

Isolationsversuche zur Analyse der Knorpelbildung aus Neuralleistenzellen bei Anurenkeim.

Von

Eiko W. OKADA und Mamori ICHIKAWA

Zoologisches Institut, Universität zu Kioto

(Eingegangen am 20. Sept., 1956)

I. Einleitung.

Es ist seit langem bekannt, dass die aus der Neuralleiste stammenden Zellengruppen (Mesektoderm) im Laufe der Entwicklung ventralwärts wandern, dann sich an der Bildung des knorpeligen Kopfskelettes beteiligen (Stone, '26, '29; Raven, '33; Ichikawa, '33; u. a.). Einige Autoren haben doch hervorgehoben, dass das Neuralleistestück nach den heterotopischen Transplantationen sich nicht immer zu Knorpel differenziert, sondern je nach seiner Lage im Wirtskeim Gelingen oder Misslingen der Knorpeldifferenzierung aufweist (Ichikawa, '37; Hörstadius u. Sellman, '46; Newth, '54). Diese Tatsache muss darauf hindeuten, dass bei der Knorpelbildung aus Neuralleistematerial die umgebenden Faktoren eine auslösende Wirkung haben.

Um es zu analysieren, unter welchen Bedingungen das Neuralleistematerial sich zu Knorpel differenziert, haben wir schon Isolationsversuche an Urodelenkeimen durchgeführt (Okada, '55). In diesen Isolationsexperimenten wurde das Neuralleistestück von Neurula, allein oder in der Kombination mit den verschiedenen Geweben gezüchtet und die Knorpelbildungsleistung der Isolate untersucht. Aus ihren Ergebnissen hat es sich gezeigt, dass die Bogenleistenzellen von Urodelen wohl im Neurulastadium Knorpelpotenz besitzen, aber sie solche Potenz nur unter der Anwesenheit von Vorderdarmsentoderm und reichlich Mesenchym in ihrer Umgebung realisieren können.

Im normalen Entwicklungsvorgang der Neuralleistenzellen gibt es aber die folgenden beträchtlichen Unterschiede zwischen Urodelen und Anuren: (1) Bei Anuren, z. B. *Rana japonica*, erscheint das Mesektoderm als so charakteristische aschgraue Zellenhaufen, dass man sie deutlich von anderen Zellschichten unterscheiden und daher die reinen Mesektodermzellen einwandfrei und sehr leicht herausnehmen kann. Das von Urodelen lässt sich dagegen nicht rein und genau

zeigen. (2) Die Mesektodermzellen von Anuren beginnen sehr früh, schon im Neurulastadium, sich vom Neuralrohr zu trennen, ventralwärts zu wandern, und sich mit anderen Geweben zu berühren, während bei Urodelen sie einstweilig in das Neuralrohr eingeschlossen werden, und erst nach der Vollendung der Neurulation zu wandern beginnen.

Aus den obigen Beschreibungen ist es nun fraglich, ob es möglich ist, die aus den Isolationsversuchen bei Urodelen gezogenen Schlüssen auf Anuren zu übertragen. Ichikawa ('37) hat früher bei seinen Transplantationsexperimenten an Anurenkeimen gezeigt, dass die Knorpelbildung von dem Mesektodermstück in dem Entomesodermbereiche des Rumpfes, besonders dicht an der Chorda, merkwürdig oft stattfand, während bei den obenerwähnten Isolationsexperimenten von Urodelen von Okada ('55) die Knorpelbildung durch Zufügung von Chorda nur sehr selten (in 2 in 52 Fällen) gezeigt wurde.

Wir führten daher dieselben Isolationsexperimente auch bei Anuren durch. Daneben wurden auch xenoplastische Isolationsversuche unternommen, wobei die Neuralleistenzellen von Anuren mit verschiedenen Geweben von Urodelen kombiniert wurden. Diese letzteren Versuche sollten klären, ob der in den homoioplastisch kombinierten Isolaten von Anuren oder Urodelen entwickelte Knorpel sich wirklich aus dem Neuralleistmaterial ableitet, und ferner wie die Knorpelbildungsvorgänge bei Anuren und Urodelen entwicklungsphysiologisch identisch wären, oder in welcher Hinsicht sie sich unterscheiden.

II. Experimente.

A. Homoioplastische Isolationen.

Als Material wurden ausschliesslich Keime von *Rana japonica* verwendet. Sie wurden in den Stadien von frühen (mit angedeuteten Sekundärwülsten) bis späten (mit ganz genährten Wülsten) Neurulen operiert. Zuerst wurden Hyoid- und Branchialgruppe von den Mesektodermzellen herausgenommen, und dann allein oder in der Kombination mit anderem verschiedenem Gewebe, mit Bauchepidermis der Neurula umgehüllt. Als zugefügtes Material wurde Vorderdarmswand, Mitteldarmsboden, Chordaanlage oder Ursegmentmaterial des gleichalterigen Keims ausgewählt (s. Abb. 1). Die so vorbereiteten Isolate wurden in Holtfreterlösung gezüchtet und nach 21 bis 25 Tagen fixiert.

1) *Züchtung der Neuralleistenzellen in der Hautblase*: Dreissig Isolate wurden in dieser Versuchsreihe umfasst. Sie bildeten jedenfalls geschwollenes oder ellipsoides Gebilde. Die bedeckende Epidermis war dünn und durchsichtig. Differenzierung der Pigmentzellen fanden sich häufiger innerhalb der Blase als an der Epidermis. Die Blase enthielt stets mehr oder weniger Mesenchym und neurales Gewebe. Mesenchym zeigte verschiedene Differenzierungszustände; vereinzelte Mesenchymzellen, ein lockeres wabenförmiges Bindegewebe oder endotheliale

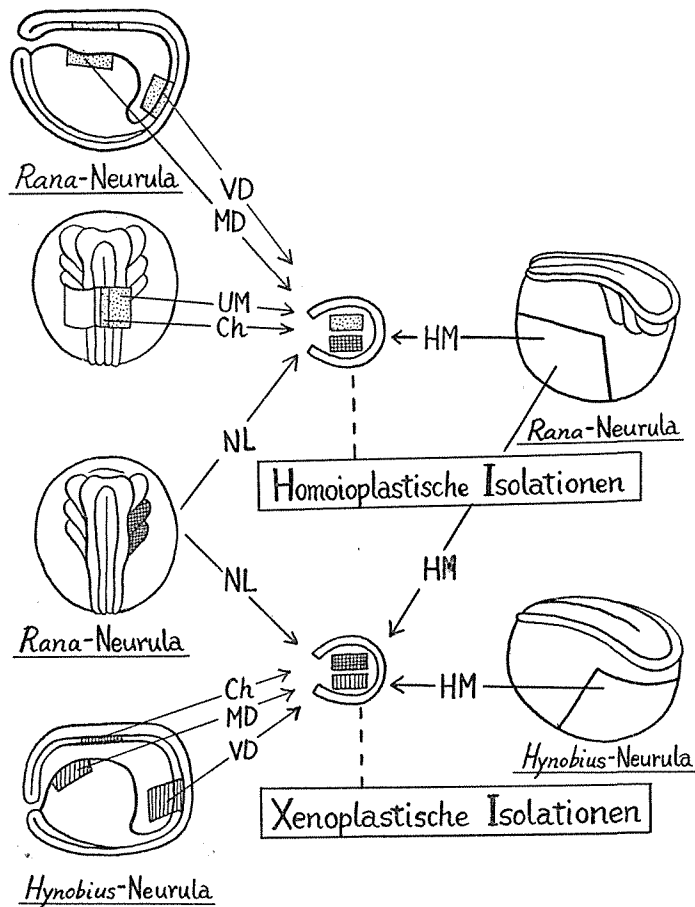


Abb. 1. Operationsschema.

Ch: Chorda, HM: Hüllmaterial, MD: Mitteldarm, NL: Neuralleiste,
UM: Ursegmentmaterial, VD: Vorderdarm.

Schicht, die einen grossen Hohlraum auskleidet. In dieser Versuchsreihe war aber keine Spur von Knorpel aufgewiesen (Abb. 2).

2) *Züchtung der Neuralleistenzellen mit Vorderdarmsentoderm in der Hautblase*: In dieser Reihe wurden 36 Isolate als geschwollene kugelige oder ellipsoide Blase fixiert. Nur einige Anzahl Pigmentzellen liessen sich an der bedeckenden Epidermis erkennen. Im Inneren waren stets reichlich Mesenchym, neurales Gewebe und sich von dem zugefügten Vorderdarmsentoderm ableitende entodermale Struktur vorhanden. Diese letztere zeigte meistens Kiemendarmsdifferenzierung mit Kiementäschen und war von reichlich Mesenchym durchaus umgeben.

Knorpel war in 30 von 36 verwertbaren Fällen, d. h. 83% der Fälle, differenziert, und zwar lag er regelmässig neben der Kiemendarmswand. Die Knorpelstücke waren jedenfalls hochdifferenziert, von verschiedener Grösse und von verschiedener Form. Diese waren meistens in den reichlichen Mesenchymzellen oder wabenförmigen Bindegeweben eingebettet, doch gab es einige Fälle, in welchen sie sich mit der Kiemendarmswand dicht berührten. Ihr Ausdifferenzierungsgrad war immer so gut wie in den normalen gleichalterigen Kaulquappen (Abb. 3).

3) *Züchtung der Neuralleistenzellen mit Mitteldarmsboden in der Hautblase*: Von 18 verwertbaren Isolaten wurden 7 als eine geschwollene Blase, 11 als ein geschrumpftes Stück fixiert. Mesenchym war in allen Fällen vorhanden, obgleich im allgemeinen armer als in anderen Reihen. Ausserdem fand man neurales Gewebe und schwarze Pigmentzellen. Das zugefügte Entodermstück blieb noch als dotterreicher undifferenzierter Zellenhaufe. In der vorliegenden Versuchsreihe erkannte man Knorpeldifferenzierung in keinem Fall.

4) *Züchtung der Neuralleistenzellen mit Chordamaterial in der Hautblase*: Vierundzwanzig Isolate bildeten sämtlich geschwollene Blasen. Bei der Fixierung liess sich Differenzierung der Pigmentzellen noch wenig erkennen. Im Inneren der Blase fanden sich Mesenchym in verschiedenen Differenzierungszuständen, neurale Gebilde und Chorda, welches sich naturgemäss vom zugefügten Material hergeleitet haben muss. Ferner wurden dotterhaltige, gedrängte Zellen beobachtet, die wohl als undifferenziertes Muskelgewebe angesprochen werden können. Knorpel bildete sich in 16 von 24 histologisch untersuchten Fällen. Die hier gefundenen Knorpelstücke waren fast immer dicht oder nahe an den Chorda zu beobachten, und zwar in Berührung mit den oben beschriebenen muskelartigen Zellenhaufen (Abb. 4).

5) *Züchtung der Neuralleistenzellen mit Ursegmentmaterial in der Hautblase*: Die Operationen wurden 19mal ausgeführt. Alle Isolate bildeten stark geschwollene, kugelige Blasen. Pigmentzellen waren an der Epidermis wenig verstreut. Bei der Schnittuntersuchung fand man schwarze Pigmentzellen, vereinzelte Mesenchym, ein wabenartiges Bindegewebe, ein grosser, mit endotheliales Gewebe ausgekleideten Hohlraum, neurales Gewebe und das aus dem zugefügten Ursegmentmaterial stammende kleine Bündel von Muskelzellen. Knorpelbildung fand in 2 Fällen, d. h. 11% der vorliegenden Fällen, statt. Diese Knorpelchen waren stets von reichlichen vereinzelter Mesenchymzellen umgeben, und zeigten guten Ausdifferenzierungszustand.

B. Xenoplastische Isolationen.

In diesen Isolationen wurden als Spender der zu isolierenden Neuralleistenzellen ausschliesslich spätere Neurulen von *Rana japonica* verwendet. Es handelt sich hier auch um die Hyoid- und Branchialgruppen des Mesektoderms wie bei den homoioplastischen Versuchen. Aber diese Zellen wurden mit aus Neurula

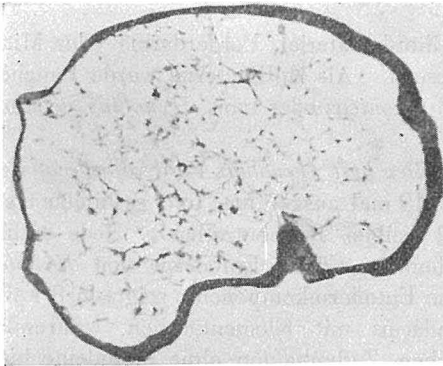


Abb. 2

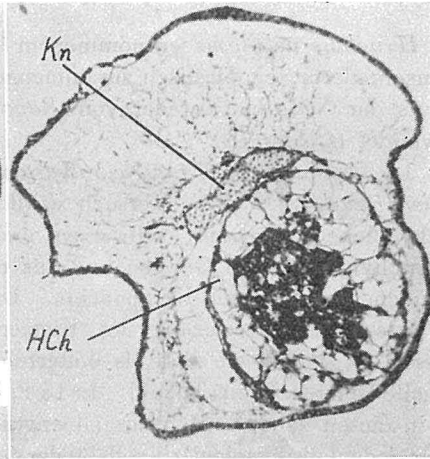


Abb. 5

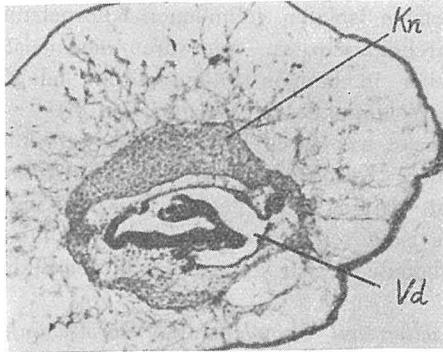


Abb. 3

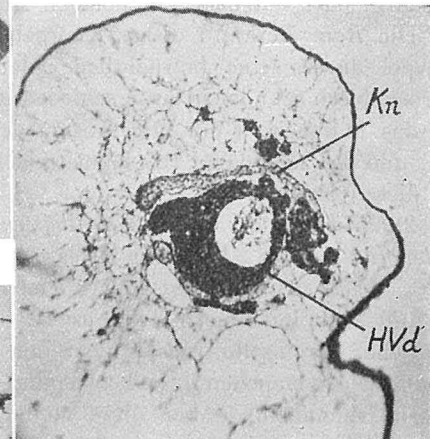


Abb. 6

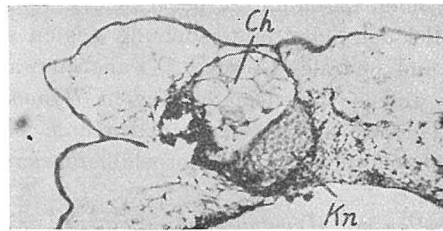


Abb. 4

- Abb. 2. Schnitt des gezüchteten Isolates ohne Zufügung anderer Gewebe bei *Rana japonica*.
 Abb. 3. Knorpeldifferenzierung in dem mit Vorderdarmsentoderm homoioplastisch kombinierten Isolat bei *Rana japonica*.
 Abb. 4. Knorpeldifferenzierung in dem mit Chorda homoioplastisch kombinierten Isolat bei *Rana japonica*.
 Abb. 5. Knorpeldifferenzierung aus *Rana*-Neuralleistenmaterial in der xenoplastischen Kombination mit *Hynobius*-Vorderdarmsentoderm.
 Abb. 6. Knorpeldifferenzierung aus *Rana*-Neuralleistenmaterial in der xenoplastischen Kombination mit *Hynobius*-Chorda.

Ch; *Rana*-Chorda, HCh; *Hynobius*-Chorda, HVd; *Hynobius*-Vorderdarm,
 Ku; *Rana*-Knorpel, Vd; *Rana*-Vordredarm.

von *Hynobius nebulosus* entnommenem Chordamaterial, Vorderdarms- oder Mitteldarmsentoderm xenoplastisch zusammengesetzt. Als Hüllmaterial wurde Bauchepidermis der Neurula entweder von *Rana japonica* oder von *Hynobius nebulosus* verwendet (s. Abb. 1).

1) *Züchtung der Rana-Neuralleistenzellen mit Hynobius-Vorderdarmsentoderm in der Hautblase*: Der Versuch wurde 19 mal ausgeführt, und es bildeten sich geschwollene Blasen mit schwarzen und gelben Pigmentzellen. Jede enthielt Mesenchym, neurales Gewebe und aus dem zugefügtes Entoderm von *Hynobius* stammende entodermale Komponente. Die Entodermkomponente zeigte in 8 Fällen die gute Ausdifferenzierung des Kiemendarms mit Kiementäschen, während in anderen 11 Fällen sie sich als dotterreichen Zellenhaufen ohne irgendeine histologische Differenzierung befand. In 15 Fällen fand die Knorpelbildung statt (Abb. 5). Die in diesen xenoplastisch zusammengesetzten Isolaten gefundenen Knorpelstücke waren jedenfalls histologisch vollständig durchdifferenziert. Sie waren hier meistens in das Mesenchym eingebettet, aber in einigen Fällen direkt mit dem Entoderm oder mit der endothelialen Auskleidung des Hohlraums berührt.

Die *Rana*-Herkunft dieser Knorpelstücke war zweifellos deshalb, weil *Rana*-Knorpel durch seine beträchtliche kleinere Kerngrösse von dem der Urodelen mikroskopisch sehr leicht unterschieden ist. In unseren Isolaten waren der Knorpel und das Mesenchym nur auf Kosten des isolierten *Rana*-Mesektoderms differenziert, und das zugefügte Urodelenmaterial beteiligte sich keineswegs an der Bildung von diesen Strukturen.

2) *Züchtung der Rana-Neuralleistenzellen mit Hynobius-Mitteldarmsentoderm in der Hautblase*: Fünfzehn Isolate wurden als geschwollene kugelige Blasen fixiert. Viele schwarze und gelbe Pigmentzellen waren an der bedeckenden Epidermis und auch im Innern differenziert. Bei der Schnittuntersuchung zeigten sich reichliche, vereinzelte Mesenchymzellen und neurales Gewebe. Daneben waren entodermale Komponente zu beobachten, welche von dem zugefügten *Hynobius*-Material stammten. Aber diese stellte immer dotterreichen Zellenhaufe ohne Differenzierung zu irgendeinem bestimmten Gewebe dar. Knorpeldifferenzierung blieb in dieser Versuchsreihe aus.

3) *Züchtung der Rana-Neuralleistenzellen mit Hynobius-Chordamaterial in der Hautblase*: Sechzehn Isolate bildeten meistens geschwollene kugelige oder ellipsoide Blase mit schwarzen und gelben Pigmentzellen. Diese Pigmentzellen müssen aus der isolierten Neuralleiste von *Rana* stammen. Die Blase war mit reichlich Mesenchym erfüllt, welches mit sehr feinem Gallertnetz und mit kleinem Zellkern versehen war. Es handelt sich dabei wohl um die Mesenchymzellen aus dem *Rana*-Mesektoderm. In das Mesenchym war gut differenziertes Chorda eingebettet. Das Chorda stellte sowohl histologisch als auch morphologisch zweifellos dasselbe von *Hynobius* dar. In 11 Fällen bildete sich der Knorpel von *Rana*-Herkunft. Dieser kam stets dicht neben dem Chorda oder unter direkter Berührung mit dem Chorda vor (Abb. 6).

Tabelle 1. Übersicht über die Knorpelbildungsleistungen der isolierten Bogenleiste.

Zugefügtes Gewebe		Nichts	Vorderdarm	Mitteldarm	Chordaanlage	Ursegmentmaterial
Homoioplastische Isolationen in Urodelenkeim (vorher angegeben; Okada '55)	Anzahl	34	58	31	52	19
	Knorpelbildung	0	47 (80%)	3 (9%)	2 (4%)	0
Homoioplastische Isolationen in Anurenkeim	Anzahl	30	36	18	24	19
	Knorpelbildung	0	30 (83%)	0	16 (67%)	2 (11%)
Xenoplastische Isolationen (<i>Rana</i> -N.L. mit <i>Hynobius</i> -Gewebe)	Anzahl		19	15	16	
	Knorpelbildung		15 (79%)	0	11 (69%)	

III. Besprechung der Ergebnisse.

In den oben beschriebenen homoioplastischen Experimenten von *Rana japonica*, wies das Neuralleistenstück nach der Züchtung mit dem entomesodermalen oder entodermalen Material in den Epidermisblasen Knorpelbildung auf, während es ohne Zufügung von anderem Gewebe keinen Knorpel bildete. Hieraus müssen wir annehmen, dass die Neuralleistenzellen von *Rana japonica* schon im Neurulastadium die knorpelbildende Potenz besitzen, aber sie nicht aus eigenen Mitteln Knorpel ausdifferenzieren können, und dass im zugefügten Gewebe die bei der Knorpelbildung beziehenden Faktoren vorhanden seien.

Jedoch war die Knorpelbildungsleistung je nach der Art des zugefügten Gewebes ganz verschieden (s. Tabelle 1). In den vorliegenden Resultaten fand man die Knorpelbildung in den mit dem Vorderdarmsentoderm kombinierten Isolate am häufigsten (83%). Ausserdem wurde die Knorpelbildung durch Zufügung von Chorda in den nahekommenden Prozentsatz (67%) und auch mit Urseg-

mentmaterial in 11% aufgewiesen. In der Reihe mit Mitteldarmsentoderm, soweit es sich um die vorliegenden Versuche handelt, trat kein Knorpel auf. Angesichts dieser Resultaten können wir nur eins von den hier zugefügten Geweben als spezifischer Induktor der Knorpeldifferenzierung schwer angeben.

Nun sollen die früher an Urodelenkeimen durchgeführten Isolationsexperimente noch einmal übersehen werden um es mit den Resultaten bei Anuren zu vergleichen (Okada, '55, s. Tabelle 1). Die Knorpelbildung wurde auch dabei in der Kombination mit Vorderdarmsentoderm im höchsten Prozentsatz aufgewiesen, und zwar vor allen anderen hervorragend. Dagegen konnten nur zwei Fälle von 52 Isolaten durch die Zufügung von Chorda Knorpel liefern. Es hat sich damit schliessen lassen, dass das Vorderdarmsentoderm sich an der Knorpelbildung der Neuralleistenzellen bei Urodelen ursächlich beziehen muss, was mit dem Schluss der früheren Versuchen von anderen Autoren gut übereinstimmt (Hörstadius u. Sellman, '46; Woellwarth, '53). Die Knorpelbildung durch Zufügung von Chorda fand in den homoioplastischen Isolationsexperimenten bei Urodelen zu selten statt, als dass man sicher schliessen konnte, ob das Chorda die Knorpelbildung der Neuralleistenzellen auslösen kann. Aber hielt man dies durchaus auch nicht für ausgeschlossen.

Ein besonderes Verhalten des Chordas bei *Rana* hat, wie schon in der Einleitung beschrieben wurde, von Ichikawa ('37) in seinen Transplantationsversuchen bemerkt worden. Auch bei den vorliegenden Versuchen fand man die Knorpelbildung dicht an der Chorda sehr häufig (s. Abb. 4). Daher müssen wir nun nicht allein den aus den Experimenten bei Urodelen gezogenen Schluss über die Wirkung des Vorderdarms auf die Anurenkeimen übertragen, sondern auch irgendeinen auslösenden Einfluss von Chorda für Knorpelbildung der Neuralleistenzellen bei Anuren in Frage ziehen. Wir müssen doch hier betonen, dass in den mit Chorda gezüchteten Isolaten nur ein oder selten zwei kleine Knorpelstückchen zu beobachten waren, dagegen in der Anwesenheit des Vorderdarms im allgemeinen mehrere grosse Knorpelstücke entstanden. Andererseits wandern die Neuralleistenzellen in Normalentwicklung sowohl bei Urodelen wie bei Anuren entlang der entomesodermalen Bahnung, dringen an den Kiemendarm heran, und dann differenzieren sich in Knorpel. Aus diesen Tatsachen kann man mit Sicherheit sagen, dass bei der normalen Knorpelbildung von beiden Ordnungen der Amphibien ja das Vorderdarmsentoderm sich entwicklungsphysiologisch beziehen muss. Dagegen scheint es kaum wahrscheinlich, dass das Chorda sich üblich direkt an den normalen Knorpelbildungsvorgängen beziehe, oder die Neuralleistenzellen gegen die Knorpelbildung doppelt sichere. Das Chorda verhält sich wahrscheinlich zu der Knorpelbildung von Neuralleistenzellen, wie die abnormalen Induktoren (oder *Evocator*) zu der Neuraldifferenzierung von undeterminiertem präsumptivem Ektoderm.

Warum ist zwischen Anuren und Urodelen ein grosser Unterschied in den Prozentsatz von den durch Zufügung des Chordas beigebrachten, positiven Ergeb-

nissen? Auf diese Frage können unsere xenoplastischen Isolationsversuche antworten. Die Neuralleistenzellen von *Rana japonica* konnten in der xenoplastischen Kombination mit Vorderdarmsentoderm oder Chorda von Urodelen deutlich in Knorpel differenziert werden. Diese Resultate beweisen, dass die Wirkung von den auslösenden, umgebenden Faktoren nicht artspezifisch, sondern über die Ordnung hinaus, noch bei fremder Art die Knorpelbildung auslösen können. Ferner aus diesen Resultaten ist es ganz sicher, dass Chorda ohne Rücksicht auf Unterschied der Ordnung seines Spenders die Knorpelbildung der Anurenkeimen auslösen kann, und dass das Chorda von Urodelen ebenso wie das von Anuren die auslösenden Faktoren enthält. Also ist der oben erwähnte Unterschied zwischen beiden Ordnungen nur den reagierenden Neuralleistenzellen zuzuschreiben.

Okada ('55) hat bei der früheren Urodelenexperimenten eine Vermutung ausgesprochen, dass nicht allein das Vorderdarmsentoderm sondern auch Mesenchym sich an die Knorpelbildungsvorgänge von dem Urodelenkeim beteiligen muss, und zwar das erstere auf der früheren Phase, das letztere auf spätere Phase derselben. Dies scheint aber bei Anuren nicht der Fall zu sein; bei den vorliegenden Versuchen wurde das gefundene Knorpelstück zwar meistens von reichlich Mesenchym umgeben, aber in einigen Fällen lag es ohne Umgebung mit Mesenchym, z. B. unter Berührung mit anderen Geweben (wie Entoderm oder Chorda) oder in grossem Hohlraum schwebend, wobei auch seine Differenzierung stets recht gut war. Diese Tatsachen deuten darauf, dass die Knorpeldifferenzierungsvorgänge bei Anuren Einfluss des Mesenchyms entbehren können. Und dies muss für grössere Selbständigkeit der Neuralleistenzellen von *Rana japonica* zur Knorpelbildung sprechen. Das frühere Ergebnis Ichikawas ('37), dass das in den Gehirnhohlraum implantierte Neuralleistmaterial von *Rana japonica* auch sich zu Knorpel differenzieren konnte, gibt einen überzeugenden Beweis für diese Auffassung von der Knorpelbildung bei Anuren. Solche grosse Selbständigkeit der Neuralleistenzellen von Anuren zur Knorpelbildung muss einerseits ihrer massiven Form, und andererseits ihrer früher beginnenden Wanderung, infolge deren der Kontakt mit Vorderdarmsentoderm schon im Neurulastadium stattfindet, zuzuschreiben ist.

IV. Zusammenfassung.

1. Zur Analyse des Mechanismus der Knorpelbildung aus Bogenleistenmaterial bei Anuren, wurden Isolationsexperimente an *Rana japonica* durchgeführt. Die aus der Neurula herausgenommenen Hyoid- und Branchialgruppen des Mesektoderms wurden, allein oder in der Kombination mit Vorderdarms-, Mitteldarmsentoderm, Chordaanlage oder Ursegmentmaterial des gleichalterigen Keims, in der Hautblase gezüchtet. Daneben wurden auch xenoplastische Kombinationen zwischen *Rana*-Mesektoderm und dem verschiedenen Material von *Hynobius* untersucht.

2. Züchtete man das Bogenleistenmaterial in der Hautblase ohne Zufügung anderer Gewebe, so blieb die Knorpelbildung aus.

3. Bei homoioplastisch mit anderem Material kombinierten Bogenleisten-isolaten war die Knorpelbildung oft zu beobachten. Von den verschiedenen kombinierten Materialien, ist das Vorderdarmsentoderm am erfolgreichsten zur Knorpelbildung; die positiven Ergebnisse wurden in der Versuchsreihe mit Vorderdarmsentoderm am häufigsten (83%) erzielt. Daneben fanden sich die Knorpelbildung auch in der Versuchsreihe mit Chorda (67%) und Ursegmentmaterial (11%).

4. Hochdifferenziertes Knorpelstück liess sich auch in den xenoplastischen Kombinationen häufig finden. Das war von *Rana*-mesektodermaler Herkunft offensichtlich bei der mikroskopischen Untersuchung. Dabei war die Häufigkeit der Knorpelbildung wesentlich derselben bei den homoioplastischen Kombinationen respektive entsprechend.

5. Die Rollen der ento- oder entomesodermalen Gewebe bei der Knorpelbildung aus Neuralleistenzellen bei Anuren wurden im Vergleich mit den Ergebnissen derselben früher ausgeführten Isolationsversuchen bei Urodelen erörtert (Okada, '55).

V. Literaturverzeichnis

- HÖRSTADIUS, S. u. S. SELLMAN, 1946 Nova Acta Reg. Soc. Sci., Upsaliensis, Ser. 4 (13).
 ICHIKAWA, M., 1933 Proc. Imp. Acad., Tokyo, 9.
 ———, 1937 Mem. Coll. Sci., Kyoto Imp. Univ., Ser. B., 12.
 NEWTH, D. R., 1954 J. Embryol. Exp. Morph., 2.
 RAVEN, Chr. P., 1933 Roux' Arch., 129.
 OKADA, E. W., 1955 Mem. Coll. Sci., Univ. Kyoto, Ser. B., 22.
 STONE, L. S., 1926 J. Exp. Zool., 44.
 ———, 1929 Roux' Arch., 118.
 WOELLWARTH, C. von, 1953 Roux' Arch., 145.