

内胚葉組織分化の解析 I. 内胚葉組織の分化能

水野丈夫・八杉貞雄・角谷まゆみ・福田珠美子

113 文京区 東京大学理学部動物学教室

1977年7月28日 受領

Analysis of Differentiation of Endodermal Tissues. I. Differentiation Potency of Endodermal Tissues. TAKEO MIZUNO, SADA O YASUGI, MAYUMI SUMIYA, AND SUMIKO FUKUDA (Zoological Institute, Faculty of Science, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113)

ABSTRACT Endodermal epithelia isolated from avian embryos were either: (1) cultured organotypically *in vitro* in the absence of mesenchymal cells, (2) transplanted into the embryonic coelomic cavity or splanchnic mesodermal layer, or (3) cultured in combination with heterologous mesenchymal tissues on the chorio-allantoic membrane. The results obtained in the present study show that the endodermal pieces derived from presumptive digestive tract have autodifferentiation potency and can differentiate to some extent in the absence of mesenchymal tissues. The potency appears in the early stages of development of the endoderm and the areas from which each type of endodermal epithelia develops are rather strictly localized. The developmental fate of certain areas of the endoderm is barely changed even under the influence of heterologous mesenchyme. (*Zool. Mag.* 87: 56-63, 1978)

鳥類胚においては、胚盤葉上層の陥入によって生じた内胚葉層は発生が進むと側板中胚葉内臓板とともに管を形成し、前腸、中腸、後腸、尿嚢に大別されるようになる。前腸からはやがて鰓部諸器官、咽頭、気管、肺臓、食道、胃、肝臓、脾臓、十二指腸が、中腸からは小腸が、後腸からは盲腸、大腸が分化する。鳥類の胃はペプシンを分泌する前胃と粘液を分泌する砂嚢に分かれる。鳥類においては尿嚢は哺乳類におけるような尿生殖洞を形成することはない。これら諸器官の発生に関しては数多くの研究がなされたが、その地域性の確立の機構に関しては、まだ殆んどわかっていない。

内胚葉性上皮組織を間充織から切り離して培養すると、予定脾臓領域を除いては、一般に発生し得ないといわれてきた (Golosow and Grobstein, 1962; Le Douarin, 1965; Dameron, 1968; Le Lièvre et Le Douarin, 1969; David, 1972; Yasugi and Mizuno, 1974)。しかしながら我々は Wolff (1961) 法を応用して内胚葉上皮のみを培養することに成功した (Mizuno et Sumiya, 1974; Sumiya et Mizuno, 1974)。この方法を用いて Sumiya (1976a) は2.5日ニワトリ胚内胚葉上皮の分化能を明らかにし、さら

に2.5日より若い胚における分化能を研究した (Sumiya, 1976b; Sumiya and Mizuno, 1976; Mizuno et Sumiya, 1977)。このような方法によって得られる内胚葉の分化は間充織の非存在下で起きるので「自律分化」と名付けられる。しかしこれは必ずしも内胚葉の発生運命の決定を意味するものではない。なぜなら異質間充織の存在下にその発生運命を変更するかも知れないからである。しかし、ニワトリ胚 (7-27体節期) の前腸内胚葉上皮を体壁板または内臓板中胚葉の中に移植しても、中胚葉の前後軸の位置によらず、前胃、砂嚢、肝臓、脾臓などが分化する (Le Douarin et Bussonnet, 1966)。また、マウス胎児 (12-19日) の食道、胃、腸、または気管の上皮を異質間充織とともに培養しても、上皮はそれぞれの起源に応じた分化を遂げる (Soriano, 1965)。従って、この時期のこれらの領域の消化管上皮は既に決定がなされていると考えられる。本研究においても、これらの方法により、内胚葉上皮の自律分化能発生時期、ならびに異質間充織の存在下においても発生のかかり初期から発生運命が変更されることなく内胚葉上皮は分化しうるという事実をつかんだので報告する。

材料および方法

ニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) とウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) を用い、胚の「年齢」は Hamburger and Hamilton (1951) (H-H と略す) 段階表または体節数または孵卵日数によって表わす。培養前と培養中のすべての操作は無菌的におこなう。色々な時期の胚より諸部分を正確に切り出し、コラゲナーゼ (Worthington CLSPA, 0.03%) 溶液を用いて、内胚葉上皮を間充織より分離する。分離した上皮片が間充織細胞を含まないこと、および分離した間充織片が上皮細胞を含まないことは、ニワトリ細胞核とウズラ細胞核の形態が異なる (Le Douarin, 1969) ので、両者の組織を組み合わせることで培養することによってチェックすることが可能であり、両種の細胞が混じっている時はデータから除く。組織片についている酵素は血清：タイロッド液 (1:1) 中にて不活性化する。このようにして得た上皮片はさらにタイロッド液でよく洗ってから、ニワトリ卵黄膜片で包んで Wolff (1961) 法により Wolff et Haffen (1952) の半固体

寒天培地上にて器官的培養 (la culture organotypique) をおこなう (図1) (Mizuno et Sumiya, 1974; Sumiya et Mizuno, 1974) か、または、上皮片をすでに部域性を確立した領域の異質間充織と結合させて器官的培養をおこなった。一部はその途中で9日ニワトリ胚の漿尿膜上に植えかえた。このほか、内胚葉上皮片を1.5日胚内臓葉 (splanchnopleure) 中にカーボンと共に移植するか、3日胚体腔内に移植し (図3)、宿主の異質間充織と結合させることにより、内胚葉上皮の分化が間充織によって修飾を受けるか否かを調べた。外植体または移植片は6ないし10日後にとりだし、ブアン液にて固定し、4 μ m のパラフィン切片を PAS-グリケマルム染色した。

結 果

1. 内胚葉上皮組織の培養

まず、H-H 発生段階 14—18 (2.5日) のニワトリ胚の予定消化管内胚葉上皮を図1の方法により培養すると、食道、前胃、砂囊、膀胱、肝臓、小腸、大腸の7種類の上皮が、間充織の非存在下に分化して

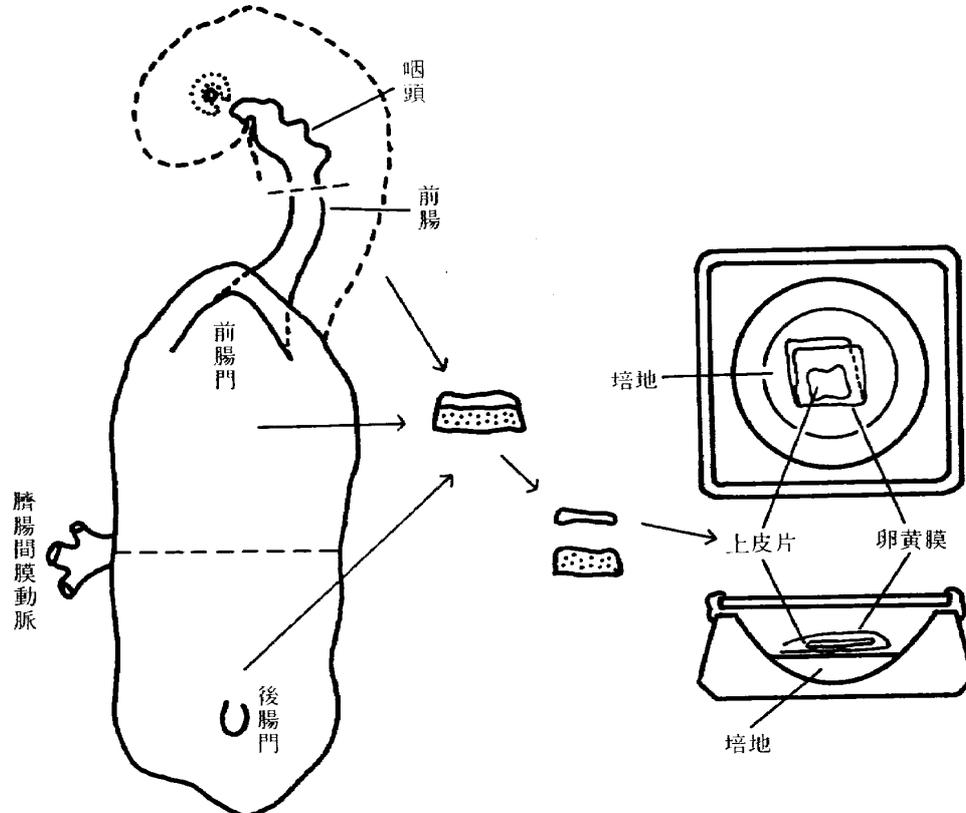


図1. 2.5日ニワトリ胚予定消化管内胚葉上皮のインビトロ培養

くる。これは内胚葉上皮の自律分化能を可視的にしたものである。さらに胚の年齢を次第に若くすることにより、内胚葉上皮における自律分化能の出現時期および各時期における胚体内のその部域性を知ることができる。その結果を表1に示す。表中の部域

性に関する略号は図2に示される領域である。このうち H-H 段階で6~13のものは6から13に進むに従ってその領域は表中に示されたもののなかで若干変化する。このようにインビトロで培養された内胚葉上皮組織は諸器官に特徴的な形態学的分化をなし、

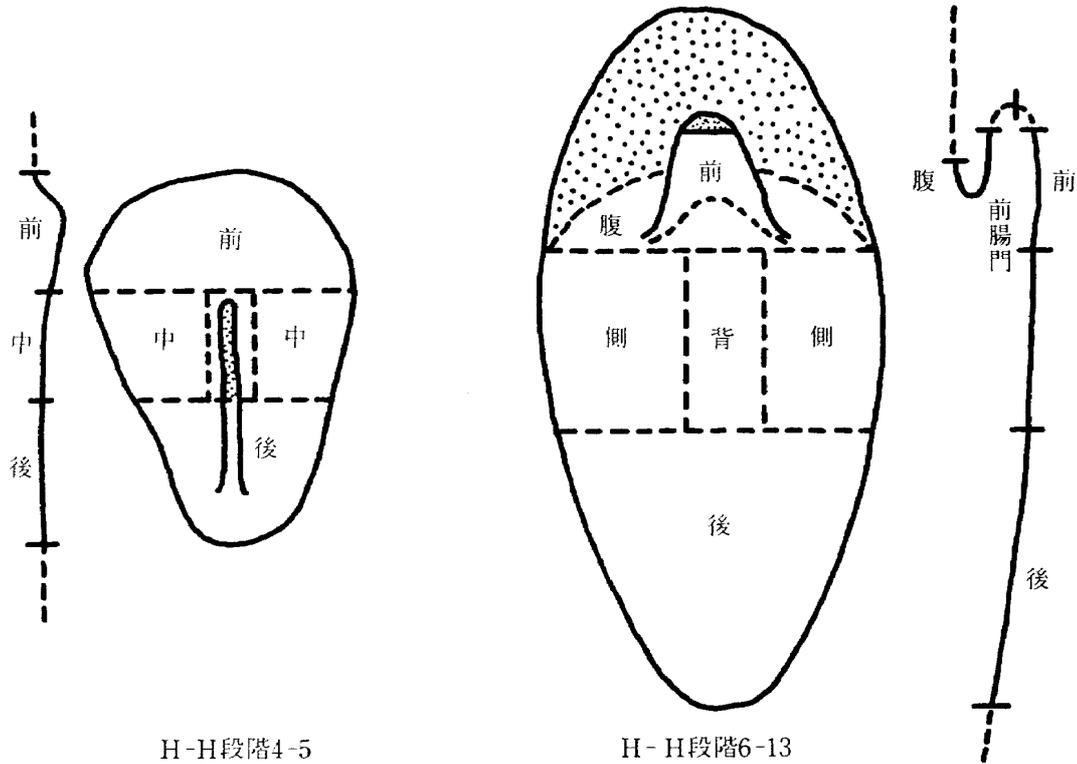


図2. 1~2日ニワトリ胚より分離した内胚葉上皮の領域。点線の部分の上皮は除く。

表1. 内胚葉上皮組織のインビトロ培養と自律分化能

上皮の分化型	実験数	分化した例数	自律分化能を検出し得た			
			最初の時期		内胚葉の領域	
			H-H 段階	体節数	H-H 段階 4~5	H-H 段階 6~13
咽頭	96	27	4	0	前, 中	前, 腹
甲状腺	66	15	6	0		前, 腹
食道	153	111	4	0	前, 中	前, 腹, 背, 側
前胃	97	19	6	0		前, 腹, 背, 側
砂嚢	113	27	5	0	前, 中	前, 腹, 背, 側
肝臓	42	17	9	7		腹
脾臓	22	15	10	10		背
小腸	218	146	4	0	前, 中, 後	前, 腹, 背, 側, 後
大腸	50	10	8	4		後

表中の部域性に関する略号は図2に示される領域である。

間充織細胞が全く無いにも拘らず、上皮組織としてある程度の形態形成を遂げるばかりではなく、たとえば甲状腺においてはPAS陽性のコロイド物質を貯え、また、砂囊上皮においてはグリコゲン顆粒の合成と粘液の分泌など機能的な分化もおこなう。また、このような分化は移植片の大小には左右されない。それ故、これらの研究により、鳥類内胚葉上皮が内胚葉の成立と前後して、発生の極めて初期に自律分化能を確立することが結論された。

しかしながら、これらのことは内胚葉が発生の初期にすでに決定されており、いかなる条件下においてもその発生運命に従って分化するというを必ずしも意味しない。内胚葉がこのような意味で厳密に決定されているかを知るために次の実験をおこなった。

2. 内胚葉上皮と間充織の結合

次の4つの方法により、内胚葉上皮と異質間充織を結合し、内胚葉上皮の自律的分化能の安定性を問うた。(1)再結合片のインビトロ培養。(2)再結合片の漿尿膜上移植。(3)上皮の内臓板中胚葉内移植。(4)上皮片の体腔内移植。

(1)インビトロ器官的培養：5日ニワトリ胚の食道、前胃、砂囊、小腸の上皮と間充織とを色々な組み合わせで直接結合し、インビトロで7~21日間培養した。おこなった16種類の組み合わせのうち、多くの組み合わせにおいて、70%以上の外植体の上皮は自らが由来した器官に特徴的な上皮へ分化した。たとえば、腸上皮と食道間充織の組み合わせでは、88%において上皮は腸上皮に分化し、逆に食道上皮と腸間充織の組み合わせでは89%において上皮は食道上皮に分化した。しかし、インビトロにおける消化管間充織の誘導作用は、血流が無いために十分発揮されないのではないかという疑問に答えるため、次の実験をおこなった。

(2)漿尿膜上移植：5日ニワトリまたはウズラ胚の予定消化管上皮片を5日ウズラまたはニワトリ胚の予定消化管間充織片とそれぞれ結合してインビトロで16時間器官的培養し、この外植体をニワトリ漿尿膜上に移して約10日間培養した。その結果を表2に示す。これによると、食道と小腸の上皮は多くの場合、組み合わせられた間充織の由来には無関係に、上皮が由来する器官の上皮にと分化することがわかる。しかし、前胃と砂囊上皮は、組み合わせられた間充織の影響を受け易い。これに関しては水野・八杉(1978)を参照。いずれにせよ、5日胚の食道と小腸

表2. 5日胚消化管上皮と消化管間充織結合体の漿尿膜上移植後の上皮の分化

上皮 間充織	食道	前胃	砂囊	小腸
食道	$\frac{6}{7}$ 食道	$\frac{1}{4}$ 食道	$\frac{1}{4}$ 砂囊	$\frac{6}{8}$ 小腸 $\frac{2}{6}$ 食道
前胃	$\frac{2}{4}$ 食道 $\frac{1}{4}$ 前胃	$\frac{1}{4}$ 前胃	$\frac{1}{4}$ 前胃	$\frac{6}{8}$ 小腸
砂囊	$\frac{15}{17}$ 食道 $\frac{4}{17}$ 砂囊	$\frac{3}{8}$ 砂囊	$\frac{3}{8}$ 砂囊	$\frac{1}{4}$ 小腸
小腸	$\frac{7}{7}$ 食道	$\frac{2}{4}$ 小腸	$\frac{5}{7}$ 小腸	$\frac{9}{9}$ 小腸

太字は上皮の予定運命が間充織によって変更されなかった例を示す。分数の分母は外植体総数、分子は右のものに分化した上皮をもつ外植体数を示す。

上皮は5日胚の消化管の異質間充織の影響を受け難いと結論される。それならば5日胚消化管上皮はもっと若い発生段階の予定消化管間充織の影響を受けないのであろうか。そのことを知るため、次の実験をおこなった。

(3)内臓葉内移植：前と同じ5日ウズラ胚の予定消化管上皮片をカーボンでマークしながら1.5日ニワトリ胚の内臓葉の中に移植した。この際、からだの前後軸に沿って色々なレベルに上皮片が入るように試みたが、前胃と砂囊の領域には上皮は見いだし得なかった(330例中330例)。その結果のうち、たとえば腸上皮に注目すると、5日小腸上皮を1.5日の予定食道領域の内臓板中に移植したのち、食道間充織中に見いだされたもの8例のうち、7例までが典型的な小腸上皮に分化した。このことは、小腸上皮は少くも5日胚においては分化の方向が比較的明確に決っており、消化管発生の初期(1.5日)より異質間充織の影響下におかれても自らの発生運命を変更し難いことを明らかにしたものである。それでは、もっと若い胚の上皮片でもその発生運命は変更され難いのであろうか。この疑問に答えるため、2.5日ウズラ胚の臍腸間膜動脈より後方の予定腸領域の上皮を1.5日ニワトリ胚の内臓葉中に移植した。移植した前後軸の位置により、ウズラ上皮は宿主の気管、食道、前胃、十二指腸、小腸の間充織中に入ったが、移植上皮はいずれの場合も単層柱状の腸上皮に分化した。このことは2.5日予定腸領域の発生能が既に狭く制限されていることを示すものである。

(4)体腔内移植：若いウズラ胚の前腸門を含む部分

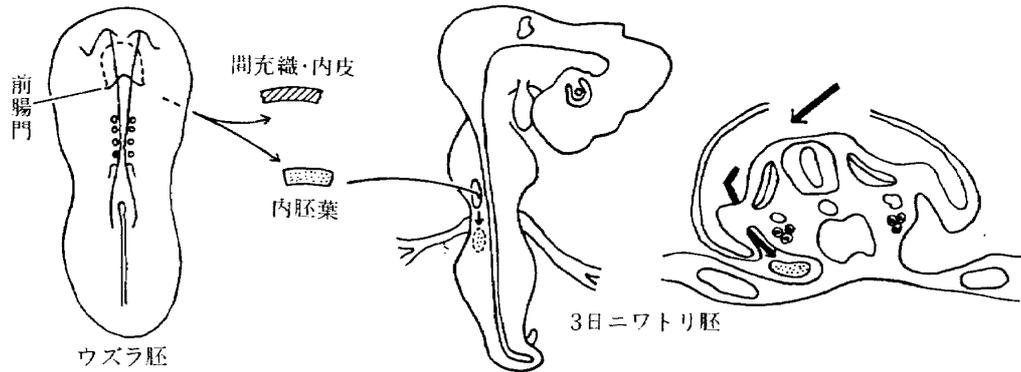


図3. ウズラ内胚葉上皮のニワトリ胚体腔内への移植

の内胚葉を分離し、これを3日ニワトリ胚後方の体腔内に移植した(図3)。上皮はやがて色々な位置で体腔の周囲の異質間充織と接触して結合するが、5体節期(H-H 段階8⁺)以後の胚から得た内胚葉上皮片からは肝臓および膵臓の上皮組織が分化することがわかった。さらに同様の内胚葉上皮片をインビトロで5~15日ニワトリ胚の異質間充織片(たとえば、各種消化器官、真皮などの)と結合させ、16時間後に3日ニワトリ胚体腔内に移植した場合には、もっと早い発生段階すなわち4体節期(H-H 段階8)以後の胚の内胚葉片から肝および膵上皮組織が分化する。これらのことは少なくとも4体節期のウズラ胚の前腸門付近の内胚葉は、肝臓と膵臓の発生に関する限り決定済みであって、その決定はかなり安定していることを意味する。

考 察

1. 内胚葉上皮の自律分化能

厳密な意味で内胚葉上皮の自律分化能を知るには、内胚葉上皮片のみを生体から分離し、間充織の非存在下で培養した時に上皮片が単独で行う分化を調べねばならない。これまで内胚葉上皮片は一般に培養不可能とされてきた(序文参照)が、我々はまずこの点を克服した。しかも、培養された上皮片から、咽頭、甲状腺、食道、前胃、砂囊、肝臓、膵臓、小腸、大腸などに特徴的な上皮組織が分化してくることを見出した。問題は2つあり、1つは予定消化器官上皮が自律分化能を獲得する時期の追求であり、他は自律分化能をもつ領域の決定と、それが予定運命(prospective fate)と一致するや否やの検証である。ニワトリ胚の内胚葉上皮片が自律分化能を獲得する時期とその領域については最も単純なインビトロ培養系において詳細に追求された(Sumiya, 1976a, b,

c; Sumiya and Mizuno, 1976; Mizuno et Sumiya, 1977)。今までに我々が得た結果は、咽頭、食道、小腸の上皮が少なくとも H-H 発生段階4という胚内胚葉が拡大を始める時期に自律分化能をもっていること、砂囊上皮は段階5より、甲状腺、前胃上皮は段階6より、大腸上皮は段階8より、肝臓上皮は段階9より、背側膵臓は段階10より自律分化能を獲得することを示している。小腸の上皮は段階4の後方 $\frac{1}{3}$ から生ずるが、この場所が胚内胚葉の予定領域(Vakaet, 1970 の三次下層 tertiary hypoblast)を含まないか否かは今後の課題である。このほか、我々はこれら自律分化能を示す内胚葉の領域を決めることができたが、この領域は9~25体節期のニワトリ胚を用い、カーボンマーク法ならびにX線破壊法によって得た Le Douarin (1964) の予定域(presumptive area)の分布とよく一致している。これらの事実はインビトロで間充織細胞の非存在下で自律的に分化しうる内胚葉の領域は、間充織の存在下におけるインビトロでの内胚葉上皮の発生運命に一致することを意味しており、両者の結果は、内胚葉に於ては発生初期よりモザイク性が強いことを示唆するものである。なお、我々が得た内胚葉自律分化能獲得時期を Willier and Rawles (1931) が漿尿膜移植法により求めた H-H 段階4と5における移植片の発生と比較すると、若干の相違がある。我々のインビトロ系では甲状腺と肝臓はこの時期に自律分化しないが、彼等の系では移植片にすべての胚葉が含まれており、この時期の移植片からこれらの器官が発生する。これは内胚葉の発生が他の胚葉によって支持されることを示唆してはいるが、それ以上の情報を与えるものではない。Sherer (1975) は26体節期(H-H 段階16)以後の肝原基内胚葉をインビトロで2日間培養し、かろうじて毛細胆管の発生をみ

ているが、我々は7体節期 (H-H 段階9) の内胚葉をインビトロで8~9日間培養し、肝臓上皮に自律分化するのを見た。この自律分化能の獲得時期は、決定の時期と必ずしも一致しない。Le Douarin (1964) は肝臓内胚葉は4~5体節期 (H-H 段階8-8⁺) に心臓領域の間充織の誘導によって「決定」されると結論したが、我々の結果は、肝臓内胚葉の自律分化能獲得時期が H-H 段階9であることを示している。また、Le Douarin (1967) は甲状腺上皮は15体節期 (H-H 段階12⁻) には少くも決定しているといっているが、我々の系では体節がまだあられない時期 (H-H 段階6) に自律分化能を獲得することを知り得る。このように自律分化能獲得段階は決定段階と必ずしも同一ではない。また、自律分化能の確立は、上皮の発生運命を変更できないという意味で「決定されている」ということと必ずしも同じではない。そこで、内胚葉の自律分化能が異質間充織により影響を受けるか否かを問う実験をおこなった。

2. 内胚葉上皮自律分化能の安定性

内胚葉上皮自律分化能の安定性を問うために、色々な発生段階にある色々な場所の内胚葉および間充織を4つの実験発生的手段を用いて結合させた。上皮・間充織結合体の器官的培養においては上皮は多くの場合、自らの自律分化能が示す方向に分化した。これらの場合、用いた間充織に誘導能力があることは尿管上皮との結合培養により確かである (Mizuno et Yasugi, 1973; Yasugi and Mizuno, 1974; 水野・八杉, 1978) ので、用いたインビトロ条件下では、内胚葉上皮は一般に間充織の影響を受けにくいといえる。これを確かめるため、この結合体を漿尿膜上に移植して上皮の発生運命を追跡した。これによると胃の上皮は消化管間充織片の誘導力を受ける。しかし、食道と小腸の上皮は、この方法によっても各々の自律分化能を変更させられない。さらに我々は本論文の結果において、2.5日予定腸上皮を1.5日食道域の内胚葉に移植した場合、上皮は小腸タイプの分化をとげることをみた。このことは少くも2.5日胚予定腸上皮の自律分化能が異質間充織によって容易に変更できないことを示すものである。

我々はさきにインビトロで肝臓内胚葉の自律分化能獲得時期は7体節期 (H-H 段階9) であることを示したが、Le Douarin et Bussonnet (1966) もまた7体節期=ワトリ胚の前腸内胚葉上皮が異質間充

織の影響下においても、前胃、砂嚢、肝臓、膵臓、小腸の上皮に分化するのを見ている。しかし、我々は前腸門内胚葉を体腔内移植する方法により5体節期胚の内胚葉より肝上皮を分化させ得たし、さらに「結果」で述べたように同じ内胚葉をあらかじめ異質間充織と結合してのち体腔内移植を行うことにより4体節期にはすでに予定肝臓と予定膵臓領域は決定されていることを明確ならしめた。この時期は Le Douarin (1964) がいう肝内胚葉決定の時期すなわち4~5体節期と一致している。また、Dieterlen-Lièvre (1970) がいう背側膵内胚葉決定の時期すなわち19体節期 (H-H 段階13) よりもはるかに早い。このような決定時期の発見は極めて重要なことであるが、そのほか、我々の系においては内胚葉のみが肝臓や膵臓の予定領域からとられたもので、体腔内移植により得られた肝臓や膵臓上皮の間にある非上皮成分は肝、膵臓予定域以外の間充織であることもまた極めて重要であって、肝、膵臓分化の機構と深くかかわっている。肝臓の正常発生を追求すると (Fukuda, 1976), 内胚葉のほか、肝間充織、内皮、食細胞などの細胞が関係していることがわかるが、これらの細胞の肝細胞分化に関する寄与については研究中である。

以上、我々がここに示してきた事実は、内胚葉上皮自律分化能がいままで一般に考えられてきた以上に発生段階の初期に局部的にあらわれ、かつ、その分化能は部分によってはかなり安定していて、決定が完了しているときえ考えうることを強く示唆するものである。一体、この内胚葉の決定が如何なる機構でおきるのか、また、内胚葉の細胞分化と形態形成機構は全く異なるものであるのか、内胚葉上皮のみで自律分化した細胞は果たしてその上皮に特有なマーカー酵素や蛋白を保有しているのか、などは今後の研究課題である。

謝 辞

本研究は文部省科学研究費の援助によりなされたものである。

文 献

- DAMERON, Fl. (1968) Étude expérimentale de l'organogenèse du poumon chez l'embryon de Poulet: I. Mise en évidence et chronologie des interactions épithélio-mésenchymateuses. *Ann. Embryol. Morph.* 1: 373-393.

- DAVID, D. (1972) Les relations épithélio-mésenchymateuses au cours de l'organogénèse gastrique du foetus de Lapin. *J. Embryol. Exp. Morph.* 27: 177-197.
- DIETERLEN-LIÈVRE, F. (1970) Tissus exocrine et endocrine du pancréas chez l'embryon de Poulet: origine et interactions tissulaires dans la différenciation. *Develop. Biol.* 22: 138-156.
- FUKUDA, S. (1976) The morphogenesis of the liver in the chick embryo—Development of the hepatic endoderm, the hepatic mesenchyme, the endothelium and macrophages. *J. Fac. Sci., Univ. Tokyo IV*, 13: 341-351.
- GOLOSOW, N. AND C. GROBSTEIN (1962) Epithelio-mesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis. *Develop. Biol.* 4: 242-255.
- HAMBURGER, V. AND H. L. HAMILTON (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* 88: 49-92.
- LE DOUARIN, N. (1964) Étude expérimentale de l'organogénèse du tube digestif et du foie chez l'embryon de Poulet. *Bull. Biol. Fr. Belg.* 98: 543-676.
- LE DOUARIN, N. (1965) La différenciation de l'endoderme hépatique étudiée en culture in vitro. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 159: 90-96.
- LE DOUARIN, N. (1967) Détermination précoce des ébauches de la thyroïde et du thymus chez l'embryon de Poulet. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 264: 940-942.
- LE DOUARIN, N. (1969) Particularité du noyau interphasique chez la caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*). Utilisation de ces particularités comme 'marquage biologique' dans des recherches sur les interactions tissulaires et les migrations cellulaires au cours de l'ontogénèse. *Bull. Biol. Fr. Belg.* 103: 435-452.
- LE DOUARIN, N. ET C. BUSSONNET (1966) Détermination précoce et rôle inducteur de l'endoderme pharyngien chez l'embryon de Poulet. *Compt. Rend. Acad. Sc. Paris, D.* 263: 1241-1243.
- LE LIÈVRE, Ch. ET N. LE DOUARIN (1969) Étude expérimentale de la différenciation de l'endoderme thyroïdien chez l'embryon d'Oiseau. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 163: 943-947.
- MIZUNO, T. ET M. SUMIYA (1974) Utilisation de la membrane vitelline de l'oeuf de poule pour l'étude de la différenciation de l'épithélium endodermique. *Ann. Biol.* 13: 111-115.
- MIZUNO, T. ET M. SUMIYA (1977) Différenciation latente de l'endoderme de jeune embryon de Poulet. *Compt. Rend. Acad. Sc. Paris, D.* 284: 473-476.
- MIZUNO, T. ET S. YASUGI (1973) Différenciation in vitro de l'épithélium de l'allantoïde associé à différents mésenchymes du tractus digestif, chez l'embryon de Poulet. *Compt. Rend. Acad. Sc. Paris, D.* 276: 1609-1611.
- 水野丈夫・八杉貞雄 (1978) 内胚葉組織分化の解析 II. 間充織の誘導能. *動物学雑誌* 87: (印刷中)
- SHERER, G.K. (1975) Tissue interaction in chick liver development: A reevaluation I. Epithelial morphogenesis: The role of vascularity in mesenchymal specificity. *Develop. Biol.* 46: 281-295.
- SORIANO, L. (1965) Différenciation des épithéliums du tube digestif in vitro. *J. Embryol. Exp. Morph.* 14: 119-128.
- SUMIYA, M. (1976a) Differentiation of the digestive tract epithelium of the chick embryo cultured in vitro enveloped in a fragment of the vitelline membrane, in the absence of mesenchyme. *Wilhelm Roux' Archiv* 179: 1-17.
- SUMIYA, M. (1976b) Localization of autodifferentiation potencies in the early endoderm of the chick embryo. *J. Fac. Sci., Univ. Tokyo IV*. 13: 363-381.
- SUMIYA, M. (1976c) In vitro analysis of the organogenesis of the digestive tract in the chick embryo. Thesis for the degree of Doctor of Science, University of Tokyo. pp. 1-147.
- SUMIYA, M. ET T. MIZUNO (1974) Différenciation de l'endoderme de tractus digestif de l'embryon de Poulet cultivé in vitro dans

- une membrane vitelline, en l'absence du mésenchyme. *Compt. Rend. Acad. Sc. Paris*, D. 278: 1369-1372.
- SUMIYA, M. AND T. MIZUNO (1976) Development of the autodifferentiation potencies in the endoderm of the chick embryo. *Proc. Japan Acad.* 52: 587-590.
- VAKAET, L. (1970) Cinematographic investigations of gastrulation in the chick blastoderm, *Arch. Biol. (Liège)* 81: 387-426.
- WILLIER, B. H. AND H. E. RAWLES (1931) The relation of Hensen's node to the differentiating capacity of whole chick blastoderms as studied in chorio-allantoic grafts. *J. Exp. Zool.* 59: 429-465.
- WOLFF, Et. (1961) Utilisation de la membrane vitelline de l'oeuf de poule en culture organotypique, I. Technique et possibilités. *Develop. Biol.* 3: 767-786.
- WOLFF, Et. ET K. HAFFEN (1952) Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires "in vitro". *Tex. Rep. Biol. Med.* 10: 463-472.
- YASUGI, S. AND T. MIZUNO (1974) Heterotypic differentiation of chick allantoic endoderm under the influence of various mesenchymes of the digestive tract. *Wilhelm Roux' Archiv* 174: 107-116.