眼由来線維芽細胞に対する抗癌剤と抗炎症剤の評価
—Dynamic microscope image processing scanner による検討—

高橋　広[1)3)], Branko Palcic[2)], Karim F. Damji[3)],
Jack Rootman[3)], Stephen M. Drance[3)]
[1)]産業医科大学眼科学教室，[2)]ブリティッシュコロンビア癌研究所
[3)]ブリティッシュコロンビア大学眼科学教室

要　約

緑内障濾過手術において線維芽細胞の増殖を抑制できるか否かはその効果を左右すると考えられ，代謝拮抗剤(5-fluorouracil)や抗炎症剤などが臨床の場で用いられている．これらの薬物を薬理作用の面からヒト眼由来線維芽細胞を取り扱った報告はない．コンピュータにて制御された顕微鏡システムである dynamic microscope image processing scanner を開発使用し，colchicine と 5-fluorouracil を 3T3 細胞，ヒト強膜および結膜下由来線維芽細胞に投与し，それらの細胞運動速度や形態変化（面積，円形度，収縮）を計測した．Colchicine は 5-fluorouracil に比較して細胞増殖や運動性をより抑制し，形態的にもより効果的であった．このように本画像解析装置は各種の薬理作用や効果を検討できる有用なシステムである．(日眼会誌　97：3—10，1993)

キーワード：緑内障手術，線維芽細胞，フルオロウラシル（5-FU），colchicine，画像解析装置

Assessment of Anti-proliferative and Anti-inflammatory Drugs for Treatment of Ocular Fibroblast Proliferation Using Dynamic Microscope Image Processing Scanner

Hiroshi Takahashi[1)3)], Branko Palcic[2)], Karim F. Damji[3)], Jack Rootman[3)] and Stephen M. Drance[3)]
[1)]*Department of Ophthalmology, University of Occupational and Environmental Health*
[2)]*British Columbia Cancer Research Centre,* [3)]*Department of Ophthalmology, University of British Columbia*

Abstract

Controlling ocular fibroblast proliferation may significantly improve the effectiveness of glaucoma filtration surgery. Drugs for the inhibition of fibroblast growth are currently in clinical use. However, systemic studies of drugs with different mechanisms of action have not been performed on human ocular fibroblasts. We have developed a method to evaluate the effect of chemotherapeutic agents on fibroblast proliferation, motility, and dynamic morphology. This involves the use of an automated microscope system designed for quantitative measurement of movement and morphology of live cells in tissue culture. This technique was tested on an established tissue culture fibroblast (3T3

別刷請求先：807　北九州市八幡西区医生ヶ丘1—1　産業医科大学眼科学教室　高橋　広
(平成3年12月27日受付，平成4年6月9日改訂受理)
Reprint requests to: Hiroshi Takahashi, M.D. Department of Ophthalmology, University of Occupational and Environmental Health. 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyusyu 807, Japan
(Received December 27, 1991 and accepted in revised form June 9, 1992)

cells) and then applied to secondary culture of human scleral and subconjunctival fibroblasts. 5-fluorouracil and colchicine were tested for their effect on fibroblast behaviour. Our data indicated that colchicine was more effective than 5-fluorouracil in inhibiting fibroblast proliferation and movement, and in changing morphology. Using this system, fundamental biological effects of various pharmacological manipulations could be studied *in vitro* prior to *in vivo* applications. (J Jpn Ophthalmol Soc 97 : 3—10, 1993)

Key words : Glaucoma surgery, Fibroblast, 5-Fluorouracil (5-FU), Colchicine, Cell analyzer

I 緒 言

線維芽細胞の増殖を抑制することは緑内障術後瘢痕形成や増殖性網膜症の進行の予防において重要である．とくに緑内障術後の濾過瘢痕形成においては，線維芽細胞の増殖と肉芽組織の形成を如何に抑えられるかが手術成績を左右すると言われている[1)~5)]．Fluorouracil（5-FU®）などの抗癌剤や colchicine などの抗炎症剤が *in vitro* の実験[6)~13)]にて線維芽細胞の増殖を抑制することに基づき，臨床においてもこれらの薬剤，とくに5-FU が用いられている[14)~21)]．しかし薬物の安定した効果が得られないばかりか，5-FU では周囲の組織，特に角膜上皮に対する重篤な副作用も報告されている[22)~25)]．これらの薬剤の *in vitro* での 3 T 3 線維芽細胞株と眼由来の線維芽細胞に対する効果を従来のパーセント細胞増殖抑制に加え，著者らが開発した dynamic microscope image processing scanner（DMIPS）を使用し[26)~29)]，細胞の運動および形態的変化をパラメターとして抗癌剤と抗炎症剤とを比較検討した．

II 実験材料および方法

1. 細胞と培養

マウス胎児の線維芽細胞（NIH 3 T 3 細胞）は Tracy Yang 博士（Lawrence Berkeley Labo., Berkeley, CA）から贈られたもので，10%胎児牛血清と抗生物質を含む Dulbecco's modified Eagle's medium を用い，5 %炭酸ガス培養装置にて維持した．そして 0.2%トリプシンにて 5 ×10^5の細胞を 10 cm 径プラスチック培養皿（Falcon # 3003, Oxnard, CA）に播種し，confluent となった 3 日毎に継代した．またヒト結膜下および強膜由来の線維芽細胞はブリティッシュコロンビア眼球銀行からの提供眼球より得られたものであった．その条件は 30 歳男性で，心筋梗塞で死亡し，死後 1.5 時間で摘出され，死後 6 時間後に組織培養に供された．そして結膜下組織と強膜を細切し，直径 6 cm の培養皿（Falcon # 3002）に静置し 3 T 3 細胞と同様の培養液を注いだ．3 ～ 5 日すると組織片より線維芽細胞が増殖し，1 週間後 0.2%トリプシンで単層培養に移し実験には 2 ～ 4 代目のものを使用した．

2. 細胞増殖

最終細胞密度が 3 T 3 細胞では 1×10^5/2.0 ml に，眼由来線維芽細胞では 5×10^4/2.0 ml となるように培養皿（Falcon # 3002）に播種し，24 時間培養した．そして 1.9 ml の前述の培養液に colchicine（Eli Lilly Canada Inc., Toronto, Ont.；0.001, 0.01, 0.05, 0.075, 0.1, 1.0, 10, 100 μg/ml）および 5-FU（Hoffman-LaRoche Ltd., Etobicoke, Ont.；0.01, 0.05, 0.075, 0.1, 1.0, 10, 100 μg/ml）の 0.1 ml を添加した培養液にし，その後に 3 T 3 細胞は 0, 12, 24, 36 時間後に，眼由来細胞は 0, 1, 2, 3, 4, 5 日後に細胞数をコールターカウンター（Coulter Electronic Inc. Hialeah, Fla）でそれぞれ 3 回計測した．

3. Dynamic microscope image processing scanner（DMIPS）

画像解析装置（DMIPS）は多目的に自動制御された顕微鏡システムで詳細は既報[26)~29)]のとおりで，位相差顕微鏡，光センサー部，コンピュータ制御可能な顕微鏡の X-Y ステージとホストコンピュータ部から成っている．このシステムでは組織培養下で生きた細胞を染色せずに観察でき，細胞の位置と形状をコンピュータに記憶でき，経時的にステージを自動的に動かし機械が自分でその細胞を再発見し，新たな位置を計測するので細胞の動き（speed）を計算できる[27)]．また細胞面積（area），細胞の光沢すなわち収縮（brightness）や細胞円形度（circularity）など形態的特徴がコンピュータ計測可能である[29)]．

次に今回用いた実験の概要を述べる．

5×10^3/6.9 ml 個の 3 T 3 細胞，ヒト結膜下および強膜由来線維芽細胞を 12 穴プレート（Corning # 25815）

の9穴に20時間前に播種した．DMIPSのステージ上にフラスコを少なくとも30分前に静置した．その後1穴あたり30個，計270個の細胞を選択し，それらの位置と形態的特徴をコンピュータに記憶させ，20分毎に計測を繰り返した．最初の8スキャンすなわち160分後にcolchicineと5-FUを0.1 ml添加し，最終濃度がcolchicineは各々0.01，0.1，1.0，10 μg/mlに，5-FUは0.1，1.0，10，100 μg/mlになるように希釈した．また対照として培養液0.1 mlを加えた．この添加に要した時間は約3分間であった．3T3細胞の1日，眼由来線維芽細胞の2日間の計測実験はすべて37℃でおこなった．

III 結　果

1. 細胞増殖

3T3細胞とヒト結膜下および強膜線維芽細胞の細胞増殖曲線は図1のとおり3T3細胞の倍増時間は20時間で，結膜下および強膜線維芽細胞のそれらは各々27，33時間であった．

図2aは細胞増殖に対する種々の濃度colchicine効果を示している．3T3細胞の50%細胞数減少濃度（ID_{50}）は0.023 μg/mlと強膜および結膜下線維芽細胞のそれらは0.009，0.007 μg/mlであった（表1）．0.1 μg/mlという濃度はこれらすべての細胞増殖をほとんど完全に阻止できる濃度であった．5-FUの効果を図2bに示す．3T3細胞のID_{50}は1.5 μg/mlと強膜および結膜下線維芽細胞のそれらは0.44，0.25 μg/ml に比して高濃度であった．5-FUは3T3細胞に対してcolchicineと異なり非常に高濃度（100 μg/ml）であっても完全には細胞増殖を阻止できなかった．

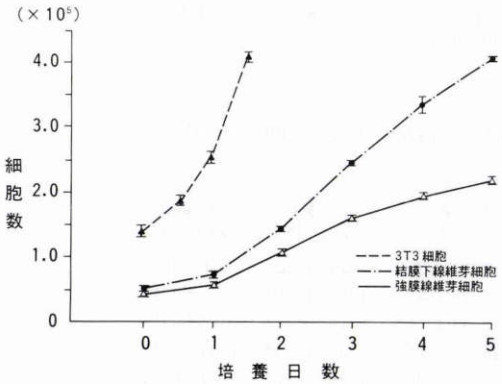
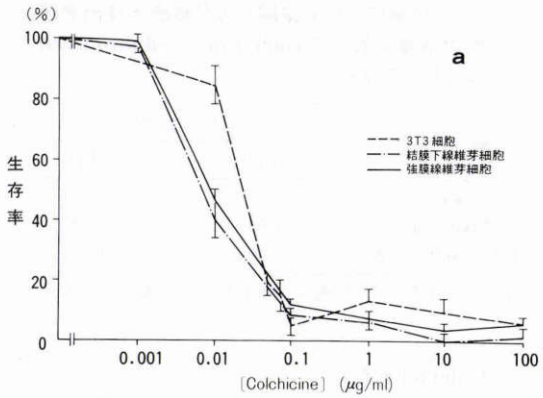


図1　3T3細胞，ヒト増強および結膜下線維芽細胞の増殖曲線．
バー：平均値±標準誤差(n=3)．5×10⁴個の眼由来線維芽細胞と1×10⁵個の3T3細胞を播種後，24時間毎に細胞数を計測した．



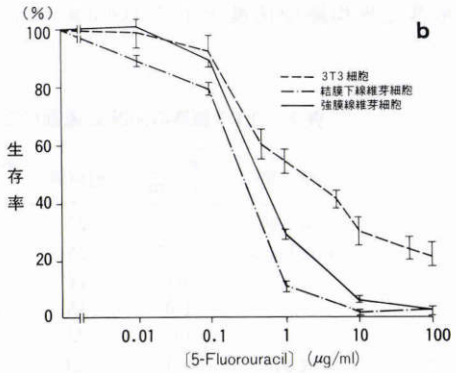


図2　3T3細胞，ヒト強膜および結膜下線維芽細胞に対する薬物の効果（生存率%）．
a：colchicine，b：5-fluorouracil(5-FU)．バー：平均値±標準誤差（n=3）．3T3細胞は24時間後に，眼由来線維芽細胞は5日後に検討した．

2. 細胞運動と細胞形態

1）対照群

3T3細胞の平均細胞面積は310±42 μm²（平均値±標準偏差），平均細胞収縮・光沢は22.3±3.7，平均細胞円形度は3.41±0.55，平均細胞速度は0.71±0.16 μm/minであった（表2）．強膜線維芽細胞では各々564±49 μm²，10.2±0.8，5.50±0.65，0.39±0.16 μm/min（表3）で，結膜下線維芽細胞では585±47 μm²，11.3±0.9，5.25±0.77，0.31±0.10 μm/minであった（表4）．

表1　3T3細胞，ヒト強膜および結膜下線維芽細胞の増殖に対するcolchicineと5-fluorouracil（5-FU）の効果

細　胞	ID_{50}（μg/ml）	
	Colchicine	5-FU
3T3細胞	0.023	1.50
強膜線維芽細胞	0.009	0.44
結膜下線維芽細胞	0.007	0.25

ID_{50}は対照群の細胞増殖を50%に抑制する濃度である

2）Colchicine投与例

3T3細胞に0.1 μg/mlのcolchicine投与した例と対象例の平均細胞面積，平均細胞収縮・光沢，平均細胞円形度と平均細胞速度を示す（図3a～d）．Colchicineを投与すると，細胞面積は減少し，細胞円形度と光沢は増加し，細胞の円形化を示した．また細胞速度は著明に減少した（図3d，表2）．このような変化は高濃度では瞬時に起こり，低濃度では細胞分裂が不完全となった．表2に示すごとく0.1 μg/ml以上のcolchicineではこれらの細胞形態や速度への効果は統計的有意差を認めた（$p<0.001$）．表3のように強膜線維芽細胞では平均細胞面積と円形度において有意に減少し，細胞光沢は有意に増強した（$p<0.001$）．しかし，結膜下線維芽細胞ではこれらの結果とは逆の傾向を示した（表4）．また，細胞速度に関しては眼由来線維芽細胞には有意差は認められなかった．

3）5-fluorouracil投与例

結膜下線維芽細胞の周囲長を除き，10 μg/ml以下の

表2　3T3細胞の形態と運動に対するcolchicineと5-fluorouracil（5-FU）の効果

薬　物	濃　度（μg/ml）	細胞数	平均細胞面積（μm²）	平均細胞光沢・収縮[1]	平均細胞円形度[2]	平均細胞速度（μm/min）
対　照		27	310±42	22.3±3.7	3.41±0.55	0.71±0.16
Colchicine	0.01	24	297±60	29.1±6.9*	2.56±0.65*	0.64±0.24
	0.1	28	214±72*	42.7±12.4*	1.72±0.81*	0.48±0.21*
	1.0	15	221±70*	34.6±5.6*	1.48±0.45*	0.43±0.19*
	10	25	237±77*	36.9±9.6*	1.68±0.70*	0.71±0.16[3]
5-FU	0.1	23	300±51	23.0±4.8	3.56±0.66	0.66±0.21
	1.0	26	292±50	22.9±4.6	3.20±0.69	0.64±0.23
	10	26	320±55	23.7±5.3	3.30±0.61	0.68±0.22
	100	25	217±61*	24.4±4.5	2.72±0.54*	0.57±0.18**

実験は20分毎に26時間行なわれ，8スキャン（160分）後に薬物は投与され，形態と運動についてT検定に統計処理をおこなった．1：光センサーグレーレベルより計測した．2：細胞周囲長²/4π面積より算出し，細胞の形態がどれだけ円より隔たっているかを示し，1.0は丸く，値が大きくなるにつれ細長い形態となる．3：多くの細胞が丸くなり，培養皿より遊離したため，見掛け上細胞速度は速くなった．平均値±標準偏差，*$p<0.001$，**$p<0.01$

表3　ヒト強膜線維芽細胞の形態と運動に対するcolchicineと5-fluorouracil（5-FU）の効果

薬　物	濃　度（μg/ml）	細胞数	平均細胞面積（μm²）	平均細胞光沢・収縮	平均細胞円形度	平均細胞速度（μm/min）
対　照		28	564±49	10.2±0.8	5.50±0.65	0.39±0.16
Colchicine	0.01	18	522±64**	12.2±1.4*	4.49±0.79*	0.41±0.18
	0.1	18	498±59*	12.6±1.2*	4.47±1.02*	0.44±0.18
	1.0	20	503±55*	14.5±1.3*	3.90±0.71*	0.37±0.17
	10	15	493±53*	15.7±2.3*	3.98±0.88*	0.41±0.24
5-FU	0.1	27	567±46	10.0±0.7	5.45±0.43	0.34±0.13
	1.0	25	573±42	9.8±1.3	5.55±0.39	0.32±0.11
	10	29	585±38	10.4±0.8	5.41±0.28	0.39±0.10
	100	12	354±63*	9.9±1.7	5.76±0.73	0.38±0.18

平均値±標準偏差，*$p<0.001$，**$p<0.05$

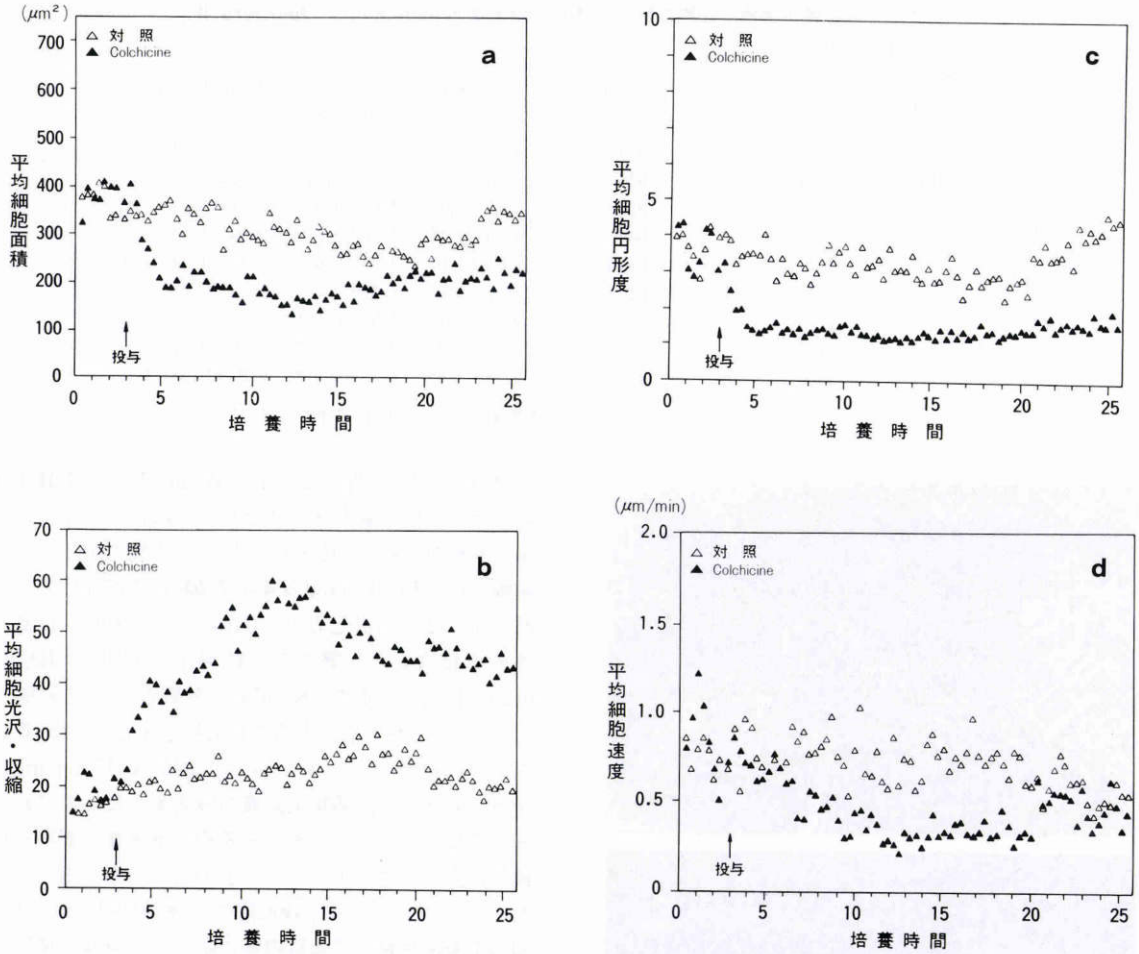


図3　3T3細胞の形態および運動に対する colchicine の効果.
Colchicine (0.1 μg/ml) を投与後 (矢印), 以下のパラメーターを計測した. a：平均細胞面積 (μm²), b：平均細胞光沢・収縮：光センサーのグレーレベルより計測した. c：平均細胞円形度(細胞周囲長²/4π 面積)：これは細胞の形態がどれだけ円より隔たっているかを示し, 1.0は丸く, 値が大きくなるにつれ細長い形態となる. d：平均細胞速度 (μm/min)

5-FU は形態変化や細胞速度には影響を及ぼさなかった. しかし, 100 μg/ml の 5-FU は 3T3 細胞と強膜線維芽細胞では細胞面積を減少させた($p<0.001$). 結膜下線維芽細胞では光沢が増し円形化した ($p<0.05$). また, 3T3 細胞と結膜下線維芽細胞では高濃度に 5-FU を投与した時に細胞速度が有意に減弱した (各々$p<0.01$, $p<0.05$). そして, 100 μg/ml の 5-FU を5日間暴露することにより細胞融解が生じた (表2～4).

IV 考　按

緑内障術後濾過瘢痕過程においては如何に炎症を抑え, 線維芽細胞の遊走と増殖を阻止しコラーゲンなどの細胞外マトリックスの合成, 肉芽組織の形成を防ぐことが重要である. このために臨床では, ステロイド, インドメタシンや 5-FU, サイトシンアラビノシドやブレオマイシンなど抗癌剤が投与される. 特に 5-FU は広く使用されており, 内外の多くの報告では良好な結果を得たとされている[14)~21)]. しかし 5-FU は他の眼組織障害[22)~24)], とくに角膜上皮障害や結膜創哆

表4　ヒト結膜下線維芽細胞の形態と運動に対する colchicine と 5-fluorouracil (5-FU) の効果

薬　物	濃　度 (μg/ml)	細胞数	平均細胞面積 (μm²)	平均細胞光沢・収縮	平均細胞円形度	平均細胞速度 (μm/min)
対　照		23	585±47	11.3±0.9	5.25±0.77	0.31±0.10
Colchicine	0.01	25	638±57*	9.1±1.9**	4.32±0.81*	0.30±0.10
	0.1	21	630±81***	9.7±1.4*	3.69±0.54*	0.34±0.13
	1.0	23	659±85*	10.1±1.5**	4.22±0.84*	0.36±0.13
	10	26	699±95*	9.1±1.6*	3.98±0.66*	0.27±0.09
5-FU	0.1	21	618±76	10.8±1.5	4.29±0.74*	0.29±0.09
	1.0	16	618±83	11.5±2.1	4.08±0.23*	0.37±0.19
	10	26	619±97	10.8±1.3	3.98±0.52*	0.30±0.07
	100	19	623±84	12.6±1.8**	4.63±0.91***	0.25±0.08***

平均値±標準偏差，*$p<0.001$，**$p<0.01$，***$p<0.05$

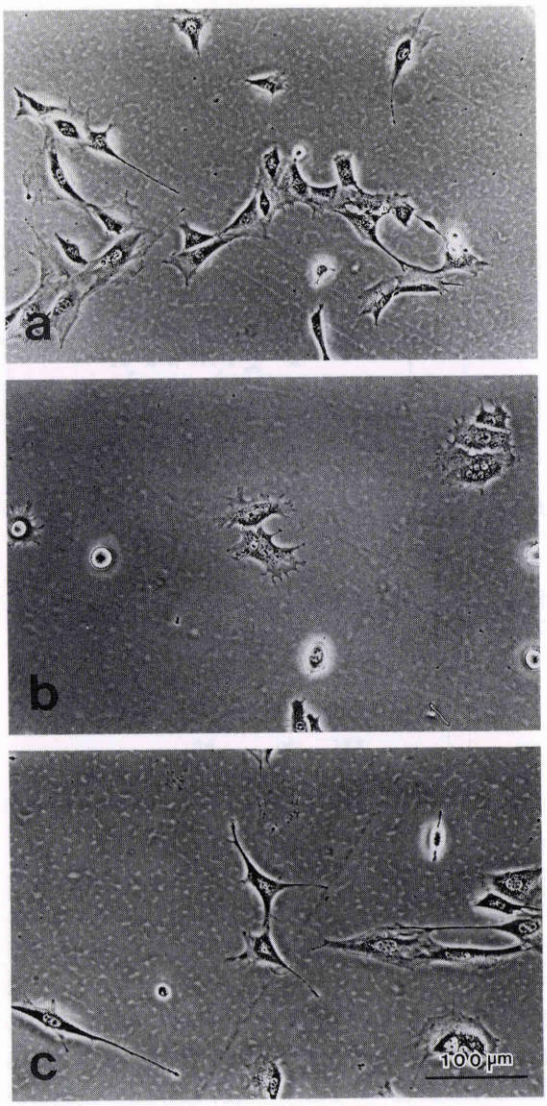


図4　3T3細胞の形態に対する薬物の影響．
a：対照，b：colchicine：0.1 μg/ml を投与後で細胞分裂は中断し，細胞は丸くなった．c：5-fluorouracil (5-FU)：10 μg/ml を投与しても細胞の形態には変化はなかった．(位相差顕微鏡×185)．

開させるとの報告がなされ，Weinreb ら[18]は Heuer ら[14]より総投与量を減少させることによりこれらの合併症を軽減させた．Kondo ら[30]は手術部の 180°対側の結膜下に 5-FU を 5 mg 注射した場合，手術部位では 5 時間後に 2 μg/ml となり，5 mg という濃度が必要であると報告した．著者らの結果でも 5-FU の ID_{50} が 0.25～1.5 μg/ml で，Kondo らの報告とほぼ同様であった．したがって手術部に直接投与するならば，ID_{50} の 100 倍程度のものすなわち 0.025～0.15 mg/ml で十分と考えられ，隣接眼組織の障害も少ないと思われる．今後はこのようなもっと安全な低濃度の薬剤を持続的に投与できるポリマーなどの方法を考えるべきである[31)32]．したがって，現段階では難治性緑内障，特に頻回手術例や無水晶体緑内障に限って注意深く使用すべきである[25]．

従来報告された投与量の根拠のひとつに組織培養された線維芽細胞の増殖抑制効果の判定として細胞数を計測する実験結果があるが，今回著者らはこれ以外に DMIPS で行える細胞運動や形態的変化をパラメーターとする薬剤効果の評価を試みた．たとえば，図4は colchicine 0.1 μg/ml と 5-FU 10 μg/ml を投与した時の位相差顕微鏡写真で，対照群に比して colchicine では細胞数も減少しており，細胞も収縮していることが明らかで，5-FU では形態はさ程変化しないが細胞数は減少している．この事実を DMIPS を用い

ると図3に示すとおり細胞運動や形態的変化を量的にとらえることができる．抗チュブリン剤でもあるcolchicineは細胞分裂時の紡錘体や細胞骨格に作用すると言われており[33]，DMIPSを用いることによりこれらの作用機序に基づく薬物効果として細胞増殖抑制以外に細胞の運動や細胞の収縮することが明らかになった．しかし，眼由来細胞では異なった結果を呈した．すなわち強膜線維芽細胞は3T3細胞と同様の反応を示したが，結膜下線維芽細胞は3T3細胞と異なり，細胞面積は増大し，光沢も減弱した．そして眼由来のこれらの細胞の細胞速度には影響をおよぼさなかった．これは3T3細胞の急激な細胞増殖や遊走時でみられる微細なマイクロフィラメントの形成と異なり，眼由来線維芽細胞は太いストレスファイバー網を作るからかもしれない[34]．しかし従来の結膜下線維芽細胞に関する実験ではcolchicineは細胞速度を減じた（ID_{50}＝0.004 μg/ml）と報告されている[12]．今後，動物や細胞の種類などで細胞運動や形態変化が異なるのか，さらに検討しなければならない．

稿を終わるに臨み，終始懇切なるご指導を賜った秋谷忍教授に深謝致します．

なお，本論文の要旨は第8回国際眼研究会議（サンフランシスコ，1988年）および第93回日本眼科学会総会（京都，1989年）にて発表した．

文　献

1) **Addicks EM, Quigley HA, Green WR, Robin AL**: Histologic characteristics of filtering blebs in glaucomatous eye. Arch Ophthalmol 101: 795—798, 1983.

2) **Skuta GL, Parrish RK II**: Wound healing in glaucoma filtering surgery. Surv Ophthalmol 32: 149—170, 1987.

3) **Jampel HD, McGuigan LJB, Dunkelberger GR, L'Hernault NL, Quigley HA**: Cellular proliferation after expeimental glaucoma filtration surgery. Arch Ophthalmol 106: 89—94, 1988.

4) **新家　真**：緑内障手術後瘢痕癒着．臨眼　43: 219—224, 1989.

5) **真野富也**：濾過手術と合併症予防法．東　郁郎（編）：眼科Mook　40　緑内障の診療ガイド．金原出版，東京，186—195, 1989.

6) **Blumenkranz MS, Claflin A, Hajek AS**: Selection of therapeutic agents for intraocular proliferative disease: Cell culture evaluation. Arch Ophthalmol 102: 598—604, 1984.

7) **Gressel MG, Parrish RK II, Folberg R**: 5-Fluorouracil and glaucoma filtering surgery: I. An animal model. Ophthalmology 91: 378—383, 1984.

8) **Mallick KS, Haject AS, Parrish RK II**: Fluorouracil (5-FU) and cytarabine (Ara-C) inhibition of corneal epithelial cell and conjunctival fibroblast proliferation. Arch Ophthalmol 103: 1398—1402, 1985.

9) **Heuer DK, Gressel MG, Parrish RK II, Folberg R, Dillberger JE, Altmam NH**: Topical fluorouracil. II. Postoperative administration in animal model glaucoma filtering surgery. Arch Ophthalmol 104: 132—136, 1986.

10) **Blumenkranz MS, Hartzer MK, Hajek AS**: Selection of therapeutic agents for intraocular proliferative disease. II. Differing antiproliferative activity of the fluoropryimidines. Arch Ophthalmol 105: 396—399, 1987.

11) **Gipson JK, Keezer L**: Effects of cytochalasins and colchicine on the ultrastructure of migrating corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 22: 643—650, 1982.

12) **Lemor M, De Bustros S, Glaser BM**: Low-dose colchicine inhibits astrocyte, fibroblast, and retinal pigment epithelial cell migration and proliferation. Arch Ophthalmol 104: 1223—1225, 1986.

13) **Lemor M, Yeo JH, Glaser BM**: Oral colchicine for the treatment of experimental traction retinal detachment. Arch Ophthalmol 104: 1226—1229, 1986.

14) **Heuer DK, Parrish RK II, Gressel MG, Hodapp E, Palmberg PF, Anderson DR**: 5-Fluorouracil and glaucoma filtering surgery. II. A Pilot study. Ophthalmology 91: 384—394, 1984.

15) **Litin BS, Jones MA, Kwong EM, Herschler J**: Effect of antineoplastic drugs on fibroblast proliferation: Individually and in combination. Ophthalmic Surg 16: 34—39, 1984.

16) **Heuer DK, Parrish RK II, Gressel MG, Hodapp E, Desjardins DC, Skuta GL**, et al: 5-Fluorouracil and glaucoma filtering surgery. III. Intermediate follow-up of pilot study. Ophthalmology 93: 1537—1546, 1986.

17) **Rockwood EJ, Parrish RK II, Heuer DK, Skuta GL, Hodapp E, Palmberg PF**, et al: Glaucoma filtering surgery with 5-fluorouracil. Ophthalmology 94: 1071—1078, 1987.

18) **Weinreb RN**: Adjusting the dose of 5-fluorouracil after filtration surgery to minimize side effects. Ophthalmology 94: 564—570, 1987.

19) **Jampel HD, Jabs DA, Quigley HA**: Trabeculectomy with 5-fluorouracil for adult inflammatory glaucoma. Am J Ophthalmol 109: 168—173, 1990.

20) **谷口 徹, 北沢克明**：5-fluorouracil の線維柱帯切除予後の改善効果について．臨眼 41: 575—578, 1987.

21) **中野 豊, 白土城照, 新家 真**：緑内障手術と 5-fluorouracil(5-FU)．臨眼 43: 1929—1933, 1989.

22) **Knapp A, Heuer DK, Stern GA, William TD Jr**: Serious corneal complications of glaucoma filtering surgery with postoperative 5-fluorouracil. Am J Ophthalmol 103: 183—187, 1987.

23) **Copone A Jr, Lance SE, Friend J, Thoft RA**: In vivo effects of 5-FU on ocular surface epithelium following corneal wounding. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 1661—1667, 1987.

24) **Mannis M, Sweet EH, Lewis RA**: The effect of fluorouracil on the corneal endothelium. Arch Ophthalmol 106: 816—817, 1988.

25) **The Fluorouracil Filtering Surgery Group**: Fluorouracil filtering surgery study one year follow-up. Am J Ophthalmol 108: 625—635, 1989.

26) **Jaggi B, Poon SSS, Palcic B**: Implementation and evaluation of the DMIPS Cell Analyser. IEEE Proc Eng Med Bio 3: 906—911, 1986.

27) **Thurston G, Jaggi B, Palcic B**: Cell motility studies measurements with an automated microscope system. Exp Cell Res 165: 380—390, 1986.

28) **Palcic B, Poon SSS, Thurston G, Jaggi B**: Time-lapse records of cell in vitro using optical memory disk and cell analyser. J Tissue Cult Meth 11: 19—22, 1988.

29) **Thurston G, Jaggi B, Palcic B**: Measurement of cell motility and morphology with an automated microscope system. Cytometry 9: 411—417, 1988.

30) **Kondo M, Araie M**: Concentration change of fluorouracil in the external segment of the eye after subconjunctival injection. Arch Ophthalmol 106: 1718—1721, 1988.

31) **Lee DA, Leong KW, Panek WC, Eng CT, Glasgow BJ**: The use of bioerodible polymers and 5-fluorouracil in glaucoma filtration surgery. Invest Ophthalmol Vis Sci 29: 1692—1697, 1988.

32) **Assil KK, Pharm JL, Weinreb RN**: Sustained release of the antimetabolite 5-fluororidine-5'-monophosphate by multivesicular liposomes. Ophthalmic Surg 19: 408—413, 1988.

33) **Gilman AG, Goodman LS, Gilman A**: The pharmacological basis of therapeutics (6th ed). MacMillan, New York, 718—720, 1980.

34) **Pollack R, Osborn M, Weber K**: Patterns of organization of actin and myosin in normal and transformed cultured cells. Proc Nat Acad Sci USA 72: 994—998, 1975.