

【特集】

イヌの外耳における*Malassezia* 属菌の保有状況と分離株の 分子生物学的解析

Occurrence and Molecular Analysis of *Malassezia* spp. in the External Ear
Canal of Dogs

千葉隆司¹、畠山薫¹、水谷浩志²、和宇慶朝昭¹、高橋由美¹、山田澄夫³、
甲斐明美¹、矢野一好¹

¹東京都健康安全研究センター、²東京都動物愛護相談センター

³東京都健康安全研究センター (現)日本生活協同組合連合会
Takashi CHIBA¹, Kaoru HATAKEYAMA¹, Hiroshi MIZUTANI²,
Tomoaki WAUKE¹, Yumi TAKAHASHI¹, Sumio YAMADA³,
Akemi KAI¹ and Kazuyoshi YANO¹

¹Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

²Tokyo Metropolitan Animal Care and Consultation Center

³Tokyo Metropolitan Institute of Public Health at the original publication,
Japan Consumers' Co-operative Union at present

要旨: *Malassezia* 属菌は、ヒトおよび動物の皮膚に常在する酵母であるが、近年、院内感染症を惹起した事例も報告されるようになってきた。そこで今回、東京都で収容された犬の外耳における*Malassezia* 属菌の保有状況と分離菌株の分子生物学的解析を試みた。

その結果、*Malassezia* 属菌は52頭のイヌのうち、33頭(63.5%)から検出された。このうち、31頭(59.6%)からrDNA塩基配列解析により*M. pachydermaitis* と同定された株が分離された。分離31株は、ITS1領域を用いた分子系統樹解析により、5系統に分類された。また、52頭中3頭から*M. japonica* 基準株との間に高い塩基類似度を示す株が3株分離された。

キーワード: 酵母、*Malassezia* 属菌、イヌ、分子系統樹

Abstract: *Malassezia* yeasts are normal skin flora of human and animals. However, hospitals have acquired infections caused by *Malassezia* spp. have been reported recently. The aim of this study was to evaluate the occurrence and DNA sequence diversity of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs in the Tokyo Metropolitan Area.

As a result *Malassezia* spp. were isolated from 33 out of 52 (63.5%) dogs. *M. pachydermaitis* was identified in 31 (59.6%) specimens by rDNA sequence analysis. These 31 isolates were classified into 5 clusters by molecular phylogenetic analysis using ITS1 region. Three isolates from 3 out of 52 specimens were found to display a high rDNA region sequence similarity to that of *M. japonica* type strain.

Keywords: Yeast, *Malassezia* spp., Dog, Molecular Phylogenetic Tree

社会的意義：*Malassezia* 属菌は、ヒトを含む恒温動物の皮膚に常在する酵母様真菌である。ヒトにおいては、以前からでん風などの起因菌として知られていたが、近年、脂漏性皮膚炎やアトピー性皮膚炎への関与が報告されている。また、海外では、*Malassezia* 属菌が高カロリー輸液を受けている易感染患者、特に新生児患者で深在性真菌症を惹起するとの報告がされ、注目されている。

一方、*Malassezia* 属菌のうち、*M. pachydermatis* は、動物を主な宿主とする菌種として知られている。本菌は、特にイヌにおける難治性外耳炎の起因菌、増悪因子と考えられており、以前から獣医学領域において注目されていた。近年、海外において本菌が動物や飼主を介して院内感染症を引き起こした事例も報告され、動物由来感染症の起因菌と考えられるようになってきた。さらに、ヒトに常在する*Malassezia* 属菌が、動物の外耳炎や皮膚炎から分離された例も報告されるようになり、ヒトと動物との間でそれぞれの常在菌が交差汚染することにより、新たな疾病の発生も懸念されている。

このように、*Malassezia* 属菌は公衆衛生上重要な真菌であることを示唆する多くの報告がありながら、我が国においては、動物の本菌保有状況などの調査報告例は少ない。そこで、2006年に東京都動物愛護相談センターに収容されたイヌを対象に、外耳における*Malassezia* 属菌の保有状況調査を行い、さらに、分離菌株の分子生物学的解析を試みた。その結果、*Malassezia* 属菌の検出率は63.5%であり、このうち、*M. pachydermatis* の検出率は59.6%であった。また、*M. japonica* 基準株との間に高い塩基類似度を示した株が3検体から分離された。

これらの結果は、我が国においてもヒトと動物との間で*Malassezia* 属菌の交差汚染が進行している可能性を示唆するものである。したがって、今後も本菌の分布を継続的に調査していくことが重要であると考えられる。

1. 緒言

Malassezia 属菌は、ヒトおよび動物の皮膚に常在する酵母様真菌で、現在、11菌種に分類されている (Sugita et al, 2003、Hirai et al., 2004)。ヒトの常在菌としては、*M. furfur*、*M. obtuse*、*M. sympodialis* などがあり、動物では*M. pachydermatis* が知られている (Sei et al, 1994)。ヒトへの影響としては、*M. furfur* がでん風やマラセチア毛包炎などを惹起することが知られているが (Sei et al., 1994)、近年、*Malassezia* 属菌の脂漏性皮膚炎やアトピー性皮膚炎への関与も報告されるようになった (Sugita et al., 2004、Sei et al, 2006)。また、病院内で使用する高カロリー輸液への混入による敗血症も報告されている (Belkum et al, 1994)。一方、動物に対しては、*M. pachydermatis* が難治性外耳炎起因菌として知られていたが、ヒトと同様にアトピー性皮膚炎への関与も報告され (Batra et al, 2005)、さらに、本菌がペットや飼い主などを介して病院内に持ち込まれ、免疫不全患者や新生児病棟内で感染症を惹起した事例も海外で報告されており (Chang et al, 1998)、人獣共通感染症の起因菌の1つとして注目されはじめている (Hirai, 2006)。

このように、*Malassezia* 属菌は公衆衛生上重要な酵母様真菌であることを示唆する多くの報告がありながら、本菌は特殊な性状を有することから、一般的な真菌検査法を用いることが難しいため、国内におけるヒトおよび動物の本菌保有状況などの調査報告例は少ない。

そこで、東京都動物愛護相談センターに収容されたイヌを対象に、外耳における*Malassezia* 属菌の保有状況と、分離菌株の分子生物学的解析を試みた。

2. 実験方法

2-1. 調査対象および材料

2006年7月から11月末までに東京都動物愛護相談センターに収容されたイヌ52頭を調査対象とした。対象犬種は、雑種33頭、柴犬9頭、ビーグル、甲斐犬およびウエルシュコーギー各2頭、ラブラドルレトリバー、シベリアンハスキー、ヨークシャーテリアおよびポインター各1頭であった。検査材料は、同センター内でこれら対象犬の外耳道内を滅菌綿棒 (Culture Swab EZ II, BBL) で拭ったものを供した。

2-2. *Malassezia* 属菌の分離および同定

(1) *Malassezia* 属菌の分離

検体を直接クロモアガーマラセチア/カンジダ培地(関東化学)に塗布し、30°C、3~4日間培養した。次いで、分離株の脂質要求性の有無を検討するために、平板に発育した独立コロニーをサブロー寒天培地(日水製薬)およびオリーブオイル(和光純薬)を重層したサブロー培地 (以下、サブロー/オリーブオイル培地)へ接種した。これらの平板を30°C、3~4日間培養し、サブロー培地およびサブロー/オリーブオイル培地ともに発育した株を脂質非要求性とし、サブロー/オリーブオイル培地にのみ発育した株を、脂質要求性とした。

(2)塩基配列解析による菌種の同定

クロモアガーマラセチア/カンジダ培地に発育した独立コロニー菌を対象に、アルカリ溶解法によるDNA抽出を行った。次いで、Kurtzman ら (Kurtzman et al, 1997) およびMakimura ら (Makimura et al, 1998) の報告に従い、真菌rDNA中の2領域(LSU-D1/D2およびITS1)に設定したユニバーサルプライマーおよび、TaKaRa EX Taq (タカラバイオ) を用いてPCRを行った。なお、PCR反応はDNAサーマルサイクラーGeneAmp 9600 (PerkinElmer) を用いて94°C 5分、55°C 30秒、72°C 1分を1 cycle、94°C 30秒、55°C 30秒、72°C 1分を33 cycle、94°C 30秒、55°C 30秒、72°C 3分を1 cycleの条件で行った。PCR反応後、生成物の精製を Montage PCR Centrifugal Filter (Millipore) を用いた限外ろ過法により行った後、BigDye Terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を使用したシーケンス反応を実施し、ABI PRISM

310 genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。次いで、得られた塩基配列データについてGenBank/EMBL/DDBJ を利用したBLAST (basic local alignment search tool) 解析と、*M. pachydermatis* (NBRC 10064、基準株)、*M. japonica* (NBRC 101613、基準株)、および*M. furfur* (NBRC 0656) との配列比較を行い、菌種を決定した。なお、NBRC株は独立行政法人製品評価技術基盤機構から分譲された菌株である。

2-3. 分離株の分子系統樹解析

M. pachydermatis と同定された菌株の遺伝子解析には、ITS1塩基配列データに加え、対照としてNBRC3株 (*M. pachydermatis*、*M. japonica*、および*M. furfur*) から得られた配列とGenBank/EMBL/DDBJ に登録されていた*M. pachydermatis*、*M. japonica*、*M. furfur*、*M. obtusa*、*M. restricta* および*M. yamatoensis* の配列を用いた。これらの塩基配列について、Clustal WによるマルチプルアライメントおよびKimura's-2-parameter モデルを用いたNeighbor-Joining法 (以下、NJ法) による分子系統樹解析 (Thompson et al, 1997) を行った。なお、樹形の信頼性検定はブートストラップ法により行った。

3. 結果

3-1. *Malassezia* 属菌の検出率と分離菌株の性状

Malassezia 属菌は、52検体中33検体(63. 5%) から検出された。このうち、*M. pachydermatis* は31検体から検出され、検出率は59. 6%であった。また、*M. pachydermatis* と同定された31株のうち、3株は脂質要求株であった。一方、*M. japonica* 基準株 (NBRC101613) との間に99%以上の高い塩基類似度を示した株が、52検体中3検体から分離された。これら3検体のうち、1検体からは*M. pachydermatis* が同時に検出された。

なお、検査対象としたイヌの外耳には顕著な炎症は観察されなかったが、外耳を綿棒でふき取った際、黒褐色で脂性の汚れが見られたものが多かった。

3-2. *Malassezia* 属菌陽性犬の特徴

M. pachydermatis が検出されたイヌについて、推定年齢、体重、品種、性別および収容場所による比較検討を試み、その結果を表1に示した。

年齢別では5才以下が66. 7%と最も検出率が高く、6才~10才が60. 9%、11才~15才が56. 3%と、加齢に応じて検出率が低くなった。体重別では、5kg未満が33. 3%と最も検出率が低く、15kg~20kgで若干検出率が落ちるものの、体重の増加に伴って検出率が増加した。品種別では、純血種における検出率は73. 7%であり、雑種における検出率51. 5%よりも高い値を示した。性別の検出率は、雄71. 0%、雌53. 3%であり、去勢および避妊処理された個体では16. 7%であった。収容地域別では、区部55. 0%、多摩地区62. 5%であった。

また、*M. japonica* 陽性犬はウェルシュコーギーと雑種であり、両菌種が陽性のイヌはヨークシャーテリアであった。

3-3. 分子系統樹解析を用いた分離菌株の解析

分離した*M. pachydermatis* 31株に対照塩基配列を加え、分子系統樹解析を行った結果、*M. pachydermatis* の分子系統樹はクラスターI~Vの5系統に分類された。また、31株のうち17株がクラスターIに分類され、このクラスターには *M. pachydermatis* の基準株

(NBRC10064) が含まれた (図1参照)。

表1. イヌにおける*M. pachydermatis* の検出

| | | No. of tested | No. of positives | (%) |
|--------|--------------|---------------|------------------|---------|
| Dog | | 52 | 31 | (59.6) |
| Age | 1-5 years | 12 | 8 | (66.7) |
| | 6-10 years | 23 | 14 | (60.9) |
| | 11-15 years | 16 | 9 | (56.3) |
| | >15 years | 1 | 0 | (0.0) |
| Weight | <5 kg | 3 | 1 | (33.3) |
| | 5-10 kg | 21 | 11 | (52.4) |
| | 11-15 kg | 19 | 13 | (68.4) |
| | 15-20 kg | 7 | 4 | (57.1) |
| | >20 kg | 2 | 2 | (100.0) |
| Breed | Mixed | 33 | 17 | (51.5) |
| | Thoroughbred | 19 | 14 | (73.7) |
| Sex | M | 31 | 22 | (71.0) |
| | F | 15 | 8 | (53.3) |
| | U* | 6 | 1 | (16.7) |
| Area | Wards | 20 | 11 | (55.0) |
| | Tama | 32 | 20 | (62.5) |

* castrated or contracepted

4. 考察

Malassezia 属菌は、近年、分子生物学的解析がすすむにつれて、その分類学的位置づけが明らかにされてきた菌種である。また、分離・同定技術の進歩によって以前はヒトが宿主と考えられていた菌種が、動物から分離される事例が報告されるようになってきた(Batra et al, 2005、Chen et al., 2005)。現在、*Malassezia* 属菌は11菌種に分類され、このうち、*M. pachydermatis* のヒトと動物との関係が注目されている。そこで2006年7月から11月にかけて、東京都動物愛護相談センターで収容された52頭のイヌから、*M. pachydermatis* の検出を試みた。その結果、31頭(59.6%)のイヌが、本菌を保有していることが判明した。この結果は、Crespoらが行ったスペイン・バルセロナでの調査(Crespo et al, 2002)とほぼ同じ結果であった。

脂質要求性酵母様真菌である*Malassezia* 属菌のうち、*M. pachydermatis* は発育に脂質を要求しない菌種として知られており、一般に本菌は脂質を添加しないサブロー培地でも発育可能とされている。今回分離した*M. pachydermatis* 31株のうち、3株は脂質を加えないサブロー培地では発育しない脂質要求株であった。脂質要求性*M. pachydermatis* 株の存在については、Crespoらの報告においても認められているが、これらの株が示した特殊な性状を含め、*Malassezia* 属菌については明らかになっていない部分が多い。このことから、分離株の性状については、今後、さらに詳細な検討が必要であろう。

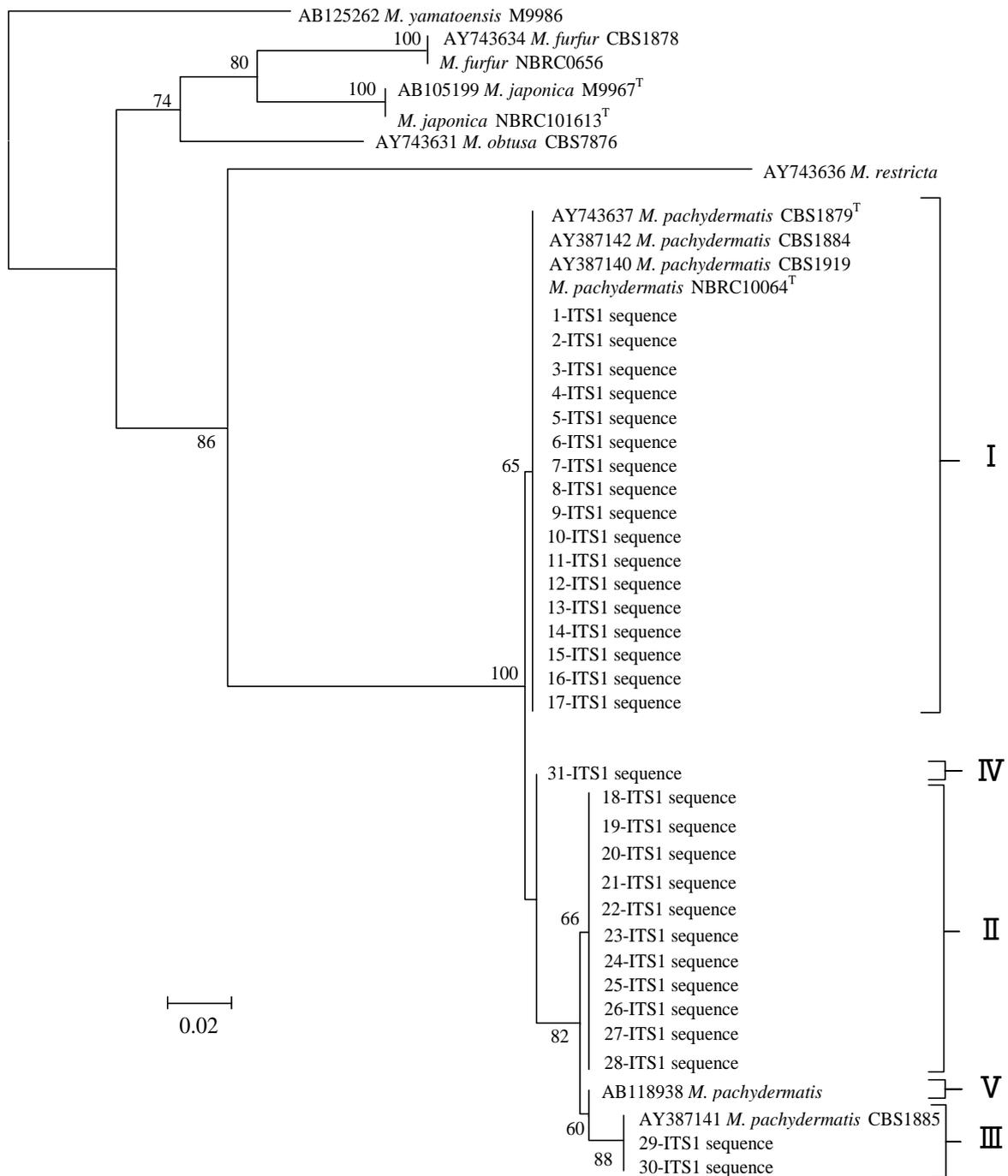


図1. 東京都のイヌから分離された *M. pachydermatis* 菌株のITS1塩基配列に基づいた分子系統樹解析 (Neighbor-Joining法)

Bootstrap percentages at the respective node were derived from 1000 replicates. Type strains were denoted by superscript "T".

近年、ヒトに常在する *Malassezia* 属菌のうち、*M. furfur*、*M. obtusa*、*M. sympodialis* が、イヌやネコ、ウシ、ウマなどの外耳炎や皮膚炎において分離された例が報告され (Batra et al,

2005、Chen et al, 2005)、ヒトと動物との間でそれぞれの常在菌が交差汚染することにより、新たな疾病の発生が懸念されている。今回分離した株のうち、*M. japonica* 基準株 (NBRC 101613) との間に高い塩基類似度を示した株が3検体から分離された。*M. japonica* は、2003年に報告された新しい菌種であり、健常人の皮膚やアトピーおよび脂漏性皮膚炎患者からの分離が報告されている (Sugita et al, 2003)。しかし、本菌が動物から分離された例は未だ報告されておらず、今回の結果は、ヒトと動物との間で*Malassezia* 属菌の交差汚染が進行している可能性を示唆するものと考えられる。今後、ヒトと動物間における本菌の分布を継続的に調査していくことが重要であろう。

現在、*Malassezia* 属菌の分類には、分子生物学的な解析が大きな役割を果たしている。今回用いた塩基配列解析法も、菌種の同定には極めて有効な手段であることが確認された。さらに、これらの方法で決定した塩基配列を用いて、分離株の分子系統樹解析を行った結果、分離した31株は5系統のクラスターに分類され、*M. pachydermatis* 基準株が含まれるクラスターには、最も多くの分離株が分類された。しかし、これら5系統が持つ生物学的な意味や、各クラスターと宿主との関係などについては、今回の調査では明らかにするには至らなかった。今後、解析対象株数を増やすとともに、他の遺伝子領域を含め、さらに詳細な解析を行うことが必要と考えられた。

5. まとめ

ヒトおよび動物の皮膚に常在する酵母様真菌である*Malassezia* 属菌について、東京都動物愛護相談センターに収容されたイヌ52頭を対象に、外耳における保有状況を調査し、あわせて、分離菌株の分子生物学的解析を試みた。

その結果、*Malassezia* 属菌は33検体(63.5%)から検出された。このうち、*M. pachydermatis* が31検体(59.6%)から検出された。また、*M. japonica* 基準株との間に高い塩基類似度を示した株が3検体から検出された。さらに、分離した31株の*M. pachydermatis* は、ITS1領域を用いた分子系統樹解析の結果、5つの系統に分類された。

本報文は、東京都健康安全研究センター研究年報第57号 (2007) に掲載された論文の内容を基に、一部加筆・修正したものである。

参考資料：

1. Sugita, T., Takashima, M., Kodama, M., Tsuboi, R., Nishikawa, A. (2003) 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.
2. Hirai, A., Kano, R., Makimura, K., Duarte, E. R., Hamdan, J. S. (2004) *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 623-627.
3. Sei, Y., Hamaguchi, T., Ninomiya, J., Nakabayashi, A., Takiuchi, I. (1994) Seborrheic dermatitis: treatment with anti-mycotic agents. *J. Dermatol.*, **21**, 334-340.
4. Sugita, T., Tajima, M., Amaya, M., Tsuboi, R., Nishikawa, A. (2004) Genotype analysis of *Malassezia restricta* as the major cutaneous flora in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *Microbiol. Immunol.*, **48**, 755-759.
5. Sei, Y. (2006) *Malassezia* related diseases. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.*, **47**, 75-80.
6. Belkum, A. V., Boekhout, T. and Bosboom, R. (1994) Monitoring spread of *Malassezia* infections in a neonatal intensive care unit by PCR-mediated genetic typing. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 2528-2532.

7. Batra, R., Boekhout, T., Gueho, E., Cabanes, F. J., Dawson, T. L., Jr, Gupta, A. K. (2005) *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. *FEMS Yeast Res.*, **5**, 1101-1113.
8. Chang, H. J., Miller, H. L., Watkins, N., Arduino, M. J., Ashford, D. A., Midgley, G., Agüero, S. M., Pinto-Powell, R., von Reyn, C. F., Edwards, W., McNeil, M. M., Jarvis, W. R. (1998) An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. *N. Engl. J. Med.*, **338**, 706-711.
9. Hirai, A. (2006) Mycology of *Malassezia* spp. *ViVeD interzoo*, **2**, 199-202.
10. Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. (1997) Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1216-1223.
11. Makimura, K., Mochizuki, T., Hasagawa, A., Uchida, K., Saito, H., Yamaguchi, H. (1998) Phylogenetic classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2629-2633.
12. Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *J. Nucleic. Acids. Res.*, **22**, 4673-80.
13. Chen, T. A. and Hill, P. B. (2005) The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses. *Vet. Dermatol.*, **16**, 4-26.
14. Crespo, M. J., Abarca, M. L., Cabañes, F. J. (2002) Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. *Medical Mycology*, **40**, 115-121.
15. Cafarchia, C., Gallo, S., Capelli, G., Otranto, D. (2005) Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. *Mycopathologia.*, **160**, 143-9.
16. Marcon, M, J., Powell, D, A. (1992) Human infections due to *Malassezia* spp. *Clin. Microbiol. Rev.*, **5**, 101-19.
17. Masuda, A., Sukegawa, T., Mizumoto, N., Tani, H., Miyamoto, T., Sasai, K., Baba, E. (2000) Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. *J. Vet. Med. Sci.*, **62**, 1177-1182.