

総 説

Malassezia と脂漏性皮膚炎・アトピー性皮膚炎

田 嶋 磨 美

東京医科大学皮膚科学教室

要 旨

Malassezia は皮膚の常在菌で、癬風、マラセチア毛胞炎、脂漏性皮膚炎 (SD)、アトピー性皮膚炎 (AD) などの皮膚疾患の原因や増悪因子として考えられているが、各々の疾患と *Malassezia* 菌種との関連については未だ不明な点が多い。今回は SD、AD 患者の *Malassezia* 菌相を PCR による非培養法を用いて解析した。AD、SD とともに健康人とほぼ同様に *M. globosa*, *M. restricta* が高頻度に検出され、菌種数は健康人に比べ多様化する傾向を示した。今回は難治性 AD 患者 20 例に、従来の外用治療に 2% ケトコナゾールクリームを重ね塗りした際の治療効果および、*Malassezia* の菌量の変化について検討した。その結果、2% ケトコナゾールクリーム外用による *Malassezia* の除菌率は 90% 以上で、臨床効果も 70% 以上が有効であった。In vitro では、アゾール系抗真菌薬とタクロリムスの同時投与が *Malassezia* に対する抗菌作用において相乗効果を示すことが判明した。そこで頭頸部の難治性 AD 患者を対象に、両薬剤の併用治療による菌量と臨床症状について検討した。その結果、タクロリムス外用患者 9 症例中 6 例 (66.6%) に有効であった。以上のことから *Malassezia* は AD の増悪因子の 1 つであり、除菌により臨床症状も改善することが示唆された。

Key words: 脂漏性皮膚炎 (seborrheic dermatitis), アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis), マラセチア (*Malassezia*), 抗真菌薬 (antifungal agents)

はじめに

Malassezia は脂質要求性の酵母様常在菌で、1996 年 Guého ら¹⁾ により再分類され、その後 Sugita ら²⁻⁴⁾ および Hirai ら⁵⁾ が新菌種を報告したことにより、現在では 11 菌種よりなっている。*Malassezia* は、癬風、マラセチア毛胞炎、脂漏性皮膚炎 (SD)、アトピー性皮膚炎 (AD) などの皮膚疾患の原因や増悪因子と考えられているが、常在菌であるはずの *Malassezia* が病変を生じる機序の詳細は未だ不明である。従来は菌の増殖とそれに伴う遅延型過敏反応や、リパーゼによる分解によって生じる遊離脂肪酸などによる炎症の惹起が病態に関与していると考えられてきた⁶⁻⁸⁾。今回は、SD 及び AD 患者の皮膚表面から PCR による非培養法を用いて *Malassezia* の菌相を解析し、同時に難治性 AD 患者に対する 2% ケトコナゾールクリーム外用の治療効果について検討したので報告する。

Malassezia と脂漏性皮膚炎

脂漏性皮膚炎は脂漏部位、顔面特に鼻唇溝、鼻梁、眉間、および眉毛や顎などの発毛部に、鱗屑、紅斑を生じ、痒痒はあっても軽度である。頭皮に脂漏性皮膚炎が生じると、びまん性に黄色の落屑と紅斑を生じ、痒痒を伴うことが多い。発生機序としては、脂質要求性の *Malassezia* 菌体が産生するリパーゼが、皮脂を遊離脂肪酸に分解

し、分解された遊離脂肪酸が起炎性を示す⁶⁾。また、菌体は補体を活性化し接触過敏を引き起こす⁷⁾。病変部の菌の増殖によって菌体や菌が分泌する物質が増加し、結果的に表皮の炎症や増殖 (turn over の亢進) を引き起こすと考えられる⁸⁾。治療は、外用ステロイド剤や非ステロイド系消炎外用薬が汎用されていたが、最近では *Malassezia* の関与が注目されており、抗真菌薬である 2% ケトコナゾールクリームによる治療が主流になりつつある。ステロイド外用薬は 2% ケトコナゾールクリーム外用に比べ速効性があるが、中止後に再燃しやすい。一方、2% ケトコナゾール外用では中止後も再燃までの日数が長く、また副作用も少ないと報告されている⁹⁾。

非培養検出法を用いた脂漏性皮膚炎患者の皮疹部と無疹部における *Malassezia* 菌相の比較

患者は東京医科大学病院皮膚科外来患者 31 人、そのうち男性 25 例、女性 6 例、平均年齢 48 歳であった。治療歴はステロイド外用 10 例、非ステロイド系抗炎症外用薬 2 例、2% ケトコナゾールクリーム 3 例で、未治療は 19 例であった。検体の採取方法は、患者の皮疹部 (前額部、鼻翼部など紅斑、鱗屑症状の強い部位) と無疹部 (頬部、頸部など) から OpSite™ を用いてテープストリッピングを行い、そこから直接 Sugita ら²¹⁾ の方法に従い、真菌 DNA を抽出した。*Malassezia* の rRNA 遺伝子上の 26S と 5S には含まれた IGS (intergenic spacer) または 18S と 26S には含まれた ITS (internal transcribed spacer) 領域上に設計した菌種特異的 PCR プライマーを用いた nested PCR により *Malassezia* DNA を検出し

別刷請求先：田嶋 磨美

〒160-0024 東京都新宿区西新宿 6-7-1
東京医科大学病院 皮膚科学教室

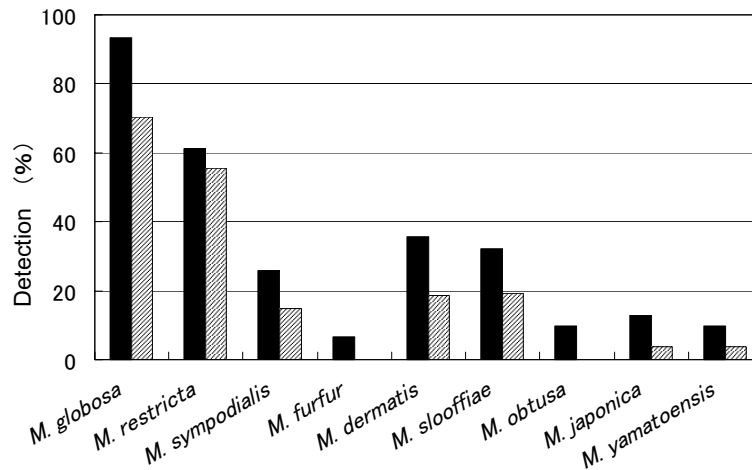


Fig. 1. The rates of detection of *Malassezia* species in samples from the lesional and non-lesional skin of seborrheic dermatitis (SD) patients.

Samples were collected from both the lesional (black column, n=31) and non-lesional (hatched column, n=27) skins of 31 SD patients. *M. globosa* and *M. restricta* were detected in approximately 90% and 70% of the subjects, respectively. *M. dermatitis*, *M. slooffiae* and *M. sympodialis* were detected at a frequency of about 40%, while the other species at a rate of less than 20%. In most species, the detection rate in the lesional skin was higher than that in the non-lesional skin.

M. globosa was present at a significantly higher frequency in lesional skin than in non-lesional skin. ($p < 0.05$)

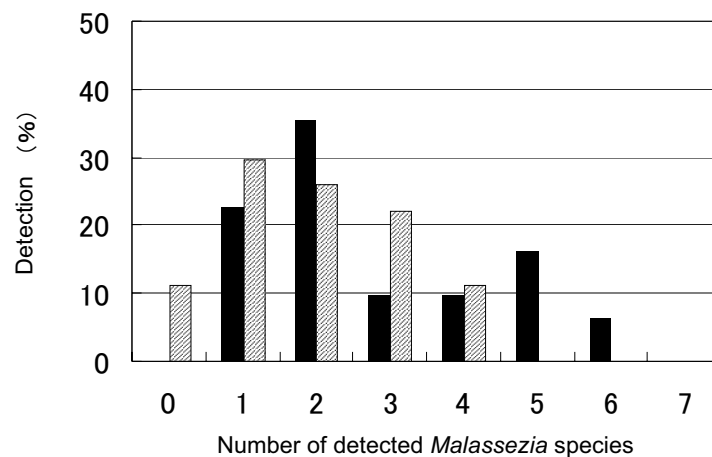


Fig. 2. The number of *Malassezia* species detected in samples from the lesional and non-lesional skin of SD patients.

The average number of *Malassezia* spp. from SD patients detected was 3.2 ± 1.6 species per patient. The average number in the lesional skin was 2.8 ± 1.6 (black column), while that of the non-lesional skin was 1.9 ± 1.2 (hatched column). ($p < 0.05$)

た。また主要菌種については、rRNA 遺伝子の IGS 領域をクローン化し DNA 塩基配列を解析した。

Fig. 1 に示すように、検出率は、皮疹部において *M. globosa* が 94%、*M. restricta* が 61%、その他の菌種は 40% 以下の検出頻度であった。またすべての菌種で、無疹部より皮疹部の方が検出率が高かった。また、Fig. 2 に SD 患者の皮疹部と無疹部における *Malassezia* の菌種数の比較を示した。皮疹部では 5 菌種以上検出される患者もあり、平均分離菌種数を比較すると、皮疹部が約 2.8 菌種、無疹部が 1.9 菌種であり、皮疹部の方が有意に菌相が多様化していた。

これまで SD における *Malassezia* の菌相は、培養法により解析が行われてきたが、分離培養に技術を要し、菌

種ごとに発育条件が異なるため、報告により検出率は様々であった¹⁰⁻¹²⁾。SD 患者の菌相について、Nakabayashi¹¹⁾ の培養法と今回我々が施行した非培養法の結果を比べてみると、培養法では、*M. furfur* 17%と *M. globosa* 22%が主要菌種であったのに対し、非培養法では、*M. globosa* 94%と、培養法では検出されることの少ない *M. restricta* 61%が主要菌種であった。

脂漏性皮膚炎患者における *M. globosa* と *M. restricta* の rRNA 遺伝子多型

主要菌種であった *M. globosa* と *M. restricta* の 2 菌種につき rRNA 遺伝子の IGS 領域をクローン化し DNA 塩基配列を解析した。Fig. 3 に示すように *M. globosa* の

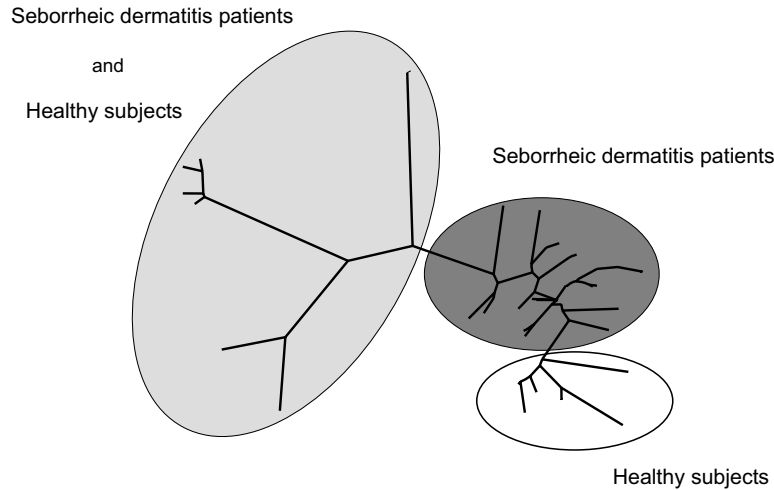


Fig. 3. Molecular phylogenetic tree of *Malassezia globosa*.

A tree was constructed from IGS1 sequences of the rRNA gene using a neighbor-joining analysis²³⁾ after the sequences were aligned using Clustal W²⁴⁾.

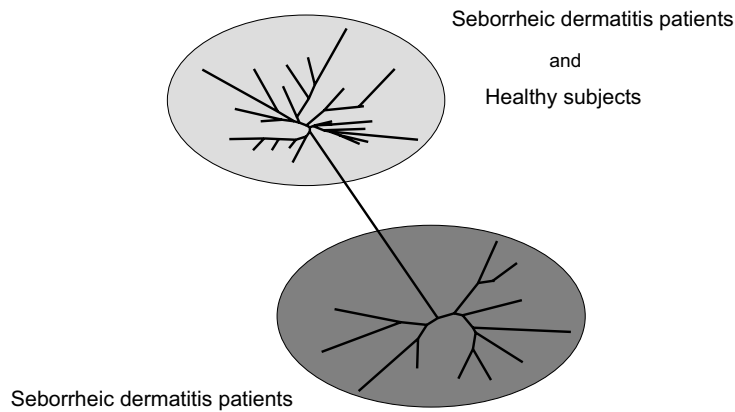


Fig. 4. Molecular phylogenetic tree of *Malassezia restricta*.

A tree was constructed from IGS1 sequences of the rRNA gene using a neighbor-joining analysis²³⁾ after the sequences were aligned using Clustal W²⁴⁾.

IGS領域のDNA塩基配列は、その類似性から、健常人のみ、SD患者のみ、及び両者の混在する3グループにわかれた。同様に *M. restricta* のIGS領域のDNA塩基配列は2グループにわかれ、*M. restricta* では、健常人由来の配列はそのうちの1グループのみに属した (Fig. 4)。これらの結果から、患者特異的な遺伝子型を示す菌株の存在が示唆された。なおAD患者についても Sugitaら^{13, 14)} が *M. globosa* と *M. restricta* の遺伝子多型について同様の報告をしている。

Malassezia とアトピー性皮膚炎

アトピー性皮膚炎は増悪・寛解を繰り返す、痒疹のある湿疹を主病変とする疾患で、患者の多くはアトピー素因を持つ¹⁵⁾。発生機序は、アトピー素因にアレルギー的・非アレルギー的な刺激が誘因となって発症する。アレルギー的側面とは、ダニ、ハウスダストなどの環境アレルゲンや、真菌・細菌などの微生物、食物アレルゲンなど多彩なアレルギー反応を介して最終的に炎症を惹起す

る。また非アレルギー的側面とは、ドライスキンによる皮膚バリアー障害によるものである¹⁶⁾。これらの治療は、ステロイド外用薬、タクロリムス軟膏、保湿剤、抗アレルギー剤内服などが一般的である。成人型ADは一般に頭頸部の症状が重篤で、このような患者は *Malassezia* 特異的IgE抗体やパッチテストが高率に陽性である。これらのことから、増悪因子の一つに *Malassezia* の関与が考えられている。一般的な治療ではないが、こういった難治性のADに対し抗真菌剤の併用で症状が軽快したという報告が増加している。1983年 Clemmensen と Hjorth¹⁷⁾ は頭頸部のADにケトコナゾール内服が有効であると報告し、Backら¹⁸⁾ は重症型AD 18例にケトコナゾール内服により全例で中等度以上の改善を認めたと報告している。さらに、*Malassezia* のRASTs陽性患者のIgEも減少したとする報告もある¹⁹⁾。本邦では、比留間ら²⁰⁾ が顔面の難治性AD 52例にイトラコナゾール200mg/日を1~2週間内服させ、6割に臨床症状に効果があったと報告している。

アトピー性皮膚炎患者の培養法と非培養法による *Malassezia* 菌相の比較

アトピー性皮膚炎患者の *Malassezia* の菌相について、Nakabayashi ら¹¹⁾の培養法による報告では *M. furfur* 17%, *M. globosa* 22%, が主要菌種であるが、Sugita ら²¹⁾の非培養法による報告では、*M. globosa* が94%, *M. restricta* が88%で、脂漏性皮膚炎と同様な結果であった。

非培養検出法による難治性アトピー性皮膚炎患者の抗真菌薬外用前後の *Malassezia* 検出率の比較と臨床効果

Sugita ら²²⁾は、タクロリムスが *Malassezia* に対して単独で弱いながら抗真菌作用を示し、タクロリムスとケトコナゾールを併用することにより、各々の最小発育阻止濃度がさらに低下することを見出した。そこで両薬剤を併用した場合の臨床効果について検討した。非培養検出法 (PCR) によりアトピー性皮膚炎患者の皮疹部をステロイド外用薬ないしタクロリムス軟膏で治療していた患者に2%ケトコナゾールクリームを併用し、併用前後におけるマラセチア除菌効果と臨床効果を比較した。

患者はステロイドなどの標準的治療に反応しにくいアトピー性皮膚炎患者20例、男性16例、女性4例、平均年齢31.7歳。サンプル採取は、顔面・頸部と体幹・四肢とにわけて各々特に症状の強い部位 (アトピー性皮膚炎ガイドラインの重症度分類で個疹の重症度が中等度以上) を選び、OpSite™を用いてテープストリッピングを行った。治療歴は顔面・頸部ではステロイド外用薬が4例、タクロリムス外用薬9例、その他の外用薬1例、体幹・四肢では、ステロイド外用薬17例、タクロリムス外用薬3例であった。これら従来の治療に2%ケトコナゾールクリームを3~5週間重ね塗りした後、*Malassezia* の菌量をPCRを用いて解析した。臨床症状は、アトピー性皮膚炎ガイドラインの重症度分類で個疹の重症度が1ランク以上下がったものを改善とした。

頭頸部の検出結果は、体幹、四肢に比べると全体的に菌量が多く、比較できた14症例中13例 (92.9%) に *Malassezia* の除菌効果を認めた。2%ケトコナゾールを重ね塗りしても菌量が減少しなかった1症例は、臨床症状も軽快しなかった。菌量が減少した13症例中10例 (76.9%) は臨床症状も軽快した。タクロリムス外用患者9症例中6例 (66.6%) は臨床症状も軽快した。体幹・四肢では、比較できた症例16症例中15例 (93.8%) に *Malassezia* の除菌効果が認められた。菌量が減少した15症例全例が臨床症状も軽快した。2%ケトコナゾールクリームを重ね塗りしても、菌量が減少しなかった1症例は、臨床症状も軽快しなかった。以上の結果より難治性AD患者への2%ケトコナゾールクリームの併用は有効であると考えられた。

おわりに

今回の研究により、SD患者では *Malassezia* 菌種数が多様化していることを示した。またAD患者への抗真菌

薬の使用により *Malassezia* の菌量の減少とともに皮膚症状も軽快した。 *Malassezia* はAD、およびSDの増悪因子であることが示唆された。今後、さらに症例数を増やして *Malassezia* と皮膚疾患の関連性や抗真菌薬の投与の適応などを検討する予定である。

謝 辞

第48回日本医真菌学会シンポジウムでの発表の機会を与えていただいた総会長の滝内石夫教授に厚く御礼申し上げます。また御指導頂きました明治薬科大学の杉田隆先生、西川朱實教授、東京医科大学坪井良治教授に深謝致します。

文 献

- 1) Guého E, Midgley G, Guillot J: The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**: 337-355, 1996.
- 2) 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* **41**: 1363-1367, 2003.
- 3) Sugita T, Takashima M, Kodama M, Tsuboi R, Nishikawa A: Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J Clin Microbiol* **41**: 4695-4699, 2003.
- 4) Sugita T, Tajima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A: New yeast species, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol Immunol* **48**: 579-583, 2004.
- 5) Hirai A, Kano R, Makimura K, Duarte ER, Hamdan JS, Lachance MA, Yamaguchi H, Hasegawa A: *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 623-627, 2004.
- 6) Ran Y, Yoshiike T, Ogawa H: Lipase of *Malassezia furfur*. *J Med Vet Mycol* **31**: 77-85, 1993.
- 7) Yoshimura T, Kudoh K, Aiba S, Tagami H: Antiinflammatory effects of topical ketoconazole for the inflammation induced on the skin of hairless guinea-pigs by repeated applications of heat-killed spores of *Malassezia furfur*. A comparative study with hydrocortisone 17-butyrate. *Dermatol Treat* **6**: 113-116, 1995.
- 8) 坪井良治: フケ. 美容皮膚科学, (南山堂) 2005 in press.
- 9) 清 佳浩: 脂漏性皮膚炎—臨床症状と各種外用剤の治療効果—. *真菌誌*: 73-77, 1999.
- 10) Gupte 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.
- 11) Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J: Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Med Mycol* **38**: 337-341, 2000.
- 12) Sandstrom MH, Bartosik J, Back O, Scheynius A, Sarnhult T, Tengvall Linder M, Faergemann J: The prevalence of the *Malassezia* yeasts in patients with

- atopic eczema, seborrheic eczema and healthy controls. (abstract). JEADV **15**(suppl. 2): 112, 2001.
- 13) Sugita T, Kodama M, Saito M, Ito T, Kato Y, Tsuboi R, Nishikawa A: Sequence diversity of the intergenic spacer region of the rRNA gene of *Malassezia globosa* colonizing the skin of patients with atopic dermatitis and healthy individuals. J Clin Microbiol **41**: 3022-3027, 2003.
 - 14) Sugita T, Tajima M, Amaya M, Tsuboi R, Nishikawa A: Genotype analysis of *Malassezia restricta* as the major cutaneous flora in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. Microbiol Immunol **48**: 755-759, 2004.
 - 15) 古江増隆, 古川福実, 秀道広, 竹原和彦: 日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎治療ガイドライン2004改訂版. 日皮会誌 **114**: 135-142, 2004.
 - 16) 宮地良樹: 成人型ADにおけるスキンケアの位置づけ. Derma **31**: 36-42, 2000.
 - 17) Clemmensen OJ, Hjorth N: Treatment of dermatitis of the head and neck with ketoconazole in patients with type 1 sensitivity to *Pityrosporum orbiculare*. Semin Dermatol **2**: 26-29, 1983.
 - 18) Back O, Scheynius A, Johansson SGO: Ketoconazole in atopic dermatitis: therapeutic response is correlated with decrease in serum IgE. Arch Dermatol Res **287**: 448-451, 1995.
 - 19) Nikkels AF, Pierard GE: Framing the future of antifungals in atopic dermatitis. Dermatology **206**: 398-400, 2003.
 - 20) 比留間政太郎: 特集・アトピー性皮膚炎の治療 抗真菌剤の適応. クリニカ **26**: 49-53, 1999.
 - 21) 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.
 - 22) Sugita T, Tajima M, Ito T, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A: Antifungal activities of tacrolimus and azole agents against the eleven currently accepted *Malassezia* species. J Clin Microbiol **43**: 2824-2829, 2005.
 - 23) Saitou N, Nei M: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol **4**: 406-425, 1987.
 - 24) Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res **22**: 4673-4680, 1994.

Malassezia Species in Patients with Seborrheic Dermatitis and Atopic Dermatitis

Mami Tajima

Department of Dermatology, Tokyo Medical University
6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan

Malassezia species, organisms normally colonizing the skin surface, are thought to play a role as either the cause or an exacerbating factor in a number of skin conditions, including pityriasis versicolor, *Malassezia* folliculitis, seborrheic dermatitis (SD) and atopic dermatitis (AD). Using a non-cultural PCR method, we analyzed *Malassezia* spp. extracted from the skin surface of SD and AD patients. The species most commonly detected in both patient groups were *M. globosa* and *M. restricta*, and the number of *Malassezia* spp. In these patients was higher than in healthy subjects. After a topical application of 2% ketoconazole cream, changes in the population of *Malassezia* spp. in 20 intractable cases of AD were recorded. The addition of the 2% ketoconazole cream to the standard topical treatments was found to have reduced the *Malassezia* spp. population by 90%, and showed a clinical efficacy rate of 70%. Furthermore, a combination of azole agents and tacrolimus produced a synergistic anti-fungal effect against *Malassezia* spp. *in vitro*. A clinical trial using this drug combination conducted on the face and neck of patients with intractable AD showed a 66.6% efficacy rate in both the reduction of the flora and in clinical improvement. From these results it was evident that *Malassezia* is one of the factors exacerbating AD, and that removal of the organism results in an improvement in the clinical condition of the patient.