ラット咬筋の組織形成機構の組織化学的研究

桂 茂 石 塚 寛

松 本 林 中 江 良 子

徳島大学歯学部口腔解剖学第1講座 (主任: 桂 茂教授)

[受付: 昭和56年9月4日]

Histochemical studies on the histogenesis of rat masseter muscle

Shigeru Katsura, Hiroshi Ishizuka, Hayashi Matsumoto
and Yoshiko Nakae

*Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Tokushima University,
Kuramoto-cho 3-18-15, Tokushima 770*

(Chief: Prof. Shigeru Katsura)

[Accepted for publication September 4, 1981]

Key words: masseter / rat / histogenesis / SDH / histochemistry

Abstract: The cellular differentiation and histogenesis of the architecture of rat masseter were studied by histochemical staining for succinic dehydrogenase (SDH). From day 19 of gestation to day 16 after birth, development of two distinct muscle fibers could be distinguished: fibers with fine formazan diffusely distributed in the sarcoplasm (SS) and fibers with large formazan particles diffusely distributed in the sarcoplasm (SL). After day 16 some muscle fibers showed marked progress in cellular differentiation and became similar to adult fiber types. After day 23 most muscle fibers could be classified into three types. Even after this, cellular differentiation increased progressively and approached that of adult muscle fibers. Until day 1 after birth there were some clusters of muscle fibers. Regions with high and low SL indices were distinguished. Thereafter muscle fibers of both SS and SL types increased in number. The SL index of each muscle region increased, especially from day 4 to 16, although there were regional differences in time of beginning and in the grade of increase. From day 1 to 4 after birth the organization of the primordial muscle structure observed in the cross section became similar to that of an adult muscle and the deepest masseter had the highest SL index. On day 23 after birth the distribution patterns of OI and SI in the cross section became similar to those in adult muscle. The average OI and SI of the muscle regions decreased in the following order: the deepest masseter > superficial masseter > deep masseter. Moreover, the range of the SL index, OI and SI values the primary fasciculi in each region showed significant changes during postnatal development.

緒 言

骨格筋線維における myosin ATPase や SDH の発生に伴う出現状態については詳細に検討され、発生に伴って活性の強い線維の数が減少す

徳島市蔵本町 3-18-15 (〒 770)

る筋と、増加する筋とがあることが指摘されている¹⁻⁹⁾。これに反して、咀嚼筋の発生に伴う筋組織の細胞構築の変化についての研究は意外に少なく、ラットの咬筋においては、わずかに Hiraiwa (1978)¹⁰⁾、前田ら(1978)¹¹⁾等が発生に伴う筋線維の分化をコハク酸脱水素酵素 (SDH) 染色法に

よって研究している報告があげられるのに過ぎない。しかしながら、氏らの研究は咬筋を構成している筋束の如何や同一筋束内での1次筋束間の差異については検討していない。筆者ら¹²⁾¹³⁾は、さに成熟ラット咬筋の細胞構築状態をSDHによる組織化学的方法によって検討して、各種筋線維の出現状態が筋の部位(起始、筋腹、停止)や構成筋束の如何及び同一筋束内での1次筋束によってもかなりの差があることを指摘した。本報では、SDH染色法を使用して、ラットの咬筋内における各種筋線維の細胞分化や細胞構築の進行状態を胎生期から出産後の発生過程を通じて追究した。

実験材料とその方法

実験試料にはウイスター系のラットを使用した。胎令の決定は、膣垢に精子の存在を認めた日を妊娠第1日と見なした。又、出産後の日数は出産日を第1日とした。胎生18—22日の胎仔と出産後1—40日のものについて検討した。この際、胎生期から出産後25日までのものでは性別を問わず観察したが、その後のものはすべて雄個体を使用した。胎生期のものと出産後4日までのものとは咬筋を骨に付着させたままで固定したが、その後のものは筋を骨からはずした後に固定した。採取した咬筋を予め液体窒素で冷却したイソペンタン液中に投入して、30分以上放置した後に、クリオスタットで(−20°C)、10μの切片を作製し、空气中でスライドガラスに貼布した後に染色を行った。SDH染色はNachlasら(1957)¹⁴⁾の方法に従った。又、他面、ヘマトキシリン—エオシン染色を併用して組織像を比較した。SDH染色を施すと、胎生期から出産後15日までのものでは、殆どどの筋線維内のフォルマザン結晶は筋形質内にびまん性に出現した。その内、線維内に太多数のフォルマザン結晶が認められる線維(SLと略記)と微細なフォルマザン結晶のみられるもの(SS)との2種類のものに大別できた(Fig. 3)。しかしながら、出産後16日以降からは成体での所見と同様に、フォルマザン結晶が筋形質膜の直下に密集し、筋形質内にも太いフォルマザン結晶がみられる小形の細胞〔S(卅)〕と、比較的大形の細胞で、微細な結晶が網状にみられる明るい線維

〔S(+)〕及びその中間で少数のフォルマザン結晶が筋形質膜の直下に見られ、筋形質内にも中等度の太さのフォルマザン結晶が見られるもの〔S(++)〕の3種類の筋線維が識別されるようになり、その後ではその数を漸増して、23日以降では大部分の筋線維がS(卅)、S(++), S(+)形へと分化してきた(Fig. 3)。従って、生後16日までのものではoxidative indexのかわりにSL index = [(SL/whole fibers) × 100] 値を、又、23日以降のものではoxidative index (OI) (Bottermanら1978)¹⁵⁾とS index (SI) (Katsuraら1980; 1981)¹²⁾¹³⁾を使用することにした。又、咬筋におけるこれらの値は筋の部位によって差異があることが知られたので(Katsuraら1980)¹²⁾¹³⁾、今回の実験では比較的部位差の少ない筋腹部で、しかも比較的類似した横断像を示す部位を選んで比較検討することにした。

実験成績

1. 胎生期の所見

胎生期の咬筋の組織は未分化で、遊離した筋系の細胞が大部分であったが、所々では数ケの筋系の細胞が集合している場所も見出された(Fig. 3)。これらの細胞はヘマトキシリン—エオシン染色によると筋管細胞が大部分であったが、それ以外に筋原細胞もかなり多数存在していた。又、それら以外の結合組織内の細胞も見出された。しかしながら、SDH染色を行うと筋系の細胞以外のものでは著明なフォルマザン結晶の出現が見られなかった。筋系の細胞とその他の細胞との識別は容易であった。又、筋管細胞のなかでも未分化なものではフォルマザン結晶の出現の少ないものが存在した。従って、本実験では明らかにフォルマザン結晶が見出されるまでに分化を進めている筋管細胞や筋線維についてのみ測定することにした。

この期の筋管細胞の大部分のものはSS型であったが、SL細胞もすでに少数ながら混在していた(Fig. 3)。しかし胎生19日になるとSSおよびSL細胞はともに増数するとともに増大し、フォルマザン結晶も増加してきた。又、SL indexには高値を示す場所と低値を示す場所とが識別された(Fig. 1)。さらに、胎生22日になると、成熟個

Fig. 1 Changes in the average SL index values in different regions of rat masseter muscle during postnatal development.

Fig. 2 Changes in the average oxidative index (OI) and S index (SI) values in different regions of rat masseter during postnatal development.

体で見出された浅層筋、深層筋、最深層筋の原基と考えられる筋束が識別できるようになった。この期のものでは1次筋束の形成は未だ行なわれていなかったが、成熟個体と同様に、最深層筋の原基に一致する部分ではSL indexが最も高く、浅層筋や深層筋の原基の部分では著しく低値を示し

ていた。

2. 出産後の所見

1) 第1日目の所見

最深層筋原基の部分では筋組織の分化がおそく、大部分の筋系の細胞は単離していたが、この部分のSL indexは最も高かった(40)。これに反し

Fig. 3 Photomicrographs showing progress of cellular differentiation stained with SDH. a-d: showing two muscle fiber types: SL (↗) and SS (↖). a: on day 1 after birth. $\times 900$, b: on day 4 after birth, region A. $\times 450$, c: on day 4 after birth, region B. $\times 450$, d: on day 6. $\times 450$. e-f: showing transition of muscle fibers from SS and SL types to S (#), S(+) and S(+) types (adult types). e: on day 23 after birth, region A. $\times 450$, f: on day 23 after birth, region B. $\times 450$, S (#): (↗), S(+): (↗), S(+): (↗).

て、浅層筋や深層筋の原基の部分では筋系の細胞が集団を形成し、網目状に配列して、不完全ながら1次筋束を構成している場所も見出された。この部分における筋管細胞や筋線維の大部分はSS型で、SL細胞は少数散在するのに過ぎず、SL indexも低値(5)を示すものが少数の筋束で見られるのに過ぎなかった(Fig. 1, 4)。

2) 第2日—23日までの所見

第2日以降ではSS, SL細胞ともに増数、増大して、内筋周膜を構成する結合織の分化も著明になり、漸次1次筋束、2次筋束の区域も明瞭になり、成体組織に類似してきた。しかしながら、この間においても最深層筋の組織形成は最も遅れていた。又、浅層筋や深層筋内でも、SL細胞が増数し

てきたが、これらのものは筋束の周辺部で増数を示すものが多かった。又、4—9日のものでは最深層筋内のSLは著しい増加を示し、他の部との差異が増大するばかりでなく、浅層筋と深層筋内のSL indexの差も著明になってきた。しかしながら、その後から16日へかけて浅層筋、深層筋内におけるSL indexはともに増加を示し、筋束間の差は少なくなってきた(Fig. 1)。又、各筋束内での1次筋束間のSL indexの差は生後1日では少なかったが、4—9日の間では大きくなり、16日になると再び減少してきた(Fig. 4)。又、16日以降の筋線維内ではフォルマザン結晶が筋形質膜の直下へ移動を示す筋線維の数が漸増するようになり、既述のような成体型に類似してきた(Fig. 3)。

Fig. 4 Percentage distribution of arbitrary primary fasciculi with different SL index values during postnatal development.

3. 第23日以降の所見

既述のように、生後23日以降の筋線維ではS(卅), S(十), S(+)線維の識別が可能になったが(Fig. 3), 23—40日の間のものでは、S(卅)でありながら他の細胞よりは小形でないものや、又、筋形質膜直下のフォルマザンの密集度の低いものもあり、又、S(+)でも大形を示さず、S(十)との中間型を示すものがあり、S(卅)とS(十), S(十)とS(+)との識別が困難な線維がかなりの頻度で見出された。OIは各期を通じて最深層筋では最も高値を示し、浅層筋がこれにつぎ、深層筋では最も低値を示した(Fig. 2)。これに反して、SIは最深層筋と浅層筋での差は少なく、深層筋だけが低値を示していた。又、各筋束ともに25日以降におけるSIの変動はOIより少なかった(Fig. 2)。又、各筋束内における1次筋束単位のOIやSIをみると(Fig. 5)、高値を示す筋束の出現率が増加

したが、この傾向は最深層筋で最も著明で、浅層筋がこれにつぎ、深層筋では最も低かった。又、各筋束内での1次筋束間のOIやSIの分散範囲も漸次狭くなってきた(Fig. 5)。さらに40日以降では筋線維の分化も進み、S(卅)も小形化し、S(+)も大形化するとともに淡染性になり、S(卅), S(十), S(+)の識別は容易になってきた。

考 察

筆者ら^{12) 13)}はさきにラットの咬筋の深層筋内にSDH活性の高い1次筋束が集合している筋束が存在することを見出し、最深層筋と命名した¹²⁾。又、成熟個体では咬筋を構成している筋束のなかでも、OIやSI等の平均値は最深層筋で最も高く、浅層筋がこれにつぎ、深層筋では最低値を示すことも指摘した。本実験成績からすると、これらの組織化学的にみられる細胞構築パターンは胎

Fig. 5 Percentage distribution of arbitrary primary fasciculi with different OI and SI values during postnatal development.

生22日からすでに成熟個体での最深層筋の原基に一致して SL index の高い筋束が分化しており、出産後4日になると SL index の最深層筋、浅層筋、深層筋の各筋束間の差が成熟個体と同様に出現することを見出した。しかしながら、このような筋束間に差の出現する機構は不明である。次に筋線維の形態分化をみると、いずれの筋束の原基においても胎生期においては SS 型の細胞が大部分であったが、生後の日数の増加に伴って SS 及び SL 細胞ともに増数し、骨膜や腱表面における筋線維の新造も加わって SL index は増加してきた。この際、SL index の増加速度には筋束間で差がみられ、最深層筋では最も早かった。又、16日以降からは筋形質内でのフォルマザンの分布状態に変化が見え始め、特に筋形質膜直下へのフォルマザンの集合の見られる筋線維が漸増し、S(卅), S(十), S(+)に識別できる線維の数が増

加してきた。この分化速度も又、最深層筋では最も早く、浅層筋がこれについていた。さらに、23日になると大部分の筋線維は成体型になった。従って、筋線維の分化の進行は、まず SS, SL 型になり、ついで成体型の S(卅), S(十), S(+)へと分化を進めるものと思われる。この際、SS から SL へ、又、SS から S(+)或は S(十)へ、SL から S(卅)或は S(十)への転換の可能性が推測されるが、それらの転換機構は不明である。筆者らは SS と SL 細胞との融合を推測させるような像を認めているので、細胞融合による転換の可能性も否定できないように思われる。又、SL index の増加の一部には新生される筋線維に SL 型の細胞が多いことも無視できないように思われる。Hi-raiwa (1978)¹⁰⁾ はラットの咬筋の発生に伴う形態分化を SDH 染色で観察して、胎生期から生後5—10日の間ではフォルマザンの出現状態には筋細

胞間に差異はみとめられず、5-10日後から小数の dense granule を持つものと持たないものとが区別されるようになり、11-20日になると濃染するものと淡染するものの2種類のものが見られるようになり、30日後では成体と同様に濃染(red)と淡染(white)性の2種の筋線維から構成されるようになり、中間型を欠くことを報告している。又、前田ら(1978)¹¹⁾はラット(SD系)の咬筋の浅層部の発生に伴う筋線維の分化を同じくSDH染色で追究して、生後10日までのものでは活性が低いものばかりであるが、15日後からは強いものと弱いものの2種類の線維が識別できるようになり、15-20日後からは筋形質膜の直下にフォルマザンの結晶がみられるものが識別されるようになり、30日後からは成体型と略々同様に濃染するものと淡染するものの2種類の線維が見られるようになることを報告している。筆者らの本実験所見は、氏らの所見と一部では軌を一にしていたが、筆者らが胎生期からすでにSSとSL型の細胞が見られることを指摘している点や、16-23日と比較的早期から成体型の筋線維へ分化することを指摘している点ではやや意見を異にしていた。恐らくは判定規準が主観的に行なわれることによるものと推測される。又、筆者らは各筋束間及び同一筋束内での1次筋束間でも筋線維の分化の進展状

態やOIやSIとSL index値に差があることを見出したが、この所見は細胞ならびに組織分化が筋束単位に、又さらに1次筋束単位に調整されている可能性を示しているものと思われる。しかしながら、これらの差の出現機構も又不明である。哺乳類の骨格筋でも動物の種類や筋の種類によって異なるが、発生に伴ってmyosin ATPase活性の強い筋線維が減少するものと、反対に増加するものがあることが報告されている。又、SDH染色によっても、最初はすべて濃染性であるが、発生に伴って淡染性のものが増加するものやその逆のものが存在することが指摘されている¹⁻⁹⁾。これらの所見が発生に伴って筋線維の種類に転換が起るとする点では筆者らの所見と軌を一にしていた。このような転換の起る原因として、神経支配の影響が大きいことを指摘する報告や^{5) 16-17)}、多重神経支配から単一神経支配への転換¹⁸⁻²⁴⁾によるとする説が報告されているが、これら以外に遺伝子レベルで既に決定されているのか、或は生後に受ける種々な要因によって順次決定されて行くのか等については今後の研究にまたなければならない。

稿を終えるにあたり、研究の遂行に御尽力をいただいた徳島大学歯学部稲住修次技官に感謝いたします。

抄録：ラットの咬筋の発生に伴う筋線維の分化と筋組織の細胞構築状態の推移をSDH染色法によって検討した。生後16日までの筋管細胞や筋線維では比較的大いフォルマザン結晶が筋形質内にびまん性に存在する型(SL)と微細なフォルマザン結晶が存在するもの(SS)の2種類に大別された。その後、16日以降からは成体型に移行する線維が漸増し、23日以降では殆んどすべての筋線維が成体型の3種の筋線維に分化してきた。SL index = $[SL / (\text{whole fibers}) \times 100]$ は生後4-16日の間で著しく増加した。又、胎生19日から、すでにSL indexの高い場所と低い場所とが識別され、生後1日でも成体筋でみられたと同様に、最深層筋の原基に一致して高いSL indexを示す場所が見出された。又、生後4日からは最深層筋で最も高く、浅層筋がこれにつぎ、深層筋で最低値を示す成体型の細胞構築パターンが認められた。さらに23日以降になると、OIやSIの横断面上での分布パターンは成体と略々類似してきた。

文 献

- 1) CLOSE, R.: Dynamic properties of fast and slow skeletal muscles of the rat during development. *J. Physiol.*, **173**: 74-95, 1964.
- 2) CHIAKULAS, J. J. and PAULY, J. E.: A study of postnatal growth of skeletal muscle in the rat. *Anat. Rec.*, **152**: 55-61, 1965.
- 3) BROOKE, M. H., WILLIAMSON, E. and KAISER K. K.: The behavior of four fiber types in developing and reinnervated muscle. *Arch. Neurol.* (Chic.), **25**: 360-366, 1971.
- 4) KUGELBERG, E.: Adaptive transformation of rat soleus motor units during growth. Histochemistry and contraction speed. *J. Neurol. Sci.*, **27**: 269-289, 1976.
- 5) RUBINSTEIN, N. A. and KELLY, A. M.:

- Myogenic and neurogenic contributions to the development of fast and slow twitch muscles in rat. *Devel. Biol.*, **62** : 473-485, 1978.
- 6) GOLDSPIK, G. : Biochemical and physiological changes associated with the postnatal development of the biceps brachii. *Comp. Biochem. Physiol.*, **7** : 157-168, 1962.
 - 7) GOLDSPIK, G. and WARD, P. S. : Changes in rodent muscle fiber types during postnatal growth, undernutrition and exercise. *J. Physiol.*, **296** : 453-469, 1979.
 - 8) AQUIN, L. and N. BANCHERO, N. : The cytoarchitecture and capillary supply in the skeletal muscle of growing dogs. *J. Anat.*, **132** : 3, 341-356, 1981.
 - 9) KELLY, A. M. and RUBINSTEIN, N. A. : Why are fetal muscle slow? *Nature*, **288** : 20, 266-269, 1980.
 - 10) HIRAIWA, T. : Histochemical properties of masticatory muscle of growing rat and of matured mammals. *Comp. Biochem. Physiol.*, **59 A** : 231-238, 1978.
 - 11) 前田憲彦, 花井 汎 : 咀嚼器官の生後分化に関する研究. (1) 咬筋を構成する筋線維の分化. 城齒大紀要, **7**(2) : 219-222, 1978.
 - 12) 桂 茂, 石塚 寛, 松本 林, 中江良子 : ラット咬筋の細胞構築と組織形成. 解剖誌, **55**(4) : 486-487, 1980.
 - 13) KATSURA, S., ISHIZUKA, H., MATSUMOTO, H. and NAKAE, Y. : Histochemical studies on the architecture of rat masseter muscle. (投稿中), 1981.
 - 14) NACHLAS, M., TSOU, M. K., DE SOUZA, E., CHENG, C. and SELIGMAN, A. M. : Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.*, **5** : 420-436, 1957.
 - 15) BOTTERMAN, B. R., BINDER, M. D. and STUART, D. G. : Functional anatomy of the association between motor units and muscle receptors. *Amer. Zool.*, **18** : 135-152, 1978.
 - 16) KARPATI, G. M. D. and ENGEL, W. K. M. D. and BETHESDA, M. D. : Neural trophic function. A new aspect demonstrated histochemically in developing soleus muscle. *Arch. Neurol.*, **17** : 542-545, 1967.
 - 17) ENGEL, W. K. and KARPATI, G. : Impaired skeletal muscle maturation following neonatal neurectomy. *Devel. Biol.*, **17** : 713-723, 1968.
 - 18) REDFERN, P. A. : Neuromuscular transmission in new-born rats. *J. Physiol. Lond.*, **209** : 701-709, 1970.
 - 19) BAGUST, J., LEWIS, D. M. and WESTERMAN, R. A. : Polyneuronal innervation of kitten skeletal muscle. *J. Physiol.*, **229** : 241-255, 1973.
 - 20) BENNETT, M. R. and PETTIGREW, A. G. : The formation of synapses in striated muscle during development. *J. Physiol.*, **241** : 515-545, 1974.
 - 21) BROWN, M. C., JANSEN, J. K. S. and VAN ESSEN, D. : Polyneuronal innervation of skeletal muscle in new-born rats and its elimination during maturation. *J. Physiol.*, **261** : 387-422, 1976.
 - 22) RILEY, D. A. : Spontaneous elimination of nerve terminals from the end-plates of developing skeletal myofibres. *Brain Res.*, **134** : 279-285, 1977.
 - 23) GAUTHIER, G. F., LOWEY, S. and HOBBS, A. W. : Fast and slow myosin in developing muscle fibers. *Nature*, **274** : 25-29, 1978.
 - 24) BETZ, W. J., CALDWELL, J. H. and RIBCHESTER, R. R. : The size of motor units during post-natal development of rat lumbrical muscle. *J. Physiol.*, **297** : 463-478, 1979.