

学位論文（博士）

**Three-dimensional analysis of the characteristics of  
joint motion and gait pattern in a rodent model  
following spinal nerve ligation**

（ラット坐骨神経結紮モデルにおける三次元歩行  
解析）

氏名 瀬戸 隆之

所属 山口大学大学院医学系研究科

システム統御医学系専攻 整形外科学講座

令和3年10月

## 目 次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	1
3. 目的	2
4. 方法	2
(1) SNL モデル作成	2
(2)、(3) 触覚評価・三次元運動分析	3
(4) 統計分析	3
5. 結果	4
6. 考察	6
7. 結語	7
8. 謝辞	7
9. 参考文献	8

## 【要旨】

ラット坐骨神経結紮モデル (SNL) は最も一般的に神経障害性疼痛の実験に用いられるモデルラットであり、運動麻痺を生じないことでも知られている。神経障害性疼痛モデルの疼痛評価にはこれまでフォンフレイテスト (機械的アロディニア評価) と熱刺激回避テストが用いられてきた。しかしこれらのテストは臨床で用いられる神経学的検査とは全く異なる手法での評価である。神経障害性疼痛を有する患者では、両下肢の協調運動が乱れ、歩行時の下肢の動きに左右差を生じていることが多い。本研究において、私達はヒトと同様な疼痛行動や疼痛に伴う歩行障害などが実際には生じているのではないかと考え、三次元歩行解析を行って本モデルの関節の動きや歩行時の動態解析を行った。今回の解析にはキネマトレサーシステムを用いた。

機械的アロディニアに関する SNL の効果として術後 1 週間から 8 週間にわたり、回避行動閾値の  $47 \pm 6.1\%$  の低下を認めた。SNL ラットにおける股関節・膝関節・足関節のマーカークの矢状面の軌跡は歩行中に大きな変動を認めた。歩行中の不安定性を示す患側左股関節・膝関節の上下端の高低差は、SNL ラットでほうが有意に大きかった。歩行パターンを示す、両足同時接地時間は SNL ラットのほうが有意に長い結果であった。左右下肢の協調運動を評価するため、両下肢の歩行周期時間も計測した。歩行周期の左右差を示す左右比は、コントロール群のラットでは  $1.0 \pm 0.08$  と左右差がほぼないのに比較し、SNL ラットでは  $0.62 \pm 0.15$  と有意に左右下肢の歩行周期が異なることが示唆された。

フォンフレイテストや熱刺激回避テストは臨床現場で使用されることのない疼痛機能評価であるが、こうした新しい三次元歩行動態解析技術を用いることができれば、神経障害性疼痛患者における疼痛行動も、定量的かつ数値化して示すことが可能になる可能性について示すことができた。従来の神経障害性疼痛モデルにおける、疼痛機能評価に関する臨床と実験モデルの大きなかけ離れについての問題点を解決し、将来的にはヒトでの機能評価にも応用できる新しい三次元歩行動態解析技術について報告し、実際のラット坐骨神経結紮モデルでのデータを示した。

## 【研究の背景】

脊髄神経結紮 (SNL) モデルは、神経因性疼痛に関わる様々な研究において使用されている<sup>1-4</sup>。動物実験モデルにおいて、疼痛そのものを直接測定することはできない。疼痛強度は疼痛行動で評価することになる。すなわち、疼痛回避行動にて疼痛そのものを評価することになる<sup>5-8</sup>。SNL モデルの疼痛強度を評価するために、フォンフレイテストや熱刺激回避テストを用いて疼痛分析を行ってきたが、臨床現場で用いる神経学的検査とは全く異なるものである<sup>5</sup>。併せて、フォンフレイテストは再検査信頼性、検者間信頼性にいくらか問題があることも報告されている<sup>5, 9-14</sup>。

従来の疼痛評価では、SNL や脊髄損傷ラットでの左右後肢の協調性のアンバランスなどは評価できない<sup>15-23</sup>。疼痛研究における臨床前実験において、特に疼痛評価の方法論そのもの

の問題点が多く報告されている。というのも、動物実験は疼痛に関する多くの研究データの蓄積をもたらしたが、実際には臨床研究段階において、多くの新規薬剤の承認に失敗している事実がある。この大きな問題が、動物実験モデルにおいて、臨床に限りなく近い疼痛機能評価を新たに開発する必要性の根拠となっている<sup>5,16,17</sup>。

## 【目的】

坐骨神経痛を有する患者は、患側を引きずるようにして歩くため、両下肢の協調運動が乱れている。こうした特異的な歩行パターンが、SNL ラットでも観察されると考えた。本研究で私たちは患者に類似した疼痛行動を SNL モデルにおいても明らかにしようとした。2次元キャットウォークシステムや三次元トレッドミル分析システムを使っていくつかのアプローチがこれまで報告されている。以前の歩行解析は足跡の面積・最大強度での最大接地・立脚期・遊脚期・単脚支持などの指標で、コントロール群と SNL 群の比較で有意な違いを示していた<sup>12, 13</sup>。しかし、SNL モデルにおける疼痛行動を評価できる客観的パラメーターはこれまで報告されていない。

過去の論文において、従来の評価方法では SNL モデルでの運動障害を同定することはできなかったが、ごくわずかな歩行パターンの変化も 3D 歩行解析では同定可能ではないかと考え、本研究を行った<sup>4</sup>。私たちは、SNL モデルを用いた神経障害性疼痛研究において、一般的に用いられることになるであろう標準的な 3D パラメーターを同定しようと考えた。本研究では、各関節の動揺性の程度を各関節の頂点の高さから底辺の高さを引くことで数値で示した。SNL モデルでのステップ長・ストライド長・両足接地時間・歩行周期の左右後肢などでの歩行パターンの変化を同定することに成功した。これらの新しくかつ客観的なパラメーターは、臨床にも容易に応用可能で、坐骨神経障害を有する患者の歩行分析などの新たな評価システムとなり得ると考えている。

## 【方法】

6週齢の雄 SD ラット（体重 200 g）がこの研究では使われた（千代田開発 東京 日本）。動物実験は山口大学医学部の動物実験ガイドラインに沿って行われ、動物実験；生体実験報告（ARRIVE）ガイドラインに従った。プロトコールは山口大学動物実験委員会で承認された（15-044）。動物は水と食べ物を自由に摂取でき、温度管理された部屋で飼育された。動物は、午後 8 時から午前 8 時までの明暗逆環境で維持された<sup>7</sup>。

苦痛を最小限にする試みがなされた。すべてのラットが術直前と術翌日に鎮痛剤（カルプロフェン、5 mg/kg、を皮下注）を投与された。それぞれのラットが目覚めるまで監視をされ、リカバリー室で自由に動くようにされた。実験の最中、動物は 1 匹で飼育された。安楽死の方法は腹腔内にペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射の過量投与（>100 mg/kg）で施行した。

### （1）SNL モデル作成

L5 SNL (N=10 ラット) 処置はキムとチャンにより考案された方法に沿って施行した (図7) <sup>4,5</sup>。左 L4 から S2 レベルまで傍脊柱筋を棘突起から分け、L4-L5 脊髄神経を露出させるために左 L6 横突起を除去した。左 L5 脊髄神経を分離し、後根神経節の遠位に 6-0 絹糸をきつく結んだ (図7)。皮切は 4-0 ナイロンで縫合した。コントロール群のラット (N=10) は同一の手技で脊髄神経は結紮せずに準備した。足趾が底屈、内反したことにより判定される脊髄神経損傷のあるラットは研究から除いた <sup>4, 5</sup>。

## (2) 触覚評価

ラットは環境に 1 週間慣れさせた後に実験に使用した。機械による回避行動閾値が減少することを知覚過敏と判断した <sup>2, 6, 8</sup>。行動テストは手術の前日に施行され、術後定期的に施行した。ラットは、アクリルガラスの囲いの中で 15 分間環境順応するようにした。足底の触覚アロディニアは自動化されたフォンフレイ足底知覚計 (ウゴバジル社、コメリオ、イタリア) を用いて評価した <sup>7</sup>。まず検知閾値以下で力を加え、20 秒開けて 1g から 50g まで増やしていった <sup>7, 8</sup>。機械刺激に対する回避反応は、足を持ち上げる程度で評価した。機械的刺激は 5 分間おきに 3 回繰り返した。機械的アロディニアを決めるために 3 回のテストの平均値を使用した。

## (3) 三次元運動分析

後肢の動きはキネマトレーサーシステム (キッセイコムテック社) を用いて評価した (図 8 A-D) <sup>16, 17</sup>。セボフルレンによる浅麻酔下で色付きマーカーを腸骨、股関節、膝関節、足関節と第 5 趾 MP 関節の皮膚に糊を用いて以前に報告された方法で貼り付けた (図 8 C) <sup>16, 17</sup>。4 つのカメラ (ポイントグレイ社、リッチモンド、カナダ) をマーカー撮影のために用いた (図 8 B)。それぞれのセッションの前に一定のサイズ (5 × 20 × 10 cm) の立方体を記録することで正確な座標を計算した。実験の 2 週間前にラットに 12m/min で 20 分間トレッドミルを歩く訓練をさせた。コントロール群 (10 匹) と SNL 群 (10 匹) を手術前日と術後 7 日、28 日に評価した。ラットがうまく歩くためにそれぞれのセッションは数回の試行を行った。それぞれのラットで合計 10 ステップのデータが得られた。XYZ 軸での関節のポジションは自動的に計算された。接地と離地のタイミングはキネマトレーサーの中に手作業で入力された (図 8D) <sup>16, 17</sup>。私たちは、SNL ラットでの術前と術後の股関節、膝関節、足関節の軌跡を比較した。ストライド長は同一肢の接地の間の距離として定義される。ステップ長は片方の足と反対側の足の接地の間の距離として定義される (図 S1 と図 5)。私たちはコントロール群と SNL 群で平均ストライド長・ステップ長、両下肢接地時間、歩行周期の時間についても比較した <sup>16, 17</sup>。左右それぞれの下肢の 1 周期の下肢運動時間を 1 とし、左右の下肢回転周期の割合変化を評価した。左右の歩行周期の時間の比として R 値を計算した <sup>15-17</sup>。左右差のない場合、R 値は 1 とした。

#### (4) 統計分析

データは平均値の標準誤差で示され、スタットフレックス Ver7を用いて分析された

(Artec社、大阪、日本；<http://www.Starflex.net/>)。フォンフレイテスト分析(図1)における各ポイントでの左右の足の回避閾値時間の比較はt-testを使って行った。三次元歩行分析(図2-5)で、SNLとコントロール群の結果の比較はマンホイットニーテストで施行された。一方でSNLラットでの左右の値の比較は対応のあるt検定で行われた。P値0.05未満で統計的に有意とした。

#### 【結果】

##### フォンフレイテスト(機械的アロディニア評価)

SNLモデルでは、術後1週間から8週間の間、右後肢に比べて患側である左後肢の疼痛回避行動閾値は $47 \pm 6.1\%$ (95%信頼区間 43%–51%)減少していた(図1)。1–8週間の間、回避行動閾値の左右の後肢での有意な違いを認めた( $P < 0.01$ )。

##### 三次元動作分析

SNLラットの股関節・膝関節・足関節マーカーの軌跡は術前および左SNL処置後の1週・2週・4週に分析した。図4から図6の中で1週と4週のSNLとコントロール群のデータを示す。SNL処置側の各関節は右側の関節と比べて動揺性を認めた。私たちは、各関節のマーカーの頂点から最下点の高さを引くことで歩行中の各関節の矢状面の変動を計測した。軌道は歩行の遊脚期・立脚期の垂直方向の関節の動きを示している。追加のS1図で遊脚期・立脚期を模式的に表記している。

##### 矢状面の股関節の軌跡

コントロール群ラットの股関節の動き(図2の右上図表の青線)は立脚期に水平方向に直線的に動き、遊脚期に垂直方向にわずかに弧を描くように動き、前方に動く動きをした。コントロール群ラットの立脚期の股関節の軌跡は平らな線状であり、遊脚期の後半の80%も平らな線状であった(図2)。しかし、SNL処置後1週間の左下肢の股関節の軌跡は、遊脚期に上昇する動きの後に低下して動く傾向を示し、(図2の左上図表の赤線)左股関節の不安定性を示していた。SNL処置後4週で遊脚期の下方に動く傾向は減少した。SNLラットの歩行中の左股関節の変動を示す左股関節のマーカーの頂点から最下点を引いた高さは術後1週間で $1.47 \pm 0.33$  cmであり、術後4週間で $1.30 \pm 0.25$  cmであった。コントロール群のラットの左下肢では各々1.47対1.0 cm、1.30対1.0 cmであり、両方の変動量で有意差を認めた( $P < 0.01$ )。

##### 矢状面の膝関節の軌跡

コントロール群ラットの膝関節の動き(図3の右上図表の青線)は股関節の動きと似ていた。

しかし、膝のマーカ―は遊脚期に平らな線状の動きではなかった。SNL ラットにおける遊脚期のより下方への動きは（図3の左図表の赤線）左膝の不安定性を示す。SNL ラットの歩行中の変動を示す膝関節マーカ―の頂点から最下点を引いた高さは術後1週で  $1.80 \pm 0.32$  cmであり、術後4週で  $1.88 \pm 0.45$  cmであり、コントロール群の左後肢では各々  $1.80$  対  $1.20$  cmと  $1.88$  対  $1.28$  cmであり、有意差を認めた（図3）。両方の変動量で有意差を認めた（ $P < 0.05$ ）。

### 矢状断の足関節の軌跡

コントロールラットの足関節は（図4の右上図表の青線）立脚期から遊脚期に徐々に上昇する。一方でSNLラットの足関節は遊脚期に鋭く上昇し下降する。（図4の左図表の赤線）SNLラットの歩行中の足関節マーカ―の頂点から最下点を引いた高さはコントロールラットの頂点から最下点を引いた高さと同じであった。しかし、遊脚期の前半2/3の間の上昇角度はコントロールラットの上昇角度よりも少なかった。SNLラットは遊脚期後半1/3で継続してコントロールラットと比較してより急速に足関節が上昇した。これらの軌跡のパターンはSNLラットに特徴的な下肢の動きと考えられた（図4）。

### SNLラット歩行の特徴

SNLラット歩行の特徴をコントロール群ラットと術後1週・4週時点で比較して分析した。踵のストライド長（図S1）はSNLラットの左右で違いがなかった。術後1週で左後肢、 $12.8 \pm 0.9$  cm、右後肢、 $12.8 \pm 0.3$  cm、術後4週で左後肢、 $12.7 \pm 0.7$  cm、右後肢、 $12.9 \pm 0.2$  cmであった（図5）。

踵のステップ長（図S1）はSNLラットにおいて1週、4週ともに有意に右下肢に比べて患側で長かった（ $P < 0.05$ ）（図5）。ステップ長は術後1週で左後肢  $8.1 \pm 0.9$  cm、右後肢  $4.7 \pm 0.3$  cm、術後4週で左後肢  $8.2 \pm 0.7$  cm、右後肢  $4.6 \pm 0.2$  cmであった。

両足接地時間は立脚期での両足が重なった時間である。両足接地時間はコントロール群と比べてSNLラットで有意に長かった。術後1週後ではSNLで  $2.0 \pm 0.25$  秒、コントロール群で  $1.0 \pm 0.26$  秒であった（ $P < 0.05$ ）。術後4週後ではSNLで  $1.9 \pm 0.15$  秒、コントロール群で  $1.03 \pm 0.15$  秒であった（ $P < 0.01$ ）（図5）。

### SNLラットの歩行パターンの特徴

左右下肢の協調性を評価するためにそれぞれの下肢の歩行周期の時間を解析した<sup>16,17</sup>。

R値は、左右の環状歩行時間の比である。歩行周期の中でR値はコントロール群で  $1.0 \pm 0.08$ 、術後1週のSNLで  $0.66 \pm 0.20$  であり、術後4週で  $0.62 \pm 0.15$  であった（図6）。

## 【考察】

1992年の報告以来、神経障害性疼痛を有するSNLラットは神経痛のメカニズムに関する様々な研究や新たな鎮痛剤の開発時の一般的なモデルとして広く用いられてきた<sup>1-4</sup>。SNLモデルを使う研究者らは、SNLラットは運動障害を生じないと判断し、アロデニアを評価するためにフォンフレイテストのようなシンプルな反射テストにこれまで頼ってきた経緯がある。しかし足回避テストはフィラメントの刺激によっておこるというよりは、単純な脊髄反射を検出している可能性が高く、本当に疼痛を評価しているのかは疑問視されてきた<sup>2, 3, 5, 8, 9, 12</sup>。一方、詳細な歩行分析は臨床的での評価法と合致しており、その正確な評価には適していると考えられる。

三次元歩行解析は神経障害性疼痛の重症度やSNLラットの歩行の特徴の変化を調べたりするのに有用な手段となりうると考えている<sup>11, 14-24</sup>。二次元キャットウォーク分析が動物の疼痛を評価するのに有用であり<sup>9, 10, 12, 13</sup>、これらの方法は比較的容易に評価できるとの報告がある<sup>13, 21</sup>。一方で、三次元歩行分析による定量評価は、位相の遅れ・対称性・不規則性・可動域評価を含む詳細な評価が可能であると報告されている<sup>16-18, 23, 24</sup>。左右下肢の対称性の評価はおそらく最も容易に識別できる方法である。正常ラットは左右対称性のある歩行様式を示す<sup>16, 17</sup>。歩行リズムとその他の詳細なパターンでの、わずかな行動変化をキネマトレーサーシステムによる3Dデータで明らかにすることができる<sup>16, 17</sup>。脊髄損傷後の治療において、両下肢の接地相のわずかな改善を明らかにした報告などがある<sup>15-17</sup>。

今回の研究において、SNLラットの三次元歩行解析を行い、新しいパラメーターを同定した。各関節の矢状面の軌跡と垂直方向の不安定性、踵のステップ長、両足接地時間、環状相について示した。三次元データにより歩行中のわずかな垂直方向の変動と各関節の特徴的な軌跡が定量化された。左股関節のマーカの頂点から最下点を引いた高さは術後1週で $1.47 \pm 0.33$  cmであり、術後4週で $1.30 \pm 0.25$  cmであった。コントロール群のラットの左後肢と比較すると、各々 $1.47$  cm対 $1.0$  cmと $1.3$  cm対 $1.0$  cmであり、両方の変動値は有意差を認めた。同様にSNLラットの左膝のマーカの値は術後1週で $1.80 \pm 0.32$  cmであり、術後4週で $1.88 \pm 0.45$  cmであり、 $1.80$  cm対 $1.2$  cmと $1.88$  cmと $1.28$  cmで有意差を認めた。これらのデータはSNLラットの歩行中の股関節と膝関節の変動を客観的に示すデータである。以前の論文では三次元歩行解析により、足趾と足関節の角度がSNLラットで減少したと報告されている<sup>25</sup>。しかし、神経障害性疼痛を有する患者での歩行の特徴と各関節の垂直方向の変動値のデータを関連付けた報告ははじめてである。

さらには、踵のステップ長と両足接地時間がSNLラットの右側に比較して患側で延長していることも示した。歩行周期のなかでR値もSNLラットで減少した。左右の環状の時間の比はSNLラットで $0.62 \pm 0.15$ であった。これらのデータはSNLラットの後肢の歩行様式がコントロール群のラットと比較して非対称で異なることを示している。2Dキャットウォークでステップ長と両下肢の接地時間について評価した報告はあるが<sup>9, 12</sup>、歩行周期(R値)の評価とその非対称性を示したのははじめてである<sup>17</sup>。



三次元運動歩行分析での正確なデータを集めることにはいくつかの制限がある。研究者はトレッドミルをスムーズに歩くようにラットを訓練し、マーカーをそれぞれの関節に正確に貼付し、実験の過程に載せる必要がある<sup>21</sup>。さらに三次元運動分析装置が高額であることも一般に普及する障壁となっており、関連する研究での使用が制限される可能性がある。しかし、今回はじめて臨床的に意義のある手法を用いて、SNL ラットのモデルを評価できることを示した。神経障害性疼痛評価におけるこの新しい分析システムは坐骨神経通や慢性疼痛を有する患者の新たな治療の発展に寄与しうる可能性があると考えている。

### 【結語】

本研究では、神経障害性疼痛を有する患者の神経症状評価とリンクした形で、SNL ラットモデルでの新たな定量的評価パラメーターを示した。SNL ラットの股関節と膝関節のマーカーの矢状面の軌道は歩行中の各関節での矢状面の大きな変動を示していた。歩行中の不安定性を示す関節高の差は、SNL ラットでは有意に大きい結果であった。両足接地時間でも SNL ラットで有意に延長していた。左右の歩行周期の比は SNL ラットで  $0.62 \pm 0.15$  であった。臨床的に意義のある新たな評価パラメーターは、疼痛研究の新たな一步を踏み出す上で、重要な評価法となる可能性が示唆された。

### 【謝辞】

本研究を進めるにあたり、山口大学大学院医学系研究科整形外科の鈴木秀典助教、坂井孝司教授、田口敏彦名誉教授には終始、適切な御指導・御鞭撻を頂きました。ここに心よりの感謝の意を示します。並びに本研究は疼痛行動の評価の部分で山口大学医学部神経生理学の石川 敏三の御助言を頂き、モデル作成において多大な貢献を頂きましたことを厚く御礼を申し上げます。またその他あるゆる面で御協力を頂きました山口大学大学院医学系研究科整形外科の先生方に深謝いたします。最後になりましたが私生活において医師として働きながら私をサポートし家庭を守ってくれた妻と2人の子供たちに感謝致します。

令和3年10月

瀬戸 隆之

## 参考文献

1. Cherng CH, Lee KC, Chien CC, Chou KY, Cheng YC, Hsin ST, et al. Baicalin ameliorates neuropathic pain by suppressing HDAC1 expression in the spinal cord of spinal nerve ligation rats. *J Formos Med Assoc.* 2019;113:513–20.
2. Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:284.
3. Hogan Q, Sapunar D, Ksenija MJ, McCallum JB. Detection of neuropathic pain in a rat model of peripheral nerve injury. *Anesthesiology.* 2004;101:476–87.
4. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain.* 1992;50:355–63.
5. Dolgin E. Animalgesic effects. *Nat Med.* 2010;16(11):1237–40.
6. Kreilkamp BAK, Lisanti L, Glenn GR, Wiesmann UC, Das K, Marson AG, et al. Comparison of manual and automated fiber quantification tractography in patients with temporal lobe epilepsy. *Neuroimage Clin.* 2019;24:102024.
7. Murakami T, Kanchiku T, Suzuki H, Imajo Y, Yoshida Y, Nomura H, et al. Anti-interleukin-6 receptor antibody reduces neuropathic pain following spinal cord injury in mice. *Exp Ther Med.* 2013;6:1194–98.
8. Pitcher GM, Ritchie J, Henry JL. Paw withdrawal threshold in the von Frey hair test is influenced by the surface on which the rat stands. *J Neurosci Methods.* 1999;87:185–93.
9. Bozkurt A, Deumens R, Scheffel J, O'Dey DM, Weis J, Joosten EA, et al. CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury. *J Neurosci Methods.* 2008;173:91–8.
10. Chen H, Du J, Zhang Y, Barnes K, Jia X. Establishing a reliable gait evaluation method for rodent studies. *J Neurosci Methods.* 2017;283:92–100.
11. Canu MH, Garnier C, Lepoutre FX, Falempin M. A 3D analysis of hindlimb motion during treadmill locomotion in rats after a 14-day episode of simulated microgravity. *Behav Brain Res.* 2005;157:309–21.
12. Chen YJ, Cheng FC, Sheu ML, Su HL, Chen CJ, Sheehan J, et al. Detection of subtle neurological alterations by the Catwalk XT gait analysis system. *J Neuroeng Rehabil.* 2014;11:62.
13. Chiang CY, Sheu ML, Cheng FC, Chen CJ, Su HL, Sheehan J, et al. Comprehensive analysis of neurobehavior associated with histomorphological alterations in a chronic constrictive nerve injury model through use of the CatWalk XT System. *J Neurosurg.* 2014;120:250–62.
14. Dallman MA, Ladle DR. Quantitative analysis of locomotor defects in neonatal mice

lacking proprioceptive feedback. *Physiol Behav.* 2013;120:97–105.

15.Hillen BK, Abbas JJ, Jung R. Accelerating locomotor recovery after incomplete spinal injury. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1279:164–74.

16.Kanchiku T, Kato Y, Suzuki H, Imajo Y, Yoshida Y, Moriya A, et al. Development of less invasive neuromuscular electrical stimulation model for motor therapy in rodents. *J Spinal Cord Med.* 2012;35:162–9.

17.Kanchiku T, Suzuki H, Imajo Y, Yoshida Y, Moriya A, Suetomi Y, et al. The efficacy of neuromuscular electrical stimulation with alternating currents in the kilohertz frequency to stimulate gait rhythm in rats following spinal cord injury. *Biomed Eng Online.* 2015;14:98.

18.Karakostas T, Hsiang S, Boger H, Middaugh L, Granholm AC. Three-dimensional rodent motion analysis and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Methods.* 2014;231:31–7.

19.Preisig DF, Kulic L, Krüger M, Wirth F, McAfoose J, Späni C, et al. High-speed video gait analysis reveals early and characteristic locomotor phenotypes in mouse models of neurodegenerative movement disorders. *Behav Brain Res.* 2016;311:340–53.

20.Ueno M, Yamashita T. Kinematic analyses reveal impaired locomotion following injury of the motor cortex in mice. *Exp Neurol.* 2011;230:280–90.

21.Wong J, Shah PK. 3D Kinematic gait analysis for preclinical studies in rodents. *J Vis Exp.* 2019;3:150.

22.Zorner B, Filli L, Starkey ML, Gonzenbach R, Kasper H, Rothlisberger M, et al. Profiling locomotor recovery: comprehensive quantification of impairments after CNS damage in rodents. *Nat Methods.* 2010;7:701–8.

23.Courtine G, Song B, Roy RR, Zhong H, Herrmann JE, Ao Y, et al. Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nat Med.* 2008;14:69–74.

24.Lablond H, L'Esperance M, Orsal D, Rossignol S. Treadmill locomotion in the intact and spinal mouse. *J Neurosci.* 2003;23:11411–19.

25.Wang T, Ito A, Aoyama T, Nakahara R, Nakahata A, Ji X, Zhang J, Kawai H, Kuroki H. *PLoS One.* 2018;13:e0208985.

## 図表説明

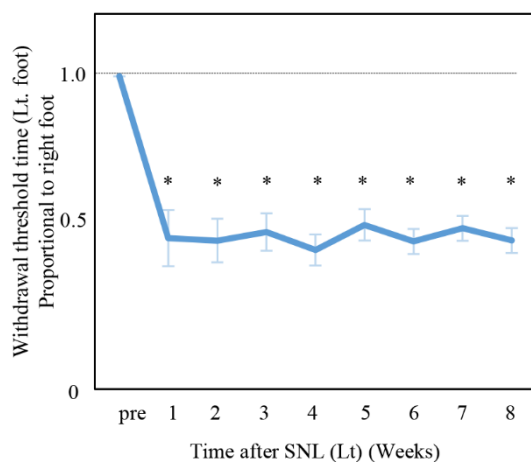


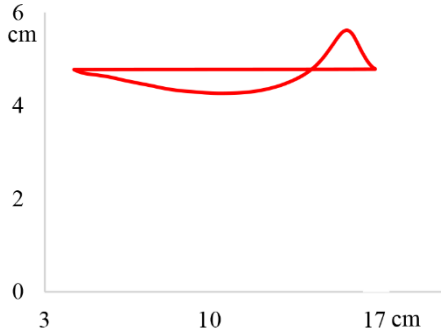
図 1. SNL ラットにおける右後肢に対する左後肢の回避行動閾値

SNLモデルでは、右後肢に比べて患側の左後肢の回避行動閾値は  $47 \pm 6.1\%$  (95%信頼区間 43%–51%) 減少であった (図 1)。1-8 週間の間、回避行動閾値の時間における左右の後肢の有意な違いを認めた ( $P < 0.01$ )。

**Sagittal trajectories: Hip joint**

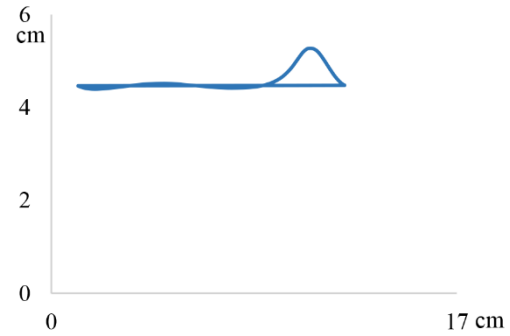
***Hip joint (SNL Left)***

1 week after OP

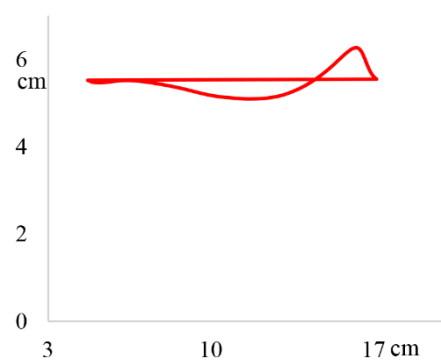


***Hip joint (Sham Left)***

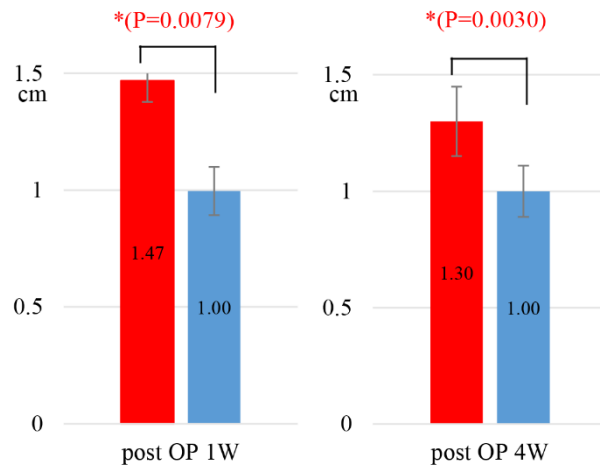
4 weeks after OP



4 weeks after OP



***Top minus bottom height (Left hip joint)***



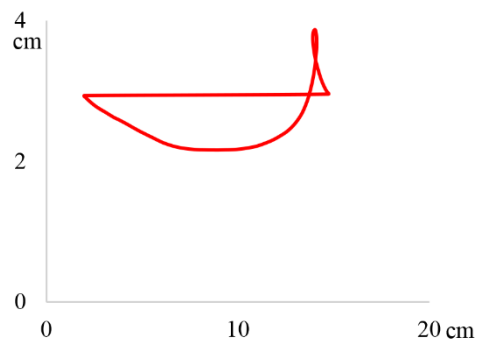
**図 2. 三次元歩行分析での左下肢の股関節の矢状面の軌跡**

SNLラットの歩行中の左股関節の変動を示す左股関節のマーカの頂点から最下点を引いた高さは術後1週間で  $1.47 \pm 0.33$  cmであり、術後4週間で  $1.30 \pm 0.25$  cmであった。コントロール群のラットの左下肢では各々1.47対1.0 cmと1.30対1.0 cmであり両方の変動量で有意差を認めた。OPは手術

### Sagittal trajectories: Knee joint

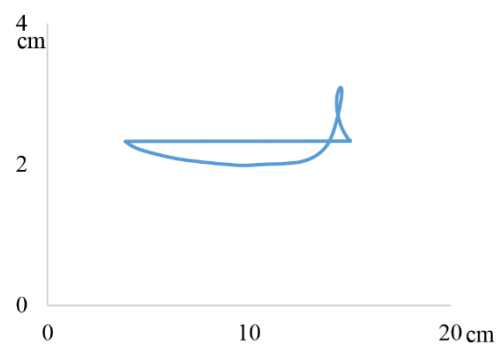
#### Knee joint (SNL Left)

1 week after OP

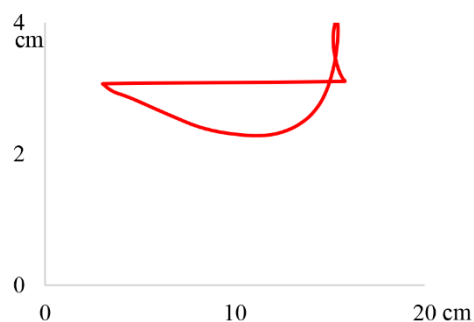


#### Knee joint (Sham Left)

4 weeks after OP



4 weeks after OP



#### Top minus bottom height (Left Knee joint)

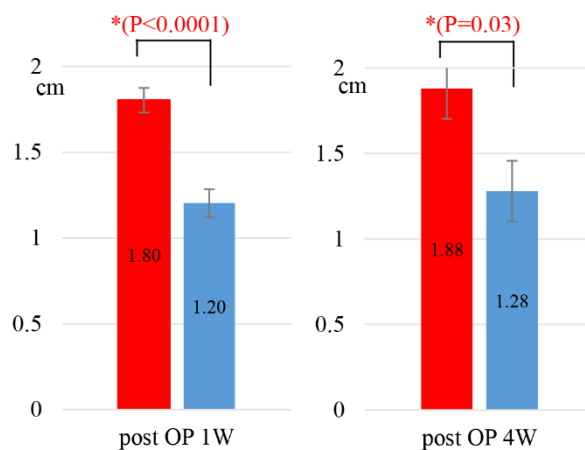


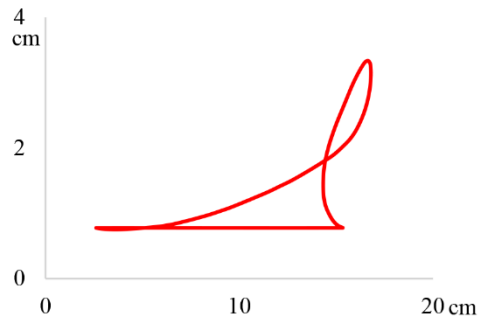
図3. 三次元歩行分析での左下肢の股関節の矢状面の軌跡

SNL ラットの歩行中の変動を示す膝関節マーカーの頂点から最下点を引いた高さは術後 1 週で  $1.80 \pm 0.32$  cm であり、術後 4 週で  $1.88 \pm 0.45$  cm であった。コントロール群の左後肢では各々 1.80 対 1.20 cm と 1.88 対 1.28 cm であり、有意差を認めた。術後 1 週で  $P < 0.0001$ ，術後 4 週で  $P = 0.03$ 。 OP は手術

### Sagittal trajectories: Ankle joint

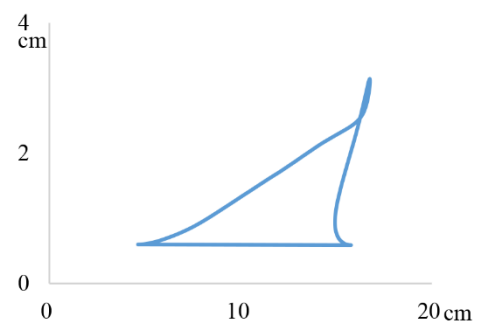
#### Ankle joint (SNL Left)

1 week after OP

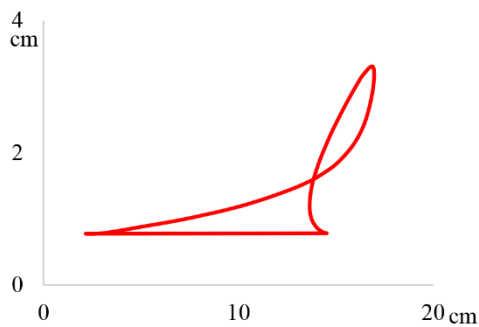


#### Ankle joint (Sham Left)

4 weeks after OP



4 weeks after OP



#### Top minus bottom height (Left ankle joint)

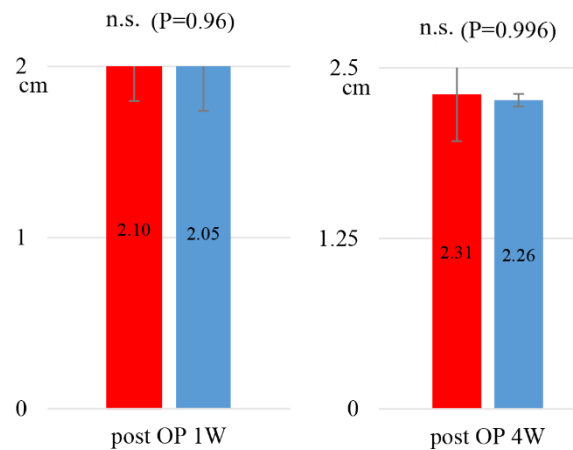
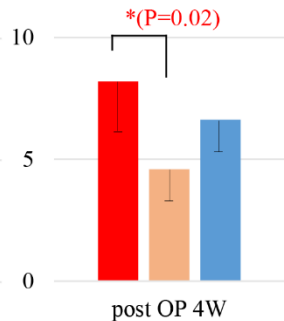
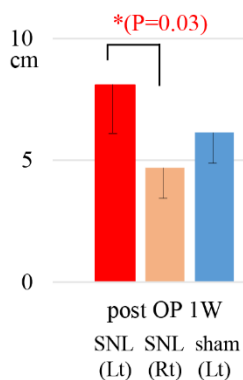


図4. 三次元歩行分析での左下肢の足関節の矢状面の軌跡

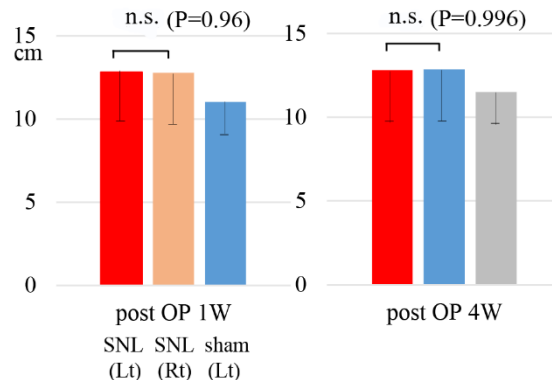
SNL ラットで遊脚期の前半 2/3 の間の上昇角度 (左図表) はコントロールラットの上昇角度よりも少なかった。SNL ラットは遊脚期後半 1/3 で継続してコントロールラットと比較してより急速に足関節が上昇した。これらの軌跡のパターンは SNL ラットに特徴的な足の動きと考えられた。OP は手術

### Walking pattern

#### Step length (heel)



#### Stride length (heel)



#### Both-foot contact time

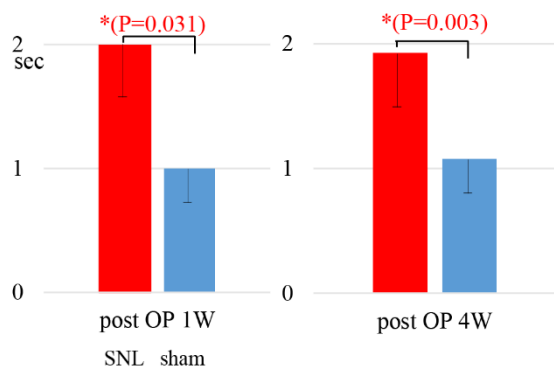
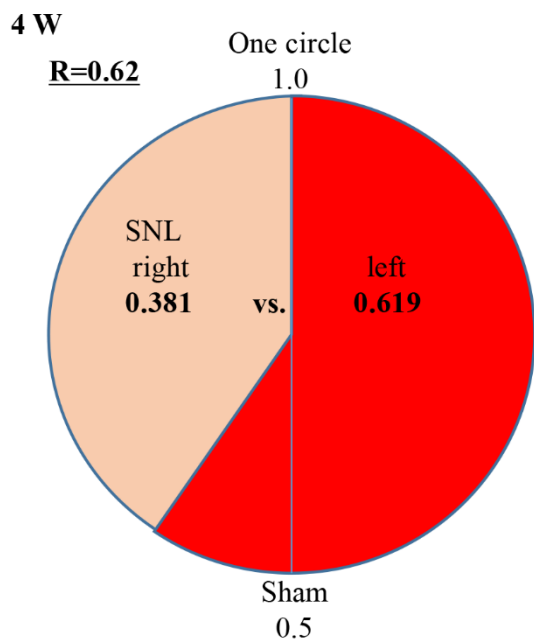
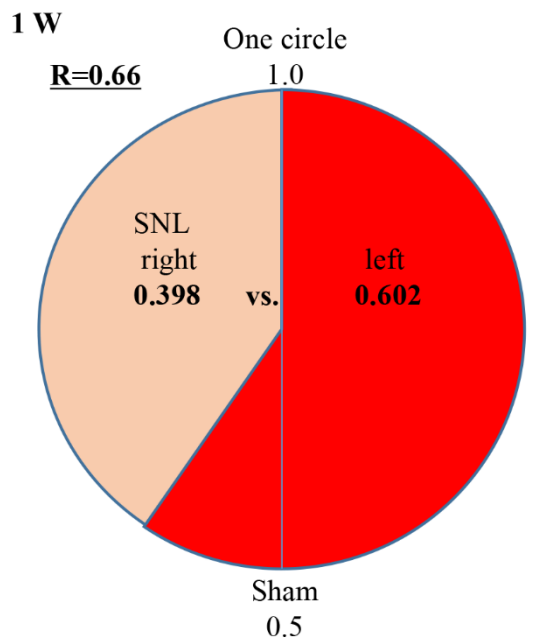


図5. ステップ長 (踵), ストライド長 (踵) と両足接地時間などの歩行の特徴

踵のステップ長はSNLラットにおいて1週, 4週ともに有意に右下肢に比べて左下肢で長かった。しかし、踵のストライド長は術後1週と4週のSNLラットの左右で違いがなかった。両足接地時間はコントロール群と比べてSNLラットで有意に長かった。 \* $P < 0.05$   
SNLモデル;  $n = 10$  コントロール群;  $n = 10$  有意差なし





**Circular phase**  
**(One stride time: Right vs. Left in SNL)**

図 6. 歩行周期の SNL ラットでの歩行の特徴  
 両下肢の接地相は右下肢が離れて再度接地するまでの時間の 1 周期として定量的に評価された。R 値は、左右の環状歩行時間の比である。歩行周期の中で R 値はコントロール群で  $1.0 \pm 0.08$ 、術後 1 週の SNL で  $0.66 \pm 0.20$  であり、術後 4 週で  $0.62 \pm 0.15$  であった。  
 SNL モデル； n = 10    コントロール群； n = 10

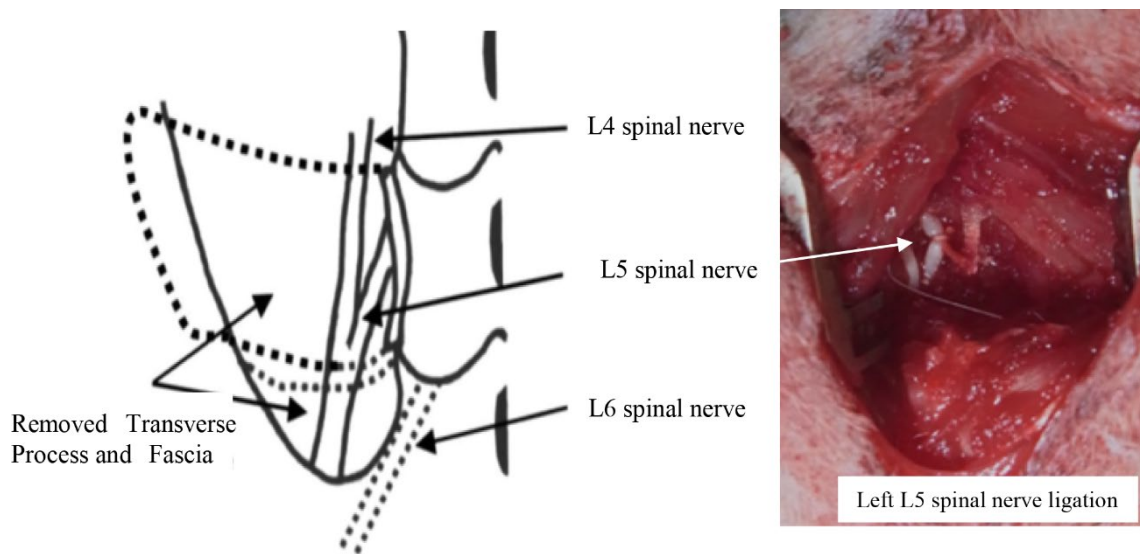


図 7. L5 坐骨神経の神経結紮の施行

左のパネル：左 L5 脊髄神経を分離し、後根神経節の遠位に 6-0 絹糸をきつく結ぶ手技の図表 (SNL=10)。右のパネル：手術写真

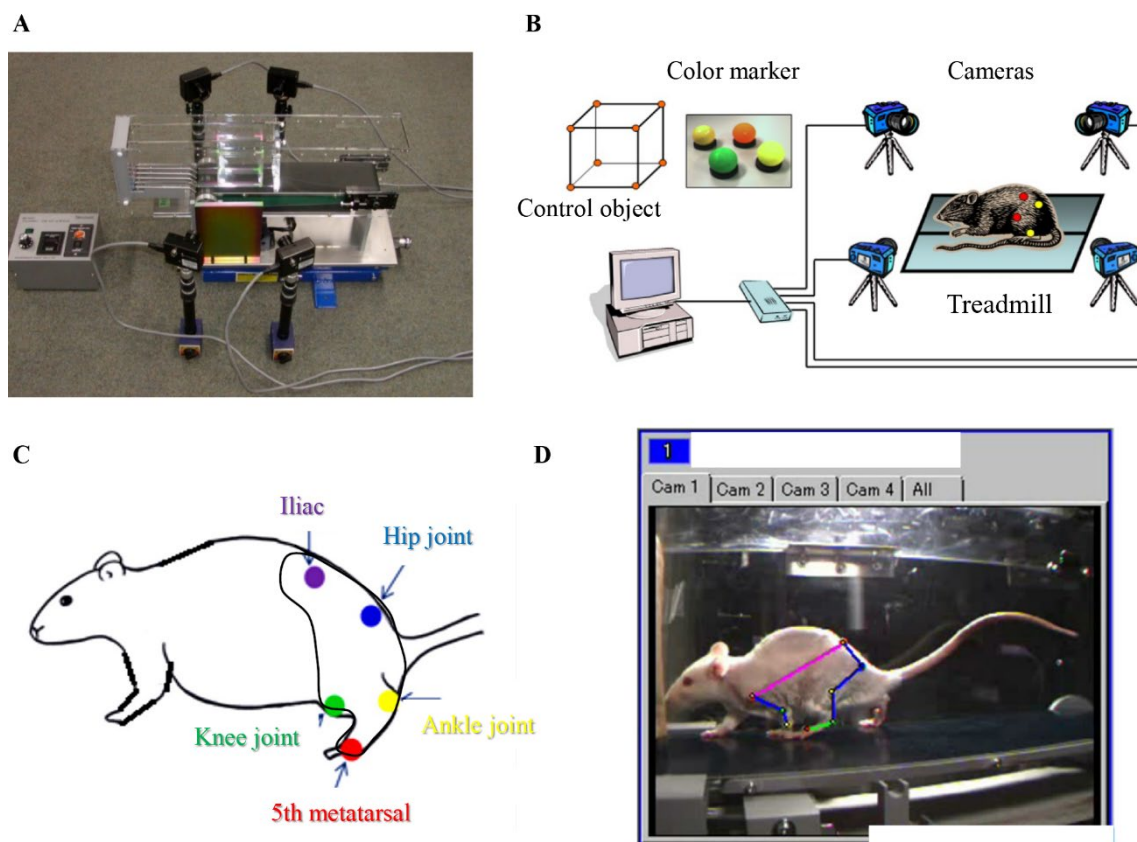
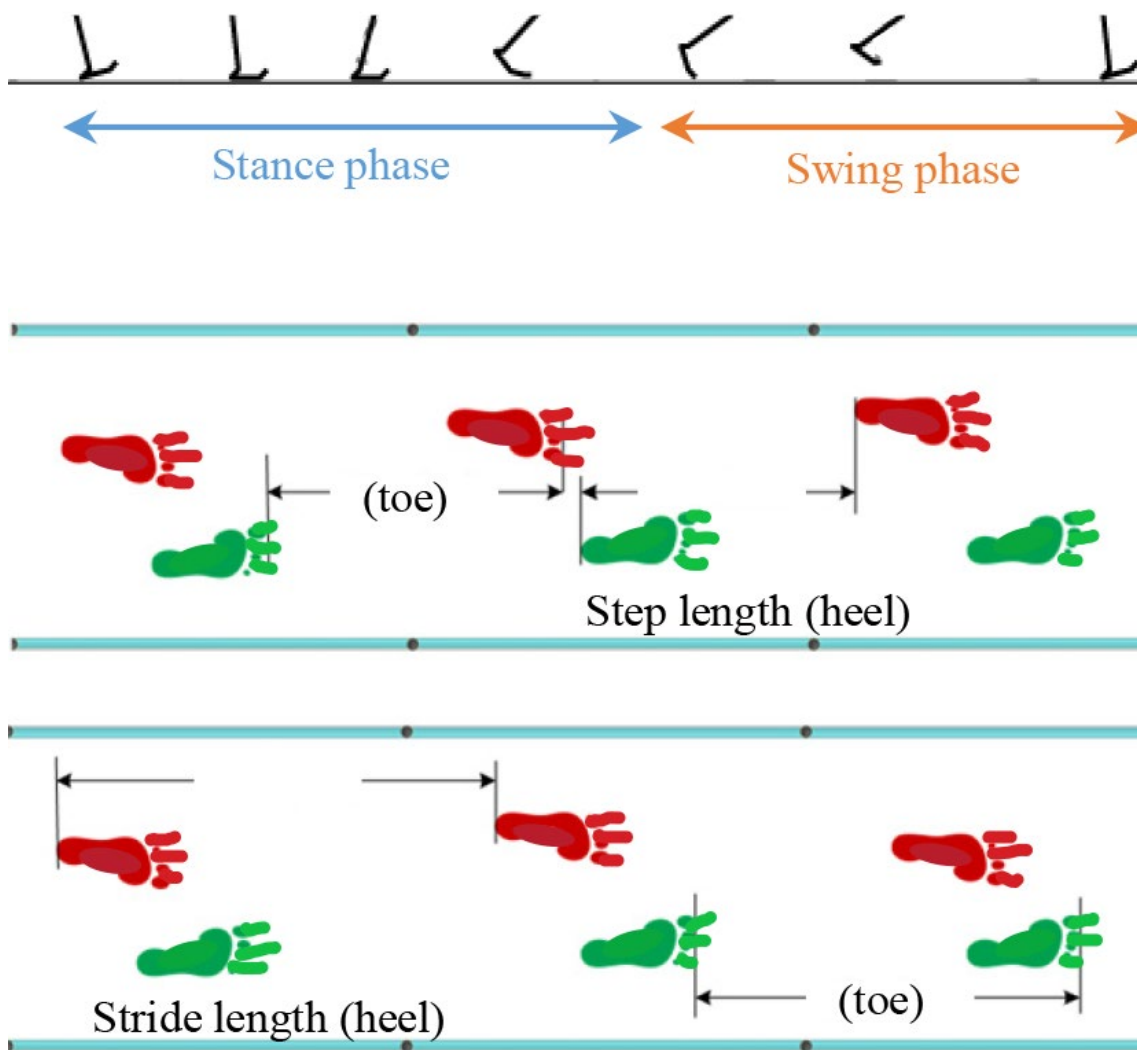


図 8. 三次元歩行分析. A と B. トレッドミル歩行における 4 つのカメラでの歩行データ

収集の装置。B. 4つのカメラがトレッドミルの同側に2つずつ設置され、歩行中のマーカ-の動きを撮影するために使われた。C. 歩行の動きをとらえるためにラットの後肢の骨ランドマーク上にマーカ-を設置した図表。全部で片側に5つずつのマーカ-が設置された。陰影のある部分はラットの毛を剃った部分である。D. 三次元動作解析のビデオ画像



補助情報 図 S1 接地相・離地相、ステップ長、ストライド長