

教育シンポジウム 8

Malassezia の菌学

杉田 隆

明治薬科大学微生物学教室

I はじめに

Malassezia は環境中には存在せず、ヒトや動物の皮膚に常在する担子菌系の酵母である。増殖に脂質を要求することから皮脂の多い部位に定着しやすく、癬風や脂漏性皮膚炎等の各種皮膚疾患の原因となる。*Malassezia* の研究は、ここ10年の間に飛躍的に進歩した。

本シンポジウムでは、*Malassezia* の分類・同定・系統を中心に、またこれらが医真菌学領域に与えたインパクトについて述べたい。

II 形態

Malassezia pachydermatis のみ脂質非要求性である。LNA培地上では、クリーム色から淡黄色を呈する (Fig. 1)。細胞の大きさは (2-8) × (2-12) μm 位で、卵形、長円形、円筒状を示す (Fig. 2)。菌種によっては菌糸形も示す。癬風患者の鱗屑を直接顕鏡すると菌糸形が認めることができる。癬風の原因菌は *Malassezia globosa* と考えられるが、本菌は適当な培養条件で菌糸形を誘導することができる。

III 分類

Malassezia の分類学的研究は、1846年に Eichstedt が癬風患者から菌株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 *Microsporion furfur* が与えられたが、1889年に Baillon により *Malassezia* 属に移行された。一方、フケ症に関連する菌種として

1904年に Sabouraud により *Pityrosporum* も記載された。両属は分類学的に同一であること、また属名の優先権 (記載年) 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。今日でも論文に属名 *Pityrosporum* を目にするが、分類学上用いることは出来ないので注意が必要である。

Malassezia の分類学的変遷を説明する上で最も重要な点は、*Malassezia 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¹⁾ 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菌種に細分類できることが明らかにされ、各々の菌種に対して新しい種名も与えられた。その後、我が国から新たに4菌種が分離・記載された。著者らは、2002年にアトピー性皮膚炎患者 (順天堂大)、2003年に健康人 (本学学生)、2004年に脂漏性皮膚炎患者 (東京医大) から分離した菌株に対してそれぞれ *Malassezia dermatis*²⁾、*Malassezia japonica*³⁾ および *Malassezia yamatoensis*⁴⁾ の種名を与えた。2004年には、日本大の Hirai ら⁵⁾ が動物から *Malassezia nana* を分離した。現在では11菌種が存在する (Fig. 3)。更に2~4菌種の存在が示唆されており、今後も *Malassezia* 属は拡大すると予想される。

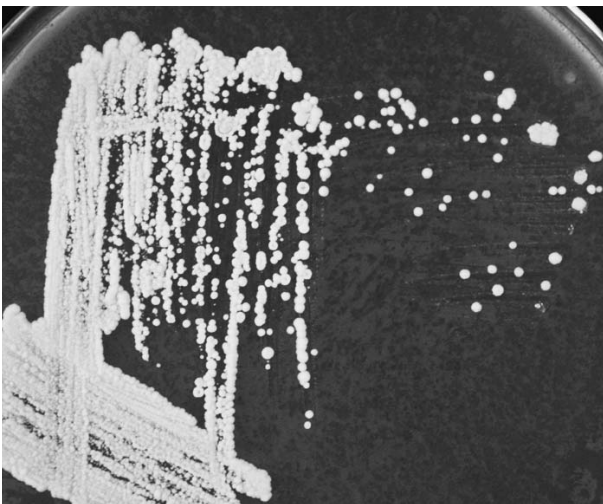


Fig. 1 mLN培地上の *Malassezia* の培養形態。32°Cで5日間培養。

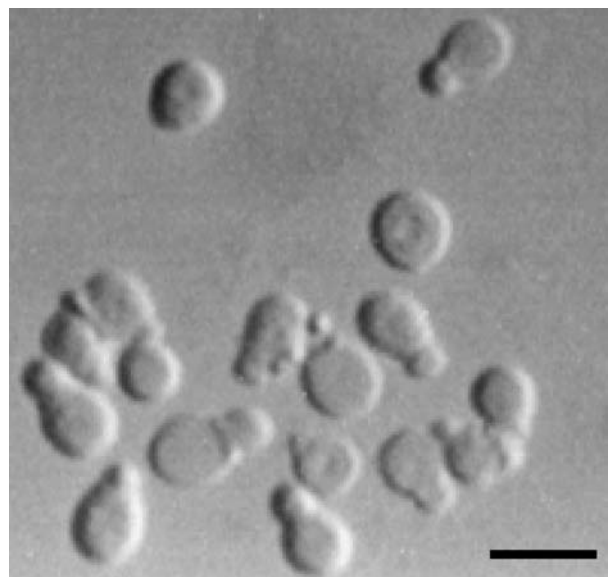
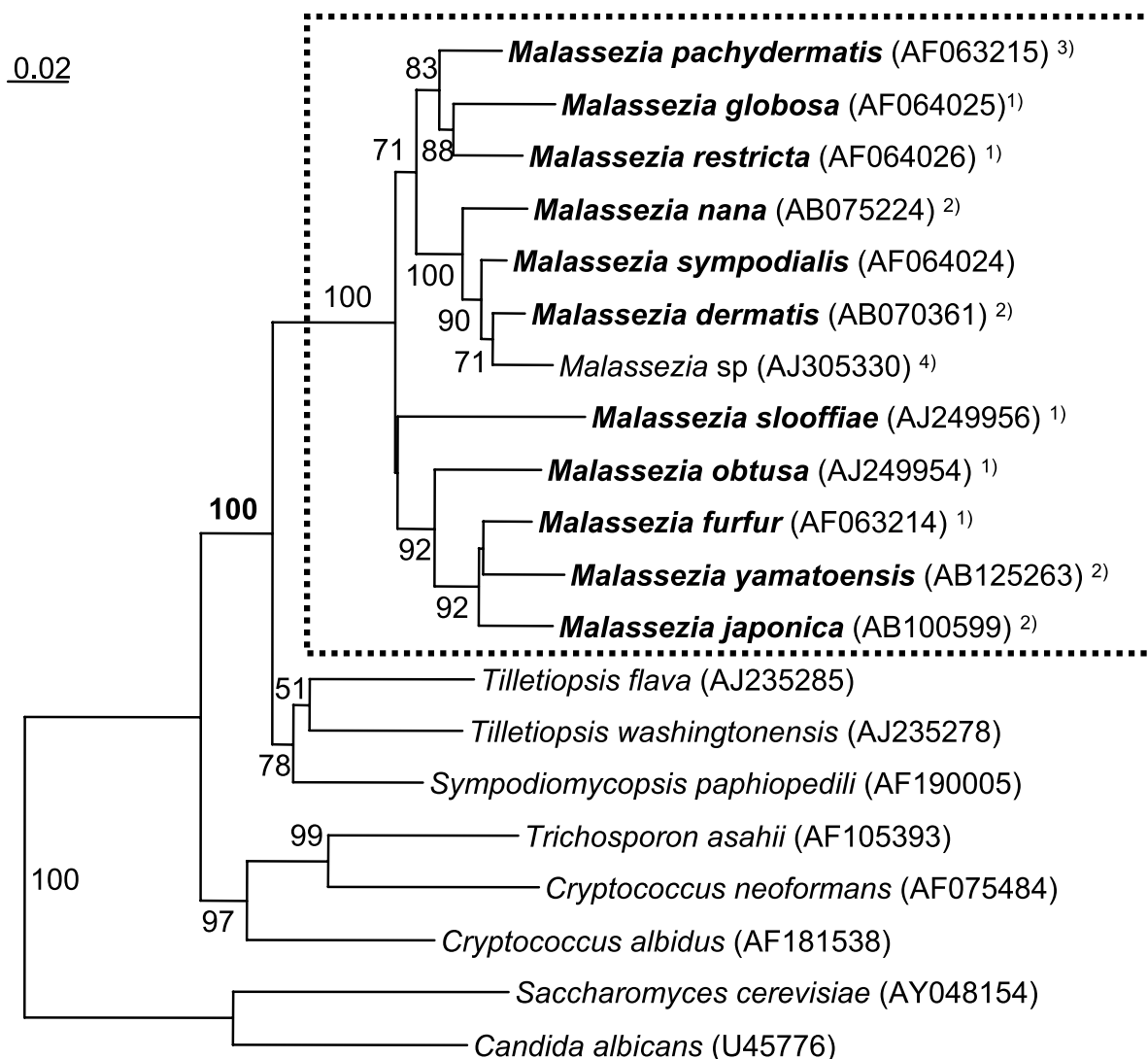


Fig. 2 *Malassezia* の栄養細胞。スケールは10 μm

Fig. 3 *Malassezia* および関連菌種の分子系統樹

D1/D2 26S rDNA の約 600 bp の塩基配列から近隣結合 (NJ) 法で作成した。

- 1) 1996年までは *M. furfur* として分類されていた菌種；2) 1996年以降, 新種として分離・記載された菌種；
 3) 脂質非要求性菌種；4) 新種として記載予定

Table 1. *Malassezia* 属菌種の生理学的性状

菌種名	SDA培地上での増殖能(32 °C)				mDixonでの増殖能			カタラーゼ			
	増殖能(32 °C)	32 °C	37 °C	40 °C	反応	10% Tween 20	0.5% Tween 40	0.5% Tween 60	0.1% Tween 80		
<i>Malassezia yamatoensis</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	+		
<i>Malassezia dermatitis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>Malassezia sympodialis</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+		
<i>Malassezia furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>Malassezia nana</i>	-	+	+	+/-	+	+/-	+	+	±		
<i>Malassezia slooffiae</i>	-	+	+	+	+	± or +	+	+	-		
<i>Malassezia japonica</i>	-	+	+	-	+	-	±	+	-		
<i>Malassezia globosa</i>	-	+	± or -	-	+	-	-	-	-		
<i>Malassezia obtusa</i>	-	+	± or +	-	+	-	-	-	-		
<i>Malassezia restricta</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-		
<i>Malassezia pachydermatis</i>	+	+	+	+	± or +	-	+	+	+		

+, 陽性; -, 陰性; ±, 弱陽性.

IV 系統

Malassezia は、担子菌系酵母である。多くの病原菌種を有する *Cryptococcus* 属や *Trichosporon* 属も担子菌系酵母であるが、これらの菌種が菌蕈綱 (class *hymenomycetes*) に属するのに対して、*Malassezia* 属はクロボキン綱 (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 (Fig. 3)。

V 同定

Malassezia の培養には、Tween, オリーブ油やグリセリン等が添加された Dixon と LNA あるいはその変法培地を用いるのが一般的である。オランダの菌株保存機関である CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) が推奨する modified LNA 培地はすべての菌種の増殖に良好な結果が得られる。また、クロモアガーカンジダを *Malassezia* 用に改良した培地が市販されている (関東化学)⁶⁾。

Malassezia は、増殖に脂質を必要とすることから病原性酵母の日常的な検査で汎用されている API キットを用いることは出来ない。Tween の利用能, カタラーゼ反応や増殖温度から同定する方法がいくつか考案されている。Table 1 に各菌種の生化学的性状を示す。*Malassezia* に限らず非典型的な性状を示す菌株はしばしば経験する。

この場合、rDNA 塩基配列の解析による同定が確実である。一般に rRNA 遺伝子中の ITS (Internal Transcribed Spacer) あるいは D1/D2 26S rDNA 領域の類似度が 99% 以上であれば同一種と判断される。しかしながら、*Malassezia* の ITS 領域は種内多様性が著しくこの基準には合致しないため、D1/D2 26S rDNA 領域も解析する方が良い (Fig. 4)。

VI 各種皮膚疾患の菌叢解析

1. 非培養法による菌叢解析

Malassezia は癬風, 脂漏性皮膚炎, 毛包炎やアトピー性皮膚炎の原因あるいは増悪因子となる。*Malassezia* が 1996 年に再分類されるまではこれらの皮膚疾患の原因菌種は、*M. furfur* と考えられていた。しかし本菌の不均一性が解明されて以来、菌叢解析が飛躍的に進歩した。*Malassezia* は菌種によって増殖能が異なるため、菌叢解析に培養法は適さない。著者らは、培養を介さない非培養検出法を新たに開発し、各種マラセチア関連皮膚疾患の菌叢を解析してきた⁷⁾。被験者の皮膚に 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 領域に設計した種特異的プライマーを用いて PCR を行う。本法は、30 例程の菌相解析でも PCR の述べ回数を超え

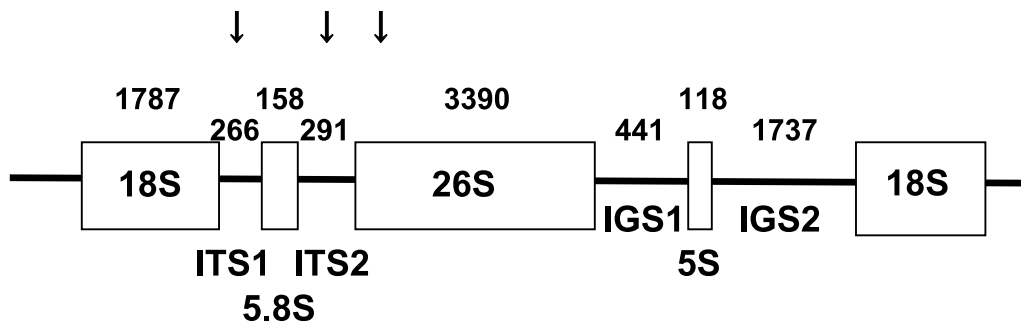


Fig. 4 *Malassezia* の rDNA 遺伝子の構造

ITS, internal transcribed spacer; IGS, intergenic spacer.
↓, 同定に用いる領域。
数字は bp を示す。本構造は、*M. globosa* CBS 7966 である。

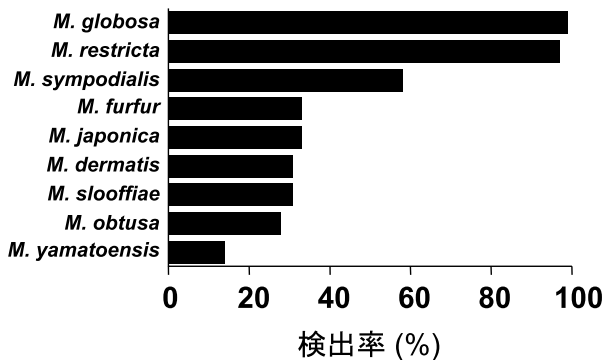


Fig. 5 アトピー性皮膚炎患者鱗屑中からの *Malassezia* の検出率
特異 PCR primer を用いた nested PCR で検出した。癬風および脂漏性皮膚炎患者の菌叢もほぼ同じである。

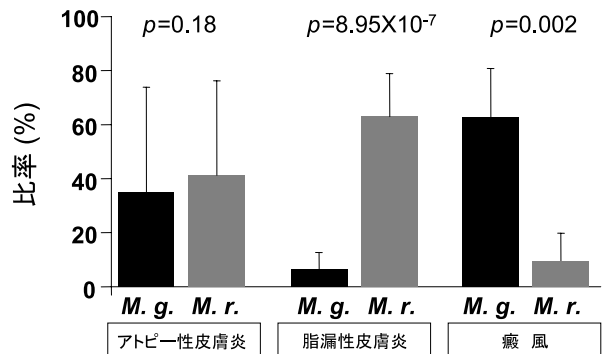


Fig. 6 各種 *Malassezia* 関連疾患患者鱗屑中の *M. globosa* と *M. restricta* の構成比率

M. g, *M. globosa*; M. r, *M. restricta*.

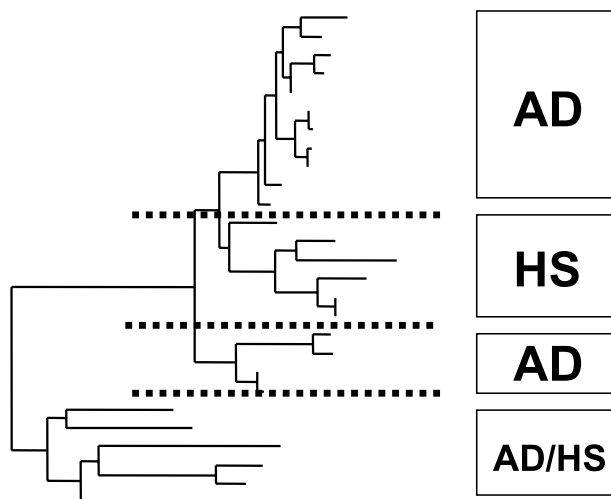


Fig. 7 *Malassezia globosa* の IGS1 領域の DNA 塩基配列から作成した分子系統樹

AD, アトピー性皮膚炎患者; HS, 健康人.

る極めて煩雑な手法ではあるが、正確に菌叢を解析するためには現時点で考える最良の方法である。

癬癩、脂漏性皮膚炎およびアトピー性皮膚炎患者の皮脂組成は異なることから疾患特異的な菌叢を形成すると考えられたが、いずれの疾患でも *M. globosa* と *M. restricta* が主要構成菌種であり、他の菌種の検出率は、10～60%程度である (Fig. 5)⁷⁻⁹⁾。更に、real-time PCR を用いて定量すると、癬癩は *M. globosa* が優位であるのに対して、脂漏性皮膚炎では *M. restricta* が優位である。アトピー性皮膚炎ではほぼ同等である。つまり質的にはいずれの疾患も同一の菌叢であるが量的には大きく異なっている (Fig. 6)。アトピー性皮膚炎患者では、*Malassezia* に対する特異 IgE 抗体が産生されるが抗体値は、菌叢の結果を反映していた。

2. 種内多型解析

主要構成菌種である *M. globosa* および *M. restricta* の rRNA 遺伝子中の IGS 領域には、(CT)_n、(GT)_n の繰り返し配列 (SSR, short sequence repeat) が存在する。アトピー性皮膚炎患者と健康人に定着する菌株では、その繰り返し回数が異なる。これをもとに分子系統樹を作成すると、患者と健康人では異なるクラスターを形成している (Fig. 7)^{10, 11)}。特定の遺伝子型を有する菌株がよりアトピー性皮膚炎の増悪に関与していると考えられる。

VII 薬剤感受性

マラセチア関連疾患の治療には抗真菌薬が用いられるが、特にケトコナゾール (KTZ) とイトコナゾール (ITZ) が優れた感受性を示す。両薬剤ともに *Malassezia* の全菌種に対して 0.016～0.25 μg/ml 濃度で発育を阻止する^{12, 13)}。アトピー性皮膚炎治療薬であるカルシニューリン阻害薬タクロリムスとピメクロリムスも臨床濃度以下で発育を阻止する^{12, 14)}。さらに KTZ と ITZ はカルシニューリン阻害薬と相乗効果を示し、*Malassezia* に対する MIC を低下させることができる。タクロリムスは抗真菌作用以外にも、マラセチアアレルギー遺伝子発現を抑制させるなどユニークな作用を示す。

文 献

- 1) Guého E, Midgley G, Guillot J: *Antonie Van Leeuwenhoek* **69**: 337-355, 1996.
- 2) Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Nishikawa A: *J Clin Microbiol* **40**: 1363-1367, 2002.
- 3) Sugita T, Takashima M, Kodama M, Tsuboi R, Nishikawa A: *J Clin Microbiol* **41**: 4695-4699, 2003.
- 4) Sugita T, Tajima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A: *Microbiol Immunol* **48**: 579-583, 2004.
- 5) Hirai A, Kano R, Makimura K, Duarte ER, Hamdan JS, Lachance MA, Yamaguchi H, Hasegawa A: *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 623-627, 2004.
- 6) Kaneko T, Makimura K, Onozaki M, Ueda K, Yamada Y, Nishiyama Y, Yamaguchi H: *Med Mycol* **43**: 699-704, 2005.
- 7) Sugita T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Shinoda T, Nishikawa A: *J Clin Microbiol* **39**: 3486-3490, 2001.
- 8) Morishita N, Sei Y, Sugita T: *Mycopathologia* **161**: 61-65, 2006.
- 9) Tajima M, Sugita T, Nishikawa A, Tsuboi R: submitted
- 10) Sugita T, Kodama M, Saito M, Ito T, Kato Y, Tsuboi R, Nishikawa A: *J Clin Microbiol* **41**: 3022-3027, 2003.
- 11) Sugita T, Tajima M, Amaya M, Tsuboi R, Nishikawa A: *Microbiol Immunol* **48**: 755-759, 2004.
- 12) Sugita T, Tajima M, Ito T, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A: *J Clin Microbiol* **43**: 2824-2829, 2005.
- 13) Sugita T, Tsuboku H, Tajima M, Tsuboi R, Nishikawa A: *Microbiol Immunol* **50**: 625-627, 2006.
- 14) Sugita T, Tajima M, Tsuboku H, Tsuboi R, Nishikawa A: *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 2897-2898, 2006.