

アジア マイクロビオーム プロジェクト：  
アジア人の食と健康のインターフェースとしての  
腸内フローラの理解に向けて

中山二郎

九州大学大学院農学研究院 生命機能科学部門

略歴：1965年、広島県生まれ。1987年 東京大学農学部卒業後、1989年 同大学大学院農学系研究科修士課程修了。1989年 東京大学農学部助手着任。1998年～1999年 オランダ・ワロゲニンゲン大学博士研究員として出向。2001年 九州大学大学院農学研究院助教授、2007年 同大学院准教授、現在に至る。

主な研究テーマ：①ヒト腸内フローラの多様性に関する研究、②グラム陽性細菌のクオラムセンシングを標的とした抗感染症剤の開発に関する研究。

主な受賞：1999年農芸化学奨励賞「腸球菌の性フェロモンシグナリングに関する生物有機化学的・分子生物学的研究」

要約：

はじめに：Asian Microbiome Project (AMP) とは

腸内フローラが食と健康のインターフェースとして重要な働きをしていることが分かってきた今日において、アジアは「食と体と健康」の疫学フィールドとして注目される。そこで、我々はアジア乳酸菌学会連合 (Asian Federation of Society for Lactic Acid Bacteria) のもとに、Asian Microbiome Project (AMP) を組織し、アジア人の腸内フローラの調査を行っている。まず、第一期調査として、各国食文化を反映する食習慣のもとに安定したフローラを構築していると期待される小学児童を対象に、糞便細菌叢を解析した。第二期調査では、アジア人の腸内細菌叢の基盤データベースを構築することを目的として調査国を10か国に増やし、また調査対象の年齢層を、第一期調査の小学児童に加えて、乳幼児、成人、高齢者も対象として、同様に糞便細菌叢解析を行った。第三期調査では、食と腸内細菌の関連性をより詳細に解析することを目的として、調査対象を特定の地域に限定して調査している。

1. 第一期調査：アジア5か国10都市の小学児童303名の腸内細菌叢<sup>1)</sup>

各国食文化を反映する食習慣を維持していると期待される、小学児童（7歳から11歳）を対象に、糞便細菌叢の解析を行った。調査国は日本、中国、台湾、タイ、インドネシアの5か国で、各国から都会と地方の2都市を選び、各都市25名から45名、計303名の健常児童を対象に、糞便をサンプリングし、その細菌

叢解析を行った。各児童の菌種レベルの組成データを用いて、教師あり機械学習プログラムであるランダムフォレスト解析を行ったところ、興味深いことに、日本と中国とインドネシアの児童の腸内細菌叢は高い確率で判別可能なほどに固有の傾向を示した。一方、台湾の児童は中国と日本、タイの児童は中国とインドネシアの中間の特徴を有する傾向にあることが示された。

一方、菌科レベルで主成分分析を行ったところ、大きな二つの特徴が見られた。日本の福岡と東京、台湾の台北と台中、中国の北京と蘭州、タイのバンコクの児童には Bacteroidaceae 科や Bifidobacteriaceae 科の細菌が多いのに対し、インドネシアのジョグジャカルタとバリ、タイのコンケンの子供には Prevotellaceae 科の細菌が多く存在していた。さらにこの主成分分析上でクラスタリング解析を行った結果、Prevotellaceae を多く含む細菌叢 (Pタイプ) と、Bifidobacteriaceae と Bacteroidaceae を多く含む細菌叢 (BBタイプ) の2つのクラスターに分かれた。日本の子どもにおいては、調査した児童84名のうち83名がBBタイプであった。また興味深いことに、日本の児童は  $\alpha$  多様性 (各サンプルに含まれる菌の多様性) および  $\beta$  多様性 (サンプル間の菌叢の多様性) とともに低く、個人間で似通った細菌叢を有していることが示された。日本の児童には、このように似通ったBBタイプの細菌叢を導く何らかの強い要因が存在していることが示唆される。

さらに各タイプの細菌叢の機能面についての特徴を知るために仮想メタゲノム解析である PICRUSt 解析を行った。その結果Pタイプには  $\alpha$ -アミラーゼがより豊富に存在し、BBタイプはオリゴ糖の分解に携わる  $\alpha$ -グルコシダーゼが豊富であった。また、BBタイプは胆汁酸の脱抱合にかかわる choloylglycine hydrolase の遺伝子量がPタイプに比べて豊富であり、BBタイプの細菌叢において胆汁酸代謝が活発になっていることが予測された。一方、Pタイプに豊富に存在する *Prevotella* は胆汁酸感受性であることが示されている。また、choloylglycine hydrolase の遺伝子量と各サンプルから検出された OTU 数は負に相関しており、抗菌活性も有する胆汁酸量の代謝が盛んなBBタイプの腸管では、一部の細菌種が生存できなくなっていることが示唆される。

PタイプとBBタイプといった菌組成的にも機能的にも異なる2つの腸内細菌叢タイプが生まれてきた要因には大変興味を持たれる。食因子、特に主食やその摂取法、あるいは副食を含む全体的な食習慣は、このようなグローバルな細菌叢タイプの決定に強く関わっていると考えられる。

## 2. 第二期調査：アジア人腸内細菌叢の基盤データベース構築

新生児から高齢者までを対象に腸内細菌叢を網羅的に解析し、アジア人の腸内フローラの基盤データベースを構築することを目指している。乳幼児については、これまでにインドネシアの0歳から4歳までの118糞便サンプルと日本人の

0歳から1歳までの202糞便サンプルの16S rRNA解析を終えている。小学児童から高齢者までの解析は、第一期調査の5か国に加えて、韓国およびモンゴルも加えてサンプリングを行い16S rRNA解析を行った。小学児童から高齢者までの500を超える菌叢データを用いて、各国ごとに年齢との相関を調べた。その結果、各国で共通して、年齢に相関して、*Bifidobacterium*が減少し、*Enterobacteriaceae*が増加する傾向が見られた。この二つの菌グループの年齢による変化は、他の多くの研究から報告があるが、アジア諸外国で共通してこの腸内細菌叢変化が確認されたことは大変興味深い。

### 3. 第三期調査：フィリピンレイテ島小学児童の食と腸内細菌叢の調査<sup>2)</sup>

第三期調査では、食と腸内細菌叢の関連性を詳細に調べることを目的に、特定の地域に焦点を当て、腸内細菌叢調査と同時に詳細な食事調査を行っている。フィリピンレイテ島は、フィリピンで第8位の面積を有する島で、発展途上にある。調査したOrmocとBaybayはわずか60kmほどの距離にあるが、オルモックは近代化が進んでいるのに対し、バイバイはまだそれほど近代化が進んでいない。AMPでは、オルモックおよびバイバイに住む児童（7歳～9歳）それぞれ19名と24名を対象に糞便サンプルを回収し、第一期同様に細菌組成の解析を行った。同時に、137項目の食品の摂取頻度を問うアンケートによる食事調査を行った。糞便細菌叢解析の結果から、バイバイの児童はPタイプ（24人中21人）、Ormocの児童はBBタイプの細菌叢（19人中15人）が主体であった。食習慣のアンケート調査ではOrmocの児童はファストフードや肉、菓子類をバイバイの児童より多く消費しており、欧米的な食文化が浸透していることが伺えた。Baybayの児童は脂質の摂取量が全エネルギー摂取量の18.1%であるのに対し、Ormocの児童は27.2%であった。WHOの指針では脂質摂取は全食エネルギーの30%以下を推奨しているが、それを上回る児童も多く、肥満児も多く含まれていた。脂質摂取量はFirmicutes/Bacteroidetes (F/B) に正の相関を示し、*Prevotella*属は負の相関を示した。PICRUSt解析を行った結果、BBタイプには、脂質の吸収を援助する胆汁酸の代謝関連遺伝子がPタイプに比べてより集積されていることが示された。これはBBタイプの子どもの腸内に、より多くの脂質が供給されていることを間接的に示しており、先の食調査のデータに矛盾しない。一方、Pタイプにはアミラーゼに関連する遺伝子が、BBタイプに比べてより多く集積されていることが示された。穀類を多く摂取するアジアにおいては、デンプンの分解は腸管内においても重要な機能の一つであり、その機能がPタイプの細菌コミュニティにより集積されているというシミュレーションの結果は注目すべき点である。

おわりに

以上、アジア人の腸内には、菌組成が大きく異なる2つの細菌叢タイプが存在することが示された。日本や中国、台湾はBBタイプ、インドネシアはPタイプが主流であった。一方、同じ国でも、地域や食習慣によってPタイプとBBタイプの分布が異なっていた。タイでは大都市バンコクの児童はBBタイプが多いのに対し、地方都市のコンケンの児童はPタイプが主流であった。またバンコクでも、ベジタリアンはPタイプが圧倒的に主流であることが報告されている<sup>3)</sup>。フィリピンでは、同じレイテ島内の2都市のバイバイとオルモックにて児童の腸内細菌叢タイプがBBタイプとPタイプに傾向が分かれた。以上のことから、近代化がもたらす食習慣の変化がPタイプからBBタイプへの大きな変化のドライビングフォースとなっていることは間違いないと考えられる。実際、このような腸内細菌叢の変化は、アジアに限らず、アフリカ人と欧米人との腸内細菌叢比較研究でも同様の傾向が示されている<sup>4,5)</sup>。

以上、我々 Asian Microbiome Project の調査結果は、アジア人の腸内細菌叢が現在大きな岐路に立っていることを暗示している。食の近代化が進む中、食習慣の変更を余儀なく迫られる今日のアジアにおいて、我々がどのように現代食と向き合っていくか、腸内細菌学も含めた健康医学を慎重に展開していくことが重要であると考えられる。

#### 参考文献

- 1) Nakayama J, *et al.* : Diversity in gut bacterial community of school-age children in Asia. *Sci Rep.*, 5, 8397 (2015)
- 2) Nakayama J, *et al.* : Impact of Westernized Diet on Gut Microbiota in Children on Leyte Island., *Front Microbiol.*, 8, 197 (2017)
- 3) Ruengsomwong *et al.* : Microbial community of healthy Thai vegetarians and non-vegetarians, their core gut microbiota and pathogens risk., *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1723-1735 (2016)
- 4) Filippo C. De, *et al.* : Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 14691-14696 (2010)
- 5) Yatsuneneko T. *et al.* : Human gut microbiome viewed across age and geography., *Nature* 486, 222-227 (2012)

# Asian Microbiome Project : To understand intestinal microbiota as an interface between food and host health in Asian people

Jiro Nakayama

Department of Bioscience & Biotechnology, Faculty of Agriculture,  
Kyushu University

**Brief curriculum vitae :** Born in Hiroshima, 1965. Graduated from Faculty of Agriculture in the University of Tokyo in 1987. Completed Master's Course, Graduate School of Faculty of Agriculture in the University of Tokyo in 1989. Assistant Professor in Faculty of Agriculture, the University of Tokyo from 1989 to 2001. Visiting researcher at Wageningen University from 1998 to 1999. Associate Professor in Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University from 2001 to present.

## **Abstract :**

### INTRODUCTION :

Asia differs substantially among and within its regions populated by diverse ethnic groups, which maintain their own respective cultures and dietary habits. On the other hand, Oriental and Western cultures are now merging at many sites in Asia and affecting our life style, especially daily diets. To inquire into diversity in gut microbiota of Asian people, which must respond to daily diets and link to host health, Asian Microbiome Project (AMP) was established in 2009. AMP aims to build a basal microbiome database of Asians covering entire region and age group and gain an insight into the link between life style and gut microbiota. By sharing information and gained knowledge obtained in this project, we hope to promote health of Asian people. To begin this project, Phase I study was performed as a pilot study, in which we collected the data of gut microbiota of school-age children, whose dietary habits essentially reflects those of their country. Following to Phase I, we are conducting Phase II study to build a basal microbiome database of Asians covering entire ages from newborn to elderly. Then, we perform Phase III study focusing on more specific populations to gain a more definite insight into the link between life style and gut microbiota.

1. Phase I : Gut microbiota profiles of 303 Asian children from 10 cities in 5 countries<sup>1)</sup>.

As a result of Phase I, we characterized the bacterial community in fecal samples obtained from 303 school-age children living in urban and rural regions from China, Japan, Taiwan, Thailand, and Indonesia. The microbiota profiled for the 303 subjects were classified into two enterotype-like clusters, each driven by *Prevotella* (P-type) or *Bifidobacterium/Bacteroides* (BB-type), respectively. Majority in China, Japan and Taiwan harbored BB-type, whereas those from Indonesia and Khon Kaen in Thailand mainly harbored P-type. The P-type microbiota was characterized by a more conserved bacterial community sharing a greater number of type-specific phylotypes. Predictive metagenomics suggests higher and lower activity of carbohydrate digestion and bile acid biosynthesis, respectively, in P-type subjects, reflecting their high intake of diets rich in resistant starch. Random-forest analysis classified their fecal species community as mirroring location of resident country, suggesting eco-geographical factors shaping gut microbiota. In particular, children living in Japan harbored a less diversified microbiota with high abundance of *Bifidobacterium* and less number of potentially pathogenic bacteria, which may reflect their living environment and unique diet.

2. Phase II : Building a basal microbiota database of Asians.

To build a basal microbiota database of Asians, AMP is collecting a stool samples from newborns to elderlies. So far, we have gained 16S rRNA profiles of 118 stool samples from Indonesian infants and 202 stool samples from Japanese. For the data of school-age children to elderlies, AMP has recruited two new countries, namely Korea and Mongolia and analyzed 16S rRNA profiles of more than 500 samples. Then, we examined correlation between changes in microbiota and aging. We found that *Bifidobacterium* increased and *Enterobacteriaceae* decreased with age, as have been observed in some previous studies. These changes were commonly observed in each country. Here the question arises how these two bacteria groups shift in response to aging.

3. Phase III : Correlation between dietary habit and gut microbiota in children on Leyte island of Philippines<sup>2)</sup>.

As a cohort study in Phase III, we compared fecal microbiota of 7 to 9-year-old children from rural Baybay city (n=24) and urban Ormoc city (n=19), and

assessed the correlation between bacterial composition and diet. A dietary survey indicated that Ormoc children consumed fast food frequently and more meat and confectionary than Baybay children, suggesting modernization/westernization of dietary habits. Fat intake accounted for 27.2% of the total energy intake in Ormoc children ; this was remarkably higher than in their Baybay counterparts (18.1 %) and close to the upper limit (30 %) recommended by the World Health Organization. Their microbiota were classified into P-type and BB-type as observed in the Phase I study, in which Baybay and Ormoc children mainly harbored P-type and BB-type, respectively. Redundancy analysis showed that P-type favored carbohydrates whereas BB-type preferred fats. Fat intake correlated positively with the Firmicutes-to-Bacteroidetes (F/B) ratio and negatively with the relative abundance of the family Prevotellaceae/genus *Prevotella*. Predicted metagenomics suggests that BB-type microbiota is well nourished and metabolically more active with simple sugars, amino acids, and lipids, while P-type community is more involved in digestion of complex carbohydrates. Overweight and obese children living in Ormoc, who consumed a high-fat diet, harbored microbiota with higher F/B ratio and low abundance of *Prevotella*. The altered gut microbiota may be a sign of a modern diet-associated obesity among children in developing areas.

Concluding remarks : Thus far, we have demonstrated that two enterotype-like gut microbial communities in Asians' gut. In developed countries, gut microbiota mostly belong to BB-type while two types are mixed in developing countries. In Thailand, children in Bangkok harbor either P- or BB-type while those in Khon Kaen mostly harbors P-type. It is also known that vegetarians in Bangkok mostly harbor P-type<sup>3)</sup>. In Leyte island in Philippines, gut microbiota of children differed into two types depending on dietary fat mainly included in Westernized foods. These results suggest that modernization of dietary habit is driving a shift from P-type to BB-type, as observed in the other comparative studies between Western and African gut microbiota<sup>4, 5)</sup>. Taken together, it is suggested that gut microbiota of Asians are facing crisis at present and AMP is obliged to suggest a way to face the dietary modernization in terms of intestinal microbiology.

## References

- 1) Nakayama J, *et al.* : Diversity in gut bacterial community of school-age

- children in Asia. *Sci Rep.*, 5, 8397 (2015).
- 2) Nakayama J, *et al.* : Impact of Westernized Diet on Gut Microbiota in Children on Leyte Island., *Front Microbiol.*, 8, 197 (2017).
  - 3) Ruengsomwong *et al.* : Microbial community of healthy Thai vegetarians and non-vegetarians, their core gut microbiota and pathogens risk., *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1723-1735 (2016).
  - 4) Filippo C. De, *et al.* : Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 14691-14696 (2010).
  - 5) Yatsunenko T. *et al.* : Human gut microbiome viewed across age and geography., *Nature* 486, 222-227 (2012).