

アトピー性皮膚炎患者に高頻度で定着する *Malassezia* の rRNA 遺伝子多型解析

杉 田 隆

明治薬科大学微生物学教室

要 旨

好脂性酵母 *Malassezia* は、癬風、脂漏性皮膚炎あるいはアトピー性皮膚炎 (AD) の原因・増悪菌種である。現在、本属には11菌種が存在する。このうち、*M. globosa* および *M. restricta* が大部分のAD患者皮膚に定着していることから、ADの増悪にはこの2菌種が重要な役割を演じていると考えられる。これらの2菌種のrRNA遺伝子中のIGS領域を解析したところ、いずれの菌種にも多型が存在し、それぞれの多型は患者と健常人に対応していた。また各多型間で、抗真菌薬 (イトラコナゾール/ケトコナゾール) に対する感受性は異なっていた。従来、rRNA遺伝子は微生物の分類・同定に広く用いられてきたが、*Malassezia* に関しては、rRNA遺伝子の新しい解析意義が存在することが示された。

Key words: アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis), マラセチア (*Malassezia*), IGS (intergenic spacer), rRNA 遺伝子 (ribosomal RNA gene)

はじめに

好脂性酵母 *Malassezia* の分類は1996年にパスツール研究所の Guého らにより大幅に改訂され、従来の3菌種から7菌種となった¹⁾。その後、著者ら²⁻⁴⁾と Hirai ら⁵⁾ が相次いで新種を記載したことから、現在では11菌種が存在している (Fig. 1)。*Malassezia* の分類の進歩および新種の発見にはrRNA遺伝子解析の多大な貢献がある。この新分類に従って各種皮膚疾患と菌種の解析が行われ、それぞれの原因・増悪菌種が明らかになりつつある。著者ら⁶⁾ は非培養検出法を新たに開発し、アトピー性皮膚炎 (AD) 患者皮膚に常在する *Malassezia* の菌相を高精度に解析してきた。その結果、*M. globosa* と *M. restricta* が主要なフローラであったことから、菌学的にはこれら両菌種あるいはいずれかの菌種がADの増悪に関与していると考えられる。

一方、rRNA遺伝子は、真菌のみならず細菌を含めたあらゆる微生物の分類・同定に幅広く用いられている。特に、真菌においては、rRNA遺伝子解析技術が導入されてきてからは、格段にその同定が容易になってきた。著者らは、rRNA遺伝子の中でIGS (intergenic spacer) と呼ばれる領域を解析したところ、分類・同定以外の新たな解析意義を見出した。本稿では、*Malassezia* における 1) IGS領域の多様性、2) IGS解析と疾患、3) IGS解析と薬剤感受性、4) 著者らが発見した *Malassezia* の

新種について紹介する。

1. rRNA 遺伝子多型

1) IGS領域の多様性

真菌のrRNA遺伝子は、18S (small subunit), 5.8S, 26S (large subunit), および5Sの4つのサブユニット、また、18Sと26Sの間にITS (internal transcribed spacer), 26Sと18Sの間にIGS (intergenic spacer) 領域が存在する。Fig. 2に *M. globosa* のrRNA遺伝子を示した。4つのサブユニットの長さは、菌種にかかわらずほぼ同じである。一方、ITSおよびIGSは、菌種により長さは著しく異なる。特にIGSの長さの差は顕著である。*M. globosa* のIGS1は400~500bpで *Candida albicans* の約1/10程度の長さである (Fig. 3)。Fig. 4に様々な菌種間のITSおよびIGSのDNA塩基配列の類似度 (%) を示す。ITSの類似度が99%を示す菌種間では、IGSは95%を示すが、ITSが98%にわずかに1%低下するだけで、IGSは50%程度まで類似度が低下することから、同一種内におけるIGS塩基配列は非常に多様化していることがわかる。このことから、IGS解析は一般的な同定には適さないが、種内多様性を解析するには適していると考えられる⁷⁻⁹⁾。

2) AD患者および健常人由来の *Malassezia* IGS1 配列

M. globosa および *M. restricta* はAD患者のみならず健常人においても主要なフローラである。両者に定着している両菌種のIGS配列を網羅的に解析したところ興味深い配列を見出した^{10, 11)}。*M. globosa* はIGS配列中に (CT)_n および (GT)_n、*M. restricta* は (CA)_n および

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

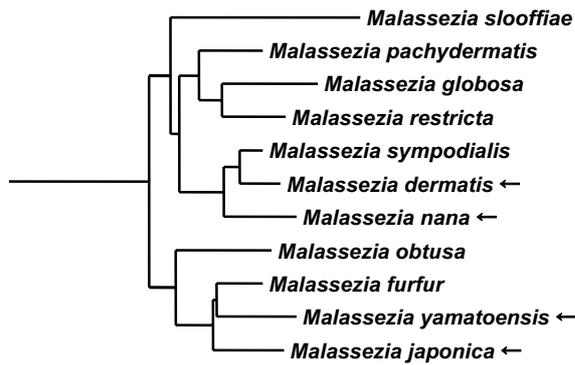


Fig. 1. Molecular phylogenetic tree of the eleven currently accepted *Malassezia* species. The tree was constructed using D1/D2 26S rDNA sequences.

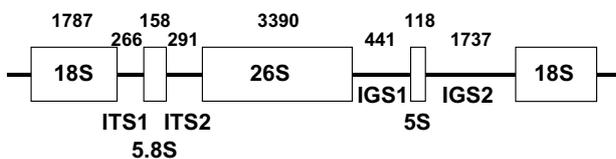


Fig. 2. Schematic representation of the rDNA locus in *Malassezia globosa*.

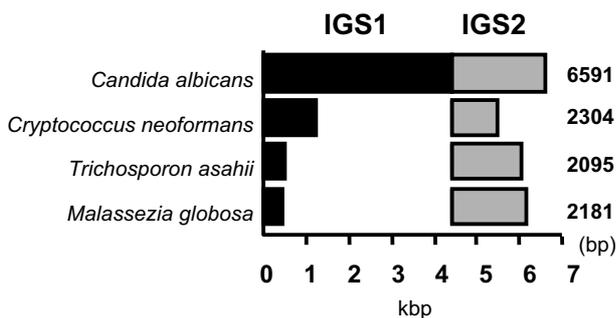


Fig. 3. IGS 1 and 2 regions of pathogenic yeasts.

(CT)_nの反復配列 (SSR, short sequence repeat) がそれぞれ存在していた。SSR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。例えば、*M. globosa*ではCTが3~11回繰り返されているが、AD患者ではn=8が全体の約70%をしめているのに対して、健康人はn=3~11に広く分布していた。*M. globosa*および*M. restricta*の全IGS1塩基配列を用いて分子系統樹を作成したところ、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 (Figs. 5, 6)。このことは、両菌種とも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。

2. IGS 解析と薬剤感受性

上述した通りIGS多型は、AD患者と健康人に対応している。更にこの多型株が抗真菌薬に対する感受性と相関するか検討した。抗真菌薬の投与を受けていないAD患者および健康人から*M. globosa*を分離し、ケトコナ

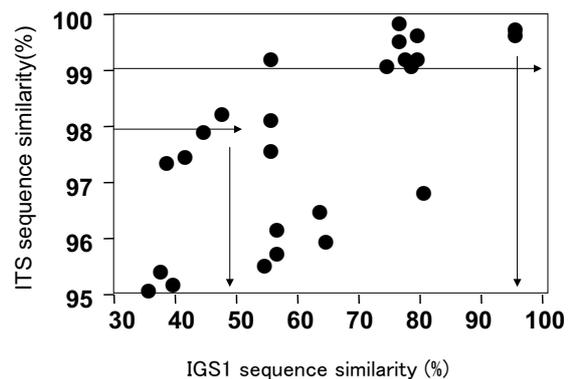


Fig. 4. The relationship based on the similarities of the combined ITS 1 and 2 sequences, and IGS1 sequences.

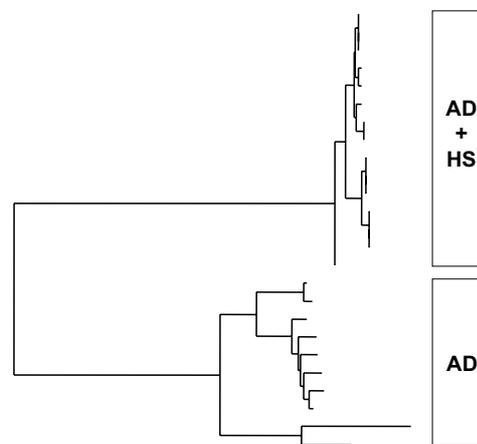


Fig. 5. Phylogenetic tree of *M. restricta* colonizing the skin surfaces of AD patients and healthy subjects based on DNA sequences of the IGS 1 region. The susceptibility of each genotypic strain to itraconazole is also shown. AD, atopic dermatitis patient; HS, healthy subject.

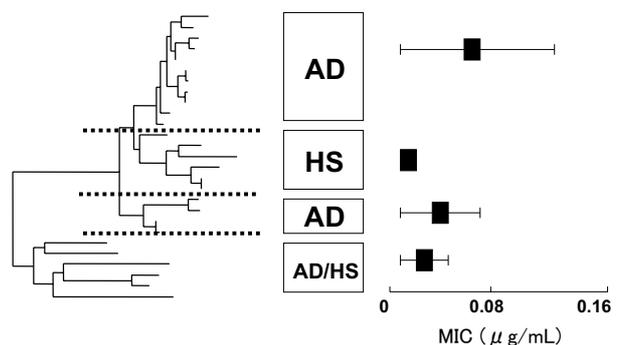


Fig. 6. Phylogenetic tree of *M. globosa* colonizing the skin surfaces of AD patients and healthy subjects based on DNA sequences of the IGS 1 region. AD, atopic dermatitis patient; HS, healthy subject.

ゾールとイトラコナゾールに対する最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。両薬剤とも優れた感受性を示したが、AD患者由来の特定の遺伝子型株が他の遺伝子型よりMICが高かった (Fig. 6)。*M. restricta*についても健

Table 1. Detection of new *Malassezia* species in patients with atopic dermatitis, and seborrheic dermatitis, and a healthy subject.

Species	Detection (%)		
	AD	SD	HS
<i>M. dermatis</i>	16	36	23
<i>M. yamatoensis</i>	14	10	5
<i>M. japonica</i>	33	13	23
<i>M. furfur</i>	41	7	27

AD, atopic dermatitis patient; SD, seborrheic dermatitis patient; HS, healthy subject.

常人群よりもAD群の方がMICが高かった。このことからIGS多型は薬剤感受性にも相関することが示された¹²⁾。

3. 新しい *Malassezia*

これまでに、著者らは *Malassezia* の菌相解析中に新しい *Malassezia* 属菌種を見い出してきた。2002年に順天堂大学皮膚科のアトピー性皮膚炎患者から、また2004年に東京医科大学皮膚科の脂漏性皮膚炎患者から分離した菌株に対して、それぞれ *M. dermatis*²⁾ および *M. yamatoensis*⁴⁾ と命名した。また、2003年には本学の健常人学生から *M. japonica* を分離した³⁾。これらの新菌種の患者および健常人皮膚への定着を非培養法を用いて検討したところ、新菌種の検出率は5~36%であった。*M. globosa* や *M. restricta* に比べれば低い検出率であるが *M. furfur* とほぼ同程度である (Table 1)。その他、日本大学の Hirai ら⁵⁾ により動物から新種 *M. nana* が分離されている。わずか数年の間に、4菌種も分離されていることから今後も継続して新種が分離される可能性がある。

本研究は、東京医科大学皮膚科学教室 坪井良治教授との共同研究として実施したものです。

参考文献

- 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* **40**: 1363-1367, 2002.
- 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: A new yeast, *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) 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.
- 7) Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, Matsushima T, Shinoda T: Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *J Clin Microbiol* **40**: 1826-1830, 2002.
- 8) Sugita T, Ikeda R, Shinoda T: Diversity among strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* as revealed by a sequence analysis of multiple genes and a chemotype analysis of capsular polysaccharide. *Microbiol Immunol* **45**: 757-768, 2001.
- 9) Sugita T, Takeo K, Ohkusu M, Virtudazo E, Takashima M, Asako E, Ohshima F, Harada S, Yanaka C, Nishikawa A, Majoros L, Sipiczki M: Fluconazole-resistant pathogens *Candida inconspicua* and *C. norvegensis*: DNA sequence diversity of the rRNA intergenic spacer region, antifungal drug susceptibility, and extracellular enzyme production. *Microbiol Immunol* **48**: 761-766, 2004.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.

Genotype Analysis of the rRNA Gene of *Malassezia* Colonizing the Skin Surface of Patients with Atopic Dermatitis

Takashi Sugita

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

Malassezia species are associated with pityriasis (tinea) versicolor, seborrheic dermatitis, and atopic dermatitis. Presently, eleven species are accepted in the genus *Malassezia*. Of these, *M. globosa* and *M. restricta* colonize the skin surface in atopic dermatitis patients, suggesting that they play a significant role in exacerbating the condition. The two species have different genotypes in the intergenic spacer (IGS) region of the rRNA gene, which correspond to patients and healthy individuals. In addition, the antifungal susceptibilities of the genotypic strains to itraconazole and ketoconazole differ. We found a new analytically significant role of the rRNA gene in *Malassezia* species, in addition to its use for fungal taxonomy and identification.

この論文は、第48回日本医真菌学会総会の“シンポジウム2：マラセチアの基礎と臨床”において発表されたものです。