

アカガエル変態期の下顎筋でみられた 筋再生と筋線維分岐

神宮司洋一, 白石明久

群馬県立県民健康科学大学 診療放射線学部

アカガエル (*Rana japonica*) 幼生の咀嚼筋群は、変態後の生活様式に合わせて各筋が様々な変化を示す。下顎骨を支える下顎筋 (submandibular muscle) は変態期にも発達を続けるが、微細構造の変化はまだよく分かっていないため、光学顕微鏡と電子顕微鏡を使って調べた。カエルの幼生の下顎筋は前肢出現の8日前から前肢出現後10日までの期間について観察した。

前肢出現8日前の筋線維には大型の空胞が出現することがあり、変態期間中にこの空胞を含んだ筋線維の崩壊と複数の新たな筋線維の再生がみられた。また、光学標本の連続切片による観察では、変態初期には途中から2本に分かれる筋線維もみられ、前肢出現後までに筋線維数が増加することから、筋の分岐も変態期の形態学的特徴の一つと考えられる。

以上の結果から、変態期の下顎筋では、一部の筋線維の作り直しによって複数の新生筋線維を作ることと筋線維の分岐によって筋全体の発達が進むものと考えられる。

キーワード：アカガエル, 下顎筋, 変態, 筋再生, 筋線維分岐

緒 言

カエル (両生類の無尾類) の骨格筋には、水中 (オタマジャクシ) から陸上へと主な生活環境を変えることに伴って形態も大きく変化するものがある。こうした変態期の変化でよく知られている現象に陸上生活では必要のない尾の消失があり (Fox *et al.*¹⁾、尾の骨格筋すべての消失も起こる。また同時に、歩行に必要となる前肢・後肢が形成され多種の骨格筋も新生する。これらの器官ほど目立たないが、カエルは成体になると餌を捕らえることに合わせて口を大きく開けるようになり、幼生時代の咀嚼筋を消失させて新しい筋への作り替えをすることがある (Takisawa *et al.*²⁾。また、肺呼吸に転換することで呼吸筋が発達する (Unayama³⁾)。

咀嚼筋についてはアカガエルを使ってすでに調

べているが (Jinguji⁴⁾)、一時的にしても広範な筋変性を起こすので形態学的には尾の消失時の変化に似ている。他方、変態期を通じて主に筋束の発達・肥大を行う咀嚼筋もある。こうした違いは、咀嚼筋の場合にはその付着場所である頭部および下顎骨の形態変化に原因があるものと考えられる (Takisawa *et al.*²⁾)。なお、骨格筋の再生は変性した既存の筋線維に密接した筋衛星細胞 (myosatellite cell) が生き残り、再び分裂増殖して新たな筋線維となることによって行われる (Ishikawa⁵⁾, Stocum⁶⁾)。

今回は、口の運動に関わる筋であって変態期を通じて下顎骨への付着場所が変わらず、筋全体には発達がみられるアカガエル (*Rana japonica*) の下顎筋について、変態期にどのような微細形態の変化が起こるか調べた。

研究対象

アカガエル (*Rana japonica*) の幼生 (オタマジャクシ) は前橋市の郊外で採集し、常温で飼育した。

幼生の発育段階は Taylor ら⁷⁾ を参考とし、後肢出現後 (Taylor らの stage XIII に相当)、前肢出現から10日後 (Taylor らの stage XXV に相当) までを調べた。

方法

光学顕微鏡標本は、10%ホルマリン-リン酸緩衝液 (pH7.4) で固定した後、エタノール系列で脱水しパラフィンに包埋した。約5 μ m厚で連続切片を作成し、脱パラフィンと親水処理後、ヘマトキシリン-エオシン染色を施して観察した。

電子顕微鏡標本は、2.4%グルタルアルデヒド-カコジル酸 Na 緩衝液 (pH7.4) で固定後、エタノール系列で脱水しエポキシ樹脂に包埋した。超薄切片は Hitachi H800B型電子顕微鏡 (群馬

大学医学部、旧第2解剖学教室) を使って観察した。

下顎筋の長さとおよび構成する筋線維の数は、前肢出現8日前と前肢出現直後の2つの時期について、それぞれ5側 (5個体) について計測し、筋発達の参考とした。なお、電子顕微鏡用の樹脂包埋標本を使ったため、標本の収縮の程度は不明で計測値の統計的な処理は行っていない。

結果

下顎筋は口腔底の体表側にある細長い筋で、その外側端が下顎骨の左右の後端付近に付着し、内側端は下顎中央部で左側と右側の筋束が合流する。この合流部は口腔底部にある舌軟骨に結合組織によって付着する。変態期を通じて下顎骨が発達すると共に、筋束も大きくなった。陸上生活では餌を丸飲みするように口を大きく開ける際に下顎筋は下顎骨を支えるものと考えられる。前肢出現前後の筋の大きさを比較すると、各5側の平均で、出現8日前には、長さ:2.5mm、幅:0.5mm、

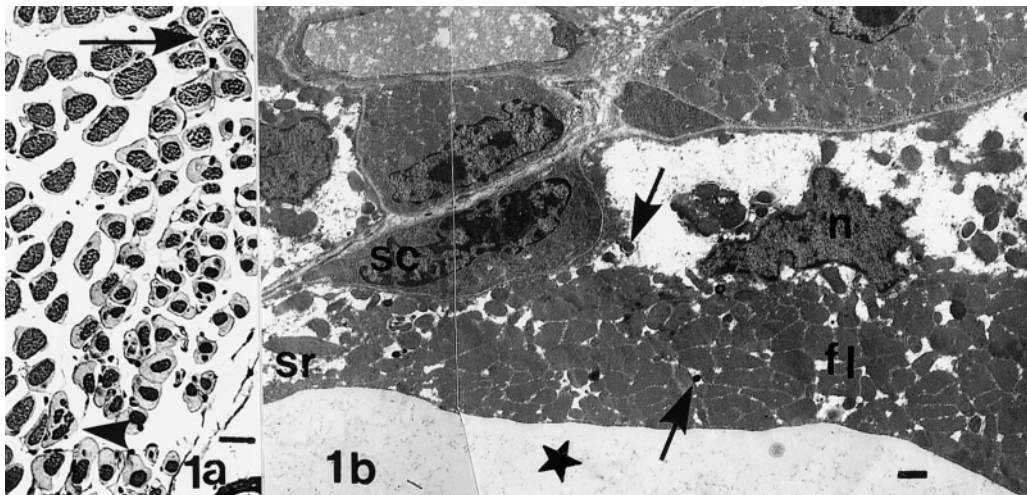


図1 1a: 前肢出現8日前の幼生の下顎筋の横断面でヘマトキシリン-エオシン染色したパラフィン切片。内部に大型の空胞をもつ筋線維 (矢印) と、図2で示す分岐する筋線維 (矢尻) がある。食細胞の集合はこの筋束ではみられなかった。

1b: 同じ時期の下顎筋を横断する電子顕微鏡像。筋線維内部にある大型の空胞 (*) の縁は膜によって筋形質 (sr) と境界されている。この筋線維の核 (n) と筋衛星細胞 (sc) の核は周辺の正常な細胞の核と同様の形態をしている。筋原線維束の横断面 (fl)。矢印は電子密度の高い物質。

1a: 230倍, 横棒: 20 μ m, 1b: 3800倍, 横棒: 1 μ m

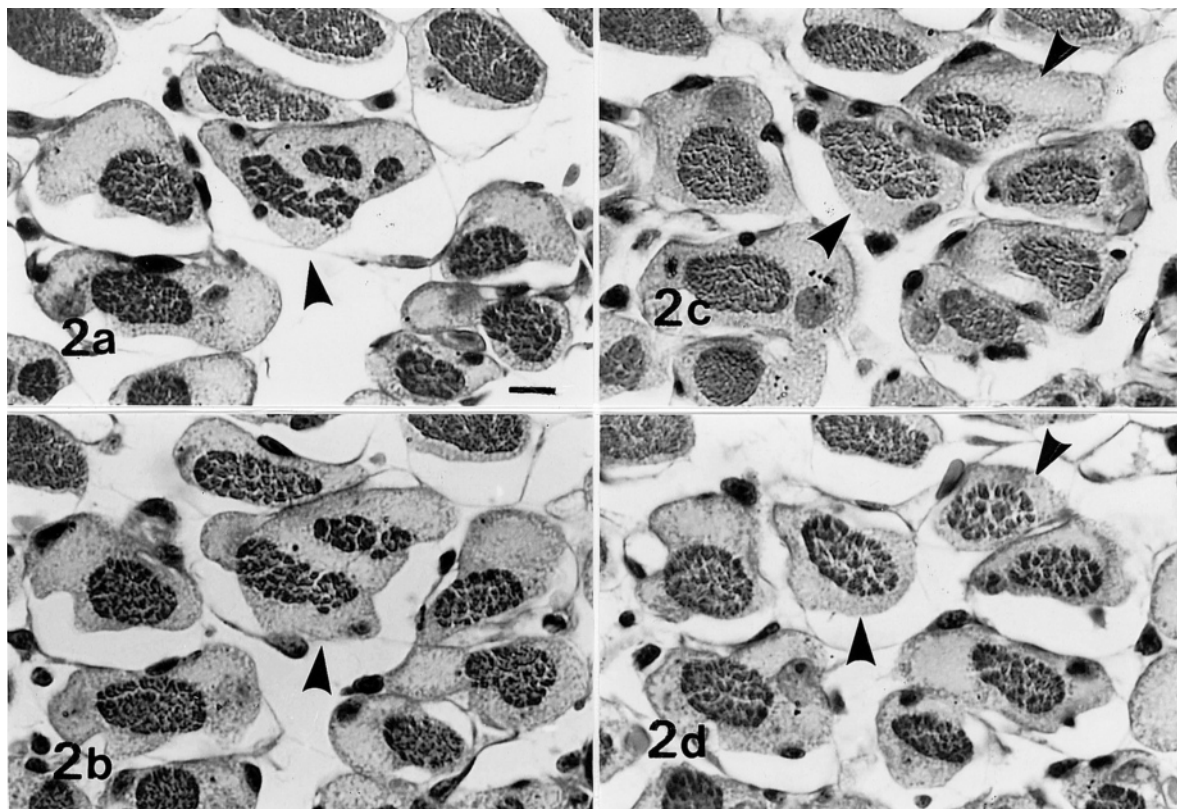


図2 a, b, c, d 前肢出現8日前の幼生の下顎筋の横断面でヘマトキシリン-エオシン染色したパラフィンの連続切片. 途中で2本に分かれる筋線維(矢尻)がある.
ab間は約60 μm , bc間は約60 μm , cd間は約120 μm . 610倍, 横棒: 10 μm

厚さ: 0.25mm, 線維数: 79本, 出現直後には, 長さ: 2.6mm, 幅: 0.8mm, 厚さ: 0.25mm, 線維数: 103本であり, 幅と線維数の増加がみられた. 前肢出現後には直径の大きな筋線維も増加していた.

前肢出現前8日期 (Taylor らの stage XVII)

光学顕微鏡像では, 約80本からなる筋線維束の中に大型の空胞を含む線維が少数現れた. これより3日程若い幼生の筋ではみられなかった特異な形態である (図1a). 電子顕微鏡による観察では, 大型の空胞はその輪郭が明瞭な膜によって筋形質 (sarcoplasm) から区別され, 収縮性線維構造に接した空胞であることがわかった (図1b). これと同様の大型の空胞は, 腱切断後の骨格筋 (Abou Salem *et al.*⁸⁾) や一部の骨格筋の筋炎でみられており, 最終的に筋の崩壊を起こす場合は筋変性へ至る微細形態学的な兆候の一つと考えられている (埜中⁹⁾). 図1bでは, 下顎筋線維の核とその筋衛

星細胞の核が, 隣接する正常な筋線維の核と同様の形態を示しているが, 筋形質には電子密度の高い物質の出現もみられ, 微細構造上の変異の兆候もある. 下顎筋の全体を光学試料の連続切片によって調べても, この時期には筋崩壊に伴う食細胞 (macrophage) の集合・侵入は観察されなかった.

光学顕微鏡用の切片から, 途中から分岐する筋線維が複数みられた. 図2は, 下顎骨に近い部分 (図2a)では1本の筋が, 細胞内部の筋原線維束が2つに分かれ (図2b), これらが個別の細胞膜に包まれた2つの筋線維に移行することを示した. 観察では1つの標本で少なくとも3カ所で見られた. 時間経過を追跡できないために, これらの形態が分岐なのか癒合なのか区別できないが, 文献 (Ho *et al.*¹⁰⁾, Ontell *et al.*¹¹⁾) に従ってここでは分岐と表現する.

前肢出現後0～3日期 (Taylor らの stage XX～stage XXI)

光学顕微鏡観察では、下顎筋筋束の前方すなわち口吻に近い側で崩壊しつつある筋線維が複数みられた。その内外に多数の食細胞が分布する。こうした筋線維の崩壊像は前肢が体表に出現する前後の限られた時期約5～7日間にみられ、かつ、筋全体に及ばないことから、変態期の下顎筋における筋線維の変性が少数であることを示す。また、変性筋線維が下顎筋内で分布する場所はより若い時期に大型の空胞のみられた部分とほぼ同じため、空胞の出現が筋変性の前兆であったことも示唆される。

電子顕微鏡による観察では、変性・崩壊した筋線維内には多数の食細胞が侵入しているが、同時に直径の小さな筋線維も複数存在していた。これら小型の筋線維では細胞膜などの微細構造は正常な細胞と同様で、再生途中の筋線維 (筋管 myotube) と考えられる。崩壊した筋線維の残遺基底膜に囲まれていることからこれら筋管は崩壊した筋線維の筋衛星細胞に由来するものであろう (図3)。変性の進行には筋線維によって差があり、筋線維の破片と多数の食細胞がみられる場合と、再生筋が区別できる場合とがあり、変態の最盛期にある前肢出現期頃には両者が混在している。図3は筋再生が進行している例である。なお、アカガエルで幼生期の尾の消失がほぼ完了する (Taylor らの stage XXV) のは前肢出現後約15日経てからであった。

考 察

主に陸上で生活するカエルは、変態期に骨格筋が様々な形態変化を示すが、その変化も行動に応じて様々である。下顎筋は陸上生活での餌取りにおける役割は高く、大きく発達させる必要がある。咀嚼筋には、幼生期に頭部の狭い範囲に複数が付着するものがあり、これらは変態期にほぼ全筋束

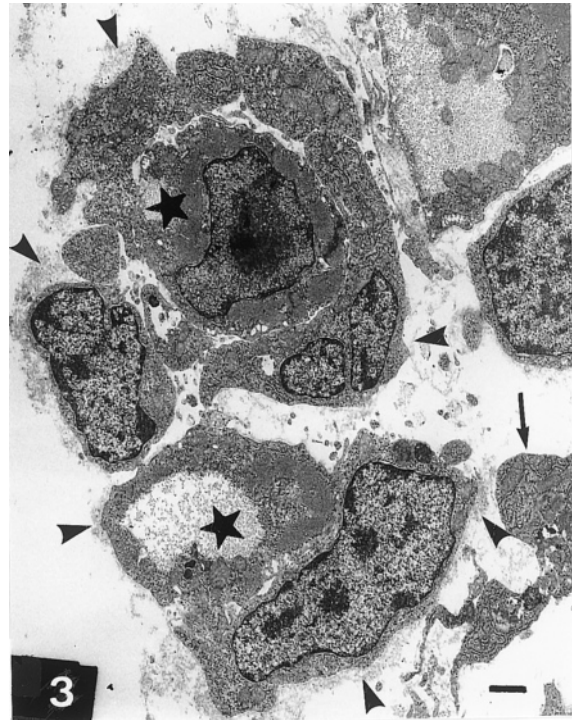


図3 前肢出現後3日目の下顎筋を横断する電子顕微鏡像。変性して崩壊した筋線維の消失跡は周辺に残った基底膜 (矢尻) によって他と区別されている。この基底膜の内側に直径の小さな筋管 (*) が2本みられる。食細胞 (矢印)。4900倍, 横棒: 1 μ m

が変性した後、再生するという複雑な過程を経る (Takisawa *et al.*²⁾, Jinguji⁴⁾)。頭部骨格の発達に伴って筋の付着場所も比較的大きく変化することに合わせた変化とも考えられる (Takisawa *et al.*²⁾)。これらに対し、下顎筋は周辺に交錯するような筋がほとんどなく下顎骨と共に一貫して発達するためか、下顎骨の大きさの変化に伴う筋の付着域の増加があっても筋線維の走向にほとんど変化はなかった。

カエルに限らず多くの動物の骨格筋線維には、未分化な状態にある筋衛星細胞が細胞膜に密接して存在する (Ishikawa⁵⁾ など文献は多い)。筋線維が傷害などにより変性した場合にはこの筋衛星細胞が分裂・増殖したのち互いに癒合し新たな筋線維 (筋管) を再生する (Luque *et al.*¹²⁾, Stocum⁶⁾ など文献は多い)。骨格筋は胎児期などの器官形成

時に分化を遂げ、その後、筋に異常が生じた場合にのみ再生が起こりうる。今回、カエル下顎筋でみられた崩壊後の残遺基底膜に包まれた筋管の形成は、筋線維の作り替え現象であることを示す。この際に複数の筋線維が再生することにより筋束全体の肥大・発達に關与する可能性を示唆する。

進行性筋ジストロフィー症の骨格筋線維では、長期的には筋束の大部分は変性するが、発症の初期には今回の下顎筋にみられたような部分変性と、その筋衛星細胞による再生を繰り返すことが知られている (Stocum⁶⁾, 埜中⁹⁾, Ontell *et al.*¹³⁾。下顎筋で一部の線維だけが変態期に作り直しする理由は、今回の形態観察では不明であるが、変態期に体全体に起こるであろう生理学的な変化に、他の咀嚼筋と同様に下顎筋の一部も影響を受けたと考えられる。

筋線維の分岐あるいは癒合を示す組織像は、今回のカエル変態期のみでなく、生後筋束の発達する過程にある動物でもみられる (Ontell *et al.*¹¹⁾。最終的な筋の消失には至らないが、強制的な運動負荷によって一部筋線維の変性が起こり、その再生過程で筋線維数も増加して、結果として筋束が発達・肥大することがネコやラットを使った実験で報告されている (Ho *et al.*¹⁰⁾, Giddings *et al.*¹⁴⁾。カエルでは変態期を経て陸上生活に対応するまで餌は捕らないので、下顎筋に対する過剰な運動負荷は想定できないが、変態期を通じて発達する下顎骨からの機械的な刺激に、一旦形成された筋が再び対応した現象とも考えられる。

結 論

アカガエルの下顎筋は変態期を通じて筋束が発達する。発達の過程で筋線維の一部には変性と再生によって作り替えがあり、その際に新生筋線維が増加する。さらに幼生期の筋線維の一部は分岐することによって筋線維数の増加に關与するものと考えられる。

文 献

- 1) Fox H (1975): Aspects of tail muscle ultrastructure and its degeneration in *Rana temporaria*, J Embryol Exp Morph 23: 191-207
- 2) Takisawa A, Ohara Y, Kano K (1952): Die Kaumuskulatur der Anuren (*Bufo vulgaris japonicus*) warend der Metamorphose, Okajimas Folia Anatomica Japonica 24: 1-28
- 3) Unayama H (1961): On the development of the mm. petrohyoidei in the anura during metamorphosis, Yokohama Medical Bulletin 12: 1-22
- 4) Jinguji Y (1983): Newly formed motor end-plate of the satellite myotubes in frog tadpole masticatory muscle. Zoological Magazine 92: 242-249
- 5) Ishikawa H (1983): Fine structure of skeletal muscle, from Cell and muscle motility vol 4, p1-84, eds Dowben M and Shay JW, Plenum Publishing Co, USA
- 6) Stocum DL (2006): Regeneration of skeletal muscle, from Regenerative biology and medicine, pp.221-229, Academic Press, London, UK
- 7) Taylor AC, Kollros JJ (1946): Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae, Anat Rec 94: 7-23
- 8) Abou Salem EB, Fujimaki N, Ishikawa H (2001): Formation of unique vacuoles in tenotomized rat soleus muscle fibers, Arch Histol Cytol 64: 247-257
- 9) 埜中征哉 (1984): Rimmed vacuole による筋変性の特異性—rimmed vacuole を伴う遠位型ミオパチーと遠位型筋ジストロフィー (三好

- 型) との対比を中心として一, 神経内科 20 : 622-630
- 10) Ho KW, Roy RR, Tweedle CD, *et al.* (1980) : Skeletal muscle fiber splitting with weight-lifting exercise in rats, *Am J Anat* 157 : 433-440
- 11) Ontell M, Feng KC (1981) : The three-dimensional cytoarchitecture and pattern of motor innervation of branched striated myotubes, *Anat Rec* 200 : 11-31
- 12) Luque E, Pena J, Salas P, *et al.* (1996) : Changes in satellite cell population associated with regenerating muscle fibers in rats, *J Submicrosc Cytol Pathol* 28 : 305-311
- 13) Ontell M, Feng KC, Klueber K, *et al.* (1984) : Myosatellite cells, growth, and regeneration in murine dystrophic muscle. A quantitative study, *Anat Rec* 208 : 159-174
- 14) Giddings CJ, Neaves WB, Gonyea WJ (1985) : Muscle fiber necrosis and regeneration induced by prolonged weight-lifting exercise in the cat, *Anat Rec* 211 : 133-141

Muscular Regeneration and Fiber Splitting in Submandibular Muscle During *Rana Japonica* Metamorphosis

Yoichi Jinguji and Akihisa Siraishi
Gunma Prefectural College of Health Sciences

Submandibular muscle fine structure was examined in *Rana japonica* during metamorphosis from 8 days before to 10 days after forelimb emergence. Light and electron microscopic examination revealed that some number of muscle fibers were replaced respectively by more than two new fibers after necrosis. These new fibers appear to be derived from the myosatellite cells of the degenerating principal fiber. On day 8, before forelimb appearance, several muscle fibers were observed to contain large vacuoles that were similar in structure to those associated with degenerative muscular diseases such as tenotomized muscles. Semi-serial light microscope observations showed that muscle fibers often split into two fibers during metamorphosis. Such muscle fiber splitting may cause an increase in fiber number in much the same way as the muscular hypertrophy associated with physical exercise in other animals. In conclusion, the observations of fiber replacement and fiber splitting in developing muscles may contribute to the growth of submandibular muscle during metamorphosis.

key words : *Rana japonica*, submandibular muscle, metamorphosis,
muscular regeneration, muscle fiber splitting