

# 真皮フィブロネクチン発現パターンと遊走表皮先端部形態の相関について

篠山 美香, 森口 隆彦

慢性創傷における創傷治癒遅延の1つの原因として再上皮化がうまく進行しないことがあげられる。私達は再上皮化遅延の病態を知るために、正常の再上皮化過程において重要な役割を果たすフィブロネクチン、特に遊走表皮先端部直下の真皮内フィブロネクチンに注目し、その分布について検索した。私達は1998年から2003年の間に当科で手術を施行した褥瘡7例、熱傷（急性創傷、コントロール）5例について蛍光抗体間接法を用い検討した。真皮内フィブロネクチン分布は、褥瘡の7例中2例が陰性であり、残りの5例は正常皮膚より減弱していた。真皮内フィブロネクチン分布が陰性の症例は、組織学的に遊走表皮先端部は、肥厚、鈍化あるいはやや鈍化し、僅かに延長していた。真皮内フィブロネクチン分布が減弱の症例では、遊走表皮先端部は、肥厚、やや鈍化、僅かに延長から軽度延長を呈した。熱傷では、5例中3例で真皮内フィブロネクチン分布が正常皮膚より増加しており、残りの2例は正常皮膚と同じであった。真皮内フィブロネクチン分布が増加している3症例では遊走表皮先端部は、鋭的楔状、やや鋭的楔状、鈍的楔状を示し、著明から中等度延長していた。真皮内フィブロネクチン分布が正常皮膚と同じ症例では、遊走表皮先端部は鈍的楔状で中等度延長していた。すなわち真皮内フィブロネクチン分布と遊走表皮先端部の形状ならびに延長の有無との間に関連性を認めた。このことより、真皮内フィブロネクチンの減少は褥瘡の再上皮化遅延の一要因になっていると考えられた。

(平成17年9月15日受理)

## Correlation between the expression pattern of dermal fibronectin and the morphology of migrating epidermis

Mika SHINOYAMA and Takahiko MORIGUCHI

One reason for a delay in the wound healing of chronic wounds is a failure in re-epithelialization. Fibronectin plays a role in correct re-epithelialization. Assuming that the level of fibronectin expression is related to a delay in epithelialization. We investigated the expression of fibronectin in pressure ulcers and burn wounds using the immunofluorescence technique. We examined seven cases of pressure ulcers and five cases of burns (positive control) treated in our department between 1998 and 2003. Dermal fibronectin was not detected in two of the seven cases, and in the remaining five cases, the levels of dermal fibronectin were lower than normal. Histologically, in the two former cases in which dermal fibronectin was not detected, the apical

migrating epidermis was thickened, dull-shaped or slightly dull-shaped and showed a little elongation. In the remaining five cases with lower fibronectin levels, the migrating epidermis was dull or slightly dull-shaped and had a little elongated or elongated to a short extent. In the burn cases (positive control), the level of dermal fibronectin was above normal in three of the five cases, and was normal in the remaining two cases. In the three cases with above normal levels, the apical migrating epidermis was wedge-shaped, slightly wedge-shaped or dull-wedge shaped and ranged from middle-length to long. In the remaining two cases, which had the same normal fibronectin level, the apical migrating epidermis was dull wedge-shaped and showed mid-length elongation. Our results suggested that the shape of the apical migrating epidermis was related to the dermal fibronectin level. If this is the case, a decrease in dermal fibronectin may be a contributing factor to a delay in the re-epithelialization of pressure ulcers. (Accepted on September 15, 2005) *Kawasaki Igakkaishi* 31(3):167-173, 2005

**Key Words** ① Pressure ulcer ② Fibronectin ③ Burn  
④ Re-epithelialization

## はじめに

創傷治癒の過程は、一般的に炎症期、増殖期、再構築期の3期に分けられる。

炎症期では、主に血小板や赤血球により出血に対する凝集凝固作用や活性化した血小板より血管内皮増殖因子や線維芽細胞増殖因子が放出され、局所の細胞や線維芽細胞の増殖を促進している。フィブロネクチンは活性化した血小板から産生され、マクロファージの遊走に関与している。

増殖期では新生血管の増加やコラーゲンの合成がおこり、創の収縮や上皮形成が行われる。ここで、フィブロネクチンは線維芽細胞から産生され主に表皮細胞の移動に関与する。組織学的にはコラーゲン原線維に多量に存在し遊走表皮細胞直下に多量のフィブロネクチン沈着を認める。また線維芽細胞の移動を促進させるPDGF (Platelet-derived Growth Factor) や TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) は増加する。

再構築期では細胞や細胞外基質の成熟や細胞死がおこり、フィブロネクチンは細胞の移動と増殖のためのマトリックスとなる<sup>1)~5)</sup>。これらのどの段階で異常が生じても治癒遅延がおこる。

フィブロネクチンとは1948年 Morrison らによって血液中の糖蛋白質として最初に報告された物質である<sup>6)</sup>。その種類には、血液中に存在する血漿性フィブロネクチンと細胞表面や培養液中に存在する細胞性フィブロネクチンとに分けられる。血漿性フィブロネクチンは、可溶性でその構造は分子量約235 kD と270 kD のサブユニットがC末端でS-S結合し二量体を形成している、細胞性フィブロネクチンは、血漿性フィブロネクチンの構造よりもさらに架橋され多量体となり、不溶性を示す。

正常皮膚においてフィブロネクチンは、表皮真皮接合部位基底膜、真皮乳頭層、および網状層の結合組織内、血管壁などに局在する。その機能には細胞と細胞、細胞と基質の接着、形態保持や細胞の移動、分化、貪食作用がある<sup>4),7)</sup>。また、フィブロネクチン不活化マウスは生存できず、生命に関わる重要な物質である<sup>8)</sup>。

これまでに、慢性創傷における創傷治癒遅延の病態は解明されておらず、効果的な治療に結びつくまでには至っていない。また慢性創傷において、遊走表皮先端部直下での真皮内フィブロネクチン分布について検索した報告はない。

今回私達は、慢性創傷の代表的疾患である褥瘡において遊走表皮先端部直下の真皮内フィブロネクチン分布を熱傷(急性創傷, コントロー

ル)でのそれと比較して検討した。

## 材料と方法

### 1. 対象

1998年から2003年の間に当科で手術を施行した褥瘡7例, 熱傷(急性創傷, コントロール)5例を用いた。いずれもインフォームドコンセントにより同意の得られた症例である。褥瘡症例(**Table 1**)は, 男性6例女性1例であり, 平均年齢 $56.4 \pm 23.5$ 歳, 潰瘍歴は2ヶ月から1年, 潰瘍の深達度は全例NPUAP(National Pressure Ulcer Advisory Panel)分類によるStage IVであった。また, 褥瘡症例の7例中4例に脊髄損傷を認めた。熱傷症例は(**Table 2**)の如く, 男性1例女性4例であり, 平均年齢 $60.3 \pm 18.6$ 歳, 潰瘍歴は8日から1ヶ月, 潰瘍の深達度はII度(s)-III度であった。

### 2. 方法

#### 1) 組織学的検査

組織は潰瘍部を含めた潰瘍辺縁皮膚(ulcer edge)を採取した。組織をホルマリン液(ホルムアルデヒド7.5%含有)にて固定し, パラフィン包埋標本を作製した。同標本について,  $5 \mu\text{m}$ の切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジ

ン(HE)染色を施行した。作製したHE染色標本を用いて組織学的検索を行った。

#### 2) 免疫組織化学的検査

潰瘍部組織採取直後, 組織をOCTコンパウンドに包埋し, ドライアイスアセトンを用いて凍結した。凍結標本について,  $6 \mu\text{m}$ の薄切切片を作製し, 60分間室温にて風乾後, マイクロプローブ染色装置(Fisher Scientific社)を用いて蛍光抗体間接法を行った。カゼインで30分間ブロッキングをした後, Phosphate-buffered saline(PBS)で1回洗浄し, 一次抗体Anti-Human Fibronectin(Polyclonal)(CAPPEL)で18時間( $4^\circ\text{C}$ , 暗所)反応させた。その後, PBSで3回洗浄し, 標識二次抗体FITC Anti-Rabbit IgG(CAPPEL)で30分間(室温, 暗所)反応させた。PBSで3回洗浄した後, VECTASHIELDで封入した。蛍光顕微鏡(Nikon ECLIPSE E 600)で観察し, FUJIFILM PROVIA(ISO感度400F)を用いて写真撮影を行った。

#### 3) 細菌検査

検体として, 創部に直接接していたガーゼを採取し, 当院細菌検査部で検査した。

### 3. 評価

フィブロネクチン分布は, 正常皮膚でのフィ

**Table 1.** Patient's characteristic with pressure ulcer

Case	Ulcer period	Age	Sex	Stage*	HE (ulcer edge)	FN	Degree of bacteria
1	2M	42	M	IV	肥厚、やや鈍化、僅かに延長	±	P. aeruginosa (少量) E. cloacae (少量) MRSA (+)
2	3M	59	M	IV	肥厚、やや鈍化、僅かに延長	±	E. coli (少量)
3	4M	24	M	IV	肥厚、やや鈍化、軽度延長	±	E. coli(3+) P. aeruginosa (3+)
4	4M	34	M	IV	肥厚、やや鈍化、僅かに延長	±	MRSA (少量)
5	4M	82	F	IV	肥厚、やや鈍化、僅かに延長	-	Enterococcus faecalis (少量) MRSA (1+)
6	7M	72	M	IV	肥厚、やや鈍化、軽度延長	±	MRSA (少量)
7	1Y	82	M	IV	肥厚、鈍化、僅かに延長	-	MRSA (少量)

\*NPUAP分類による

FN : Fibronectin

**Table 2.** Patient's characteristic with burn

Case	Ulcer period	Age	Sex	Depth	HE (ulcer edge)	FN	Degree of bacteria
1	8D	67	F	II s	鋭的楔状、著明に延長	2+	MRSA (1+) Enterococcus faecalis (1+)
2	13D	52	F	II d	鈍的楔状、中等度延長	+	MRSA (少量)
3	14D	80	F	III	やや鋭的楔状、中等度延長	2+	MRSA (1+)
4	24D	66	M	II d	鈍的楔状、中等度延長	2+	MRSA (少量)
5	1M	27	F	II d	鈍的楔状、中等度延長	+	MRSA (少量)

FN : Fibronectin

プロネクチン分布を (+) とし, 増強を (2+), 減弱を (±), 陰性を (-) と評価した. HE 染色所見は, 遊走表皮先端部の形状ならびに潰瘍面への延長の有無を評価した.

## 結 果

褥瘡症例では, (Table 1) の如く, 7 症例中 2 症例 (Case 5, 7) において真皮内フィブロネクチンが陰性であった (Fig. 1-c). これらの症例は, 臨床的に潰瘍の深さは筋に及ぶ皮膚全層欠損 (NPUAP 分類による Stage IV) であり, 潰瘍辺縁は急峻で, 肉芽組織は脆弱であった (Fig. 1-a). HE 染色所見は, 遊走表皮先端部が肥厚, 鈍化あるいはやや鈍化しており遊走表皮先端部は僅かに延長していた (Fig. 1-b). 残りの 5 症例 (Case 1, 2, 3, 4, 6) においては, 真皮内フィブロネクチンが減弱しており (Fig. 2-c), 臨床的に前述した 2 症例と

同様の深さであったが (NPUAP 分類, Stage IV), 潰瘍辺縁は浅くなだらかで上皮化傾向にあり, 潰瘍辺縁部まで肉芽も良好であった (Fig. 2-a). HE 染色所見では, 遊走表皮先端部は, 肥厚, やや鈍化, 僅かに延長から軽度延長を示した (Fig. 2-b). 細菌の存在については MRSA が 7 症例中 5 症例 (Case 1, 4, 5, 6, 7) に検出された.

熱傷症例では, (Table 2) の如く, 真皮内フィブロネクチンが 5 症例中 3 症例 (Case 1, 3, 4) で増強していた (Fig. 3-c). 臨床的には深達度 II s から III であった (Fig. 3-a). HE 染色所見では, 遊走表皮先端部が, 鋭的楔状で著明に延長 (Case 1), やや鋭的楔状で中等度延長 (Case 3), 鈍的楔状で中等度延長 (Case 4) (Fig. 3-b) を示した. 真皮内フィブロネクチンが正常と同じ症例 (Case 2, 5) では, 臨床的に深達度 II d であった. HE 染色所見では, 遊走表皮先端部が鈍的楔状で中等度延長し

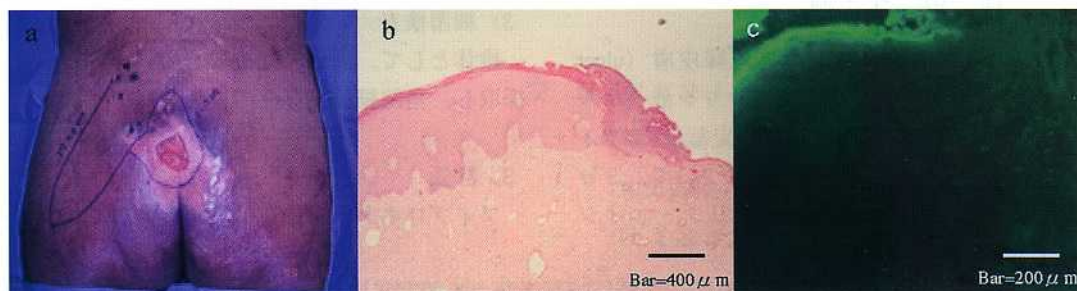


Fig. 1. a : Clinical finding. This is a sacral pressure ulcer case. The wound bed has brittle granulation.  
b : Histological finding. Thickened, dull-shaped epidermis without migrating epithelial tongue (H.E.)  
c : Immunohistochemical finding. FN was not detected in the dermis.

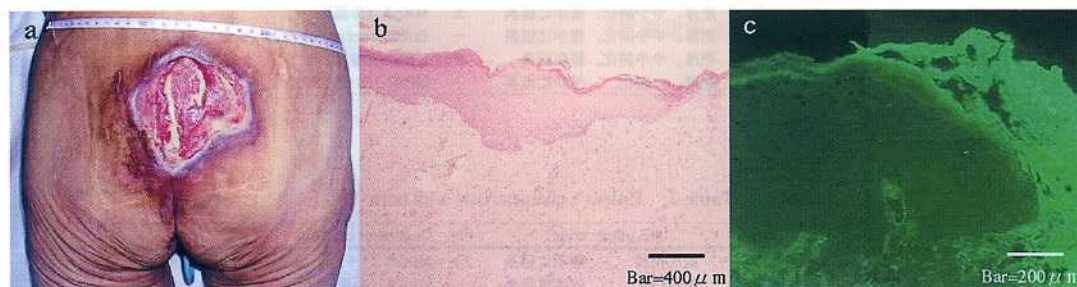
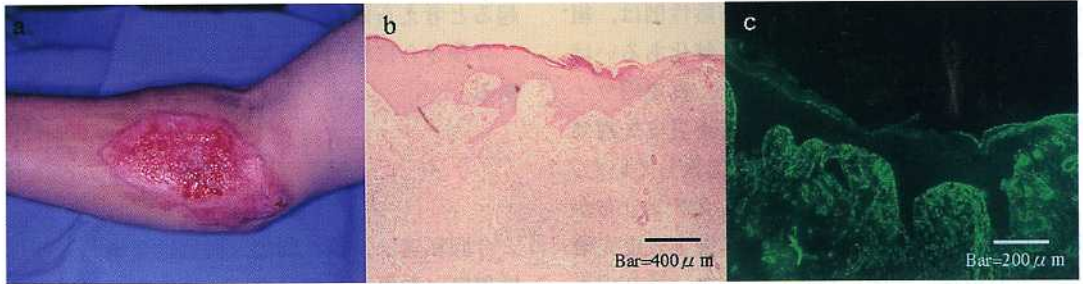


Fig. 2. a : Clinical finding. This is a sacral pressure ulcer case. The wound bed has good granulation.  
b : Histological finding. Thickened, slightly dull-shaped epidermis with a little elongation of migrating epithelial tongue (H.E.)  
c : Immunohistochemical finding. FN was found slightly in the dermis.



**Fig. 3.** a : Clinical finding. This is a rt. forearm burn case. The wound bed has good granulation and tend to epithelize.  
 b : Histological finding. Dull-wedge shaped epidermis with an elongation of migrating epithelial tongue (H.E.)  
 c : Immunohistochemical finding. FN was increased in the dermis.

ていた。全ての熱傷症例でMRSAが検出された。褥瘡、熱傷症例とも罹患期間による皮膚内フィブロネクチン分布の差は認められなかった。

## 考 察

本研究では、脊髄損傷患者4例を含む褥瘡患者の真皮内フィブロネクチン分布は、全症例で減弱ならびに陰性であった。再上皮化がおこっていない褥瘡は真皮内フィブロネクチンが陰性であり、再上皮化が少しでもおこっているものは真皮内フィブロネクチンが正常より減弱していたが陰性ではなかった。このことは、Herickらの結果と類似していた<sup>9)</sup>。原因として、同部への血漿性フィブロネクチン滲出の減少ならびに陰性化の可能性、局所でのフィブロネクチン産生の減少の可能性、プロテアーゼ<sup>10)</sup>やエラスターゼ<sup>11)</sup>によるフィブロネクチン分解の亢進の可能性などが考えられる。これまでに脊髄損傷患者の褥瘡の皮膚内フィブロネクチン減少の報告はあるが<sup>12)</sup>皮膚内の局在や動向については記載されていない。またCruse<sup>12)</sup>らは、対象が脊髄損傷患者だけであるが、私達の研究は脊髄損傷患者に加えて脊髄損傷のない症例も加えた。その結果、真皮内フィブロネクチン分布は全症例で陰性化あるいは減弱していた。したがって本研究は、脊髄損傷患者と特定しておらず有用な研究と考えられた。また浸出液中の血漿性フィブロネクチンについても一定の結果は

出ていない<sup>13)~15)</sup>。しかし再上皮化傾向にある症例は、再上皮化傾向にない症例に比べて血液中血漿性フィブロネクチンが高いのではないかと推測した。

熱傷では、皮膚内および血液中フィブロネクチンの上昇が創傷治癒に大きく影響を与え<sup>16)</sup>ラット化学熱傷モデルでは皮膚内フィブロネクチンは増加していた<sup>17)</sup>。またその動向は、病状の経過を予想できる<sup>18), 19)</sup>。本研究の結果からも肉眼的および組織学的に再上皮化が進行しているものほど、フィブロネクチンの組織内沈着は増加していた。著者らは、慢性創傷でも創傷環境が顕著な改善傾向にある場合、フィブロネクチンの組織内分布は正常より増加しているのではないかと考えている。すなわち真皮内フィブロネクチン分布は、再上皮化と相関関係にあるのではないかと考えた。

血液中血漿性フィブロネクチンについてはフィブロネクチンmRNAの検索が、慢性創傷の代表的疾患であり褥瘡と並んで用いられる下腿静脈うっ滞性潰瘍で行われ、フィブロネクチンmRNAは増加していたという興味深い報告がなされた<sup>20)</sup>。褥瘡でも同様の所見が認められるのではないかと筆者は推測する。もしそうであれば再上皮化遅延がおこる原因に、フィブロネクチンの分解が強いかわるいは、フィブロネクチンレセプターが機能していないことが考えられる。

また、HE染色所見で示された遊走表皮先端部の形状や延長の有無を観察した結果、褥瘡症

例の真皮内フィブロネクチン分布陰性例は、組織学的に遊走表皮先端部が肥厚、鈍化あるいはやや鈍化し、僅かに延長していた。真皮内フィブロネクチン分布減弱例では、遊走表皮先端部が肥厚、やや鈍化、僅かから軽度延長していた。また熱傷症例の真皮内フィブロネクチン分布が増加している1症例については、遊走表皮先端部が鋭的楔状、著明に延長していた。残りの真皮内フィブロネクチン分布増加例は、遊走表皮先端部がやや鋭的楔状から鈍的楔状、中等度延長していた。このように真皮内フィブロネクチン分布と遊走表皮先端部の形状ならびに延長の有無との間に関連性を認めた。

褥瘡および熱傷の全ての症例に何らかの細菌を確認した。重症感染合併例では、血液中血漿性フィブロネクチンが減少しており<sup>16), 18)</sup>、細菌が放出する蛋白分解酵素による炎症の持続やフィブロネクチン分解の亢進により治癒遅延が

起ると考えられた<sup>5), 14)</sup>。

今後さらに症例数を増やして検討する必要がある。

## 結 語

今回私達は、慢性創傷（褥瘡）7例および急性創傷（熱傷）5例について真皮内フィブロネクチン分布を観察した。褥瘡部遊走表皮先端部直下の真皮内フィブロネクチン分布は全症例で減弱ならびに陰性化していた。このことが、褥瘡の再上皮化の遅延をきたす一要因になっていると考えられた。

なお本論文の一部は第45回日本形成外科学会中国・四国支部学術集会（於：岡山市）において口頭発表した。

## 文 献

- 1) Bryant RA : Acute & Chronic wounds. nursing management. 2th ed, USA, Mosby, 2000, pp 17-39
- 2) Norris DA, Clark RAF, Swigart LH : Fibronectin fragment(s) are chemotactic for human peripheral blood monocyte. *J Immunol* 129 : 1612-1618, 1982
- 3) 久保美代子, 森口隆彦 : きれいな傷あとと形成のための創傷治癒の促進機序. *形成外科* 42 : S5-13, 1999
- 4) 久保美代子 : フィブロネクチン皮膚臨床28 特 : 26 : 1169-1178, 1986
- 5) 森口隆彦 : 創傷の治療. 最近の進歩. 第二版. 東京. 克誠堂出版株式会社, 2002, pp3-10
- 6) Morrison PR, Edsall JT, Miller SG : Preparation and Properties of serum and plasma protein. X VIII. The separation of purified fibrinogen from fraction I of human plasma. *J Am Chem* 70 : 3103-3108
- 7) 長田浩行, 植木宏明, 森口隆彦, 谷太三郎 : 肉芽組織, 肥厚性癬痕および成熟癬痕におけるフィブロネクチンの局在. *日形会誌* 4 : 151-158, 1984
- 8) George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-king, Rayburn H, Hynes RO : Effects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119 : 1079-1091, 1993
- 9) Herrick SE, Sloan P, McGurk M, Freak L, McCollum CN, McCollum MW, Ferguson J : Sequential Changes in Histologic Pattern and Extracellular Matrix Deposition During the Healing of Chronic Venous Ulcers : *Am J Pathol* 141 : 1085-1095, 1992
- 10) Schmidtchen A : Degradation of antiproteases, complement and fibronectin in chronic leg ulcer. *Acta Derm Venereol* 80 : 179-184, 2000
- 11) Herrick S, Ashcroft G, Ireland G, Horan M, McCollum C, Ferguson M : Up-regulation of elastase in acute wounds of healthy aged humans and chronic venous leg ulcers are associated with matrix degradation. *Lab Invest* 77 : 281-288, 1997
- 12) Cruse JM, Wang H, Lewis RE, Cespedes J, Morrison III RS, Lineaweaver WC, Dilioglou S : Cellular and molecular alterations in spinal cord injury patients with pressure ulcer : A Preliminary Report. *Exp Mol Pathol* 72 : 124-131,

2002

- 13) Annette B, Wysocki G, Frederick G : Fibronectin profiles in normal and chronic wound fluid. *Lab Invest* 63 : 825 - 831, 1990.
- 14) Harris IR, Yee KC, Walters CE, Cunliffe WJ, Kearney JN, Wood EJ, Ingham E : Cytokine and protease level in healing and non-healing chronic venous leg ulcers. *Exp Dermatol* 4 : 342 - 349, 1995
- 15) Nosratola DV, Ibrahim EI, Emma G, Robert LW, Haison P, Tri DB, Samireh S : Pressure ulcer, fibronectin, and related proteins in spinal cord injured patients. *Arch Phys Med Rehabil* 73 : 803 - 806, 1992
- 16) Eriksen HO, Kalaja E, Jensen BA, Clemmensen I : Plasma fibronectin concentration in patients with severe burn injury. *Burns Include Therm Inj* 10 : 422 - 426, 1984
- 17) Saika S, Kobata S, Hashizume N, Okada Y, Yamanaka O : Epithelial basement membrane in alkali-burned corneas in rats. *Cornea* 12 : 383 - 390, 1993
- 18) Dolynchuk KN : Plasma fibronectin level as predictive of survival in major thermal injury. *Burns* 17 : 185 - 187, 1991
- 19) Eriksen H, Clemmensen I, Hansen M : Plasma fibronectin concentration in normal subjects. *Scand. J. Lab. Invest* 42 : 291 - 295, 1982
- 20) Ongenaes KC, Phillips TJ, Park HY : Level of fibronectin mRNA is markedly increased in human chronic wounds. *Dermatol Surg* 26 (5) : 447 - 451, 2000