

総 説

マラセチアとアトピー性皮膚炎 —患者血清中の抗マラセチア IgE 抗体からの検討—

神戸俊夫¹ 小山友来²

¹名古屋大学大学院医学系研究科附属病態制御研究施設医真菌研究部門

²総合病院中津川市民病院皮膚科

要 旨

ヒト皮膚より分離した *M. furfur*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, および *M. sympodialis* から β -mercaptoethanol 処理により菌体成分を抽出 (2-ME extract) し, これらに対するアトピー性皮膚炎患者血清中の IgE 抗体について調べた. 2-ME extract の CBB 染色およびレクチンプロットの結果から, マラセチア種間で菌体成分に明らかに違いがある事が確認できた. 2-ME extract を用いたウェスタンプロットにより患者血清中のマラセチア種に対する IgE 抗体を調べたところ, それぞれの菌種の陽性率は 83% (*M. globosa*), 74% (*M. sympodialis*), 65% (*M. furfur*), 56% (*M. restricta*) and 50% (*M. slooffiae*) であった. さらに, *M. globosa* と他の種との交差性を調べるために *M. globosa* の 2-ME extract による吸収試験を試みた. 結果, マラセチア種間の共通抗原と種特異抗原の存在が示唆された. *M. globosa* の 2-ME extract から分子量約 46 kDa (Malg46b) の成分を精製し, これの主要抗原性について検討した. Malg46b によるドットプロットでは, 全アトピー性皮膚炎の患者血清の 69%, *M. globosa* 陽性血清では 83% の血清が本成分と反応した. Malg46b によるドットプロット intensity と 2-ME extract の intensity の間には高い相関 ($r=0.763$) があり, 本マラセチア種の主要抗原成分であることが示唆された. さらにこの Malg46b に対するポリクローナル抗体によるウェスタンプロットで, この成分は *M. globosa* に特に多く, *M. restricta* でわずかに発現されることがわかった.

Key words: atopic dermatitis, IgE, *Malassezia* spp., *M. globosa*

はじめに

ヒト皮膚の常在菌であるマラセチアがアトピー性皮膚炎の増悪因子として関わっていることが指摘され, 本疾患とマラセチアとの関連が注目されている. マラセチアは, 特にヒトの顔面, 頸部, 前胸部などの脂漏部皮膚の常在真菌で, 癬風や毛嚢炎の起因菌, あるいは脂漏性皮膚炎などの皮膚疾患の増悪因子としても知られている. 近年, マラセチア属は形態学的, 生化学的および遺伝子の塩基配列から 7 菌種に分類され^{1,2)}, さらに *Malassezia dermatis* がこれらに加わり, マラセチア属は 8 種類となった³⁾. ここでは, アトピー性皮膚炎とマラセチアとの関係に注目し, 本疾患の患者血清中に存在するマラセチアに対する IgE 抗体を, 新分類に基づいて同定した 5 菌種の抗原成分を用いて検討した.

マラセチアの菌体成分

ヒトの顔面および頸部皮膚より 5 種のマラセチア種 (*M. globosa*, *M. sympodialis*, *M. restricta*, *M. furfur*, *M.*

slooffiae) を分離した. 各菌種のマラセチア菌体を 300 mM メルカプトエタノールで処理し, 遠心上清を粗抗原 (2-ME extract) とした. Fig. 1A は 5 菌種から調整された 2-ME extract を SDS-PAGE の後, CBB で染色したものである. 染色された蛋白成分を各菌種間で比較してみると, 一部に共通して存在する成分 (分子量が似ている) がみられるが, 種に特異的なバンドが多数みられた. 別の抽出方法により調整したサンプルについても SDS-PAGE/CBB 染色を行ったところ, 2-ME extract の場合と同じように種間でバンドパターンに違いが認められた. さらに, レクチンプロットを行うと, 種によりレクチンと反応する成分に違いがあり, 明らかに種により抽出される成分に差が認められた⁴⁾. これらの結果は, マラセチア種の菌体成分は, 蛋白レベルでそれぞれの種に特徴的な成分をもつことを示している. また, 同一菌種から異なる抽出方法を用いて菌体成分を抽出した場合, 抽出される成分の数や分子量に違いが認められた. これまでもいくつかのマラセチアの主要抗原に関する研究があるが, 報告された抗原成分のサイズは同じではない^{5,6)}. これらのいくつかは新分類法で同定した場合, 異なるマラセチア種間での比較の可能性もある. また, 研究者によって抗原成分の抽出法に違いがありこれが原因の一つであることも否定できない. 今回解析に用いた菌種は 5

別刷請求先: 神戸 俊夫

〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65

名古屋大学大学院医学系研究科附属病態制御
研究施設医真菌研究部門

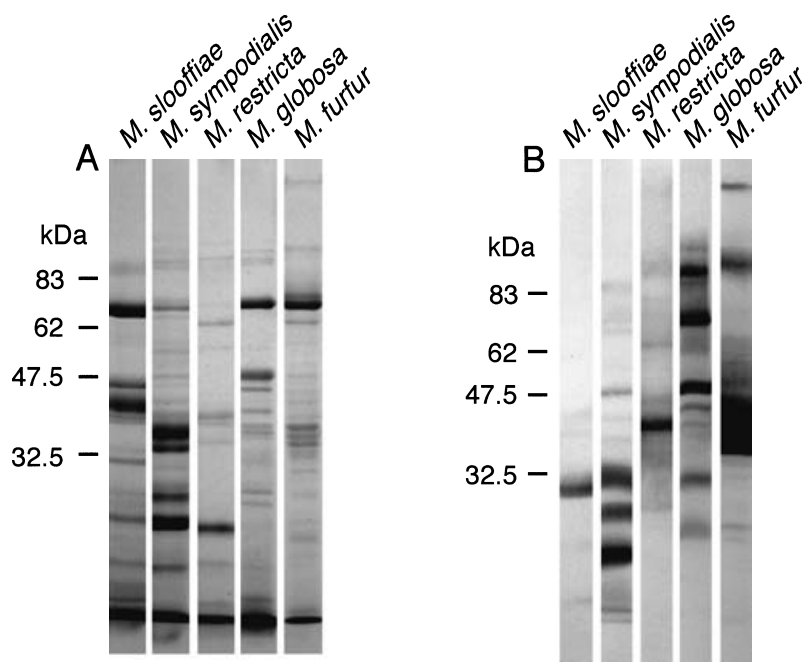


Fig. 1. CBB staining (A) and Western blot (B) profiles of the 2-ME extracts of *Malassezia* species.

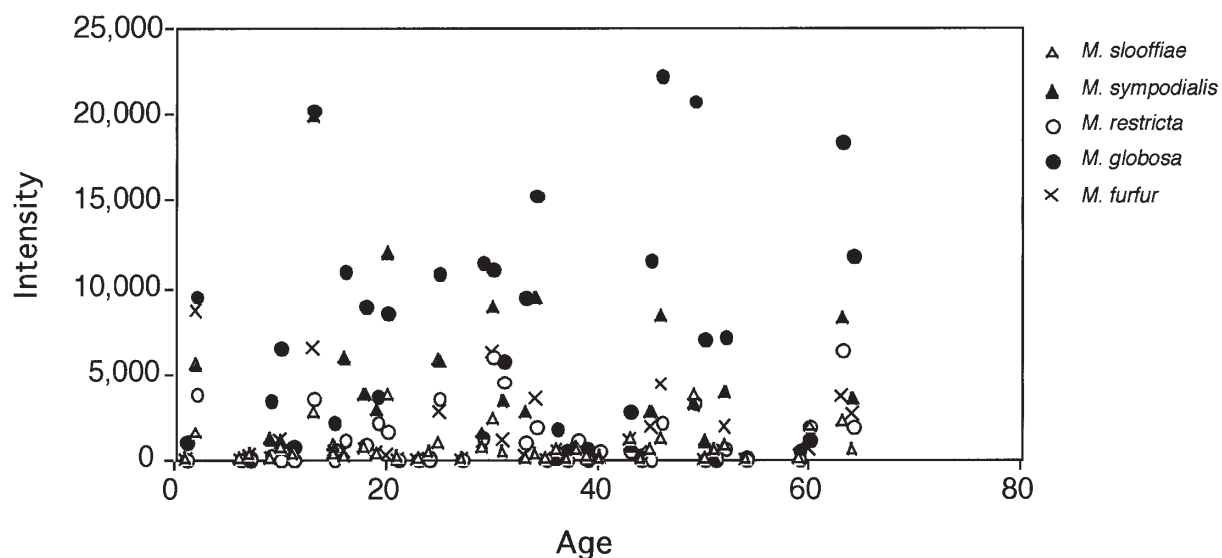


Fig. 2. Correlation of the total intensities generated for each *Malassezia* species in the IgE-Western blots with ages of the patients with atopic dermatitis.

種であり、残りの3種の抗原成分については不明である。また、いずれの抽出法が最も適切かについてはわからないが、それぞれのマラセチア種の主要抗原成分あるいは共通抗原成分などの解析には、標準となる株と抽出法の確立が必要であろう。

アトピー性皮膚炎患者血清中の抗マラセチア IgE 抗体

ウェスタンブロット法により、アトピー性皮膚炎患者血清中の各マラセチア菌体成分に対する抗マラセチア IgE 抗体を調べた。結果、患者血清の約83%にいずれかの抗原成分に対する IgE 抗体が検出された (Fig. 1B)。

反応の程度を比較するために、陽性バンドの intensity (arbitrary unit) を測定し、患者の年齢と反応の程度との関係をしらべた (Fig. 2)。いずれの年齢においても *M. globosa* 抗原に対する反応が最も高く、次いで *M. sympodialis* 抗原との反応が高いことがわかった。性別で比較した場合も、男女共に *M. globosa* および *M. sympodialis* に対する IgE 抗体が高い陽性率を示した⁷⁾。しかしこの場合、年齢やアトピー性皮膚炎の程度が異なることから正確な性別の比較 (特に反応の強さの比較) をするためにはデータが不十分であろう。年齢および性別に関係なく全体の各マラセチア種に対する IgE 抗体の陽性

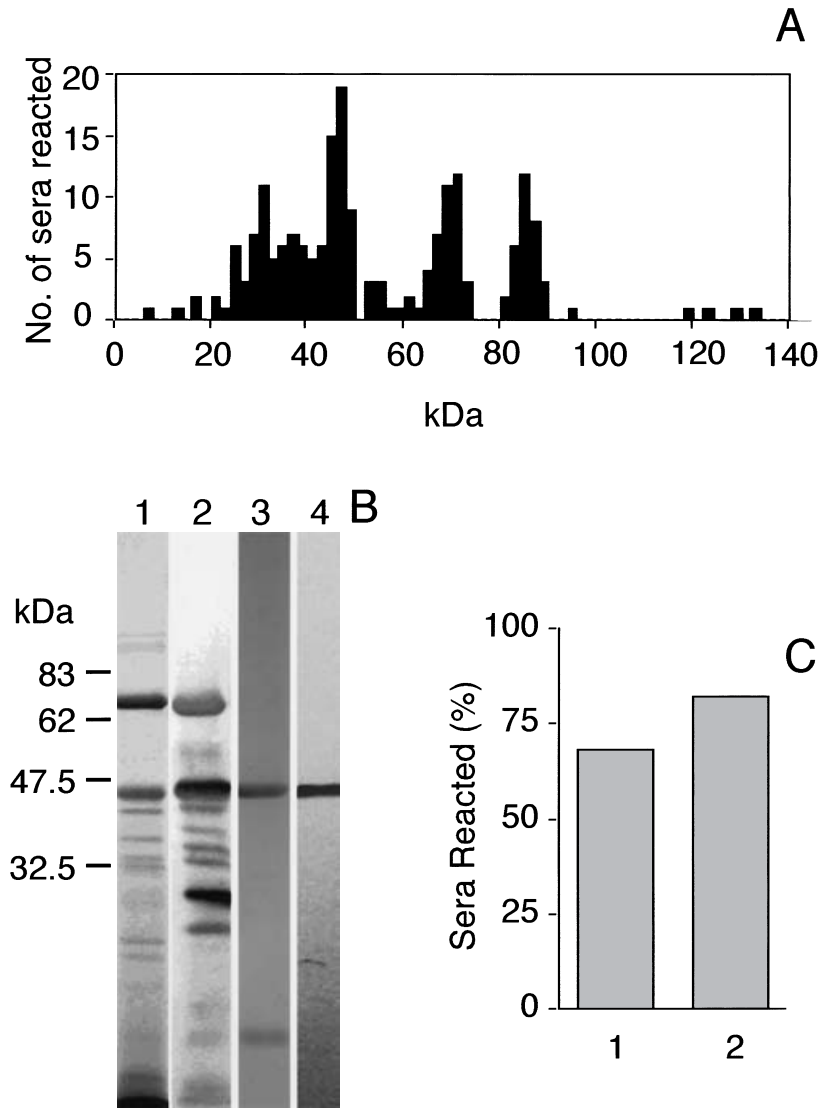


Fig. 3A to 3C. Possible antigenic components of *M. globosa* to IgE antibodies of the patients with AD. The bands with the five highest intensities were recorded for all positive sera in the Western blots, and their molecular masses were plotted (A). A possible major component of approximately 46 kDa (Malg46b) was purified by ion-exchange column chromatography (B). Lane 1, CBB stain of the 2-ME extract; lane 2, IgE-Western blot of the 2-ME extract; CBB stain of Malg46b; lane 4, IgE-Western blot of Malg46b. Dot blot tests with Malg46b (C). Columns 1 and 2 show the positive percentage of sera reacted with Malg46b from AD patients and from the AD patients with IgE antibodies to *M. globosa*, respectively.

率を調べたところ、*M. globosa* に対する IgE 検出率が最も高く (60%)、次いで *M. sympodialis* (52%)、*M. restricta* (38%)、*M. furfur* と *M. slooffiae* (33%) の順であった。また、反応の程度も *M. globosa* が最も高く、続いて *M. sympodialis* であった。これらの結果から、アトピー性皮膚炎患者血清中には、*M. globosa* の菌体成分に対する IgE 抗体も最も高率に存在することが確認できた。ヒト皮膚に常在するマラセチア種では *M. globosa* が最も多いことが報告されている⁸⁾。これらのことから、*M. globosa* がアトピー性皮膚炎に密接に関係する最も重要なマラセチア種の一つであることは間違いないであろう。

ウェスタンブロットにより患者血清中の IgE 抗体を

調べたとき、陽性血清のほとんどは複数の菌種と反応し (Fig. 1B)、単一菌種のみと強く反応する血清は少なかった。この結果は、単一菌種の一部の成分により感作されるのではなく、皮膚に常在する複数の菌種の複数の成分が感作に関係しているものと考えられた。あるいは、菌種間の共通抗原の存在が反応に関係しているかもしれない。そこで、*M. globosa* の 2-ME extract と患者血清と反応させ、次いで各種抗原成分と反応させることにより、*M. globosa* と他の *Malassezia* 種間の共通成分の存在を調べた。結果、*M. furfur* との間には反応の程度に差は認められなかったが、その他の菌種間では明らかに陽性バンドの消失と反応の低下を確認できた。このことから *M.*

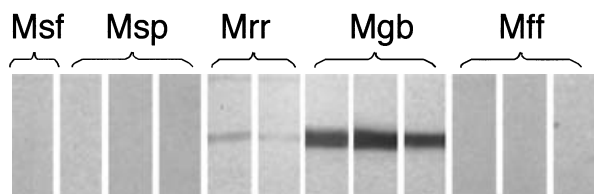


Fig. 4. Western blot with anti-Malg46b antibody. A polyclonal antibody to Malg46b reacted strongly only with *M. globosa*, and reacted slightly with *M. restricta*. Msf, *M. slooffiae*; Msp, *M. simpodialis*; Mrr, *M. restricta*; Mgb, *M. globosa*; Mff, *M. furfur*.

globosa と他の *Malassezia* 種 (*M. furfur* を除く) との間
の共通抗原の存在と種に特徴的な成分の存在の両方可能
性が示唆された。各菌種間で得られた intensity の相関を
各組み合わせで比較すると, *M. furfur* を除いた全ての
組み合わせで相関が得られた⁷⁾。この結果からも, マラ
セチア種間での共通抗原成分の存在が示唆された。

M. globosa の主要抗原

アトピー性皮膚炎患者血清中には *M. globosa* 菌体成分
に対する IgE 抗体が最も高率に検出された。これらの IgE
抗体がいずれの菌体成分に対するものなのか調べるため
に, ウェスタンブロットで最も反応が強い 5 種の成分の
分子量を比較した (Fig. 3A)。結果, 45-50 kDa の分子
量の成分に対する IgE 抗体が最も多くみられた。そこで,
2-ME extract から精製した 2 種類の分子量約 46 kDa の
成分を分離し, 患者血清との反応性を調べた。結果, 高
塩濃度で溶出された分画が目的の成分を含んでいること
が確認できた。本成分を Malg46b とし, 以下の実験に用
いた。ドットブロット法により Malg46b に対する IgE
抗体を調べたところ, 全アトピー性皮膚炎患者の約 69%,
M. globosa の 2-ME extract と反応した血清の約 83% に
本成分に対する IgE 抗体が存在した。また, 2-ME extract
を抗原とした場合の intensity と Malg46b の intensity の
間に高い相関 ($r=0.763$) があった。このことから, こ
の分子量 Malg46b がアトピー性皮膚患者血清中の IgE
抗体に対する *M. globosa* の主要抗原であることが示され
た。さらに, 本成分は ConA と反応し, 調べた全ての血
清が endoglucosidase H 処理後も反応した⁹⁾。以上の結
果から, 本成分はマンノース鎖を持つこと, そして IgE
抗体に対する主要エピトープは蛋白部分にあることが示
された。また, Malg46b に対する特異抗体をウサギを用
いて作成し, これを用いたウェスタンブロットを行った
ところ, 本成分は *M. globosa* に特異的に発現される (*M.*
restricta ではわずかに発現される) 成分であることが示
された。

おわりに

アトピー性皮膚炎の患者血清中に抗マラセチア IgE
抗体の解析から *M. globosa* の分子量約 46 kDa の糖タン
パクが最も強い抗原性を持つことが示された。また, マ
ラセチア種に共通する抗原成分が存在することが阻害実
験の結果から示された。種特異抗原とともに共通抗原成
分の解析も極めて興味あるところである。本文中でも述
べたが, マラセチアを含めた真菌アレルゲンの標準化は
真菌アレルゲンの研究者の最終的な目標であろう。この
ためにも標準株と標準となる抽出法の確立が必要であら
う。

文 献

- 1) Simmons RB, Gueho E: A new species of *Malassezia*. *Mycol Res* **94**: 1146-1149, 1990.
- 2) Gueho E, Midgley G, Guillot J: The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**: 337-355, 1996.
- 3) 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.
- 4) Koyama T, Kanbe T, Ishiguro A, Kikuchi A, Tomita Y: Antigenic components of *Malassezia* species for immunoglobulin E antibodies in sera of patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* **26**: 201-208, 2001.
- 5) Johansson S, Karlstrom K: IgE binding components in *Pityrosporum orbiculare* identified by an immunoblotting technique. *Acta Derm Venereol* **71**: 11-16, 1991.
- 6) Lingborg M, Magnusson CG, Zargari A, Schmidt M, Schrymius A, Cramer R, Whitley P: Selective cloning of allergens from the skin colonizing yeast *Malassezia furfur* by phage surface display technology. *J Invest Dermatol* **113**: 156-161, 1999.
- 7) 小山友来, 神戸俊夫, 菊池韶彦, 富田 靖: アトピー性皮膚炎患者血清中の *Malassezia* 種に対する特異 IgE 抗体の検出. *皮膚* **42**: 18-23, 2000.
- 8) 杉田 隆, 須藤 一, 海野哲史, 坪井良治, 小川秀興, 篠田孝子, 西川朱實: アトピー性皮膚炎患者からの非培養系による *Malassezia* 種の検出. *真菌誌* **42**: 217-218, 2001.
- 9) Koyama T, Kanbe T, Ishiguro A, Kikuchi A, Tomida Y: Isolation and characterization of a major antigenic component of *Malassezia globosa* to IgE antibodies in sera of patients with atopic dermatitis. *Microbiol Immunol* **44**: 373-379, 2000.

Atopic Dermatitis and *Malassezia* Species: A Study of Antigenic Components of *Malassezia* Species for Immunoglobulin E of Patients with Atopic Dermatitis

¹Toshio Kanbe and ²Tomoki Koyama

¹Laboratory of Medical Mycology, Research Institute for Disease Mechanism and Control, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai, Showa-ku, Nagoya, Aichi 466-8550, JAPAN.

²Nakatsugawa City Hospital, 1522-1 Komaba, Nakatsugawa, Gifu 508-8502, JAPAN.

Antigenic components extracted by treatment with β -mercaptoethanol from *M. furfur*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, and *M. sympodialis* were studied for immunoglobulin E antibodies in sera of patients with atopic dermatitis. CBB staining and lectin blots of the extracts showed that each *Malassezia* species contained species-dependent components at the protein level. In a Western blot with the 2-ME extracts, IgE antibodies against the *Malassezia* species were found in sera of 83% (for *M. globosa*), 74% (for *M. sympodialis*), 65% (for *M. furfur*), 56% (for *M. restricta*) and 50% (for *M. slooffiae*) of the AD patients. In the Western blot inhibition test, the 2-ME extract of *M. globosa* partially inhibited the reaction of the antigenic components of other *Malassezia* species with the patient's IgE antibodies. These results indicated that *Malassezia* species contained both species-specific and common antigenic components at the IgE antibody level. A major component of *M. globosa* was isolated from the 2-ME extract of this fungus by ion-exchange column chromatography and was referred to as Malg46b. Dot blot with the Malg46b containing fraction immunologically reacted with 69% of the sera of the patients, and with 83% of the sera of those who were positive for IgE antibodies to the 2-ME extract of *M. globosa* in Western blot. The intensities generated for each dot correlated well with the total intensities generated for the 2-ME extract of *M. globosa* in Western blot ($r=0.763$). The polyclonal antibody to Malg46b reacted strongly only with the 2-ME extract of *M. globosa* and reacted slightly with *M. restricta*. These results indicate that a glycoprotein, Malg46b of *M. globosa*, is dominantly expressed in this fungus and is a possible major antigen for IgE antibodies in patients with 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。