総 説 (学会賞受賞)

ラット胚における頭部神経堤細胞と前腸内胚葉の歯胚形成への寄与
—長期下顎培養法の応用—

今 井 元

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
顎顔面機構制御学講座分子発生分野

Contribution of Cranial Neural Crest Cells and Foregut Endoderm to Tooth Initiation
in Rat Embryos

—The Application of Long-term Mandibular Culture—

Hajime Imai

*Department of molecular craniofacial embryology, Tokyo Medical and Dental University,
1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8549, Japan*

はじめに

顎顔面の形態形成や組織分化の研究には、主に鳥類および両生類が実験材料として用いられてきた。しかし、哺乳類の顎顔面の骨・軟骨・歯牙などは系統発生学的に他の動物種とは大きく異なっている。例えば、哺乳類の歯牙は切歯、犬歯、臼歯などのさまざまな形態を有する異型歯性であるのに対し、魚類、両生類、爬虫類などではすべて同型歯性であり、鳥類には歯牙様構造物すら存在しない。したがって、哺乳類の顎顔面の発生機構の解析は、哺乳類を実験材料とする必要がある。しかしながら、哺乳類胚は子宮内で発生するという独特の発生様式をもっており、胚の取り扱いが難しく、これが顎顔面の形態形成の解明を遅らせる原因となっていた。したがって、長い間、哺乳類胚を材料として実験発生的な研究を行う手法の開発が求められてきた。

現在、哺乳類胚の顎顔面形態形成の解明には、全胚培養法および下顎器官培養法が用いられている。哺乳類全胚培養法は、中胚葉誘導や神経誘導などの起こる中胚葉形成期から神経胚期さらには咽頭胚期までの培養が可能であり、培養下で哺乳類胚に顕微操作を加えることができるため、多くの研究者が中胚葉の細胞動態や神経堤細胞の移動様式の解明に応用してきた¹⁻¹⁰⁾。また、下顎器官

培養法は、下顎の歯牙・軟骨などの組織分化を再現することが可能なため、下顎の形態形成の研究に応用されてきた^{11,12)}。しかし、これら既存の培養法は、“胚葉が形成される中胚葉形成期・前腸陥入期・神経胚期から顎顔面原基が成立する咽頭胚期まで”(全胚培養法)¹³⁻¹⁶⁾、あるいは“咽頭胚期から軟骨・歯牙・舌の組織分化期まで”(下顎器官培養法)のいずれか一方の時期にのみ適用可能であり、下顎の発生の初期段階から組織分化段階までを通しての培養系は確立されていなかった。そこで、筆者らは、ラット胚の全胚培養に続いてその培養胚の下顎を器官培養することにより、原腸形成・神経胚期から下顎の軟骨・歯牙・舌などの組織分化を再現できる長期下顎培養系を開発した。この系は、下顎の発生を初期段階から詳細に解析できるため、下顎の軟骨・歯牙・舌などの器官発生の初期誘導 (initiation) の解明にたいへん有用であると考えられる。

本稿では、まず、この〈ラット胚全胚培養法と下顎器官培養法を組合せた長期下顎培養法〉について詳述する。次に、〈長期下顎培養法を細胞追跡に応用した研究〉として、「哺乳類における頭部神経堤細胞の歯胚間葉への寄与」および「哺乳類における前腸内胚葉上皮の予定歯胚形成領域への寄与」を証明した2つの研究について紹介する。

長期下顎培養法の確立

本稿では、哺乳類胚の発生段階を各時期に特異的な発生現象に基づいて下記のように分類した。

中胚葉形成期：中胚葉形成開始時期～原腸形成前まで
(マウスでは胎齢 7—7.5 日, ラットでは胎齢 8.5—9 日)

原腸形成期：原腸形成開始期～前腸陥入前まで

(マウスでは胎齢 7.5—8 日, ラットでは胎齢 9—9.5 日)

前腸陥入期：前腸陥入期～神経堤細胞移動開始前まで
(マウスでは胎齢 8—8.25 日, ラットでは胎齢

9.5—9.75 日)

神経胚期：神経堤細胞移動開始期～胚の回転開始前まで

(マウスでは胎齢 8.25—9 日, ラットでは胎齢 9.75—10.5 日)

咽頭胚期：胚の回転開始期～第 1 鰓弓などの顔面原基の成立時期まで

(マウスでは胎齢 9—10.5 日, ラットでは胎齢 10.5—12 日)

組織分化期：顎顔面原基の成立後～下顎の軟骨・歯牙・舌の組織分化期まで

(マウスでは胎齢 10.5—13 日, ラットでは胎齢 12—14.5 日)

また、前腸陥入期～咽頭胚期の発生段階を細かく表示するため、体節数でその発生段階を表す。

1. 長期下顎培養法における原腸形成期の顕微操作の意義

顎顔面の骨・軟骨は、肢芽発生と同様にダイナミックな上皮と間葉の相互作用のもとに形成される器官であることが鳥類を用いた組合せ実験によって示されている。たとえば、(1) 顔面原基の上皮は、肢芽原基の間葉の増殖を維持し、軟骨の伸長を促進すること (2) 肢芽原基の上皮も、顔面原基の間葉の増殖を維持し、軟骨の伸長を促進することなどが報告されており、両原基の上皮と間葉は交換可能であることが示されている¹⁷⁾。さらに、肢芽の形態形成に重要な役割を担う分子 (Fibroblast growth factor (Fgf)-4 や -8, Sonic hedgehog (Shh) など) が顎顔面原基においても領域特異的に発現する。したがって、両者には共通した上皮と間葉のシグナリング機構が働いている可能性が高いと考えられる。

しかしながら、原始口腔は口咽頭膜 (胚の前方で前腸内胚葉と口腔外胚葉の接した領域) が破裂することにより形成されるため¹⁸⁻²⁰⁾、原始口腔周囲の顎顔面の原基は

前腸内胚葉と口腔外胚葉に由来する上皮が複雑に入り組んで分布している。また、顎顔面の原基には頭部神経堤細胞が移動してくるため、この領域には頭部神経堤細胞と一次中胚葉由来の間葉細胞が分布している^{21,22)}。したがって、顎顔面の歯牙・軟骨・舌の器官形成を解明するためには、上皮と間葉の相互作用を考えるだけではなく、口腔外胚葉、前腸内胚葉、頭部神経堤細胞および一次中胚葉という由来の異なる 4 種類の組織の分布領域と相互作用を考える必要がある。実際、これまでに

1) 頭部神経堤細胞は顎顔面の骨・軟骨などの結合組織に、一次中胚葉は筋肉に分化する運命にあり、組織分化の運命は由来する組織によりある程度決定されていること^{21,22)}。

2) 形態形成のマスター遺伝子と呼ばれる遺伝子の転写産物が、組織特異的に発現すること (例えば、*Shh* は前腸内胚葉特異的に発現する²³⁾)。

3) 前脳形成に重要である脊索前板が前腸内胚葉の層に存在すること²³⁾。

4) 古典的な両性類の移植実験において、歯牙の発生には口腔外胚葉と頭部神経堤細胞と前腸内胚葉の 3 つの組織の存在と相互作用が必要であること²⁴⁾、などが明らかにされている。これらのことは、顎顔面の器官形成には、顎顔面原基に独特な「由来の異なる 4 つの組織の分布様式と相互作用」が重要であることを示している。

ここで紹介する長期下顎培養法は、全胚培養法と下顎の器官培養法を組合せた培養系であるため²⁵⁾、原腸形成期あるいは神経胚期に組織特異的な標識や遺伝子導入が可能であり、咽頭胚期や組織分化期の下顎の器官形成を再現できる系である。したがって、顎顔面領域の器官形成における 4 種類の組織の分布領域を明らかにし、それらの相互作用の分子メカニズムを検索するうえで非常に有用であると考えられる。

2. 長期下顎培養法における全胚培養法

われわれは、哺乳類全胚培養法における前腸陥入期・神経胚期から咽頭胚期にかけての胚の顕微操作、および培養方法についてのプロトコルをすでに報告している¹⁴⁻¹⁶⁾。しかしながら、胚にどのような顕微操作を加えれば組織特異的な標識や遺伝子導入が可能になるかについては、詳しく記述していない。したがって、本稿では、ラット胚全胚培養法についてはプロトコルのみにとどめ、組織特異的な標識や遺伝子導入を可能にする顕微操作について 3. で詳しく解説する。

1) ラット胚全胚培養法

胎齢 9.5—10 日のラット胚を 56—72 時間全胚培養す

る場合、5、20、60、95%の酸素に、それぞれ5%二酸化炭素と窒素バランスを加えた混合ガスを用いて、その時期の胚に適切な酸素濃度と流量を経時的に変化させる。培養中はつねにロータを20 rpmで回転させ、培養液中に混合ガスを分散させる。培養器の温度は、常に37°Cに保つ。長期下顎培養法では、多くの場合48時間を越えて培養する必要があるため、36-48時間後に培養液(IC血清、後述)を交換する必要がある。

2) ラット IC 血清ならびに培養液の調整

着床後の哺乳類胚の培養には一般的に100%ラット血清を用いる。ただし、溶血した血液からの血清では培養成績が良くないため、溶血した血液から血清を採取しないように注意しなければならない。当研究室では、採取直後に遠心分離した、いわゆるIC血清(immediately centrifuged serum)を自家製造している¹⁴⁻¹⁶⁾。ここでは、ラットIC血清ならびに培養液の調整法は省略するが、全胚培養下でいかにうまく胚を維持するかが長期下顎培養を成功させる鍵となるので、IC血清を自家調整することをお勧めする。

3) 胎齢9.5-10日のラット胚の摘出

(1) ジエチルエーテルを用いて麻酔した妊娠ラットを仰臥位に置く。

(2) 腹部一面に70%エタノールを用いて簡易消毒する。

(3) 開腹用のピンセットとハサミでラットを開腹する。最初に前腹壁の筋膜と皮膚組織とのすきまを利用し皮膚のみにV字状の切開を加え、前腹壁を胸郭部まで露出する。次に、滅菌したピンセットとハサミで腹壁をV字状に切開する。

(4) 滅菌したピンセットとハサミで子宮の卵巢端をみつけ、輸卵管と卵巢の境界部分を切り、次いで子宮断端を持ち上げ、子宮間膜にハサミをあてがうようにして間膜を切って子宮を取り出す。この際、子宮に脂肪組織をなるべく付けないよう注意する。

(5) 取り出した子宮はただちに緩衝塩溶液(Tyrod液)の入った培養皿に移して血液を洗い、新しいTyrod液入りの培養皿に移しておく。

(6) 子宮の断端部分に眼科用ハサミを刺し入れ、非胎盤側の子宮壁に長軸に沿って切開を加える(図1A)。

(7) 胚を傷つけないように胚側方の子宮壁の長軸に垂直に切開を加える(図1B)。

(8) 眼科用ピンセットを両手に持ち、一方のピンセットで子宮断壁を保持し、もう片方のピンセットで子宮壁を軽く挟み、ピンセットの腹を胚と子宮壁の間に沿わせ、しごくように胚を取り出し(図1C)、スポイトで新しい

図2 脱落膜およびReichert膜の除去。

Tyrod液入りの培養皿に移す。

(9) 胎盤側の脱落膜にピンセットを刺し入れ(図2A)、そのまま脱落膜を縦に2つに分割する(図2B)。さらに、2つに分割した脱落膜のうち、胚が付着している方をさらに縦に二分割する(図2C)。

(10) 胚が脱落膜に付着している場合、一方のピンセットで脱落膜を保持し、もう片方のピンセットの先でReichert膜と脱落膜の間を長軸方向に優しく撫でるようにして胚を脱落膜から分離する(図2D)。この際、外胎盤円錐が外れないように、必ず外胎盤円錐側から胚側に向けてピンセットの先を走らせる。

(11) 外胎盤円錐の反対側には、Reichert膜と卵黄囊膜の間に小さな空隙がある。その領域のReichert膜を左右のピンセットで摘む(図2E)。ピンセットを左右に開いてReichert膜を破る。この際、胚を揺らしながら丁寧に裂き、外胎盤円錐を傷つけないように注意する(図2F)。

(12) 卵黄囊膜や胎盤が傷ついていないことを確認して、新しいTyrod液入りの培養皿に移す。

3. 顕微操作による組織特異的な標識・遺伝子導入

妊娠9.5-10日のラットの母獣からは、神経堤細胞が移動を開始する前の胚(4体節期以下)、あるいは、口咽頭膜が破れる前の胚(8体節期以下)を摘出できる。すなわち、この時期の胚の顎顔面は、前腸内胚葉、一次中胚

図3 胎齢9.5-10日ラット胚への蛍光色素を用いた組織特異的な細胞標識。

葉、口腔外胚葉の三相性胚盤から構成されており、この時期においては複雑に入り組むまでには至っていない(内胚葉層の背側正中に脊索前板と脊索になる層が存在していることは除く)。したがって、組織特異的な標識や遺伝子導入を可能にするためのコツは、この時期の胚の適切な発生段階を選んで標識や遺伝子導入を行うことにある(図3A)。筆者らは、細胞標識には蛍光色素(DiI, DiO)を用い、遺伝子導入には *LacZ* を組み込んだアデノウイルス(Adex-lacZ)を用いて、第1鰓弓への組織特異的な標識や遺伝子導入を確立している。ここで用いる蛍光色素やアデノウイルスは、膜に付着し、細胞膜や細胞内に取り込まれる性質をもっているため、ニードルを胚に刺す必要はない。DiIを用いて神経堤細胞を標識する場合、標識溶液の拡散を防ぐため、標識部位の周囲に漏れた溶液はニードルで吸収する(図3A)。また、DiIは、わずかながら毒性があるため標識する部位と時期に応じて濃度を設定する必要がある。神経堤細胞の標識では、ジメチルホルムアミドを溶媒とし、飽和させたものと同じ溶媒で30倍に希釈したものを用いる。また、内胚葉を標識する場合には、同様の飽和溶液を0.3 M スクロースで30倍に希釈したものを用いる。前腸内胚葉を Adex-lacZ を用いて標識する場合は、ウイルス液を吹き付けた

後、2-4時間培養し感染を成立させ、口咽頭膜が破れる前に Tyrode 液中でよく洗い、外胚葉へのアデノウイルスの拡散を防ぐ。

1) 第1鰓弓の神経堤細胞への組織特異的な標識・遺伝子導入

齧歯類では、神経堤細胞の形成は3-4体節期に始まり、5体節期には移動を開始する^{26,27)}。したがって、第1鰓弓内の神経堤細胞由来の外胚葉性間葉を DiI を用いて標識するためには、3-4体節期の中脳後方から後脳前方領域の神経堤を標識する(図3A)。大隅らは、DiI 標識した神経堤を宿主の神経堤領域に移植すると、正常に移動することを報告している²⁸⁾。また、Takahashi らは、アデノウイルスを用いて、神経外胚葉に直接遺伝子導入しているが、神経堤細胞には他の組織と比較して選択的に多くのウイルスが取り込まれるらしい²⁹⁾。したがって、アデノウイルスを用いて神経堤細胞特異的に遺伝子導入を行うためには、3-4体節期の供与体の羊膜内にウイルス液を注入し、全胚培養下で2時間感染した後、神経堤を摘出・洗浄し、宿主の神経堤領域に移植することが可能である。

2) 第1鰓弓の一次中胚葉への組織特異的な標識・遺伝子導入

第1鰓弓の頭部中胚葉を DiI 標識する場合は、4-5体節期中の脳後方から後脳前方の領域の中胚葉節(ソメトメア)に行く(図3A)。実際、Trainor と Tam は、中脳-後脳前方のソメトメアを DiO を用いて標識することにより、上顎隆起と下顎突起と鼻隆起の一次中胚葉由来の標識に成功している¹⁰⁾。アデノウイルスを用いて中胚葉に遺伝子導入を行うためには、神経堤細胞の場合と同様に供与体のソメトメアに感染した後、その中胚葉細胞を摘出・洗浄し、宿主のソメトメア領域に注入することが可能である。

3) 第1鰓弓の口腔外胚葉への組織特異的な標識・遺伝子導入

第1鰓弓の口腔外胚葉を DiI 標識する場合は、4-8体節期に行うことができるが、漏洩により神経堤あるいは内胚葉が標識されないように、標識後、余分な標識液は確実に吸引しておかなければならない(図3A)。アデノウイルスによる遺伝子導入は、第1鰓弓に到達する神経堤細胞がすでに遊走した後で口咽頭膜が破裂していない7-8体節期に行うのが適当であろう。しかしながら、ウイルス液は局所への感染には向かないため、筆者らは、口腔外胚葉のみへの精密な遺伝子導入は、非常に難しいと考えている。

4) 第1鰓弓の前腸内胚葉への組織特異的な標識・遺伝子導入

第1鰓弓の内胚葉に対して標識あるいは遺伝子導入する場合は、ラット胚では9-10体節期に口咽頭膜が破れるので、それより前の発生段階の、口腔外胚葉と前腸内胚葉が確実に分かれている6体節期までに行うのが適当である(図3A)。筆者らは、head hold stageの内胚葉の層にアデノウイルスを感染し、前腸内胚葉に標識している(図3A)³⁰⁾。ただし、アデノウイルスを遺伝子導入に用いた場合、感染後に、胚をよく洗浄する必要がある。

5) 顕微操作による組織特異的な標識および遺伝子導入のプロトコール

(1) まず、マイクロインジェクション時に胚を支えるホールディングピペットとインジェクション用のニードルを作製しておく。ホールディングピペットはマイクロバーナーを用いて、インジェクション用ニードルはプレーを用いてガラスキャピラリーから作製する。

(2) ホールディングピペットをホルダーに装着し、マイクロマニピレーターにセットする。

(3) ホールディングピペットの溶液に浸る部分をアルコールランプで軽く熱し、簡易滅菌する。

(4) 直径100 mmのシャーレにTyrode液を適量入れ、ホールディングピペットをゆっくり下ろし、シャーレの底と平行になるように調節する。

(5) 胚をホールディングピペットの先端に置き標識しやすい方向に向きを変え、マイクロシリンジをゆっくりと引く。その際、吸引する領域は胚の前方部や側方部の卵黄囊膜のみにとどめ、胚は吸引しないように注意する。

(6) ニードルをマウスピペットにセットし、標識に用いる溶液(DiIやAdex-lacZなど)を吸引しておく。

(7) 神経堤細胞を標識する場合は、ニードルを卵黄囊膜と羊膜の内側まで貫通させる。その際、胚を傷つけないように卵黄囊膜や羊膜の状態を確認して、ニードルの先を不透明に見える胚の中胚葉部分を避けて刺入し、胚のない方向に向けて羊膜腔まで貫通した後、標識する位置にもっていく。

(8) 標識した部位および時期を記録し、胚をホールディングピペットから外し、調整しておいたIC血清入りのボトルにスポイトを用いて移し、全胚培養を行う(図3B)。

(9) 前腸の陥入が起こるhead hold stageあるいは神経堤細胞の移動が始まる神経期(体節数0-8)から培養を開始した場合は56-72時間前後の全胚培養を行う(図3C)。これらの時期から培養を開始すると顔面原基が成立する咽頭胚期(体節数30-35)までの胚発生を維

持できる。その後の組織分化期を再現するためには、以下に示す下顎の器官培養を行う。

4. 長期下顎培養法における下顎の器官培養法

下顎の器官培養については、すでに多くの論文に記載されているので^{11,12)}、ここでは、主に、培養成功への鍵となる全胚培養後の胚の取扱いについて述べる。

1) Tyrode液入りの直径100 mmの培養皿を用意し、ミリポアフィルター(直径6 mm, Type AA)を入れておく。また、器官培養用の培養皿には、ステンレス格子を置き、Tyrode液で満たしておく。

2) スポイトを用いて胚を全胚培養用ボトルから培養皿に取り出し、ピンセットを用いて卵黄囊膜、胎盤、羊膜などを除去し観察する。この時点で、胚が30体節期以上に成長していないと、器官培養の成功率は極端に下がるため、体節数29以下の組織分化の遅れている胚があれば除く。

3) タングステンニードルを用いて、まず、胚の第3鰓弓の尾側、次いで心臓、上顎突起の順に切り落とし、鰓弓レベルの外植片を摘出する(図4A, 1→2→3)。

4) この時点の外植片には胚の背側部分(神経管、脊索など)が付いているので、タングステンニードルの先端を前腸内胚葉に差込み鰓嚢を結ぶラインで、前腸の側壁から背側部分を切り落とす(図4B)。必要ならば、第2鰓弓以下を丁寧に除去する。

5) 取り出した下顎突起の外植片をミリポアフィルターですくい取る(図4C)。この際、外植片の口腔側または咽頭側を上にして金魚すくいの要領で丁寧にすくい取る。

6) 外植片をミリポアフィルターごと器官培養用の培養皿のステンレス格子の上に置く(図4D-G)。

7) 培養皿内の緩衝塩溶液をBGJb medium(10%牛胎仔血清, 100 µg/ml Ascorbic acid, 50 U/ml ペニシリン・ストレプトマイシン含有)と置換した後、CO₂インキュベーターに移す。全胚培養を終了してからCO₂インキュベーターに移すまで、15分以上かからないようにする。

8) BGJb mediumは、隔日で交換する。

5. 長期下顎培養法における下顎の組織分化

長期下顎培養法では、胎齢9.5-10日(0-8体節期)のラット胚を約2.5日間全胚培養し、30-34体節期まで発生させた後、下顎突起を摘出し器官培養を行う^{25,30)}。この長期培養法で発生した下顎を組織切片によって形態観察すると、下顎臼歯は8.5日間の培養で80%以上が蕾状

図 4 全胚培養後の胚および下顎突起の顕微操作。

期まで、12.5日後には帽状期まで達するものもあった²⁵⁾。また、舌やメッセル軟骨も発生していた。歯胚に特徴的な組織学的ポイントを *in vivo* の歯胚と比較したところ、両者は同様の組織像を示していた。すなわち、8.5日間の培養では歯堤の一部が間葉組織に向かって増殖し、歯蕾（エナメル器）を形成し、その周囲の間葉細胞は凝集し、歯胚の間葉と他の下顎の間葉とを区別できるようになる（図5 A, B）。また、12.5日後には、エナメル器の最深部は陥入し、その凹部には間葉細胞が球状に密集して歯乳頭を形成していた。エナメル器中で歯乳頭に接する内層には一層の円柱上皮からなる内エナメル上皮が形成され、外層には外エナメル上皮が形成される（図5 C, D）。内・外エナメル上皮の間には、星状網が形成され、その中心には細胞が密集したエナメル結節がみられる（図5 C, D）。さらに、エナメル器と歯乳頭を取り囲むように歯小嚢らしき細胞集団も観察できた（図5 C, D）。

これらの結果は、筆者らが開発した長期下顎培養法が原腸形成期から組織分化期までの下顎の発生と歯胚形成を再現できる方法であることを示している。

長期下顎培養系の応用：頭部神経堤細胞と前腸内胚葉の歯胚形成への寄与

哺乳類の歯は第1鰓弓の上皮と間葉の相互作用により誘導され、その相互作用は歯胚の initiation から形態形成、さらには、最終分化に至るまで関与している。Mina と Kollar は、胎齢9—13日（ラットの胎齢10.5—14.5日に相当する）のマウスの咽頭胚の第1鰓弓と第2鰓弓か

ら摘出した上皮と間葉の recombinant を培養し、歯胚の誘導実験を行った³¹⁾。その結果、歯胚誘導能は、胎齢9—10日では第1鰓弓の上皮にのみ存在し、胎齢11日に間葉に移行しはじめ、胎齢12日には完全に間葉に移行することを明らかにした。また、Lumsden は、胎齢9日のマウスの第1鰓弓の上皮と胎齢8.5日の頭部（中脳から後脳レベル）あるいは体幹部（5体節より後方）の神経堤の組織片を組合せて成獣マウスの前眼房に移植し、歯胚の誘導実験を行った³²⁾。これらの結果、胎齢9日の第1鰓弓の上皮は、頭部あるいは体幹部のどちらの神経堤細胞との組合せでも歯を誘導できることを報告している。これは、あたかも頭部の神経堤細胞が、口腔外胚葉の歯胚誘導に関係していないかにみえる。しかしながら、胎齢9日の第1鰓弓の上皮は、すでに頭部神経堤細胞と接触しているため、“頭部神経堤細胞が口腔外胚葉の歯胚誘導能の獲得に関係している”という命題を否定することはできない。すなわち、第1鰓弓の口腔外胚葉がいつどのように歯胚誘導能を獲得するのかについては、いまだに未解決である。したがって、これらの問題を解明するためには、胎齢9日より前に起こる組織間相互作用を明らかにしなければならない。

筆者は、胎齢8.5日から胎齢9日に、頭部神経堤細胞が口咽頭膜（口腔外胚葉と前腸内胚葉の接する領域）周囲に到達し、これら3つの組織が出会うことに注目している。実際、両性類では、「頭部神経堤細胞が歯胚間葉に寄与すること³³⁾」ならびに、「前腸内胚葉へ陥入する領域の口腔外胚葉（stomodeal collars）で歯胚形成が起こる

図 5 *in vitro* で発生した下顎臼歯歯胚 (A, C) と *in vivo* で発生した下顎臼歯歯胚 (B, D)。

- A. 8.5 日間の培養で発生した下顎臼歯歯胚。歯蕾 (EO) を形成しており、その周囲の間葉細胞は凝集し、歯胚間葉 (DM) と他の下顎の間葉とを区別できる
- B. 胎齢 14 日の下顎臼歯歯胚
- C. 12.5 日間の培養で発生した下顎臼歯歯胚。エナメル器の最深部は陥入し、その凹部には間葉細胞が球状に密集して歯乳頭 (DP) を形成している。エナメル器中で歯乳頭に接する内層には一層の円柱上皮からなる内エナメル上皮 (IE) が形成され、外層には外エナメル上皮 (OE) が形成されている。内・外エナメル上皮の間には、星状網が形成され、その中心には細胞が密集したエナメル結節 (EK) がみられる。エナメル器と歯乳頭を取り囲むように歯小嚢 (DF) らしき細胞集団が存在している
- D. 胎齢 16 日の下顎臼歯歯胚

こと²⁰⁾などが観察されている。さらに、1946 年に Sellman は、両生類 *Ambystoma maxicanum* の幼生を用いて歯の誘導実験を行っている (図 6)。彼は、神経胚期の頭部の組織から移動前の神経堤と口腔周囲の外胚葉と内胚葉を摘出し、同様の胚の胴体にいろいろな組合せの recombinant を移植した²⁴⁾。その結果、図 6 のように口腔周囲の外胚葉と前腸内胚葉と頭部神経堤細胞の 3 つの組

両生類の歯の誘導には、口腔外胚葉と頭部神経堤細胞と口腔内胚葉が必要である。

図 6 Sellman の歯の誘導実験。

織の recombinant を移植した時にのみ歯が誘導されることを明らかにした。すなわち、両生類では、歯の発生には口腔外胚葉と頭部神経堤細胞と前腸内胚葉の 3 つの組織の相互作用が必要であることが示されている。このように、哺乳類胚の口腔外胚葉における歯胚誘導能の獲得を解明するためには、これら 3 つの組織の相互作用を明らかにしてゆく必要がある。しかしながら、哺乳類では、頭部神経堤細胞あるいは前腸内胚葉が、歯胚の initiation 期に口腔のどの領域に存在するのかさえ明らかにされていない。そこで、筆者らは、1) 哺乳類胚においても頭部神経堤細胞が歯胚間葉に寄与する、2) 哺乳類胚においても前腸内胚葉上皮が歯胚上皮に隣接して存在する、という 2 つの作業仮説の検定を行った。

1. 頭部神経堤細胞の歯胚間葉への寄与

神経堤細胞とは、神経管の発生過程において、神経板の両端が盛り上がりヒダ状になった領域 (神経堤) から生ずる神経外胚葉由来の間葉細胞のことである。神経堤細胞は、神経管から離れると中胚葉の間あるいは表皮外胚葉の直下を移動し、到達した領域で、脊髄神経節、知覚神経、副腎髄質、色素細胞などに分化する³⁴⁾。両生類や鳥類の移植実験では、頭部の神経堤細胞は体幹部のそれとは異なる性質をもつことが知られている。すなわち、

頭部神経堤細胞は骨・軟骨に分化する能力をもっており、その骨・軟骨の形態的特徴は神経堤細胞が規定しており、しかも、神経堤細胞が規定する形態的特徴は、移動する神経軸上の位置により異なることが示されている³⁴⁻³⁷⁾。特に、第1鰓弓に移動する中脳および後脳前方の神経堤細胞は特徴的であり、これを第2鰓弓に移動する神経堤領域に移植すると、方形骨やメッケル軟骨などの第1鰓弓骨格が第2鰓弓領域に重複して生ずる³⁷⁾。

両生類を用いた神経堤細胞の追跡実験では、歯胚間葉は頭部神経堤細胞に由来することが示されている。哺乳類においても第1鰓弓に中脳および後脳前方の神経堤細胞が移動することは示されているけれども^{10,25)}、これらの頭部神経堤細胞が将来歯胚を形成する部位に移動し、実際に歯胚間葉に寄与することは証明されていなかった。そこで、筆者らは、まず、1) 予定歯胚形成域に移動する神経堤細胞が神経軸上のどの位置からいつ移動を開始するかを同定した上で、2) 実際にその神経堤細胞が歯胚の間葉に存在することを証明することにした²⁵⁾。

1) 予定歯胚形成域に到達する神経堤細胞が移動を開始する位置とその発生段階

嚙歯類では、中脳から後脳前方に位置する神経堤細胞は4-6体節期に移動を開始し、第1鰓弓に分布することが報告されている²⁷⁾。また、下顎臼歯の歯胚発生の最初の形態学的徴候は、下顎突起の口腔側基部の上皮の肥厚として現れることが知られている。そこで、まず、胎齢9.75-10日のラット胚の中脳前方・中脳後方・後脳前方の神経堤をDiI標識した後、全胚培養下で胚を発生させ、神経軸上のどの位置からいつ移動を開始する神経堤細胞が予定歯胚形成域に到達するのかを同定した²⁵⁾。

(1) 30時間全胚培養後の解析

これらの領域の神経堤を標識した場合、早い発生段階で標識すると、神経堤から近い領域（近心側）から遠い領域（遠心側）まで標識細胞がみられ（図7A-D）、遅い発生段階に標識すると、近心側にのみ標識細胞がみられた（図7F）。つまり、早い発生段階での標識は、移動を開始する時期の早い神経堤細胞も遅い神経堤細胞も標識できることを示している。中脳後方の神経堤を標識した場合の第1鰓弓の分布様式も、標識した発生段階に依存していた。具体的には、3-5体節期に標識したすべての胚で、標識細胞は第1鰓弓の口腔側遠心側を含む第1鰓弓全体に分布していた（図7C, D）。これに対して、6体節期に標識した場合にも（図7E）、第1鰓弓の口腔側遠心側に検出されたが、標識細胞の数は3-5体節期に標識した場合に比較して少なかった。また、7-8体節期に標識した場合は、標識細胞は第1鰓弓の近心側にわずか

に認められたものの、遠心側には全く観察されなかった（図7F）。中脳前方の神経堤を標識した場合（図7A）、標識細胞は鼻板形成域や眼の原基の周囲で多く観察されたが、三叉神経節や第1鰓弓にはわずかに認められるに過ぎなかった。一方、後脳前方の神経堤を標識した場合（図7B）、標識細胞の分布は主に第1鰓弓や三叉神経節に観察されたが、鼻板形成域や眼の原基の周囲には観察されなかった。しかし、第1鰓弓での標識細胞の分布は非口腔側基部に局限し、ほとんどの胚で口腔側遠心まで到達することではなく、第1鰓弓に分布している標識細胞の数は中脳後方の神経堤を標識した場合に比較して少なかった。

(2) 60時間全胚培養後の解析

次に、60時間全胚培養を行い、下顎臼歯の予定臼歯歯胚形成域に到達する神経堤細胞の移動開始時期と位置をさらに正確に同定した。30時間全胚培養後の結果をもとに、DiI標識は3-6体節期の胚に限定して行った。中脳後方の神経堤を3-4体節期に標識した場合（図8B）、標識細胞はすべての胚で下顎突起の口腔側基部の予定臼歯歯胚形成域に検出され、5体節期に標識した場合は、半数の胚で認められた。これに対して、6体節期に標識したすべての胚で、標識細胞は予定臼歯歯胚形成域には検出されなかった。一方、中脳前方では（図8A）、早い発生段階の標識であっても、標識細胞は下顎突起の予定臼歯歯胚形成域への分布は認められなかった。また、後脳前方の神経堤を標識した場合も（図8C）、標識細胞は予定臼歯歯胚形成域には検出されなかった。これらの結果は、中脳後方から早い時期に移動を開始する神経堤細胞が、予定臼歯歯胚形成域に到達することを示している。また、ここで示した移動開始の位置と時期に依存した神経堤細胞の分布様式の詳細な解析によって、上述の第1鰓弓内の神経堤細胞への特異的な標識および遺伝子導入が可能になった。

2) 歯胚間葉での神経堤細胞の検出

上述の実験をもとに、3-4体節期の中脳後方の神経堤に限定して標識し、8.5日間の長期下顎培養を行った。24個体中21個体の胚が、60時間の全胚培養下で30体節期以上に发育し、引き続いて器官培養された下顎突起の21原基中18原基で蕾状期まで発生した臼歯が認められた。さらに18下顎原基中17原基で、標識側の下顎原基間葉に標識細胞が検出された（図9A）。しかも標識細胞を検出できた17下顎原基中13原基で、陥入した歯胚上皮直下の凝集した歯胚間葉に標識細胞が認められた（図9B）。これらの結果より、哺乳類において頭部神経堤細胞が歯胚間葉へ直接寄与していることが初めて明らかにさ

れた。

2. 前腸内胚葉上皮は予定歯胚上皮に隣接して存在する

両生類を用いた移植実験では、歯胚誘導には、口咽頭膜領域の口腔外胚葉と前腸内胚葉が必要である一方、頭部神経堤細胞の歯胚形成能は必ずしも第1鰓弓へ移動する神経堤細胞のみに限定されず、もっと後方の後脳後方に相当する領域の神経堤細胞まで含まれていることが示されている³⁸⁾。また、前脳や体幹部の神経堤には、歯胚形成能が存在しないことも知られている²⁴⁾。これらが示唆することは、予定歯胚形成域には、まず始めに、口咽頭膜の口腔外胚葉と前腸内胚葉が存在しており、これらの上皮が歯胚の initiation のポテンシャルをもつ領域を規定しており、次いで、その領域に歯胚形成能をもった神経堤細胞が移動してくることにより歯胚形成が開始する

ということである。しかしながら、哺乳類の歯胚形成における前腸内胚葉の関与についてはこれまでのところ全く報告がなされていなかった。それは、前腸内胚葉由来の組織が歯胚の initiation 期にどこに分布するのかさえ検索されてこなかったためである。そこで、筆者らは、長期下顎培養法を用い、まず、1) 咽頭胚の予定歯胚形成域に前腸内胚葉が存在することを明らかにし、さらに、2) 実際にその前腸内胚葉上皮が initiation 期の歯胚上皮に隣接して存在することを証明した³⁰⁾。

1) 咽頭胚の予定歯胚形成域に前腸内胚葉が存在する
Lumsden は、30-34 体節期のマウス胚の下顎突起の正中部と基部を摘出し、マウス成獣の前眼房へ移植を行うことにより、下顎突起の正中部は切歯を形成する領域であり、下顎突起の基部は臼歯を形成する領域であることを明らかにしている。そこで、前腸陥入期のラット胚の前腸内胚葉を Adex-lacZ を用いて標識し、全胚培養下

図 7 30 時間全胚培養後の DiI 標識された神経堤細胞の分布様式。写真は、すべて胚の側面観で、A の左側の写真のみ暗視野像、他はすべて明視野像と暗視野像の合成像。DiI 標識された神経堤細胞は、赤い細胞として検出できる。矢頭は、第1鰓弓内で最も遠心で認められた標識細胞。

- A: 中脳前方の神経堤 (AMB) を4体節期 (S4) に標識した場合の標識細胞の分布。標識細胞は鼻板形成域 (FNM) や眼の原基 (E) の周囲で多い。
B: 後脳前方の神経堤 (AHB) を4体節期 (S4) に標識した場合の標識細胞の分布。標識細胞は、主に第一咽頭嚢周囲や三叉神経節 (TG) に多く分布しているが、第1鰓弓の予定上顎形成域 (Mx) や予定下顎形成域 (Md) に分布している標識細胞は少ない。
C-F: 中脳後方 (PMB) の神経堤を標識した場合の標識細胞の分布。
C, D: 3-5 体節期 (S3, S5) に標識した胚。第1鰓弓の口腔側遠心部を含む第1鰓弓全体に分布している。
E: 6 体節期に標識した胚。第1鰓弓の標識細胞の数は、3-5 体節期に標識した場合に比較して少ない。
F: 7 体節期に標識した胚。標識細胞は第1鰓弓の近心部にわずかに認められるものの、遠心部には全く観察されない。
Bar: 100 μ m

図 8 60 時間全胚培養後の DiI 標識された神経堤細胞の分布様式。写真は、すべて前頭断の明視野像と暗視野像の合成像。DiI 標識された神経堤細胞は、赤い細胞として検出できる。

- A: 中脳前方の神経堤 (AMB) を4体節期 (S4) に標識した場合の標識細胞の分布。下顎突起での分布はほとんど認められない。
B: 中脳後方 (PMB) の神経堤を3体節期 (S3) に標識した場合の標識細胞の分布。標識細胞は、下顎突起の口腔側基部の予定臼歯胚形成域 (矢印) に検出された。
C: 後脳前方の神経堤 (AHB) を4体節期 (S4) に標識した場合の標識細胞の分布。下顎突起での分布はほとんど認められない。Bar: 100 μ m

図 9 長期下顎培養後の DiI 標識された神経堤細胞の分布様式。DiI 標識された神経堤細胞は、赤い細胞として検出できる。

- A: 中脳後方の神経堤を3体節期 (S3) に標識した場合の下顎 (Md) における標識細胞の分布。写真は、前頭断の暗視野像。矢印は、臼歯歯胚 (TB) が存在する位置を示している。
B: 中脳後方の神経堤を3体節期 (S3) に標識した場合の下顎臼歯の歯胚間葉における標識細胞の分布。写真は、前頭断の明視野像と暗視野像の合成像。Bar: 100 μ m

図 7

図 8

図 9

図 10

図 10 60 時間全胚培養後の Adex-LacZ で標識された前腸内胚葉の分布様式。Adex-LacZ で標識された前腸内胚葉は、青い細胞として検出できる。

- A. 胚の側面観。原始口腔の咽頭側の内面に標識された前腸内胚葉を検出できる。
- B. 胚の前頭断。下顎突起 (Md) の口腔側基部の予定切歯胚形成域 (I) と予定臼歯胚形成域 (M) に標識された前腸内胚葉 (矢印) を検出できる。

哺乳類の歯の誘導は、口腔外胚葉と頭部神経堤細胞と前腸内胚葉の存在する領域でおこる。

- 神経堤細胞
- 口腔外胚葉
- 前腸内胚葉
- ||||| 歯胚形成領域

図 12 歯胚領域には、口腔外胚葉と頭部神経堤細胞と前腸内胚葉が存在する。

図 11

図 11 長期下顎培養後の Adex-LacZ で標識された前腸内胚葉の分布様式。Adex-LacZ 標識された前腸内胚葉は、青い細胞として検出できる。

- A. 長期下顎培養後の下顎 (Md)。矢印は、切歯歯胚 (I) と臼歯歯胚 (M) に隣接して存在する標識前腸内胚葉を示している。
- B. A の実線 B における前頭断。矢印は、切歯歯胚 (I) に隣接して存在する標識された前腸内胚葉を示している。

で30体節期まで発生させ、前腸内胚葉が下顎の予定歯胚形成域に存在するのかを検定した。その結果、下顎突起の正中部の予定切歯歯胚形成域と基部の予定臼歯歯胚形成域の双方に前腸内胚葉由来の組織が存在していることを確認した(図10 A, B)。

2) 前腸内胚葉上皮はinitiation期の歯胚上皮に隣接して存在する

上述の実験をもとに、前腸陥入期のラット胚の前腸内胚葉をAdex-lacZを用いて上述のように標識し、8.5日間の長期培養を行った結果、切歯胚形成域と臼歯胚形成域の上皮に近接して、前腸内胚葉由来の上皮が確認された(図11 A, B)。

これらの結果は、哺乳類の下顎の臼歯歯胚は、前腸内胚葉が隣接している口腔外胚葉と中脳後方由来の神経堤細胞から形成されることを示唆している。これは、Sellmanによる両生類における歯の誘導実験を支持するものであり(図6)、これまでの口腔外胚葉と頭部神経堤細胞の相互作用に加えて、歯胚の発生に前腸内胚葉が関与する可能性が大であることを示しており、哺乳類の歯の発生に関する画期的な知見と思われる(図12)。

おわりに

長期下顎培養法は外来遺伝子を組織特異的に導入することができること、下顎臼歯の歯胚形成を再現できることなどから、歯胚のinitiationにかかわる分子メカニズムの基礎研究に非常に有用な手段になると考えられる。例えば、最初の兆候である歯胚の上皮の肥厚を誘導するShhは、原腸形成期や咽頭胚期ではまさに内胚葉で発現しており³⁹⁾、一方、歯胚間葉を形成する領域を規定する分子として知られているFgf-8の発現は、咽頭胚期に口腔外胚葉に限局する⁴⁰⁾。このような原腸形成期から咽頭胚期にかけて発現している歯胚のinitiationにかかわる分子の誘導メカニズムの解明には、本法は最適であろう。

また、長期培養法は、前腸陥入や神経堤細胞の移動を再現し、歯胚・軟骨・舌の組織分化を*in vitro*で再現することが可能であるばかりでなく、他の器官培養と組合せることも可能である。例えば、筆者らは、現在、全胚培養と鼻隆起-上顎隆起の器官培養とを組合せる系も確立しており、歯胚、洞毛、鼻中隔軟骨の発生を確認している。したがって、これら顎顔面の広範にわたる器官のinitiationから組織分化にいたるまでの発生機構について、口腔外胚葉・前腸内胚葉・頭部神経堤細胞・一次中胚葉などの異なる由来と分化運命をもつ組織間の相互作用を詳細に検索するために本法はきわめて有効な系とな

り得るであろう。

稿を終えるにあたり、歯科基礎医学会賞の発表と本総説の発表の機会をお与えくださった歯科基礎医学会実行委員ならびに学会賞選定委員の先生方に深甚なる感謝の意を表します。

また、本研究の機会をお与えいただくとともに終始ご懇篤なるご指導、ご校閲を賜りました東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科顎顔面機構制御学講座分子発生分野 江藤一洋教授に心より感謝申し上げます。また、本稿をまとめるにあたり、貴重な助言と検討を賜りました同太田正人助手に深甚なる感謝を申し上げます。また、直接的にご懇切なるご指導、ご校閲を賜りました東北大学大学院医学部器官構築学講座 大隅典子教授に心より感謝申し上げます。さらに、この研究を行う際、多大なご協力をいただいた東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科顎顔面機構制御学講座分子発生分野 池田正明助教授、同飯村忠浩助手、同二宮洋一朗助手に感謝申し上げます。また、共に研究を行ってくださった東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科顎顔面機構制御学講座分子発生分野 青戸一司氏に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Tam, P.P. and Behringer, R.R.: Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech. Dev.* **68**(1-2): 3-25, 1997.
- 2) Tam, P.P.: Postimplantation mouse development: whole embryo culture and micromanipulation. *Int. J. of Dev. Biol.* **42**(7 Spec No): 895-902, 1998.
- 3) Tan, S.S. and Morriss-Kay, G.M.: The development and distribution of the cranial neural crest in the rat embryo. *Cell Tissue Res.* **240**: 403-416, 1985.
- 4) Tan, S.S. and Morriss-Kay, G.M.: Analysis of cranial neural crest cell migration and early fates in postimplantation rat chimaeras. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **98**: 21-58, 1986.
- 5) Osumi-Yamashita, N., Ninomiya, Y., Doi, H. and Eto, K.: The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos. *Develop. Biol.* **164**: 409-419, 1994.
- 6) Osumi-Yamashita, N., Ninomiya, Y., Doi, H. and Eto, K.: Rhombomere formation and hindbrain crest cell migration from prorrhombomeric origins in mouse embryos. *Develop. Growth Differ.* **38**: 107-118, 1996.
- 7) Trainor, P.A., Tan, S.S. and Tam, P.P.L.: Cranial paraxial mesoderm: regionalisation of cell fate

- and impact on craniofacial development in mouse embryos. *Development* **120** : 2397—2408, 1994.
- 8) Osumi-Yamashita, N., Ninomiya, Y. and Eto, K. : Mammalian craniofacial embryology in vitro. *Int. J. Dev. Biol.* **41** : 187—194, 1997.
 - 9) Osumi, N., Hirota, A., Ohuchi, H., Nakafuku, M., Kimura T., Kuratani, S., Fujiwara, M., Noji, S. and Eto, K. : Pax-6 is involved in the specification of hindbrain motor neuron subtype. *Development* **124** : 2961—2972, 1997.
 - 10) Trainor, P. A. and Tam, P. P. : Cranial paraxial mesoderm and neural crest cells of the mouse embryo : co-distribution in the craniofacial mesenchyme but distinct segregation in branchial arches. *Development* **121** : 2569—2582 : 1995.
 - 11) Slavkin, H. C., Bringas, P., Sasano, Y. and Mayo, M. : Early embryonic mouse mandibular morphogenesis and cytodifferentiation in serumless, chemically defined medium ; a model for studies of autocrine and/or paracrine regulatory factors. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* **9** : 185—205, 1989.
 - 12) Yamada, M., Bringas, P., Grodin, M., Macdougall, M., Cummings, E., Grimmnet, J., Weliky, B., and Slavkin, H. C. : Chemically defined organ culture of embryonic mouse tooth organs : morphogenesis, dentinogenesis and amelogenesis. *J. Biol. Buccale.* **8** : 127—139, 1980.
 - 13) New, D. A. T., Coppola, P. T. and Cockroft, D. L. : Improved development of head-fold rat embryos in culture resulting from low oxygen and modifications of the culture serum. *J. Reprod. Fert.* **48** : 219—222, 1976.
 - 14) 二宮洋一郎, 大隅-山下典子, 今井 元, 江藤一洋 : 哺乳類器官形成期胚の培養と顕微操作. *実験医学* **12** : 93—103, 1994.
 - 15) 大隈-山下典子, 二宮洋一郎, 江藤一洋 : 哺乳類全胚培養法—発生学的研究への応用. *実験医学* **9** : 214—221, 1991
 - 16) 朝田総一郎, 大隅-山下典子, 江藤一洋 : 哺乳類全胚培養法を用いた顔面形態形成の研究. *組織培養* **16** : 47—50, 1990.
 - 17) Richman, J. M. and Tickle, C. : Epithelia are interchangeable between facial primordia of chick embryos and morphogenesis is controlled by the mesenchyme. *Develop. Biol.* **136** : 201—210, 1989.
 - 18) Waterman, R. E. : Ultrastructure of oral (buccopharyngeal) membrane formation and rupture in the hamster embryo. *Dev. Biol.* **58** : 219—229, 1977.
 - 19) Waterman, R. E. and Schoenwolf, G.C. : The ultrastructure of oral (buccopharyngeal) membrane formation and rupture in the chick embryo. *Anatomical Record.* **197** : 441—470, 1980.
 - 20) Takahama, H., Sasaki, F. and Watanabe, K. : Morphological changes in the oral (buccopharyngeal) membrane in urodelan embryos : development of the mouth opening. *J. of Morph.* **195** : 59—69, 1988.
 - 21) Graham, A. and Lumsden, A. : Patterning the cranial neural crest. *Biochemical Society Symposia.* **62** : 77—82, 1996.
 - 22) Lumsden, A. and Guthrie, S. : Alternating patterns of cell surface properties and neural crest cell migration during segmentation of the chick hindbrain. *Development (Suppl)* **2** : 9—15, 1991.
 - 23) Shimamura, K. and Rubenstein, J. L. : Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* **124** : 2709—2718, 1997.
 - 24) Sellman, S. : Some experiments on the determination of the larval teeth in *Ambystoma mexicanum*. *Odontol. Tidsk.* **54** : 1—128, 1946.
 - 25) Imai, H., Osumi-Yamashita, N., Ninomiya, Y., and Eto, K. : Contribution of early-emigrating midbrain crest cells to the dental mesenchyme of the mandibular molar tooth in rat embryos. *Develop. Biol.* **176** : 151—165, 1996.
 - 26) Nichols, D. H. : Neural crest formation in the head of the mouse embryo as observed using a new histological technique. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **64** : 105—120, 1981.
 - 27) Nichols, D. H. : Formation and distribution of neural crest mesenchyme to the first pharyngeal arch region of the mouse embryo. *Am. J. Anat.* **176** : 221—231, 1986.
 - 28) Osumi-Yamashita, N., Kuratani, S., Ninomiya, Y., Aoki, K., Iseki, S., Chareonvit, S., Doi, H., Fujiwara, M., Watanabe, T. and Eto, K. : Cranial anomaly of homozygous rSey rat is associated with a defect in the migration pathway of midbrain crest cells. *Devel. Growth & Differ.* **39** : 53—67, 1997.
 - 29) Takahashi, K., Nuckolls, G. H., Tanaka, O., Semba, I., Takahashi, I., Dashner, R., Shum, L. and Slavkin, H. C. : Adenovirus-mediated ectopic expression of *Msx2* in even-numbered rhombomeres induces apoptotic elimination of cranial neural crest cells in ovo. *Development* **125** : 1627—1635, 1998.
 - 30) Imai, H., Osumi-Yamashita, N., and Eto, K. : Contribution of foregut endoderm to tooth initiation of

- mandibular incisor in rat embryos. *European Journal of Oral Science* **106** : 19-23, 1998.
- 31) Mina, M. and Kollar, E. J. : The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch. Oral Biol.* **32** : 123-127, 1987.
 - 32) Lumsden, A. G. S. : Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development* **103** : (Suppl.) 155-169, 1988.
 - 33) Chibon, P. : Etude expérimentale par ablations, greffes et autoradiographie, de l'origine des dents chez l'amphibien urodele *Pleurodeles waltlii* Michah. *Arch. oral Biol.* **12** : 745-753, 1967.
 - 34) Couly, G. and Le Dourin, N. M. : The fate map of the cephalic neural primordium at the presomatic to the 3-somite stage in the avian embryo. *Development* **103** : (Suppl.) 101-114, 1998.
 - 35) Wagner, G. : Die Bedeutung der Neuralleiste für die Kopfgestaltung der Amphibienlarven, Untersuchungen an Chimaeren von Triton und Bombinator. *Rev. Suisse Zool.* **56** : 519-620, 1949.
 - 36) Wagner, G. : Chimaerische Zahnanlagen aus Triton-Schmelzorgan und Bombinator-Papille. *J. Embryol. exp. Morphol.* **3** : 160-188, 1955.
 - 37) Noden, D. M. : Craniofacial development : New Views on old problems. *Anat. Rec.* **208** : 1-23, 1984.
 - 38) Graveson, A. C., Smith, M. M. and Hall, B. K. : Neural crest potential for tooth development in a urodele amphibian : developmental and evolutionary significance. *Develop. Biol.* **188** : 34-42, 1997.
 - 39) Hardcastle, Z., Mo, R., Hui, C. C. and Sharpe P. T. : The Shh signalling pathway in tooth development : defects in Gli 2 and Gli 3 mutants. *Development* **125** : 2803-2811, 1998.
 - 40) Tucker, A. S., Yamada, G., Grigoriou, M., Pachnis, V. and Sharpe P. T. : Fgf-8 determines rostral-caudal polarity in the first branchial arch. *Development* **126** : 51-61, 1999.