

Ethyl nitrosourea 誘発ラット実験脳腫瘍の微小血管構築に

関する研究 —血管鋳型走査電顕法による検討—

菊岡 政久

脳腫瘍の微小血管は腫瘍の循環代謝や頭蓋内に発生する複雑な病態とも密接に関連する重要な因子である。本研究では、ethyl nitrosourea 経胎盤投与により誘発した実験脳腫瘍の微小血管構築および腫瘍血管の形成過程について血管鋳型走査電顕法を用いて立体的に検討した。長径が2 mm未満の微小腫瘍では腫瘍血管の形成は認められず、むしろ微小血管の乏しい部分として観察されたが、長径が2 mm以上の腫瘍になると正常脳には存在しない特徴的な形態を有する腫瘍血管が形成され、血管鋳型標本から腫瘍の存在を確認することができた。これら腫瘍の各部位における微小血管構築について詳細に検討し、腫瘍の血管新生およびその形成過程や形成された腫瘍血管の2次的変化を示すと考えられる種々の形態学的所見を明らかにした。

(昭和63年10月26日採用)

Microvascular Architecture of Ethyl nitrosourea-Induced Brain Tumors in Rats: Scanning Electron Microscopic Study of Vascular Corrosion Casts

Masahisa Kikuoka

Tumor microcirculation is of crucial importance not only for the metabolism and behavior of tumor tissue but also for tumor therapy. The present study was undertaken to demonstrate the microvascular architecture of ethyl nitrosourea-induced brain tumors in rats by means of scanning electron microscopy of vascular corrosion casts.

In tumors less than 2 mm in diameter no tumor vessels were observed, indicating an avascular phase of tumor growth. On the other hand, in tumors more than 2 mm in diameter, various vascular phases were observed. In particular, the peripheral zone of the tumors consisted of dilated and tortuous vessels with vascular sprouts and endothelial invagination, which may be characteristic of angiogenesis. However, the microvascular architecture of the intermediate and central zones varied with tumor size. In tumors more than 5 mm in diameter, remarkably dilated and paradoxically deformed capillaries were found, while in those 2–5 mm in diameter relatively common and rich capillary networks were observed. These differences may be due to secondary effects related

to tumor growth, such as high tumor tissue pressure and endothelial proliferation.

(Accepted on October 26, 1988) *Kawasaki Igakkaishi* 15(1): 62-71, 1989

Key Words ① Experimental brain tumor ② Ethylnitrosourea ③ Scanning electron microscopy ④ Microvascular architecture ⑤ Corrosion casts

I. はじめに

脳腫瘍も正常脳組織とともに血管系を介して栄養されている。すなわち、腫瘍の間質である血管は腫瘍の環境維持には欠くべからざる存在であり、その微小血管は腫瘍の血行動態や代謝だけでなく、頭蓋内に発生する複雑な病態とも密接に関連する要因であることから極めて重要な意義をもっている。また近年、放射線療法や化学療法などの治療効果が腫瘍の微小血管と密接な関連のもとに論じられており、微小血管の構築や機能を追究することは脳腫瘍の生物学的特性の解明だけでなく、新たな治療法の発展にも大きく貢献するものと考えられる。

すでに著者は、脳の微小血管構築を立体的に研究する第一歩として、血管鋳型走査電顕法を用いてラット正常脳の各部位における微小血管構築を検討し、その結果および有用性について報告¹⁾した。本研究では、血管鋳型走査電顕法を ethylnitrosourea (ENU) 経胎盤投与による実験脳腫瘍に応用し、脳腫瘍の各部位における立体的な微小血管構築について検討した。さらに、正常脳の微小血管構築との相違や関連から腫瘍血管の形成過程についても検討を加え、若干の興味ある知見を得たのでその成績を報告する。

II. 実験方法

1) 実験脳腫瘍の作製

実験動物は妊娠14日目のフィッシャー系ラット(平均体重250g)を使用した。ENU(半井化学薬品)は磷酸緩衝液(pH 6.0)に溶解後、直ちに50 mg/kgを妊娠ラットの腹腔内に1回投与した。自然分娩により得られた新生ラットを飼育観察すると、減動、四肢の麻痺、膀胱直腸障害、眼球突出、頭部膨隆などの脳腫瘍症状

が生後3カ月頃より出現した。後述の方法に従い脳を摘出すると、腫瘍発生が推測された全例に腫瘍形成が認められ、その大部分は傍側脳室部に発生した glia 系腫瘍であった。

2) 血管鋳型標本の作製

担脳腫瘍ラットはエーテル麻酔下で開腹、開胸を行った。左心室より18Gエラストーを挿入して大動脈起始部に結紮固定した後、右心耳切開を行い脱血しつつ大動脈起始部に固定したエラストーより37°Cに加温したヘパリン加生食(1000 IU/l)約500 mlで灌流し、血管腔より血液成分を完全に除去した。血管および組織は3%グルタルアルデヒドを用いて灌流固定を行った。次いで、メタクリレート樹脂である Mercor CL-2R(大日本インキ)を100~120 mmHgの圧に保ちながらガラスシリンジを用いて用手的に注入した。メタクリレート樹脂は水中にて重合、硬化させた後、開頭を行い脳を摘出した。摘出脳は腫瘍を含む厚さ約5 mmの冠状断に切り出した。目的とする切片はまず20%水酸化ナトリウム液に3日間浸漬し、次いで0.5%次亜塩素酸ナトリウムを含む流水で組織を完全に腐食、除去した。一部の切片は界面活性剤を含む中性洗剤および酵素(プロテアーゼP:天野製薬)により組織を腐食し、流水で組織を完全に除去した。できあがった血管鋳型標本は液体窒素中で凍結し、真空乾燥後、金パラジウム蒸着を行って走査電顕(日立, S-570, 加速電圧20 kv)で観察した。また、血管鋳型標本に対応するすべての組織はパラフィンに包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色、PAS染色および鍍銀染色を用いて光顕で観察した。

3) 実験脳腫瘍の観察方法

血管鋳型標本に対応する組織標本を検討すると、担脳腫瘍ラット全例に腫瘍形成が認めら

れ、その大部分は傍側脳室部に発生した glia 系腫瘍であった。本研究では、ヒト脳腫瘍の分類に従い、mixed glioma と考えられる 30 個の脳腫瘍の微小血管構築について検討した。腫瘍は大きさにより長径 2 mm 未満の微小腫瘍 5 個、2 mm 以上 5 mm 未満の小腫瘍 10 個、および 5 mm 以上の大腫瘍 15 個に分類した。微小血管構築の解析は腫瘍浸潤のない腫瘍周囲部と、腫瘍を腫瘍辺縁部、中間部、中心部に分けて行った (Fig. 1)。

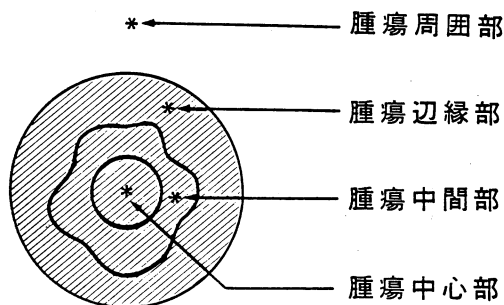


Fig. 1. Microvascular architecture of the ethylnitrosourea-induced brain tumors is observed on the four representative sites.

III. 結 果

I) 微小腫瘍の微小血管構築

組織学的には腫瘍周囲部の微小血管の変化および腫瘍血管の形成は認められなかった。血管

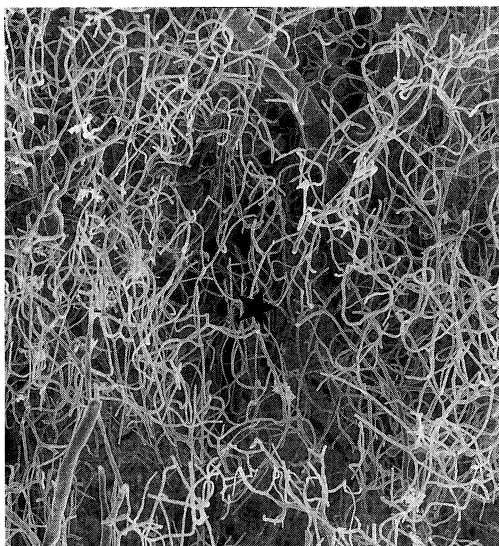


Fig. 2. Scanning electron micrograph of the tumor less than 2 mm in diameter, showing avascular or oligovascular architecture (★) (×100).

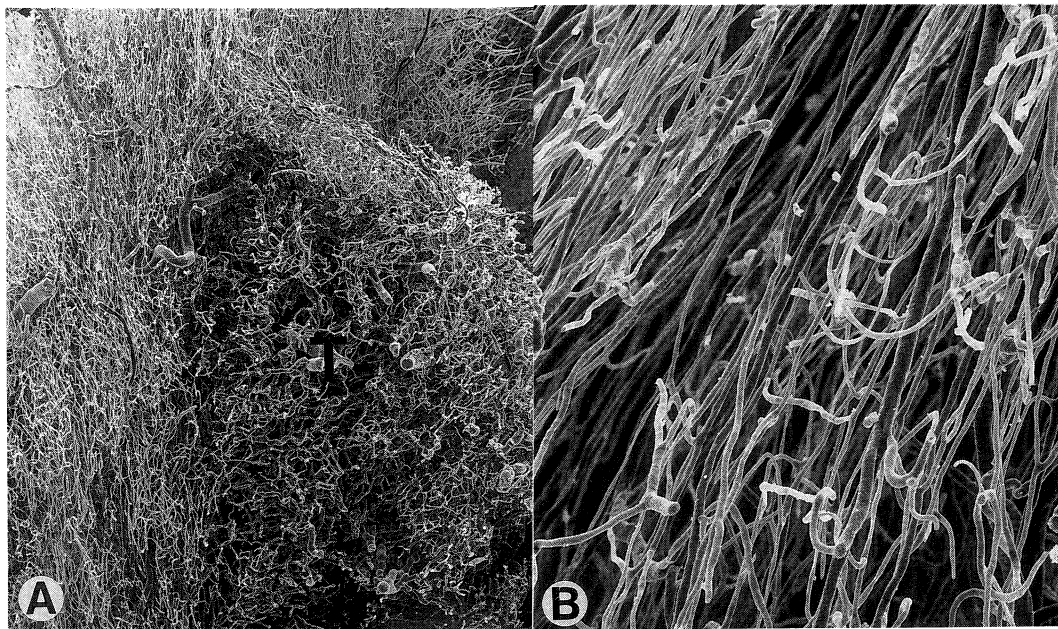


Fig. 3. Microvascular architecture of the tumor more than 2 mm in diameter. **A:** Tumors (T) easily identified on a lower magnification (×25). **B:** Capillaries in the surrounding zone, showing a stretched and straight running course (×200).

鋳型標本においても腫瘍血管の形成はなく、むしろ周囲と比較して微小血管の乏しい部分が存在したが、組織標本と対比して注意深く観察しないと見逃してしまうほど軽微な変化であり、artifact との判別は困難であった (Fig. 2).

II) 小腫瘍の微小血管構築

長径が 2 mm 以上の腫瘍になると腫瘍周囲部の微小血管構築の変化だけでなく、明らかに正常とは異なる腫瘍血管が形成され、血管鋳型標本から腫瘍の存在を確認することが可能であった (Fig. 3A).

a) 腫瘍周囲部

組織学的には明らかな微小血管構築の変化は認められなかったが、血管鋳型標本を見ると、腫瘍周囲部の微小血管構築は腫瘍が大きくなるにつれて圧排、偏位されていた。微小血管は伸展され 2~3 μ m と狭小化し、本来の規則的な 3 次元構築は消失していた (Fig. 3B).

b) 腫瘍辺縁部

組織学的にも明らかな腫瘍血管が形成されていた。また、その内皮細胞は肥大、増殖する傾

向を示し、一部では明瞭な核小体や核の濃染像が認められた。血管鋳型標本を見ると、腫瘍周囲部の微小血管が腫瘍に近づくにつれ徐々に拡張しながら腫瘍辺縁部に移行していた (Fig. 4).

腫瘍辺縁部の微小血管は分岐が著しく、屈曲、蛇行を示す大小不同の異常血管により形成されていた。この異常血管の径は 8~20 μ m で、成熟ラット脳では認められない環状構造 (Fig. 5A) や有窓構造 (Fig. 5B) を示しながら不規則な腫瘍血管網を形成していた。また、これらの異常血管の表面には典型的な内皮細胞核による陥凹は認められず、血管腔を分割すると考えられる“溝”形成 (Fig. 5C) や血管の発芽 (Fig. 5D) を思わせる小隆起や盲端が多数認められ、なかには血管の発芽と発芽の吻合を示す部分も存在した。

c) 腫瘍中間部および中心部

腫瘍中間部および中心部にかけてはほぼ同様の形態を示す微小血管構築が認められた。組織学的には壊死や嚢胞形成のない充実性腫瘍が大部分を占め、8~20 μ m 程度の微小血管がびまん性に存在した。血管鋳型標本を見ると、腫瘍辺縁部で認められた特徴的な微小血管構築は消失し、表面は不整で口径も 8~20 μ m と不均一ではあるものの、比較的一定の血管距離を有する腫瘍血管網が形成されていた (Fig. 6).

III) 大腫瘍の微小血管構築

a) 腫瘍周囲部および辺縁部

腫瘍周囲部および辺縁部は前述の小腫瘍と同様の微小血管構築を示した。

b) 腫瘍中間部

組織学的には不規則な断端を示す口径が 3~50 μ m の異常血管が多数認められた。血管鋳型標本を見ると、腫瘍辺縁部で認められた異常血管が腫瘍中間部に移行するにつれ腫瘍中心部に向かってテーブル珊瑚状に配列して途絶える部分 (Fig. 7A) と、腫瘍中間部に移行するにつれて動脈瘤様に拡張したり、拡張、蛇行して集合し、腎糸球体様 (Fig. 7B) の形態を示す異常血管の存在が認められた。

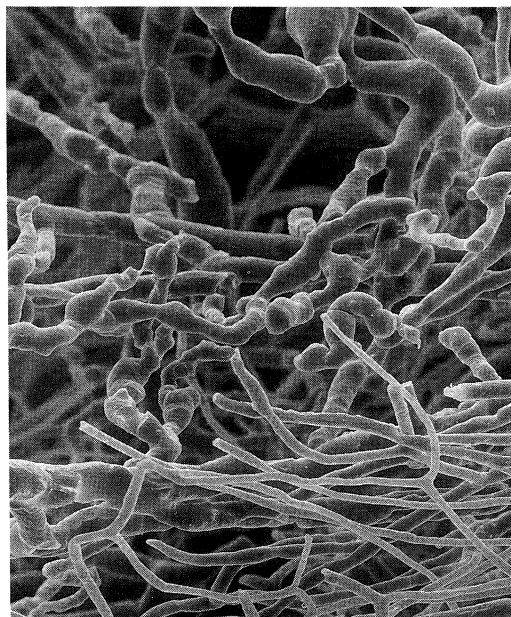


Fig. 4. Microvascular architecture of the peripheral zone in tumor more than 2 mm in diameter ($\times 300$).

c) 腫瘍中心部

組織学的には壊死や嚢胞形成を示す腫瘍が大部分を占めた。腫瘍血管は著明に拡張し、血管数の増加よりも血管面積の増加として認められた。これらの拡張した血管の内腔には十分な灌流、血液成分除去を行ったにもかかわらず、血

液成分の残存が観察された (Fig. 8A)。血管鑄型標本を見ると、腫瘍中間部においてテーパー珊瑚状に配列した異常血管は途絶え、腫瘍血管が認められない部分と、腫瘍中間部において動脈瘤様あるいは腎糸球体様の形態を示した異常血管が中心部に移行すると、血管密度

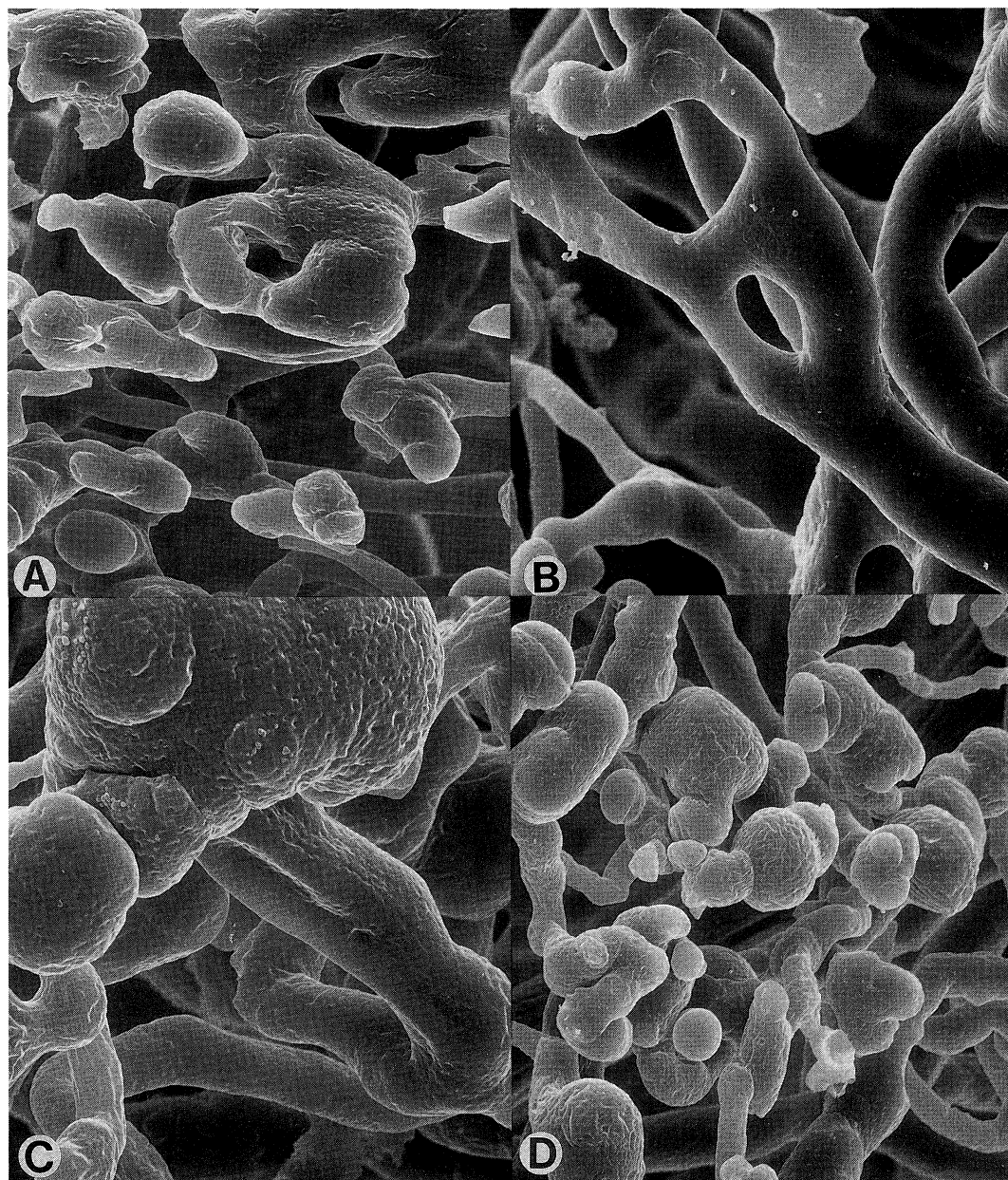


Fig. 5. Microvascular architecture of the peripheral zone in tumor more than 2 mm in diameter; ring formation (A, $\times 1000$), fenestration (B, $\times 1500$), endothelial invagination (C, $\times 1700$) and vascular sprouts (D, $\times 1000$).

は疎になるものの口径が $100\sim 200\ \mu\text{m}$ にも拡張した腫瘍血管が存在する部分とが観察された。後者の鋳型表面は粗造で、コンプ状変形

や螺旋状走行を示す奇異な外観を示した (Fig. 8B)。

IV. 考 察

血管鋳型走査電顕法は微小血管を中心とした血管構築を立体的かつ連続した構造物として観察できる利点を有し、従来の形態学的検索法では得られなかった視野で詳細な検討が可能である。これまで正常脳^{2)~5)}あるいは種々の中枢神経系疾患^{6)~9)}における微小血管構築の研究に応用され多数の報告が見られる。しかし、脳腫瘍の微小血管構築に関しては、発癌ウィルスや培養腫瘍細胞を脳に直接移植して作製した実験脳腫瘍モデルに用いた Fujita,¹⁰⁾ 吉田¹¹⁾ の報告が見られるものの、ENU 経胎盤投与による実験脳腫瘍モデルについては埴本ら¹²⁾ のわずかな記載があるのみで、その詳細は不明である。Druckrey ら¹³⁾ が報告した ENU 経胎盤投与による実験脳腫瘍モデルは、妊娠ラットに ENU を1回投与するだけでヒト類似の glia 系腫瘍が選択的に発生する。特に、脳腫瘍の間質である腫瘍血管の構築やその形成過程を追求す

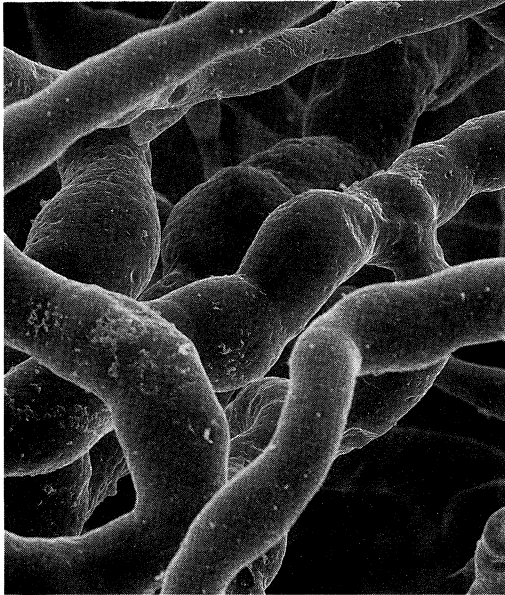


Fig. 6. Microvascular architecture of the intermediate and central zone in tumor 2-5 mm in diameter ($\times 1000$).

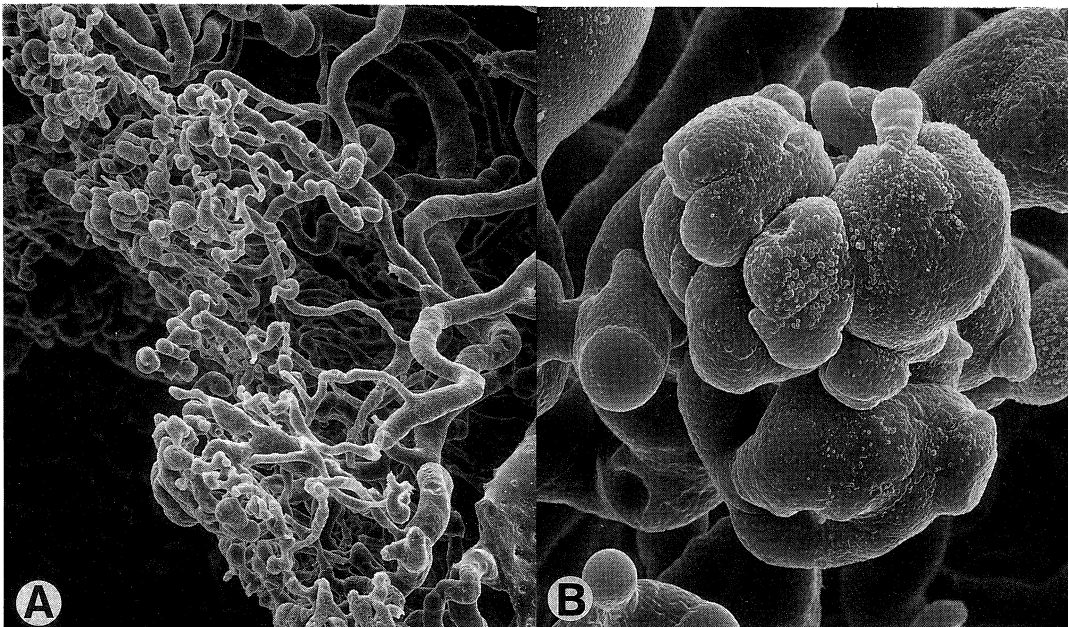


Fig. 7. Microvascular architecture of the tumor more than 5 mm in diameter. Coralliform (A, $\times 200$) and glomerular like capillaries (B, $\times 1100$) are observed in the intermediate zone.

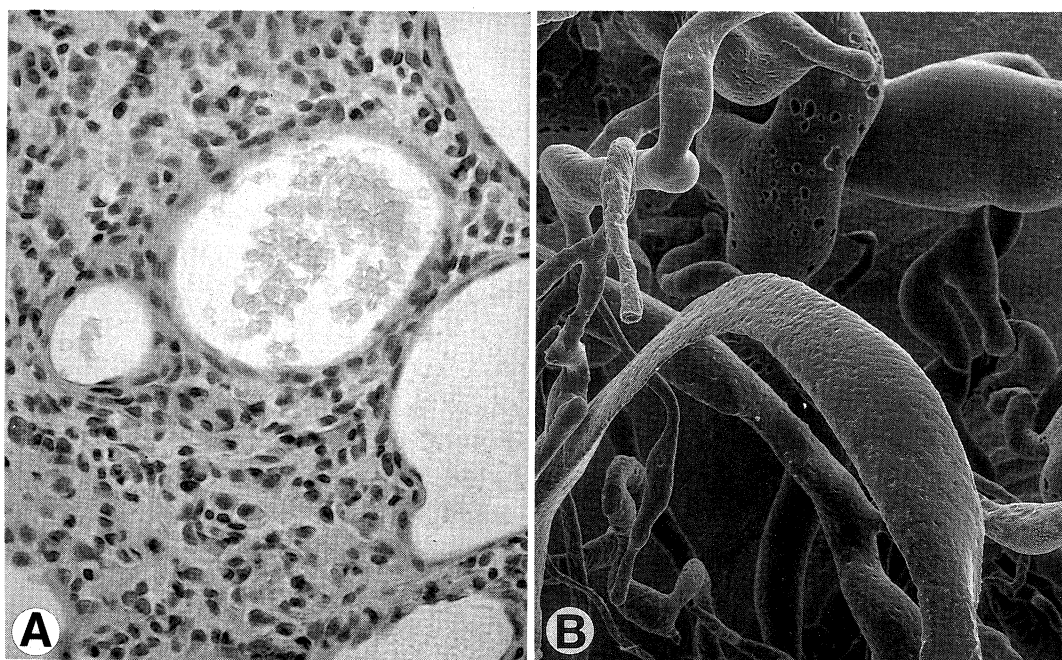


Fig. 8. Microvascular architecture of the tumor more than 5 mm in diameter.

A: Paraffin section opposing the vascular corrosion casts, showing residual blood cells in the dilated capillaries in spite of complete wash-out ($\times 200$).

B: Scanning electron micrograph showing remarkably dilated and paradoxically deformed capillaries ($\times 70$).

る場合、脳内操作にともなう機械的外傷や炎症などによる血管反応を無視できることから、より自然発生の状態に近い理想的な実験脳腫瘍モデルと考えられる。以下、血管鋳型走査電顕法を用いて立体的に観察し得た ENU 経胎盤投与による実験脳腫瘍の微小血管構築について考察を加えてみたい。

I. 腫瘍サイズによる血管構築の変化

脳腫瘍のような固形腫瘍の増殖は一定の速度では見られず、二つの異なる avascular phase, vascular phase を経て成長することが知られている。なかでも avascular phase の腫瘍では腫瘍血管の形成はなく、腫瘍細胞は周囲組織からの diffusion により栄養されると考えられており、腫瘍血管の形成がない場合、腫瘍は 1~2 mm 以下の小結節として dormant な状態にとどまることが実験的に報告¹⁴⁾ されている。本研究においても、長径が 2 mm 未満の微小腫瘍では明らかな腫瘍血管の形成は認めら

れず、むしろ微小血管の乏しい部分として観察され、avascular phase に相当する所見と考えられた。しかし、血管鋳型走査電顕法はこの方法の開発者である Murakami²⁾ や吉田ら³⁾ が指摘するように、血流が存在する部位の恒常性を維持することは技術的に可能であるが、樹脂が流入せずに途絶えた部分については、もともと血管が存在しないのか、血管が存在しても血流が存在しないのかを一概に論ずることは困難である。今回、上記の問題点を補うべく血管鋳型標本に対応する組織標本を光顕でも検討したが、より詳細な超微形態学的検討の必要性が痛感された。一方、長径が 2 mm 以上の腫瘍は vascular phase に相当し、腫瘍サイズにより内部の血管構築は異なるものの、腫瘍に対し spherical な腫瘍血管の形成が認められ、腫瘍細胞が何らかの形で血管を誘導し、密な協調関係を獲得して初めて腫瘍が急速に増大するものと考えられた。

II. 腫瘍の各部位における微小血管構築

vascular phase に相当すると考えられる腫瘍の微小血管構築を見ると、腫瘍サイズおよび腫瘍の各部位により異なる血管構築が観察された。

1) 腫瘍辺縁部

腫瘍辺縁部は腫瘍サイズにかかわらず一定の血管構築を示し、旺盛な腫瘍細胞増殖をうかがわせる活発な血管新生および腫瘍血管形成の一過程を示唆する所見が多数認められた。腫瘍の血管新生に関しては古くから形態学的基盤に基づいて多数の研究^{15)~17)}が行われている。坪本,¹⁸⁾ Cavallo ら¹⁹⁾は ³H-thymidine autoradiography 法を用いて腫瘍の cell kinetics を検討し、腫瘍辺縁部は腫瘍細胞だけでなく内皮細胞へも thymidine の取り込みが増加していることを報告し、腫瘍辺縁部における活発な血管新生を示唆する所見と考察している。内皮細胞が正常細胞のなかで腫瘍組織へ侵入し増殖可能な細胞であることから、腫瘍辺縁部で認められた特徴的な微小血管構築は新たな血管新生および腫瘍血管形成の一過程を示す所見と考えられる。すなわち、腫瘍辺縁部において異常血管の鋳型表面に見られた“溝”形成は、血管内腔に向かって増殖した内皮細胞により血管腔を分割し有窓構造を呈しながら増殖する過程と考えられた。また、樹脂が流入しないで途絶えた小隆起や盲端については、血管外腔に向かって増殖した内皮細胞による新たな血管の発芽と考えられ、血管の発芽と発芽が吻合することにより環状構造を呈し、それぞれが密接に関連して腫瘍血管網を形成するのではないかと推察された。

2) 腫瘍中間部および中心部

腫瘍中間部および中心部においては腫瘍サイズにより異なる微小血管構築が観察された。大腫瘍では腫瘍辺縁部で認められた異常血管が腫瘍中間部においてテーブル珊瑚状に配列して途絶え、腫瘍中心部には腫瘍血管の存在しない部分が認められたが、大部分は腫瘍中間部において動脈瘤様あるいは腎糸球体様に拡張し、腫瘍

中心部は奇異な形態を示す著明に拡張した腫瘍血管が主体となり血管数の増加よりも血管腔の増加として観察された。坪本ら,²⁰⁾ Pakula ら²¹⁾は microangiography 法を用いて実験脳腫瘍の血管構築を検討し、microaneurysm, sinusoid および glomerular formation と表現される拡張、蛇行した血管を報告している。

また、Deane ら²²⁾はこれら拡張血管を透過電顕で検討し、その内腔すべてに内皮細胞が存在することや、未熟な内皮細胞により構成されていることから、拡張血管は内皮細胞増殖による結果であると報告している。しかし、血管鋳型走査電顕法で得られた結果から推察すると、各種形態を示す拡張血管は腫瘍中間部から中心部にのみ存在し、拡張血管の鋳型表面には内皮細胞に特徴的な核の陥凹が見られないことから、内皮細胞増殖による拡張と考えるよりも、本来、内皮細胞増殖により狭小化傾向にあると考えられる腫瘍血管が腫瘍増殖にともなう何らかの二次的な修飾を受けた結果ではないかと推測された。つまり、腫瘍中間部での変化は内皮細胞増殖による腫瘍血管の狭小化あるいは閉塞を示す部分と、腫瘍血管の減少にともなう腫瘍組織の acidosis により、残存腫瘍血管が動脈瘤様あるいは腎糸球体様に拡張した部分が混在すると考えられた。さらに、腫瘍中心部の奇異な形態を示す著明に拡張した血管は光顕観察においてその内腔に血液成分の残存する部分が散見されたことより、血管は存在しても血流の停滞した非機能的血管であると推察され、その結果として腫瘍中心部では壊死、嚢胞形成など腫瘍組織の退行性変化が生ずるものと考えられた。一方、小腫瘍の中間部および中心部では大腫瘍で観察された腫瘍血管の一連の変化は認められず、表面は不整で屈曲、蛇行を示すものの比較的一定の血管距離を有する腫瘍血管網が存在した。また、光顕観察においても血液成分の残存する非機能的血管や腫瘍組織の退行性変化は認められなかったことから、腫瘍増殖にともなう腫瘍組織特有の影響が少なく、機能的腫瘍血管として存在し、比較的成熟した腫瘍循環が維持されている時期ではないかと考えられた。

Ⅲ. 腫瘍の血管新生について

血管新生は腫瘍だけでなく発生過程や炎症、創傷治癒などにおいても惹起されることは周知の事実である。しかし、これらの血管新生が全く異なる機序や形態で生じるか否かは今も議論的である。本研究で得られた結果から腫瘍血管の由来を推測することはできないが、発生過程²³⁾や凍結脳損傷⁸⁾および実験脳梗塞^{6),7)}にともなう微小血管構築の変化を血管鋳型走査電顕法を用いて観察した報告と比較すると、腫瘍辺縁部において恒常的に存在した血管新生を示唆する所見との類似性が認められる。つまり、内皮細胞が正常細胞のなかで腫瘍組織へ侵入し増殖可能な細胞であることから、腫瘍の血管新生もその起源に基づいて最適の環境をもたすべく普遍的に認められる現象であると考えたい。そして、血管新生の本質的な違いについては、腫瘍以外の血管新生は発生過程や炎症、創

傷治癒が完了するまでの寿命であり、新生された血管は成熟し、元来の組織に適合した血管構築になると考えられる。一方、腫瘍の血管新生は腫瘍細胞が存在する限り持続するが、形成された腫瘍血管は成熟することなくいずれ非機能的血管となり退縮するものと推察され、その一連の変化が腫瘍サイズや腫瘍の各部位における微小血管構築の変化として観察されたと考えたい。

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えてくださった川崎医科大学脳神経外科 石井鎮二教授に深謝致します。また、終始有益な助言と協力をいただいた電子顕微鏡センター、動物実験センターおよび当教室の諸兄に深謝致します。

本論文の要旨は、第46回日本脳神経外科学会総会(1987年10月、東京)において発表した。

本研究は川崎医科大学プロジェクト研究費(No.61-308)によった。

文 献

- 1) 菊岡政久：ラット脳における微小血管構築の検討—血管鋳型走査電顕法による解析—。川崎医学会誌14：539—551, 1988
- 2) Murakami, T.: Application of the scanning electron microscope to the study of the fine distribution of the blood vessels. Arch. Histol. Jpn. 32: 445—454, 1971
- 3) 吉田泰二, 生田房弘：走査および透過電子顕微鏡による中枢神経系微小血管構築の観察—脳血管鋳型法について。生田房弘：厚生省・神経疾患研究委託、低エネルギー低酸素症に基く脳障害の形態学的生化学的研究。昭和55年度研究報告書。1981, pp. 114—124
- 4) Nakai, K., Imai, H., Kamei, I., Itakura, T., Komai, N., Kimura, H., Nagai, T. and Maeda, T.: Microangioarchitecture of rat parietal cortex with special reference to vascular "sphincters". Scanning electron microscopic and dark field microscopic study. Stroke 12: 653—659, 1981
- 5) Motti, E. D. F., Imhof, H. G. and Yasargil, M. G.: The terminal vascular bed in the superficial cortex of the rat. A SEM study of corrosion casts. J. Neurosurg. 65: 834—846, 1986
- 6) 柴田尚武, 福島政昭, 井上 優, 堤 健二, 森 和夫：脳梗塞に関する実験的研究(第7報), 微小血管への電子顕微鏡的アプローチ。Neurol. Med. Chir. 24: 831—839, 1984
- 7) 吉田泰二, 生田房弘, 山田光則, 若林孝一：実験的脳梗塞における反応性微小血管：成熟脳および発達期脳血管との関連について。厚生省神経疾患、発達期における脳循環障害調査研究班(班長・松本 悟), 昭和60年度研究報告書。1986, pp. 25—34
- 8) 織田哲至：脳損傷後の微小血管構築の経時的観察。Neurol. Med. Chir. 28: 230—235, 1988
- 9) 岡 伸夫, 中田潤一, 遠藤俊郎, 高久 晃, 篠原治道, 森沢佐蔵：実験的水頭症における血管構築。Neurol. Med. Chir. 25: 701—706, 1985
- 10) Fujita, T.: Vascularization in infantile brain tumors induced by human adenovirus type 12 in rats. Acta Pathol. Jpn. 34: 1343—1354, 1984

- 11) 吉田泰二：実験脳腫内微小血管の立体像，胎子，新生仔期の脳血管形成との関連．脳と神 35：619—627, 1983
- 12) 埜本勝司，藤原 潔，玉木紀彦，松本 悟：Ethylnitrosourea (ENU) の経胎盤投与による実験的脳腫瘍（第5報），透過型および走査型電顕による微細形態の検討．脳と神 30：911—921, 1978
- 13) Druckrey, H., Ivankovic, S. and Preussmann, R.: Teratogenic and carcinogenic effect in the offspring after single injection of ethylnitrosourea to pregnant rat. *Nature* 210: 1378—1379, 1966
- 14) Gimbrone, M. A., Jr., Leapman, S. B., Cotran, R. S. and Folkman, J.: Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J. exp. Med.* 136: 261—276, 1972
- 15) Folkman, J. and Cotran, R.: Relation of vascular proliferation to tumor growth. eds. by Richter, G. W. and Epstein, M. A., Vol. 16, New York, Academic Press. 1976, pp. 208—248
- 16) Eriksson, E. and Zarem, H. A.: Growth and differentiation of blood vessels. In *Microcirculation*, eds. by Kaley, G. and Altara, B. M., Vol. 1, Baltimore, London and Tokyo, University Park Press. 1977, pp. 393—419
- 17) Brem, S.: The role of vascular proliferation in the growth of brain tumors. *Clin. Neurosurg.* 23: 440—453, 1976
- 18) 埜本勝司：Ethylnitrosourea の経胎盤的投与による実験的脳腫瘍（第3報），Autoradiography による腫瘍増殖動態について．脳と神 29：433—441, 1977
- 19) Cavallo, T., Sade, R., Folkman, J. and Cotran, R. S.: Tumor angiogenesis, rapid induction of endothelial mitoses demonstrated by autoradiography. *J. Cell Biol.* 54: 408—420, 1972
- 20) 埜本勝司，玉木紀彦，松本 悟：Ethylnitrosourea の経胎盤的投与による実験的脳腫瘍（第2報），ENU 経胎盤投与による実験脳腫瘍の血管構築について．脳と神 29：27—35, 1977
- 21) Pakula, H., Mennel, H. D. and Zulch, K. J.: Gross vascularization of experimentally induced transplanted tumors of the central and peripheral nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 43: 185—190, 1978
- 22) Deane, B. R. and Lantos, P. L.: The vasculature of experimental brain tumors. Part 1. A sequential light and electron microscopic study of angiogenesis. *J. neurol. Sci.* 49: 55—66, 1981
- 23) 吉田泰二，生田房弘，永田伴子：ラット胎子および新生仔期の脳血管鋳型法について．生田房弘：厚生省・神経疾患研究委託，低エネルギー低酸素症に基づく脳障害の形態学的生化学的研究，昭和55年度研究報告書，1981，pp. 125—136