

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

千葉 隆 司, 畠 山 薫, 水 谷 浩 志, 和宇慶 朝 昭, 高 橋 由 美,
山 田 澄 夫, 甲 斐 明 美, 矢 野 一 好

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

Takashi CHIBA, Kaoru HATAKEYAMA, Hiroshi MIZUTANI, Tomoaki WAUKE, Yumi TAKAHASHI,
Sumio YAMADA, Akemi KAI and Kazuyoshi YANO

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

千葉 隆 司*, 畠 山 薫*², 水 谷 浩 志*³, 和 宇 慶 朝 昭*, 高 橋 由 美*,
山 田 澄 夫*⁴, 甲 斐 明 美*, 矢 野 一 好*⁵

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

Takashi CHIBA*, Kaoru HATAKEYAMA*², Hiroshi MIZUTANI*³, Tomoaki WAUKE*, Yumi TAKAHASHI*,
Sumio YAMADA*⁴, Akemi KAI* and Kazuyoshi YANO*⁵

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. pachydermatis* 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 : 酵母 Yeast, *Malassezia*属菌 *Malassezia* spp., イヌ Dog, 分子系統樹 Molecular Phylogenetic Tree

はじめに

*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^{1, 2)}。ヒトの常在菌としては、*M. furfur*, *M. obtusa*, *M. sympodialis*などがあり、動物では*M. pachydermatis*が知られている³⁾。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³⁾、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^{4, 5)}。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⁶⁾。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⁷⁾、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⁸⁾、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⁹⁾。

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。

実験方法

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キー各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. *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℃、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)を重ねたサブロー培地 (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℃、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

* 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health 3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

* 2 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

* 3 東京都動物愛護相談センター城南島出張所

* 4 日本生活協同組合連合会, (元) 東京都健康安全研究センター微生物部

* 5 東京都健康安全研究センター微生物部

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、Kurtzman¹⁰⁾らおよびMakimura¹¹⁾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℃5分、55℃30秒、72℃1分を1 cycle、94℃30秒、55℃30秒、72℃1分を33 cycle、94℃30秒、55℃30秒、72℃、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)を使用したシークエンス反応を実施し、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/DBJを利用したBLAST (basic local alignment search tool) 解析¹²⁾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。

3) *M. pachydermatis* 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NBRC 3株(*M. pachydermatis*, *M. japonica*, および*M. furfur*)から得られた配列とGenBank/EMBL/DBJに登録されていた*M. pachydermatis*, *M. japonica*, *Malassezia* sp. M9959株, *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、ClustalW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を行った¹³⁾。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。

結 果

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 (NBRC 101613) 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。

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検討を試み、その結果をTable 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才から10才が60.9%、11才から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から20kg未満の範囲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、両菌種が陽性の品種はヨークシャーテリアであった。

Table 1. Occurrence of *M. pachydermatis* in dogs

		No. of tested	No. of positives	(%)
		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

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 (NBRC 10064) が含まれた(Fig. 1.)。

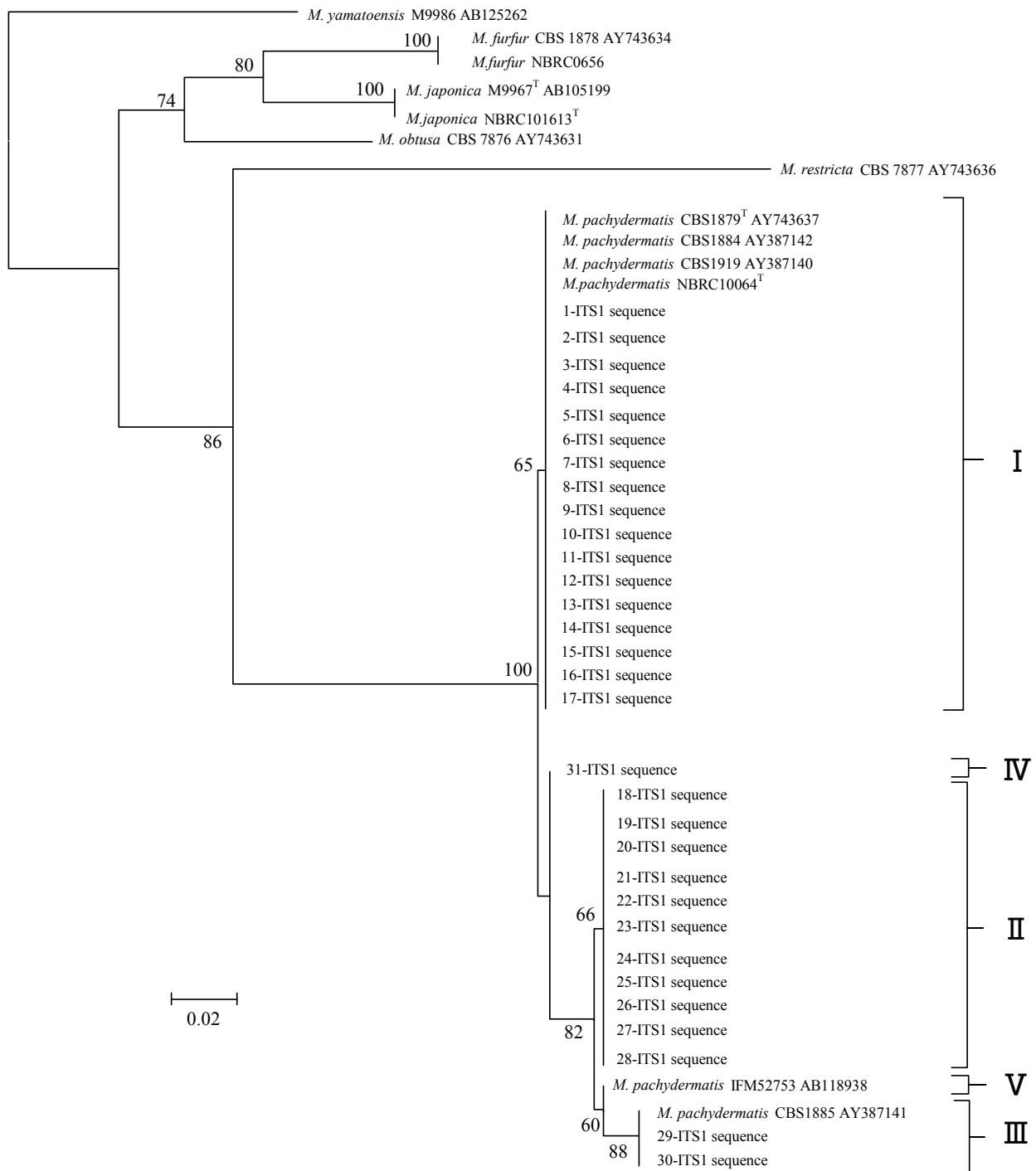


Fig. 1. Phylogenetic Analysis (Neighbor-Joining Method) of *M. pachydermatis* Isolated from Dogs in Tokyo, Based on The Sequences of ITS1.

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

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^{7, 14)}。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¹⁵⁾が行ったス

ペイン・バルセロナでの調査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¹⁵⁾ 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。

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^{7, 14)}、ヒトと動物との間でそれぞれの常在菌が交叉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⁹⁾。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、健康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¹⁾。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。

Crespo らの調査では¹⁵⁾、*M. pachydermatis* の検出率と調査個体の年齢との間に一定の傾向がみられている。今回の調査でも、年齢別の検出率は加齢に伴って緩く減少する傾向がみられた。一方、*M. pachydermatis* による外耳炎については耳の形状が重要であり、特に、たれ耳の場合は耳介が不衛生な状態になるために本菌の検出率が高くなるとの報告がある¹⁶⁾。また、本菌がイヌの外耳炎において優勢な起因菌となる理由として、外耳道内に分泌される脂質の関与も報告されている^{17, 18)}。これらの要因については、今回、検討することができなかったが、*Malassezia* 属菌の分布と宿主個体との関係を明らかにするためには、さらに調査対象数を増やすとともに、宿主の特徴を踏まえた詳細な解析を行う必要がある。

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* 基準株の配列が分類されたクラスターには、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までは至らなかった。このため、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。

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。

文 献

- 1) Sugita, T., Takashima, M., Kodama, M., et al. : *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4695-4699, 2003.
- 2) Hirai, A., Kano, R., Makimura, K., et al. : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 623-627, 2004.
- 3) Sei, Y., Hamaguchi, T., Ninomiya, J., et al. : *J. Dermatol.*, **21**, 334-340, 1994.
- 4) Sugita, T., Tajima, M., Amaya, M., et al. : *Microbiol. Immunol.*, **48**, 755-759, 2004.
- 5) Sei, Y. : *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.*, **47**, 75-80, 2006.
- 6) Belkum, A. V., Boekhout, T. and Bosboom, R. : *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 2528-2532, 1994.
- 7) Batra, R., Boekhout, T., Gueho, E., et al. : *FEMS Yeast Res.*, **5**, 1101-1113, 2005.
- 8) Chang, H. J., Miller, H. L., Watkins, N., et al. : *N. Engl. J. Med.*, **338**, 706-711, 1998.
- 9) Hirai, A. : *ViVeD interzoo*, **2**, 199-202, 2006.
- 10) Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. : *J. Clin. Microb.*, **35**, 1216-1223, 1997.
- 11) Makimura, K., Mochizuki, T., Hasagawa, A., et al. : *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2629-2633, 1998.
- 12) Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. : *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1216-1223, 1997.
- 13) Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. : *J. Nucleic. Acids. Res.*, **22**, 4673-80, 1994.
- 14) Chen, T. A. and Hill, P. B. : *Vet. Dermatol.*, **16**, 4-26, 2005.
- 15) Crespo, M. J., Abarca, M. L. and Cabañes, F. J. : *Medical Mycology*, **40**, 115-121, 2002.
- 16) Cafarchia, C., Gallo, S., Capelli, G., et al. : *Mycopathologia.*, **160**, 143-9, 2005.
- 17) Marcon, M. J., Powell, D. A. : *Clin. Microbiol. Rev.*, **5**, 101-19, 1992.
- 18) Masuda, A., Sukegawa, T., Mizumoto, N., et al. : *J. Vet. Med. Sci.*, **62**, 1177-1182, 2000.