

ニホンアカガエル変態期の下顎下筋でみられた 筋線維の作り替え

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

ニホンアカガエル (*Rana japonica*) の下顎下筋 (submandibular muscle) でみられた筋変性とその再生過程を，前肢出現の約8日前から前肢出現後7日までの変態期間について，光学顕微鏡と電子顕微鏡を使って調べた。下顎下筋は変態期間中に発達するが，この過程で，少数ではあるが筋線維の作り替えによる筋線維数の増加がみられた。前肢出現の約8日前に筋線維の変性域では，その前兆と考えられる大型の空胞を含んだ筋線維が出現した。前肢出現後の，筋線維の再生領域には比較的口径が小さくミトコンドリアの多い筋線維が増加しており，変態後の生活環境に対応した筋線維型への再編が行われたものと考えられた。

キーワード：ニホンアカガエル，下顎下筋，変態，筋再生，大型空胞

I. 緒 言

変態期のカエルの骨格筋で観察される形態変化には，筋新生，筋消失，筋の変性と再生が連続して起こる筋の作り替え，がある。筋新生は付属肢の形成時に，筋消失は尾の消失時に典型例がみられる。筋の作り替えは，幼生すなわちオタマジャクシ，からカエルへと生活環境も食性も変化することに対応した筋でみられる。幼生期にキチン質の歯板を動かす顎の筋群は，変態期にほぼ全筋束が変性した後，必要に応じて再生する。この例についてはヤマアカガエルの adductor mandibulae posterior longus superficialis 筋を使ってすでに調べているが (Jinguji¹⁾)，この筋は一斉に広範な筋変性を起こし，その後，筋衛星細胞が分裂増殖して新たな筋線維となった。観察された形態変化は骨格筋線維の再生過程でよく知られている過程と同様であった (Ishikawa²⁾, Blaveri *et al.*³⁾, Collins *et al.*⁴⁾)。一部の咀嚼筋が変態期の

末期に作り替えられるのは，その付着場所である頭部の骨格系，特に幼生時代の歯板の消失と下顎骨の発達が甲状腺ホルモンの影響によって進行すること (Gilbert⁵⁾) と関連するものと考えられる。

今回は，幼生期には歯板の運動に直接は関わらないが，変態期を通じて下顎骨に付着し，下顎骨と共に発達し続ける下顎下筋 (Kordylewski⁶⁾ による submandibular muscle, Luther⁷⁾ による intermandibular muscle も同じ筋と考えられる) について，ニホンアカガエルを使って変態期の微細形態を調べた。

この筋には，変性の前兆と考えられる大型の空胞を含む筋線維が出現した。こうした空胞が一時的に形成される例は，骨格筋の病的変化に際してしばしばみられている (Fraser *et al.*⁸⁾, Jannergren *et al.*⁹⁾) が，カエル特有の生活史である変態期の筋にも同様の形態が現れることが分かった。

II. 研究材料

ニホンアカガエル (*Rana japonica*) の幼生は前橋市の郊外で採集し、煮沸して軟化した葉菜類を餌に常温で飼育した。幼生の発育段階は Taylor ら¹⁰⁾ を参考とし、後肢出現後 (Taylor らの stage XIII に相当) から前肢出現の 7 日後 (Taylor らの stage XXV に相当) までを調べた。

III. 方 法

光学顕微鏡標本は、10%ホルマリンーリン酸緩衝液 (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、ヘマトキシリンー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ーカコジル酸 Na 緩衝液 (pH7.4) で固定後、2%四酸化オスミウム水溶液で後固定したのち、水洗し、更にエタノール系列で脱水してエポキシ樹脂に包埋した。超薄切片は Hitachi H800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。

下顎下筋の大きさと含まれる筋線維の数は、エポキシ樹脂に包埋した試料を使い、前肢出現の約 8 日前と前肢出現後 3 日、の 2 つの時期について、それぞれ 10 側について計測し、筋発達の参考とした。なお、計測値の統計的な処理は行っていない。

IV. 結 果

下顎下筋の外側端は下顎骨の後端付近に付着し、内側端は下顎中央部で口腔底部にある舌軟骨に付着する。この筋は口に近い口腔底にあり、カエルでは舌軟骨とともに舌の支えにも関わる筋で、変態期を通じて体表から透けて見えた。変態期に下顎骨が発達すると共に、筋束も前後方向に広がる。下顎中央で左右の筋が舌軟骨に付着することから、下顎骨と舌軟骨を支え、更に、下顎底

に大きく広がることからカエルの肺呼吸にも役立つものと考えられている (Kordylewski⁹⁾)。前肢出現前後で筋の大きさを、筋の中央部で比較すると、各 10 側の平均で、出現約 8 日前 (8 個体) には、幅: 0.5mm、長さ: 2.5mm、線維数: 92 本、出現後 3 日 (10 個体) には、幅: 0.6mm、長さ: 2.6mm、線維数: 111 本であり、線維数の増加はみられたが、長さとはわずかな増加であった。変態期間中にも下顎下筋が消失せずに筋束を発達させることがわかった。なお、ニホンアカガエルで幼生期の尾の消失がほぼ完了するのは前肢出現後約 7 日経てからであった。

1. 前肢出現前約 8 日期

大型の空胞を含む筋線維が、下顎下筋の横断面でみられた。その数は少なく、図 1 に示すように約 110 本の筋線維束の中に 3 本ほどであった (図 1 b)。連続切片による観察からこの空胞は筋線維内に独立した構造であって (図 1 a ~ 1 c)、筋原線維束に密接、あるいはその内部に位置していた。電子顕微鏡観察では、空胞の外壁には多数の小胞様の構造が形成され、大型の空胞はほぼ連続する膜によって周辺の構造から区画されていた (図 2)。空胞の大きさは様々であり、横断面での最大径がその筋線維の最大径の約 67% に及ぶ場合もあった。ただし、これらの場合にも空胞内に細胞質の断片などの大きな構造物はみられなかった。同様の大型の空胞は、骨格筋の種々の変性過程でみられており (Abou Salem *et al.*¹¹⁾)、これらの報告と同様に微細形態からは筋原線維周辺でイオンの出入りに関係する横細管 (T 管) 系膜構造と関連があるように考えられた。

今回観察された、大型の空胞を含む筋線維ではその核と筋衛星細胞の核には、電子顕微鏡像から筋線維が変性する前兆は得られなかった。また、筋変性に伴って多数出現するはずの食細胞も、空胞を含む筋線維の周辺にもまだ観察されなかった。

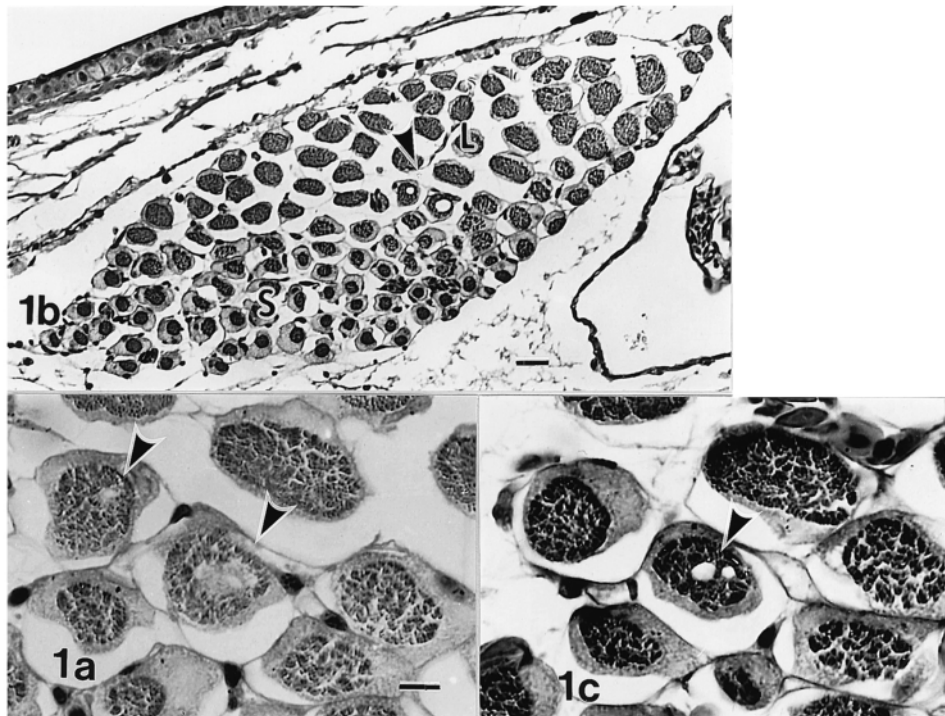


図1 前肢出現約8日前のニホンアマガエル幼生下顎下筋の横断面でヘマトキシリン-エオシン染色したパラフィンの部分連続切片. 内部に大型の空胞(矢尻)をもつ筋線維がある. 連続切片によってこの空胞が同一筋線維内に広がる構造であることを示す. 線維の直径と筋原線維の占める割合から, 大口径線維(L)と小口径線維(S)が区別される. 図aと図b間では約 $10\mu\text{m}$, 図bと図c間では約 $150\mu\text{m}$. a, cは610倍, bは260倍. 横棒はaでは $10\mu\text{m}$, bでは $20\mu\text{m}$.

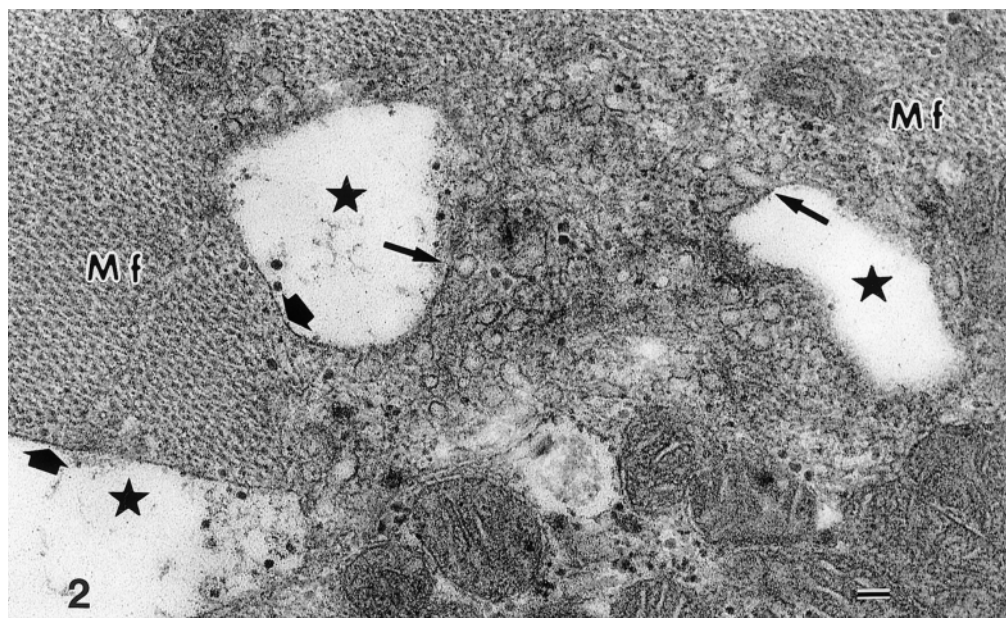


図2 前肢出現約8日前の下顎下筋を横断する電子顕微鏡像. 筋線維内部にある大型の空胞(星印)の縁は膜(太矢印)によって筋原線維束(Mf)と境界されている. 空胞の膜は筋形質内へ小胞を多数作っている(細矢印). 電子密度の高い物質が空胞内にもみえる. 45,000倍, 横棒は $0.1\mu\text{m}$.

下顎下筋に含まれる筋線維を光学顕微鏡像から、横断面で、大口径で筋原線維の多い型と小口径でミトコンドリアが比較的多い型に分類し、それらの分布を比較した。筋線維の口径を図1bに隣接する切片で計測した場合、本論文で以下に述べる大口径線維は43本の平均で約22.4 μ m, 小口径線維は49本の平均で約14.9 μ mであった。変態期間中の筋束内での比率は、大口径線維が約57%, 小口径線維が約43% (実測値は35~54%)であり、前者は体表側に多く、後者は口吻・口腔側に多いという大まかな分布域が得られた (図1b)。

2. 前肢出現後3日期

光学顕微鏡観察では、下顎下筋の前方域すなわち口吻に近い側で崩壊した筋線維が複数みられ、その内外には多数の食細胞が分布した。変性して崩壊しつつある筋線維の内外には多数の食細胞がみられ (図3), 電子顕微鏡では残存する基底膜に囲まれた空所に新生筋管も複数あった (図4)。変性線維が下顎下筋内で分布する場所はより若い時期に大型の空胞の観察された領域であり、形態学的には小口径の線維群の中であった。このことから、空胞の出現が小口径線維群内の筋変性の前兆であることが示唆された。筋線維数の比較では、大口径線維が約42%, 小口径線維が約58% (実測値は48~63%) となり、変態期間中の後者の増加が明らかであった。

変性した筋線維の跡地は残存する基底膜によって囲まれ、その内側に再生中の筋線維即ち筋管がみられるのは、前肢が体表に現れた後であったが、変性線維の数はそれ以前の変態期間では少なかった。ただ、筋線維群の内外には多数の食細胞がみられ、変性した筋線維の存在を示唆していた (図4)。これらに加えて、電子顕微鏡で観察すると、再生中の筋線維とは別の小型の新生筋も少数観察された。これらの筋線維は、残存する基底膜に囲まれた再生中の筋線維とは明確に区別でき、分布

は小口径の筋線維群の周辺で多かった。光学顕微鏡ではこうした新生筋を周辺の組織細胞から区別するのが難しく、今回の筋線維数の計測からは除外した。

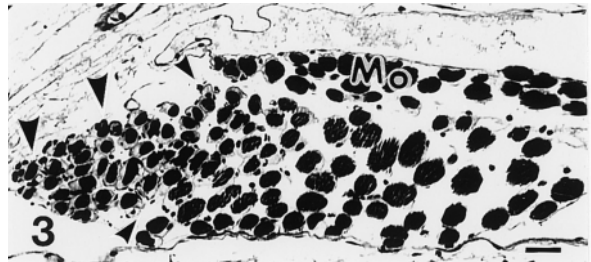


図3 前肢出現3日後の幼カエル下顎下筋の横断面でヘマトキシリン-エオシン染色したパラフィン切片。小口径の筋線維の領域で再生中の筋線維 (大矢尻) と食細胞の集合 (小矢尻) がみられる。Mo は口腔側の別の筋。230倍, 横棒は20 μ m。



図4 前肢出現3日後の下顎下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 (矢印) が3本みられる。食細胞 (*). 4,900倍, 横棒は1 μ m。

V. 考 察

変態期のカエルでは幼生の口腔周辺にある骨格筋の中でも、成体で機能が大きい筋は下顎骨と共に発達を続け、下顎下筋もその一つである。今回、この筋は一部の筋の作り替えとともに、幼若な骨格筋でみられる場合と同様な筋新生 (Schultz¹²⁾) も行い、筋全体の発達が盛んであることがわかった。下顎下筋でみられた筋線維の作り替えでは、再生時に複数の筋線維が形成されるため、筋線維数の増加にも関与するようである。ただ、他の咀嚼筋でみられたような (Jinguji¹¹⁾) 筋束全体に及ぶ作り替え現象ではないため、筋線維数の急速な増加には貢献しないものと思われる。

骨格筋線維が変性後に再生し、結果的に筋の発達・肥大につながる例は、ネコやラットを使って強制的な運動負荷を与えた場合に知られている (Ontell *et al.*¹³⁾, Giddings *et al.*¹⁴⁾)。これらの報告では、過剰な負荷が筋線維の変性を起こし、その再生時に筋線維数が増加している。今回調べたカエルの下顎下筋は、生体の観察から幼生でも摂食時の歯板や呼吸の際の口の動きに良く対応しているので、急速で過剰な運動負荷が変態末期にのみ及ぶとは考えられない。ただ、発育過程での筋線維の伸長や、筋線維の再生には、それらの付着相手である骨の伸長あるいは再生すべき筋全体に及ぼされる何らかの機械的な伸展刺激が必要とされている (Wolpert¹⁵⁾, Stocum¹⁶⁾)。同様に、カエルの変態期に起こる頭骨の変化も周辺の筋を含む様々な器官に空間的な位置の変化をもたらしている (Gilbert⁵⁾, Wolpert¹⁵⁾) ので、ゆっくりとした下顎骨の成長がこうした特異な筋変化と関係あるものと考えられる。

今回観察されたものと同様の空胞は、分離されたカエルの骨格筋を塩類 (Fraser *et al.*⁸⁾) や乳酸 (Jannergren *et al.*⁹⁾) を加えた培養液で処理した場合に現れると報告されている。ただし、これら

の報告例では正常な培養液中では空胞が消失し、形態は回復するとされる。ラットの腱切断実験では、直接、筋は傷害されていないが、腱に近い部分で筋線維の一部が変性し、その際に大型の空胞が出現する (Abou Salem *et al.*¹¹⁾)。この例ではその後、筋が短縮して機能は回復するという。筋線維が空胞を伴った部分変性を起こしその後、筋衛星細胞による再生を繰り返す例が筋ジストロフィー症の一部でも知られている (Stocum¹⁶⁾, 埜中¹⁷⁾)。

カエルも含めたこれらの報告例では、大型の空胞は病的な原因も含めた筋の生理学的環境の変化に応じて形成されるが、筋線維全体に及ぶ急速な変性・崩壊の前兆ではないようである。同様にニホンアカガエル下顎下筋では、大型の空胞を含む筋線維の出現数が少ないことと、再生された筋管が前肢出現後に高い頻度で観察されることから、すでに報告した全面的に作り替える筋 (Jinguji¹¹⁾) の場合に比べて筋の変性と再生がゆっくり進行することを示唆している。再生中の筋管への神経支配は、すでに別の筋で調べているが、変性した筋線維への支配神経が枝を出して再生中の筋管表面に新たな運動終板を作ると考えられた。今回の観察でも基底膜表面に接する細い神経線維がみられたので、同様の変化を経るものと考えられる。

それぞれ10側の計測で、小口径の線維数が全線維数に占める割合を比較すると、平均で、前肢出現前が約43%、前肢出現後が約58%であったため、変態期間中の線維数増は小口径群で高いと判断された。小口径の筋線維は筋原線維の量に対するミトコンドリアの量が、大口径の筋線維の場合よりも多く、一般的に、持続的な運動に有利と考えられている。カエルは変態の末期に、甲状腺ホルモンの影響によって幼生期に活動した組織細胞を成体の生活環境に対応した細胞型に交替する場合があり (吉里¹⁸⁾)、骨格筋についても、摂食行動や呼吸などの運動機能の変化に応じた筋線維の生理学

的な機能型の再編が行われたものと考えられる。

VI. 結 論

アカガエル下顎下筋で一部の筋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、変態期に特徴的な咀嚼器の形態と機能の変化に応じて、関連する筋の一部も作り直しの刺激を受けたものと考えられる。この作り直し過程では変性筋線維の内部に特異な空胞を形成し、比較的ゆっくり進行するようである。

文 献

- 1) Jinguji Y (1983) Newly formed motor end-plate of the satellite myotubes in frog tadpole masticatory muscle, *Zoological Magazine* 92: 242-249
- 2) 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
- 3) Blaveri K, Heslop L, Yu DS, Rosenblatt D, Gross JG, Partridge A, Morgan JE (1999) Patterns of repair of dystrophic mouse muscle: studies on isolated fibers, *Dev Dynam* 216: 244-256
- 4) Collins CA, Olsen L, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge A, Morgan JE (2005) Stem cell function, self-renewal and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche, *Cell* 122: 289-301
- 5) Gilbert SF (2003) Metamorphosis, regeneration, and aging, from *Developmental biology* 7th edition Chapter 18, p575-612, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Massachusetts
- 6) Kordylewski L (1979) Morphology of muscle fibers in amphibian submandibular muscle, *Z mikrosk-anat Forsch* 93: 225-243
- 7) Luther A (1914) N. trigeminus versorgte Muskulatur der Amphibien, *Acta Societiarum Fennicae* 44: 7-145
- 8) Fraser JA, Skepper JN, Hockaday AR, Huang CLH (1998) The tubular vacuolation process in amphibian skeletal muscle, *J Muscle Res Cell Motil* 19: 613-629
- 9) Jannergren I, Bruton JD, Westerblad H (2000) Vacuole formation in fatigued skeletal muscle fibers from frog and mouse: Effect of extracellular lactate, *J Physiol* 526: 597-611
- 10) Taylor AC, Kollros JJ (1946) Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae, *Anat Rec* 94: 7-23
- 11) Abou Salem EB, Fujimaki N, Ishikawa H (2001) Formation of unique vacuoles in tenotomized rat soleus muscle fibers, *Arch Histol Cytol* 64: 247-257
- 12) Schultz E (1996) Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles, *Dev Biol* 175: 84-94
- 13) Ontell M, Feng KC, Klueber K, Dunn RF, Taylor F (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
- 15) Wolpert L (1998) Growth and post-embryonic development, from *Principles of development* Chapter 14, p417-441, Current Biology LTD, Oxford University Press,

Oxford

- 16) Stocum DL (2006) Regeneration of skeletal muscle, from Regenerative biology and medicine Chapter 9, p221-229, Academic Press, London, UK
- 17) 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—, 神経内科20: 622-630

- 18) 吉里勝利 (1993) 両生類の変態におけるアポトーシスのメカニズム, 実験医学, 羊土社, 11: 2262-2267

Muscular Replacement Observed in Submandibular Muscle During *Rana Japonica* Metamorphosis

Yoichi Jinguji and Akihisa Shiraishi

School of Radiological Technology, Gunma Prefectural College of Health Sciences

Ultrastructure of *Rana japonica*'s submandibular muscle was studied on the process of metamorphosis ranging 8 days before to 7 days after forelimbs emergence.

A characteristic feature was the replacement of larval muscle fibers by adult fibers even though its frequency was lower than that of new muscle formation observed in submandibular muscle. Large vacuolar inclusions appeared in degenerating muscle fibers, on 8 days before to forelimb emergence. This may derive from the transverse tubular system in or around contractile filament mass of muscle fiber and indicate the change of fiber's physiological state.

These results suggest that replacement of larval muscle fibers by adult fibers may contribute to the growth of submandibular muscle and adapt the muscle function to new habitat of frog.

Key words : *Rana japonica*, submandibular muscle, metamorphosis,
muscular regeneration, vacuolar inclusion