4）。

これらの結果は、UPAL溶液またはRECとUPALの混合液を椎間板内に注入することにより、穿刺後の椎間板変性が抑制されることを示唆している。

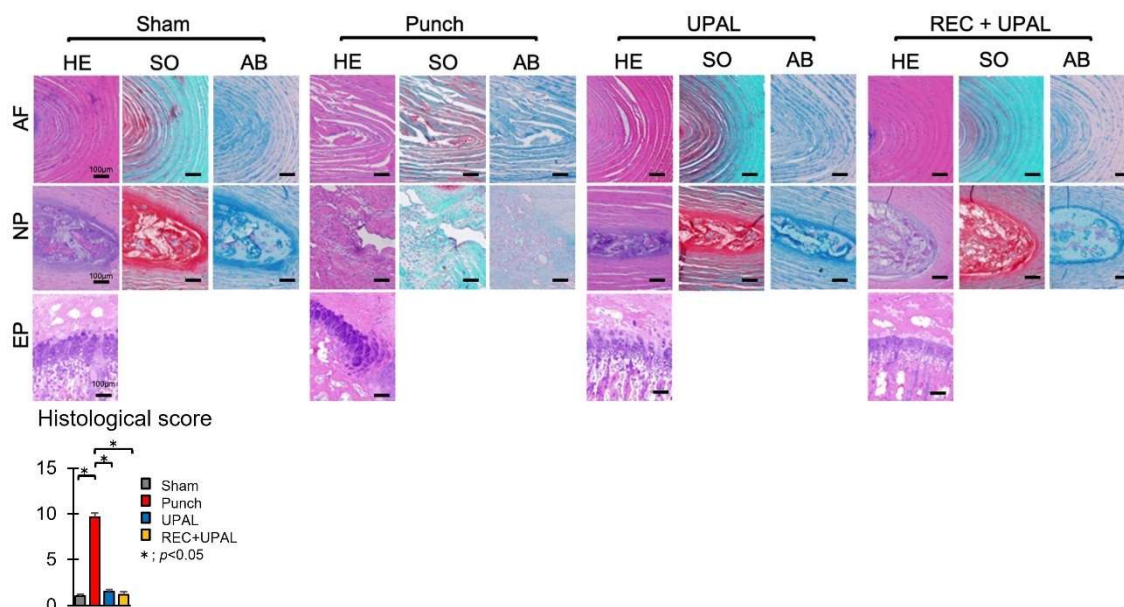


Figure 4. 組織学的評価. H&E、SO、AB染色像（スケールバー：100 μm ）ならびに半定量的組織学的椎間板変性スコアの評価（ $n = 6$, 平均 $\pm$ SE, $*P < 0.05$ ）.

ラット椎間板損傷モデルにおいてUPALゲル埋植は疼痛関連行動を減少させる

免疫組織化学的および組織学的解析から、RECとUPALの混合物を椎間板内に投与すると、炎症性サイトカインとTrkAの発現が抑制され、椎間板組織の変性が抑制されることが示された。このことは、椎間板穿刺後の椎間板変性による痛みを軽減できる可能性が示唆された。そこで、引き続き疼痛関連行動の評価を行った。

Hargreaves試験では、UPAL群の2日目を除き、術後の各時点でpunch群は他の群より有意に逃避行動までの潜時が短かった（punch vs sham, REC+UPAL; 各時点で $p<0.05$ 、punch vs UPAL; 7日目と27日目で $p<0.05$ ）（Figure5）。UPAL群はREC+UPAL群よりも術後2日目と14日目の潜時が短かった（UPAL vs REC+UPAL; 2日目と14日目の $p<0.05$ ）（Figure5）。

von Frey試験では、逃避行動までの潜時は他の群に比べpunch群で有意に減少した（punch vs sham, UPAL, REC+UPAL; 各時点で $p<0.05$ ）。2日目ではsham群よりもUPAL群、REC+UPAL群の潜時が短縮していたが（sham vs UPAL, REC+UPAL; $p<0.05$ ）、7日目以降は同等であった（Figure5）。

Tail flick試験では、punch群のみ8日目以降に延長し、他の群より有意に長か

った (punch vs sham, UPAL, REC+UPAL; $p < 0.05$ 、8日目、15日目、28日目) (Figure5)。Sham群、UPAL群、REC+UPAL群の潜時は術後28日目まで変化しなかった (各時点で群間に有意差なし) (Figure5)。

これらの結果から、RECとUPALの混合液は椎間板穿刺による痛みを軽減し、その効果はUPAL溶液単独の場合よりも大きいことが示唆された。

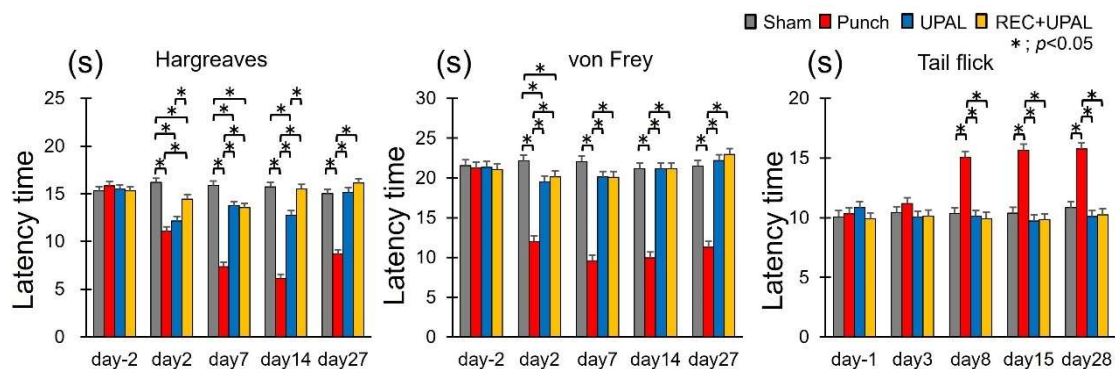


Figure 5. 疼痛関連行動評価 (n = 6, 平均±SE, $*P < 0.05$).

考察

本研究では REC と UPAL の混合液を椎間板へ投与すると、TNF- α 、IL-6、TrkA の産生が抑制され、椎間板変性が抑制された。さらに、REC と UPAL の混合液は疼痛関連行動も抑制した。これらの結果は、REC と UPAL の混合液が、TNF- α 、IL-6、TrkA の発現低下に基づく椎間板変性の予防、炎症の軽減、neoinnervation の抑制により、椎間板性疼痛の治療戦略となり得ることを示している。

TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインは、痛みを有する椎間板組織で増加することが知られている (Burke et al., 2002, Woolf et al., 1997, Mohd et al., 2018, Wuertz et al., 2013, Lai et al., 2015)。TrkA は椎間板の炎症によって産生される NGF と結合して、椎間板内の neoinnervation と椎間板性疼痛を引き起こす (Freemont et al., 2002, Patel et al., 2000, Wuertz et al., 2013)。ラットの椎間板穿刺後にヒアルロン酸ゲルまたは UPAL ゲルを注入すると、炎症性サイトカイン(TNF- α と IL-6)と NGF 受容体(TrkA)の発現が低下し、疼痛関連行動が抑制されたという既報があり (Ura et al., 2021, Mohd et al., 2018)、TrkA の発現低下は椎間板内への neoinnervation の抑制または遅延と関連していると推測されている (Ura et al., 2021)。本研究では、REC と UPAL 混合液の投与により、TNF- α 、IL-6、TrkA の発現が抑制され、疼痛関連行動が改善することが示された。このことから、REC と UPAL の混合液は、既報と同様のメカニズムによって椎間板性疼痛を抑制することが示唆された。すなわち、主要な炎症性シグナル分子の減衰とタンパク質制御経路の調節を介して、neoinnervation の阻害、侵害受容マーカーの発現を抑制する (Ura et al., 2021, Mohd et al., 2018)。

BMSCs は、抗炎症性サイトカインの産生を誘導することで炎症を抑制する (Chahal et al., 2019, Li et al., 2020)。変形性膝関節症患者の膝関節内に BMSCs を自家注射すると、血清 TNF- α および IL-6 レベルが低下し、内視鏡的滑膜切除術やヒアルロン酸注射と比較して、疼痛および臨床スコアが有意に改善した (Li et al., 2020)。本研究では、REC+UPAL 群は UPAL 群と比較して、炎症性サイトカイン、TrkA、および疼痛関連行動の産生をさらに抑制することが示された。これらの結果は、UPAL に REC を加えることで、投与直後に BMSCs によって誘導される抗炎症作用が発揮され、UPAL 群と比較して疼痛が軽減されることを示していると考えられる。

椎間板に対する UPAL と REC の組織再生能は、様々な動物の椎間板切除モデルで実証されている (Ura et al., 2021, Tsujimoto et al., 2018, Ukeba et al., 2022, Ukeba et al., 2020)。無細胞の UPAL ゲルを移植すると、ラット、ウサギ、ヒツジの椎間板切除または穿刺モデルにおいて、椎間板変性が抑制された (Ura et al., 2021, Tsujimoto et al., 2018)。このことは、UPAL ゲル中に残存する NP 前駆細胞の蓄積

と増加が、椎間板組織の自然再生を促進することを示している。さらに、UPAL ゲルと BMSC/REC の混合物を移植すると、ウサギとヒツジのモデルにおいて、細胞を含まない UPAL ゲル単独と比較して、組織の変性を抑制する効果が高かった (Ukeba et al., 2022, Ukeba et al., 2020)。UPAL は REC を補助する担体として作用し、REC と NP 細胞の共存は細胞外マトリックスと成長因子の産生につながり、REC を NP 細胞に分化させ、その結果 BMSCs/REC による椎間板組織再生が起こる (Ukeba et al., 2022)。

近年、腰椎変性疾患に対する幹細胞を用いた再生医療が注目されている。椎間板性慢性腰痛症に対する BMSCs を用いた新たな治療法が開発され、臨床試験が進行中である (Noriega et al., 2017, Orozco et al., 2011, Mesoblast Phase 3 Trial 2021)。自己/同種 BMSCs の椎間板への局所投与は、プラセボと比較して慢性腰痛患者の疼痛を有意に緩和すると報告されている (Noriega et al., 2017, Mesoblast Phase 3 Trial 2021)。しかし、これらの BMSCs には、採取に伴う高い患者侵襲、感染リスクに加えて、自家 BMSCs での高コスト (Orozco et al., 2011, Yoshikawa et al., 2010)、同種 BMSCs での非分化汚染細胞が含まれるといった、いくつかの課題がある (Mabuchi et al., 2013, Morikawa et al., 2009, Houlihan et al., 2012, Mabuchi et al., 2016, Harada et al., 2021, Pittenger et al., 1999, Ukeba et al., 2022)。そのため、より安全で質の高い BMSCs は、臨床応用において重要であると考えられている。REC は超精製された幹細胞であり、細胞増殖能、細胞サイズの均一性、細胞表面マーカー発現に優れ、従来の BMSCs とは区別されている (REC では CD90 陽性細胞の割合が 99.5%以上、CD45 陽性細胞は 0.0%) (Ukeba et al., 2022)。また、ヒツジモデルにおいて体外に移植してから 24 週間経過しても、REC の発がんが確認されないことが証明されている (Ukeba et al., 2022)。本研究では、UPAL と REC の混合液を椎間板に注入することで、疼痛抑制効果および組織変性抑制効果が得られることが示された。REC と UPAL の混合液を椎間板に注入することは、椎間板性慢性腰痛症の臨床的に有効な治療戦略となることが期待される。

この研究にはいくつかの限界がある。第一に、ラットの尾椎穿刺モデルを用いたため、厳密には組織変性による椎間板性疼痛を評価することができなかった。第二に、ラットの尾椎における疼痛関連行動を評価することは、荷重負荷がかかるヒト腰椎における椎間板性疼痛の評価と同等とは考えられない点がある。ラットモデルにおける椎間板性疼痛の評価には、腰椎椎間板損傷モデルが用いられている報告もあるが、ラットの腰椎と尾椎で痛みの評価に有意差がないとされていることから、本研究では尾椎椎間板損傷モデルを用いた (Lai et al., 2015, Mosley et al., 2017, Mosley et al., 2020)。第三に、椎間板変性の評価には磁気共鳴画像法 (MRI) も有用と考えられたが、実施しなかった。小型ラットにおける軽度の変性を効果的に評価するためには 7.0 テスラの MRI が必要であると考えら

れた (Li et al., 2018)。先行研究 (Ura et al., 2021, Ukeba et al., 2022, Ukeba et al., 2020, Rutges et al., 2013) に基づき、組織学的解析による評価も十分に有効であると考えられたため、MRI は施行しなかった。最後に、本研究は投与後 28 日目までしか観察を行っておらず、それ以降の長期的な追跡調査は行っていない点がある。しかし、SD ラットの 28 日間はヒトの数年に相当する (Sengupta et al., 2012)。したがって、ラットの慢性腰痛に対する治療効果を調べるには、この観察期間で十分であると考えられた。

結論として、REC と UPAL の混合液をラットの椎間板内に局所投与することで、主要な炎症性サイトカインである TNF- α および IL-6 産生、神経新生に重要な役割を持つ TrkA 発現、椎間板組織の変性を抑制し、侵害刺激に対する疼痛関連行動を減少させた。この技術は低侵襲で入院を必要としない方法であり、椎間板性疼痛の軽減だけでなく、組織変性の予防にも寄与する可能性がある画期的な新しい治療法となり得ることが期待される。

第2章 腰椎X線写真を用いたAIによる腰部脊柱管狭窄症の自動診断システムの開発

緒言

腰部脊柱管狭窄症（Lumbar spinal canal stenosis: LSCS）は、高齢者の脊柱変性疾患の中で最も多い疾患である（Djurasovic et al., 2010, Chen et al., 2013, Laiwalla et al., 2023, Buckwalter et al., 1995, Verbiest et al., 1975）。LSCSは下肢神経麻痺を引き起こし歩行障害をきたすため、自立した健康的な生活を送る上で大きな障害となる。近年急速に高齢化が進んでいることに伴いLSCSの有病率も増加していることを考えると、この疾患を克服することが極めて重要である。LSCSに対する脊椎除圧術や脊椎固定術などの外科的介入は極めて有効であり、65歳以上で手術を要する割合が高いことが報告されている（Djurasovic et al., 2010, Weinstein et al., 2007）。一方で、LSCSに起因する進行性の神経障害を呈する場合、外科的介入が遅れると回復が困難となることが危惧される。したがって、早期診断と適切な手術適応の判断がLSCSの治療において極めて重要である。

一般的に、LSCS患者はまずプライマリケア医や脊椎外科を専門としない整形外科のクリニックを受診することがほとんどである。前述のように、LSCSの診療において重要なのは、手術が必要な患者を脊椎外科医に紹介する最適なタイミングを見極めるということにある。LSCSの診断には磁気共鳴画像（Magnetic resonance imaging: MRI）が最も有用である（de Schepper et al., 2013, McDonald et al., 2015）。MRIで脊柱管面積が50mm²未満の場合、保存的治療の効果が乏しく、早期の手術が必要となることが多い（Minamide et al., 2013）。しかしながら、MRI検査が必要かどうかの見極めや、手術が必要かどうかの判断は非専門医にとっては困難な場合も多い。さらに、特に地方ではMRI装置のない医療施設も多く、早期のMRI検査自体が困難となることもある。このような背景から、多くの医療施設で撮影が可能な単純X線写真を用いて、専門医への紹介を要する腰部脊柱管狭窄症を自動判定することができるシステムの開発は非常に有用となることが考えられる。

ディープラーニング（深層学習）は、人間の脳の構造を模したニューラルネットワークを用いた機械学習の一つの手法であり、複雑なデータの特徴やパターンを識別することに長けている（Zou et al., 2019）。特に、画像認識や音声認識、言語処理などに活用されており、画像診断を行う本研究においては深層学習が最適な手段と考えられる。畳み込みニューラルネットワーク

（Convolutional neural network: CNN）では、畳み込み層、プーリング層、完全

連結層を通して画像内のパターンを「特徴」として抽出し、不要なパラメータを削減していくことで効率的な学習が可能となる（Alex et al., 2017, Yamashita et al., 2018）。そのため、深層学習の中でもCNNは、画像認識において大きな利点がある（Alex et al., 2017）。深層学習を用いた画像診断の精度を評価するメタアナリシスでは、臨床的に許容できる精度に相当していることから、深層学習を画像診断に用いる妥当性が報告されている（Aggarwal et al., 2021）。脊椎疾患では、これまでに頸椎単純X線写真から頸椎症性脊髄症を検出するためのCNNは報告されているが（Maki et al., 2020, Lee et al., 2022, Tamai et al., 2023）、腰椎単純X線写真からLSCSを検出するためのCNNに関する文献はほとんどない。

そこで我々は、深層学習は腰椎単純X線写真からLSCSを識別できると仮説を立てた。本研究の目的は、手術が必要なLSCSの有無を腰椎単純X線写真から自動診断するCNNを用いたアルゴリズムを開発することである。腰椎単純X線写真からLSCSを自動検出できるアルゴリズムの開発により、MRIのない医療施設でも診断が可能となり、早期介入が必要なLSCSの診断や治療の遅れを減らすことができる可能性が期待される。

方法

1. 対象

北海道大学病院と関連施設の各病院の施設審査委員会の承認を得て、画像データと患者情報をレトロスペクティブに収集した。本研究では、2022 年 1 月から 2022 年 8 月の期間に、1 施設（病院 1）で LSCS（腰椎変性すべり症を含む）の手術を受けた 150 人の患者と、他の 2 つの施設で手術を受けた 25 人の患者を対象とした。除外基準は、（1）第 1 腰椎（L1）から第 5 腰椎（L5）における椎体骨折または腰椎分離症、（2）脊椎転移および感染、（3）コブ角 15°以上の側弯症および移腰仙部移行椎などの奇形、（4）心臓ペースメーカー等による MRI データのない例、とした。病院 1 の症例は手術日に基づいて、2022 年 1 月から 2022 年 6 月までの 125 例を内部検証に、2022 年 7 月から 8 月までの 25 例を外部検証に用いることとした。さらに、他施設の 25 症例は追加外部検証に使用した。内部検証では、LSCS を予測するために、画像データを用いて CNN モデルの学習を行った。その後、外部検証では内部検証と独立したデータを用いて、これらの学習済み CNN モデルの性能を評価した。

2. インプットデータ

腰椎単純 X 線写真の側面像から Figure 6 に示すように第 1/2 腰椎（L1/2）から第 4/5 腰椎（L4/5）までの 4 椎間の関心領域（Region of interest: ROI）を抽出した。上下はそれぞれ頭側椎体と尾側椎体の椎弓根の下縁とし、左右は椎間関節の後縁から椎体前縁までとした。内部検証用データとして 500 枚、外部検証用データとして 100 枚、さらに追加外部検証データとして 100 枚の合計 700 枚の画像を用意した。これらの画像を 224×224 ピクセルの Portable Network Graphics (PNG) ファイルに変換し、標準化のために padding を行った。

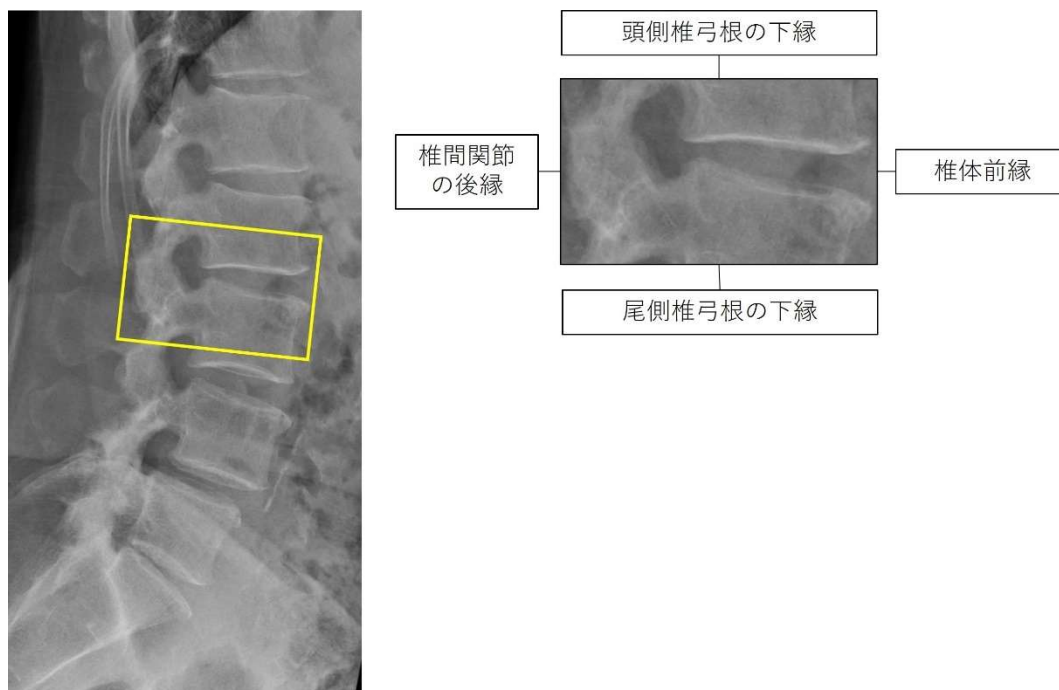


Figure 6. 腰椎単純 X 線側面像からの ROI 抽出における定義

3. データのラベリング

得られた 700 枚の画像に対し (1) 手術レベルか非手術レベルかの 2 値、(2) MRI 水平断像で測定した脊柱管面積 (mm^2) (Figure 7)、の 2 つのラベリングを行った。Annotation 1 では、CNN は手術レベルを 1、非手術レベルを 0 と分類し、手術レベルである可能性を予測した。Annotation 2 では、CNN は脊柱管面積を連続変数として学習した。

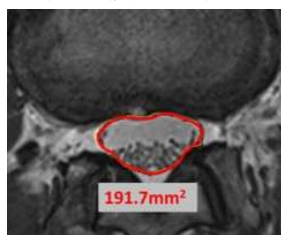


Figure 7. MRI T2 強調像の水平断で椎間板レベルの脊柱管面積を計測

内部検証では、選択バイアスを軽減し CNN モデルの汎用性を評価するために、5 分割交差検証を行った。手術日に基づいて、同一患者の画像が同じデータセットになるよう 500 枚の画像を 5 つに分け、それぞれ 100 枚ずつのデータセットとした (データセット 1、2、3、4、5)。1 つのデータセットが検証セットとなり、残りの 4 つのデータセットがトレーニングセットとなるようにデータセットを交換しながら学習を 5 回繰り返し、それぞれが 1 回ずつ検証セッ

トとして使用されるようにした。外部検証では、5つの学習済みモデルが外部検証データセットの画像に対し、手術レベルであるかどうかと脊柱管面積を予測させ、その予測性能を評価した。予測性能はこれら5つのモデルから得られた予測数値の平均値を用いて評価した。また、別の施設のデータでも同様の結果が出るか、すなわち CNN モデルの汎用性を確認するために追加外部検証を行った。その後、この2つの annotation が LSCS に関連する共通の特徴を持っているのかを確認するため、マルチタスク学習を行った (Ye et al., 2019, Yang et al., 2021)。最後に、外部検証データセット (200 画像) と内部検証データセット (500 画像) を学習させ、外部検証で観察された予測性能と比較して有意な乖離がないことを検証した (内部-外部クロス検証)。

4. Convolutional Neural Network (CNN)モデル

CNN モデルの構築は、ニューラル・ネットワーク・コンソール (ソニーネットワークコミュニケーションズ、東京、日本) を用いて行い、Figure 8 に示すような順序で学習を行った。この階層は「Image Augmentation」レイヤーを備えており、各エポックでの訓練データセットに対する画像処理を加えることで、学習効率の向上を図った。各画像には、-0.1 ラジアンから 0.1 ラジアンの範囲で回転を加え、0.8 倍から 1.2 倍の範囲でズーム後にトリミングを行うなど、学習中にランダムな処理ができるようにした。

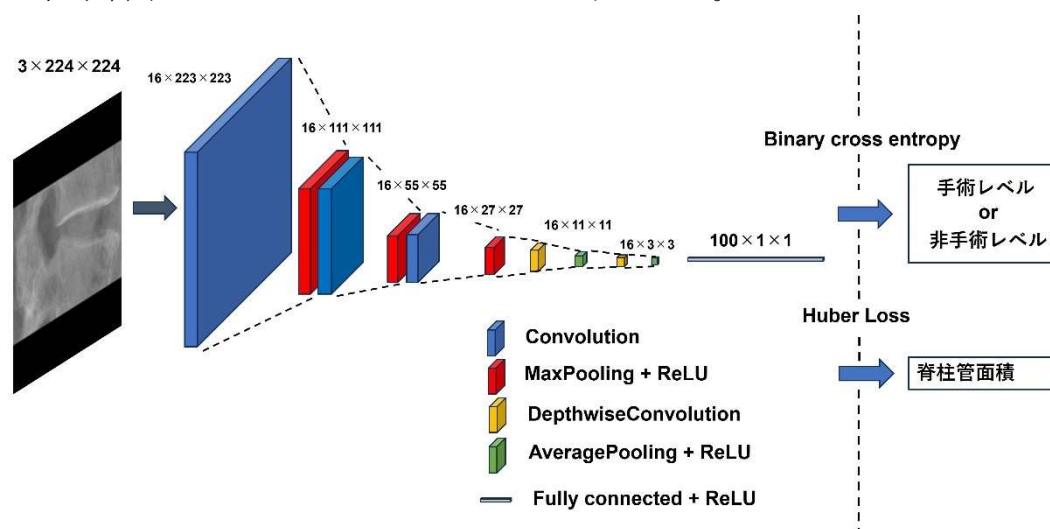


Figure 8. LSCS 診断のための CNN モデルの概略図

Annotation 1 と Annotation 2 は、Image Augmentation 層に続いて、3つの畳み込み層、3つの Max Pooling 層、2つの Depthwise Convolution 層、2つの Average Pooling 層から構成される。出力層は、アノテーション 1 では Binary Cross Entropy を、アノテーション 2 では Huber loss を採用し、完全連結層の後

に選択した (Figure 8)。マルチタスク学習は、annotation 1 と annotation 2 のそれぞれの出力層の間に共通の中間層を持つ構造とした。バッチサイズ 64 と Adam オプティマイザ (Kingma et al., 2015) を設定し、各エポックにおいて Image Augmentation 層が学習データセットに若干の変更を加えるため、学習は 2000 エポックとした。

CNN の最後の畳み込み層によって抽出された特徴量の多い領域を可視化するために、Grad-CAM を確認した。これらの深層学習には、Core i9-10920X

(Intel) の中央処理装置、Quadro RTX 4000 (NVIDIA) のグラフィック処理装置、128GB のランダムアクセスメモリを用いた。

5. 統計解析

Annotation 1 では、receiver operating characteristic (ROC) 曲線から area under the curve (AUC) 算出した。手術レベルの予測に関するカットオフ値を 0.5 とし、感度、特異度、陽性適中率 (PPV)、陰性適中率 (NPV)、精度、陽性尤度比 (PLR)、陰性尤度比 (NLR) など、予測性能に関する様々な指標を算出した。Annotation 2 については、実際の脊柱管面積と予測脊柱管面積の関係をピアソンの相関係数を用いて評価した。

データ解析は JMP statistical software for Windows (version 14; SAS, Inc., Cary, NC, USA) を用いて行い、有意水準 $P < 0.05$ を統計的に有意とみなした。

結果

175名のうち男性110名、女性65名であり、平均年齢は 68 ± 11 歳だった。Annotation 1には、手術レベルが278（40%）椎間、非手術レベルは422（60%）椎間だった。各データセットの詳細をTable 1に示す。

Table 1. 各データセットの詳細

データセット	1 (n=25)	2 (n=25)	3 (n=25)	4 (n=25)	5 (n=25)	外部検証 (n=25)	追加 外部検証 (n=25)
男性(女性)	17 (8)	14 (11)	20 (5)	12 (13)	15 (10)	16 (9)	16 (9)
年齢	69.7 ± 12.7	69.4 ± 11.3	68.5 ± 12.1	68.8 ± 10.1	69.8 ± 8.8	66.0 ± 11.2	62.7 ± 13.1
手術レベル数	45 (45.0%)	50 (50.0%)	39 (39.0%)	38 (38.0%)	42 (42.0%)	38 (38.0%)	26 (26.0%)
脊柱管面積 (mm ²)	113.5 ± 56.1	100.2 ± 54.3	117.0 ± 54.9	118.4 ± 56.6	100.1 ± 50.1	110.8 ± 57.0	124.1 ± 53.9

内部検証

Annotation 1では、5分割交差検証におけるAUCと精度の範囲は、それぞれ0.85～0.89と79～83%だった（Figure 9, Table 2）。5つのデータセットすべて合計した場合の各指標も同等であり、AUCは0.87、感度は0.74、特異度は0.86、PPVは0.80、NPVは0.81、精度は81%、PLRは5.39、NLRは0.30であった（Figure 9, Table 2）。

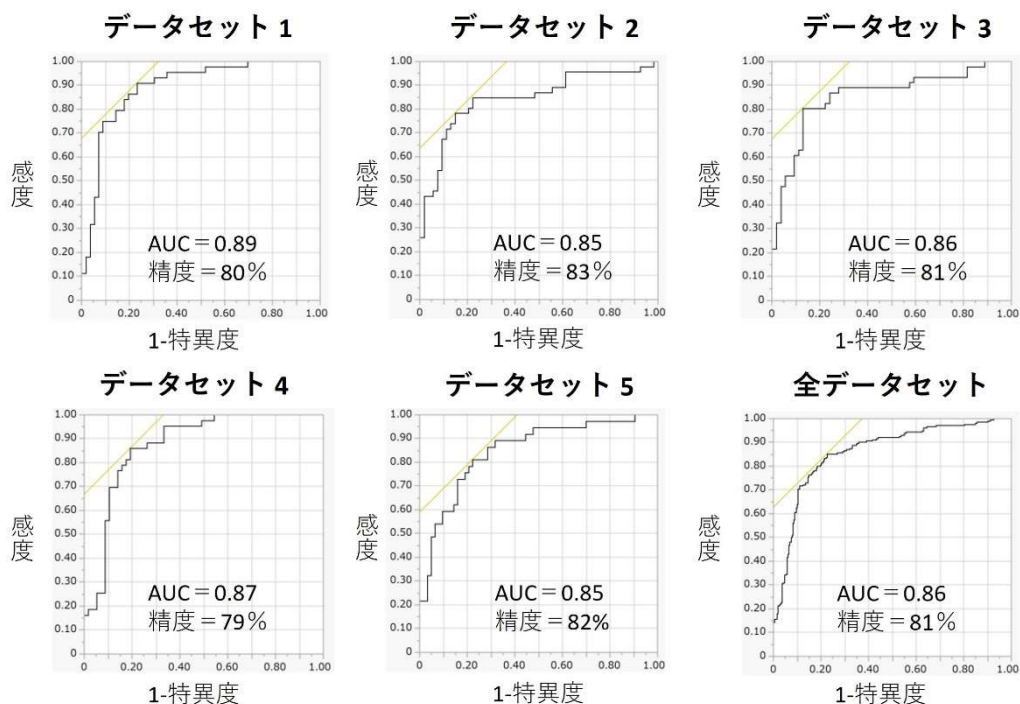


Figure 9. Annotation 1 における内部検証結果

Table 2. 内部検証における手術レベルの予測性能に関する統計的指標

内部検証	感度	特異度	PPV	NPV	精度	PLR	NLR
データセット 1	0.71	0.88	0.82	0.79	80%	5.64	0.34
データセット 2	0.83	0.83	0.81	0.85	83%	4.96	0.21
データセット 3	0.78	0.83	0.80	0.82	81%	4.70	0.26
データセット 4	0.63	0.91	0.84	0.77	79%	7.16	0.41
データセット 5	0.76	0.86	0.76	0.86	82%	5.30	0.28
全データセット	0.74	0.86	0.80	0.81	81%	5.39	0.30

Annotation 2 については、5 分割交差検証における相関係数は 0.53～0.64 の範囲であり（すべて $P < 0.01$ ）、全データセット合計での相関係数は 0.58（Figure 10）であった。

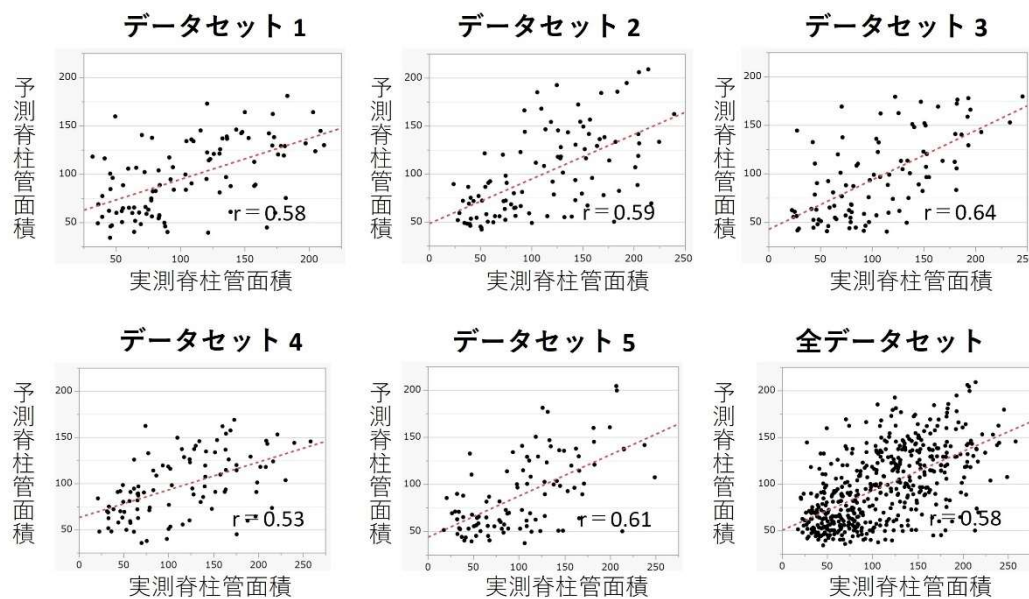


Figure 10. Annotation 2 に関する内部検証における脊柱管面積の実測値と予測値 (r ; 相関係数)

外部検証

Annotation 1 と annotation 2 に関して 5 つの学習済み CNN モデルを用い、100 枚の画像からなる外部検証データセットにおいて、手術レベルの可能性と脊柱管面積の予測を行った。Annotation 1 では、5 つの学習済み CNN モデルの AUC と精度の範囲は、それぞれ 0.88-0.90 と 78-83%であり、5 つの予測可能性の平均値では、AUC が 0.90、精度が 82%であった (Figure 11, Table 3)。

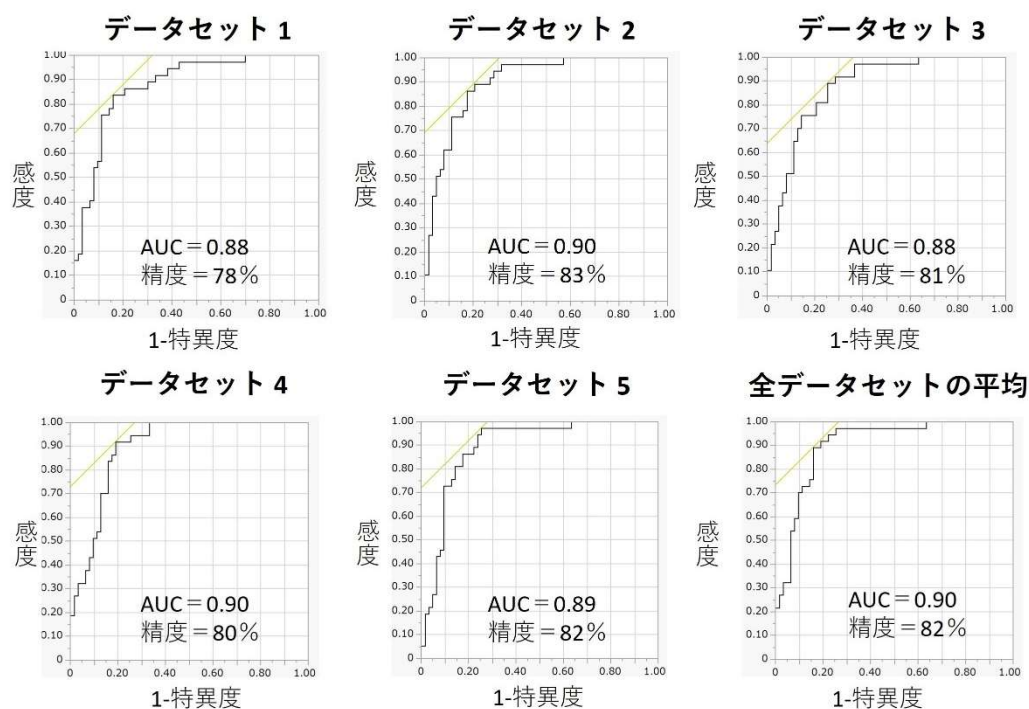


Figure 11. Annotation 1 における外部検証結果

Table 3. 外部検証における手術レベルの予測性能に関する統計的指標

外部検証	感度	特異度	PPV	NPV	精度	PLR	NLR
データセット 1	0.60	0.89	0.76	0.79	78%	5.35	0.46
データセット 2	0.89	0.79	0.72	0.93	83%	4.32	0.14
データセット 3	0.70	0.87	0.77	0.83	81%	5.53	0.34
データセット 4	0.73	0.84	0.73	0.84	80%	4.60	0.32
データセット 5	0.73	0.87	0.77	0.85	82%	5.75	0.31
全データセット	0.76	0.86	0.76	0.86	82%	5.30	0.28

Annotation 2 では、5 つの学習済み CNN モデルの相関係数は 0.54～0.71 であり、5 つのモデルの平均値では相関係数は 0.69 だった (Figure 12)。

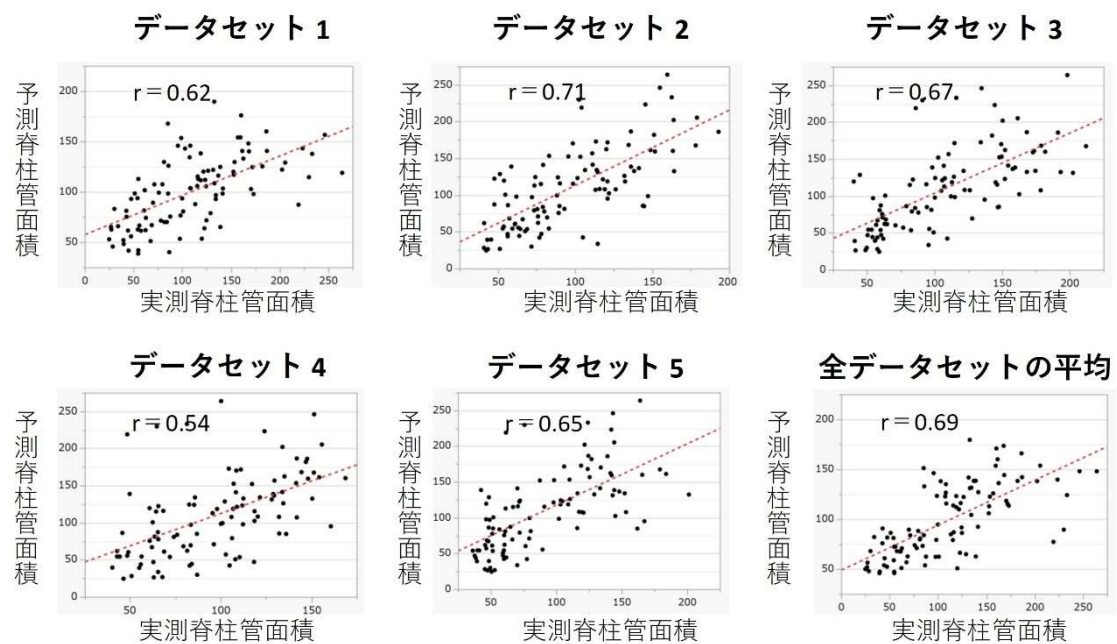


Figure 12. Annotation 2 に関する外部検証における脊柱管面積の実測値と予測値 (r ; 相関係数)

Grad-CAM による可視化では、椎間関節と椎間板後部の特徴密度が高いことが示された (Figure 13)。

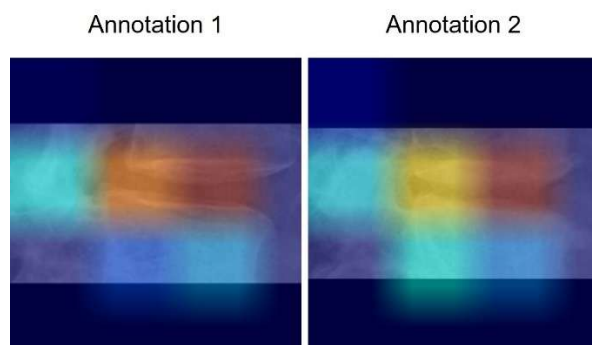


Figure 13. Annotation 1 と 2 における Grad-CAM

さらに、他の 2 つの病院の画像 100 枚を用いて、追加外部検証を行った。Annotation 1 では、5 つの学習済み CNN モデルの AUC と精度の範囲は、それぞれ 0.84~0.91、76~88%であり、平均値では、AUC が 0.89、精度が 84%であった (Figure 14, Table 4)。

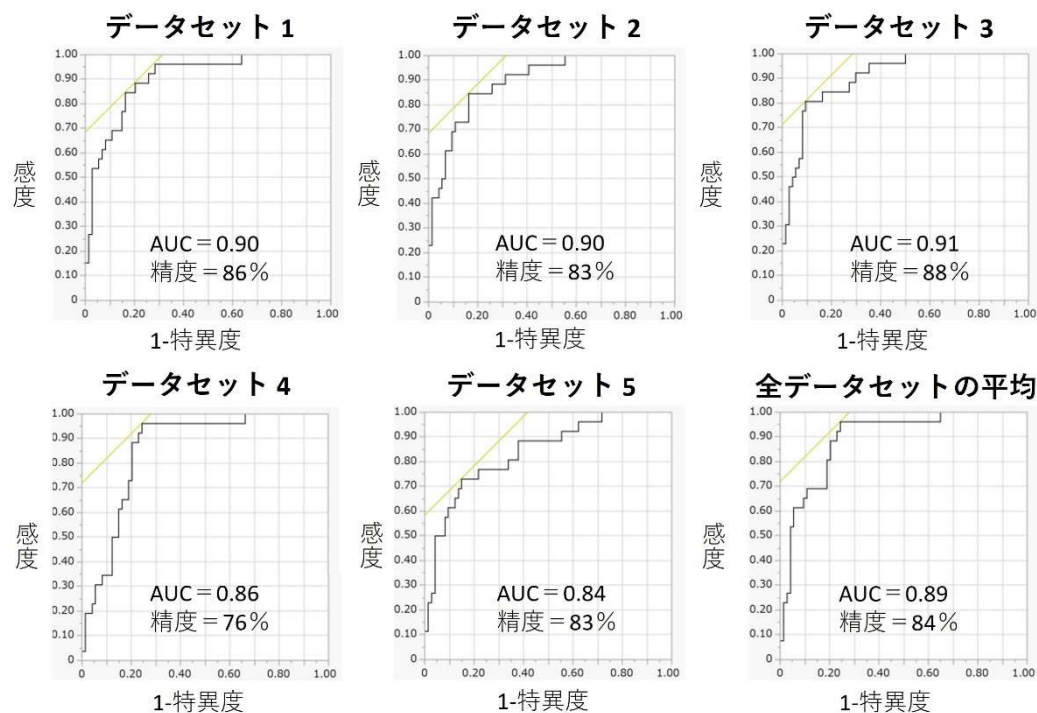


Figure 14. Annotation 1 における追加外部検証結果

Table 4. 追加外部検証における手術レベルの予測性能に関する統計的指標

追加外部検証	感度	特異度	PPV	NPV	精度	PLR	NLR
データセット 1	0.68	0.92	0.74	0.90	86%	8.50	0.35
データセット 2	0.73	0.87	0.66	0.90	83%	5.41	0.31
データセット 3	0.77	0.92	0.77	0.92	88%	9.49	0.25
データセット 4	0.50	0.85	0.54	0.83	76%	3.36	0.59
データセット 5	0.58	0.92	0.71	0.86	83%	7.12	0.46
全データセット	0.65	0.91	0.71	0.88	84%	6.91	0.20

Annotation 2 では、5 つの学習済み CNN モデルで相関係数は 0.39～0.63 であり、平均値では相関係数は 0.56 だった (Figure 15)。

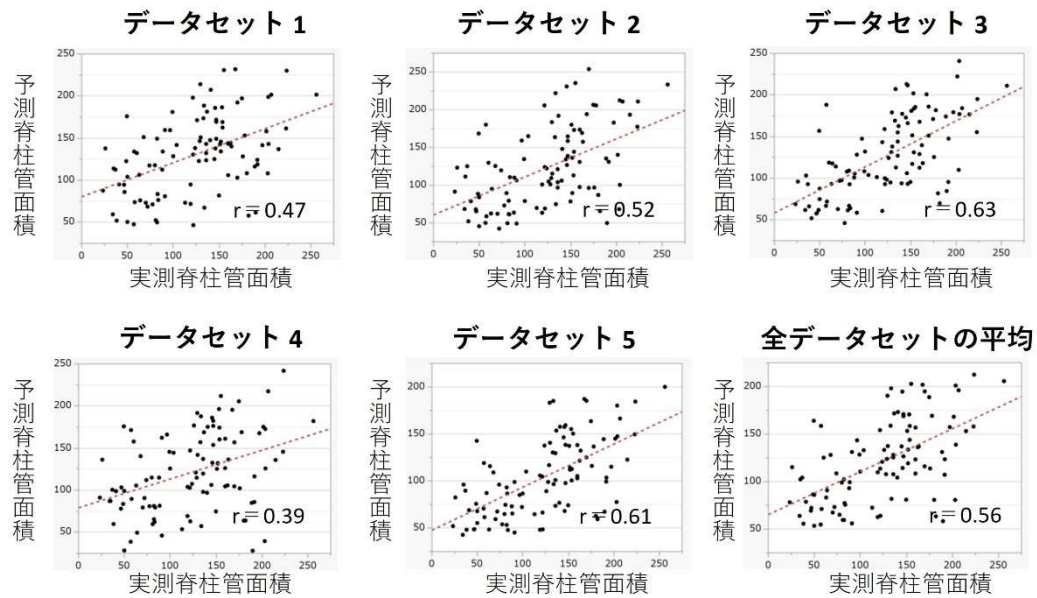


Figure 15. Annotation 2 に関する追加外部検証における脊柱管面積の実測値と予測値 (r ; 相関係数)

マルチタスク学習による検証

内部検証の結果は以下の通りであった。Annotation 1 における 5 分割交差検証の AUC と精度の範囲は、それぞれ 0.86~0.88 と 76~84% であった (Figure 16, Table 5)。5 つのデータセットの合計においても各指標は同等であり、AUC は 0.86、感度は 0.77、特異度は 0.82、PPV は 0.77、NPV は 0.82、精度は 80%、PLR は 4.28、NLR は 0.28 であった (Figure 16, Table 5)。

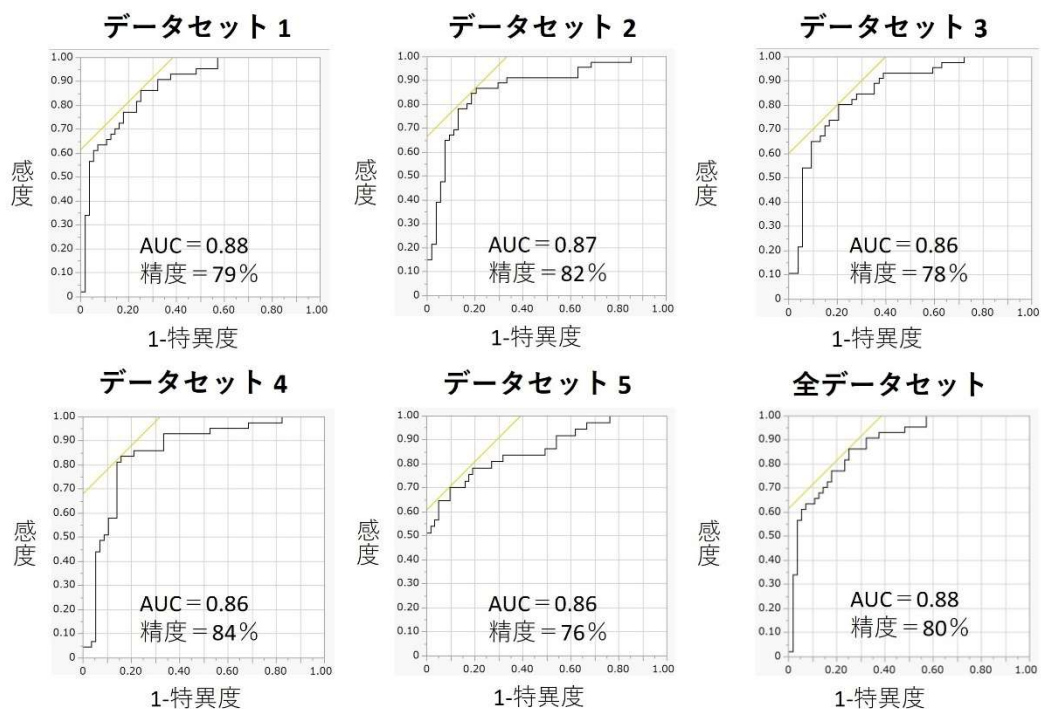


Figure 16. Annotation 1 におけるマルチタスク学習での内部検証結果

Table 5. マルチタスク学習での内部検証における手術レベルの予測性能に関する統計的指標

内部検証	感度	特異度	PPV	NPV	精度	PLR	NLR
データセット 1	0.75	0.82	0.77	0.81	79%	4.20	0.30
データセット 2	0.76	0.87	0.83	0.81	82%	5.87	0.28
データセット 3	0.72	0.83	0.79	0.78	78%	4.30	0.34
データセット 4	0.84	0.84	0.80	0.87	84%	5.30	0.19
データセット 5	0.78	0.75	0.64	0.86	76%	3.09	0.29
全データセット	0.77	0.82	0.77	0.82	80%	4.28	0.28

Annotation 2 での相関係数は、0.57～0.67（すべて $P < 0.01$ ）の範囲であり、すべてのデータセットの合計での相関係数は 0.60 であった（Figure 17）。

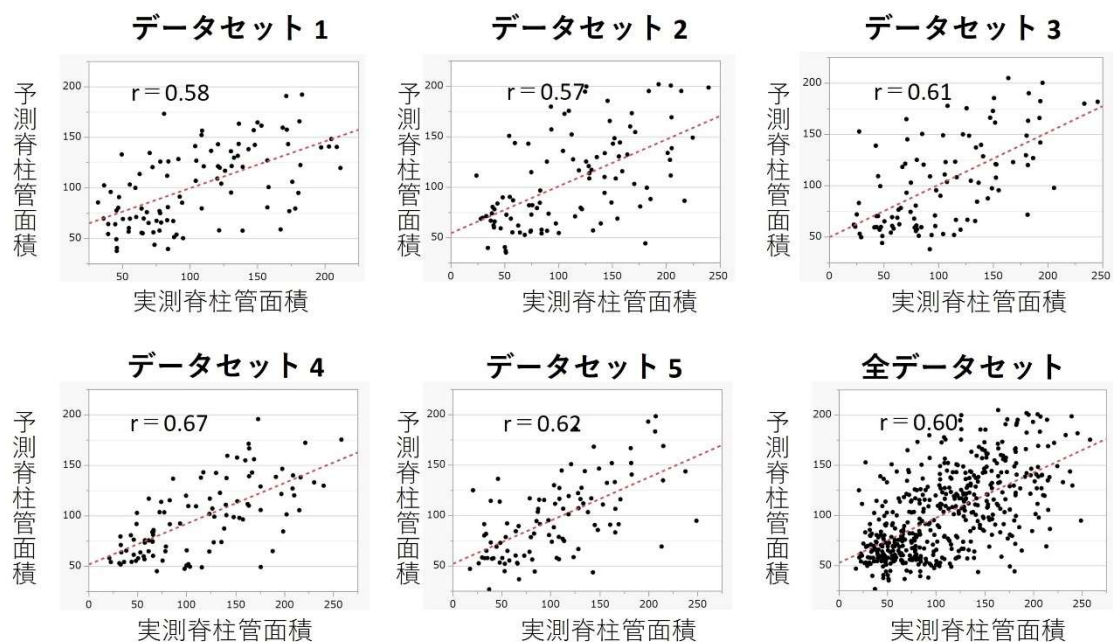


Figure 17. Annotation 2 に関するマルチタスク学習での内部検証における脊柱管面積の実測値と予測値 (r ; 相関係数)

Annotation 1 の学習済み CNN モデルの外部検証では、AUC の範囲は 0.86～0.89、精度の範囲は 77～79%であった。予測値の平均では AUC 0.88、精度 79%だった (Figure 18, Table 6)。

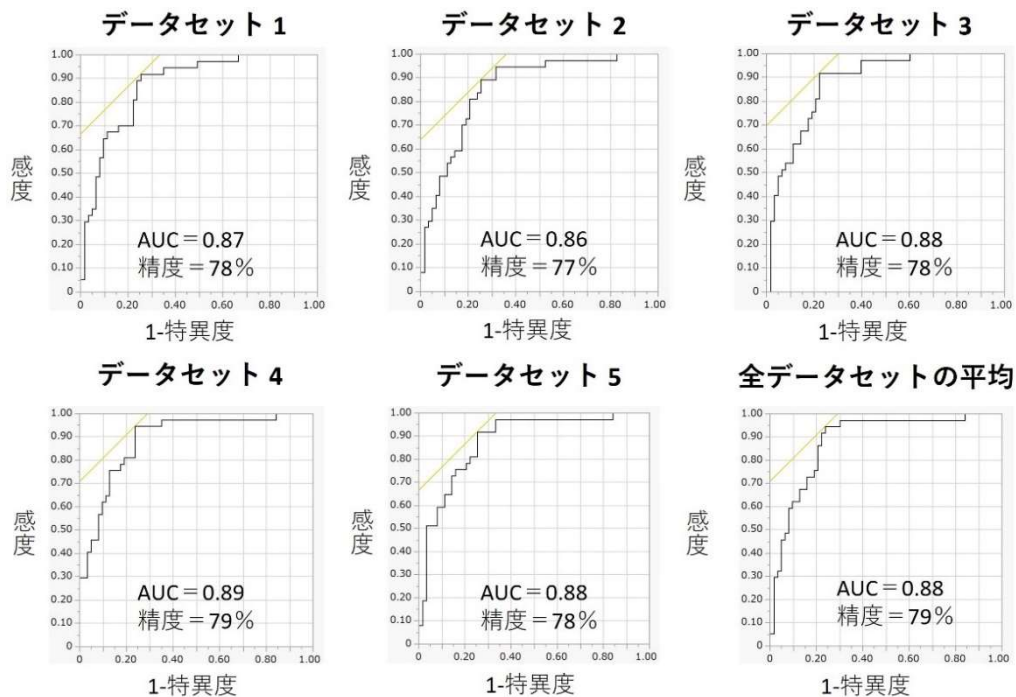


Figure 18. Annotation 1 におけるマルチタスク学習での外部検証結果

Table 6. マルチタスク学習での外部検証における手術レベルの予測性能に関する統計的指標

外部検証	感度	特異度	PPV	NPV	精度	PLR	NLR
データセット 1	0.70	0.83	0.70	0.83	78%	4.03	0.36
データセット 2	0.68	0.83	0.69	0.81	77%	3.87	0.39
データセット 3	0.54	0.92	0.80	0.77	78%	6.81	0.50
データセット 4	0.84	0.76	0.67	0.89	79%	3.52	0.21
データセット 5	0.78	0.78	0.67	0.86	78%	3.53	0.28
全データセット	0.76	0.81	0.70	0.85	79%	3.97	0.30

Annotation 2 については、5 つの学習済み CNN モデルの相関係数は 0.67～0.70 の範囲であり、予測値の平均での相関係数は 0.71 であった (Figure 19)。

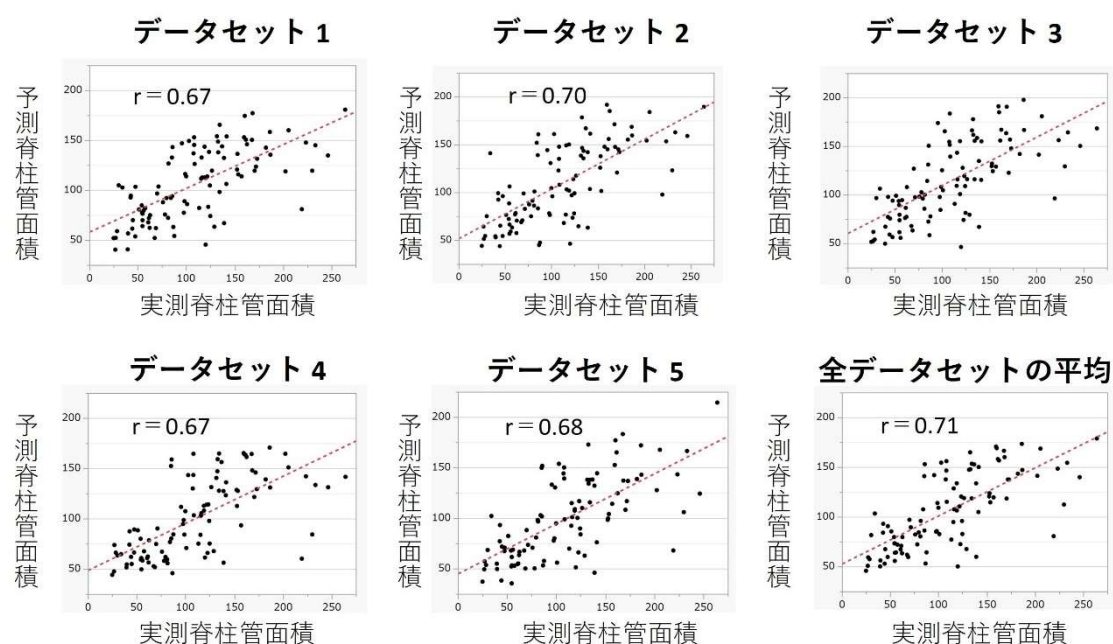


Figure 19. Annotation 2 に関するマルチタスク学習での外部検証における脊柱管面積の実測値と予測値 (r ; 相関係数)

Annotation 1 の追加外部検証では、5 つの学習済み CNN モデルの AUC は 0.85～0.91、精度は 77～87%であり、予測値の平均では AUC 0.90、精度 84%であった (Figure 20, Table 7)。

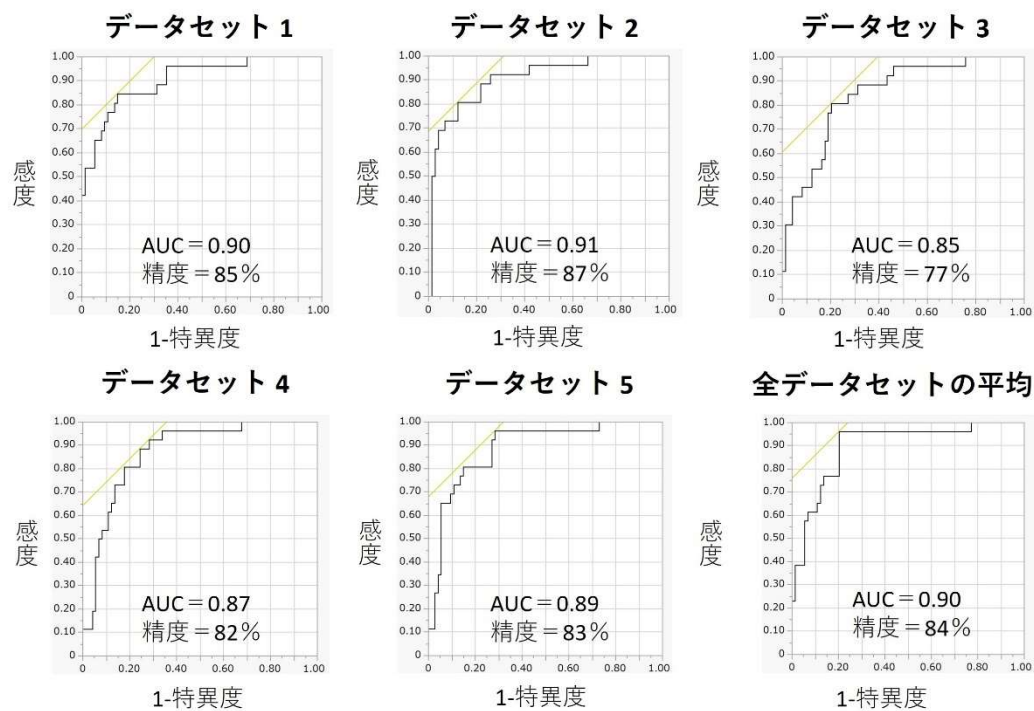


Figure 20. Annotation 1 におけるマルチタスク学習での追加外部検証結果

Table 7. マルチタスク学習での追加外部検証における手術レベルの予測性能に関する統計的指標

追加外部検証	感度	特異度	PPV	NPV	精度	PLR	NLR
データセット 1	0.67	0.94	0.85	0.85	85%	11.33	0.35
データセット 2	0.84	0.88	0.62	0.96	87%	6.82	0.18
データセット 3	0.80	0.77	0.15	0.97	77%	3.46	0.26
データセット 4	0.63	0.90	0.73	0.85	82%	6.33	0.41
データセット 5	0.66	0.90	0.73	0.87	83%	6.65	0.38
全データセット	0.62	0.92	0.73	0.87	84%	7.59	0.42

Annotation 2 については、5 つの学習済み CNN モデルで相関係数は 0.49～0.63 の範囲にあり、予測値の平均での相関係数は 0.58 であった (Figure 21)。

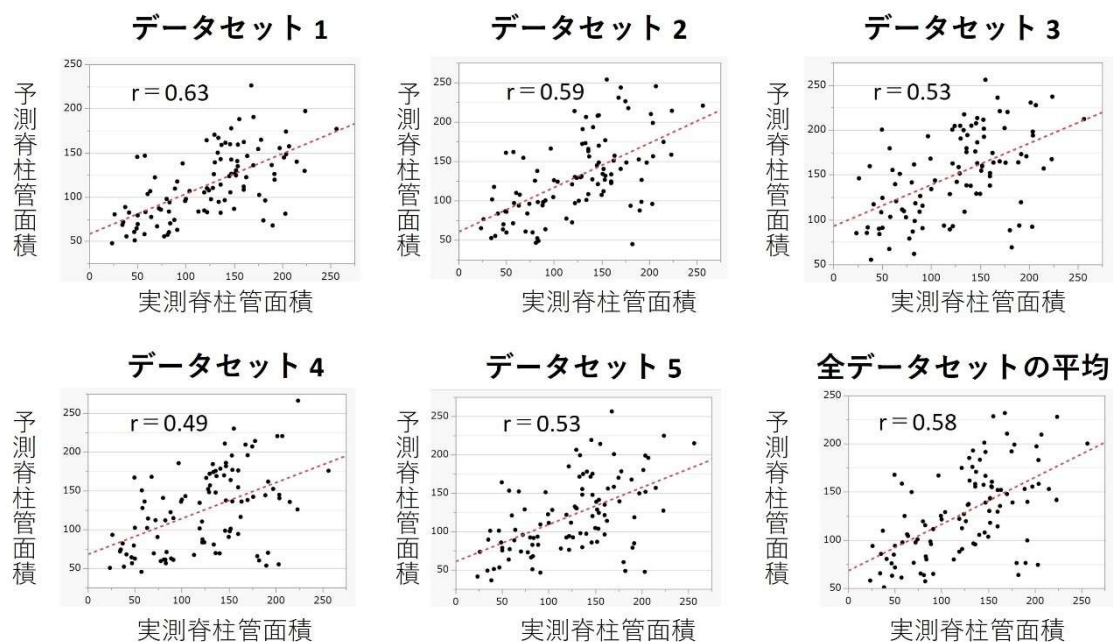


Figure 21. Annotation 2 に関するマルチタスク学習での追加外部検証における脊柱管面積の実測値と予測値 (r ; 相関係数)

内部-外部クロス検証

外部検証データセット 100 枚と追加外部検証データ 100 枚の合計 200 枚を検証セットとし、内部検証データ 500 枚をトレーニングセットとして、学習・検証を行った。Annotation 1 では AUC は 0.89、感度は 0.78、特異度は 0.89、PPV は 0.77、NPV は 0.90、精度は 86%、PLR は 7.10、NLR は 0.25 であった

(Figure 22a)。アノテーション 2 では、相関係数は 0.60 であった (Figure 22b)。

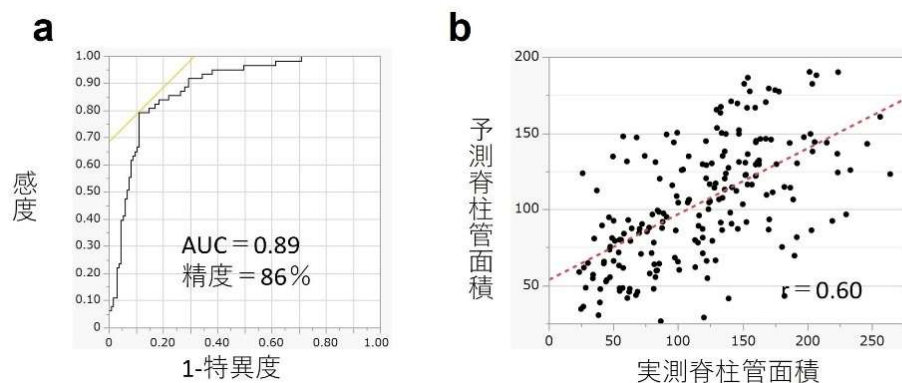


Figure 22. a) Annotation 1 における手術レベルの予測。

b) Annotation 2 における脊柱管面積の実測値と予測値 (r ; 相関係数)

考察

本研究では、腰椎 X 線写真から LSCS を検出する深層学習アルゴリズムの性能を評価することを目的とした。外部検証において、5 つの学習済みモデルによって算出された手術レベルの予測は、AUC が 0.90、精度 82% という結果だった。さらに、脊柱管の実際の面積と、学習済みモデルを用いた予測面積との相関係数は 0.69 であり、正の相関関係が示された。これらの結果は、この深層学習アルゴリズムが、腰椎単純 X 線写真から LSCS を診断することに有用である可能性を示唆している。LSCS の病因は、椎弓根が短いといった先天性因子の他に、椎間板や黄色靱帯、椎間関節の退行性変化と関連している (Saifuddin et al., 2000, Gibson et al., 2005, Melancia et al., 2014, Akar et al., 2019)。腰椎 X 線写真にはこれらの先天性因子や退行性因子に関連する特徴が含まれている可能性があり、深層学習は人間の目の識別能力を超えている可能性がある。実際、Grad-CAM 解析では、椎間関節と椎間板後方に特徴量が多いことが明らかになった。さらに、マルチタスク学習の結果は、Annotation 1 と Annotation 2 を分離した検証と比較しても同レベルであった。このことから、手術レベルか否かと脊柱管面積の 2 つの項目が、LSCS を診断するための共通の特徴を持っていることを裏付けていると考えられる。他の 2 施設のデータを用いた追加外部検証では、AUC、精度、相関係数は、Annotation 1, 2 でそれぞれ 0.89、84%、0.56、マルチタスク学習でそれぞれ 0.90、84%、0.58 であった。これらの結果は、外部検証と比較して若干精度が低下したものの、このアルゴリズムが様々な臨床現場において一般性と汎用性を持つことを示唆している。

既存の報告で、二値分類を用いて腰椎 X 線写真から LSCS を検出するために設計された CNN アルゴリズムに関する論文が 1 つだけある (Kim et al., 2022)。この研究では、外部検証において、AUC 0.89、精度 81.8% の予測性能が報告されている。我々の研究は前述の研究よりもサンプルサイズが小さい

(内部検証 12,442 画像に対して本研究では 500 画像) にもかかわらず、性能は同等であった。さらに、同じ施設のデータを使用した外部検証では AUC 0.90、精度 82% であり、他の 2 施設のデータを使用した追加外部検証では AUC 0.89、精度 84% とほぼ同等の結果だった。このように少ないサンプルサイズでも高い精度を維持できたのは、ROI 抽出を行ったことで特徴量の少ない領域を除外して椎間関節や椎間板のような特徴量の多い領域に焦点を当てることができたためと考えられる。特徴選択はモデルの複雑さを軽減することで学習効率を向上させる、深層学習における貴重な手法である (Lee et al., 2020)。我々の研究では必要最小限の ROI に焦点を当てること、特徴選択と同様の効果が得られた可能性が高い。今後は、深層学習によるセマンティックセグメンテーシ

ョンを活用し、Figure 6 に示すような ROI を抽出するアルゴリズムを開発する予定である。

本研究の内部-外部クロス検証において、Annotation 1 の AUC と精度はそれぞれ 0.90 と 83% であり、Annotation 2 の相関係数は 0.73 であった。これらの結果は、内部-外部クロス検証における性能が、内部検証で得られた平均的な性能に匹敵することを示している。このことは、外部検証データセットが内部検証データセットと類似したものではないことを示している。すなわち、学習済みモデルが外部検証データセットに偶然適合したために高い性能を維持できたのではないということであり、オーバーフィッティングの懸念が小さいことを示唆している。

外部検証データセットが開発したモデルに酷似している場合、その評価は、一般性よりも再現性を主に評価することになる (Justice et al., 1999)。開発セットと検証セットの類似性を確認することは、外部検証の解釈にとって極めて重要である (Steyerberg et al., 2016)。モデル開発時に外部検証を行うことが一般的に推奨されるが、データの異質性をテストするために内部-外部クロス検証を用いるのが有用である (Steyerberg et al., 2016)。モデル開発時にこのような評価を行うことで、予測性能の過大評価を軽減することができる。

この研究には、いくつかの限界がある。第一に、L5/S レベルを除外したことで、バイアスが生じる可能性がある点である。このレベルは狭窄がないことが多く、他の椎間レベルと比べて異なる形状をしているからである (Melcher et al., 2022, Park et al., 2010)。椎体の形状から、狭窄がなくても評価できる L5/S を含めると、モデルの性能が過大評価される可能性がある。第二に、Annotation 1 における手術レベルと非手術レベルの決定は、単一施設の外科医に依存した主観的なものであった点がある。軽度および中等度の狭窄を有するレベルを手術適応に含めるかどうかは、外科医の裁量による部分が大きく判断が異なる可能性がある。第三に、X線写真からの ROI 抽出は手作業で行ったという点がある。より広範な社会実装のためには、より正確に短時間で ROI を抽出するために、セマンティックセグメンテーションを用いた別のアルゴリズムが必要かもしれない。最後に、他の 2 施設のデータを用いて予測性能を評価したが、これらのモデルがそれ以外の施設のデータでも同様の性能を示すかどうかは不明であるという点である。したがって、複数の施設からのデータを用いた更なる検証が必要である。しかし、これらのモデルをファインチューニングのような技術を用いて再学習することにより、それぞれの X 線撮影装置に適応させることができる可能性がある。

このような限界はあるものの、本研究で開発された深層学習アルゴリズムは、MRI 設備のない医療施設や、整形外科医へのアクセスが限られている地方

で特に有用と考えられ、実用化されることが期待される。

総括および結論

- ・ ラット尾椎椎間板損傷モデルにおいて、REC と UPAL の混合液の椎間板内投与は主要な炎症性サイトカインである TNF- α および IL-6 産生、神経新生に重要な役割を持つ TrkA 発現を抑制し、椎間板組織の変性も抑制した。さらに、侵害刺激に対する疼痛関連行動を減少させた。
- ・ REC と UPAL の混合液は、椎間板損傷後の炎症反応と、それに引き続く神経新生および椎間板変性を阻害することで、侵害刺激に対する疼痛関連行動を減少させた可能性が示唆された。
- ・ REC と UPAL の混合液の椎間板内投与は低侵襲で入院を必要としない方法であり、椎間板性疼痛の軽減だけでなく、組織変性の予防にも寄与する可能性がある画期的な新しい治療法となり得ることが期待される。
- ・ 腰椎単純 X 線写真の側面像から LSCS を検出する、CNN を利用した深層学習アルゴリズムを開発した。
- ・ 手術を要するレベルか否かの 2 値分類予測については、外部検証で AUC が 0.90、精度 82% という結果だった。さらに、脊柱管の実際の面積と予測面積との相関係数は 0.69 であり、正の相関関係が示された。
- ・ マルチタスク学習でも同等の結果が得られたことから、手術レベルの有無と脊柱管面積の 2 つの項目が、LSCS を診断するための共通の特徴を持っている可能性が高いことが示された。
- ・ 本研究で開発された深層学習アルゴリズムは、MRI 設備のない医療施設や、整形外科医へのアクセスが限られている地方で実用化されることで特に有用となることが期待される。

謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究院医学専攻機能再生医学講座整形外科学教室博士課程在学中に行った研究をまとめたものです。本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました整形外科学分野教授岩崎倫政先生に深謝いたします。

また本研究を行うにあたり、UPAL をご提供頂いた持田製薬株式会社ならびに REC をご提供頂いた PuREC 株式会社様に深い感謝の意を表します。

最後に、これまでの研究課程において直接のご指導を賜りました北海道大学病院整形外科特任教授の須藤英毅先生をはじめ、整形外科学分野の諸先生方、研究に関わっていただいた皆様に心よりの感謝を申し上げます。

利益相反

本研究において、開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Aggarwal R, Sounderajah V, Martin G, Ting DSW, Karthikesalingam A, King D, Ashrafian H and Darzi A (2021). "Diagnostic accuracy of deep learning in medical imaging: a systematic review and meta-analysis." *NPJ Digit Med* 4(1): 65.
- Akar E and Somay H (2019). "Comparative morphometric analysis of congenital and acquired lumbar spinal stenosis." *J Clin Neurosci* 68: 256-261.
- Alex K, Ilya S and Geoffrey EH (2017). "ImageNet classification with deep convolutional neural networks." *ACM*, 60, 6, 84–90.
- Aoki Y, Takahashi Y, Ohtori S, Moriya H and Takahashi K (2004). "Distribution and immunocytochemical characterization of dorsal root ganglion neurons innervating the lumbar intervertebral disc in rats: a review." *Life Sci* 74(21): 2627-2642.
- Baba R, Onodera T, Momma D, Matsuoka M, Hontani K, Elmorsy S, Endo K, Todoh M, Tadano S and Iwasaki N (2015). "A Novel Bone Marrow Stimulation Technique Augmented by Administration of Ultrapurified Alginate Gel Enhances Osteochondral Repair in a Rabbit Model." *Tissue Eng Part C Methods* 21(12): 1263-1273.
- Balagué F, Mannion AF, Pellisé F and Cedraschi C (2007). "Clinical update: low back pain." *Lancet* 369(9563): 726-728.
- Btsh J, Fischer MJM, Stott K and McNaughton PA (2013). "Mapping the binding site of TRPV1 on AKAP79: implications for inflammatory hyperalgesia." *J Neurosci* 33(21): 9184-9193.
- Buchner M, Neubauer E, Zahlten-Hinguranage A and Schiltenswolf M (2007). "The influence of the grade of chronicity on the outcome of multidisciplinary therapy for chronic low back pain." *Spine (Phila Pa 1976)* 32(26): 3060-3066.
- Buckwalter JA (1995). "Aging and degeneration of the human intervertebral disc." *Spine (Phila Pa 1976)* 20(11): 1307-1314.

Burke JG, Watson RW, McCormack D, Dowling FE, Walsh MG and Fitzpatrick JM (2002). "Intervertebral discs which cause low back pain secrete high levels of proinflammatory mediators." *J Bone Joint Surg Br* 84(2): 196-201.

Chahal J, Gómez-Aristizábal A, Shestopaloff K, Bhatt S, Chaboureaux A, Fazio A, Chisholm J, Weston A, Chiovitti J, Keating A, et al. (2019). "Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell Treatment in Patients with Osteoarthritis Results in Overall Improvement in Pain and Symptoms and Reduces Synovial Inflammation." *Stem Cells Transl Med* 8(8): 746-757.

Chen M, Carass A, Oh J, Nair G, Pham DL, Reich DS and Prince JL (2013). "Automatic magnetic resonance spinal cord segmentation with topology constraints for variable fields of view." *Neuroimage* 83: 1051-1062.

Chou R, Qaseem A, Snow V, Casey D, Cross JT, Shekelle P, Owens DK, Physicians CEASotACo, Physicians Aco and Panel APSLBPG (2007). "Diagnosis and treatment of low back pain: a joint clinical practice guideline from the American College of Physicians and the American Pain Society." *Ann Intern Med* 147(7): 478-491.

de Schepper EI, Overvest GM, Suri P, Peul WC, Oei EH, Koes BW, Bierma-Zeinstra SM and Luijsterburg PA (2013). "Diagnosis of lumbar spinal stenosis: an updated systematic review of the accuracy of diagnostic tests." *Spine (Phila Pa 1976)* 38(8): E469-481.

Djurasovic M, Glassman SD, Carreon LY and Dimar JR (2010). "Contemporary management of symptomatic lumbar spinal stenosis." *Orthop Clin North Am* 41(2): 183-191.

Errico TJ, Gatchel RJ, Schofferman J, Benzel EC, Faciszewski T, Eskay-Auerbach M and Wang JC (2004). "A fair and balanced view of spine fusion surgery." *Spine J* 4(5 Suppl): S129-138.

Fatoye F, Gebrye T and Odeyemi I (2019). "Real-world incidence and prevalence of low back pain using routinely collected data." *Rheumatol Int* 39(4): 619-626.

Freemont AJ, Watkins A, Le Maitre C, Baird P, Jeziorska M, Knight MT, Ross ER, O'Brien JP and Hoyland JA (2002). "Nerve growth factor expression and innervation of the painful intervertebral disc." *J Pathol* 197(3): 286-292.

Frith JE, Cameron AR, Menzies DJ, Ghosh P, Whitehead DL, Gronthos S, Zannettino AC and Cooper-White JJ (2013). "An injectable hydrogel incorporating mesenchymal precursor cells and pentosan polysulphate for intervertebral disc regeneration." *Biomaterials* 34(37): 9430-9440.

Gibson JN and Waddell G (2005). "Surgery for degenerative lumbar spondylosis." *Cochrane Database Syst Rev* 2005(4): CD001352.

Harada S, Mabuchi Y, Kohyama J, Shimojo D, Suzuki S, Kawamura Y, Araki D, Suyama T, Kajikawa M, Akazawa C, et al. (2021). "FZD5 regulates cellular senescence in human mesenchymal stem/stromal cells." *Stem Cells* 39(3): 318-330.

Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, Niibe K, Araki D, Suzuki S, Okano H and Matsuzaki Y (2012). "Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- α ." *Nat Protoc* 7(12): 2103-2111.

Hoy D, March L, Brooks P, Blyth F, Woolf A, Bain C, Williams G, Smith E, Vos T, Barendregt J, et al. (2014). "The global burden of low back pain: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study." *Ann Rheum Dis* 73(6): 968-974.

Justice AC, Covinsky KE and Berlin JA (1999). "Assessing the generalizability of prognostic information." *Ann Intern Med* 130(6): 515-524.

Kim T, Kim YG, Park S, Lee JK, Lee CH, Hyun SJ, Kim CH, Kim KJ and Chung CK (2022). "Diagnostic triage in patients with central lumbar spinal stenosis using a deep learning system of radiographs." *J Neurosurg Spine*: 1-8.

Kingma DP and Ba J (2015). "Adam: a method for stochastic optimization." *Proceedings of the 3rd International Conference on Learning Representations, ICLR 2015; May 2015; San Diego, CA, USA.*

Kraychete DC, Sakata RK, Issy AM, Bacellar O, Santos-Jesus R and Carvalho EM (2010). "Serum cytokine levels in patients with chronic low back pain due to herniated disc: analytical cross-sectional study." *Sao Paulo Med J* 128(5): 259-262.

Lai A, Moon A, Purmessur D, Skovrlj B, Laudier DM, Winkelstein BA, Cho SK, Hecht AC and Iatridis JC (2016). "Annular puncture with tumor necrosis factor-alpha

injection enhances painful behavior with disc degeneration in vivo." *Spine J* 16(3): 420-431.

Lai A, Moon A, Purmessur D, Skovrlj B, Winkelstein BA, Cho SK, Hecht AC and Iatridis JC (2015). "Assessment of functional and behavioral changes sensitive to painful disc degeneration." *J Orthop Res* 33(5): 755-764.

Laiwalla AN, Ratnaparkhi A, Zarrin D, Cook K, Li I, Wilson B, Florence TJ, Yoo B, Salehi B, Gaonkar B, et al. (2023). "Lumbar Spinal Canal Segmentation in Cases with Lumbar Stenosis Using Deep-U-Net Ensembles." *World Neurosurg* 178: e135-e140.

Lee CH, Rodeo SA, Fortier LA, Lu C, Erisken C and Mao JJ (2014). "Protein-releasing polymeric scaffolds induce fibrochondrocytic differentiation of endogenous cells for knee meniscus regeneration in sheep." *Sci Transl Med* 6(266): 266ra171.

Lee GW, Shin H and Chang MC (2022). "Deep learning algorithm to evaluate cervical spondylotic myelopathy using lateral cervical spine radiograph." *BMC Neurol* 22(1): 147.

Lee SH, Han P, Hales RK, Voong KR, Noro K, Sugiyama S, Haller JW, McNutt TR and Lee J (2020). "Multi-view radiomics and dosiomics analysis with machine learning for predicting acute-phase weight loss in lung cancer patients treated with radiotherapy." *Phys Med Biol* 65(19): 195015.

Li J, Shao Q, Zhu X and Sun G (2020). "Efficacy of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of knee osteoarthritis and their effects on the expression of serum TNF- α and IL-6." *J Musculoskeletal Neuronal Interact.* 20(1): 128–135.

Li LY, Wu XL, Roman RJ, Fan F, Qiu CS and Chen BH (2018). "Diffusion-weighted 7.0T Magnetic Resonance Imaging in Assessment of Intervertebral Disc Degeneration in Rats." *Chin Med J (Engl)*. Jan 5;131(1):63-68.

Liu Y, Wei J, Zhao Y, Zhang Y, Han Y, Chen B, Cheng K, Jia J, Nie L and Cheng L (2017). "Follistatin-like protein 1 promotes inflammatory reactions in nucleus pulposus cells by interacting with the MAPK and NF κ B signaling pathways." *Oncotarget* 8(26): 43023-43034.

Lotz JC and Ulrich JA (2006). "Innervation, inflammation, and hypermobility may characterize pathologic disc degeneration: review of animal model data." *J Bone Joint Surg Am* 88 Suppl 2: 76-82.

Mabuchi Y and Matsuzaki Y (2016). "Prospective isolation of resident adult human mesenchymal stem cell population from multiple organs." *Int J Hematol* 103(2): 138-144.

Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S, Niibe K, Suzuki S, Renault-Mihara F, Houlihan DD, Akazawa C, Okano H and Matsuzaki Y (2013). "LNGFR(+)THY-1(+)VCAM-1(hi+) cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells." *Stem Cell Reports* 1(2): 152-165.

Maki S, Furuya T, Horikoshi T, Yokota H, Mori Y, Ota J, Kawasaki Y, Miyamoto T, Norimoto M, Okimatsu S, et al. (2020). "A Deep Convolutional Neural Network With Performance Comparable to Radiologists for Differentiating Between Spinal Schwannoma and Meningioma." *Spine (Phila Pa 1976)* 45(10): 694-700.

McDonald RJ, Schwartz KM, Eckel LJ, Diehn FE, Hunt CH, Bartholmai BJ, Erickson BJ and Kallmes DF (2015). "The effects of changes in utilization and technological advancements of cross-sectional imaging on radiologist workload." *Acad Radiol* 22(9): 1191-1198.

Melancia JL, Francisco AF and Antunes JL (2014). "Spinal stenosis." *Handb Clin Neurol* 119: 541-549.

Melcher C, Paulus AC, Roßbach BP, Gülecüyüz MF, Birkenmaier C, Schulze-Pellengahr CV, Teske W and Wegener B (2022). "Lumbar spinal stenosis - surgical outcome and the odds of revision-surgery: Is it all due to the surgeon?" *Technol Health Care* 30(6): 1423-1434.

Minamide A, Yoshida M and Maio K (2013). "The natural clinical course of lumbar spinal stenosis: a longitudinal cohort study over a minimum of 10 years." *J Orthop Sci. Sep*;18(5):693-8.

Miyagi M, Ishikawa T, Kamoda H, Suzuki M, Murakami K, Shibayama M, Orita S, Eguchi Y, Arai G, Sakuma Y, et al. (2012). "ISSLS prize winner: disc dynamic compression in rats produces long-lasting increases in inflammatory mediators in discs

and induces long-lasting nerve injury and regeneration of the afferent fibers innervating discs: a pathomechanism for chronic discogenic low back pain." *Spine (Phila Pa 1976)* 37(21): 1810-1818.

Mesoblast Phase 3 Trial Shows That a Single Injection of Rexlemestrocel-L + Hyaluronic Acid Carrier Results in at Least Two Years of Pain Reduction With Opioid Sparing Activity in Patients With Chronic Low Back Pain Due to Degenerative Disc Disease. Mesoblast Limited. 2021. <https://www.globenewswire.com/news-release/2021/02/10/2173646/0/en/Mesoblast-Phase-3-Trial-Shows-That-a-Single-Injection-of-Rexlemestrocel-L-Hyaluronic-Acid-Carrier-Results-in-at-Least-Two-Years-of-Pain-Reduction-With-Opioid-Sparing-Activity-in-Pa.html> (2024 年 11 月 16 日参照).

Mohd Isa IL, Abbah SA, Kilcoyne M, Sakai D, Dockery P, Finn DP and Pandit A (2018). "Implantation of hyaluronic acid hydrogel prevents the pain phenotype in a rat model of intervertebral disc injury." *Sci Adv* 4(4): eaaq0597.

Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niiibe K, Hiratsu E, Suzuki S, Miyauchi-Hara C, Nagoshi N, Sunabori T, et al. (2009). "Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow." *J Exp Med* 206(11): 2483-2496.

Mosley GE, Evashwick-Rogler TW, Lai A and Iatridis JC (2017). "Looking beyond the intervertebral disc: the need for behavioral assays in models of discogenic pain." *Ann N Y Acad Sci* 1409(1): 51-66.

Mosley GE, Wang M, Nasser P, Lai A, Charen DA, Zhang B and Iatridis JC (2020). "Males and females exhibit distinct relationships between intervertebral disc degeneration and pain in a rat model." *Sci Rep* 10(1): 15120.

Noriega DC, Ardura F, Hernández-Ramajo R, Martín-Ferrero M, Sánchez-Lite I, Toribio B, Alberca M, García V, Moraleda JM, Sánchez A, et al. (2017). "Intervertebral Disc Repair by Allogeneic Mesenchymal Bone Marrow Cells: A Randomized Controlled Trial." *Transplantation* 101(8): 1945-1951.

Orozco L, Soler R, Morera C, Alberca M, Sánchez A and García-Sancho J (2011). "Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study." *Transplantation* 92(7): 822-828.

Park DK, An HS, Lurie JD, Zhao W, Tosteson A, Tosteson TD, Herkowitz H, Errico T and Weinstein JN (2010). "Does multilevel lumbar stenosis lead to poorer outcomes?: a subanalysis of the Spine Patient Outcomes Research Trial (SPORT) lumbar stenosis study." *Spine (Phila Pa 1976)* 35(4): 439-446.

Patel TD, Jackman A, Rice FL, Kucera J and Snider WD (2000). "Development of sensory neurons in the absence of NGF/TrkA signaling in vivo." *Neuron* 25(2): 345-357.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* 284(5411): 143-147.

Ramspek CL, Jager KJ, Dekker FW, Zoccali C and van Diepen M (2021). "External validation of prognostic models: what, why, how, when and where?" *Clin Kidney J* 14(1): 49-58.

Rutges JP, Duit RA, Kummer JA, Bekkers JE, Oner FC, Castelein RM, Dhert WJ and Creemers LB (2013). "A validated new histological classification for intervertebral disc degeneration." *Osteoarthritis Cartilage* 21(12): 2039-2047.

Saifuddin A (2000). "The imaging of lumbar spinal stenosis." *Clin Radiol* 55(8): 581-594.

Sengupta, P (2012). "The laboratory rat: relating its age with human's." *Int J Prev Med.* 4, 624-630.

Steyerberg EW and Harrell FE (2016). "Prediction models need appropriate internal, internal-external, and external validation." *J Clin Epidemiol* 69: 245-247.

Sudo H and Minami A (2010). "Regulation of apoptosis in nucleus pulposus cells by optimized exogenous Bcl-2 overexpression." *J Orthop Res* 28(12): 1608-1613.

Sudo H and Minami A (2011). "Caspase 3 as a therapeutic target for regulation of intervertebral disc degeneration in rabbits." *Arthritis Rheum* 63(6): 1648-1657.

Tamai K, Terai H, Hoshino M, Tabuchi H, Kato M, Toyoda H, Suzuki A, Takahashi S, Yabu A, Sawada Y, et al. (2023). "Deep Learning Algorithm for Identifying Cervical

Cord Compression Due to Degenerative Canal Stenosis on Radiography." *Spine (Phila Pa 1976)* 48(8): 519-525.

Tsujimoto T, Sudo H, Todoh M, Yamada K, Iwasaki K, Ohnishi T, Hirohama N, Nonoyama T, Ukeba D, Ura K, et al. (2018). "An acellular bioresorbable ultra-purified alginate gel promotes intervertebral disc repair: A preclinical proof-of-concept study." *EBioMedicine* 37: 521-534.

Ukeba D, Sudo H, Tsujimoto T, Ura K, Yamada K and Iwasaki N (2020). "Bone marrow mesenchymal stem cells combined with ultra-purified alginate gel as a regenerative therapeutic strategy after discectomy for degenerated intervertebral discs." *EBioMedicine* 53: 102698.

Ukeba D, Yamada K, Suyama T, Lebl DR, Tsujimoto T, Nonoyama T, Sugino H, Iwasaki N, Watanabe M, Matsuzaki Y, et al. (2022). "Combination of ultra-purified stem cells with an in situ-forming bioresorbable gel enhances intervertebral disc regeneration." *EBioMedicine* 76: 103845.

Ura K, Yamada K, Tsujimoto T, Ukeba D, Iwasaki N and Sudo H (2021). "Ultra-purified alginate gel implantation decreases inflammatory cytokine levels, prevents intervertebral disc degeneration, and reduces acute pain after discectomy." *Sci Rep* 11(1): 638.

Verbiest H (1975). "Pathomorphologic aspects of developmental lumbar stenosis." *Orthop Clin North Am* 6(1): 177-196.

Weinstein JN, Lurie JD, Tosteson TD, Hanscom B, Tosteson AN, Blood EA, Birkmeyer NJ, Hilibrand AS, Herkowitz H, Cammisa FP, et al. (2007). "Surgical versus nonsurgical treatment for lumbar degenerative spondylolisthesis." *N Engl J Med* 356(22): 2257-2270.

Woolf CJ, Allchorne A, Safieh-Garabedian B and Poole S (1997). "Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha." *Br J Pharmacol* 121(3): 417-424.

Wuertz K and Haglund L (2013). "Inflammatory mediators in intervertebral disk degeneration and discogenic pain." *Global Spine J* 3(3): 175-184.

Xia K, Zhu J, Hua J, Gong Z, Yu C, Zhou X, Wang J, Huang X, Yu W, Li L, et al. (2019). "Intradiscal Injection of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Nucleus Pulposus-Like Cell-Seeded Polymeric Microspheres Promotes Rat Disc Regeneration." *Stem Cells Int* 2019: 6806540.

Yamada K, Sudo H, Iwasaki K, Sasaki N, Higashi H, Kameda Y, Ito M, Takahata M, Abumi K, Minami A, et al. (2014). "Caspase 3 silencing inhibits biomechanical overload-induced intervertebral disk degeneration." *Am J Pathol* 184(3): 753-764.

Yamashita R, Nishio M, Do RKG and Togashi K (2018). "Convolutional neural networks: an overview and application in radiology." *Insights Imaging* 9(4): 611-629.

Ye Z, Yang Y, Li X, Cao D and Ouyang D (2019). "An Integrated Transfer Learning and Multitask Learning Approach for Pharmacokinetic Parameter Prediction." *Mol Pharm.* Feb 4;16(2):533-541.

Yoshikawa T, Ueda Y, Miyazaki K, Koizumi M and Takakura Y (2010). "Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation: a report of two case studies." *Spine (Phila Pa 1976)* 35(11): E475-480.

Zeng Y, Chen C, Liu W, Fu Q, Han Z, Li Y, Feng S, Li X, Qi C, Wu J, et al. (2015). "Injectable microcryogels reinforced alginate encapsulation of mesenchymal stromal cells for leak-proof delivery and alleviation of canine disc degeneration." *Biomaterials* 59: 53-65.

Zou J, Huss M, Abid A, Mohammadi P, Torkamani A and Telenti A (2019). "A primer on deep learning in genomics." *Nat Genet* 51(1): 12-18.