# 眼球組織の力学的特性の測定

# 須長 純子<sup>a)</sup>, 横田 秀夫<sup>a)b)</sup>, Cristian TEODOSIU<sup>b)</sup>, 牧野内 昭武<sup>b)</sup>, 姫野 龍太郎<sup>a)</sup>

e-mail:j-sunaga@riken.jp

a)理化学研究所 生体力学シミュレーション特別研究ユニット

埼玉県和光市広沢2-1

<sup>b)</sup>理化学研究所 ものつく情報技術統合化研究プログラム

埼玉県和光市広沢2-1

#### 1. はじめに

医学や生物学、分子生物学の進歩により、生体について構造や代謝機構などが解明 されてきた。一方で、計算機能力の向上により、高度な数値解析や様々なシミュレー ションの実現が期待されている。生体力学シミュレーションは、生体現象の解明や医 療現場における疾病の予防・診断・治療、リハビリテーションなどに対する有効な支 援技術として注目されている。生体力学シミュレーションの実現には、複雑な生体組 織の力学的特性、形態・構造に関するデータの取得に加え、材料構成式、形状モデル、 解析モデルの構築が必要である。

近年、社会の高齢化に伴い網膜剥離患者が増加している。治療には、眼球を外側から圧迫する輪状締結手術が適用されているが、その締め付け量や締め付け部位、シリ コンパットの材質選定は医師の経験や勘により行われている。この手術では眼球を変 形させる量により、その予後が左右されるため、術前に変形量を予測することが求め られている。網膜剥離に対する輪状締結手術のシミュレーションを実現させるために は、眼球モデルの構築が不可欠である。そこで、本ユニットでは、眼球の有限要素解 析と術前評価への応用をひとつの重要な課題としている。

眼球は強膜、脈絡膜、網膜、角膜、水晶体、硝子体等の軟組織により構成<sup>1)</sup>され、 眼球内部からの圧力と眼球周辺の筋肉、脂肪、神経等の周辺組織からの圧力により形 状を保っている。我々のユニットにより、眼球において詳細な生体形状モデルの構築 は、三次元構造の画像データの取得より行っている<sup>10)11)</sup>。一方、それにあてはめる詳 細な力学的特性については明らかではない。また、生体力学シミュレーションの正確 性は力学的特性の精度により左右されるため、詳細な力学的特性の解析が求められる。 これまでに、眼球を対象とした力学シミュレーションでは、衝突実験や視力矯正手術 のための角膜を対象とした研究が多くなされている<sup>2)3)</sup>。しかし、眼球の各組織につ いて、統合的に詳細な力学的特性の取得は行われていない。そこで、開発した複数の 生体軟組織を対象とした引張り試験システム<sup>89912)</sup>を用いて、眼球の各組織について統 一的な手法による詳細な力学的特性の測定を試みた。

本研究では、医療分野における眼球組織の研究で多く用いられている豚眼球を使用 した。眼球組織の引張り試験では、眼球が球形の層状組織から構成されているために、 組織の曲率が力学的特性の測定精度に影響することが考えられる。そのため、試験片 は小さくせざるを得ず、全長が数ミリメートルの軟組織を対象とした試験システムが 必要である。JIS(日本工業規格)<sup>5)</sup>では、単軸引張り試験による力学的特性の測定に おいて、試験片形状をダンベル(短冊)型に指定している。しかし、生体軟組織を対 象とした場合、ダンベル型試験片を装置へ保持することが困難であったため、試験片 をリング状にすることにより対応した。眼球組織を対象としたリング状試験片の引張 り試験は、Krag ら<sup>4)</sup>による水晶体嚢の単軸引張り試験について報告がなされている。 Krag らは、リング状試験片の作製は、近視矯正手術 (LASIK: Laser in Situ Keratomileusis) で用いられているエキシマレーザで行っている。しかし、エキシマ レーザによる切り出しは、含水量の多い組織や、厚さが数 mm の試料では、切り出し 不可能である。そこで我々は、様々な生体軟組織に対応できる試験片の作製方法とし て、リング状ナイフを用いることを提案した<sup>9)12)</sup>。既報<sup>8)</sup>の引張り試験装置と、生体 軟組織をリング状に切り出す試料作製装置を用いて、豚眼球の強膜、角膜、水晶体前 **嚢を対象に応力-ひずみ関係を測定した。** 

#### 2. 試料の作製

#### 2-1. 試料作製装置

図1に打ち抜き装置を示す。装置の可動部にリング状ナイフを取り付け、垂直移動 させることで試料を打ち抜く。図2にリング状ナイフの構造を示す。φ2.97mmの内向 きステンレスとφ2.07mmの外向きステンレス刃の二本の円筒を組み合わせて同心円 状に固定した。また、図2上に示すように先端を研削加工により15°に刃付けした。 内側の刃と外側の刃の間に試験片が打ち抜かれる。

## 2-2. 試料作製

供試試料は実験当日早朝、屠殺場にて摘出された豚眼球を入手し、屠殺から 15 時 間以内に実験を行った。試料は眼球とその周囲の組織が付着した状態で 5℃環境下に て輸送され、到着後直ちに筋肉、まぶた等を除去し洗浄した。図3に各眼球試料の切 り出し手順を示す。強膜試料は、眼球切断器具とミクロトーム用ナイフで切断し、そ の後ろ側を用いた(図3右上)。切り出し位置は神経束を基準に時計に見立て、12 時、 6 時の位置を決めた(図3中上)。また、左右の眼球は同じ形状では無く対称形をして いることから、解剖学知識に基づいて眼球の鼻側を3時、その逆側を9時として四方 向を設定した。試料は直径8mmのトレパンで切り出し、ピペットを用いて水流で網膜 と硝子体を除去した。この試料片をデンタルワックスにのせ、試料作製装置により、 リング状の試験片に切り出した。さらに、実体顕微鏡下でピンセットにより脈絡膜と



図1. 試料作製装置



図2. リング状ナイフ

強膜を分離し、リング状の強膜試験片を作製した (図 4-a)。角膜は、メスと眼科バサミを用いて切り 出し、同様に打ち抜き装置にてリング状試験片を作 製した(図3左、図4-b)。水晶体は摘出した後、水 晶体前嚢のみを切り出し、同様に打ち抜き装置にて リング状試験片を得た(図3右下、図4-c)。試験片 は引張り試験開始まで、 リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffer Saline: PBS) 中に 4℃で保管 した。引張り試験前に、分解能 1µm の CCD レーザ変 位計(LK-030: KEYENCE)を用いて各試験片の厚さ を4点ずつ測定し、その平均を試験片の厚さとした。 図4(右)に強膜試験片の12、3、6、9時の位置お よび角膜、水晶体前嚢の各組織試験片 10 サンプル についての厚さ測定結果を示す。測定結果より、強 膜組織の厚さは、眼球の部位によって異なることが 明らかとなった。



図3. リング状試験片の作製



<b>内径</b> (mm)	1.90 ± 0.062
外径 (mm)	$2.86 \pm 0.067$
12時厚さ(mm)	1.46 ± 0.133
3時厚さ(mm)	1.65 ± 0.171
6時厚さ(mm)	1.00 ± 0.155
9時厚さ(mm)	1.52 ± 0.160

強膜試験片サイズ (n=10)

図4-a. 強膜リング状試験片、サイズ (Mean±SD)



角膜試験片サイズ (n=10)

 内径 (mm)	1.94 ± 0.102
外径 (mm)	2.87 ± 0.127
厚さ(mm)	$3.41 \pm 0.498$

図 4-b. 角膜リング状試験片、サイズ (Mean±SD)



内径 (mm)	2.01 ± 0.064
外径 (mm)	$2.94 \pm 0.038$
厚さ(µm)	86.08 ± 23.33

図4-c. 水晶体前嚢リング状試験片、サイズ (Mean±SD)

図 4. 各眼球組織のリング状試験片

# 3. 引張り試験

# 3-1. 引張り試験装置

図5に引張り試験装置の模式図を示す。既報<sup>80</sup>の引張り試験装置にマクロレンズと CCD カメラ(JK-TU52H: Toshiba)、レーザディスク(LQ-D5500: Panasonic)、時 間軸調整のためのマーカーライトを付け加えたものを用いた。図6に装置の外観を示 す。リング状試験片を試験装置の2本のピンにかけ、片側のピンを動かして、移動量 と荷重の関係を測定する。引張りを行うボイスコイルモータのストロークは4mm、分 解能は0.01mmである。また、荷重を検出するロードセルは、2種(最大2N、10N)を 組織に応じて用いた。較正試験により各ロードセルは、最小1mN および 50mN 以下の 荷重検出が可能であることが確認できている。

引張り距離および荷重データをサンプリング周波数 200Hz でオシロスコープ (NR-2000: KEYENCE) に記録した。さらに、引張り試験時の様子をマクロレンズと CCD カメラを用いて撮影し(視野 11.6 × 8.73mm)、レーザディスクにビデオレート (30frames/sec) で保存した。なお、オシロスコープと撮影画像の時間軸は、引張り 試験直前にマーカーを点灯し、その電圧と画像を記録することにより同期可能とした。



図5. 引張り試験装置模式図



図6. 引張り試験装置装置外観

## 3-2. 実験条件

2-2で作製した豚眼球組織の強膜、角膜、水晶体前嚢試験片を引張り試験に用いた。引張り試験は PBS 中で行った。本報では、強膜組織の力学的特性は、眼球の部位

による特異性、引張り速度依存性、環境(PBS)温度依存性、異方性について検討した。また、角膜および水晶体前嚢組織の力学的特性は、引張り速度依存性、環境温度 依存性について検討した。引張り試験は、破断の有無に関わらず移動側ピンを初期位 置から4mmまで行い、引張り速度は試験装置の位置制御を用いて、0.5、0.1、0.01mm/sec の3速度条件、PBS温度は4±1℃、室温(25±1℃)、37±1℃の3温度の条件下にお いて測定を行った。

#### 4. 結果

#### 4-1. シリコンゴムによるリング状試験片のゼロ点設定および公称ひずみの較正

本手法では試験片をリング状にしたため、ゼロ点設定および公称ひずみの較正を行 う必要がある。まず、ひずみの算出方法の検討および較正をシリコンゴムの引張り試 験より検討した。

図 7 にシリコンゴムの引張り試験の様子を示す。引張り開始前を(a)、ピンが試験 片の内径に接した状態を(b)、試験片の内周に張力がかかる直前の状態を(c)、試験片 に荷重が生じている状態を(d)に示す。また、図 8 にピンの移動量-荷重の関係を示 した。図 7-(a)から(c)の各状態における移動側のピンの位置をそれぞれ Lo、Ld、Ls と して、図 8 に示す。Ld および Ls に達するピンの移動量は、試料作製時の試験片内径 とピン直径から下式のように算出した。

Ld = 試験片内径 – 初期ピン間距離 – ピン直径

Ls = { 試験片内周 - (初期ピン間距離×2) - ピン外周 } / 2



図 7. シリコンゴム引張り試験





ゼロ点は、リング状試験片の内周に張力がかかる直前の状態(Ls)に設定する。初 期試験片長、初期試験片断面積から、下記公式<sup>6)7)</sup>に従い、公称応力-公称ひずみの 関係を算出する。 σ<sub>N:公称応力</sub>

1 +1.---

	ε N:公称OJ み
	F:荷重
$\sigma N = F / A0$	A0:初期試験片断面積
$\epsilon N = (L - L_0) / L_s$	L:試験片長
	1.0 · 初期試驗片長

本試験システムでは、試験片をリング状にしたため、公称ひずみの算出において、 曲部の扱い方を検討する必要がある。そこで、図9のように仮定をたてた。画像処理 による実測値と各仮定に基づき算出した公称ひずみについて比較した(図10)。画像 による実測から、リング状試験片の上部と下部の試料伸長率は同程度であった。図10 の結果から、本試験システムにおける公称ひずみ算出方法として、実測値より得られ た公称ひずみに近い値を示した仮定2を採用した。また、実測値と仮定2における計 算値より得られた公称ひずみについて、線形回帰したところ(図11)、R<sup>2</sup>=0.9997と高





仮定2:曲部を含めた試験片全体を棒状と仮定



図 9. 公称ひずみ算出方法の仮定



い相関が得られ、回帰が可能であった。こ のことから、実測と仮定2では、公称応力 ー公称ひずみ関係のグラフ傾きに変化は無 いことが分かった。また、引張り試験のピ ンの移動量に対し、試験片のひずみが大き くなっていることが明らかとなった。これ は、本試験システム(リング状試験片を用 いた引張り試験)に依存的なものであるこ とが考えられる。しかし、本実験で明らか になった係数(図11)について、原因が明 確では無いため、以降の引張り試験測定値 について較正は行っていない。



## 4-2. 豚眼球組織の引張り試験結果

図 12、20、23 に、各試験片における引張り開始から破断までの様子を順に示す。 各試料について、引張り開始前を(a)、ピンが試験片の内径に接した状態を(b)、試験 片の上辺と下辺が平行になった状態を(c)に示した。各状態における移動側のピンの 位置をそれぞれ Lo、Ld、Ls とした。試験片の内径とピン間距離を撮影画像から測定 し、Ld、Ls に達する移動量を算出した。また、各組織について力学的特性(公称応 カー公称ひずみ関係)を算出した。

#### 4-2-1. 強膜引張り試験結果

図 13 に、引張り開始からのピンの移動量-荷重関係とピンの位置をあわせて示す。 図 13 からピンの移動量-荷重関係は非線形であり、引張り開始直後は力が非常に小さ く、可動ピンがある移動量を超えると、力が急激に増加したことが分かる。すなわち、 Ld から Ls までの力の増加量は非常に小さく、Ls 以降で急激に大きくなっている。Ld -Ls 間でかかる力は、リング状試験片の変形によるものであると考えられる。よって、 Ls 以降で生じる力が引張りに起因しているものとして、図 12-(c)の形状を 2 本の棒 状試験片と仮定(図 10、仮定 2)し、力学的特性(応力-ひずみ関係)を算出した。 強膜組織の力学的特性は、

- 眼球の部位特異性:12、3、6、9時(室温、0.1mm/sec)
- 環境温度依存性:37℃、室温、4℃(9時、0.1mm/sec)
- 引張り速度依存性:0.5、0.1、0.01mm/sec(室温、9時)
- 異方性:3方向(室温、9時、0.1mm/sec)

について検討した。

図14に、強膜の測定部位の違いによる応力-ひずみ関係を示す。強膜において、 測定部位によって力学的特性に差異があり、12、3時の位置の組織が硬く、6、9時の 位置は軟らかいことが明らかとなった。環境温度依存性、引張り速度依存性、異方性 試験は、切り出し部位の特定が容易であった9時の位置のサンプルを用いて行った。 図15に、強膜における環境温度による応力-ひずみ関係を示す。環境が低温になる に従い、応力は高くなり、標準偏差(SD:standard deviation)も増大した。図16に、 強膜の速度依存性についての引張り試験の応力-ひずみ関係を示す。引張り速度が速 いほど応力が大きく、また標準偏差も増大した。図17に、強膜の異方性を考慮した 引張り試験の応力-ひずみ関係を示す。図18に示すように、異方性試験はメチルバ イオレット(WAKO)飽和液により神経束から放射状に印を入れ、3方向において引張 り試験を行った。引張りの方向によって、各ひずみにおける応力の平均値について、 異方性が存在する傾向が認められるが、有意差が見られなかった。強膜組織において 厚さ約5µmのパラフィン切片を作製し、観察したところ、組織繊維の方向が一定でな いことが分かった(図19)。















図18. 異方性マーキング(強膜)



図 19. 強膜組織切片観察

# 4-2-2. 角膜膜引張り試験結果



図 20. 角膜引張り試験

図 20 に角膜組織の引張り試験の様子を示す。強膜 と同様に、図 20-(c)の形状を 2 本の棒状試験片と仮定 し、公称応力-公称ひずみの関係を求めた。角膜組織 の力学的特性は、

● 環境温度依存性:37℃、室温、4℃(0.1mm/sec)

● 引張り速度依存性: 0.5、0.1、0.01mm/sec(室温) について検討した。

図 21 に、角膜組織の環境温度の違いによる応力-ひずみ関係を示す。環境温度は、37℃、室温、4℃の3 温度について行った。その結果、環境温度が低い程、 応力が高くなることが明らかとなった。

図 22 に引張り速度の違いによる応力-ひずみの関係を示す。引張り速度は、0.5、0.1、0.01mm/sec の3 速度について引張りを行った。その結果、速度が増す ほど応力が大きくなる傾向が見られた。また、引張り 速度が 0.1、0.01mm/sec では、有意な差は認められな かった。





# 4-2-3. 水晶体前嚢引張り試験結果



図23. 水晶体前嚢引張り試験

図23に、水晶体前嚢組織の引張り試験の様子を示す。 強膜、角膜と同様に、図23-(c)の形状を2本の棒状試 験片と仮定し、公称応力-公称ひずみの関係を求めた。 水晶体前嚢の力学的特性は、

● 環境温度依存性:37℃、室温(0.1mm/sec)

● 引張り速度依存性:0.5、0.1、0.01mm/sec(室温) について検討した。

図24に、水晶体前嚢組織の環境温度の違いによる応 カーひずみ関係を示す。環境温度は、37℃、室温の2温 度について行った。環境温度依存性について、室温と 比較し、37℃環境下では応力が低く、標準偏差も小さ かった。

図 25 に引張り速度の違いによる応力-ひずみ関係を 示す。引張り速度は、0.5、0.1、0.01mm/sec の3速度 について引張りを行った。その結果、水晶体前嚢組織 について、引張り速度依存性は認められなかった。



環境温度による違い



引張り速度による違い

## 4. まとめ

2-1に示した試料作製装置により、豚眼球の強膜、角膜、水晶体前嚢組織において、直径約3mm、厚さ0.05~4mmの同心円状のリング状試験片を作製することができた。また、このリング状試験片を用いて、既報<sup>80</sup>の引張り試験装置により、位置データ、力学的データおよび試験片変形の様子を記録することができた。本試験システムにより、豚眼球各組織の応力--ひずみ関係について、以下の検討を行った。

\* 強膜

- 環境温度依存性
- 眼球の位置による違い
- 引張り速度依存性
- 異方性

#### \* 角膜

- 環境温度依存性
- 引張り速度依存性
- \* 水晶体前囊
  - 環境温度依存性
  - 引張り速度依存性

測定結果から、強膜、角膜、水晶体前嚢組織の応力-ひずみ関係について、環境温 度が低くなるに従い、応力が大きくなっており、温度依存性があることが明らかにな った。また、角膜組織については、引張り速度が増すに従い応力が大きくなっていた。 しかし、強膜、水晶体前嚢組織については、応力-ひずみ関係に引張り速度による違 いは認められず、眼球組織の違いによって、引張り速度依存性の有無があることが明 らかとなった。各組織破断時の公称応力・公称ひずみは、強膜:約830kPa・約30%、 角膜:約840kPa・約40%、水晶体前嚢:約815kPa・約70%であった。このことから、 水晶体前嚢が延性に富む組織であると考えられた。強膜組織は、眼球の位置により厚 さおよび、応力-ひずみ関係に違いがあることを明らかにした。また、組織観察結果 より、強膜組織は主成分であるコラーゲン繊維が複雑に絡み合った構造をなしており、 引張り試験結果に異方性は無いことが裏付けられた。

以上の結果より、眼球の各組織は、その役割に応じて力学的特性が異なると考えら れた。この力学的特性の違いは、各組織の構成成分や含水量が異なることによるもの と考えられる。また、各組織とも環境温度依存性が示唆されたため、より正確な生体 力学シミュレーションの実現には、生体温度(35~37℃)に近い条件下での力学特性 の取得が不可欠であると考える。さらに、眼球は層状構造であることから、接着して いる複合組織での引張り試験および組織間の剥離試験を行うことで、眼球の各組織に おける力学的特性を統合的に評価できるものと考えられる。

眼球の力学的なメカニズムを明らかにすることは、網膜剥離手術である輪状締結手 術のシミュレーションだけでなく、緑内障や白内障など多くの眼球疾患の解明につな がると考える。また、眼球の外傷シミュレーションや人工眼球の開発等、その有用性 が期待される。

本研究で提案した力学的特性の測定方法は、他の生体軟組織を対象とした引張り試 験においても有効であり、血管の力学的特性については、測定可能であることを確認 している。また、他の臓器や組織、特に膜状組織についても、測定が可能であると考 える。

生物個体全体について、構成組織の力学的特性と形状情報の取得から、生体ディジ タルモデルをコンピュータ上に構築することが期待されている。これが実現すると、 三次元構造をとらえた生体内組織の観察および力学的変化の予測が可能となる。人体 モデルの構築により、医療に応用することができれば、疾病の診断や外科手術の技術 支援につながるなど、その有用性は大いに期待される。

#### 5. <br /> 今後の予定

本手法により、リング状試験片を用いた引張り試験によって、強膜、角膜、水晶体 前嚢組織の詳細な力学的特性を測定することができた。同様にして網膜等、他の眼球 組織について力学的特性を測定する予定である。また、応力緩和試験や繰り返し引張 り試験等によって、さらに詳細な眼球組織の力学的特性について明らかにする予定で ある。

JIS<sup>5)</sup>では、単軸引張り試験による力学的特性の測定において、試験片形状をダンベ



図26. 応力-ひずみ曲線(シリコンゴム) 試験片形状による違い

ル(短冊)型に指定している。しかし、 生体軟組織を対象とした場合、ダンベ ル型では引張り試験を行うことが不可 能であったため、本試験システムでは、 試験片をリング状にすることにより対 処した。そこで、シリコンゴムを用い てリング状およびダンベル型試験片に よる応力-ひずみ関係を測定した。図 26に、結果を示す。試験片形状によっ て応力-ひずみ関係に差異が認められ た。これは、試験片がリング状である ため、試験片の内側と外側にかかる荷重に差が生じることや引張り時の試験片曲部に おける荷重・ひずみが不均一であることなどが考えられるが、詳細については明らか ではない。今後、リング状試験片において、試験片曲部のひずみと応力集中、ピンと 試料との間に生じる摩擦等について、詳細に検討する予定である。また、リング状試 験片を用いた場合の材料特性の定義方法について、有限要素解析等により、検討する 予定である。

網膜剥離に対する輪状締結手術における術前シミュレーションには、特に初期変形 について高精度の力学的特性が求められる。そのため、リング状試験片の引張り試験 において、ゼロ点設定方法の再検討が必要であると考える。

#### 参考文献

1. R. Snell: "眼球の臨床解剖学" 医学書院

- 2. E. Uchio *et al.*: "Simulation model of an eyeball based on finite element analysis on a supercomputer", Br F Ophthalmol, vol. 83, pp. 1106-1111 (1999)
- 3. J. Stitzel *et al.*: "Computational modeling and experimental validation of human eye interaction with high-speed foam particle", Duma, (2000)
- S.Krag, T.Andreassen: "Biomechanical measurements of the porcine lens capsule", Exp. Eye Res, Vol. 62, pp. 253-260 (1996)
- 5. "新 JIS への手引き ゴム物理試験方法新 JIS ガイド",大成社
- 6. 佐々木康順: "新版 ゴム技術の基礎" 日本ゴム協会編
- 7. 林紘三郎: "バイオメカニクス" コロナ社
- 8. 横田ほか: "軟組織の力学特性計測システムの開発", 第 13 回バイオエンジニアリング 講演会講演論文集, pp. 46-47 (2001)
- 9. 須長ほか: "眼球の詳細な力学的特性の測定", 第15回バイオエンジニアリング講演会講 演論文集, pp. 185-186 (2003)
- 10. 横田ほか: "生体軟組織の実形状を反映した精密 FEM メッシュ作成法",第 15 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, pp. 419-420 (2003)
- 11. 横田ほか: "スライスによるディジタイジング装置の開発と眼球組織のディジタ イジング",理研シンポジウム, pp. 92-99 (2003)
- 12. 須長ほか: "眼球の詳細な力学的特性の測定 -第2報 強膜、水晶体嚢の測定 -", 第16回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, pp. 275-276 (2004)