

# 高齢者顔面における常在真菌マラセチアのフローラ ——脂漏性角化症との関連について

筑波大学人間総合科学研究科 六町皮フ科クリニック

伴野 朋裕

Seborrheic keratoses (SK) are verrucous dark-brown nodules or elevated macules, which develop on the face and the body mainly in elderly patients. They are often multiple in seborrheic areas and show epidermal proliferation with hyperkeratosis. Lipophilic yeasts of the genus *Malassezia* are members of the normal human cutaneous microflora and are also associated with several skin diseases including atopic dermatitis and seborrheic dermatitis. We investigated the roles of genus *Malassezia* in SK by microflora analysis using nested PCR. *Malassezia obtusa* and *Malassezia slooffiae* were preferentially detected in SK group. Aging and a lack of face cleansing are important factors in the detection rate for both species. DNA microarray analysis in normal human keratinocytes incubated with *Malassezia slooffiae* for 24 hours revealed transcriptional changes toward epidermal proliferation, keratinization, and up-regulation of lipid metabolism, which provide beneficial environments for the growth of *Malassezia* spp.

## 1. 緒言

高齢化社会となり高齢者の美容に対する関心が高まっているなか、中年以降に顔面に多発する脂漏性角化症（老人性いぼ）は多くの人々を悩ませている。脂漏性角化症の発生には古くから紫外線の影響が言われているが、脂漏性角化症は非露光部にも多発することから紫外線以外の因子もその発生に関与していると思われる。脂漏性角化症は黒褐色のいぼ状外観のため老人様顔貌の象徴ともなっているが、脂漏性角化症を予防ないし治療したいと希望する高齢者は少なくない。したがって、脂漏性角化症の発生機序を明らかにすることは高齢化社会において無視できない課題である。

最近、マラセチア (*Malassezia*) 族がアトピー性皮膚炎や脂漏性皮膚炎の増悪因子であることが明らかとなってきた<sup>1)</sup>。脂漏部位に好んで常在するマラセチア族が表皮ケラチノサイトに対して様々なサイトカインの分泌を誘導し皮膚炎を惹起する病態が推測されている<sup>2,3)</sup>。本研究では、高齢者の顔面におけるマラセチア族のフローラをタイピング（菌相解析）するとともに、特に脂漏部位において老人性色素斑が隆起しやすく脂漏性角化症が多発することに着目し、老人の顔面にみられる脂漏性角化症とマラセチア族の関連を調べた。マラセチア族の菌相解析は培養法が主流であったが、マラセチア族は培養が困難でありフローラの解析にあたっては培地など発育条件の違いのために培養法

では検出率にかなりのばらつきがみられる。一方、最近、杉田らによって開発されたマラセチアの rRNA 遺伝子解析による菌種同定は発育条件によらず菌相解析が可能な有意義な方法であり<sup>1)</sup>、本研究では主にこの方法を用いた。

次に、マラセチアによってヒトの表皮細胞がどのように遺伝子発現を変化させるのか調べる目的で、DNA マイクロアレイを用いてマラセチアと共培養したケラチノサイトの転写プロファイリングを行った。

## 2. 実験方法

### 2-1 対象と観察

顔面片側に径 5 mm 以上の脂漏性角化症が 6 個以上多発する 60 歳以上の男女のうち同意を得た方を対象とした。対照として 60 歳以上であるが顔面に脂漏性角化症が少ない方に協力いただいた。被験者には日光暴露の有無、入浴や洗顔の頻度と方法、石鹸使用の有無などについて問診するとともに、写真撮影とダーマスコープによる観察を行い、顔面以外の脂漏部位（頭皮、腋窩、臍周囲など）についても観察した。

### 2-2 マラセチアの菌相解析

被験者の顔面頬部生え際付近からオプサイト®（医療用滅菌シール）貼付により皮膚表層の常在真菌を採取して DNA を抽出した。現在まで知られている 11 種のマラセチアのうち動物のみに検出される *M. pachydermatitis* と *M. nana* を除く 9 種のマラセチアについて、rRNA 遺伝子の IGS (intergenic spacer) あるいは ITS (internal transcribed spacer) 領域に設計した各種マラセチアに特異的なプライマー（表 1）を用いて nested PCR を行った。菌株分離のためにはクロモアガーマラセチア / カンジダ生培地®（関東化学）による培養と PCR による菌種同定を併用した。



*Malassezia* microflora on the senile face associated with seborrheic keratoses

Tomohiro Banno

Tsukuba University Graduate School of Comprehensive Human Sciences, Rokucho Skin Clinic

### 2-3 培養ヒト正常ケラチノサイトにおける転写プロファイリング

ヒト正常ケラチノサイトを Keratinocyte growth medium (KGM) で第3パッセージまで培養し keratinocyte basal medium (KBM) に培地を交換した。マラセチアの菌相解析により脂漏性角化症と関連がありそうな特定のマラセチア族を同定し、ケラチノサイトと共培養したものを実験群としてDNAマイクロアレイを用いて解析した。本研究の中間報告で示したように培養ケラチノサイトは細胞密度依存性に遺伝子発現を大きく変化させる。このような培養にともなう遺伝子発現変化を除外するため実験群と同時進行でケラチノサイトを単独培養したものを対照群とした。マラセチア感染から24時間後にRNAを抽出し、mRNA選択、cDNA変換、cRNA合成を経て等量の標識RNAをAffymetrix社GeneChipにハイブリダイゼーションした。マラセチア感染の他は実験群と対照群ですべての条件を統一した。シグナルは標準化し、Data Mining Toolを用い

てデータを抽出、比較した。統計学的に有意な発現変化を示す遺伝子を選択し、分子機能により分類してプロファイリングした。

## 3. 結果

### 3-1 脂漏性角化症の観察

症例群17名(平均年齢76.6±8.5)、健常群17名(平均年齢70.1±7.4)について調査した。長期日光暴露を受けていた例では老人性色素斑が多発する傾向があった。このような症例ではしばしば老人性色素斑から脂漏性角化症への移行像を見ることがあり、脂漏性角化症は扁平隆起性のものが多い(図1a)。老人性色素斑は顔面のどこにでも生じるようであるが、脂漏性角化症は毛髪生え際付近の頬部、眉毛付近、鼻のわき、外耳道など脂漏部位優位に分布する傾向がある(図1b)。老人性色素斑と脂漏性角化症の区別が必ずしも容易でないものもあるが、拡大写真やダーモスコープで確認すると脂漏性角化症は顆粒状ないし乳頭

表1 nested PCRに用いた各種 *Malassezia* 特異的プライマー

Species and		Sequence (5' → 3')	Annealing temp. (°C)
1st PCR for six <i>Malassezia</i> species (a)	Forward	ATCCTTTGCAGACGACTTGA	55
	Reverse	TGCTTAACTTCGGAGATCGG	
1st PCR for three <i>Malassezia</i> species (b)	Forward	ACCTGCAGAAGGATCATTAGTGA	56
	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATG	
2nd PCR for each <i>Malassezia</i> species			
<i>M. dermatis</i>	Forward	CGCACCTTGCCTCCATGGT	58
	Reverse	AGCCTGGTTTCCCAGGCAGCGG	
<i>M. furfur</i>	Forward	TGTGTACCATAGGCACCCAC	58
	Reverse	CACGGTGATAAAGGGATGCA	
<i>M. globosa</i>	Forward	TCGAGTGCATACCACACTCGAG	57
	Reverse	TACGGTGCTTTCACGGTTCT	
<i>M. japonica</i>	Forward	CGTATGTGGATCTTATCCTAT	44
	Reverse	TGACTAGTGTCGTAGGCACGGTA	
<i>M. obtusa</i>	Forward	CATGGTCCATCTCCCACACA	60
	Reverse	AGAGAGTGCGTGGCGCATGGT	
<i>M. restricta</i>	Forward	CGACCTAGTCGACTACATCCTACT	55
	Reverse	TTCGGAGATACAAGCCTCCAT	
<i>M. slooffiae</i>	Forward	ACGCACGCTAACACAACGTG	60
	Reverse	TGTGCGATTCTGAAGCGCACA	
<i>M. sympodialis</i>	Forward	CGCACCTTGCCTCCATGGT	58
	Reverse	GGTACAATCCCCAGGCAGCAA	
<i>M. yamatoensis</i>	Forward	CGATCAAACCTTCTCTGTGTCCAG	59
	Reverse	TGTGTGGGAGGTAGAAGAGGCA	

(a) *M. furfur*, *M. globosa*, *M. japonica*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. yamatoensis*

(b) *M. dermatis*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*

腫状に隆起しており、表面に鱗屑が付着して角化性であることがわかる (図 1c, d)。顔面以外について観察すると、非露光部である腹部の溝に脂漏性角化症が多発する例 (図 2a) や代表的な脂漏部位である頭皮に脂漏性角化症が多発する症例 (図 2b) があつた。腋窩付近の側胸部に脂漏性角化症と癩風様の紅褐色斑が共存する場合もあり (図 2c)、この紅褐色斑を擦過すると多量の鱗屑が得られ、KOH 検鏡で菌糸 (後にマラセチアと同定) を確認できた (図 2d)。図 2a～c の症例はいずれも多汗ないしあぶら症と自覚しており、脂漏性角化症の発生と汗や脂質を好むマラセチア

族との関連を想起させる。図 2e の症例は入浴の際にほとんど石鹸を用いないという方であるが、臍と臍周囲に脂漏性角化症が多発していた。特に臍の脂漏性角化症は油粕のような厚い鱗屑があかつき状に付着しており、ここからも多種のマラセチアが検出された。

### 3-2 マラセチア族の菌相解析

マラセチアの rRNA 遺伝子について nested PCR により菌種同定し (図 3a)、クロモアガーマラセチア / カンジダ生培地<sup>®</sup> を用いた培養で各マラセチアを分離した (図 3b)。

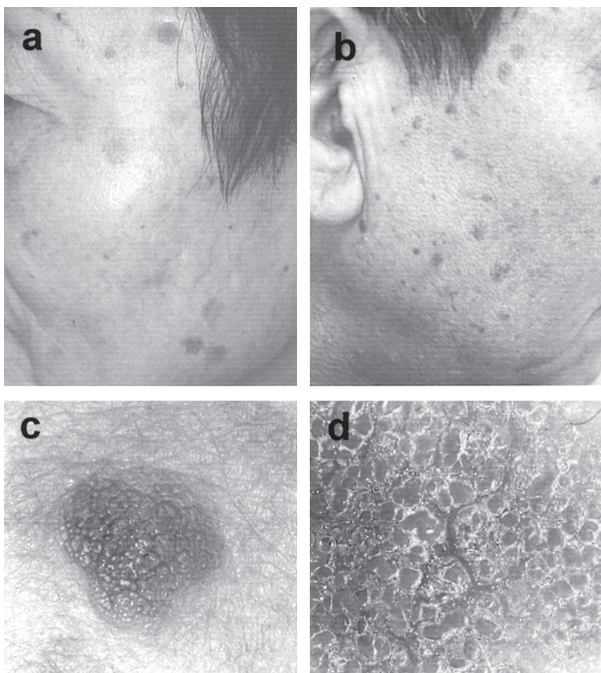


図 1 顔面に生じた脂漏性角化症の観察  
a: 長期日光暴露者に生じた脂漏性角化症 b: 脂漏部位である生え際と外耳道に脂漏性角化症が多発する例 c: 脂漏性角化症の拡大像 d: ダーモスコープによる脂漏性角化症の観察

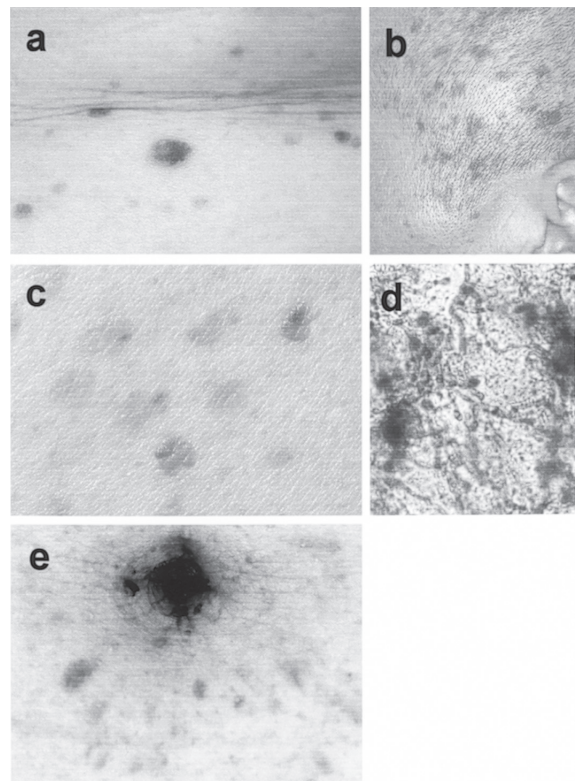


図 2 顔面以外に生じた脂漏性角化症の観察  
a: 腹部の皺溝に多発する脂漏性角化症 b: 被髪頭部に多発する脂漏性角化症  
c: 腋窩付近に多発する脂漏性角化症と癩風様紅褐色斑 d: KOH 検鏡で菌糸を確認  
e: 臍と臍周囲に多発する脂漏性角化症 (入浴の際にほとんど石鹸を用いない例)

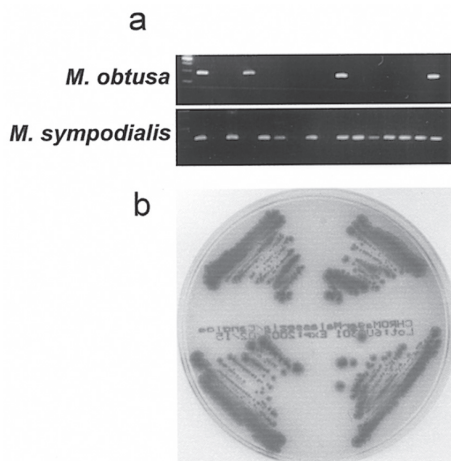


図 3 マラセチアフローラの菌相解析  
a: PCR によるマラセチアの菌相解析 b: クロモアガーマラセチア / カンジダ生培地<sup>®</sup> を用いたマラセチアの分離培養

被験者のプロフィールと菌相解析の結果を表2に示す。顔面に脂漏性角化症が少ない健常群の高齢者でも複数のマラセチア族がフローラを形成していた。特に *M. globosa*, *M. sympodialis*, *M. dermatis* は両群を通じて検出率が高かった(表3)。一方、*M. obtusa* と *M. slooffiae* は症例群と健常群における検出率の差が顕著であった(*M. obtusa*, *M. slooffiae* とも症例群における検出率が65%で健常群の3.6倍)。年齢が高齢であるほど多種のマラセチアが検出される傾向があり、女性よりも男性に、外来患者より入院患者に多種のマラセチアが検出された。また、洗顔頻度の少ない者、石鹸を使用しない者にマラセチアが多く検出される傾向があった。

### 3-3 DNAマイクロアレイを用いた転写プロファイリング

*M. slooffiae* とヒト正常ケラチノサイトを24時間共培

養し、DNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現をプロファイリングした。*M. slooffiae* 感染ケラチノサイトは細胞周期関連遺伝子やDNA合成に関わる遺伝子の発現を一斉に増加させた。一方、細胞周期抑制性分子の発現は低下した(表4)。どちらの変化もケラチノサイトを増殖性にするものと思われる。ケラチノサイトの分化関連遺伝子群は発現増強した(表5)。角化に関する代表的な分化マーカーである transglutaminase 1, involucrin, loricrin, filaggrin は2倍以上の増加であったが、small proline-rich protein, S100A protein, 分化関連蛋白分解酵素である各種 kallikrein は比較的軽度の上昇を示した。分化型ケラチンである keratin 1,10 の増加と、角化開始前の表皮基底層で主に発現する keratin 15 の減少もマラセチアと共培養したケラチノサイトが分化傾向を示すことを意味する。また、主に基底層のケラチノサイトが産生するコラー

表2 被験者のプロフィールとマラセチア菌相解析結果

No.	年齢	性	区分	洗顔	石鹸	SL	SK	G	Sy	D	R	Y	F	J	O	SI	備考
1	70	M	外来	毎日	不使用	多	多	●	●	●	●				●		
2	73	M	外来	稀	不使用	多	多	●		●					●		日光
3	65	M	外来	毎日	使用	多	多	●	●	●	●						SD
4	75	M	外来	毎日	不使用	多	多	●	●	●	●				●	●	
5	81	F	外来	毎日	不使用	多	多	●	●	●	●			●		●	
6	76	M	外来	毎日	使用	多	多	●	●			●		●			
7	72	M	外来	毎日	使用	多	多	●	●	●		●	●		●		
8	71	M	外来	稀	不使用	多	多	●	●	●	●					●	
9	84	M	外来	毎日	使用	多	多	●	●		●						日光
10	79	F	外来	毎日	不使用	多	多	●	●						●	●	
11	69	M	外来	毎日	不使用	少	多	●	●	●	●					●	
12	75	F	入院	2/週	不使用	少	多	●	●	●					●	●	
13	93	M	入院	2/週	不使用	多	多	●	●	●			●		●	●	
14	86	F	入院	2/週	不使用	多	多	●	●	●			●		●	●	
15	91	M	入院	2/週	不使用	多	多	●	●	●	●	●			●	●	
16	63	F	入院	2/週	不使用	多	多	●	●	●			●		●	●	
17	79	M	入院	2/週	不使用	多	多	●	●	●			●		●	●	
18	66	F	外来	毎日	使用	少	少	●									
19	65	M	外来	毎日	使用	少	少	●	●	●	●						SD
20	65	M	外来	毎日	使用	少	少	●		●							
21	62	M	外来	毎日	使用	少	少	●		●							
22	63	F	外来	毎日	使用	少	少	●		●							
23	73	F	外来	毎日	不使用	少	少	●	●	●		●	●	●			
24	74	F	外来	毎日	使用	多	少	●	●	●							日光
25	68	F	外来	毎日	使用	多	少	●		●	●						
26	66	F	外来	毎日	使用	少	少	●	●		●						
27	72	M	外来	毎日	不使用	少	少	●	●	●					●		
28	62	M	外来	毎日	使用	少	少	●	●		●						
29	64	F	外来	毎日	使用	少	少	●	●	●	●						
30	76	M	外来	毎日	不使用	少	少	●	●	●	●		●		●		SD
31	68	M	外来	毎日	使用	少	少	●	●		●	●					
32	83	M	入院	2/週	不使用	少	少	●	●	●		●			●	●	
33	77	F	入院	2/週	不使用	少	少	●	●	●				●		●	
34	87	F	入院	2/週	不使用	少	少	●	●	●						●	

SL : Senile Lentigo (老人性色素斑), SK : Seborrheic Keratosis (脂漏性角化症),

SD : Seborrheic dermatitis (脂漏性皮膚炎)

日光 : 長期日光暴露歴あり

G : *M. globosa*, Sy : *M. sympodialis*, D : *M. dermatis*, R : *M. restricta*, Y : *M. yamatoensis*, F : *M. furfur*, J : *M. Japonica*, O : *M. obtusa*, SI : *M. slooffiae*

● : 検出

表3 脂漏性角化症群と健常群における各種*Malassezia*族の検出率

Species	Detection (%)	
	SK	HS
<i>M. dermatis</i>	82	71
<i>M. furfur</i>	35	18
<i>M. globosa</i>	100	100
<i>M. japonica</i>	12	12
<i>M. obtusa</i>	65	18
<i>M. restricta</i>	47	41
<i>M. slooffiae</i>	65	18
<i>M. sympodialis</i>	94	71
<i>M. yamatoensis</i>	18	12

SK：脂漏性角化症群（症例群）

HS：健常群

表4 細胞周期関連分子の遺伝子発現変化

Symbol	Gene	Signal	S.L.R.	Change	Function
CCNA1	cyclin A1	136	0.8	Up	Cell cycle
CCNA2	cyclin A2	202	0.6	Up	Cell cycle
CCNB1	cyclin B1	1305	0.7	Up	Cell cycle
CCNB2	cyclin B2	697	0.6	Up	Cell cycle
CDC2	cell division cycle 2	788	0.5	Up	Cell cycle
CDC20	CDC20 541		0.5	Up	Cell cycle
CDC25B	cell division cycle 25B	412	0.7	Up	Cell cycle
CDC2L1	cell division cycle 2-like 1	461	0.5	Up	Cell cycle
CDKN3	cyclin-dependent kinase inhibitor 3	393	0.5	Up	Cell cycle
CENPA	centromere protein A	349	0.5	Up	Cell cycle
DEEPEST	mitotic spindle coiled-coil related protein	176	0.6	Up	Cell cycle
G0S2	putative lymphocyte G0/G1 switch gene	365	1.2	Up	Cell cycle
GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1	62	0.5	Up	Cell cycle
KIAA0165	extra spindle poles	136	0.6	Up	Cell cycle
KIF13B	kinesin family member 13B	58	1	Up	Cell cycle
MAD2L1	MAD2 like 1	604	0.5	Up	Cell cycle
MPHOSPH6	M-phase phosphoprotein 6	1218	0.5	Up	Cell cycle
KATNB1	katanin p80 subunit B 1	663	0.5	Up	Cell cycle
PLK	polo (Drosophila)-like kinase	177	0.5	Up	Cell cycle
BUB1	BUB1	257	0.5	Up	Cell cycle
BUB1B	BUB1B	275	0.5	Up	Cell cycle
AMPD3	adenosine monophosphate deaminase 3	392	0.7	Up	DNA synthesis
DNASE1L3	deoxyribonuclease I-like 3	115	0.8	Up	DNA synthesis
RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	911	0.6	Up	DNA synthesis
UP	uridine phosphorylase	226	0.8	Up	DNA synthesis
H1F0	H1 histone family, member O	811	0.5	Up	Histone
H2AFL	H2A histone family, member L	138	0.7	Up	Histone
H2AFO	H2A histone family, member O	2580	0.6	Up	Histone
H2BFQ	H2B histone family, member Q	343	0.5	Up	Histone
CDKN2B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	253	-0.5	Dn	Cell cycle inhibitor
GAS1	growth arrest-specific 1	228	-0.5	Dn	Cell cycle inhibitor
GAS6	growth arrest-specific 6	796	-0.5	Dn	Cell cycle inhibitor
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible	317	-0.6	Dn	Cell cycle inhibitor
RAB27B	RAB27B, member RAS oncogene family	72	1.1	Up	Ras pathway
RAB9	RAB9, member RAS oncogene family	867	0.6	Up	Ras pathway
SSPN	sarcospan (Kras oncogene-associated)	80	0.7	Up	Ras pathway
NDRG1	N-myc downstream regulated	3093	0.7	Up	Myc pathway
NDRG2	N-myc downstream-regulated gene 2	233	0.9	Up	Myc pathway
NOTCH2	Notch (Drosophila) homolog 2	332	0.5	Up	Notch pathway
NOTCH3	Notch (Drosophila) homolog 3	319	0.7	Up	Notch pathway

S. L. R : Signal Log Ratio, Log (Log2) 比

表5 ケラチノサイト分化関連分子の遺伝子発現変化

Symbol	Gene	Signal	S.L.R.	Change	Function
TGM1	transglutaminase 1	214	1.2	Up	Cornification
IVL	involucrin	622	1.3	Up	Cornification
LOR	loricrin	153	2.2	Up	Cornification
FLG	filaggrin	497	2.9	Up	Cornification
KLK7	kallikrein 7	732	0.9	Up	Cornification
KLK8	kallikrein 8	664	0.6	Up	Cornification
KLK10	kallikrein 10	3174	1	Up	Cornification
KLK11	kallikrein 11	488	1	Up	Cornification
CDSN	corneodesmosin	355	2	Up	Cornification
ANXA9	annexin A9	56	1.9	Up	Cornification
ARS	ARS component B	161	1.7	Up	Cornification
SPRK	Small proline-rich protein SPRK	10986	0.5	Up	Cornification
S100A4	S100 calcium-binding protein A4	278	0.6	Up	Cornification
S100A7	S100 calcium-binding protein A7	564	4.6	Up	Cornification
S100A8	S100 calcium-binding protein A8	12728	0.7	Up	Cornification
S100A9	S100 calcium-binding protein A9	6634	1.8	Up	Cornification
SCEL	sciellin	186	0.7	Up	Cornification
KRT1	keratin 1	3338	1.2	Up	keratin
KRT10	keratin 10	4898	0.6	Up	keratin
KRT15	keratin 15	823	-0.5	Dn	keratin
COL4A1	collagen, type IV, alpha 1	862	-0.8	Dn	ECM
COL4A2	collagen, type IV, alpha 2	1517	-0.5	Dn	ECM
COL5A1	collagen, type V, alpha 1	305	-0.6	Dn	ECM
COL5A2	collagen, type V, alpha 2	418	-0.5	Dn	ECM
P4HA2	procollagen-proline	1925	-0.5	Dn	ECM
PLOD2	procollagen-lysine	391	-0.5	Dn	ECM
CSPG4	chondroitin sulfate proteoglycan 4	62	-0.5	Dn	ECM
EFEMP1	EFEMP1	819	-0.5	Dn	ECM
MATN2	matrilin 2	312	-0.7	Dn	ECM
SDC2	syndecan 2	52	-0.5	Dn	ECM
DSC1	desmocollin 1	2101	0.8	Up	Desmosomal
DSG1	desmoglein 1	2185	0.6	Up	Desmosomal
ALOX12B	arachidonate 12-lipoxygenase	170	1.7	Up	Prostaglandin pathway
ALOX15B	arachidonate 15-lipoxygenase	178	1.7	Up	Prostaglandin pathway
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	474	0.5	Up	Prostaglandin pathway
PLA2G4A	phospholipase A2, group IVA	520	0.5	Up	Prostaglandin pathway
UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	872	0.7	Up	Lipid metabolism
AKR1C1	aldo-keto reductase family 1C1	3144	0.6	Up	Lipid metabolism
AKR1C3	aldo-keto reductase family 1C3	758	1.3	Up	Lipid metabolism
HSD17B2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	105	2	Up	Lipid metabolism
SULT2B1	sulfotransferase family	361	1.1	Up	Lipid metabolism
GCH1	GTP cyclohydrolase 1	354	0.5	Up	Lipid metabolism
PPT2	palmitoyl-protein thioesterase 2	129	0.7	Up	Lipid metabolism

ゲンなどの細胞外マトリックスの遺伝子発現はいっせいに低下した。このこともケラチノサイトが basalt type から supurabasal type にシフトしていることを示唆する。脂質代謝に関する遺伝子群は発現増強した (表5)。特に角化にともなう細胞間脂質の産生に関連した分子の発現増加が特徴的である。各種ケモカインや炎症性サイトカインである interleukin1 や TNF $\alpha$ 、および interferon 関連遺伝子の発現は増加した (表6)。一方、ケラチノサイトの増殖抑制作用を有する TGF $\beta$  の発現は低下した。

#### 4. 考 察

脂漏性角化症が多発している高齢者からは *M. slooffiae* と *M. obtusa* が検出されることが多く、疾患との関連が示唆された。しかし、対照群にあっても入院患者の場合は

*M. slooffiae* ないし *M. obtusa* が検出される率が高く、その要因を検討していくうちにこのふたつの菌種については、年齢、洗顔の頻度、石鹸使用の有無が特に重要な因子であることも示唆された。つまり顔面に両菌種が検出されるのはほとんどが70歳以上であり、洗顔の頻度が低く、洗顔の際に石鹸を用いない場合が多い。すでに報告されているマラセチアの菌相解析では主に若年から中年を対象にしており、実験系が異なるので本研究結果と一概に比較できないが、高齢者の方がより多種類のマラセチアが検出される印象がある。本研究の被験者においても年齢が高いほど多量のマラセチアがフローラを形成する傾向があった。特に91歳の男性入院患者では、検索した全9種のマラセチアのうち8種が検出された。高齢になるにつれ顔面の脂腺の活動が活発になることも一因かもしれない。このように年齢は顔面におけるマラセチアのフローラにおいて重要な

表6 サイトカイン関連分子の遺伝子発現変化

Symbol	Gene	Signal	S.L.R.	Change	Function
CCL27	CTACK/ILC	79	1.6	Up	Secreted, Chemokine
CXCL1	GRO $\alpha$ oncogene	739	0.9	Up	Secreted, Chemokine
CXCL2	GRO $\beta$ oncogene	90	1.1	Up	Secreted, Chemokine
CXCL10	IP-10	485	1.2	Up	Secreted, Chemokine
CXCL11	I-TAC	86	1.3	Up	Secreted, Chemokine
IL8	interleukin 8, CXCL8	287	1	Up	Secreted, Chemokine
IL1A	interleukin 1, alpha	2603	1.3	Up	Secreted
IL1B	interleukin 1, beta	1250	2.7	Up	Secreted
TNF	tumor necrosis factor	95	1.2	Up	Secreted
CSF2	colony stimulating factor 2	138	0.5	Up	Secreted
DEFB1	defensin beta 1	536	1.5	Up	Secreted
EFNA3	ephrin-A3	120	0.6	Up	Secreted
EREG	epiregulin	134	1.6	Up	Secreted
ST16	suppression of tumorigenicity 16	218	1.2	Up	Secreted
IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	318	1.6	Up	Receptor
IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	2390	1.3	Up	Receptor
IFNGR1	interferon gamma receptor 1	1925	0.5	Up	Receptor
CTGF	connective tissue growth factor	770	-1.2	Dn	Secreted
NRG1	neuregulin 1	170	-0.6	Dn	Secreted
EGF	epidermal growth factor	65	-1.1	Dn	Secreted
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	245	-0.6	Dn	Secreted
IGFBP4	insulin-like growth factor-binding protein 4	206	-0.5	Dn	Secreted
TGFB2	transforming growth factor, beta 2	92	-0.6	Dn	Secreted
LGALS9	lectin, galactoside-binding, soluble 9	58	-0.6	Dn	Secreted
NESP55	neuroendocrine secretory protein 55	97	-0.8	Dn	Secreted
SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich	776	-0.5	Dn	Secreted
IL7R	interleukin 7 receptor	123	-1	Dn	Receptor
OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1	368	0.6	Up	Interferon regulated
OASL	2'-5' oligoadenylate synthetase-like	73	0.5	Up	Interferon regulated
IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30	559	0.6	Up	Interferon-regulated
IFIT4	interferon-induced protein	233	0.9	Up	Interferon-regulated

S. L. R : Signal Log Ratio, Log (Log2) 比

因子と思われるが、高齢であるほど洗顔の頻度が減って石鹸を用いなくなる傾向があり、顔面がより脂漏性となりやすいだろう。このような年齢に伴う生活様式の変化も大きな要因と考えられる。今回調査対象にした入院施設は慢性疾患や認知症を有する高齢者をケアする施設であり、清潔維持のために入浴ではなく週に2回の清拭が行われていた。顔面の清拭には石鹸を使用しないとのことである。高齢者が顔面清潔保持に無頓着になる傾向は女性よりも男性に顕著であるが、認知症を有する場合は男女を問わず清潔保持は介護者に大きく依存するようになる。今回、入院患者から多種のマラセチアが検出されたのはそのような背景があるのかもしれない。本研究で脂漏性角化症との関連が疑われた *M. slooffiae* と *M. obtusa* についても高齢化にともなう脂腺の活動亢進や石鹸を用いた洗浄の欠如により増加してくるものと考えられる。これら2菌種はおそらく脂質要求性が他のマラセチア菌種より高いのであろう。本研究ではまだ十分に検討していないが、中年ないし若年者においても何らかの理由で長期間入浴ができない場合や、入浴しても石鹸を全く使用しない場合は、これら2菌種が通常より高頻度で検出されるようである。また、脂漏部位のうち石鹸洗浄する機会の少ない外耳道からはしばしば *M. slooffiae* が検出される。

本研究で採用した nested PCR を用いた菌相解析はあくまでも定性的なものであり、菌量を反映するものではない。そこで *M. slooffiae* と *M. obtusa* が検出された症例のうち2例についてクロモアガーマラセチア培地上のコロニーをそれぞれ任意に10個選択してPCR法にて菌種の同定したところ、約8割が *M. slooffiae* であり、計20個のコロニーのなかには *M. obtusa* はひとつもなかった。このことは *M. obtusa* より *M. slooffiae* が定量的に圧倒的に多いことを意味する。以上の結果から、DNAマイクロアレイによる解析には *M. slooffiae* を選択した。DNAマイクロアレイによる転写プロファイリングの結果は、*M. slooffiae* と共培養したケラチノサイトが増殖と分化の両方に向かうことを示唆している。正常の表皮においては基底層のケラチノサイトは増殖性であるが、有棘層から顆粒層へかけてケラチノサイトが増殖を停止し分化を開始するとともに遺伝子発現も大きく変化する<sup>4,5)</sup>。したがって、増殖と分化は表皮内の各層に特異的な個別の現象であるが、乾癬に代表される炎症性角化症の表皮や今回調査対象にした脂漏性角化症では増殖と分化がともに亢進していることが知られている。ただし、今回得られた発現変化は *M. slooffiae* とケラチノサイトを共培養してから24時間後のものであり、実際に *M. slooffiae* に感染した表皮が長期的にどのような変化を示すのかは不明である。また、増殖関連や角化関連分子の発現変化は比較的軽度であった。しかし、軽微な変化であってもそれが長期にわたって持続した場合はケラ

チノサイトが角化を伴う腫瘍性増殖を示していくことがあるかもしれない。つまり洗浄不足により *M. slooffiae* がフローラの優位菌種となり、その状態が数ヶ月から数年にわたって持続すれば脂漏性角化症の発生に結びつく可能性がある。実際、長期間入浴しないことで生じるあかつき病では表皮が肥厚し脂漏性の厚い痂皮が付着するが、あかつき病の肥厚した角層からは *M. slooffiae* が検出される<sup>6)</sup>。ケモカインや炎症性サイトカインの発現誘導は比較的軽度であったが、このことはマラセチアが皮膚に恒常的にフローラを形成していく上で都合がよいただろう。あまりに強い炎症が起これば、棲家である組織が壊死してしまうか炎症によって微生物が短期間のうちに排除されてしまう可能性が高くなるからである。炎症性サイトカインである IL-1, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  は免疫応答の惹起のみならずケラチノサイトにおいて多様な遺伝子変化を生じさせる<sup>7,8)</sup>。IL-1 は増殖性のサイトカインであり、ケラチノサイトの増殖にも関与するだろう。一方、TNF $\alpha$  は炎症惹起とともにケラチノサイトの置かれた状況に応じて分化ないし細胞死のための遺伝子発現を準備する<sup>8,9)</sup>。 *M. slooffiae* に感染したケラチノサイトは細胞間脂質に関連する脂質代謝分子の発現を亢進させた。ケラチノサイトは角化に伴いオドラント小体由来の細胞間脂質を分泌して結果的に角層間に高密度の脂質を含ませる。したがって、脂質要求性の高いマラセチア族にとっては、脂質を豊富に含む角層は格好の棲家となろう。 *M. slooffiae* はケラチノサイトの遺伝子発現変化を介して表皮増殖、角化、脂質代謝のすべてを亢進させることで自らの成育環境を有利に導いているのかもしれない。

本研究では脂漏性角化症と *M. slooffiae* および *M. obtusa* の関連が示唆されたが、これら2菌種の出現には年齢、性別、洗顔頻度と方法、入院外来の区分など多数の因子が関係しており、マラセチアが存在が必ずしも脂漏性角化症の発生に直接結びつくものではないのかもしれない。脂漏性角化症のように脂漏性の厚い角質を有する状態では *M. slooffiae* および *M. obtusa* が生育しやすいということもあるだろう。つまり二次的に両菌が脂漏性角化症に生着した可能性もある。微生物が病原菌であることを証明するには「コッホの原則」を満たさなければならない。もっと症例数を増やして多変量解析を行うとともに、人工表皮や実験動物などへの接種実験も行って菌と脂漏性角化症の因果関係を確かめる必要がある。また、菌種の同定だけでなくリアルタイム PCR などによる定量的解析も必要である。最近、杉田らはアトピー性皮膚炎におけるマラセチア菌相の詳細な遺伝子解析を行い、同一菌種でも遺伝子形の違いにより病原性を示す場合があるという機序を提唱している<sup>10)</sup>。本研究においても同様の遺伝子形に関する解析が必要かもしれない。今回は主に露光部である顔面についてマラセチア族の菌相解析を行ったが、紫外線の影響を除外する



ためには非露光部における解析も必要と思われる。腋窩などの非露光部に脂漏性角化症が多発する症例をしばしば経験するのでそのような症例にも同様の解析を行っていきたい。

#### 謝 辞

PCR 法によるマラセチア菌相解析について技術的な指導をしていただいた明治薬科大学微生物学教室の杉田隆博士に深謝いたします。共同研究者である筑波大学人間総合科学研究科の佐藤寛子氏と本研究に対して終始ご支援いただいたコスメトロジー研究振興財団に感謝いたします。

#### (参考文献)

- 1) Sugita T, Suto H, Unno T, et al. Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. *J Clin Microbiol.* 39 (10) : 3486-90, 2001
- 2) Watanabe S, Kano R, Sato H, et al. The effects of *Malassezia* yeasts on cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 116 (5) : 769-73, 2001
- 3) Ishibashi Y, Sugita T, Nishikawa A. Cytokine secretion profile of human keratinocytes exposed to *Malassezia* yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 48 (3) : 400-9, 2006
- 4) Radoja N, Gazel A, Banno T, et al. Transcriptional profiling of epidermal differentiation. *Physiol Genomics.* 27 (1) : 65-78, 2006
- 5) Gazel A, Banno T, Walsh R, et al. Inhibition of JNK promotes differentiation of epidermal keratinocytes. *J Biol Chem.* 281 (29) : 20530-41, 2006
- 6) Tajima M, Amaya M, Sugita T, et al. Molecular analysis of *Malassezia* species isolated from three cases of Akatsuki disease (pomade crust) *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 46 (3) : 193-6, 2005
- 7) Banno T, Adachi M, Mukkamala L, et al. Unique keratinocyte-specific effects of interferon-gamma that protect skin from viruses, identified using transcriptional profiling. *Antivir Ther.* 8 : 541-54, 2003
- 8) Banno T, Gazel A, Blumenberg M. Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J Biol Chem.* 279 (31) : 32633-42, 2004
- 9) Banno T, Gazel A, Blumenberg M. Pathway-specific profiling identifies the NF-kappa B-dependent tumor necrosis factor alpha-regulated genes in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem.* 280 (19) : 18973-80, 2005
- 10) Sugita T, Tajima M, Amaya M, et al. Genotype analysis of *Malassezia restricta* as the major cutaneous flora in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *Microbiol Immunol.* 48 (10) : 755-9, 2004