

眼球結膜紫外線螢光影像之初期研究

The Preliminary Study of Ultraviolet Fluorescence Photography on Eye Conjunctiva

黃泰郎 Tai-Liang Huang^{1,2}, 黃維寧 Wei-Ning Huang^{1*}

¹ Department of Biotechnology, Yuanpei University of Science and Technology

² Department of Optometry, Jen-Teh Junior College of Medicine, Nursing and Management

摘要：

目前有不少生物醫學診斷或是研究，是透過自體螢光(Autofluorescence)技術來進行，2006年Ju-Lee Ooi等人，將此技術應用於眼科，研究結膜紫外線自體螢光，並透過紫外線螢光影像，嘗試瞭解結膜自體螢光與個人接觸環境及身體機能之相關性。本研究以一份調查問卷及一套精簡的結膜紫外線螢光影像設備，來觀察眼球結膜螢光影像面積與視覺障礙、飲食習慣、過去病史、工作環境等等之相關性。我們發現男性平均結膜螢光影像面積大於女性、吃甜食及女性糖尿病患之平均結膜螢光影像面積也大於不吃甜食及無糖尿病之受測者。此結膜自體螢光現象的初步研究，雖然設備與方法尚不完備，但應可以當作台灣地區民眾結膜紫外線自體螢光調查之初步參考資料，並作為未來更多不同領域的研究人員投入之基礎。

Abstract:

There are many biomedical diagnostic applications through autofluorescence tools. Ju-Lee Ooi et al. applied this technology to the eye's research in 2006. They used conjunctiva ultraviolet fluorescence photography (UVFP) as a tool to correlate the status of conjunctiva UVFP and environments and physical activities of peoples. In this study, we designed equipment for conjunctiva UVFP for measurement and used a questionnaire in an attempt to correlate the status of ultraviolet autofluorescence (UVAf) of conjunctiva with visual impairment, eating habits, past medical history, and work environment. We found that the average area of conjunctiva fluorescence image of men is larger than women. In subjects with a habit of eating sweets and in women with diabetes, the average area of conjunctiva fluorescence image appeared to be larger than those who did not eat sweets and those without diabetes. Although the equipment and methods are not yet perfect, the present preliminary study demonstrated the application of conjunctiva ultraviolet autofluorescence photography in clinical research and suggests that this equipment should be usable for future research.

Keywords: Conjunctiva, Autofluorescence, Ultraviolet fluorescence photograph (UVFP)

TOVS, 2016; 1(2):45-49

*Corresponding author: 黃維寧 Wei-Ning Huang

Department of Biotechnology, Yuanpei University of Science and Technology, NO. 306, Yuanpei St., Hsinchu City, Taiwan(ROC)

E-mail: wnhuang@mail.ypu.edu.tw

前言

自體螢光是在不外加螢光染劑的情況下，以短波長光線照射生物組織，激發組織內的螢光分子，譬如膠原蛋白、彈性蛋白、菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸、黃素腺嘌呤二核苷酸〔1-3〕，或是芳香環氨基酸族群之酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸〔4-6〕等，然後再發出波長較長的螢光。這些生物組織發出的螢光訊號，會隨著環境與濃度差異而改變其形式與強度，如此便可透過螢光訊號的變化而了解生物組織的情形。在生物醫學研究上，螢光影像具有低侵入、操作容易、即時診斷、可量化等優點。此外，它可作為闡明組織特徵的媒介，對於評估身體組織的狀況之研究是一項極具發展潛力的技術。例如，自體螢光支氣管鏡檢查(Autofluorescence Bronchoscopy)在早期肺癌篩檢上，已能提供更精確有效的診斷〔7〕。內視鏡三模式影像(Endoscopic Trimodal Imaging, ETMI)，應用在巴瑞特食道，可使高度異生或早期癌的偵測率由53%提高至90%〔8〕。而在大腸的研究中，自體螢光影像提高息肉的偵測率達32%，且多數是小於5mm的息肉〔9〕。螢光影像陸續被應用在皮膚色素沉著(Skin Pigmentation)〔10〕、尿液篩查緩發性皮膚病變紫質症(Porphyrria Cutanea Tarda)〔11〕及皮膚光化損傷〔12〕等臨床診斷。

研究團隊將此概念應用於眼科學，研究結膜紫外線自體螢光(Ultraviolet Autofluorescence; UVAF)，並開發一種結膜紫外線螢光影像(Ultraviolet Fluorescence Photography; UVFP)之技術與設備，藉以觀測眼球結膜螢光反應量之變化，研究陽光中紫外線對眼睛之傷害〔13〕。也有研究學齡兒童的陽光中紫外線對眼睛之傷害，指出結膜紫外線螢光影像和年齡增長呈負線性關係。男性比女性有更高的結膜自體螢光面積總和，右眼和左眼間或鼻側和顳側間，結膜自體螢光面積並無統計學之顯著差異。主要發現的是，結膜紫外線螢光影像在年輕人和男性較高〔14〕。也有學者嘗試研究眼球翼狀贅肉及結膜黃斑(臉裂斑)與結膜紫外線螢光影像的相關性〔15〕。近來有文獻將結膜紫外線螢光影像，當作陽光暴曬的生物標誌物，並用於研究與近

視之相關性，發現近視度數 $\leq 1.00D$ 患者的結膜螢光面積平均值比沒患近視的人結膜螢光面積為低〔16〕。

基於過去的研究成果，我們也嘗試建立眼球結膜紫外線螢光影像之技術，並企圖運用此技術，研究台灣受試者之眼球結膜螢光影像是否可能與視覺障礙、工作環境、飲食習慣、過去病史等有所關聯。因此我們設計一份問卷及一套更精簡的結膜紫外線螢光影像設備，希望進一步對結膜紫外線螢光影像的性質有更多的了解。

研究方法與設備

結膜紫外線螢光影像之獲得，主要參考Ju-Lee Ooi 團隊之裝置〔15〕，以紫外線手電筒(永隆科技)及數位相機(Canon EOS 50D)位於同側，距離受測者頭部45公分，受測者坐於對面，下巴置於托架上，額頭緊靠前額止板，保持檢測環境於暗室狀態，開啟紫外線手電筒(光照度250~300 lux)，曝光時間、光圈設定為自動。紫外線光源以Hitachi F-4500螢光儀確認其光譜分布，濾鏡則以Jasco V-730光譜儀確認其濾光範圍，使用ImageJ影像分析軟體，計算加總左右兩眼睛結膜螢光圈定範圍之像素，再轉換為面積，單位為毫米平方(mm²)。

本研究以6次新竹縣社區，眼睛健康義診時，招募願意協助之受試者為基礎，其中以2012年12月15日關西鎮(61例)及2013年2月21日竹北市(47例)之結膜紫外線螢光影像及問卷最為完整，因此本研究樣本以此2次為基礎，有效樣本總數108例。問卷內容的設計方向，包含視覺障礙、工作環境、飲食習慣、過去病史等等重點。實驗統計方法採用微軟辦公室專業版Plus 2010之Excel軟體為本論文之統計分析工具。在其資料分析工具中操作，主要為t雙尾檢定及皮爾森(Pearson)相關係數，並製作各項目之相關圖表。

結果與討論

使用之光源及濾片的螢光/吸收光譜圖如圖一，可以看出紫外線手電筒的最高波峰為378 nm，而濾鏡在412 nm以下波長之吸收度大於1(90%光被阻擋)並急速上升，

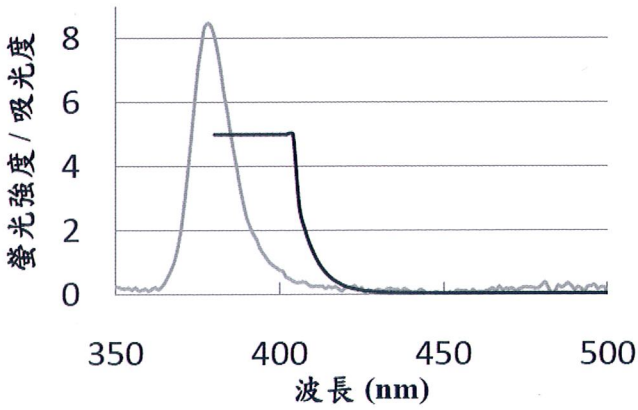


Fig. 1.

因此可以適當的進行UVFP量測。圖二則是受測者在一般可見光(左)及紫外光下的眼睛影像，圖二上為受測者無明顯結膜螢光之眼睛影像，圖二下則為受測者有結膜螢光之眼睛影像(中)及圈定其螢光區域(右)之範例，面積計算以眼睛拍照位置放置固定方格尺，重疊影像以ImageJ軟體計算分析求得(圖二右上)。相機在未加裝濾鏡下之結膜螢光影像面積與加裝後之結果無明顯差異，此可能原因是相機彩色影像來自於內部的三色濾鏡，此內建的濾鏡可能已濾除大部分的紫外光所以再外加濾鏡便無太明顯差異。考量設備須經常搬移至各社區服務，安裝上的方便與一致性，因此此研究的結

膜螢光影像，皆只使用相機內部濾鏡，未再加掛外部濾鏡。

受測者108個樣本中，男性52人，女性56人。小於50歲8人，大於90歲2人。70-79歲50人佔比最高，60-69歲25人佔比次高。平均為69歲。圖三為受試者結膜螢光影像面積與人數之分佈圖，可以發現結膜螢光影像面積並非常態分佈，反而有些近似指數分佈，此結果也與澳洲Norfolk島上6百多位居民的分佈類似〔14〕。圖四(A)為受試者年齡與結膜螢光影像面積之散佈圖，因受測者主要來自社區老人，因此不易取得年齡範圍分佈大之研究成果，但是可以發現50歲以下之受試者也有大面積結膜螢光之現象，而樣品集中的70多歲老人也看不出有結膜螢光面積增加或是減少的趨勢，計算皮爾生相關係數 $r = 0.05$ ，更可以得到結膜螢光面積與年齡不具有相關性之結論

這結果雖似乎與Norfolk島研究認為年紀與結膜螢光面積為負相關不合，不過另有研究在學學生的統計卻是高年級學生(12~15歲)有較多的結膜螢光面積〔13〕，因此結膜螢光與年紀的長幼尚無一致的結論再考量此研究受試者的年齡分佈主要為老年人，得到無相關性結果似乎也不意外。

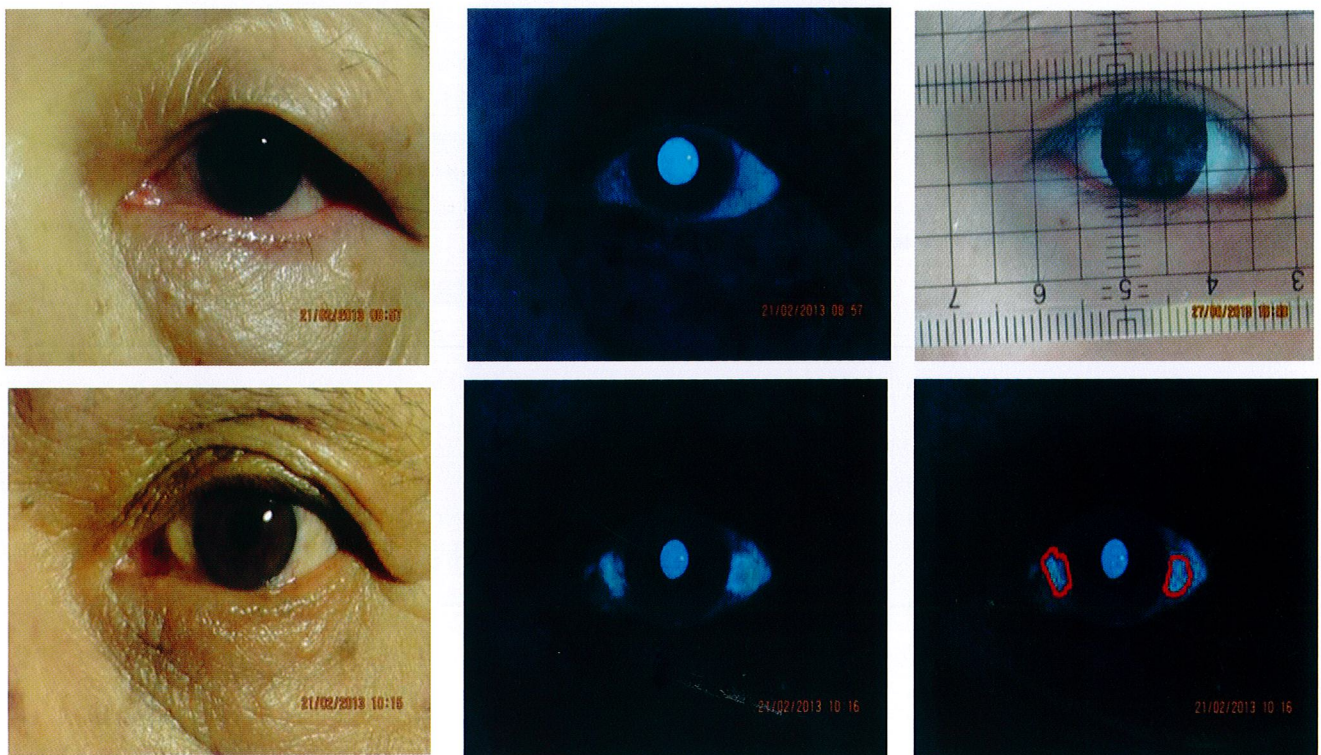


Fig. 2.

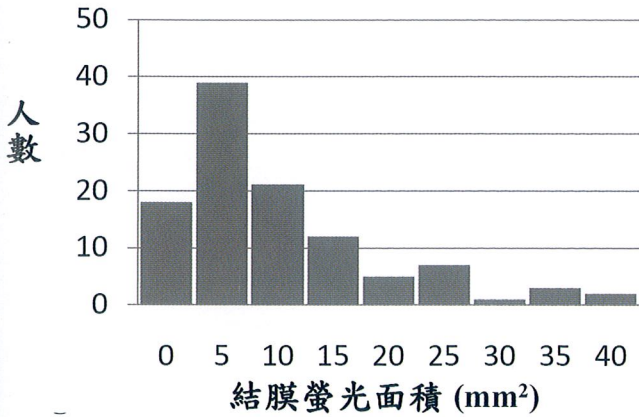


Fig. 3.

圖四(B)則是受試者性別與結膜螢光影像面積之長條圖，可以發現女性受測者結膜螢光面積多集中於5mm²以下，男性受測者結膜螢光面積較為均勻分佈，男、女受測者結膜螢光面積之平均值分別是 9.8及 6.1mm²，透過t檢定計算虛無假設之機率p值為0.026，因此可以推論男性結膜螢光面積大於女性。

在問卷中的生活習慣與結膜螢光面積的相關性分析中，是否喜歡吃甜食竟然有顯著性的差異，常吃、不吃甜食的受試者，

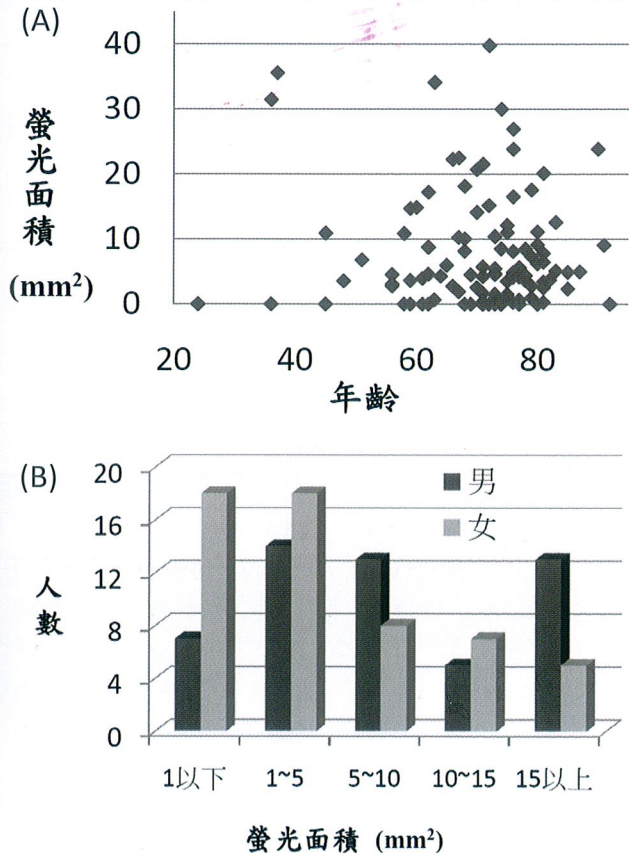


Fig. 4.

其結膜螢光面積平均值分別是 10.3及 6.4mm²，透過t檢定計算虛無假設之機率p值為0.044。由圖四男性結膜螢光面積大於女性之結論，考量男、女在結膜螢光面積上的本質差異，問卷上的數據呈現男、女對甜食的趨勢為45%及25%，因此嗜吃甜食者結膜螢光面積較高的現象，可能來自男性樣品數較多所導致。單獨分開男、女受試者進行t檢定，則不再有明顯差異，因此很困難直接推論常吃甜食對結膜螢光面積的影響。

問卷中提到自身有糖尿病的受測者中共有21位，有、無糖尿病的受測者之結膜紫外線自體螢光面積平均值分別是10.4及 7.1mm²，進行結膜螢光面積假設檢定並無顯著性差異(圖五)。問卷中糖尿病患為男、女各為9及12人，當依性別分開進行t檢定時，發現男性有、無糖尿病受試者的結膜螢光面積皆在10 mm²範圍，無明顯差異，但是女性有、無糖尿病受試者的結膜螢光面積分別為10.7及5.0 mm²，有2倍差異，t檢定之p值為0.033，具有統計上的顯著性(圖五)。因此可以發現，糖尿病患者結膜紫外線自體螢光面積在女性的變化量遠大於男性。

結論

本研究受限於受測者主要來自於社區眼睛健康義診的成員，因此尚無法全面性的了解結膜紫外線自體螢光特性，但是此以台灣居民為受測者之初步研究數據，在年齡與性別的相關性上與國外之文獻相近，也發現女性糖尿病患有較大面積的結膜紫外線自體螢光。雖然目前多數研究猜想與

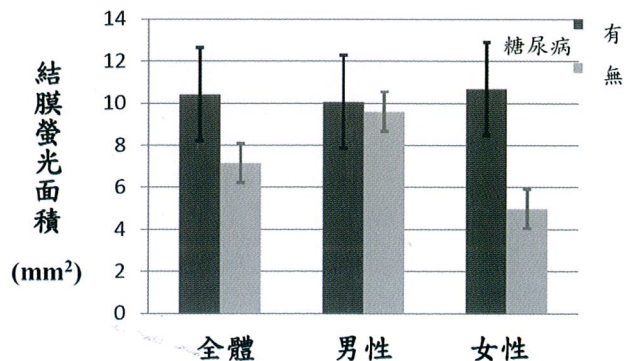


Fig. 5.

陽光中的紫外線有關，但尚無產生此結膜紫外線自體螢光組織的生物化學分析，也因此很困難深入瞭解其發生機制，若有更多不同領域的研究人員投入，相信會對此現象有更多了解，並發現其價值。

參考文獻：

1. Georgakoudi I, Jacobson BC, Müller MG, et al :NAD(P)H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes. *Cancer Res* 2002;62(3): 682-687.
2. Banerjee B1, Miedema BE, Chandrasekhar HR: Role of basement membrane collagen and elastin in the autofluorescence spectra of the colon. *J Investig Med.* 1999 47(6):326-32.
3. Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY:Creating new fluorescent probes for cell biology.*Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(12): 906-918.
4. Menter JM: Temperature dependence of collagen fluorescence. *Photochem Photobiol Sci* 2006; 5(4):403-410.
5. Boonacker E, Van Noorden CJ:Enzyme cytochemical techniques for metabolic mapping in living cells, with special reference to proteolysis.*J Histochem Cytochem*2001; 49(12) : 1473-1486.
6. Alan Waggoner:Covalent labeling of proteins and nucleic acids with fluorophores. *Methods in Enzymology*1995; 246: 362-373
7. 連啟惇:早期肺癌檢查新利器-窄頻染色及自體螢光支氣管鏡。高醫醫訊月刊 2012;31(8):18。
8. Curvers WL, Singh R, Wong Kee Song LM, et al: Endoscopic tri-modal imaging for detection of early neoplasia in Barrett's oesophagus: a multi-centre feasibility study using high-resolution endoscopy, autofluorescence imaging and narrow band imaging incorporated in one endoscopy system. *Gut* 2008; 57:167-72.
9. Ramsoekh D, Haringsma J, Poley JW, et al A back-to-back comparison of white light video endoscopy with autofluorescence endoscopy for adenoma detection in high-risk subjects.*Gut*2010; 59(6): 785-793.
10. Barbara A.Gilchrest, Thomas B.Fitzpatrick, R.Rox Anderson, John A.Parrish: Localhization of melanin pigmentation in the skin with Wood's lamp.*British Journal of Dermatology* 1977; 96:245.
11. Jackson R, Alghareeb M, Alaradi I, Tomi Z: The diagnosis of skin disease.*Dermatology Nursing* 1999; 11(4): 275-283.
12. Fulton JE Jr: Utilizing the ultraviolet (UV detect) camera to enhance the appearance of photodamage and other skin conditions. *Dermatol Surg* 1997; 23: 163-169.
13. Ju-Lee Ooi, Neil S. Sharma, Daya Papalkar, et al :Ultraviolet Fluorescence Photography to Detect Early Sun Damage in the Eyes of School-Aged Children.*American Journal of Ophthalmology* 2006;294-298.
14. JC Sherwin, AW Hewitt, LS Kearns, MT Coroneo, LR Griffiths, DA Mackey: Distribution of conjunctival ultraviolet autofluorescence in a population-based study: the Norfolk Island Eye Study. *Eye* 2011; 25(7): 893-900.
15. Ju-Lee Ooi, Neil S. Sharma, Shanel Sharma et al :Ultraviolet Fluorescence Photography: Patterns in Established Pterygia. *Ultraviolet Fluorescence Photography* 2007; 143: No. 1.
16. Justin C. Sherwin, Alex W. Hewitt, Minas T. Coroneo, Lisa S. Kearns, Lyn R. Griffiths, David A. Mackey: The Association between Time Spent Outdoors and Myopia Using a Novel Biomarker of Outdoor Light Exposure.*Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2012; 53 No. 8.