

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2015

課題番号：25304006

研究課題名(和文) アジア人種の食と腸内フローラと健康に関する調査研究

研究課題名(英文) Investigation on diets, gut microbiota, and health of Asian people

研究代表者

中山 二郎 (Nakayama, Jiro)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40217930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：アジアの多様な食が腸内フローラを介して、我々の健康にどのような影響を及ぼしているかについて知見を蓄積することを目標として、アジア10カ国と共同でAsian Microbiome Projectを設立した。そして、小学児童を対象とした第一期調査と、新生児から高齢者まですべての年齢層を対象とした第二期調査を実施した。その結果、(1)アジア人は欧米人に比べてビフィズス菌が豊富なこと、(2)アジア人の腸内フローラは大きく2つのタイプに分かれること、(3)すべての国において加齢とともにビフィズス菌が減少し腸内細菌科が増加する傾向があること、(4)各国特有の特徴が腸内フローラに存在すること、が示された。

研究成果の概要(英文)：To gain knowledge on how diverse Asian diets affect host health through gut microbiota, we have established Asian Microbiome Project with ten Asian countries. Phase 1 targeted school-age children and Phase 2 targeted whole age group from newborn to elderly. We found that (1)Asians harbor Bifidobacterium more than Western population, (2)Asian gut microbiota can be classified into two types, (3)Bifidobacterium decreases and Enterobacteriaceae increases with age commonly among Asia, (4) country-associated features present in gut microbiota of Asians.

研究分野：分子微生物学

キーワード：腸内フローラ アジア 食 16S rRNA ビフィズス菌 エンテロタイプ

1. 研究開始当初の背景

近年爆発的に進展したゲノム科学の技術革新は、腸内共生菌学にも多大なる波及効果を及ぼし、腸内共生菌と宿主の健康の関係について次々とメスを入れている。特に最近では、1000種にのぼると言われる共生菌群において、どの菌がどのように宿主に影響を与えているか、詳細なデータが示されるようになってきた。特に、食を始めとする宿主の生活習慣と腸内細菌叢との関係については、多くの研究者の興味の下に精力的に研究が展開されている。そして腸内細菌と宿主の健康の関連性を理解することで、何を食すると、どのような腸内細菌叢が形成され、どのように健康が維持され、あるいは逆にどのような疾病リスクが高まるかを予測することができるようになって期待される。

このような時代背景の中、米国 NIH 主導の Human Microbiome Project (HMP)、欧州では Metagenomics of Human Intestinal Tract (MetaHIT) と、多人数の腸内フローラデータを収集する大規模プロジェクトが進行している。そして、アジアでも、自身の腸内フローラのデータを自分たちの手により収集しようという機運が高まり、2009年にアジア乳酸菌学会連合のメンバーが中心となり、Asian Microbiome Project (AMP) を始動した。

2. 研究の目的

「食と体と健康」に関するライフサイエンスへの関心が日々高まってきている昨今、多民族種が混在すると言われるアジアは、ユニークで健康効果の高い食文化の宝庫であり、「食と体と健康」の疫学フィールドとして注目される。一方、近年の腸内細菌学の発展により、500~1000種の細菌から構成される腸内フローラは、食と健康を繋ぐインターフェースとして非常に重要な役割を果たしていることが分かってきた。そこで、我々は、アジア諸外国・計10ヶ国の研究グループと共同で AMP を設立し、本調査研究を実施することとした。ここでは、アジア各地域における食と腸内細菌叢と健康状態について、詳細かつ網羅的に調査し、基盤データベースを構築し、さらにはそのデータベースを多次元的に解析し、人種と食と腸内細菌叢と健康の間の関連性を数多く見出すことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 第一期調査 (小学児童)

比較的安定した成人に近い腸内細菌叢を有するとされている、小学児童7歳から11歳を対象に、糞便細菌叢と日常の食生活と健康状態について調査を行った。調査国は日本、中国、台湾、タイ、インドネシアの5ヶ国とした。各国より、都会と地方の2都市を選び、各都市から30名前後、計303名の参加者を募った。

食習慣調査は、各食品項目の摂取頻度を尋ねたアンケート (Food Frequency Questionnaire; FFQ) により行った。

糞便細菌叢については、参加者より提供された糞便より、細菌 DNA を抽出し、全細菌の16S rRNA 遺伝子 V6-V8 領域をバーコードタグ付きプライマーで増幅し、Roche 454 ゲノムシーケンサーにて配列解析した。

得られた配列は、クオリティフィルタリングと PCR キメラチェックによりデノイズした後、97% 相同配列をグルーピングして operational taxonomy unit (OTU) とした。同時に、バーコードタグ配列をもとに、サンプル毎の OTU table を作成した。次に、各 OTU の代表配列をデータベースに照合して系統情報を得た後、OTU table をもとに各サンプルの各分類の存在比率を計算した。

次に、各サンプルの細菌組成データを基に、多様性解析、主成分分析、クラスタリング解析、などを行った。

以上の解析に加えて、さらにモンゴル、韓国、フィリピン、マレーシアの児童も加えた調査も行った。また、細菌叢解析法として、Roche 454 シーケンサーよりも低コストで解析が可能なイルミナ社の MiSeq を用いたシーケンシングも行っている。

また、日本、韓国、タイ、インドネシアから計6サンプルを選択し、全ゲノムのショットガンメタゲノムシーケンス解析 (2013年度ゲノム支援研究) も行った。

(2) 第二期調査 (乳幼児)

乳幼児については、日本とインドネシアにおいてのみ調査を行った。日本では、環境省の「子どもの健康と環境に関する全国調査 (エコチル調査)」に参加の福岡市内出生児101名を対象とし、生後1ヶ月と生後1年時の便をサンプリングし、MiSeq によりメタ16S解析を行った。また、同エコチル調査に参加の10名を対象に、生後1ヶ月、2ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、24ヶ月 (今後36ヶ月まで調査を継続する) の調査も行った。このうち6名については、全ゲノムのショットガンメタゲノム解析も行っている (2015年度ゲノム支援研究)。インドネシアの児童についても同様に生後3年間の便のサンプリングを行い、ショットガンメタゲノム解析を行っている。

(3) 第二期調査 (成人、高齢者)

成人と高齢者については、日本、中国、モンゴル、韓国、タイ、インドネシア、シンガポールを対象国とした。各国1都市にて、成人については20歳から40歳を対象に、高齢者については60歳以上を対象に、各国各年齢グループ約30名ずつから便をサンプリングし、細菌叢調査を上記同様行った。

4. 研究成果

(1) 第一期調査 (小学児童)

各国の食文化を反映する食習慣を維持し

ているとされることを理由に、最初に、小学児童を調査することとした。まず、アジアの小学児童の腸内細菌叢と特徴として、ビフィズス菌を豊富に含むことが示された。特に、日本と中国の蘭州の子どもは全細菌の20%程度がビフィズス菌で占められていた(図1)。また、5ヶ国303名の腸内細菌組成データをもとに主成分分析を行い、さらにクラスタリング解析を行った結果、二つの腸内細菌叢型(エンテロタイプ)に大きくクラスタリングされることが示された(図2)。一つは、プレボテラ属細菌の占有率が高いPタイプで、もう一つはビフィドバクテリウム属・バクテロイデス属の占有率が高いBBタイプである。Pタイプはインドネシアやタイの地方の児童に多く、BBタイプは中国、日本、台湾、そしてタイの都市であるバンコクの児童に多かった。特に、日本の児童は、調査した43名の東京の児童、40名の福岡の児童のうち、東京の児童1名を除いてすべてBBタイプであった。

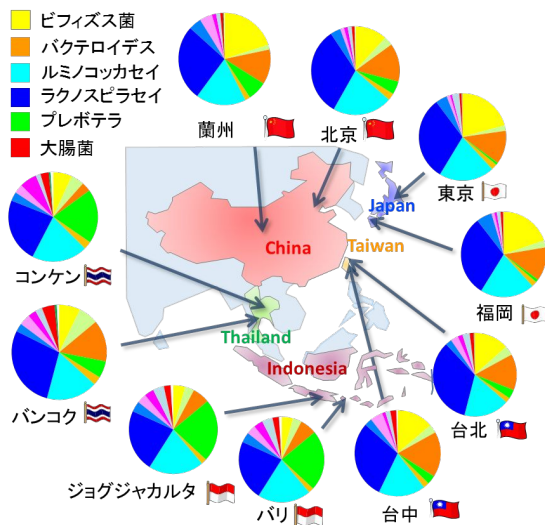


図1. アジア5ヶ国10都市児童303名の腸内細菌叢(科レベル)

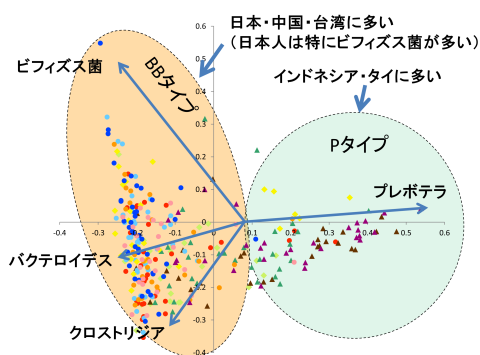


図2. アジア5ヶ国児童303名の腸内細菌叢の主成分分析

全遺伝子を対象としたショットガンメタゲノム解析から、Pタイプの細菌叢にはアミラーゼやペクチナーゼなど植物性多糖の分解酵素が豊富であり、一方BBタイプの細菌叢には胆汁酸の代謝酵素が豊富にあることが示された。前者から、Pタイプの腸管内には、未消化のでんぷんや植物細胞壁成分などが存在することが示唆された。このことから、東南アジアの子どもにPタイプが多い理由として、野菜特に穀類、なかでもインディカ米などの難消化性でんぷんを多く含むものを多く食していることが関連していると推察された。一方、BBタイプの腸管内には、胆汁酸が多く、このことが理由で、胆汁酸感受性のプレボテラ属などは生存できずBBタイプが形成されていると推察された。また、胆汁酸が多い理由としては、高脂肪食により胆汁酸の分泌がより、促進されていること、また、胆汁酸の吸収排泄に大きな役割を果たすといわれている食物性繊維の摂取が少ないことも関連していると推察された。

エンテロタイプに加えて、各国特有の細菌叢も見られた。特に、日本の児童の菌叢は特徴的で、他国に比べて多様性に乏しく、特に大腸菌群やウェルシュ菌などの悪玉菌が少ない傾向にあった。我国特有の食事様式に加えて、生活環境が腸内フローラの構成に影響を及ぼしている可能性が示唆される。

(2) 第二期調査(乳幼児)

日本人新生児100名の解析結果からは、生後1ヶ月の時点では、大きく3つのタイプに腸内細菌叢が分かれることが示された。一つはビフィズス菌を豊富に有するタイプ、もう一つは大腸菌群が多いタイプ、そして3つ目はバクテロイデスが比較的多いタイプである。興味深いことに帝王切開出産児には3つ目のバクテロイデスタイプは見られなかった。

生後1年後になると、インドネシアの子どもの多くはプレボテラタイプ、日本人はバクテロイデスタイプに分かれる傾向にあることが示された。この2つのタイプに分かれる要因については大変興味を持たれる。

(3) 第二期調査(成人・高齢者)

各国共通で、年齢とともに、ビフィドバクテリウム属細菌が減少し、大腸菌群が増加し、さらには細菌種の多様性が減少していく傾向が見られた。しかし、その度合いは国により大きく異なり、また同一国内でも個人間の差が大きく見られた。これらの腸内細菌叢の変化とその個人差が、宿主の健康や加齢にどのような影響を及ぼしているか、大変興味のもたれるところである。

<引用文献>

Nakayama, J. et al., (2015) Diversity in gut bacterial community of school-age children in Asia. Sci Rep 5:8397.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Nakayama J, Jiang J, Watanabe K, Chen K, Ninxin H, Matsuda K, Kurakawa T, Tsuji H, Sonomoto K, Lee Y-K (2013) Up to species-level community analysis of human gut microbiota by 16S rRNA amplicon pyrosequencing. *Bioscience Microflora Food Health* 32(2): 69-76. DOI:10.12938/bmfh.32.69.

Enomoto T, Sowa M, Nishimori K, Shimazu S, Yoshida A, Yamada K, Furukawa F, Nakagawa T, Yanagisawa N, Iwabuchi N, Odamaki T, Abe F, Nakayama J, Xiao JZ (2014) Effects of bifidobacterial supplementation to pregnant women and infants in the prevention of allergy development in infants and on fecal microbiota. *Allergol Int* 63 (4):575-585. DOI:10.2332/allergolint.13-OA-0683

Ruengsomwong S, Korenori Y, Sakamoto N, Wannissorn B, Nakayama J, Nitisingprasert S (2014) Senior Thai fecal microbiota comparison between vegetarians and non-vegetarians using PCR-DGGE and real-time PCR. *J Microbiol Biotechnol* 24 (8):1026-1033. DOI: 10.4014/jmb.1310.10043.

Nakayama J, Watanabe K, Jiang J, Matsuda K, Chao SH, Haryono P, La-Ongkham O, Sarwoko MA, Sujaya IN, Zhao L, Chen KT, Chen YP, Chiu HH, Hidaka T, Huang NX, Kiyohara C, Kurakawa T, Sakamoto N, Sonomoto K, Tashiro K, Tsuji H, Chen MJ, Leelavatcharamas V, Liao CC, Nitisingprasert S, Rahayu ES, Ren FZ, Tsai YC, Lee YK (2015) Diversity in gut bacterial community of school-age children in Asia. *Sci Rep* 5:8397. DOI: 10.1038/srep08397.

中山二郎. 腸内細菌と健康：ゆりかごから墓場まで. *日本醸造学会誌*, 108(10), 724-733 (2013).

東佳那子, 中山二郎. グローバル化する腸内フローラ研究と Asian Microbiome Project. *ソフト・ドリンク技術資料*, 175, 49-70 (2015).

東佳那子, 中山二郎. 進化する次世代シーケンサーによる腸内細菌叢の解析, *腸内細菌学雑誌*, 29(3), 135-144 (2015).

本田倫子, 中山二郎. アジア人の食・健康・腸内細菌叢. *化学療法の領域*, 32(2), 253-260 (2016).

〔学会発表〕(計 19 件)

Sunee Nitisingprasert, Orawan La-ongkam, Supatjaree Ruengsomwong, Massalin Nakphaichit, Bhusita Wanissorn, Jiro Nakayama, Age-related changes and their food consumption affecting gut microbiota of healthy Thai subjects, 第 67 回日本生物工学会, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市), 2015 年 10 月 28 日.

本田倫子、實藤雅文、諸隈誠一、山本麻寿紗、田中優、百田理恵、高木愛子、佐藤匡夫、月森清巳、加藤聖子、原寿郎、中山二郎, 新生児期における腸内細菌叢に影響を与える要因の網羅的解析, 第 67 回日本生物工学会, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市), 2015 年 10 月 28 日.

山本麻寿紗、本田倫子、田中優、百田理恵、Ladie Palermo, Jullie Tan, Yuan Kun Lee, 園元謙二、中山二郎, フィリピン都市部と農村部に住む児童の腸内細菌叢の比較, 2015 年度日本農芸化学会中四国・西日本支部合同大会, 愛媛大学(愛媛県松山市), 2015 年 9 月 18 日.

山本麻寿紗、本田倫子、田中優、百田理恵、Ladie Palermo, Jullie Tan, Yuan Kun Lee, 園元謙二、中山二郎, フィリピンの子どもの腸内細菌叢：食との関連性, 第 22 回日本生物工学会九州支部宮崎大会, 宮崎大学(宮崎県宮崎市), 2015 年 12 月 5 日.

田中優、東佳那子、山本麻寿紗、本田倫子、百田理恵、清原千賀子、園元謙二、鷲尾昌一、中山二郎, 食物アレルギー発症児と非発症児の乳幼児期における腸内細菌叢の比較解析, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2016 年 3 月 28 日.

中山二郎、東佳那子、山本麻寿紗、百田理恵、本田倫子、渡辺幸一、Yuan Kun Lee, Asian Microbiome Project: アジア人の食と腸内フローラと健康に関する横断型コホート研究, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山大学(岡山県岡山市), 2015 年 3 月 29 日.

山本麻寿紗、東佳那子、百田理恵、本田倫子、渡辺幸一、Shirchin Demberel, Sunee Nitisingprasert, Park Yong Ha, Endang S. Rahayu, Fa-Zheng Ren, Yuan Kun Lee, 園元謙二、中山二郎, Asian microbiome project phase II: アジア人の腸内フローラの加齢による変化, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山大学(岡山県岡山市), 2015 年 3 月 28 日.

中山二郎、東佳那子、山本麻寿紗、本田倫子、百田理恵、園元謙二、Yuan Kun Lee, Asian Microbiome Project: アジア人の腸内細菌叢に関する横断型コホート研究, 第 88 回日本細菌学会総会, 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市), 2015 年 3 月 26

日.
Jiro Nakayama, Yuan Kun Lee, Asian Microbiome Project: Diversity in gut microbiota of Asian people, 4th Beneficial Microbes Conference, ハーグ(オランダ), 2015年3月18日.
Jiro Nakayama, What is microbiota, microbiome and their analysis?, The 8th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria, バンコク(タイ), 2015年8月7日.
Jiro Nakayama, Digging into our gut microbial community by NGS, 2nd Asian Fermented Foods: Probiotic: the potential ingredients for health products, バンコク(タイ), 2015年8月27日.
東佳那子、百田理恵、山本麻寿紗、林哲也、小椋義俊、黒川顕、豊田敦、加藤和人、AMP study group、園元謙二、渡辺幸一、Lee Yuan Kun、中山二郎, Asian Microbiome Project: 次世代シーケンサーを用いたアジア人腸内細菌叢のプロファイル化, 第21回日本生物工学会九州支部熊本大会, 熊本大学(熊本県熊本市), 2014年12月6日.
中山二郎, Asian Microbiome Project: アジア人の腸内細菌叢に関する調査研究, 日本食品免疫学会第9回宿泊セミナー, 鷗外荘(東京都台東区), 2014年12月5日.
中山二郎, アジア人の食と腸内細菌と健康に関するマルチコホート研究, 第19回腸内細菌学会, 北里大学(東京都港区), 2015年6月19日.
中山二郎ら, Asian microbiome project phase II: アジア人の腸内フローラの加齢による変化, 第18回腸内細菌学会, 東京大学伊藤国際学術研究センター(東京都文京区), 2014年6月11日.
中山二郎、渡辺幸一、Yuan-Kun Lee, Asian Microbiome Project: アジア人の食と腸内フローラと健康に関する調査研究, 日本農芸化学会 2014年度大会, 明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市), 2014年3月30日.
東佳那子、Jiahui Jiang、渡辺幸一、Shirchin Demberel, Sunee Nitisinprasert, Yongha Park, Endang S, Rahayum, Fa-Zheng Ren, Ying-Chieh Tsai, 園元謙二、Yuan-Kun Lee, 中山二郎, アジア人の腸内フローラに見られる2つのエンテロタイプと地域特異性, 日本農芸化学会 2014年度大会, 明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市), 2014年3月29日.
Jiahui Jiang, Kenji Sonomoto, Jiro Nakayama, Diversity in gut bacterial composition and their 16S rRNA gene sequences among Asian children, 日本農

芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本ビタミン学会近畿・中四国・九州沖縄合同大会, 広島県立大学(広島県広島市), 2013年9月6日.

Jiro Nakayama, Jiahui Jiang, Koichi Watanabe, Kazunori Matsuda, Takashi Kurakawa, Hirokazu Tsuji, Fa-Zheng Ren, Sunee Nitisinprasert, Endang S, Rahayum Chii-Cherng Liao, Ying-Chieh Tsai, Yuan-Kun Lee, アジア5ヶ国児童の腸内細菌叢解析, 第17回腸内細菌学会, 北里大学(東京都港区), 2013年6月13日.

[図書](計3件)

本田倫子, 中山二郎. ヒトマイクロバイオーム研究最前線(第1編第3節)アジア人の腸内細菌叢比較. pp.27-42, エヌティーエス(2016).

本田倫子, 中山二郎. 食と微生物の事典, 4. 食と腸内微生物, 17. 世界各国に暮らす人々と腸内常在微生物叢. 朝倉書店, 印刷中(2016).

山本麻寿紗, 田中優, 中山二郎. 食と微生物の事典, 4. 食と腸内微生物, 18. 腸内微生物の年齢による変化. 朝倉書店, 印刷中(2016).

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 二郎 (NAKAYAMA, Jiro)

九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 40217930

(2) 研究分担者

清原 千香子 (KIYOHARA, Chikako)

九州大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号: 00169963

佐藤 匡央 (SATO, Masao)

九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 90294909

(3) 連携研究者

服部 正平 (HATTORI, Masahira)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授
研究者番号: 70175537

住江 愛子 (SUMINOE, Aiko)

九州大学・環境発達医学研究センター・学術研究員
研究者番号: 80335968

(4)研究協力者

< 研究協力者 >

渡辺 幸一 (WATANABE, Koichi)
ヤクルト本社中央研究所・参与

< エコチル調査 >

原 寿郎 (HARA, Toshiro)
九州大学・大学院医学研究院・教授

加藤 聖子 (KATO, Kiyoko)
九州大学・大学院医学研究院・教授

實藤 雅文 (SANEFUJI, Masafumi)
九州大学・環境発達医学研究センター・学
術研究員・特任准教授

諸隈 誠一 (MOROKUMA, Seiichi)
九州大学・環境発達医学研究センター学術
研究員・特任准教授

< 新学術領域「ゲノム支援」支援担当者 >

林 哲也 (HAYASHI, Tetsuya)
九州大学・大学院医学研究院・教授

黒川 顕 (KUROKAWA, Ken)
東京工業・大学院生命理工学部・教授

加藤 和人 (KATO, Kazuto)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授

小椋 義俊 (OGURA, Yoshitoshi)
九州大学・大学院医学研究院・助教

豊田 敦 (TOYODA, Atsushi)
国立遺伝学研究所・教授

山田 拓司 (YAMADA, Takuji)
東京工業・大学院生命理工学部・准教授

< 海外共同研究者 >

Yuan-Kun Lee
National Univ. of Singapore
(Singapore)・Assoc. Prof.

Ying-Chieh Tsai
National Yang-Ming Univ.(Taiwan)・Prof.

Fa-Zheng Ren
China Agriculture Univ.(China)・Prof.,

Endang Rahayu
Gadjah Mada Univ.(Indonesia)・Prof.

Sunee Nitisinprasert
Kasetsart Univ.(Thailand)・Assoc. Prof.

Raha Abdul Rahim
Univ. Putra Malaysia(Malaysia)・Prof.

Shirchin Demberel
Mongolian State University of
Agriculture (Mongolia)・Prof.

G. Balakrish Nair
National Institute of Cholera and
Enteric Diseases (India)・Prof.

Yongha Park
Yeungnam University(South Korea)・Prof.

Julie D. Tan
Visayas State Univeristy (Philippines)・
Prof.