

미세표면분석 기법을 이용한 미용 콘택트렌즈와 일반 콘택트렌즈의 표면거칠기와 세균부착성 비교

Comparison of Surface Roughness and Bacterial Adhesion between Cosmetic Contact Lenses and Conventional Contact Lenses

지용우¹ · 홍순호² · 정동룡³ · 김응권^{1,4} · 이형근^{1,4}

Yong Woo Ji, MD¹, Soon Ho Hong², Dong Yong Chung³, Eung Kweon Kim, MD^{1,4},
Hyung Keun Lee, MD^{1,4}

연세대학교 의과대학 안과학교실 시기능개발 연구소¹, 연세대학교 의과대학 강남세브란스병원 진단검사의학 미생물학과²,
연세 의생명연구원 형태학연구실³, 연세대학교 의과대학 안과학교실 각막이상증 연구소⁴

Institute of Vision Research, Department of Ophthalmology, Yonsei University College of Medicine¹, Seoul, Korea
Division of Microbiology, Department of Laboratory Medicine, Gangnam Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine², Seoul, Korea
Morphology Lab., Yonsei Biomedical Research Institute³, Seoul, Korea
Institute of Corneal Dystrophy Research, Department of Ophthalmology, Yonsei University College of Medicine⁴, Seoul, Korea

Purpose: To determine the surface roughness of cosmetic and conventional contact lenses (CLs) and their susceptibility to bacterial adhesion.

Methods: Concave surface roughness of cosmetic and conventional hydrogel (Etafilcon A) CLs was measured by atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM). In particular, the surface of the color tinted area of cosmetic CLs was measured. CLs were immersed into a bacterial solution of *Pseudomonas aeruginosa* for 1, 12, or 24 hours and culture of *P. aeruginosa* that had adhered to the CLs was performed.

Results: Concave surface roughness of cosmetic CLs significantly increased compared with conventional CLs by AFM ($p < 0.05$). Bacterial colony formation of *P. aeruginosa* adhering to cosmetic CLs within one hour significantly increased compared with conventional CLs ($p = 0.047$). Adhesions of *P. aeruginosa* to CLs within one hour was found to correlate significantly with the surface roughness of CL ($r > 0.9$, $p < 0.05$). By SEM, *P. aeruginosa* had adhered to the color-tinted area more than to the non-color-tinted area of cosmetic CL.

Conclusions: Surface of cosmetic CLs was significantly rougher and initial adhesion of bacteria was higher to cosmetic CLs than to conventional CLs. In particular, an increased number of bacteria was found to be adhered to the color-tinted area of cosmetic CLs. Initial bacterial adhesion is important because it is the first stage of bacterial attachment process to any surface. After then, the adherent bacteria can progress to form a biofilm. Increased surface roughness of CLs contributes to opportunities for the CL to come into contact with bacteria, and thus, initial bacterial adhesion increases. In this study, it is clear that cosmetic CLs are more vulnerable to bacterial adhesion. To avoid serious complications, such as bacterial keratitis, the manufacturing process for smoothing and treating the surface in order to inhibit bacterial adhesion should be developed in the future.

J Korean Ophthalmol Soc 2014;55(5):646-655

Key Words: Atomic force microscope, Bacterial adhesion, Cosmetic contact lens, *Pseudomonas aeruginosa*, Surface roughness

■ Received: 2013. 9. 13. ■ Revised: 2013. 10. 5.

■ Accepted: 2014. 4. 1.

■ Address reprint requests to **Hyung Keun Lee, MD**
Department of Ophthalmology, Gangnam Severance Hospital,
#211 Eonju-ro, Gangnam-gu, Seoul 135-720, Korea
Tel: 82-2-2019-3440, Fax: 82-2-3463-1049
E-mail: shadik@yuhs.ac

* This study was presented as a narration at the 110th Annual Meeting of the Korean Ophthalmological Society 2013.

* This study was supported by a grant of the Korean Health Technology R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (HI13C0055).

미용 콘택트렌즈는 단순한 시력의 개선뿐만 아니라 홍채의 색깔을 변화시키고 강조하여 환자의 외양을 바꿀 수 있다는 점에서 최근 그 사용이 증가하고 있다. 보고에 의하면, 중국, 일본 및 국내를 포함한 동아시아에서 2012년도 전체 콘택트렌즈 사용자의 13%가 미용 목적으로 컬러 콘택트렌즈를 사용하고 있다고 한다.^{1,4} 미용 콘택트렌즈 역시 일반 연성콘택트렌즈의 사용에서 가능한 합병증이 모두 발생할 수 있는데, 각막미란, 상피결손, 점상 각막염, 각막저산소증,

© 2014 The Korean Ophthalmological Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

각막신생혈관 등은 물론이거니와 각막부종, 각막용해, 각막 뒤틀림, 테스메막류, 각막혼탁 등도 보고되고 있다.⁵⁻⁸ 특히 시력 상실의 치명적인 결과를 초래할 수 있는 세균성 각막염 및 궤양 등의 심각한 합병증 또한 종종 접하게 되는데, 환자들의 소견은 일반 연성콘택트렌즈 사용자의 그것보다 세균 감염에 더욱 취약한 양상이다.⁹⁻¹³ 콘택트렌즈와 연관된 세균 감염의 기전에 대해서는 기존의 연구들에서 이미 렌즈 표면의 소수성과 거칠기가 세균 부착에 매우 중요함을 제시한 바 있으나, 이는 그 대상이 모두 일반적인 무색의 연성콘택트렌즈에만 국한되어 있다.¹⁴⁻¹⁸ 미용 콘택트렌즈 사용으로 인한 세균성 각막염은 심각한 임상 양상 및 사회적 문제 인식에 비해 병인에 대한 과학적인 연구가 부족한 실정으로, 렌즈의 부적절한 위생관리 및 소독 등의 외부적인 요인에만 집중되어 있을 뿐 미용 콘택트렌즈의 직접적인 성상과 관련해서는 논의된 바가 없다.¹⁹⁻²⁴ 따라서 본 연구는 미용 콘택트렌즈 사용이 세균 감염과 어떠한 직접적 관련이 있는지 알아보기 위하여, 미세표면분석 기법을 이용하여 미용 콘택트렌즈 표면의 거칠기와 세균 부착의 연관성을 과학적이고 객관적으로 연구하였다.

대상과 방법

국내에서 유통되고 있는 하이드로겔(Etafilcon A, FDA Group IV, high water & ionic polymers) 재질의 일일착용 및 연속착용 콘택트렌즈 중, 미용 목적의 도색 처리가 동반된 컬러 콘택트렌즈와 일반 무색 연성콘택트렌즈를 대상으로 하였다(1-DAY ACUVUE® MOIST®/ACUVUE® 2®/1-DAY ACUVUE® DEFINE®/ACUVUE® 2® DEFINE®, Johnson & Johnson, Vision Care, Inc., NJ, USA).

원자력 현미경(atomic force microscopy, AFM) 촬영을 위하여, 형태 유지를 위한 최소의 수분만을 남겨둔 하이드로겔 콘택트렌즈 샘플을 레이저 블레이드를 이용하여 1/4 크기로 잘라서 슬라이드 위에 양면 테이프를 고정 후 각각의 내측 표면(concave surface)을 촬영하였고, 특히 미용 콘택트렌즈의 경우는 도색 처리가 되어 있는 부분을 직접 촬영하였다. 2D XY Flexure 스캐너와 High-Force Z 스캐너가 분리되어 장착되어 있고 Super-Luminescent Diode (SLD) 광원을 이용하는 Park Systems (XE-Bio)의 원자력 현미경을 이용하여 비접촉식 모드에서 진행하였다. 접촉면에 알루미늄이 코팅된 42 N/m force constant의 실리콘 캔틸레버(Si₃N₄ Cantilever)를 사용하여, 50×50 μm²의 단위 면적에 대한 Average Roughness (Ra), Root Mean Square Roughness (Rq), Ten Points Mean Height Roughness (Rz)의 거칠기 지표를 측정하였다. 하이드로겔 성분의 콘택트렌즈 샘플이

탈수되어 변형될 수 있으므로 모든 검사는 20분 이내로 최대한 빠르게 수행하였다.

거칠기 지표

1. Average Roughness (Ra):

$$\text{arithmetic average height } (z) : \bar{z} (N, M) = \frac{1}{N} \sum_{x=1}^n z(x, y)$$

$$Ra (N, M) = \frac{1}{N} \sum_{x=1}^n (z(x, y) - \bar{z}(x, y))$$

평균 height를 먼저 구하여 이를 기준으로 요철부위(peak) 즉 (+)값과, 패인 부위(valley) 즉 (-)값을 있는 그대로 계산한, 단순히 평균으로부터 벗어나 있는 정도만을 계산한 것이다. (+), (-)값이 상쇄될 수 있으므로 실제로는 다른 값의 데이터가 같은 결과값을 보일 수 있다.

2. Root Mean Square (RMS) Roughness (Rq):

$$Rq (N, M) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{x=1}^n (z(x, y) - \bar{z}(x, y))^2}$$

수식에서 보듯이 평균과의 편차에 제곱을 하여 모두 양의 차이 값으로 만든 후 이것을 제곱근한, 표면 높이에 대한 표준편차이다. Ra값이 비슷할 때, 이것을 통해서 더 분별력을 가질 수 있다. 계산 시 측정값의 제공이 되므로 심한 요철 부위나 패인 부위가 있다면 이 값은 더욱 커지게 된다. Artifact에 의해 영향을 많이 받을 수도 있겠으나, 반대로 특정 부분의 좋지 않은 거칠기 값이 더 분명하게 반영될 수 있다는 장점이 있다.

3. Ten Points Mean Height Roughness (Rz):

$$Rz (N, M) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^5 Rpi + \frac{1}{N} \sum_{i=1}^5 Rvi$$

10개의 점을 찍어 peak의 평균과 valley의 평균을 더한 값으로, 표면의 도장 두께 또는 점점 계면의 발생 정도를 간접적으로 알 수 있어, 불규칙한 표면에 미생물을 비롯한 미세 물질의 포획을 비교할 수 있다.²⁵⁻²⁷

콘택트렌즈 표면에 세균을 부착하기 위하여, 렌즈에 의한 세균성 각막염에서 흔한 균주인 *Pseudomonas aeruginosa*의 대표 균주(*P. aeruginosa* ATCC No. 29853)를 사용하였다. 탁도계(DensiCHEK™ Plus, BioMérieux, Inc.)를 이용하여 1 McFarland, 즉 3.0×10⁸ CFU/mL의 세균 용액을 준비한 후 그 중 500 μL만 취하여, 2.5×10⁷ CFU/mL의 3 cc 세균 용액을 12-well plate에 준비하였다. 먼저 상온 25°C에서 세균 용액을 24시간 이상 방치해도 세균 증식으로 인하여 탁도가 변하지 않음을 확인하였다. 준비된 세균 용액에 각각의 콘택트렌즈를 충분히 잠기도록 담근 후, Parafilm으로 밀봉하여 상온 25°C에서 각각 1시간, 12시간,

24시간 동안 렌즈 표면에 세균이 부착되도록 유도하였다. 해당 시간이 경과하면 렌즈를 꺼내어 부드럽게 2-3회 가량 물기를 털어내고 천천히 흐르는 생리식염수 20 cc로 천천히 3회 세척하여 콘택트렌즈 표면에 부착력 없이 존재하는 세균을 제거하였다. 이후 생리식염수 5 cc가 담겨 있는 멸균 tube에 오염되지 않도록 조심히 렌즈를 옮겨 담은 후 Laboratory Vortex Mixer (VORTEX-GENIE 2, Scientific Industries, Inc., USA)를 이용하여, 3000 rpm로 1분씩 렌즈 표면에 부착된 세균을 생리 식염수에 탈착 및 분리시켰다. 분리된 세균이 담겨 있는 용액에서 1:1000 백금이를 이용하여 Right angle streaking method for urine culture 방법으로 혈액 한천 배지(BAP)에 선상도말하여 세균을 순수 분리하였다. 도말한 배지는 37°C, 5% CO₂ incubator 안에서 18 시간 동안 뒤집어 배양하였고, 사진을 촬영하여 발생한 세균 군집 수를 계산, 비교하였다. (단, 24시간 동안 세균을 부착하는 경우 세균 군집 수가 육안으로 세기 힘들 정도로 증가하여 1시간, 12시간 세균 부착 시보다 세균 용액의 농도를 1/4로 희석하여 시행한 후, 발생한 세균 군집 수에 4배를 하여 계산하였다.)

미용 콘택트렌즈의 표면 상태 및 세균 부착 양상을 직접 관찰하기 위하여 주사 전자 현미경(Scanning electron microscopy, SEM)을 이용하였다. 멸균 상태 및 24시간 동안 세균을 부착한 상태의 콘택트렌즈를 촬영 대상으로, 0.1 M PBS 완충액(pH 7.4)으로 조정된 Karnovsky 고정액(2% Glutaraldehyde, 2% Paraformaldehyde, 0.5% CaCl₂)으로 6 시간 이상 전 고정하였다. 0.1 M PBS로 2시간 세척하여 1% OsO₄ (0.1 M PBS buffer)로 2시간 고정하였다. 고정된 샘플은 0.1 M PBS buffer로 10분간 세척 후 저농도 Alcohol에서 무수알코올까지 탈수(50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 순서)한 후에 Isoamyl acetate로 치환 후 약 30분-1시간 후에 임계점 건조(CPD-critical point dry: Hitachi HCP-2)한 다음 Ion coater (Eiko IB-3형 - Japan)를 이용하여 30 nm 두께로 Gold coating하여 FE-SEM (Japan, Hitachi S-800)으로 콘택트렌즈 내측 표면의 도색 처리된 부분과 그렇지 않은 부분 및 세균이 부착된 모습을 촬영하였다.

통계학적 분석은 통계프로그램 SPSS (version 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 독립 표본 *t* 검정과 *Pearson* 상관분석을 이용하여 비교 분석하였다. 통계학적 유의성의

기준은 *p*<0.05로 정의하였다.

결 과

실험에 사용된 하이드로겔 콘택트렌즈의 성분은 모두 Etafilcon A (FDA Group IV)로 함유율(Water Content 58%)과 산소투과율(Dk/t 25.5×10⁻⁹)은 차이가 없었다. 동일 사용 형태(Daily wear, Extended wear)의 콘택트렌즈는 도색 처리와 상관 없이 모든 기초 성상이 동일하였으며, 연속착용 렌즈 (Extended wear)의 경우는 일일착용렌즈(Daily wear)에 비하여 직경과 곡률 반경에서 약간의 차이를 보였다 (Table 1). 연구에 사용된 미용 콘택트렌즈는 렌즈 전면과 후면의 사이에 염료를 넣고 접합시키는 Sandwich method (ACUVUE® Beauty-Wrapped-In-Comfort™) 공법을 사용하여 실제 노출된 표면의 재질은 일반 무색의 콘택트렌즈와 동일한 성분으로 간주할 수 있었으며, 그 무늬 및 형상은 Fig. 1과 같았다.

원자력 현미경을 이용한 콘택트렌즈 표면의 거칠기 평가 각 콘택트렌즈의 내측 표면에 대하여 2500 μm² 단위 면적의 3-dimensional image를 구현한 후 거칠기의 지표인 Average Roughness (Ra), Root Mean Square Roughness (Rq), Ten Points Mean Height Roughness (Rz)를 각각 측정



Figure 1. Shape and tinted pattern of four hydrogel contact lenses (CL) used in the study.

Table 1. Contact lens (CL) used in the study

Contact lens type	Recommended replacement	Material	Water content (%)	Dk/t value (@-3.00D)	BC (mm) /Dia (mm)	Center thickness (@-3.00D) (mm)
Conventional	Daily wear	Etafilcon A	58	25.5 × 10 ⁻⁹	8.5/14.2	0.084
	Extended wear	Etafilcon A	58	25.5 × 10 ⁻⁹	8.3/14.0	0.084
Cosmetic	Daily wear	Etafilcon A	58	25.5 × 10 ⁻⁹	8.5/14.2	0.084
	Extended wear	Etafilcon A	58	25.5 × 10 ⁻⁹	8.3/14.0	0.084

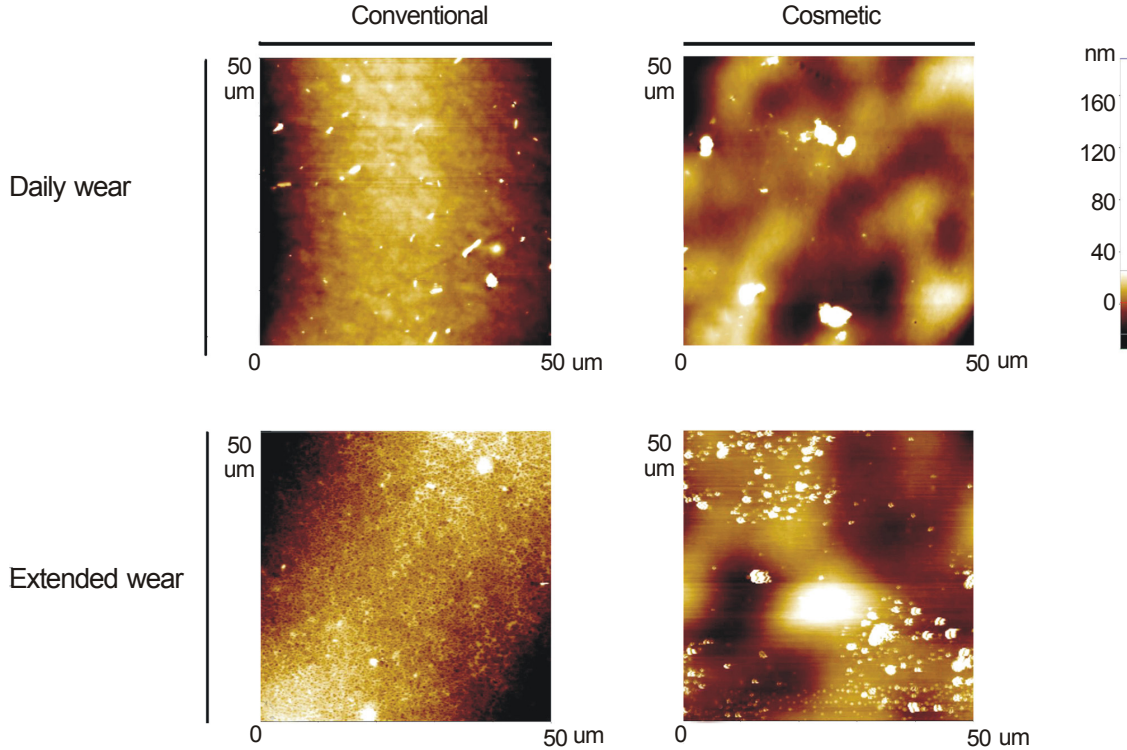


Figure 2. Atomic force micrographs of surface of different contact lenses (CLs) on the concave side. The surface topography of four different CLs was obtained through atomic force microscopy (AFM) analysis over a $2500 \mu\text{m}^2$ surface area on the concave side. Especially measuring cosmetic CLs, color tinted area was contained. (A) Conventional CL – daily wear. (B) Cosmetic CL – daily wear. (C) Conventional CL – extended wear. (D) Cosmetic CL – extended wear.

Table 2. Surface roughness of contact lenses (CLs) measured by atomic force microscope (AFM) on concave side (nm at $2500 \mu\text{m}^2$)

	Average roughness (Ra)		Root mean square roughness (Rq)		Ten points mean height roughness (Rz)	
	Conventional	Cosmetic	Conventional	Cosmetic	Conventional	Cosmetic
Daily wear	9.68	34.03	12.39	54.86	182.12	809.08
Extended wear	10.89	51.69	14.27	73.14	203.50	819.35

하였다(Fig. 2). 그 결과, 일반 콘택트렌즈와 일일착용렌즈에 비하여 미용 콘택트렌즈와 연속착용렌즈 표면의 거칠기 측정치가 더 증가한 양상을 보였다(Table 2). 일반 콘택트렌즈의 거칠기 값은 $Ra=10.29 \pm 0.85 \text{ nm}$, $Rq=13.33 \pm 1.33 \text{ nm}$, $Rz=192.81 \pm 15.11 \text{ nm}$ 인 반면, 미용 콘택트렌즈는 $Ra=42.86 \pm 12.49 \text{ nm}$, $Rq=64.00 \pm 12.93 \text{ nm}$, $Rz=814.21 \pm 7.26 \text{ nm}$ 이었으며, 특히 Rq와 Rz는 독립표본 t 검정상 통계학적으로 의미 있는 차이를 보였다(Ra ; $p=0.067$, Rq ; $p=0.031$, Rz ; $p=0.002$). 일일착용콘택트렌즈의 거칠기 값은 $Ra=21.86 \pm 17.22 \text{ nm}$, $Rq=33.62 \pm 30.03 \text{ nm}$, $Rz=495.60 \pm 443.33 \text{ nm}$ 인 반면, 연속착용렌즈는 $Ra=31.29 \pm 28.85 \text{ nm}$, $Rq=43.71 \pm 41.63 \text{ nm}$, $Rz=511.42 \pm 435.47 \text{ nm}$ 로 증가된 양상을 보였으나, 이는 모두 통계학적으로 의미 있는 차이를 보이지는 않았다(Ra ; $p=0.730$, Rq ; $p=0.807$, Rz ; $p=0.975$) (Table 3).

콘택트렌즈의 종류에 따른 *P. aeruginosa* 부착 비교
 각 콘택트렌즈의 표면에 *P. aeruginosa* 균이 부착되도록 유도시간을 달리하여(1시간, 12시간, 24시간) 시행한 후, 배양된 세균 균집 수를 측정하였다(Fig. 3). 그 결과, 일반 콘택트렌즈와 일일착용렌즈에 비하여 미용 콘택트렌즈와 연속착용렌즈 표면의 *P. aeruginosa* 부착으로 인한 세균 균집 수가 더 증가하였다(Table 4). 일반 렌즈에 부착 배양된 세균 균집 수는 1 시간 부착 시 $4.53 \pm 0.04 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$, 12 시간 부착 시 $12.68 \pm 0.88 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$, 24시간 부착 시 $94.50 \pm 7.50 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$ 인 반면, 미용 콘택트렌즈는 1 시간 부착 시 $7.98 \pm 1.10 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$, 12시간 부착 시 $17.55 \pm 3.11 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$, 24시간 부착 시 $117.50 \pm 21.92 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$ 이었으며, 특히 초기 1시간 동안 세균을 부착하여 배양된 세균 균집 수는 독립표본 t 검정상 통계학적으로

Table 3. Comparison of concave surface roughness between different contact lenses (CLs)

(a) Conventional vs Cosmetic (nm at 2500 μm^2)

Average roughness (Ra)			Root mean square roughness (Rq)			Ten points mean height roughness (Rz)		
Conventional	Cosmetic	p-value	Conventional	Cosmetic	p-value	Conventional	Cosmetic	p-value
10.29 \pm 0.85	42.86 \pm 12.49	0.067	13.33 \pm 1.33	64.00 \pm 12.93	0.031*	192.81 \pm 15.11	814.21 \pm 7.26	0.002†

Values are presented as mean \pm SD.

* $p < 0.05$ by independent t -test; † $p < 0.01$ by independent t -test.

(b) Daily wear (DW) vs Extended wear (EW) (nm at 2500 μm^2)

Average roughness (Ra)			Root mean square roughness (Rq)			Ten points mean height roughness (Rz)		
DW	EW	p-value	DW	EW	p-value	DW	EW	p-value
21.86 \pm 17.22	31.29 \pm 28.85	0.730	33.62 \pm 30.03	43.71 \pm 41.63	0.807	495.60 \pm 443.33	511.42 \pm 435.47	0.975

Values are presented as mean \pm SD.

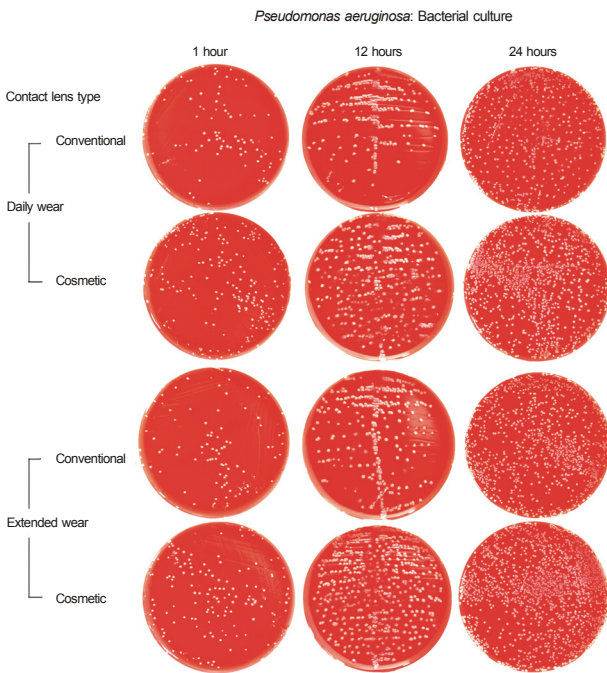


Figure 3. Bacterial culture of *Pseudomonas aeruginosa* adhering to contact lenses after immersing the contact lenses (CLs) into bacterial solutions for 1 hour, 12 hours, or 24 hours, using right angle streaking method. (The bacterial solution for *P. aeruginosa* adhesion to CLs during 24 hours was diluted to 1:4, compared to others for 1 and 12 hours.)

로 의미 있는 차이를 보였다(1 hour; $p=0.047$, 12 hours; $p=0.167$, 24 hours; $p=0.295$). 일일착용렌즈에 부착 배양된 세균 균집 수는 1시간 부착 시 $5.85 \pm 1.91 \times 10^5$ CFU/mL, 12시간 부착 시 $13.70 \pm 2.33 \times 10^5$ CFU/mL, 24시간 부착 시 $95.60 \pm 9.05 \times 10^5$ CFU/mL인 반면, 연속착용렌즈는 1시간 부착 시 $6.65 \pm 2.97 \times 10^5$ CFU/mL, 12시간 부착 시 $16.53 \pm 4.56 \times 10^5$ CFU/mL, 24시간 부착 시 $116.40 \pm 23.48 \times$

10^5 CFU/mL로 증가된 양상을 보였으나 이는 모두 통계학적으로 의미 있는 차이를 보이지는 않았다(1 hour; $p=0.779$, 12 hours; $p=0.517$, 24 hours; $p=0.363$) (Table 5).

콘택트렌즈 내측 표면의 거칠기와 *P. aeruginosa* 부착과의 연관성

콘택트렌즈 표면의 거칠기가 세균 부착과 관련이 있는지를, 특히 초기 1시간 동안 표면의 세균 부착과의 연관성을 통계학적으로 분석하였다. Pearson 상관분석상 렌즈 내측 표면의 거칠기(Ra, Rq, Rz)는 초기 1시간 동안 *P. aeruginosa* 부착에 따른 세균 균집 수와 유의한 양의 상관 관계를 보였으며, 12시간 및 24시간 동안 세균 부착을 시행한 경우에는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Ra-1 hour; $r=0.998$, $p=0.002$, Rq-1 hour; $r=0.998$, $p=0.002$, Rz-1 hour; $r=0.956$, $p=0.044$) (Fig. 4).

주사 전자 현미경으로 관찰한 미용 콘택트렌즈의 표면 및 *P. aeruginosa*의 부착 양상

미용 콘택트렌즈의 표면을 주사 전자 현미경을 이용하여 관찰하였다. 특히 초기 1시간 동안 *P. aeruginosa*를 부착한 렌즈의 표면을 살펴 본 결과 Fig. 5와 같았다. 색깔이 없는 부분(N)은 표면이 매끈한 반면, 도색 처리된 부분(C)은 거칠고 불규칙하였다(Fig. 5A; 100배율, Fig. 5B; 1000배율, B 사진은 A의 검은색 사각형 부분을 확대하였음). 미용 콘택트렌즈의 표면 내에서도 색깔이 없는 부분에 비하여 도색 처리된 거칠고 불규칙한 표면에 *P. aeruginosa*가 더 부착되어 있는 모습(화살표머리)을 확인할 수 있었고(Fig. 5C; 2000배율), 이를 고배율로 촬영하였다(Fig. 5D; 10000배율).

Table 4. Bacterial culture of *Pseudomonas aeruginosa* adhering to different contact lenses (CLs), after immersing the CLs into bacterial solutions for 1 hour, 12 hours, or 24 hours ($\times 10^5$ CFU/mL)

	Immersing time - 1 hour		Immersing time - 12 hours		Immersing time - 24 hours	
	Conventional	Cosmetic	Conventional	Cosmetic	Conventional	Cosmetic
Daily wear	4.50	7.20	12.05	15.35	89.20	102.00
Extended wear	4.55	8.75	13.30	19.75	99.80	133.00

Table 5. Comparison of *Pseudomonas aeruginosa* adhering to different contact lenses (CLs), after immersing the CLs into bacterial solutions for 1 hour, 12 hours, or 24 hours

(a) Conventional vs Cosmetic ($\times 10^5$ CFU/mL)

Immersing time - 1 hour			Immersing time - 12 hours			Immersing time - 24 hours		
Conventional	Cosmetic	<i>p</i> -value	Conventional	Cosmetic	<i>p</i> -value	Conventional	Cosmetic	<i>p</i> -value
4.53 \pm 0.04	7.98 \pm 1.10	0.047*	12.68 \pm 0.88	17.55 \pm 3.11	0.167	94.50 \pm 7.50	117.50 \pm 21.92	0.295

Values are presented as mean \pm SD.

**p* < 0.05 by independent *t*-test.

(b) Daily wear (DW) vs Extended wear (EW) ($\times 10^5$ CFU/mL)

Immersing time - 1 hour			Immersing time - 12 hours			Immersing time - 24 hours		
DW	EW	<i>p</i> -value	DW	EW	<i>p</i> -value	DW	EW	<i>p</i> -value
5.85 \pm 1.91	6.65 \pm 2.97	0.779	13.70 \pm 2.33	16.53 \pm 4.56	0.517	95.60 \pm 9.05	116.40 \pm 23.48	0.363

Values are presented as mean \pm SD.

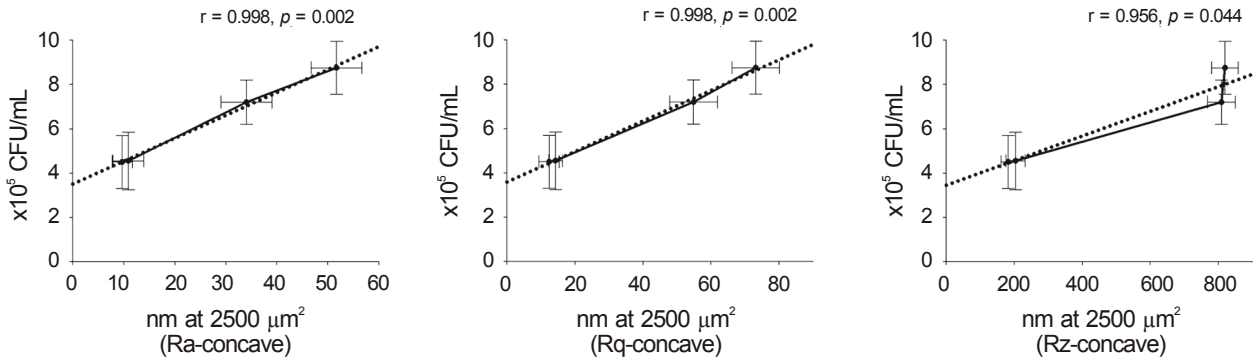


Figure 4. Correlation of surface roughness and initial (1 hour) number of *Pseudomonas aeruginosa* adhering to contact lenses (CLs) (*r*: Pearson correlation coefficient $-1 \leq r \leq 1$ by the Pearson correlation test).

고찰

본 연구는 동일한 제조사, 동일한 공정 및 동일 성분의 콘택트렌즈를 대상으로 연구한 결과, 일반적인 무색 콘택트렌즈에 비하여 미용 콘택트렌즈의 내측 표면의 거칠기가 통계학적으로 유의하게 증가하였음을 확인하였다. 또한 미용 콘택트렌즈에서 초기 1시간 동안의 렌즈 표면의 *P. aeruginosa* 균의 부착이 증가하였고, 이는 일반 렌즈에 비하여 통계학적으로 유의한 차이를 보였다. 이를 바탕으로 렌즈 표면의 거칠기와 초기 세균의 표면 부착 정도가 통계학적으로 유의한 양의 상관관계를 갖음을 알 수 있었다.

세균의 감염에 있어 초기 세균의 부착 과정은 매우 중요하다. 혈관도관, 도뇨관, 심혈관 이식재 등의 인체 내 삽입

용 의료기기에서 많이 연구된 바와 같이, 일반적으로 세균의 부착 과정은 크게 두 단계로 나눌 수 있다.²⁸ 첫 단계는 브라운 운동을 하던 세균 세포들이 반테르 발스 힘, 이온차 등에 의해 불규칙하게 표면에 붙게 되는 것이다. 이것은 초기 약 1시간 내에 일어나는 현상으로, 가역적이고 우연적인 결합이나 특히 편모나 섬모 등의 물리적 능력이 없는 세균의 경우는 더더욱 감염의 시작이라는 점에서 중요하다. 부착 후 입자 간의 소수성, 전위 차 등으로 인하여 결합이 좀 더 고착화되면서 두 번째 단계인 비가역적인 부착 과정으로 넘어가게 된다. 이것은 시간중속적인 과정으로, 세균과의 접촉 후 약 24시간 정도 지나서 나타나게 된다. 초기 부착된 세균들이 점액성 다당류(Exopolymers)를 분비하여 세균-표면뿐만 아니라 세균-세균 간의 비가역적인 생물막

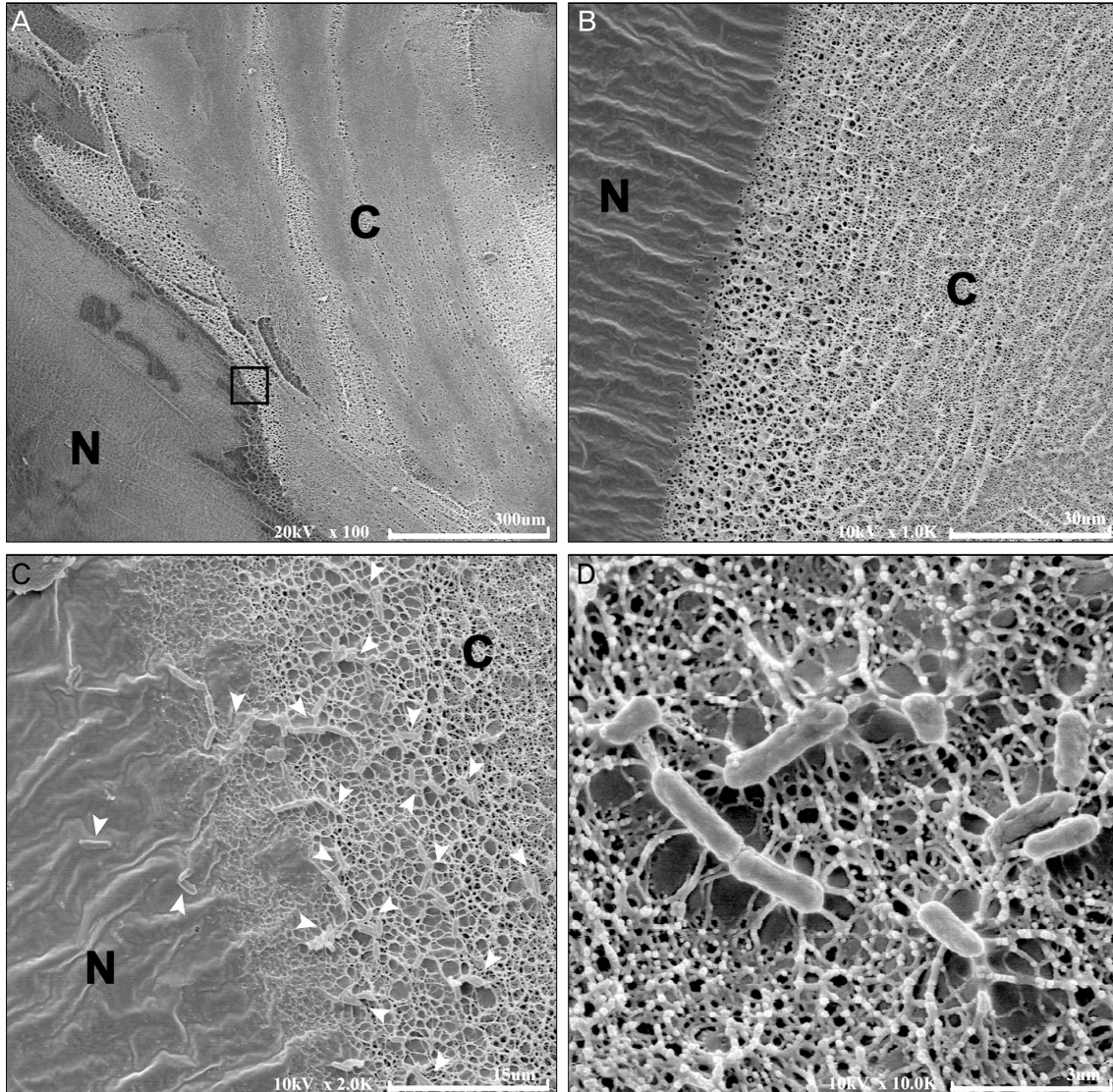


Figure 5. Scanning electron microscopic photographs of cosmetic contact lens surface and its *Pseudomonas aeruginosa* adhesions. Cosmetic contact lenses (CLs) were immersed into *P. aeruginosa* for 24 hours. After the CLs were washed and processed for scanning electron microscopy (SEM). Then, the microscopic photographs of concave side of CLs were taken from SEM. (A) Color tinted area of cosmetic CL was rougher than non-color tinted ($\times 100$). (B) Black lined square of Fig. A was observed at higher magnification ($\times 1000$). (C) *P. aeruginosa* (white arrow head) was adhered to irregular surface of cosmetic CL. Especially, more bacterial adhesions were found to color tinted area ($\times 2000$). (D) *P. aeruginosa* adhesion to surface of CL was observed at high magnification ($\times 10000$). (N: non-color tinted area, C: color tinted area, white arrow head: *P. aeruginosa* adhesions).

(biofilm)을 형성하게 되므로, 일반적인 세척 및 소독으로도 파괴되지 않을 수 있다.^{23,29-32} 이처럼 초기 세균의 표면 부착 과정은 생물막 형성으로 진행할 수 있으므로 중요하다.

본 연구에 사용된 미용 콘택트렌즈는 시중에 유통되는 것들 중에서도 비교적 고가이면서 안정성이 높은 제품으로, 함유율이 높고 이온성을 갖는 FDA Group IV의 하이드로겔(Etafilcon A) 중합체로 이루어져 있는 것을 대상으로 하였다. 함유율이 낮고 비이온성의 polyHEMA만으로 구성된 (FDA Group I) 재질이 아닌, Etafilcon A 하이드로겔 렌즈

는 일일 또는 2주 착용 후 교체하도록 되어 있어 세균 감염의 기회가 비교적 적으며, 도색 처리의 방식도 염료가 각막에 직접적으로 닿지 않게 하는 sandwich 방식(ACUVUE® BWIC™)이라 좀더 안정적이라고 알려졌다. 그러나 본 연구에서 원자력 현미경으로 미용 콘택트렌즈의 내측 표면 중 도색 처리된 부분의 거칠기를 측정된 결과, 일반 렌즈보다 통계학적으로 유의하게 증가되어 있었으며, 주사 전자현미경을 통한 직접적인 관찰을 통해서도 도색 처리된 부분이 무색의 부분에 비하여 더 거칠고 불규칙한 표면을 갖

음을 확인하였다.

원자력 현미경으로 측정된 거칠기 지표 중 Average Roughness (Ra)는 평균 height를 먼저 구하여 이를 기준으로 peak 즉 (+)값과 valley 즉 (-)값을 있는 그대로 계산한, 단순히 평균으로부터 벗어나 있는 편차만을 계산한 것이므로, (+), (-)값이 상쇄되어 실제 거친 정도에 비하여 작은 값을 갖을 수 있다. 따라서 Ra 값으로 분별력이 떨어질 때에는 Root Mean Square Roughness (Rq)를 사용하게 되는데, 계산 시 제곱이 되므로 매우 심한 요철부위나 패인 부위가 있다면 이 값은 더욱 커지게 된다. Artifact에 의해 영향을 많이 받을 수도 있겠으나, 반대로 특정 좋지 않은 부분의 거칠기가 더욱 많이 반영이 될 수 있다는 장점이 있다. Ten Points Mean Height Roughness (Rz)는 10 개의 점을 찍어 peak의 평균과 valley의 평균을 더한 값으로, 지엽적이기는 하나 도료의 두께나 이물질이 포착될 수 있는 공간을 알아볼 수 있는 지표이다. 본 연구는 수분이 있어야 형태를 유지하는 하이드로겔 연성콘택트렌즈의 오목한 내측 표면을 대상으로 하였는데, 2500 μm^2 의 넓은 면적을 원자력 현미경으로 촬영하는 데에는 수십 분이 걸리게 되어 최소의 수분으로 렌즈의 형태를 유지시키는 것이 쉽지 않았다. 측정된 시료가 전체적으로 편평하지 못하여 평균 height가 달라지게 되면서 Ra 값이 유의한 차이를 보이지 않았던 것으로 생각되나, Rq에서는 불규칙한 부분이 더 반영되므로 미용 콘택트렌즈의 값이 더 증가하였고 이는 통계학적으로 유의한 결과를 보였던 것으로 해석된다. Rz 역시 미용 콘택트렌즈에서 더 증가하는 유의한 결과를 보였는데, 용매 속에서 브라운 운동을 하던 세균의 포착이 미용 콘택트렌즈의 거친 표면에서 더 일어나게 되어 초기 세균 부착이 증가할 수 있음을 예상할 수 있다.

미용 콘택트렌즈 사용자의 많은 수가 청소년들로, 부족한 관리 교육 및 위생 관념으로 인하여 비위생적인 렌즈 보관함으로부터 세균 오염이 시작되는 경우가 대부분이다. 본 연구는 이러한 임상 행태와 유사한 조건으로 실험하기 위하여, 탁도계를 이용하여 일정한 농도의 세균 용액을 준비하여 콘택트렌즈를 충분히 잠기도록 담근 후 일정시간을 경과하도록 하였다. 콘택트렌즈와 연관된 세균성 각막염의 흔한 균 주 중, 보다 소수성을 갖는 *P. aeruginosa*를 이용하여 콘택트렌즈의 표면에 균이 부착되도록 유도하였는데, 거칠고 불규칙한 표면을 갖고 있는 미용 콘택트렌즈의 세균 부착이 초기 1시간에서 유의하게 증가하였다. 이는 렌즈 표면의 불규칙함으로 인하여 세균과 렌즈의 접촉 면적 및 기회가 증가하게 되어 실제 세균-표면 간의 결합력이 극대화됨으로써 나타난 결과로 생각할 수 있다. 미용 콘택트렌즈 내에서도 무색 부분보다 도색 처리된 부분에서 세균의

부착이 더 많이 일어나 있음을 주사 전자 현미경을 통하여 확인할 수 있었다. 반면 24시간 동안 세균 용액에 보관하였던 콘택트렌즈의 표면에 부착한 세균의 군집 수는 매우 많이 증가하였으나, 예상과는 달리 생물막을 형성한 모습을 관찰하지는 못하였다.

이를 바탕으로, 동일한 성분의 콘택트렌즈들을 대상으로 측정된 거칠기 값과 초기 1시간 동안의 세균 부착의 정도를 분석한 결과, 통계학적으로 매우 유의한 양의 상관관계를 갖음을 밝혔다. 예상했던 대로 렌즈 표면의 거칠기가 초기의 세균 부착에 중요한 영향을 미친다는 결론을 얻었다. 12시간 및 24시간 동안 세균 용액에 담근 후 배양한 세균 군집 수는 콘택트렌즈 표면의 거칠기와 통계학적으로 유의한 상관관계를 갖지 않았는데, 이는 초기에 불규칙한 면적에 세균의 부착이 완료되면 그 이후에는 세균-표면 간의 관계가 아닌 세균-세균 간의 결합이 더 중요하게 작용하여 그러할 것으로 생각한다. 본문의 결과에 명시하지는 않았으나, 초기의 세균 부착은 12시간 및 24시간 후의 부착된 세균 수와 당연히 통계학적으로 유의한 양의 상관관계를 보였다(Pearson coefficient $r > 0.9$, $p < 0.05$).

연구에 사용된 콘택트렌즈 중 연속착용렌즈는 장기 사용의 편의를 위해 일일착용렌즈에 비하여 직경과 곡률반경이 약간 더 작았으나, 일반 무색 콘택트렌즈와 미용 콘택트렌즈에 상관없이 일일착용과 연속착용렌즈 간의 거칠기, 세균의 부착 정도 등의 모든 데이터는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

본 연구는 Etafilcon A를 중합체로 사용한 하이드로겔 연성 콘택트렌즈만을 대상으로 하였다는 한계가 있다. 현재 시중에 유통되는 제품으로는 하이드로겔 재질뿐만 아니라, Enfilcon A, Narafilcon A, Galyfilcon A, Comfilcon A, Senofilcon A, Lotrafilcon A&B, Balafilcon A 등의 다양한 실리콘 하이드로겔 재질 또한 사용되고 있고, 재질 성분에 따라서도 모두 다른 성상을 띠고 있다. 특히 청소년들에게 문제가 되는 저가의 미용 콘택트렌즈는 단순 polyHEMA만으로 구성된 렌즈인 경우가 많아, 본 연구의 결과가 이러한 모든 렌즈의 경우를 대표하기에는 한계가 있을 수 있다. 그러나 기존의 연구에서 실리콘 하이드로겔 콘택트렌즈는 하이드로겔 렌즈에 비하여 더 소수성을 띠고 있어, 소수성을 보이는 세균세포와의 부착이 더 용이하다고 알려졌다.^{17,18,33} 또한 Etafilcon A는 하이드로겔 중에서도 FDA Group IV에 속하는 보다 친수성의 우수한 재질로, 본 재질만의 일반 무색의 콘택트렌즈와 미용 콘택트렌즈를 비교함과 동시에 실제 임상에서 세균성 각막염의 가장 흔한 균주를 사용함으로써, 보편적이고 의미 있는 결과로 받아들여기에 무리가 없다. 단, 시간, 비용 등의 한계로 많은 수의 렌즈를 연구할 수 없었

며, 콘택트렌즈의 내측 표면 중 일부(2500 μm^2)의 거칠기를 측정하였다는 점이 추후 보완해야 할 부분이었다. 주사전자 현미경으로 외측 표면을 먼저 촬영해 본 결과, 내측과 차이를 보이지 않아 각막과 직접적으로 접촉하는 내측 표면만을 대상으로 하였다. 물론, 세균의 부착 정도를 비교하는 실험을 할 때에도 콘택트렌즈의 오목한 내측에만 세균 용액을 넣어서 시행할 수도 있었으나, 연성콘택트렌즈의 조작이 매우 어려울 뿐만 아니라 이는 실제 렌즈의 보관 형태와도 다르므로 렌즈 전체를 세균에 노출시키는 방법을 사용하였다. 본 연구는 실험적 연구에 한하였으므로, 실제 생물 연구 또는 임상 연구에 적용할 직접적인 데이터를 제시하지 못한다는 점도 향후에 추가 연구가 필요한 부분이다.

미용 목적의 컬러 콘택트렌즈는 우리나라를 비롯한 많은 나라에서 의사의 처방 없이 유통되고 있다. 일반 무색의 콘택트렌즈에 비하여, 미용 콘택트렌즈의 표면은 더 거칠고 불규칙하여 초기 세균의 부착이 용이하기 때문에 비위생적인 관리를 하는 경우 감염에 더욱 취약할 수 있는데, 이는 비단 시중에 유통되는 저가 제품에서만 발생 가능한 문제가 아니라 정상적인 제조 공정을 거친 고가 제품조차도 갖을 수 있는 문제점이다. 그러나 이제까지 미용 콘택트렌즈의 성상에 대한 연구는 전무한 실정므로, 향후 기존의 미용 콘택트렌즈 제품에 대한 후향적 연구뿐만 아니라, 제작 공정에서부터 의료인과 렌즈 제조업체가 협력하여 모든 변수들을 통제하는 체계적이고 전향적인 연구가 필요하겠다. 특히 세균성 각막염과 같은 시력 예후에 치명적인 합병증을 예방하기 위해서 미용 콘택트렌즈의 도색처리 과정에서 표면거칠기를 감소시킬 수 있는 공정 기술과 적정밀도 인식 신호차단(Anti-Quorum Sensing) 혹은 입체장벽(Steric Barrier)과 같이 세균의 부착을 줄일 수 있는 처치 및 신소재의 개발이 필요하다.

REFERENCES

- 1) Efron N, Morgan PB, Woods CA. International survey of contact lens prescribing for extended wear. *Optom Vis Sci* 2012;89:122-9.
- 2) Efron N, Morgan PB, Woods CA. Survey of contact lens prescribing to infants, children, and teenagers. *Optom Vis Sci* 2011;88:461-8.
- 3) Morgan PB, Efron N, Woods CA. Determinants of the frequency of contact lens wear. *Eye Contact Lens* 2013;39:200-4.
- 4) Efron N, Morgan PB, Woods CA. An international survey of daily disposable contact lens prescribing. *Clin Exp Optom* 2013;96:58-64.
- 5) Park YM, Hahn TW, Choi SH, et al. Acanthamoeba Keratitis Related to Cosmetic Contact Lenses. *J Korean Ophthalmol Soc* 2007;48:991-4.
- 6) Song JS, Lee H, Kim JW, et al. The effects of cheap tinted contact lenses on corneal swelling and ocular surface inflammation. *J Korean Ophthalmol Soc* 2008;49:1888-93.
- 7) Lim TH, Lee JR, Choi KY, et al. Corneal melting And descemetocelle resulting from noninfectious keratitis related to the cosmetic contact lenses. *J Korean Ophthalmol Soc* 2009;50:774-8.
- 8) Park SJ, Lee SM, Kim MK, et al. Cosmetic contact lens-related complications: 9 cases. *J Korean Ophthalmol Soc* 2009;50:927-35.
- 9) Sauer A, Bourcier T. Microbial keratitis as a foreseeable complication of cosmetic contact lenses: a prospective study. *Acta Ophthalmol* 2011;89:e439-42.
- 10) Steinemann TL, Fletcher M, Bonny AE, et al. Over-the-counter decorative contact lenses: Cosmetic or Medical Devices? A Case Series. *Eye Contact Lens* 2005;31:194-200.
- 11) Steinemann TL, Pinninti U, Szczotka LB, et al. Ocular complications associated with the use of cosmetic contact lenses from unlicensed vendors. *Eye Contact Lens* 2003;29:196-200.
- 12) McKelvie J, Patel D, McGhee C. Cosmetic contact lens-related Acanthamoeba keratitis. *Clin Experiment Ophthalmol* 2009;37:419-20.
- 13) Williams D. Great expectations and the grapes of wrath: contamination of contact lenses. *Med Device Technol* 1999;10:10-3.
- 14) Giraldez MJ, Resua CG, Lira M, et al. Contact lens hydrophobicity and roughness effects on bacterial adhesion. *Optom Vis Sci* 2010;87:E426-31.
- 15) Burnham GW, Cavanagh HD, Robertson DM. The impact of cellular debris on Pseudomonas aeruginosa adherence to silicone hydrogel contact lenses and contact lens storage cases. *Eye Contact Lens* 2012;38:7-15.
- 16) Dutta D, Cole N, Willcox M. Factors influencing bacterial adhesion to contact lenses. *Mol Vis* 2012;18:14-21.
- 17) Vijay AK, Zhu H, Ozkan J, et al. Bacterial adhesion to unworn and worn silicone hydrogel lenses. *Optom Vis Sci* 2012;89:1095-106.
- 18) Willcox MD. Microbial adhesion to silicone hydrogel lenses: a review. *Eye Contact Lens* 2013;39:61-6.
- 19) Willcox MD, Holden BA. Contact lens related corneal infections. *Biosci Rep* 2001;21:445-61.
- 20) Robertson DM. The effects of silicone hydrogel lens wear on the corneal epithelium and risk for microbial keratitis. *Eye Contact Lens* 2013;39:67-72.
- 21) Bailey CS. A review of relative risks associated with four types of contact lenses. *Cornea* 1990;9 Suppl 1:S59-61; discussion S62-3.
- 22) Willcox MD, Harmis N, Cowell, et al. Bacterial interactions with contact lenses; effects of lens material, lens wear and microbial physiology. *Biomaterials* 2001;22:3235-47.
- 23) Bruinsma GM, van der Mei HC, Busscher HJ. Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials* 2001;22:3217-24.
- 24) McGlinchey SM, McCoy CP, Gorman SP, Jones DS. Key biological issues in contact lens development. *Expert Rev Med Devices* 2008;5:581-90.
- 25) Loyola-Rodriguez JP, Zavala-Alonso V, Reyes-Vela E, et al. Atomic force microscopy observation of the enamel roughness and depth profile after phosphoric acid etching. *J Electron Microscop* (Tokyo) 2010;59:119-25.
- 26) Lira M, Santos L, Azeredo J, et al. Comparative study of silicone-hydrogel contact lenses surfaces before and after wear using atomic force microscopy. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008;85:361-7.

- 27) Giraldez MJ, Serra C, Lira M, et al. Soft contact lens surface profile by atomic force microscopy. *Optom Vis Sci* 2010;87:E475-81.
- 28) Desrousseaux C, Sautou V, Descamps S, Traore O. Modification of the surfaces of medical devices to prevent microbial adhesion and biofilm formation. *J Hosp Infect* 2013;85:87-93.
- 29) Mueller RF, Characklis WG, Jones WL, Sears JT. Characterization of initial events in bacterial surface colonization by two *Pseudomonas* species using image analysis. *Biotechnol Bioeng* 1992;39:1161-70.
- 30) Chen L, Wen YM. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *Int J Oral Sci* 2011;3:66-73.
- 31) Fletcher EL, Weissman BA, Efron N, et al. The role of pili in the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to unworn hydrogel contact lenses. *Curr Eye Res* 1993;12:1067-71.
- 32) Evans DJ, Fleiszig SM. Microbial keratitis: could contact lens material affect disease pathogenesis? *Eye Contact Lens* 2013;39:73-8.
- 33) Vermeltfoort PB, Rustema-Abbing M, de Vries J, et al. Influence of day and night wear on surface properties of silicone hydrogel contact lenses and bacterial adhesion. *Cornea* 2006;25:516-23.

= 국문초록 =

미세표면분석 기법을 이용한 미용 콘택트렌즈와 일반 콘택트렌즈의 표면거칠기와 세균부착성 비교

목적: 미용 콘택트렌즈 사용에 따른 세균 감염에 대한 문제 인식에 비해 객관적이고 과학적인 연구는 전무한 실정으로, 일반 연성콘택트렌즈에 비하여 미용 콘택트렌즈 표면의 특성이 세균 부착에 직접적으로 미치는 영향에 대해 체계적으로 연구하였다.

대상과 방법: 하이드로겔(Etafilcon A) 재질의 일일착용 및 연속착용콘택트렌즈 중 미용 목적의 컬러렌즈와 일반 투명렌즈를 대상으로 하였다. 각 렌즈의 내측 표면 거칠기를 원자력 현미경으로 분석하였고, *Pseudomonas aeruginosa*를 1, 12, 24시간 동안 렌즈에 접촉시킨 후 표면에 부착된 세균을 분리·배양하여 균집 수를 계산하였다. 또한 부착된 세균의 양상을 주사 전자 현미경으로 관찰하였다. 특히 미용 콘택트렌즈는 도색 처리된 부분을 집중 검사하였다.

결과: 원자력 현미경으로 렌즈의 내측 표면을 분석한 결과, 일반렌즈에 비하여 미용 콘택트렌즈의 거칠기가 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 1시간 동안의 *P. aeruginosa*의 렌즈표면 부착은 통계학적으로 유의하게 미용 콘택트렌즈에서 증가하였다($p=0.047$). 또한 표면 거칠기는 1시간 동안 렌즈에 부착된 세균 수와 유의한 상관관계를 보였다($r > 0.9$, $p < 0.05$). 주사 전자 현미경을 통하여 도색 처리된 표면에 세균이 더 부착됨을 확인하였다.

결론: 본 연구는 미용 콘택트렌즈 표면의 거칠기와 세균부착의 연관성을 객관적으로 밝힘으로써, 세균성 각막염 등의 합병증을 예방하기 위하여 렌즈 표면의 거칠기를 감소시키고 세균 부착을 억제할 수 있는 콘택트렌즈의 개발 및 도색 처리 공정의 개선이 필요함을 제시하였다.

〈대한안과학회지 2014;55(5):646-655〉
