Med. Mycol. J.
Vol. 52, 297 – 303, 2011
ISSN 2185 – 6486

総　説

Malassezia 属真菌の簡易同定法に関する研究

金　子　孝　昌[1]

[1]関東化学株式会社試薬事業本部マイクロバイオ部

要　旨

Malassezia 属真菌は，皮膚の脂漏部位に常在する好脂性の真菌であるが，一方で，癜風，マラセチア毛包炎，脂漏性皮膚炎，アトピー性皮膚炎の起因菌もしくは増悪因子として知られている．本属真菌は ribosomal DNA/RNA 解析により再分類され，さらに新菌種報告も続いた．これらは非常に類似した形態と生化学的性状を有しており，表現形質を利用した鑑別は難しいと考えられてきた．分子生物学的解析法は最も信頼性の高い同定法といえるが，一般の検査施設では利用できない状況にある．われわれは（1）分離培地の開発と簡易鑑別法の開発，（2）簡易鑑別法の検証と再構築を研究し，報告した．

Key words：*Malassezia* 属真菌（*Malassezia*），分離培養（isolation medium），簡易鑑別法（culture-based easy identification system）

はじめに

Malassezia 属真菌は，温血動物の皮膚常在細菌叢の一部を担っているが，皮膚状態によっては病原因子となり得る．本属真菌は皮膚の脂漏部位に常在する好脂性の真菌であり，一般的には癜風やマラセチア毛包炎の起因菌として知られている．一方，この十数年の間に *Malassezia* 属真菌が脂漏性皮膚炎やアトピー性皮膚炎との関連性を示唆する報告が次々と出されている[1)]．

しかしながら，本邦において本属真菌の分離培地は市販されてなく，また，オリーブ油重層培地では発育が困難な菌種も経験してきたこともあり，容易に培養することが第一の研究課題であった．さらに，*M. furfur* は Guého ら[2)] により 5 つの種に再分類され，研究着手時には本属真菌は 7 菌種が報告されていた．その後も，Sugita ら[3–5)]，Hirai ら[6)]，Nell ら[7)]，さらには Cabañes ら[8)] により新種報告が続き，現在では 14 菌種となっているが，*Malassezia* 属真菌は似通った形態，生化学性状を示し，表現形で菌種を同定することは困難と考えられていた．分子生物学的手法は最も信頼できる同定手法であるが，ほとんどの検査室で利用できないことから簡易的な培養同定法が求められていた．このような状況の中，*Malassezia* 属真菌の分離培地の開発，簡易同定法の樹立を目的として研究を開始した．

1．分離培地の開発

まず *Malassezia* 属真菌標準株 7 菌種（*M. furfur* CBS 1878，*M. sympodialis* CBS 7222，*M. globosa* CBS 7966，*M. obtusa* CBS 7876，*M. slooffiae* CBS 7956，*M. restricta* CBS 7877，*M. pachydermatis* CBS 1879）を入手し，分離培地の開発に着手した．開発の基礎となる分離培地には CHROMagar™ Candida を用いた．これは，臨床上重要な酵母様真菌である *Candida* 属菌種を簡易鑑別できる分離培地[9)] として利用価値が高いと判断したことによる．これまでに本属真菌の分離培地としては，オリーブ油重層培地，DIXON 培地，mDIXON 培地，Leeming 培地等が報告されており，これらの培地成分から必須となる発育促進物質を選ぶことから研究を始めた．必須発育促進物質として，牛胆汁末，グリセリン，モノステアリン酸，そして Tween 60 が認められ，牛胆汁末は精製度の低いものが必要であった．必須成分を添加した CHROMagar™ Candida は，供試した *Malassezia* 属真菌 7 菌種の発育を高く支持し，かつ *Candida* 属真菌の鑑別能を有していた[10)]．われわれは本培地を LN-CHROM と名付け，さらなる検討を続けた．

別刷請求先：金子　孝昌
〒103-0022　東京都中央区日本橋室町 2-2-1
関東化学株式会社

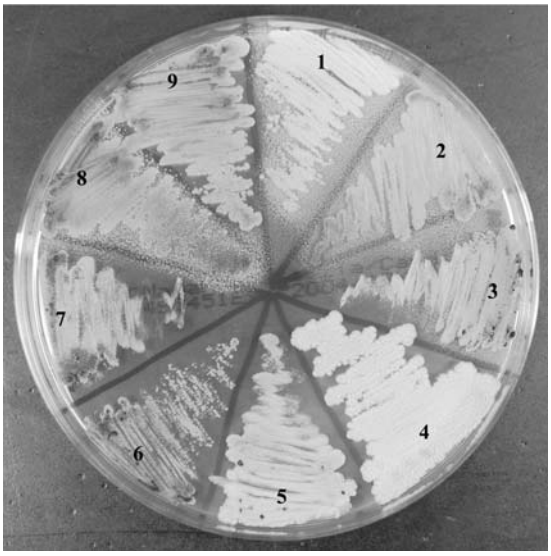


Fig. 1. Precipitate production on modified CHROMagar™ Malassezia. Nine *Malassezia* species were incubated for 4 days at 32℃ on CHROMagar™ Malassezia. Numbers indicate each species, as shown below: (1) *M. pachydermatis*; (2) *M. sympodialis*; (3) *M. globosa*; (4) *M. furfur*; (5) *M. slooffiae*; (6) *M. obtusa*; (7) *M. restricta*; (8) *M. dermatis*; (9) *M. japonica*. Note the precipitate production by colonies of No. 1, 2, 3, and 8.

2．簡易鑑別法の開発

われわれは，DIXON 培地において，特定の菌種によって培地成分が沈殿する現象[11]に着目し，LN-CHROM の改良と簡易鑑別法の樹立に着手した．この開発時には，Sugita ら[3,4]により本属真菌は 9 菌種となっていた．

まず *Malassezia* 属真菌標準株 9 菌種 11 株（*M. furfur* CBS 1878，*M. sympodialis* CBS 7222，*M. globosa* CBS 7966，*M. obtusa* CBS 7876，*M. slooffiae* CBS 7956，*M. restricta* CBS 7877，*M. pachydermatis* CBS 1879，*M. dermatis* JCM 11348 および JCM 11470，*M. japonica* M9966 および M9967）ならびに新鮮臨床分離株 26 株を用いた．DIXON 培地における Tween 40 が沈殿物形成に重要な培地成分であることを突き止め，前述の LN-CHROM への Tween 40 の添加と本培地における各標準株の性状確認を行った．本培地は期待通り特定の菌種（*M. pachydermatis*，*M. sympodialis*，*M. globosa*，*M. dermatis*）にて沈殿物形成が確認された（Fig. 1）．さらに，菌種鑑別の key として脂質要求性，カタラーゼ反応，エスクリン分解能，Tween 60 資化性およびクレモフォア EL 資化性に絞り込み，簡易鑑別法のための試薬として TE 斜面培地（エスクリン分解および Tween 60 資化性試験用）と EL 斜面培地（クレモフォア EL 資化性試験用）を開発し，検討した．*Malassezia* 属真菌の中で沈殿物形成群 4 菌種は脂質要求性のない *M. pachydermatis* 以外は，エスクリン分解能をもつ *M. sympodialis*，Tween 60 資化性のない *M. globosa* とそれ以外の *M. dermatis*（エスクリン分解能はないが Tween 60 資化性はある）に分けることができた．一方，沈殿物形成のない一群 5 菌種（*M. furfur*，*M. obtusa*，*M. slooffiae*，*M. restricta*，*M. japonica*）は，EL 斜面培地発育菌種の *M. furfur*，カタラーゼ反応陰性の *M. restricta* 以外を，エスクリン分解能をもつ *M. japonica*，Tween 60 資化性のない *M. obtusa* とそれ以外の *M. slooffiae*（エスクリン分解能はないが Tween 60 資化性はある）に分けることができた（Table 1）．新鮮臨床分離株を含め，本簡易鑑別法の実証試験を行ったところ，すべて分子生物学的同定結果と一致した[12]．われわれは，本報告より Tween 40 を添加した LN-CHROM を CHROMagar™ Malassezia と名付けた．

3．簡易鑑別法の検証と再構築

アトピー性皮膚炎，脂漏性皮膚炎，癜風，そして外耳道炎患者および健常者より得られた 218 検体，さらにイヌの外耳道炎もしくは健常犬の外耳道より得られた 65 検体を供試し，本簡易鑑別法の精度を再評価した．すべ

Table 1. Biological characterization based on the kit developed in the present study

Strains	Growth on				Catalase reaction
	CHROM	SDA	TE	EL	
M. pachydermatis CBS 1879	GP	G	GB	G	+
M. sympodialis CBS 7222	GP	N	GB	N	+
M. globosa CBS 7966	GP	N	N	N	+
M. dermatis JCM11348	GP	N	GN	N	+
M. dermatis JCM11470	GP	N	GN	N	+
M. furfur CBS 1878	G	N	GB	G	+
M. slooffiae CBS 7956	G	N	GN	N	+
M. obtusa CBS 7876	G	N	NB	N	+
M. restricta CBS 7877	G	N	N	N	−
M. japonica M9966	G	N	GB	N	+
M. japonica M9967	G	N	GB	N	+

CHROM, CHROMagar™ Malassezia; G, growth; N, no growth; GP, growth and production of precipitate; GB, growth and black zone; GN, growth and no change; NB, no growth and black zone; +, test positive; −, test negative.

ての CHROMagar™ Malassezia 分離株（377 株）は，サブローブドウ糖斜面培地（脂質要求性），TE 斜面培地，EL 斜面培地およびカタラーゼ試験における表現形質調査を実施した．分子生物学的同定成績とこれら表現形質における鑑別性状を評価し，表現形質における簡易同定法を検証した．

Table 2 に供試したすべての菌株における調査性状成績を示す．1）CHROMagar™ Malassezia にて，沈殿物形成群と非形成群とに分けることにより，*M. globosa* および *M. obtusa* の表現形質（脂質要求パターン，カタラーゼ反応，発育温度域）類似菌種を明瞭に区別でき，さらに，*M. dermatis* および *M. japonic*a の表現形質についても，それぞれ *M. slooffiae* および *M. sympodialis* の表現形質と類似しているが，明瞭に区別できた．また，2）*M. furfur* は特徴的な大きな菊花様の薄いピンク色コロニーを形成することにより，初代分離培養にて他の菌種と鑑別可能であった．3）脂質要求性により *M. pachydermatis* を鑑別できたが，2 株（4.7%）の脂質要求株が認められ，感度 95.4%，特異度 100%であった．4）TE 斜面培地はエスクリン分解能および Tween 60 の資化性を調べることができることから，沈殿物形成群と非形成群内における菌種鑑別に有用であることが確認されていたが，34.3%の *M. slooffiae* においてエスクリン分解性が認められ，*M. japonica* と類似性状を示した．一方で，CHROMagar™ Malassezia 上のコロニーサイズは両菌種を明瞭に区別せしめたことから，鑑別法にコロニーサイズを導入した．5）カタラーゼ反応はすべての *M. restricta* にて陰性，かつ，その他の *Malassezia* 属菌種にてすべて陽性であったことから，*M. restricta* の直接鑑別ができる性状と考えられた．

われわれは以上の結果より，簡易的かつ正確性の高い安価な同定法を再構築した（Figs. 2, 3）．本同定システムを用いることにより，臨床上重要な 3 菌種；*M. furfur*，*M. restricta*，および *M. globosa* の正確な同定が可能となることを報告した[13]．

4．おわりに

以上の一連の研究により，*Malassezia* 属真菌の分離培養が容易になり，かつ臨床の現場にて簡易鑑別できる手法を提案できるようになった．われわれは，これらツールを利用し，ヒト外耳道における *Malassezia* 属真菌の分離頻度調査[14,15]，外耳道炎症例における *Malassezia* 属真菌の関与研究[16]，ならびに IVH カテーテル関連 *Malassezia* 菌血症に関与した菌株の表現形質調査[17] に進め，報告した．本属真菌はその他の疾患（にきび，涙嚢炎，脂漏性眼瞼炎，集族性網状乳頭腫症，爪甲真菌症，乳房炎，副鼻腔炎など）との関わりも報告[18] されている．今後，本属菌種の病因論的役割の解析と，診断治療面の新しい知見が一つでも多くもたらされることを期待したい．

Table 2. Biological feature of 9 species of *Malassezia*

Species identified by molecular biological analysis (no. of strains)	Biological feature							
	Colony characteristics on CHROM[a]			Growth on SDA[b]	Growth characteristics on TE slant[b]	Growth on EL slant[b]	Growth at 40℃	Catalase reaction
	Size	Color/ Morphology	Precipitate					
M. pachydermatis (43)	Large (100%)	Pale pink/smooth (100%)	+ (100%)	Growth (95.3%)[d]	Growth and produced a black zone (95.3%)[d]	Growth (95.3%)[d]	NT	+ (100%)
M. sympodialis (84)	Large (100%)	Pale pink/smooth (100%)	+ (100%)	No growth (100%)	Growth and produced a black zone (100%)	No growth (100%)	NT	+ (100%)
M. globosa (14)	Small (100%)	Purple/smooth (100%)	+ (100%)	No growth (100%)	No growth and no change (100%)	No growth (100%)	NT	+ (100%)
M. dermatis (5)	Large (100%)	Pale pink to purple/ smooth (100%)	+ (100%)	No growth (100%)	Growth and no change (100%)	No growth (100%)	NT	+ (100%)
M. furfur (41)	Large (100%)	Pale pink/wrinkled (100%)	− (97.6%)	No growth (100%)	Growth and produced a black zone (100%)	Growth (85.4%)	NT	+ (100%)
M. slooffiae (108)	Small (100%)	Pale pink/smooth (100%)	− (100%)	No growth (100%)	Growth and no change (65.7%)[e]	No growth (98.1%)	Growth (84.3%)[e]	+ (100%)
M. obtusa (4)	Medium (100%)	Pink/rough (100%)	− (100%)	No growth (100%)	No growth but produced a black zone (100%)	No growth (100%)	NT	+ (100%)
M. restricta (71)	Small (100%)	Pink/smooth (100%)	− (100%)	No growth (100%)	No growth and no change (100%)	No growth (100%)	NT	− (100%)
M. japonica (2)	Large (100%)	Pink/smooth (100%)	− (100%)	No growth (100%)	Growth and produced a black zone (100%)	No growth (100%)	No growth (100%)	+ (100%)

NT, Not test; +, positive; −, negative; CHROM, CHROMagar™ Malassezia

[a] Incubated at 32℃ for 4 to 7 days.

[b] Incubated at 32℃ for 4 days.

[c] Only one strain of fresh clinical isolate produced a precipitate.

[d] Only two strains of fresh clinical isolates did not grow on SDA and EL, and did not produce a black zone on TE.

[e] 37 strains of fresh clinical isolates produced a black zone on TE, and 17 strains did not grow on mLNA at 40℃ for 4 days.



M. furfur *M. japonica* *M. slooffiae*

Fig. 2. Colony characteristics of *M. furfur*, *M. japonica*, and *M. slooffiae* on CHROMagar™ Malassezia were observed after incubation at 32℃ for 4 days.

Colonies of *M. furfur* were large, pale pink, and wrinkled and did not produce precipitates. Colonies of *M. japonica* were larger (2 to 5 mm) than those of *M. slooffiae* (<1 mm). Their sizes were measured in well-isolated single colonies.

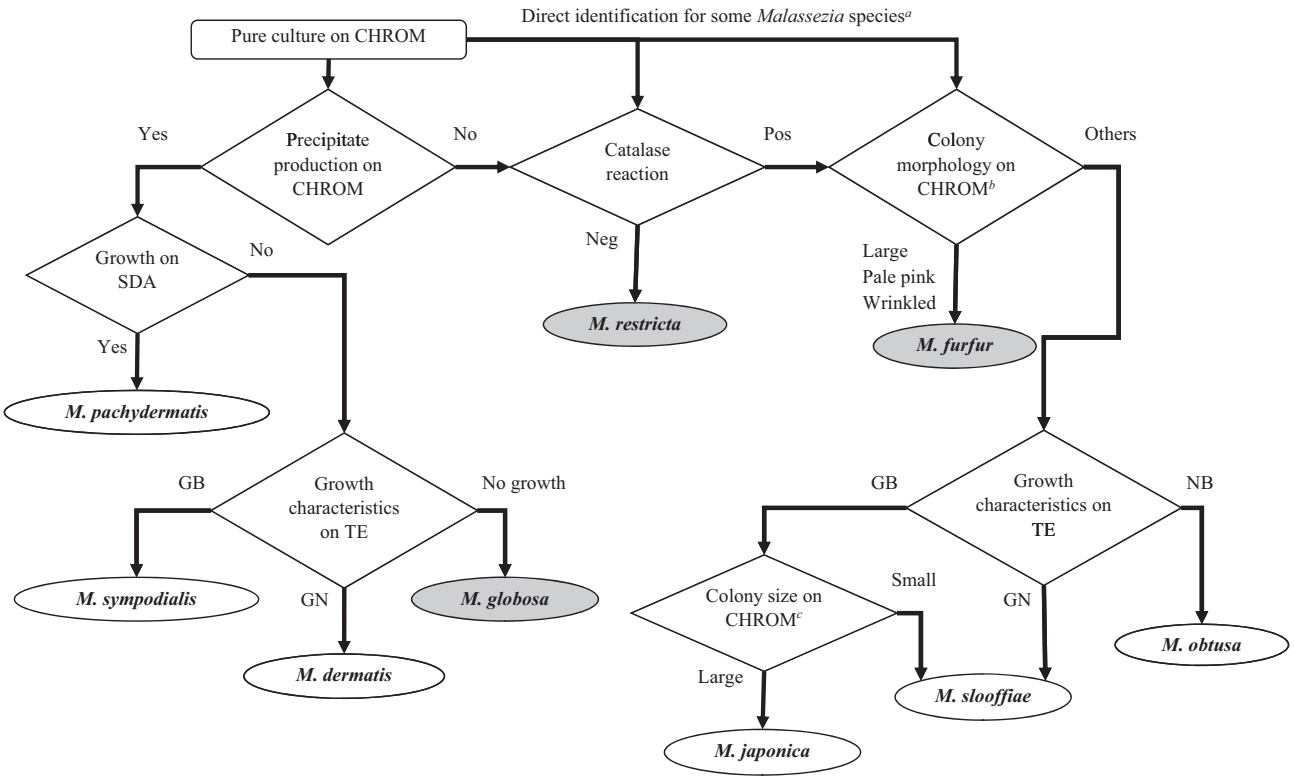


Fig. 3. Proposed identification workflow for nine species of *Malassezia*.

CHROM, CHROMagar™ Malassezia; Pos, positive; Neg, negative; GB, growth and black zone; GN, growth and no change; NB, no growth and black zone. *a*, Direct identification by catalase reaction and features of colonies on CHROM for *M. restricta* and *M. furfur*. *b*, Colony morphology on CHROM as shown in Fig. 2. *c*, Colony size of *M. japonica* and *M. slooffiae* on CHROM as shown in Fig. 2.

文　献

1) 清　佳浩：*Malassezia* 関連疾患．真菌誌 **47**: 75-80, 2006.
2) Guého E, Midgley G, Guillot J: The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie van Leewenhoek **69**: 337-355, 1996.
3) 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.
4) 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.
5) 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.
6) 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 Evol Microbiol **54**: 623-627, 2004.
7) Nell A, James SA, Bond CJ, Hunt B, Herrtage ME: Identification and distribution of a novel *Malassezia* yeast species on normal equine skin. Veter Rec **150**: 395-398, 2002.
8) Cabañes FJ, Theelen B, Castellá G, Boekhout T: Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. FEMS Yeast Res **7**: 1064-1076, 2007.
9) Odds FC, Bernaerts R: CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol **32**: 1923-1929, 1994.
10) Kaneko T, Makimura K, Onozaki M, Ueda K, Yamada Y, Nishiyama Y, Yamaguchi H: Vital growth factors of *Malassezia* species: presumptive identification of *Malassezia* and *Candida* species on modified CHROMagar Candida Agar. Med Mycol **43**: 699-704, 2005.
11) Hammer KA, Riley TV: Precipitate production by some *Malassezia* species on Dixon's agar. Med Mycol **38**: 105-107, 2000.
12) Kaneko T, Makimura K, Sugita T, Yamaguchi H: Tween 40-based precipitate production observed on modified chromogenic agar and development of biological identification kit for *Malassezia* species. Med Mycol **44**: 227-231, 2006.
13) Kaneko T, Makimura K, Abe M, Shiota R, Nakamura Y, Kano R, Hasegawa A, Sugita T, Shibuya S, Watanabe S, Yamaguchi H, Abe S, Okamura N: Revised culture-based system for identification of *Malassezia* species. J Clin Microbiol **45**: 3737-3742, 2007.
14) Kaneko T, Shiota R, Shibuya S, Watanabe S, Umeda Y, Takeshita K, Yamamoto M, Nishioka K, Makimura K: Human external ear canal as the specific reservoir of *Malassezia slooffiae*. Med Mycol **48**: 824-827, 2010.
15) 塩田量子，白井高利，武下公子，矢野裕明，山本眞実，西岡慶子，金子孝昌：*Malassezia* 属真菌を含む健常人外耳道微生物叢と外耳道炎．医学検査 **59**: 1131-1136, 2010.
16) 塩田量子，金子孝昌，矢野裕明，武下公子，西岡慶子，槇村浩一：*Malassezia* 属真菌の関与が疑われた外耳道炎の検討．真菌誌 **50**: 109-116, 2009.
17) Kaneko T, Murotani M, Ohkusu K, Sugita T, Makimura K: Genetic and biological features of catheter-associated *Malassezia furfur* from hospitalized adults. Med Mycol In press.
18) Ashbee HR, Evans EGV: Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. Clin Microbiol Rev **15**: 21-57, 2002.

A Study of Culture-based Easy Identification System for *Malassezia*

Takamasa Kaneko[1]
[1]Department of Microbiology, Kanto Chemical Co., Inc.

Most species of this genus are lipid-dependent yeasts, which colonize the seborrheic part of the skin, and they have been reported to be associated with pityriasis versicolor, Malassezia folliculitis, seborrheic dermatitis, and atopic dermatitis. *Malassezia* have been re-classified into 7 species based on molecular biological analysis of nuclear ribosomal DNA/RNA and new *Malassezia* species were reported. As members of the genus *Malassezia* share similar morphological and biochemical characteristics, it was thought to be difficult to differentiate between them based on phenotypic features. While molecular biological techniques are the most reliable methods for identification of *Malassezia*, they are not available in most clinical laboratories. We studied (i) development of an efficient isolation media and culture based easy identification system, (ii) the incidence of atypical biochemical features in *Malassezia* species and propose a culture-based easy identification system for clinically important *Malassezia* species, *M. globosa*, *M. restricta*, and *M. furfur*.