

## 第5章 皮膚清浄技術開発に向けた皮膚常在微生物叢の解析

杉田 隆<sup>1</sup>、山田 深<sup>2</sup>、武岡 元<sup>2</sup>、山崎 丘<sup>2</sup>、榎村 浩一<sup>3</sup>、大島 博<sup>2</sup>、向井 千秋<sup>2</sup>

### 1. はじめに

国際宇宙ステーション(ISS)には入浴設備がないことから、頭髮および身体はスポンジ等で清拭することになる。宇宙飛行士が宇宙に滞在している間は、比較的脂漏肌(オイリー肌)になることが経験的に知られている。

ヒト皮膚には多種多様な微生物が常在しているが、これはヒトの生命恒常には重要な役割を担っている。すなわち、皮膚常在微生物は皮膚上に、1)バイオフィルムを形成する、2)皮膚 pH を弱酸性に保持する、3) 抗菌物質を産生する、4)紫外線を吸収する等により外来病原体の侵入を物理的・化学的に阻止している<sup>1)</sup>。皮膚常在微生物の内、細菌叢は部位により構成菌種は異なる。例えば、頭頸部では、Propionibacteriaceae、四肢では Proteobacteria、足裏では Corynebacteriaceae が優位になる<sup>2)</sup>。一方、真菌叢では部位にかかわらず *Malassezia* が優位である<sup>3,4)</sup>。*Malassezia* は環境中には存在せずヒトあるいは動物の皮膚のみに存在する。その増殖には脂質を必要とする。従って、入浴を行えないあるいは制限された場合は、皮脂量の増加とともに真菌 *Malassezia* 量も連動して増加すると考えられる。

南極は変則的な日照や長期間の閉鎖環境等の宇宙と類似した環境である。今回、被験者として協力して頂いたセール・ロンダーネ山地地質調査隊は、数ヶ月にわたり雪上車で南極を移動しながら内陸調査を行っている。この間、隊員は長期にわたり入浴ができないため、皮膚を清浄に保つことが困難となる。各国の宇宙機関も南極の特殊環境に着目し、南極の生活施設を宇宙施設に見立てた研究に取り組みは始めている。

本研究では、南極の生活施設を模擬宇宙生活施設およびそこで生活する南極地域観測隊員を宇宙飛行士に見立てて、皮膚常在微生物叢の経時変化を解析する。これにより、皮膚清浄技術開発に向けた基礎的データを取得することを目的としている。

<sup>1</sup> 明治薬科大学

<sup>2</sup> 宇宙航空研究開発機構宇宙医学生物学研究室

<sup>3</sup> 帝京大学

## 2. 材料および方法

1) 被験者: 第 50 次地域観測隊セール・ロンダーネ山脈地質調査隊より 6 名、第 51 次隊より 10 名の合計 16 名を被験者とした(Table 1)。なお、本試験は倫理委員会の審査後、文書による同意を各々の被験者より得て実施した。

2) 鱗屑の採取部位: トランスペアレントドレッシング、OpSite<sup>TM</sup> (7 cm x 9 cm、スミス・アンド・ニューメディカル)を用いて頭皮、左右の頬、左右の前胸部、右足底、右耳裏の 7ヶ所から鱗屑をストリップングにより採取した。テープは解析時まで-30°C以下で保存した。なお、第 51 次隊については右耳裏部からは採取していない。

3) 鱗屑の採取時期: 皮膚常在菌量を経時的に解析するために南極への出発前後および南極滞在中に鱗屑を採取した。すなわち、1)南極へ出発のおおよそ 1ヶ月前、2)南極到着 1ヶ月後 (地質調査のためテント生活を開始して 3 日以内)、2) 南極到着 2ヶ月後(調査期間の中間時期)、3) 南極到着 3ヶ月後(調査終了 3 日以内)および 4)帰国後(調査終了 4ヶ月目)の 5ポイントである。なお、51 次隊については、帰国後の鱗屑の採取は未実施である。検体は、JAXA を経由して明治薬科大学微生物学教室へ搬入された。

4) 鱗屑中の *Malassezia* DNA の抽出: *Malassezia* DNA は Sugita et al<sup>5)</sup>の方法に従って抽出した。OpSite を 3 cm x 3 cm に切断しこれを 1.5 mL エッペンドルフチューブに入れた。これに 1,000  $\mu$ L の溶菌液 (100 mM Tris-HCl (pH7.0), 1 mM EDTA (pH 7.0), 0.5% SDS)を加えて、100°C、15 分間加熱した。フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール(25:24:1、インビトロジェン)およびクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)により除タンパクを行い、遠心上清の 2.5 倍量のエタノールを加えて DNA を沈殿させた。なお、沈殿促進剤としてエタ沈メイト<sup>TM</sup> (日本ジーン)も用いた。70%エタノールで DNA を洗浄後、乾燥し DNA を得た。

5) 鱗屑中の *Malassezia* DNA の定量: *Malassezia* DNA 量は、1)*Malassezia* 全菌種の DNA、2) *M. globosa* DNA、および 3)*M. restricta* DNA として測定した。すなわち、Sugita et al<sup>6)</sup>の方法に従い、当該菌種の rRNA 遺伝子を標的として TaqMan Probe (アプライドバイオシステムズ)を用いたリアルタイム PCR により定量した。用いたプローブおよびプライマー配列を Table 2 に示す。

### 3. 結果

#### 1) *Malassezia* DNA 量の変化

第50次隊および第51次隊ともに南極滞在中に採取部位に関わらず *Malassezia* 量は上昇し、帰国後にその菌量は出発時の値に戻った(第51次隊は帰国時の検体採取は未実施である)(Figs 1, 2)。出発時の菌量を1とした場合の菌量変化も Figs 1, 2 に示した。個人間で変動比率に大きな差異が認められるが、特に頭皮で著しい菌量の増加が観察された。南極滞在1ヶ月後→2ヶ月後→3ヶ月後の平均変動率は、第50次隊で51倍→106倍→150倍、第51次隊で97倍→246倍→128倍を示した。中には1,000倍を超える変化を示した隊員もいた。

一方、頬、前胸部、足底および耳裏部の菌量も南極滞在中に上昇したが頭皮ほどの変化率は示していない。頬部の南極滞在1ヶ月後→2ヶ月後→3ヶ月後の平均変動率は、第50次隊で1.8倍→2.1倍→1.6倍、第51次隊で3.1倍→3.6倍→3.0倍に変化した。同様に、前胸部は、第50次隊で7.2倍→5.0倍→6.2倍、第51次隊で8.9倍→9.4倍→10.1倍に、足底部は、第50次隊で1.9倍→4.3倍→5.5倍、第51次隊で1.5倍→3.3倍→4.0倍に、耳裏部は、第50次隊で5.7倍→2.8倍→4.2倍に変化した(第51次隊では検体未採取)。

#### 2) 頭皮における *Malassezia* 叢の解析

*Malassezia* 叢は部位にかかわらず *M. globosa* および *M. restricta* が優位であるが、構成比率は皮膚疾患あるいは部位によって異なる。全 *Malassezia* 菌種に対する *M. globosa* および *M. restricta* の構成比率を Fig. 3 に示す。

出発前の *M. restricta* の比率は60~70%であるが、南極滞在中に80~90%に上昇した。同時に *M. globosa* は出発前の10~20%から滞在中は10%以下に低下した。帰国後は出発前と同様の構成率を示すようになった。すなわち、頭皮では菌量の著しい上昇に伴い *M. restricta* が優位になった。

## 4. 考察

ISS に滞在中の宇宙飛行士は脂漏肌になるため、皮膚に定着する菌種の経時解析には好脂性菌を対象とするべきである。健康人の皮膚から細菌が 1,000 種以上、真菌は数 10 菌種以上が検出される。この内、皮膚に優位に常在しかつ好脂性菌は真菌 *Malassezia* である。真菌叢の中で *Malassezia* は部位に関わらず最も優位であり、全真菌の約 50~90%をしめる<sup>3)</sup>。*Malassezia* 叢のうち、*M. globosa* と *M. restricta* はいずれの部位でも優位な構成菌種である。一方で、宿主の状態により *Malassezia* は様々な皮膚疾患の原因あるは増悪菌種となることがある。鼻翼周辺の脂漏部位では脂漏性皮膚炎を引き起こす。HIV 等の免疫抑制した患者でも脂漏性皮膚炎はしばしば発症する。頭皮のフケ症は脂漏性皮膚炎の軽症型である<sup>7, 8)</sup>。アトピー性皮膚炎患者は皮膚バリア機能が損傷するため、結果としてドライスキン状態になる。この場合、皮膚 *Malassezia* が増悪抗原となり血清中に抗 *Malassezia* IgE 抗体が産生される<sup>9)</sup>。その他、癬風や毛包炎がある。

脂漏肌では脂漏性皮膚炎やフケ症が誘発される。これは、*Malassezia* のリパーゼが皮脂を分解しトリグリセリドを産生する。さらに、これはグリセリンと脂肪酸に分解される。パルミチン酸等の飽和脂肪酸は他の皮膚微生物の栄養源として利用されるが、不飽和脂肪酸であるオレイン酸は皮膚に炎症を直接惹起する。*Malassezia* はオレイン酸も栄養源として増殖することもできる<sup>10)</sup>。従って、皮脂量と *Malassezia* 量は相関する<sup>11)</sup>。

本試験で、頭皮の *Malassezia* 量は南極滞在中に著しく増加することが明らかになった。頬、胸部、足裏や耳裏部は定期的にウェットテッシュ等で当該部分を清拭することができるが、頭皮は洗髪が困難であるからと考えられる。頭皮での著しい *Malassezia* の上昇はフケ症の発症が予想される。事実、隊員の大部分が頭皮の痒みや大量のフケの発生をうたっていた。

健康皮膚あるいは *Malassezia* 関連皮膚疾患でのいずれにおいても、*Malassezia* 叢の主要構成菌種は *M. globosa* と *M. restricta* であるがその比率が疾患によってことなる。例えば、脂漏性皮膚炎やフケ症は *M. restricta* が優位になるのに対して、癬風は *M. globosa* が優位である<sup>12, 13)</sup>。第 50 次および 51 次隊員の 16 名の全例とも出発前に対して南極滞在中は *M. restricta* の比率は上昇し、反対に *M. globosa* の比率は低下した。これは脂漏性皮膚炎やフケ症型の *Malassezia* 叢へシフトしたことを示している。

以上、本研究では入浴や身体の清拭が制限された状態では皮膚 *Malassezia* 量は上昇し、主要構成菌種の構成比率が変化することを示した。本成果は、宇宙環境に長期間滞在する宇宙飛行士の衛生管理技術の向上に応用できると考えられる。

## 【参考文献】

1. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2011, 9(4):244-53. Erratum in: *Nat Rev Microbiol*. 2011, 9(8):626.
2. Cogen AL, Nizet V, Gallo RL. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br J Dermatol*. 2008, 158(3):442-55.
3. Gao Z, Perez-Perez GI, Chen Y, Blaser MJ. Quantitation of major human cutaneous bacterial and fungal populations. *J Clin Microbiol*. 2010, 48(10):3575-81.
4. Zhang E, Tanaka T, Tajima M, Tsuboi R, Nishikawa A, Sugita T. Characterization of the skin fungal microbiota in patients with atopic dermatitis and in healthy subjects. *Microbiol Immunol*. 2011, 55(9):625-32.
5. 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*. 2001, 39(10):3486-90.
6. Sugita T, Tajima M, Tsuboku H, Tsuboi R, Nishikawa A. Quantitative analysis of cutaneous *Malassezia* in atopic dermatitis patients using real-time PCR. *Microbiol Immunol*. 2006, 50(7):549-52.
7. Ashbee HR. Update on the genus *Malassezia*. *Med Mycol*. 2007, 45(4):287-303.
8. Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, Bassukas ID, Velegriaki A. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2012, 25(1):106-41.
9. Zhang E, Tanaka T, Tajima M, Tsuboi R, Kato H, Nishikawa A, Sugita T. Anti-*Malassezia*-Specific IgE Antibodies Production in Japanese Patients with Head and Neck Atopic Dermatitis: Relationship between the Level of Specific IgE Antibody and the Colonization Frequency of Cutaneous *Malassezia* Species and Clinical Severity. *J Allergy (Cairo)*. 2011, 2011:645670.
10. DeAngelis YM, Saunders CW, Johnstone KR, Reeder NL, Coleman CG, Kaczvinsky JR Jr, Gale C, Walter R, Mekel M, Lacey MP, Keough TW, Fieno A, Grant RA, Begley B, Sun Y, Fuentes G, Youngquist RS, Xu J, Dawson TL Jr. Isolation and expression of a *Malassezia globosa* lipase gene, LIP1. *J Invest Dermatol*. 2007, 127(9):2138-46.
11. Sugita T, Suzuki M, Goto S, Nishikawa A, Hiruma M, Yamazaki T, Makimura K. Quantitative analysis of the cutaneous *Malassezia* microbiota in 770 healthy Japanese by age and gender using a real-time PCR assay. *Med Mycol*. 2010 Mar;48(2):229-33.
12. Tajima M, Sugita T, Nishikawa A, Tsuboi R. Molecular analysis of *Malassezia* microflora in seborrheic dermatitis patients: comparison with other diseases and healthy subjects. *J Invest Dermatol*. 2008, 128(2):345-51.
13. Sugita T. Mycological study on *Malassezia*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2007, 48(4):179-82.

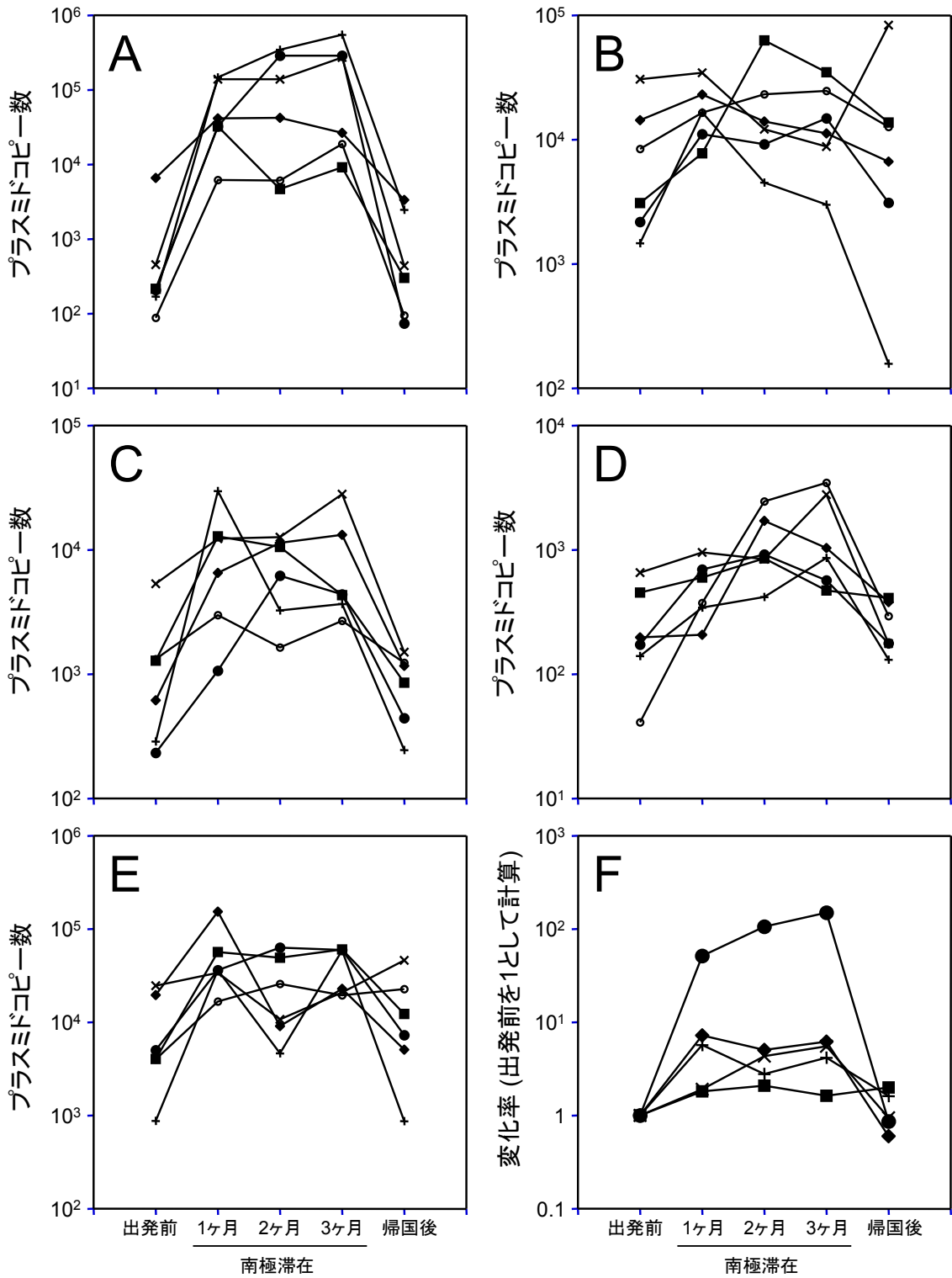


Fig. 1 第50次隊員の皮膚*Malassezia* DNAの経時変化

A, 頭皮; B, 頬; C, 前胸部; D, 足底; E, 耳裏;  
 ●, 隊員A; ■, 隊員B; ◆, 隊員C; ▲, 隊員D; ○, 隊員E; □, 隊員F

F, 変化率の平均 (出発前を1として計算)  
 ●, 頭皮; ■, 頬; ◆, 前胸部; ×, 足底; +, 耳裏

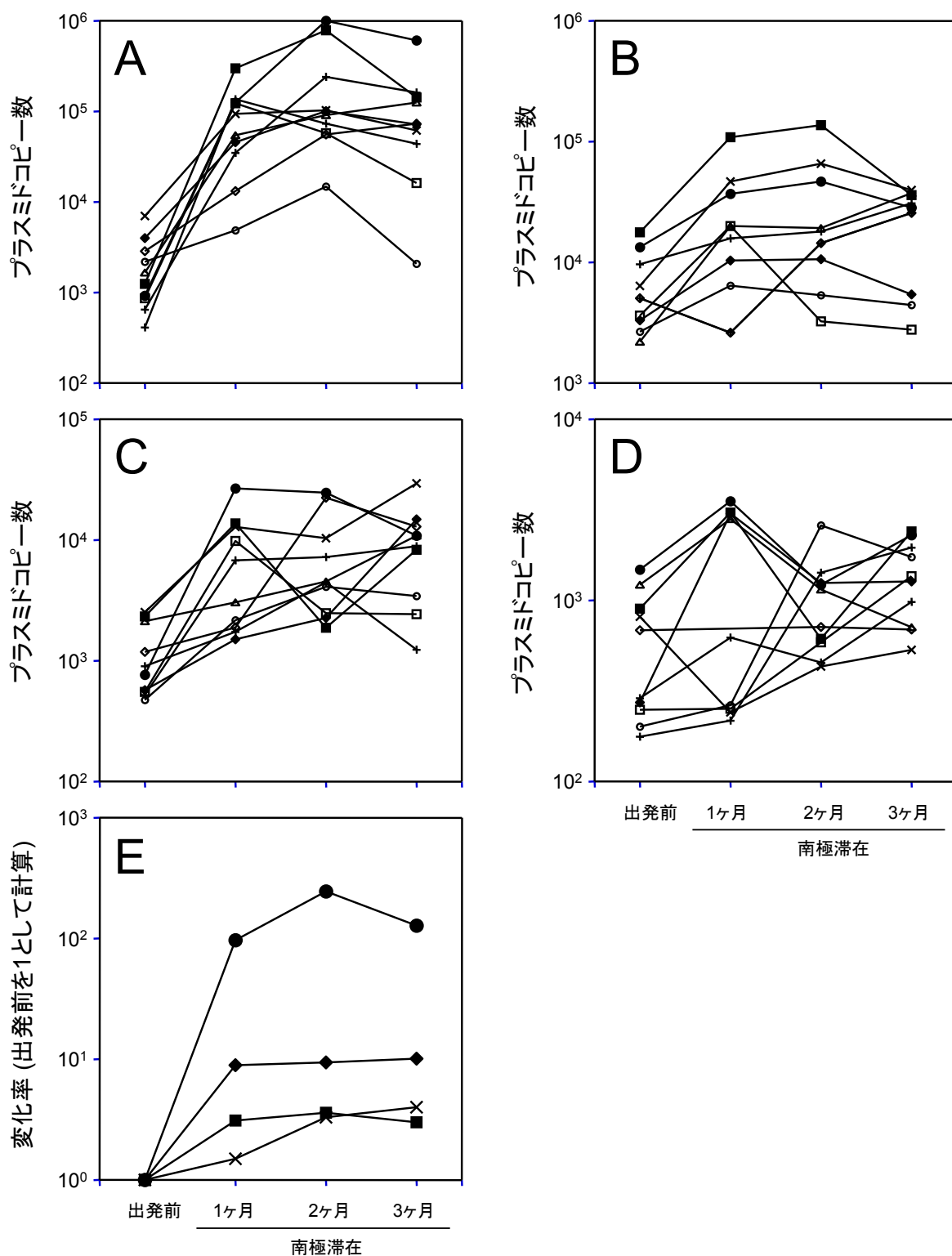


Fig. 2 第51次隊員の皮膚*Malassezia* DNAの経時変化

A, 頭皮; B, 頬; C, 前胸部; D, 足底

●, 隊員A; ■, 隊員B; ◆, 隊員C; ×, 隊員D; +, 隊員E;  
○, 隊員F; □, 隊員G; ◇, 隊員H; △, 隊員I; |, 隊員J

E, 変化率の平均 (出発前を1として計算)

●, 頭皮; ■, 頬; ◆, 前胸部; ×, 足底

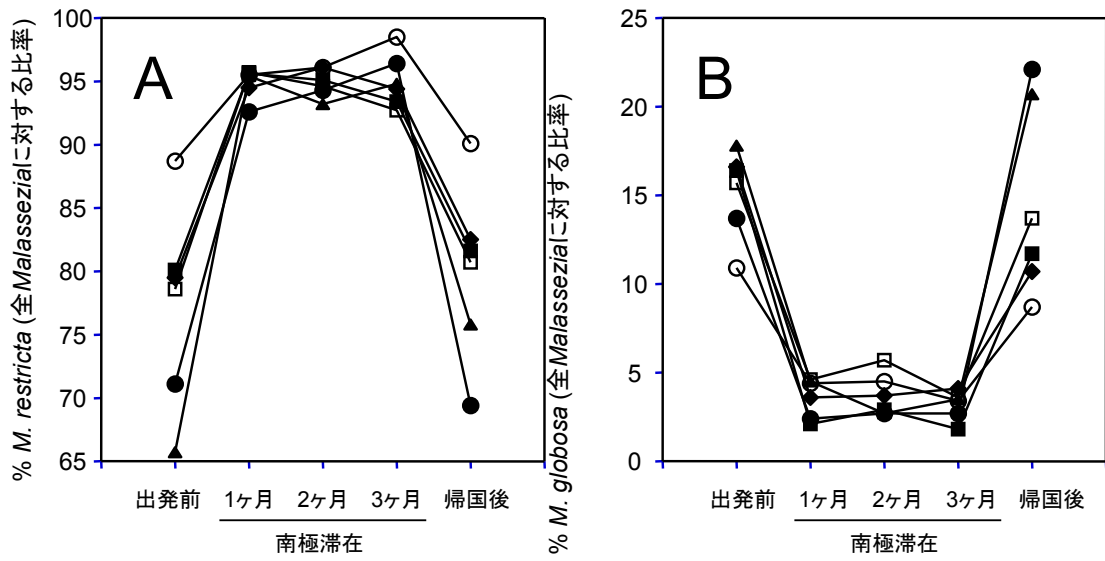


Fig. 3 第50次隊員の皮膚*Malassezia restricta* / *M. globosa* DNA構成比率の経時変化

●, 隊員A; ■, 隊員B; ◆, 隊員C; ▲, 隊員D; ○, 隊員E; □, 隊員F