

総 説

アトピー性皮膚炎患者における *Malassezia* の菌相と その遺伝子多型の解析

杉 田 隆¹ 西 川 朱 實²

¹ 明治薬科大学微生物学教室

² 明治薬科大学免疫生物学教室

要 旨

Malassezia のアトピー性皮膚炎 (AD) への関与を明らかにするには、まず AD 患者における菌相を明らかにすることが不可欠である。*Malassezia* の分離・培養は一般に容易でないことから、正確な菌相を明らかにすることは困難であった。著者らは、分離・培養技術に依存しない非培養法である PCR-based non-culturable method を新たに開発し、AD 患者および健常人のいずれにおいても *M. globosa* が最も高頻度で定着していることを明らかにした。さらに、*M. globosa* の IGS (intergenic spacer) 領域には多型が存在し、AD 患者と健常人由来の *M. globosa* の IGS 配列は異なっていた。従って、AD の増悪には特定の遺伝子型を有する *M. globosa* が最も重要な役割を演じていると考えられる。

Key words: アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis), マラセチア グロボーサ (*Malassezia globosa*), 菌相 (microflora), IGS (intergenic spacer), SSR (short sequence repeat)

はじめに

Malassezia が、癬風、毛包炎や脂漏性皮膚炎を引き起こすことは古くから知られているが、近年では、本菌とアトピー性皮膚炎 (AD) の関連性も大いに注目されてきている¹⁾。すなわち、AD 患者の血清中に抗 *Malassezia* 特異 IgE 抗体が産生されることから *Malassezia* は AD における trigger factor の一つであると考えられている^{2,3)}。本稿では、AD 患者に定着する *Malassezia* の菌相および多様性解析を行なうことで、*Malassezia* の AD への関与について論じた。

Malassezia の分類

1) 分類の変遷^{4,5)} 後述するアトピー性皮膚炎 (AD) 患者皮膚の菌相解析には、*Malassezia* の分類の進歩が大きく寄与している。現在の分類は、1996年にパスツール研の Guého らの提案に基づいているが、長い間、*Malassezia* の分類は混乱していた。その原因は2つ考えられる。第一に、*Malassezia* 属と *Pityrosporum* 属との関係である。*Malassezia* の分類学的研究は、1846年に Eichstedt が癬風患者から酵母細胞を分離したことから始まる。後の1853年に Robin によりこの分離株に対して種名 *Microsporum furfur* が与えられたが、さらに1889年に Baillon により *Malassezia* 属に移行された。一方、癬風に関連する菌種として *Pityrosporum* も記載されたが、当時は酵母型を示

す菌株は *Malassezia* 属に、菌糸型は *Pityrosporum* 属に分類されていた。1980年代まで、属名 *Pityrosporum* も用いられていたが、両属は分類学的に同一であること、また属名の優先権は *Malassezia* にあることから、現在では *Pityrosporum* 属は *Malassezia* 属に統合されている。第二に、*M. furfur* の不均一性 (heterogeneity) の問題である。*M. furfur* が複数の菌種から構成されていることは以前から示唆されていたが、Guého らの DNA-DNA 交雑実験および rRNA 遺伝子の塩基配列の解析結果から、本菌は5菌種に細分類された。この様な分類学的変遷を経て、1996年に現行の分類体系が構築された。

2) 現在の分類^{5,6)} 本属には、増殖に脂質を要求する6菌種と脂質非要求性の *M. pachydermatis* を加えた7菌種が存在していたが、最近、著者らは、本邦の AD 患者から新しい菌種、*M. dermatis* を分離・記載したため、現在では8菌種が存在することになる。Fig. 1に8菌種を系統樹として示した。系統学的には、*Malassezia* 属は、担子菌系不完全酵母に属する。Cryptococcus や Trichosporon も担子菌系酵母であるが、これらの菌種が菌茸綱 (class hymenomycetes) に属するのに対して、*Malassezia* はクロボキン綱 (class ustilaginomycetes) に属することから系統的には遠い距離に位置している。

アトピー性皮膚炎患者皮膚の菌相解析

1) 非培養法による菌相解析 新分類に基づいた AD 患者皮膚の菌相解析は、これまでいくつか報告されているが、その結果は研究者間で様々である⁷⁻¹⁰⁾。これは培養手法の差に起因していると考えられたので、培養に

別刷請求先: 杉田 隆

〒204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1
明治薬科大学微生物学教室

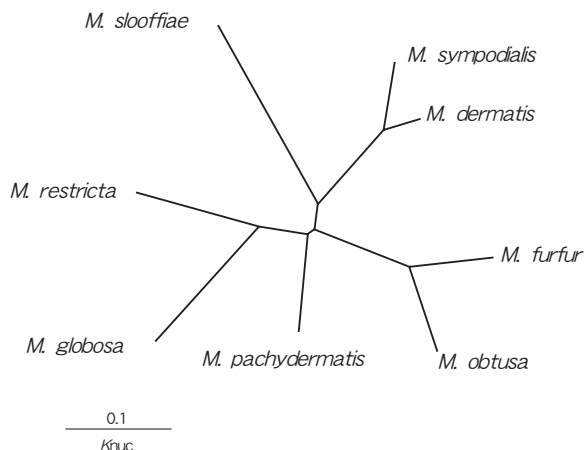


Fig. 1. Molecular phylogenetic trees constructed using the ITS1 sequences of members of the genus *Malassezia*. K1nuc, Kimura's parameter.

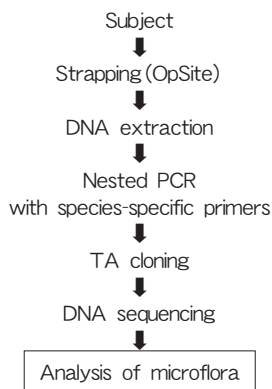


Fig. 2. Method of analyzing the *Malassezia* microflora.

よらない解析法である PCR-based non-culturable method を適応することとした¹¹⁾。概略を Fig. 2 に示す。被験者の皮膚（皮疹部および無疹部）に OpSite を貼付し、そこから直接真菌 DNA を抽出する。次に rRNA 遺伝子の IGS (intergenic spacer) あるいは ITS (internal transcribed spacer) 領域に設計した種特異的プライマーを用いて PCR を行う。皮膚由来の材料を対象として nested PCR を行う場合、他の真菌、細菌あるいは環境雑菌由来の DNA の混入によりキメラ分子の生成の可能性が考えられる。そこで PCR 産物を、TA クローニング後、DNA 塩基配列を決定することにより種レベルでの正確な同定を行った。本法は、30 例程の菌相解析でも PCR の述べ回数は数千回を超える極めて煩雑な手法ではあるが、正確に菌相を解析するためには現時点で考える最良の方法である。独立した 2 施設で実施した AD 患者の菌相解析では、*M. slooffiae*、*M. obtusa* の検出率で施設間に差異はあるが、全体としては類似した結果である。すなわち、*M. globosa* および *M. restricta* は、90% 以上の検出率であり、他の 6 菌種はほとんど 50% 以下である (Fig. 3)。皮疹部と無疹部間、部位（四肢、体幹、顔面等）別、あるいは IgE 抗体値による菌相の大きな差異は認められな

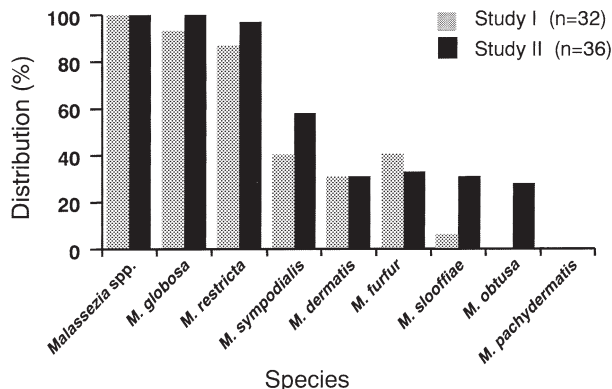


Fig. 3. *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients. The study was conducted in two university hospitals.

かった。なお、*M. dermatitis* は、著者らが日本人 AD 患者皮膚から分離した新しい菌種であるが、おおよそ 30% 程度の検出率であった。言い換えると本邦の AD 患者の 3 人に 1 人は、本菌が定着していることになる。現在のところ、本邦での分離例しか報告はないが、本菌は日本人特異的か、あるいは世界的に分布している菌種かは興味のあるところである。

2) 定量解析 菌相解析の結果から、90% 以上の AD 患者から *M. globosa* と *M. restricta* が検出されたことから、これら 2 菌種が最も重要な菌種であると考えられる。しかしながら、皮膚に定着している菌量についても考慮する必要がある。そこで、次に、患者皮膚に定着する *M. globosa* と *M. restricta* の菌量を real time PCR で定量した。皮疹部および無疹部間、また部位によっても *M. globosa* の方が *M. restricta* よりも約 5 ~ 20 倍以上の菌量であった。

以上の菌相解析および定量解析の結果から、AD の増悪には *M. globosa* が最も重要な役割を演じていると考えられる。

Malassezia globosa の遺伝子多型の解析

M. globosa は AD 患者のみならず、健康人皮膚からも高頻度で検出されるため、両者由来の *M. globosa* の多様性について検討した。

1) *M. globosa* rRNA 遺伝子 rRNA 遺伝子の全 DNA 塩基配列を解析したところ、約 8,000 bp であった。これは、*Candida albicans* の 12,000 bp より短い *Cryptococcus neoformans* や *Trichosporon asahii* とはほぼ同じ長さである。26S と 5S の間に位置する IGS (intergenic spacer) 1 領域に (CT)_n および (GT)_n の SSR (short sequence repeat) 配列が存在した。これは、著者らが解析した限りでは他の *Malassezia* spp. には存在しない興味深い配列である。

2) AD 患者および健康人由来の *M. globosa* IGS1 配列 AD 患者および健康人由来 *M. globosa* IGS1 配列の代表的なアライメントを Fig. 4 に示す。(CT)_n、(GT)_n 以外の配列は両者でほとんど変わらないのに対して、SSR に著しい差異が認められた。特にこの差異は CT2 と示

	<u>CT1</u>
Sequence 1	GCTTTCGAGTGCATACCACACTCGAGCGCTTCTCTCTCTCTCTCTCTGTGAGCGAGGCAA
Sequence 2	GCTTTCGAGTGCATACCACACTCGAGCGCTTCTCTCTCTCTCTCTCT--GTGAGCGAGGCAA
Sequence 3	GCTTTCGAGTGCATACCACACTCGAGCGCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCT-----GTGAGCGAGGCAA

Sequence 1	TGGAGGTGTGTACTCCAACACACACCATCGCCCCAGGTACAGCCAATGGAGGTGTGTGTGT
Sequence 2	TGGAGGTGTGTACTCCAACACACACCATCGCCCCAGGTACAGCCAATGGAGGTGTGTGTGT
Sequence 3	TGGAGGTGTGTACTCCAACACACACCATCGCCCCAGGTACAGCCAATGGAGGTGTGTGTGT

Sequence 1	G--CGCACTCCGGTTCGGCTCTCTCTCTCGTACGCTTGGCTTTGGATTCTCTCTACATAC
Sequence 2	GTGCGCACTCCGGTTCGGCTCTCTCTCTCGTACGCTTGGCTTTGGATTCTCTCTACATAC
Sequence 3	G--CGCACTCCGGTTCGGCTCTCTCTCTCGTACGCTTGGCTTTGGATTCTCTCTACATAC
	* *****
Sequence 1	GTACTTACTTTCATAGAGTGTATGTTGATTCAATCTATCCGCTGTCAAAGAATCGTCCG
Sequence 2	GTACTTACTTTCATAGAGTGTATGTTGATTCAATCTATCCGCTGTCAAAGAATCGTCCG
Sequence 3	GTACTTACTTTCATAGAGTGTATGTTGATTCAATCTATCCGCTGTCAAAGAATCGTCCG

	<u>GT</u> <u>CT2</u>
Sequence 1	TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGGATATATGTCTCTCTCTCTCTCTCTTCTCCCTCAAAT
Sequence 2	TGTGTGTGTGTGTGTGTGT--GGATCTATGTCTCTCTCTCT-----TCTCCCTCAAAT
Sequence 3	TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGGATCTATGTCTCTCTCTCTCTCT-----TCTCCCTCAAAT

Sequence 1	GGAGGTGTGTGTGCACCCTCACCCCTCGCCCTCGCTCATCCCTCCTTTCATCCATTCCCTTT
Sequence 2	GGAGGTGTGTGTGCACCCTCACCCCTCGCCCTCGCTCATCCCTCCTTTCATCCATTCCCTTT
Sequence 3	GGAGGTGTGTGTGCACCCTCACCCCTCGCCCTCGCTCATCCCTCCTTTCATCCATTCCCTTT

Fig. 4. Alignment of representative DNA sequences of the IGS 1 region of *M. globosa*.

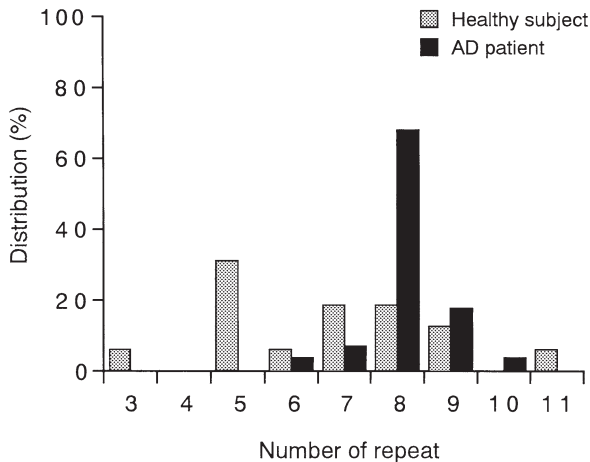


Fig. 5. Number of repeat CT sequences in *M. globosa* IGS1 from AD patients and healthy subjects.

した箇所に顕著であった。この領域は、CTが3~11回繰り返されているが、AD由来の*M. globosa*はn=8が全体の約70%をしめているのに対して、健康人は3~11に広く分布していた (Fig. 5)。この差異はIGS領域全体の類似度にも表れている。すなわち、AD患者間の類似度が約95%であるのに対して、健康人間では約90%を示し健康人由来の*M. globosa*の方が多様化していた。全DNA塩基配列を用いて分子系統樹を作成したが、AD患者と健康人はそれぞれ独立したクラスターを形成した。このことは、*M. globosa*はAD患者および健康人のいずれにも高頻度で定着しているが、その遺伝子型は異なることを意味している。つまり特定の遺伝子型を有する菌株がADの増悪に関与している可能性が考えられる。

おわりに

AD患者皮膚における*Malassezia*の菌相解析は、*Malassezia*の分類の混乱、また培養・分離の困難さから、長い間不十分な状態であったが、従来にない非培養法を適用したことにより、初めてその菌相が明らかにされた。検出率の高かった*M. globosa*や*M. restricta*も従来は*M. furfur*のシノニムとして取り扱われてきた菌種であるため、いかに分類の進歩が菌相の解明に寄与したかは言うまでもないことである。今後、*Malassezia*に起因するADの病態あるいは治療等の検討に際しては、この菌相の解析結果を考慮する必要があると考えられる。さらに、非培養法はADのみならず、脂漏性皮膚炎等の他の皮膚疾患の菌相解析にも十分に応用可能である。

本研究は、順天堂大学皮膚科学講座小川秀興教授ならびに東京医科大学皮膚科学教室坪井良治教授との共同研究により行なわれたものであり、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) Ashbee HR, Evans EG: Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. Clin Microbiol Rev 15: 21-57, 2002.
- 2) Crespo Erchiga V, Delgado Florencio V: *Malassezia* species in skin diseases. Curr Opin Infect Dis 15: 133-142, 2002.
- 3) Scheynius A, Johansson C, Buentke E, Zargari A, Linder MT: Atopic eczema/dermatitis syndrome and *Malassezia*. Int Arch Allergy Immunol 127: 161-169, 2002.
- 4) Slooff WC: Genus 6. *Pityrosporum* Sabouraud. In The

- Yeasts, A Taxonomic Study (Lodder J ed), p.1167-1186, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1970.
- 5) Guého E, Midgley G, Guillot J: The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek* **69**: 337-355, 1996.
 - 6) Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Nishikawa A: New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J Clin Microbiol* **40**: 1363-1367, 2002.
 - 7) Faergemann J: Atopic Dermatitis and Fungi. *Clin Microbiol Rev* **15**: 545-563, 2002.
 - 8) Arzumian VG: The yeast *Malassezia* on the skin of healthy individuals and patients with atopic dermatitis. *Vestn Ross Akad Med Nauk* **2**: 29-31, 2001.
 - 9) Gupta AK, Kohli Y, Summerbell RC, Faergemann J: Quantitative culture of *Malassezia* species from different body sites of individuals with or without dermatoses. *Med Mycol* **39**: 243-251, 2001.
 - 10) Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J: Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Med Mycol* **38**: 337-341, 2000.
 - 11) Sugita T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Shinoda T, Nishikawa A: Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. *J Clin Microbiol* **39**: 3486-3490, 2001.

Molecular and Quantitative Analyses of *Malassezia* Microflora on the Skin of Atopic Dermatitis Patients and Genotyping of *M. globosa* DNA

Takashi Sugita¹, Akemi Nishikawa²

¹Department of Microbiology, ²Department of Immunobiology, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588

To elucidate the role of *Malassezia* species in atopic dermatitis (AD) requires investigation of the *Malassezia* microflora on the skin of AD patients. Previously, *M. furfur* was considered the dominant species in the microflora, however, this microorganism has been reclassified into five species and reanalysis of the microflora based on the current *Malassezia* taxonomy is therefore needed. *Malassezia* is more difficult to isolate and culture than other pathogenic yeasts such as *Candida* and *Cryptococcus*, making it difficult to elucidate the microflora of AD patients accurately. We developed a PCR-based non-culture method that does not require the use of isolation or culture techniques. Of the members of the genus *Malassezia*, *M. globosa* colonized the skin of both AD patients and healthy subjects more frequently than other *Malassezia* species. In addition, we found polymorphisms in the intergenic spacer 1 region of the *M. globosa* rRNA gene. The genotypes of the microorganisms obtained from AD patients were significantly different from those obtained from healthy subjects. We believe that a specific genotype of *M. globosa* is responsible for exacerbation of AD.

この論文は、第46回日本医真菌学会総会の“シンポジウム II: マラセチアの基礎と臨床”において発表されたものです。