

コラーゲンの産生異常がニワトリ羽毛の初期発生に及ぼす影響

小林謙, 福永重治, 竹之内一昭, 加藤(森)ゆうこ, 中村富美男

北海道大学大学院 農学研究科 畜産資源開発学

札幌市 060-8589

Influences of abnormal collagen production on early feather development

Ken KOBAYASHI, Shigeharu FUKUNAGA, Kazuaki TAKENOUCI,

Yuko KATO-MORI and Fumio NAKAMURA

Sapporo 060-8589

キーワード : 羽毛発生, 再構成ゲル皮膚, I型コラーゲン, コラーゲン線維, 細胞移動

Key words : feather development, reconstituted gel skin, type I collagen, collagen fibrillars structure, cell migration

Abstract

To examine the influences of abnormal collagen production on early feather development, we utilized reconstituted gel skins using type I collagen in the dermal layer. When L-ascorbic acid 2-phosphate (Asc2-P), a stimulator of collagen production, were added to the medium, some regions of the reconstituted gel skins did not show the formation of feather buds, and some feather buds had thickly developed bases. In the pterygiae where feather buds were formed, a very dense collagen fibrillar network, a dense distribution of mesenchymal cells and excess deposition of type I collagen were observed at the bases of the buds, whereas in other pterygiae where feather development was inhibited, distribution patterns of mesenchymal cells and type I collagen were similar to those of apteria. On the other hand, when ethyl-3, 4-dihydroxybenzoate (EDHB), an inhibitor of collagen production, was added to the medium of reconstituted gel skins at a low concentration, feather bud elongation was suppressed, loose collagen fibrils organized a dome-like structure, and the density of mesenchymal cells decreased in pterygiae. When EDHB was added to the medium of reconstituted gel skins at a high concentration, the density of mesenchymal cells became uniform throughout the dermal layer, and the collagen fibrillar structure disappeared in pterygiae. Furthermore, a high concentration of type I collagen in the reconstituted gel skins arrested feather bud elongation. These results suggested that regulated collagen production and degradation in spatial- and temporal-specific manners are required for early feather development and that abnormal collagen production inhibits normal feather development and morphogenesis.

要 約

コラーゲンの産生異常がトリ羽毛の初期発生に及ぼす影響について, I型コラーゲンゲルを真皮層に用いる再構成ゲル皮膚を用いて検討した. コラーゲン産生を促進するL-アスコルビン酸2-リン酸(Asc2-P)を再構成ゲル皮膚の培地に添加すると, 基部が太く発達

した羽芽が形成されたが, 羽芽自体が形成されていない領域も観察された. 羽芽が形成された領域では, 基部における真皮細胞の高密度化とI型コラーゲンの過剰な蓄積とともに非常に緻密なコラーゲン線維の立体構造が観察され, 羽芽が形成されなかった羽毛域では, 真皮細胞とコラーゲンの存在様式が無羽毛域のものに類似していた. 一方, コラーゲン産生を抑制するエチル-3, 4-ジヒドロキシベンゾエイト(EDHB)を低濃度で添加した場合, 羽芽伸長が阻害され, 羽毛域では

粗なコラーゲン線維によってドーム状の構造が形成されており、羽芽の真皮細胞密度も低かった。EDHBを高濃度で添加すると、真皮細胞の密度は真皮全体で一様となり、羽毛域のコラーゲン線維構造は消失していた。さらに、再構成ゲル皮膚に用いるI型コラーゲンの濃度を高くすると、羽芽の伸長が阻害された。これらの結果から、羽毛の初期発生には、時間的、空間的に制御されたコラーゲンの産生と分解が必要であり、コラーゲンの産生異常は、正常な羽毛の発生や形態形成を阻害することが示された。

結 言

トリ羽毛の発生は表皮のプラコード形成に始まり、プラコード下側への真皮細胞の密集によるコンデンセーション形成が続き、両者は羽毛原基を構成する。羽毛原基は発生の進行に伴って隆起して羽芽になり、羽芽は次第に尾部方向へ伸長し、最終的に羽枝、小羽枝構造を有する初生羽に発達する(中村ら 1999; YU *et al.* 2004)。また、羽毛の発生は連続的な表皮と真皮の相互作用によって進行し(JIANG *et al.* 1999)、相互作用の真皮側の要素として多種多様な細胞外マトリックス(ECM)が関与している(MAUGER *et al.* 1982; 中村ら 1999)。一方、代表的なECMであるコラーゲンの立体構造は他のECM成分や細胞との相互作用、物理的あるいは生理的な環境によって多様に変化することが知られており(林ら 2000)、実際、羽毛発生初期の真皮コラーゲンは、時間的にも空間的にも特異な立体的線維構造を構築している(小林ら 2005)。この羽毛の発生に伴うコラーゲンの立体的線維構造の変化には、コラーゲンの局所的な蓄積と分解が密接に関与していると考えられ、羽毛と同じ皮膚付属器官である毛の発達では、時間的、空間的に制御されたコラーゲン代謝の重要性が指摘されている(YAMAMOTO and YAMAUCHI 1999)。しかし、羽毛発生時のコラーゲン産生に着目した研究は未だ報告されていない。

コラーゲン産生を調節する物質としてL-アスコルビン酸2-リン酸(Asc2-P)とエチル-3,4-ジヒドロキシベンゾエイト(EDHB)が良く知られている(HATA and SENOO 1989; NAKAJIMA *et al.* 2002)。Asc2-Pはコラーゲンの翻訳後修飾におけるプロリンやリジンの水酸化に必要なビタミンCの誘導体であり、細胞培養系では持続的にコラーゲン産生を活性化させ、逆にEDHBはその水酸化を阻害してコラーゲン産生能を低下させる。

そこで本研究では、羽毛発生モデルの一つであるI型コラーゲンを真皮層に用いる再構成ゲル皮膚(KOBAYASHI *et al.* 2005)をAsc2-PとEDHB存在下で培養することによって、真皮層におけるコラーゲン産生を増減させた場合の羽毛への影響を追究し、羽毛の初

期発生におけるコラーゲンの役割を検討した。

材料および方法

供試動物

北海道大学北方生物圏フィールド科学センターのロードアイランドレッド種ニワトリ受精卵を37℃、湿度100%条件下で孵卵した。孵卵から摘出した胚の発生ステージ(S)はHAMBURGERとHAMILTON(1951)の方法に従い、外見の形態の特長で決定した。実験は北海道大学大学院農学研究科の動物実験ガイドラインに従って行った。

Asc2-PおよびEDHBの調製

Asc2-P(Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)は、Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)に溶解後、4℃で保存した。EDHB(Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo, Japan)は、エタノールに溶解後、4℃で保存した。溶解した両試薬は、使用直前に培地へ添加し、培地による両試薬の希釈率はAsc2-Pで100倍、EDHBでは400倍以上であった。

コラーゲン溶液の調製

再構成ゲル皮膚の真皮層に用いるコラーゲンゲルはYANG *et al.*(1979)の方法に従って作成した。NAKAMURA *et al.*(2000)の方法に従って抽出したラット尾腱由来のペプシン可溶性I型コラーゲンを含む0.1%酢酸溶液、5倍濃縮DMEMと0.23 N炭酸水素ナトリウム、25 mM HEPES(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、0.15 N水酸化ナトリウムを含む再構成緩衝液を氷冷しながら、7:2:1の割合で混合し、最終コラーゲン濃度が0.9 mg/ml~1.2 mg/mlである中性コラーゲン溶液を調製した。

再構成ゲル皮膚の作製と培養

S31のニワトリ胚の背部から採取した皮膚はPBSで洗浄した後、2%となるようにトリプシン(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)を溶解したカルシウムとマグネシウムを含まないPBS(CMF-PBS)に4℃で17分間浸漬して酵素処理を行い、表皮と真皮を細い針を用いて剥離した。剥離した表皮は2%牛胎児血清(FBS; JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA)を含むDMEMに4℃で浸漬した。剥離した真皮は0.25%トリプシンを含むCMF-PBSに室温下で5分間浸漬後、ピペティングを行い、ポアサイズが40μmのセルストレーナー(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)を通過した解離細胞を得た。細胞懸濁液を1000 rpmで5分間遠心後、沈殿として得られた 1.5×10^6 個の真皮細胞を中性コラーゲン溶液80μlに対して懸濁し、懸濁液をセルカルチャーインサート(Becton Dickinson)上に置いたガラスシリンダー(7.0 mm in internal diameter;

Asahi Glass, Tokyo, Japan) 内に滴下して37°Cで1.5時間インキュベートした。

ゲル化終了後に剥離した表皮をのせたものを再構成ゲル皮膚として (KOBAYASHI *et al.* 2005), 基礎培地である2%FBSを含むDMEM, EDHB を30 μ Mあるいは50 μ M, もしくは Asc2-P を200 μ Mとなるように添加した基礎培地を用いて5日間, 5% CO₂, 95%空気, 相対湿度100%, 37°C に設定したCO₂インキュベーター内で培養した。

走査電子顕微鏡 (SEM) 観察

SEM試料は, OHTANI *et al.* (1989) のアルカリ処理・細胞消化法に従って作成した。各条件下で培養した再構成ゲル皮膚をPBSで洗浄し, 2.5%グルタルアルデヒド (Polysciences, Warrington, PA, USA) を含む0.1 Mリン酸バッファー (pH 7.4) で浸漬固定した後, 10% NaOH 溶液に4日間浸漬し, アルカリ処理を行った。蒸留水で2日間洗浄し, 溶解した表皮層を含む細胞成分を除去した後, 真皮のコラーゲンだけとなった試料を1%タンニン酸 (KANTO Chemical, Tokyo, Japan) 溶液に2時間浸漬し, 蒸留水で洗浄後1%オスミウム (Polysciences) 溶液中で1時間固定した。エタノール系列で脱水後, t-ブチルアルコール (KANTO) に浸漬してエタノールと置換した試料はt-ブチルアルコールとともに凍結させた。凍結した試料は凍結乾燥後に金属試料台に貼り付け, プラズマコーター (NL-OPC80A; JOEL, Tokyo, Japan) で金属オスミウムを蒸着して走査電子顕微鏡 (JSM-5340F; JOEL) を用いて観察, 撮影した。

ヘマトキシリン・エオシン (HE) および間接蛍光抗体染色

各条件下で培養した再構成ゲル皮膚をPBSで洗浄後, OCTコンパウンド (Tissue-Tec; SAKURA, Tokyo, Japan) に包埋したものを液体窒素中で凍結し, クリオスタット (JUNG CM 3000 II; Leica, Germany) を用いて厚さ5 μ mに薄切した。

切片は10%ホルマリンで固定した後, HE染色を行う一方, I型コラーゲンに対する抗血清 (LB-1196; LSL, Tokyo, Japan) を第一抗体とし, FITC標識した第二抗体により可視化し (中村ら 1999), 蛍光顕微鏡 (BH2-RFL-T2; OLYMPUS, Tokyo, Japan) 下で観察, 撮影した。

結 果

コラーゲン産生異常が再構成ゲル皮膚の羽芽に及ぼす影響

基礎培地で培養したコントロールの再構成ゲル皮膚では, 培養5日後, 尾部方向へ伸長した羽芽が形成されていた (Fig. 1A)。EDHBを30 μ M含む培地で培養し

た再構成ゲル皮膚では, 幾分隆起した羽毛原基が形成されていたが, 伸長した羽芽は観察されず (Fig. 1B), 50 μ M EDHB存在下の皮膚ではほとんど羽毛原基が隆起していなかった (Fig. 1C)。一方, 200 μ M Asc2-P存在下で形成された羽芽の形状はコントロールよりも基部が太く発達していたが, 羽芽自体が形成されていない領域も観察された (Fig. 1D)。

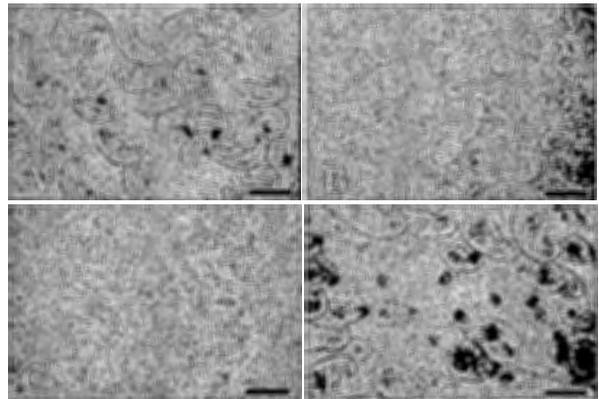


Fig. 1 Effects of decreased or increased collagen production on feather development in cultured reconstituted gel skins. Phase-contrast micrographs show reconstituted gel skins cultured in a control medium (A) and in a medium containing 30 μ M (B), 50 μ M EDHB (C) or 200 μ M Asc2-P (D) for 5 days. Scale bars: 200 μ m.

再構成ゲル皮膚における真皮細胞とI型コラーゲンの局在

各条件下で5日間培養した再構成ゲル皮膚の断面をHE染色すると, 30 μ M EDHB存在下で培養した再構成ゲル皮膚の羽毛原基は, コントロールと比較して羽芽真皮領域の真皮細胞密度が低かった (Fig. 2A, B)。EDHBを50 μ M含む培地で培養したゲル皮膚では, ブラコード下側に真皮細胞の密集したコンデンセーションは観察されず, 細胞密度は真皮層全体で一様であった (Fig. 2C)。Asc-2P存在下で形成された羽芽では, 真皮細胞が羽芽基部の真皮領域にコントロールよりも密集していたが (Fig. 2D), 形成されなかった領域では無羽毛域と同程度の細胞密度であった (Fig. 2E)。

抗I型コラーゲン抗体による免疫染色の結果, コントロールの再構成ゲル皮膚では, 羽芽の真皮領域が均一に染色されていた (Fig. 2F)。EDHBを30 μ M含む培地で培養した再構成ゲル皮膚では, 抗I型コラーゲン抗体に対する反応性が真皮領域全体で弱くなり (Fig. 2G), EDHBを50 μ M含む培地で培養した皮膚の真皮領域の陽性反応は極めて微弱であった (Fig. 2H)。一方, Asc-2P存在下で培養した再構成ゲル皮膚において, 形成された羽芽では基部の真皮領域に強い陽性反応が観察され (Fig. 2I), 羽芽が形成されなかった領域では無羽毛域と同様に表皮直下の真皮上層が強染されていた (Fig. 2J)。

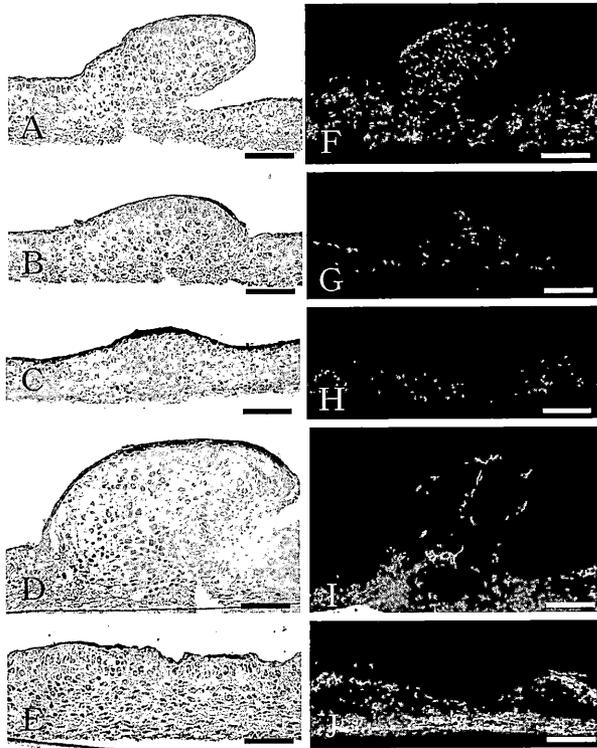


Fig. 2 Effects of decreased or increased collagen production on mesenchymal cells and type I collagen in cultured reconstituted gel skins. Sagittal sections of the reconstituted gel skins cultured in a control medium (A, F) and in a medium containing 30 μ M (B, G), 50 μ M EDHB (C, H) or 200 μ M Asc2-P (D, E, I, J) for 5 days were stained with HE (A-E) or anti-type I collagen antiserum (F-J). Scale bars: 50 μ m.

再構成ゲル皮膚におけるコラーゲン線維の立体構造

各条件下で培養した再構成ゲル皮膚をアルカリ処理した後に観察すると、コントロールの再構成ゲル皮膚で形成された羽芽のコラーゲン線維の立体構造は、先細りの円錐形を呈しており (Fig. 3A), 羽芽の基部から先端部に向かって走行するコラーゲン線維によって構成されていた (Fig. 3B). EDHBを30 μ M含む培地で培養した再構成ゲル皮膚では、羽毛域の表面にドーム様の比較的太いコラーゲン線維による粗い立体構造が観察されたが (Fig. 3C), コラーゲン線維に特定の走向性は認められなかった (Fig. 3D). EDHBを50 μ M含む培地で培養した再構成ゲル皮膚では、真皮全体のコラーゲン線維の立体構造が希薄で、羽毛域では消失していた (Fig. 3E). Asc2-P存在下で培養した再構成ゲル皮膚の羽芽の形成が阻害された領域の表面は周囲の無毛域よりも窪んでおり (Fig. 3F, G), コラーゲン線維が交差して緻密に折り重なった立体構造が観察された (Fig. 3H). Asc2-P存在下で形成された羽芽では、コラーゲン線維が基部から先端部に向かって走行していたが、コントロールと比較して非常に密度の高いネットワーク状であった (Fig. 3I, J).

濃度の異なるI型コラーゲンゲルが羽芽に及ぼす影響

I型コラーゲン濃度を0.95 mg/mlにした再構成ゲル皮膚では、コントロール (Fig. 1A; 0.9 mg/ml) との違いは観察されなかったが (Fig. 4A), 濃度が1.0 mg/mlになると、羽芽の基部が幾分太くなっていた (Fig. 4B). コラーゲン濃度が1.1 mg/mlの再構成ゲル皮膚では、一部の羽毛域の羽芽伸長が阻害され (Fig. 4C), 1.2 mg/mlになると、再構成ゲル皮膚全体で羽芽の伸長が阻害されていた (Fig. 4D).

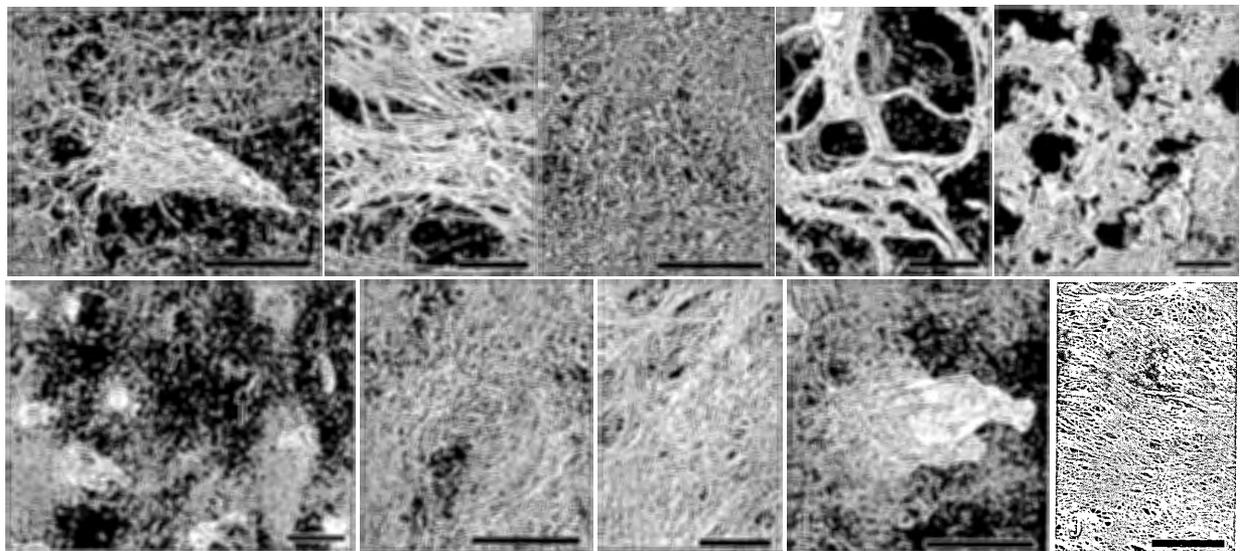


Fig. 3 Effects of decreased or increased collagen production on collagen fibrillar structure in cultured reconstituted gel skins. SEM views show collagen fibrillar structure of reconstituted gel skins cultured in a control medium (A, B) and in a medium containing 30 μ M (C, D), 50 μ M EDHB (E) or 200 μ M Asc2-P (F-J) for 5 days. Arrows in E and F show pteryllae where feather development was inhibited. Scale bars: 100 μ m for A, C, E, F, G, I; 4 μ m for B, D, H, J.

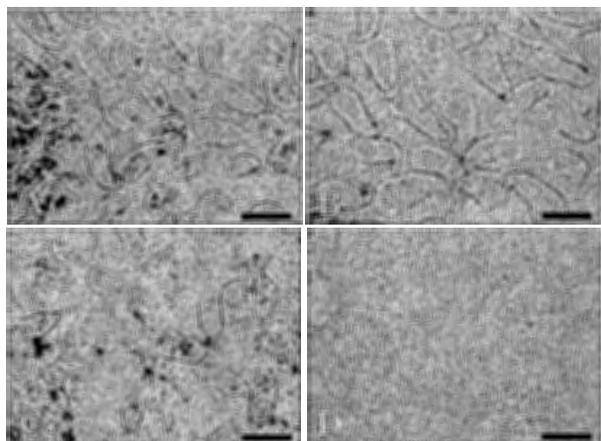


Fig. 4 Effects of collagen concentration on feather development in cultured reconstituted gel skins. Phase-contrast micrographs show reconstituted gel skins using 0.95 mg/ml (A), 1.0 mg/ml (B), 1.1 mg/ml (C) or 1.2 mg/ml (D) of type I collagen gels after 5 days of culture. Type I collagen in gels at concentrations higher than 1.0 mg/ml prevented feather development in a dose-dependent manner. Scale bars: 200 μ m.

考 察

ニワトリ胚における羽毛原基形成に際し、無羽毛域ではI型コラーゲンが真皮上層に多く存在し、コラーゲン線維は立体構造を形成しており(中村ら1999;小林ら2005)、真皮細胞はI型コラーゲン線維の立体構造上を移動することが報告されている(STUART and MOSCONA 1967)。一方、羽毛域ではI型コラーゲンを分解するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)がコンデンセーション領域に特異的に発現しており(DUONG and ERICKSON 2004)、実際にI型コラーゲン量の低下とコラーゲン線維の立体構造の損壊が認められ(中村ら1999;小林ら2005)、コンデンセーションの真皮細胞は無羽毛域から移動したものであることが報告されている(JIANG *et al.* 1999)。これらのことは、羽毛原基のコンデンセーション形成の際には、無羽毛域では真皮細胞の足場としてコラーゲン線維の立体構造が必要であるが、羽毛域では立体構造の損壊も必要であることを示している。本研究において、高濃度EDHBによってコラーゲン産生が抑制された再構成ゲル皮膚では、真皮層全体でI型コラーゲンが減少し、真皮細胞の密集した領域も認められなかった。すなわち、EDHBによるコラーゲンの産生不足は、真皮細胞の移動に必要な無羽毛域のコラーゲン線維の立体構造構築を抑制し、羽毛原基を構成するコンデンセーションの形成を阻害したと考えられる。一方、Asc2-Pによるコラーゲン産生の促進は、羽毛原基の形成が阻害された領域のI型コラーゲンの局在とコラーゲン線維の立体構造が無羽毛域のものと類似していたことから、

I型コラーゲンの産生過剰を招き、羽毛域のコラーゲン線維の立体構造の損壊を抑制し、羽毛原基の形成を阻害したと考えられ、このことは高濃度のコラーゲンをを用いた再構成ゲル皮膚の結果によっても支持された。

トリ胚の羽芽伸長段階においては、長軸方向に走行するコラーゲン線維の立体構造が徐々に構築され(小林ら2005)、真皮細胞は羽芽の基部から先端部側へ移動する(SOTO-SUAZO *et al.* 2004)。一定方向に走行するコラーゲン線維は走行軸方向への細胞移動を促進することから(DICKINSON *et al.* 1994)、羽芽伸長段階において、真皮細胞は先端部側に向かって走行するコラーゲン線維の立体構造を足場として移動すると考えられる。また、培養系においてI型コラーゲンゲル中の細胞はインテグリンを介してI型コラーゲンと接着し、移動するが(CARVER *et al.* 1995)、この細胞移動はI型コラーゲンゲルの濃度が高すぎる場合にも低すぎる場合にも阻害される(PERUMPANANI and BYRNE 1999)。本研究において、低濃度でEDHBを添加した場合、抗I型コラーゲンの免疫染色像における陽性反応は低下し、形成された羽芽の真皮層表面にはコラーゲン線維がドーム状に粗く組まれていたが、コラーゲン線維に一定の走行性は認められなかった。すなわち、EDHBによるコラーゲンの産生抑制は、真皮細胞の足場として必要なコラーゲン線維の立体構造を形成させず、羽芽の伸長を阻害したと考えられる。Asc2-Pを添加した皮膚では、羽芽の基部が異常に発達し、真皮細胞の高密度化とI型コラーゲンの過剰な蓄積とともに非常に緻密なコラーゲン線維の立体的なネットワークが観察された。Asc2-Pによるコラーゲンの産生過剰は、コラーゲン線維の立体構造を必要以上に高密度にして細胞移動を阻害したと考えられ、このことは高濃度のコラーゲンをを用いた再構成ゲル皮膚の結果からも支持された。

本研究におけるコラーゲン産生を促進するAsc2-Pと抑制するEDHBを用いた実験結果から、羽毛原基形成や羽芽伸長を含む羽毛の初期発生には、時間的、空間的に制御されたコラーゲンの産生と分解が必要であり、コラーゲンの産生異常は、正常な羽毛の発生や形態形成を阻害することが示された。また、コラーゲンは、時間的、空間的に特異な立体構造を構築し、羽毛発生に伴う細胞移動を調節する因子として構造的に機能していると考えられる。

参考文献

- CARVER, W., I. MOLANO, T. A. REAVES, T. K. BORG and L. TERRACIO (1995) Role of the alpha 1 beta 1 integrin complex in collagen gel contraction in vitro by fibroblasts. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 165: 425-437.

- DICKINSON, R. B., S. GUIDO and R. T. TRANQUILLO (1994) Biased cell migration of fibroblasts exhibiting contact guidance in oriented collagen gels. *Ann. Biomed. Eng.*, 22: 342-356.
- DUONG, T. D. and C. A. ERICKSON (2004) MMP-2 plays an essential role in producing epithelial-mesenchymal transformations in the avian embryo. *Dev. Dyn.*, 229: 42-53.
- HAMBURGER, V. and H. L. HAMILTON (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, 88: 49-92.
- HATA, R. and H. SENOO (1989) L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts. *J. Cell Physiol.*, 138: 8-16.
- 林利彦・水野一乗・中里浩一・羽関典子・西山俊夫(2000) 細胞外マトリックスー基礎と臨床ー“コラーゲンスーパーファミリータンパク質の項執筆”(小山輝・林利彦 編集). 94-118. 愛智出版. 東京.
- JIANG, T. X., H. S. JUNG, R. B. WIDELITZ and C. M. CHUONG (1999) Self-organization of periodic patterns by dissociated feather mesenchymal cells and the regulation of size, number and spacing of primordia. *Development*, 126: 4997-5009.
- 小林謙・福永重治・竹之内一昭・加藤(森)ゆうこ・中村富美男 (2005) ニワトリ初生羽の発生に伴う真皮コラーゲンの形態変化. *北海道畜産学会報*, 47: 65-71.
- KOBAYASHI, K., S. FUKUNAGA, K. TAKENOUCI, Y. KATOMORI and F. NAKAMURA (2005) Functional role of type VI collagen during early feather development of the chick embryo *in vitro*. *Anim. Sci. J.*, 76: 273-282.
- MAUGER, A., M. DEMARCHEZ, D. HERBAGE, J. A. GRIMAUD, M. DRUGUET, D. HARTMANN and P. SENDEL (1982) Immunofluorescent localization of collagen types I and III and of fibronectin during feather morphogenesis in the chick embryo. *Dev. Biol.*, 94: 93-105.
- NAKAJIMA, I., S. MUROYA, R. TANABE and K. CHIKUNI (2002) Positive effect of collagen V and VI on triglyceride accumulation during differentiation in cultures of bovine intramuscular adipocytes. *Differentiation*, 70: 84-91.
- 中村富美男・平野大介・三田晶子・竹之内一昭・近藤敬治 (1999) ニワトリ羽毛の形態形成に関する免疫組織化学的検討. *北海道畜産学会報*, 41: 53-57.
- NAKAMURA, F., T. FUJIOKA, Y. HIRAOKA, Y. KUBO and S. FUKUNAGA (2000) Inhibitory effects of bovine cartilage chondromodulin-I on angiogenesis. *Anim. Sci. J.*, 71: 486-493.
- OHTANI, O., T. USHIKI, T. TAGUCHI and A. KIKUTA (1989) Collagen fibrillar networks as skeletal frameworks: a demonstration by cell-maceration/scanning electron microscope method. *Arch. Histol. Cytol.*, 51: 249-261.
- PERUMPANANI, A. J. and H. M. BYRNE (1999) Extracellular matrix concentration exerts selection pressure on invasive cells. *Eur. J. Cancer*, 35: 1274-1280.
- SOTO-SUAZO, M., S. SAN-MARTIN and T. M. ZORN (2004) Collagen and tenascin-C expression along the migration pathway of mouse primordial germ cells. *Histochem. Cell Biol.*, 121: 149-153.
- STUART, E.S. and A. A. MOSCONA (1967) Embryonic morphogenesis: role of fibrous lattice in the development of feathers and feather patterns. *Science*, 157: 947-948.
- YAMAMOTO, K. and M. YAMAUCHI (1999) Characterization of dermal type I collagen of C3H mouse at different stages of the hair cycle. *Br. J. Dermatol.*, 141: 667-675.
- YANG, J., J. RICHARDS, P. BOWMAN, R. GUZMAN, J. ENAMI, K. MCCORMICK, S. HAMAMOTO, D. PITELKA and S. NANDI (1979) Sustained growth and three-dimensional organization of primary mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 3401-3405.
- YU, M., Z. YUE, P. WU, D. Y. WU, J. A. MAYER, M. MEDINA, R. B. WIDELITZ, T. X. JIANG and C. M. CHUONG (2004) The biology of feather follicles. *Int. J. Dev. Biol.*, 48: 181-191.