

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計畫：以小鼠模式評估市售隱形眼鏡保養液是否直接對眼角
* 名稱：膜組織造成傷害
* *****

執行計畫學生：李佩珊
學生計畫編號：NSC 100-2815-C-040-022-B
研究期間：100年07月01日至101年02月28日止，計8個月
指導教授：林培正

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學視光學系

中華民國 101年02月22日

行政院國家科學委員會補助大專生專題研究畫

■ 期末報告

以小鼠模式評估市售隱形眼鏡保養液是否直接對眼角膜組織造成傷害

Safety evaluation of the contact lens solutions on market using a mouse model

計畫編號：100-2815-C-040-022-B

執行期間：100年7月1日至101年2月28日

執行機構及系所：中山醫學大學 視光學系

計畫主持人(指導教授)： 林培正教授 (David Pei-Cheng Lin)

計畫參與人員： 李佩珊 (Pei-Shan Li)

中華民國 101 年 2 月 28 日

以小鼠模式評估市售隱形眼鏡保養液是否直接對眼角膜組織造成傷害

Safety evaluation of the contact lens solutions on market using a mouse model

學生：李佩珊(Pei-Shan Li)
指導教授：林培正(David Pei-Cheng Lin)

摘要：

許多的案例顯示眼球表面的傷害與隱形眼鏡保養液的錯誤使用有密切的相關性。保養液的殘留或使用不當，會衝擊角膜表皮細胞的健康，導致視力的下降。另外，保養液的成分被懷疑是導致結膜炎和乾眼症的因素之一，但至今卻無明確的實驗證據。因此，針對此議題，我們從市場上隨機選擇了2款隱形眼鏡保養液於小鼠身上來進行研究，模擬在保養液的錯誤使用下，對於眼球表面的效應。實驗將ICR小鼠分為5組：(1)空白對照組、(2)0.9% NaCl(等張溶液)、(3)18% NaCl(高張溶液)陽性對照組、(4)隱形眼鏡藥水(博士倫保養液)、(5)含玻尿酸成分的保養液。分別將以上的液體滴入小鼠的角膜表面(4.76 ul/cornea)，早晚2次，持續10天。於第5天與第10天觀察老鼠的眼球表面平滑度(corneal smoothness)與透明度(corneal opacity)，並以角膜染色方法(lissamine green staining)評估角膜表面的受損程度。10天後，採取組織染色分析方法(histopathological analysis)觀察角膜與結膜組織結構的變化，並輔以PAS染色方法評估結膜杯狀細胞(conjunctiva goblet cells)的健康。實驗結果發現，隱形眼鏡保養液的錯誤使用，對於眼角膜和結膜組織會直接造成衝擊性的損傷。本研究結果警醒消費者與各家廠商注意隱形眼鏡保養液對於眼睛的影響，更需謹慎的依據使用說明來正確的使用保養液。

關鍵詞：隱形眼鏡保養液、角膜、結膜

Abstract

Many clinical cases indicated a correlation between the use of the contact lens preservative and cleaning solutions and ocular surface damages. The detainment of solutions and misuse are thought to be detrimental to the corneal epithelial layer, leading to impairment of visual acuity. Besides, the ingredients of the solutions have been regarded as a causing factor for dry eye and conjunctivitis. Yet, there has been no substantial experimetal data to support such hypothesis. In the present study, we selected randomly two contact lens soultions on market and misuse them intendedly on mouse cornea to determine the effects. ICR mice were randomly divided into 5 groups according to various eye drop treatments: (1) blank controls, (2) 0.9% NaCl isotonic vehicle controls, (3) 18% NaCl hypertoninc controls, (4) a contact lens cleaning solution, (5) a contact lens hyaluronic acid-containing preservative solution. Each soultion was dropped onto mouse ocular surface (4.76 μ l/cornea; twice daily) for a 10-day period. On days 5 and 10, the mice were assessed for corneal smoothness, opacity, and scored for lissamine green staining, after the ocular surface assessment on the 10th day, the mice were sacrificed with their corneas processed for histopathological analysis and PAS stain to examine the health status of conjunctiva goblet cells. The results showed a direct link between misuse of contact lens solutions and keratoconjunctival damages. The results of this study remind a safety issue on manufacturing and using the contact lens soultions.

Keywords: contact lens solutions, cornea, sclera, keratoconjunctival damages

二. 研究動機與研究問題：

- (1) 隨著隱形眼鏡使用率的增加，隱形眼鏡保養液(隱形眼鏡藥水)的商品種類也日漸增加。希望能夠透過這個計畫，能夠有正確的提供客觀的數據給大家參考，並確認眼鏡保養液對眼角膜或結膜傷害的程度。同時讓我們了解如何謹慎的選擇並且使用隱形眼鏡保養液，而非一昧的相信業者花俏的廣告宣傳(免手搓、免食鹽水沖洗等)而傷及我們的視力。
- (2) 從流行病學的調查推測-[隱形眼鏡保養液]的使用與角膜炎、乾眼症的發生率有密切的關係；但是，至今尚無明確的實驗證據。本研究計畫以小鼠模式，設計實驗來針對此議題，尋求客觀的實驗證據。
- (3) 市售隱形眼鏡保養液(隱形眼鏡藥水)的商品，常含有雙氧水(H₂O₂)和防腐劑的成分。事實上，此商品具有一定的使用風險。因此，以動物試驗做此類商品的安全性評估，是當代發展視力保健衛教的重要課題之一。

三. 文獻與討論：(與外界接觸而較容易受到感染的部分：角膜、結膜)

(1) 隱形眼鏡保養液(隱形眼鏡藥水)的使用目的與介紹：

在這美觀與方便當道的時代，配戴隱形眼鏡成為許多人的首選，人們對隱形眼鏡的依賴度也越來越高，所以隱形眼鏡的保養也相對的變得更為重要，但大多數的消費者大多從廣告文宣中獲取不完整的隱形眼鏡保養知識，殊不知自己的眼睛早在無形中已受到了傷害，有些傷害甚至無法痊癒。像大眾所熟知的隱形眼鏡保養液，它是用來殺死隱形眼鏡配戴後殘留在鏡片上的細菌與黴菌，其中最常見的包括：三種細菌—綠膿桿菌、葡萄球菌、黏質沙雷菌；和兩種黴菌—白色念珠菌、鐮刀菌。廠商為了增加大眾購買的慾望，廣告上還強打著可免搓洗直接帶上的方便性，確實吸引到不少民眾的購買。然而，此產品往往忽略了幾個大問題，如：

- (a) 眼球表面組織細胞(角膜細胞、結膜杯狀細胞...等)對於[隱形眼鏡保養液]是否會敏感？
- (b) [隱形眼鏡保養液]是否有毒殺眼球表面組織細胞的風險？

(2) 隱形眼鏡保養液(隱形眼鏡藥水)的使用風險：

[隱形眼鏡保養液]的毒性可用來殺死鏡片上絕大多數的細菌；但換個角度思考，對於眼球表面組織是否也會造成傷害？事實上，因[隱形眼鏡保養液]或[隱形眼鏡藥水]所造成眼球表面過敏、刺激、紅腫、充血的問題相當的嚴重，此問題被認為是配戴隱形眼鏡的主要風險。

- (a) 當隱形眼鏡保養液衝擊眼球表組織後，可能使免疫力降低，讓眼睛進而受到感染而罹患球結膜水腫、乳突狀結膜炎、角膜炎等併發症。
- (b) 另一方面，配戴隱形眼鏡的容易有乾眼症的現象。此類型乾眼症發生原因，除了隱形眼鏡的材質吸取鏡片的水分之因素外；「隱形眼鏡保養液」的殘留可能會直接撲殺結膜杯狀細胞(conjunctiva goblet cells)，當結膜杯狀細胞退化後，導致乾眼症的產生。

上述種種的問題的確值得我們去思考；然而至今，尚未有動物實驗來證實此觀點，並探究其造成害的程度。因此，建立實驗動物模式來探討[隱形眼鏡保養液]對於眼球表面組織傷害的程度是當今急迫的課題，可釐清使用者的疑慮。小鼠實驗模式建立後，有助於當代視覺保健的推展和新產品的開發。

四. 實驗方法與步驟：

實驗器材：ICR小鼠、Pipette、TIP、玻尿酸、博士倫保養液、烘箱、切片機、玻片、染色所需用到的器材、顯微鏡

實驗步驟：

- (1) 將ICR小鼠分成5組單位(1組空白對照組、2組實驗組、1組陰性對照組1組、陽性對照組)，每組8隻小鼠，並記錄實驗前每單位老鼠的眼睛外觀狀況。
- (2)
 - (a) 空白對照組不滴保養液。
 - (b) 陰性對照組每天早上8：00、晚上17：00雙眼各滴入4.76 μ l的0.9%的等張食鹽水(NaCl)溶液。
 - (c) 陽性對照組每天早上8：00、晚上17：00雙眼各滴入4.76 μ l的18%的高張食鹽水(NaCl)溶液。
 - (d) 實驗組甲每天早上8：00、晚上17：00雙眼各滴入4.76 μ l的博士倫保養液。
 - (e) 實驗組乙每天早上8：00、晚上17：00雙眼各滴入4.76 μ l的玻尿酸。
- (3) 於實驗的第0天、第5天和第10天觀察並紀錄實驗組與對照組眼睛外觀狀況的差異。
- (4) 麻醉小鼠進行螢光染色，於暗室藍光的照射下，觀察眼球表面外觀的變化；並以分級評分探討其差異性。

Scores	0	1	2	3	4
Corneal opacity	transparent	slight opacity with visible iris texture	moderate opacity with unclear iris texture	severe opacity pupil can be seen vaguely	very severe opacity pupil can not be seen
Neovascularization grades	No	2 mm within limbal	around cornea \leq 1/2 quadrant	around cornea $>$ 1/2 quadrant	whole cornea
Fluorescence staining area	No	\leq 1/4 quadrant	1/4 $<$ area \leq 1/2quadrant	1/2 $<$ area \leq 3/4quadrant	$>$ 3/4quadrant

[參考資料； Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. Jiang TS, Cai L, Ji WY, Hui YN, Wang YS, Hu D, Zhu J. Mol Vis. 2010 Jul 14;16:1304-16]

- (5) 實驗的第10天犧牲老鼠，取出的眼球與眼瞼，進行組織切片

[參考資料； Molecular Vision: 2011 (accepted; article in press) (SCI; 眼科前25%)

Dietary zerumbone prevents against ultraviolet B-induced cataractogenesis in the mouse
作者群： Bo-Yie Chen, David Pei-Cheng Lin(指導教授), Kuo-Chen Su, Yi-Ling Chen, Chia-Yung Wu, Mei-Ching Teng, Yuan-Ting Tsai(蔡媛婷), Chi-Yun Sun (孫琦雲), Soo-Ray Wang, and Han-Hsin Chang]

- (6) 挑出組織進行PAS染色

PAS 染色方法

- 1.脫蠟
- 2.oxidize in periodic acid solution 3 mins.
- 3.一次水沖掉
- 4.schiff reagent 7(eyelids)/10(gland) mins. 避光暗房
- 5.溫水5 min.
- 6.一次水沖掉
- 7.citrate buffer 微波 2mins 中火
- 8.用一次水沖掉

9. mayer's hematoxylin (蘇木紫) 2 mins 避光
 10. 一次水沖3次
 11. acid alcohol solution (酸性酒精) 10 secs
 12. 一次水沖3次
- (7) 觀察實驗組中角膜細胞與結膜內的杯狀細胞與對照組的數目並比較其差異。
- (8) 挑出組織進行HE染色
- HE 染色方法
1. 脫蠟
 2. 泡在citrate buffer中，中火mins、微火10mins
 3. 冷卻20分鐘
 4. 用一次水沖掉
 5. mayer's hematoxylin (蘇木紫) 2 mins 避光
 6. 用一次水沖掉
 7. .acid alcohol solution (酸性酒精) 10 secs
 8. 用一次水沖掉
 9. 泡伊紅
- (9) 觀察實驗組中角膜組織上皮層的變化並比較其差異。

五. 實驗結果

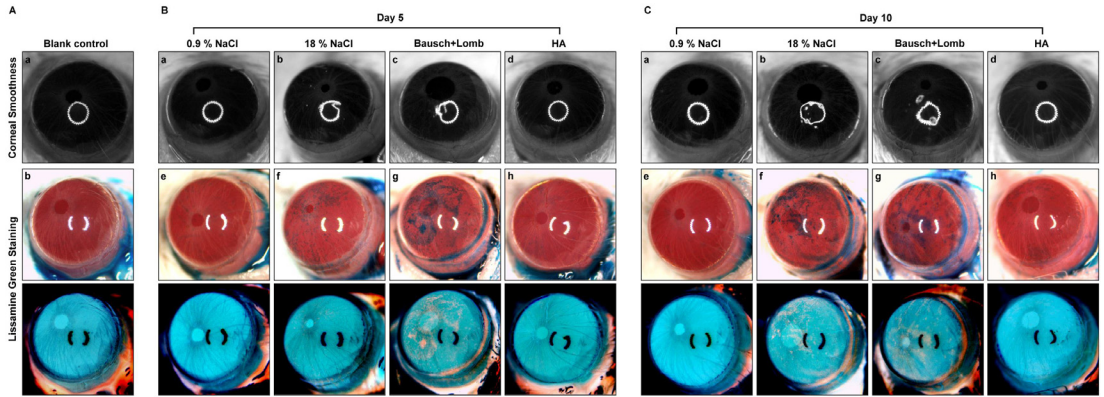
5.1 眨眼反應分析 — 於每次滴入溶液後觀察；當有外來物進入小鼠眼內時，小鼠眼睛會根據刺激大小做出適當的眨眼反應，隨溶液的刺激性加劇，小鼠眼睛的眨眼頻率會升高以利排除外來物，故可以以最直接的眨眼反應作為判斷溶液對小鼠刺激性的相對大小。

當滴入 0.9% 的 NaCl 後小鼠未有眨眼反應表現
 當滴入 18% 的 NaCl 後小鼠緊閉雙眼
 當滴入博士倫保養液後小鼠有明顯強烈的眨眼
 當滴入玻尿酸保養液後小鼠有些微眨眼

故得知刺激大小：18% 的 NaCl > 博士倫保養液 > 玻尿酸溶液 > 0.9% 的 NaCl

5.2 角膜表面平整程度分析 — 於第 10 天觀察，實驗使用環狀燈照射在小鼠角膜的表面，在正常的角膜表面則會反射有一圓形且規則的反光光環；若角膜表面不均勻，反光光環就呈現扭曲變形的外觀。由實驗結果的圖像中，可明顯的比較出 A 組(空白組)與 C 組 18% NaCl(陽性對照組)的角膜表面差異；C 組的角膜反光可發現反光光環有明顯扭曲，A 組則是正常圓形光環。在實驗的 D 組(玻尿酸)與 E 組(博士倫保養液)的外觀檢察中，發現 E 組的反光光環有扭曲的情況，D 組的反光光環為正常的圓形光環。因此，實驗證明了 E 組的保養液會直接對角膜造成變形。顯示，使用 D 組的保養液則不會對角膜的外觀上造成影響。

5.3 角膜染色分析 — 用染劑在小鼠眼表面進行染色，以染色範圍的面積大小作為判斷角膜健康程度的依據。A 組為正常健康的角膜染色，表面無大量的染劑附著；C 組為陽性對照組，角膜上有大範圍的組織被染色。相較於 D 組與 E 組，E 組的角膜組織也是有明顯的大範圍染色。因此，此實驗的結果說明了 E 組的保養液不僅僅對角膜造成變形，亦會對角膜造成損害。

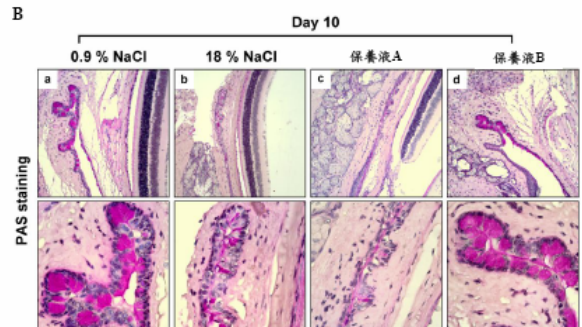


A 為空白對照組；B 為第五天的比較分析；C 為第十天的比較分析

a-d 圖為角膜表面平整程度分析，依序為 0.9%NaCl(陰性對照組)、18%NaCl(陽性對照組)、保養液 A(博士倫保養液)及保養液 B(玻尿酸保養液)

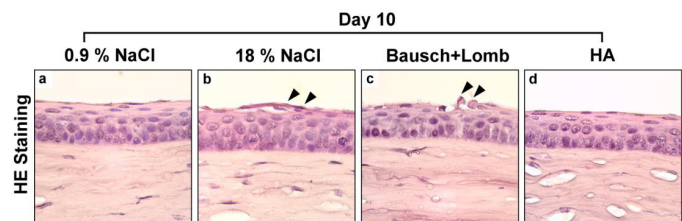
e-h 圖為角膜染色分析依序為 0.9%NaCl(陰性對照組)、18%NaCl(陽性對照組)、保養液 A(博士倫保養液)及保養液 B(玻尿酸保養液)

5.4 結膜內杯狀細胞分析 — 於第 10 天後以 PAS 染色進行觀察，杯狀細胞與淚液有著密不可分的关系，其數量多寡為淚液品質的重要依據，染色後發現在 18% NaCl(陽性對照組)與使用博士倫保養液的小鼠結膜組織，發現結膜杯狀細胞有明顯的退化和數目減少現象。相較於 0.9% NaCl 組和玻尿酸組，結膜杯狀細胞呈現正常的分布。



a 組為 0.9%NaCl(陰性對照組)杯狀細胞數目豐富；b 組為 18%NaCl(陽性對照組)杯狀細胞數目明顯下降；c 為保養液 A(博士倫保養液)杯狀細胞數目與陽性對照組類似顯示其傷害性；d 為保養液 B(玻尿酸保養液)杯狀細胞數目與陰性對照組類似

5.5 角膜上皮組織分析 — 於第 10 天後以 HE 染色進行分析，觀察角膜上皮層及內部細胞排列規則度與密度變化的比較，染色後發現在 18% NaCl(陽性對照組)與使用博士倫保養液的小鼠結膜組織，發現其角膜組織上皮層有脫落性損傷的現象，且其扁平細胞與柱狀細胞呈不規則狀排列混亂。相較於 0.9% NaCl 組和玻尿酸組，細胞排列整齊並未有脫落現象發生。



a 組為 0.9%NaCl(陰性對照組)角膜上皮細胞排列規則；b 組為 18%NaCl(陽性對照組)上皮層脫落且柱狀細胞排列混亂；c 為博士倫保養液其表現與陽性對照組類似顯示其傷害性；d 為玻尿酸保養液其表現與陰性對照組類似

六.討論與建議:

目前在市面上，有眾多不同廠牌的保養液，雖然各廠牌都有屬於自己的清洗步驟，但是說法卻眾說紛紜，沒有一定的程序可循。其中，又以保養液使用後是否能直接戴入眼睛的說法為最；因此，是商業包裝或是真如其事，於消費者的立場是值得進一步的省思。在許多保養液的使用程序中，都是標榜六合一功能(清潔、保養、殺菌、消毒、沖洗、浸泡)，然而是否對於眼角膜組織細胞是否有風險？未能進一步的說明，導致許多的消費者在浸泡隱形眼鏡後，就將隱形眼鏡直接放入眼睛。另一方面，保養液對眼睛所造成的傷害風險中，是否會損及分泌淚液的腺體或組織，或進而造成淚液的不平衡，誘發出乾眼症是值得後續進一步探討。總而言之，我們實驗的結果確實呈現了保養液對於眼睛角膜與結膜所造成的傷害，也間接說明了並非所有保養液的成份都是安全的，其中仍有不少的化學物質對於眼睛仍存在著相當高的風險，值得我們更加注意。

本實驗的結果，說明了一個對於保養液應該注意的重要處理程序。對於保養液的使用程序，建議使用食鹽水的沖洗來降低保養液對眼睛的刺激與危險性，建立一套安全的使用方法。另一方面，此小鼠模式可成為檢測保養液安全性的評估平台，建議政府相關單位可以進行大規模的篩選與檢測，除了對於商品的安全性和使用說明書作實質的查核把關外，也為未來的消費大眾提供了第一線的預防與保護。例如：用以減少消費者不依正常使用保養液的程序而造成更龐大的社會醫療成本。因此，研究結果將有助於市場的行銷服務，用以幫助消費者更注重保養液的正確使用方法，避免因錯誤使用而帶來不必要風險，或損及相關商品的可靠度和信譽。

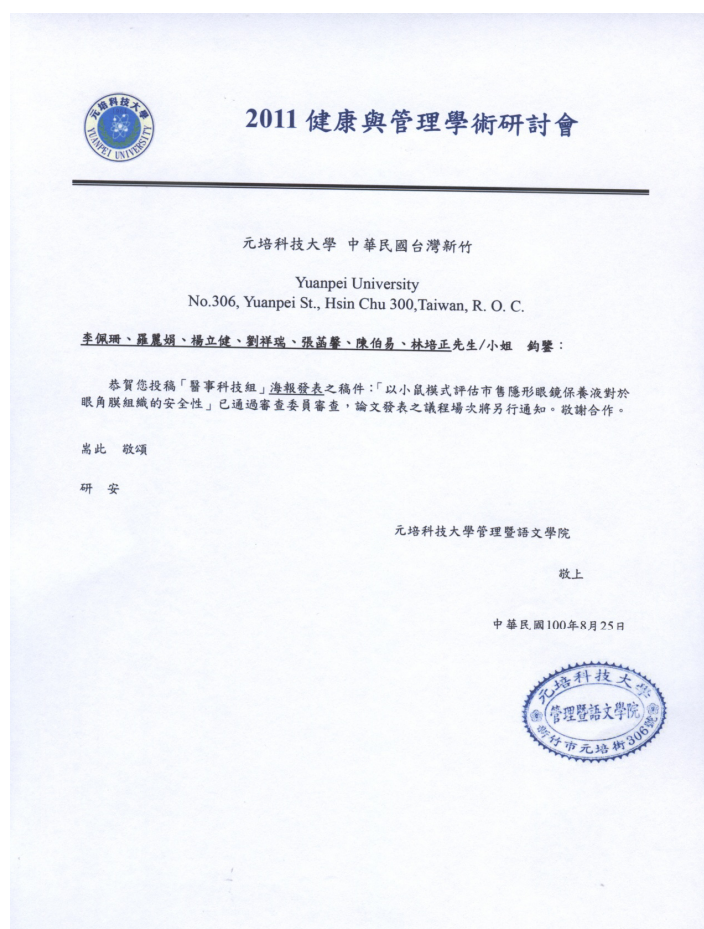
七.參考文獻

- (1) <http://www.zysj.com.cn/liunshuji/yankexue2/998-3-1.html>
- (2) 眼病學
- (3) 眼科學
- (4) 眼解剖生理學
- (5) 隱形眼鏡相關疾病治療手冊
- (6) <http://baike.baidu.com/view/88031.htm>
- (7) <http://www.clinico.com.tw/eye1/eye12/eye126/1126a.htm>
- (8) <http://www.nobelgroup.com.tw/lasikeye/excimer/113.htm>
- (9) Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. Jiang TS, Cai L, Ji WY, Hui YN, Wang YS, Hu D, Zhu J. Mol Vis. 2010 Jul 14;16:1304-16
- (12) Investigations on the conjunctival goblet cells and on the characteristics of glands associated with the eye in the guinea pig. Gasser K, Fuchs Baumgartinger A, Tichy A, Nell B. Vet Ophthalmol. 2011 Jan;14(1):26-40.
- (13) Mucins and contact lens wear. Hori Y, Argüeso P, Spurr-Michaud S, Gipson IK. Cornea. 2006 Feb;25(2):176-81.
- (14) Peterson RC, Fonn D, Woods CA, Jones L. Impact of a rub and rinse on solution-induced corneal staining. Optom Vis Sci. 2010 Dec;87(12):1030-6.
- (15) Dutot M, Reveneau E, Pauloin T, Fagon R, Tanter C, Warnet JM, Rat P. Multipurpose solutions and contact lens: modulation of cytotoxicity and apoptosis on the ocular surface. Cornea. 2010 May;29(5):541-9.

- (16) Andrasko G, Ryen K. Corneal staining and comfort observed with traditional and silicone hydrogel lenses and multipurpose solution combinations. Optometry 2008;79:444-54.
- (17) Nichols JJ. Deposition rates and lens care influence on galyfilcon A silicone hydrogel lenses. Optom Vis Sci 2006;83:751-7.
- (18) Tanti NC, Jones L, Gorbet MB. Impact of multipurpose solutions released from contact lenses on corneal cells. Optom Vis Sci. 2011 Apr;88(4):483-92.

八. 具體成果

研究成果之壁報論文發表於 2011 健康與管理學術研討會



國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

隱形眼鏡保養液在當今的市場上占有很重要消費的比例，但是到目前為止仍未有完整的動物實驗模式去證明——在不當使用下其可能對我們的靈魂之窗所造成的傷害，甚至各家知名廠商對於產品的使用方式仍然眾說紛紜，在這樣一個毫無科學根據的情況下導致消費者無所適從，希望能夠透過這個計畫，能夠正確的提供客觀的數據給大家參考，此研究結果將有幫助消費者更注重保養液的正確使用方法，避免因錯誤使用下而帶來不必要風險，或損及相關商品的可靠度和信譽，製造出使廠商與消費者雙贏的局面。此外，研究結果對於臨床視光保健衛教推展與隱形眼鏡藥水的研發具有實質的正面意義，將來期望能擴大整個究項目，更建議政府相關單位可以進行大規模的篩選與檢測，除了對於商品的安全性和使用說明書作實質的查核把關外，也為未來的消費大眾提供了第一線的預防與保護，進而使國人的健康安全得到更完善的保障。