



腸内細菌叢と健康、 プロバイオティクス



東京農業大学 生命科学部 分子微生物学科
客員教授 野本 康二

はじめに

今世紀に入って我々の健康に及ぼす腸内細菌叢の関与についての研究が進んだことは、例えば、腸内細菌叢を指す“microbiota”やプロ(プレ)バイオティクスについての学術論文数の激増ぶり(図1)を見れば明らかであろう。極めて多種多様な微生物群が棲み分けているこの生態系を解析するためのさまざまな方法が確立されたことがこの背景にある。さらに、臨床における疾患と腸内菌叢の関係

の研究も進んでおり、我々の健康に有益な作用をもたらす生菌(プロバイオティクス)、有用菌の補助栄養素材(プレバイオティクス)、およびプロバイオティクスとプレバイオティクスの併用としてのシンバイオティクス、の概念が定着している。本稿ではまず腸内細菌叢解析の方法論について概説する。さらに、プロ・プレ・シンバイオティクスの定義や有効性の概要を紹介するとともに、今後の研究開発のポイントについて考察する。

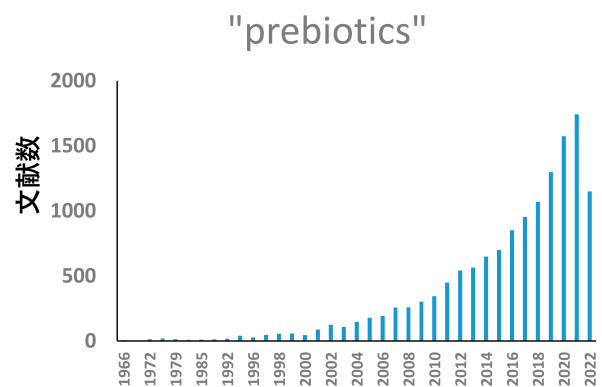
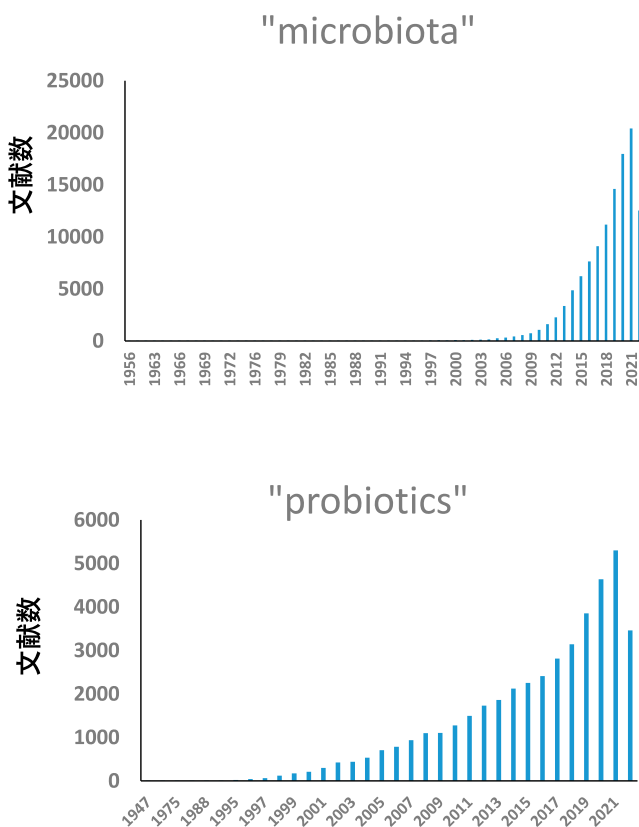


図1 プロ(プレ)バイオティクスや“microbiota”に関する文献数の年次推移

“microbiota”、“probiotics”、“prebiotics”でPubMed(生命科学系の文献検索サイト)検索して得られる文献数の年次推移。いずれも2000年以降に増加している。

腸内菌叢の解析方法の進展

細菌の16SrRNA配列の特異性に基づき腸内微生物が系統分類化され、この情報を基にしてPCR法で特異的に増幅させた遺伝子の配列を解読することによる腸内細菌叢の解析が進んでいる。すなわち、ヒトの腸内細菌叢の解析対象は主に新鮮便であるが、これから抽出されたDNAを16SrRNAに特異的なプライマーセットを用いてPCR増幅し、その配列を解読して、算出される増幅コピー数からその微生物群の構成割合を割り出す。各系統分類レベルにおける菌種構成や、 α 多様性、 β 多様性、などの情報が得られる。他方、定量的な腸内フローラ解析の方法として、定量的PCR法が用いられる。すなわち、菌群や菌属の標準菌株（あらかじめ特異的な染色法で菌数を測定しておく）の一定菌数から抽出されたDNAを、この菌群（属）に特異的なプライマーセットを用いたPCRで増幅すると、便宜的に定めた2本鎖DNA濃度に到達するまでのPCRの増幅回数と菌数とは直線関係とな

る。これを標準曲線として、便検体から抽出したDNAについて同じプライマーを用いたPCRの結果を当てはめると、便中に含まれる当該菌群（属）の菌数が得られる。

我々はこの定量的PCR法をさらに進化させた定量的RT-PCR法 (RT-qPCR法) を確立することにより、様々な異なる生息菌数の腸内微生物群を精度よく解析することを可能とした¹⁾。RT-qPCR法では、16SrRNA分子そのものを標的とした解析となるので、16SrRNA遺伝子を対象とするqPCR法に比べて、菌体内の各コピー数の差 (100 ~ 1000倍) に応じた測定感度の差をもった結果が得られる。すなわち、最優勢の嫌気性菌群である、*Blautia coccooides* groupや*Clostridium leptum* subgroupの標準値は便1gあたり凡そ 10^{10} 個であるが、マイナーな腸内細菌科や乳酸桿菌属では 10^7 、ブドウ球菌属に至っては 10^5 のレベルであることが判明した。しかも、これらの菌数分布は、いわゆる対数正規分布することも明らかとなった²⁾ (図2)。すなわち、各菌群の便中の菌数に標準値があることから、これから大きく逸脱する場合を異常と判定す

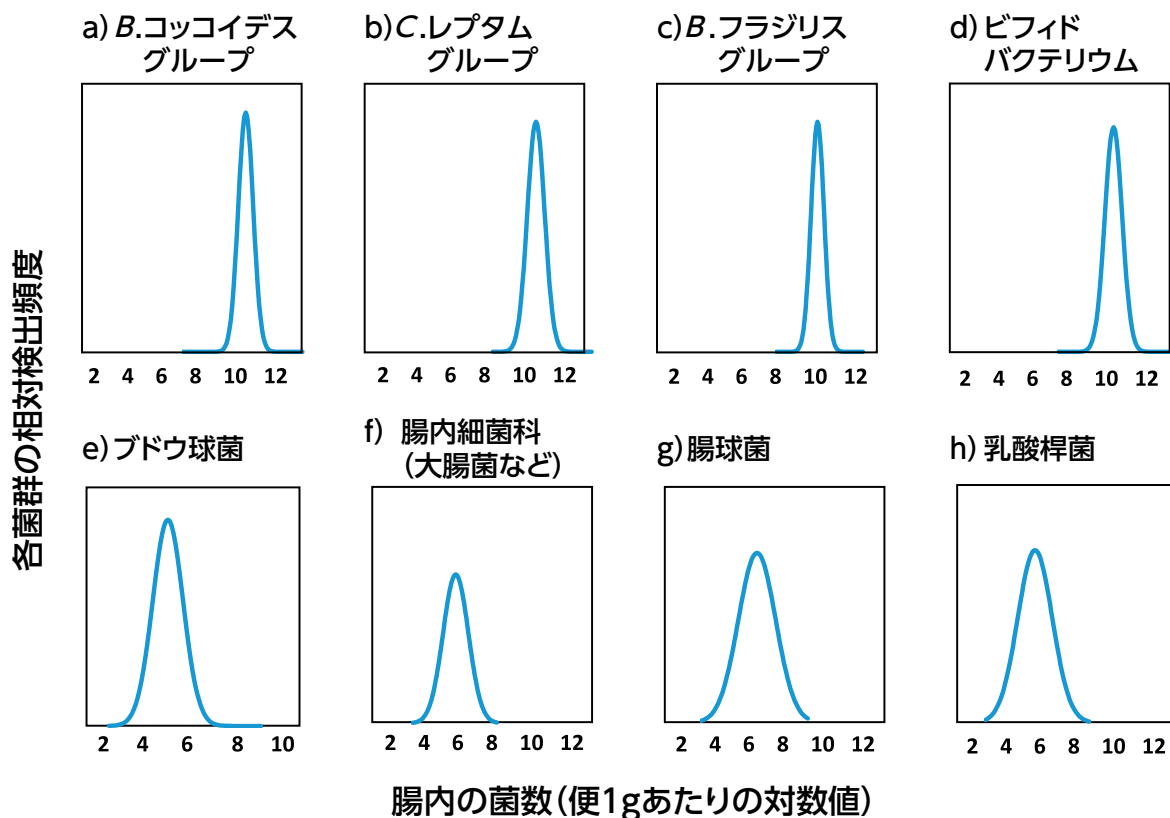


図2 腸内細菌叢の菌数分布

健康成人(20~39歳)の腸内菌叢を構成する主な嫌気性菌群(a~d)およびマイナーな通性嫌気性菌(e~h)の菌数は、いずれも対数正規分布する。

(文献2より改変引用)

ることが可能となった(唯一の例外としてPrevotella属があり、同菌属のみ、高い菌数レベルで生息するグループと低いレベルに分かれた)。すなわち、極めて複雑多様で菌数のダイナミックレンジの広い菌群から構成される腸内菌叢の精細な解析が可能となったと言える。

一方で、腸内細菌の多くは管腔内容物中に存在するとともに、腸管上皮表面を覆う粘液中にも生息している。このような腸管上皮粘液中の腸内細菌の局在を、多重粘膜炎FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法(複数の異なる蛍光色素で標識した16SrRNA特異的DNAプローブを、固定した薄切腸管粘膜炎組織切片にハイブリダイズさせ、これを蛍光顕微鏡下で観察することにより腸管上皮粘膜炎に局在する腸内細菌の局在を観察する)を用いて可視的に調べることが可能となっている³⁾。

培養法の重要性

臨床細菌学の始祖であるコッホ(R. Koch, 1843~1910)によって開発された細菌の「純粋培養法」は、これを用いた結核菌の発見からおよそ140年を経過した現在に至っても極めて重要な役割を果たしている。特に、腸内菌叢の大部分が生息している下部腸管は嫌気度が高いため、必然的に生息している菌群の大多数が偏性嫌気性菌である。コッホの弟子である北里柴三郎は、ドイツ留学中に、独自に開発した嫌気培養装置を用いた破傷風菌の嫌気培養法を確立した。現在では、内部を窒素、二酸化炭素および水素の混合ガスで満たした嫌気培養用のグローブボックスを用いて、嫌気培養が行われる(酸素吸収材や水素発生剤を用いたより簡便な方法もある)。

何しろ、現在に至っても、そのDNA配列が解読されていないながら未だに生きていた菌としては培養できていない菌がかなり存在するので、腸内菌叢の研究、特に特徴的な機能を有する未知菌の分離培養は今後も大きな課題である。最近では、カルチャーミクス(culturomics)という考え方が紹介されている⁴⁾。すなわち、培養温度、糖源などの添加栄養素、さらには、培地の基材、といったさまざまな培養法の要素の組み合わせから、より効

果的に腸内の難培養菌を培養しようというものである。

その好例として、我々がヒトの新鮮便から特殊な機能を有する嫌気性菌(エコール産生菌、NATTS株)を分離した事例を紹介する^{5,6)}。エコールは、乳がんや前立腺がんのようないわゆるホルモン依存性のがんに対する予防作用が喧伝されている。大豆イソフラボン類を摂取すると、配糖体のゲニシジンやダイジンから酵素的に糖が外され、アグリコン化したゲニステインやダイゼインがさらに複数段階の腸内微生物による酵素的な還元作用によりエコールが産生される。このような複数段階の酵素活性を有する腸内微生物を腸内フローラ構成菌として所有している宿主のみにおいて、エコールが産生される。

そこで、我々は、便や尿から常時エコールが検出される健康成人(エコール産生者)の新鮮便からエコール産生菌の分離を試みた。さまざまな種類の炭素源とダイゼインを添加した嫌気用基礎液体培地にエコール産生者便を添加して培養し、培養後の培養液中のエコール濃度を測定したところ、限られた糖源でのみ高濃度のエコールが産生されることが判明した。そこで、次の実験では、エコール産生性の高かった糖源を加えた基礎培地でエコール産生者の便を培養し、これを経時的に継代(例えば24時間培養した培養液の一部を新鮮な培養液に植え継いでさらに培養すること、を何度も繰り返す)したところ、ソルボースやアドニールなどの糖源でのみ、継代に伴うエコール産生性が維持された。この状態で、エコール産生菌は「集密培養」されており、これを分離培養することで、新規なエコール産生菌としてSlackia NATTS株を取得することができた。NATTS株は、ダイゼインを3段階の酵素的に還元することよりエコールを産生することも明らかとなった。実際には、ダイジンやゲニステインといった大豆イソフラボンの配糖体のアグリコン化を含む4段階の代謝を経てエコールが産生される。エコール産生菌はSlackia属に加えてEggerthella属やAdlercreutzia属など複数の菌群に属する菌種が知られており、エコール産生者ではこれらのいずれかが腸内に常在していると考えられる。

プロバイオティクス

プロバイオティクスの語源はずいぶん古いですが、1989年にFullerによって「腸内フローラのバランスを改善することにより我々の健康に資する生きた微生物」と定義されて⁷⁾以来、現在の「保健作用を有する生きた微生物」というプロバイオティクスの共通理解が進んだと考えられる。プロバイオティクスは、現在、「適切な量を摂取することにより、

我々ヒトを含む宿主に有益な作用をもたらす生きた微生物」と定義されている⁸⁾。

腸内常在細菌のビフィズス菌や乳酸桿菌などは、そのままではプロバイオティクスとは呼ばず、あくまでも独立した菌株（複数の場合もある）として分離同定された菌株で、これを摂取することにより摂取個体の健康に資する作用を持つものをプロバイオティクスとしている。ヨーグルトや漬物などの発酵食品自体はプロバイオティクスではなく、あくまでも、有用性が検証されている既同定菌株

表1 科学的証拠に基づくプロバイオティクスー PubMedで検出されるプロバイオティクス菌株の学術論文数ー

400以上	100以上	50以上	20以上
<i>L. casei</i> Shirota	<i>L. acidophilus</i> LA5	<i>L. johnsonii</i> La-1	<i>L. casei</i> CRL 431
<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>L. acidophilus</i> NCFM	<i>B. breve</i> Yakult	<i>B. bifidum</i> BF-1
<i>S. boulardii</i>	<i>L. plantarum</i> 299V	<i>B. longum</i> BB536	<i>L. rhamnosus</i> Lcr -35
<i>B. lactis</i> BB-12	<i>L. rhamnosus</i> GR-1	<i>B. lactis</i> HN019	<i>L. rhamnosus</i> R0011
VSL#3	<i>L. rhamnosus</i> HN001	<i>L. rhamnosus</i> LC705	<i>L. salivarius</i> UCC118
<i>E. coli</i> Nissle 1917		<i>L. reuteri</i> RC14	<i>B. lactis</i> DN-173 010
		<i>L. acidophilus</i> CERELA	<i>L. paracasei</i> F19
			<i>L. gasseri</i> SBT2055
			<i>L. gasseri</i> OLL2716 (LG21)
			<i>L. acidophilus</i> L-92
			<i>L. casei</i> DN114001

2022年9月現在

表2 プロバイオティクスのシステマティックレビューとメタアナリシス

疾病	結論、コメント
旅行者下痢症	3件のプロバイオティクス研究のうち1件に有意な効果が認められた ⁹⁾
抗生物質誘導下痢症 (AAD)	プロバイオティクスの適度な有効性あり ¹⁰⁾
急性下痢症 (AD)	本メタアナリシスの対象プロバイオティクスおよびシンバイオティクスに小児ADに対する有効性が認められる ¹¹⁾
過敏性腸症候群 (IBS)	一般的なIBS有症状者に対して、プロバイオティクス治療は、安全であり、全体的な症状改善と腹痛改善の効果を有する ¹²⁾
慢性炎症性腸疾患 (IBD)	プロバイオティクスはIBDの寛解のためによりよい選択である ¹³⁾

を相当数含んでいる場合にプロバイオティクスと呼ぶことができる。

さまざまなプロバイオティクスの保健作用(健康に有用な作用)に関する臨床研究や非臨床研究が進んでいる。下痢、慢性炎症性腸疾患、アレルギー疾患、など広い範囲の疾患の発症予防や進展の阻害を示唆する報告が多数ある(表1)。ただし、同一の臨床研究の中で複数菌株を比較した研究は稀である。この点で、表2に示すようなシステマティックレビューやメタアナリシスによる確度の高いデータ検証に基づく学術報告が有効性の判断のために重要である⁹⁻¹³⁾。

さらには、異なるプロバイオティクス菌株に共通する作用メカニズムの提示は、有効性を理解するうえで必要と考えるが、これも簡単ではない。例えば、プロバイオティクスとされる菌株の多くはグラム陽性菌であるが、免疫賦活(あるいは調節)作用においては、死菌体でもこれを発揮することが多く報告されており、その作用本体として、細胞壁多糖体を示す結果も多い^{14,15)}。ところが、細胞壁多糖の構造は極めて複雑で、菌種や菌株ごとに異なる。この辺、これの受容体(例えばtoll like receptor 2など)のリガンドとしての共通構造が示されれば話が早い。つまり、グラム陰性菌におけるリポ多糖体に相当するような構造である。例えば、リポテイコ酸のようなグラム陽性菌の細胞壁構成分子が相当するとも考えられる。

プロバイオティクスの炎症制御などの免疫調節作用の作用メカニズムはこれまでのところ菌株ごとに謳われており、同様の作用メカニズムを有する菌株を系統的に捉えることが今後の研究課題である¹⁶⁾。例えば、上記のエコール産生菌などはその好例であり、エコール産生機能を有する複数の菌属にまたがる菌種・菌株を、プロバイオティクスとすることなども視野に入れるべきであろう。

食物繊維およびプレバイオティクス

Sonnenburgらは、「腸内微生物が利用可能な炭水化物(MACs)」、すなわち、腸内細菌が難消化性炭水化物を代謝するという観点から、これを促進するために食物繊維を積極的に消費することが

健康に有益である、という概念を提唱している¹⁷⁾。

通常、難消化性食物繊維の有効エネルギーは通常の消化しやすい単純炭水化物のそれよりはるかに低いが、小腸で分解されずに大腸に到達した難消化性食物繊維が大腸の嫌気性細菌によって分解され、酢酸、酪酸、プロピオン酸などの有機酸が生成される。これらの有機酸は下部消化管の腸内細菌叢の恒常性を維持する上で重要である。たとえば、腸内有機酸のうち最も高濃度の酢酸は日和見菌(大腸菌群やブドウ球菌などの通性嫌気性菌やウェルシュ菌やデフィシル菌などの毒素産生性日和見病原菌)の異常増殖の抑制や、腸管上皮バリア統合性の維持など、重要な機能を果たす。有機酸は、腸管内の局所的な働きのみならず、これを特異的に認識する宿主受容体(GPR41やGPR43など)を介して、食欲抑制や交感神経系の刺激などの肥満抑制刺激の伝達によりエネルギー消費を促進する¹⁸⁾。

一般的に、プレバイオティクスは、乳酸菌やビフィズス菌が選択的に資化できるオリゴ糖などを指すものと理解されている。ガラクトオリゴ糖、果糖が重合したフラクトオリゴ糖、など異なる分子種のオリゴ糖について、これを摂取することにより腸内のビフィズス菌が増加することが知られている。ビフィズス菌が特異的にオリゴ糖を資化するために、オリゴ糖を菌体内に取り込むためのトランスポーター蛋白および、取り込んだオリゴ糖を分解するための酵素システムを有することが条件となる¹⁹⁾。

最近、国際プロバイオティクス・プレバイオティクス学術機関(ISAPP)のエキスパート研究者は、プレバイオティクスの定義としてより広義な、「宿主微生物により選択的に利用された結果、宿主の健康上の利益をもたらす物質」を提言している²⁰⁾。この考え方では、腸内微生物に利用されるプレバイオティクスの種類は、さまざまなオリゴ糖に加えて脂肪酸類やポリフェノール類等などより多様となる。

シンバイオティクス

複雑多様な微生物生態系である腸内細菌叢のバランスの恒常性を維持しているメカニズムは依然

として不明である。これを理解するために、1970年代にWaijの提唱したコロナイゼーションレジスタンス (CR) の考え方が有用である²¹⁾。筆者は、CRを「異なる腸内細菌群相互の自律的なバランス維持機構」と理解している。外傷や火傷、侵襲度の高い外科手術、化学療法、などの医原的な要因によりCRが著しく減弱した患者では生体防御機構の低下と相まって、腸内常在菌の生体内侵襲 (Bacterial translocation、以下BT) を伴う感染性合併症の発症リスクが高まる。

筆者は医原的なBTを介する自発性微生物感染モデルを構築した²²⁾。すなわち、マウスに大量の5フルオロウラシル (5FU: 抗がん化学療法剤) を投与すると、腸内常在性の本来は低菌数レベルの大腸菌が異常増殖するとともにBTを起こし、5FUによる免疫抑制を伴う全身感染症に進展する、というものである。この医原的な自発性感染モデルでは、抗生物質投与により5FUの自発性感染誘発作用を阻止することが可能であり、また、骨髄細胞の移植やプロバイオティクスの投与 (非経口的) により自然免疫系を賦活化することでも感染予防が可能であった²³⁾。

このような研究背景を基に、消化器外科、救命救急、小児外科 (新生児外科)、などの医療機関と、シンバイオティクス (プロバイオティクスとプレバイオティクスの併用) による重症患者における感染性合併症の予防作用についての共同研究に至った。消化器外科領域では、胆道がん患者の術後の経腸栄養にシンバイオティクス (乳酸桿菌、ビフィズス菌およびガラクトオリゴ糖の組み合わせ) を添加することにより、術後の感染性合併症の発症が有意に抑制され²⁴⁾、また、食道がん患者において、術前のシンバイオティクス飲用により術中のBTが有意に軽減されることも明らかにされた²⁵⁾。シンバイオティクス投与により患者の腸内細菌叢の異常 (dysbiosis) や腸内環境 (有機酸濃度) も顕著に改善されていることから、シンバイオティクスは、患者の腸内細菌叢および腸内環境の改善を通してBTを防ぎ、感染防御作用を発揮したものとする。

筆者らが構築したマウスの *Acinetobacter baumannii* (多剤耐性菌、以下Ab) の感染モデルでは、多種の抗生物質を投与することにより腸内フローラが

破たんした状態でAbを経口感染させると、Abが腸内定着するが、この状態で5FUを投与すると、Abが腸管から生体内侵襲し全身感染を起こす²⁶⁾。この感染実験モデルにおいて、ビフィズス菌およびガラクトオリゴ糖のコンビネーション投与 (シンバイオティクス) は、腸内のAbの増殖を抑制し、その生体内侵襲を阻害することにより感染防御効果を発揮した。シンバイオティクスを投与されたマウスの腸管上皮のバリア機能を担うクローディン、オクルディンおよびZO-1といった分子の遺伝子発現も増強されていた。シンバイオティクスを構成するビフィズス菌は、投与された複数の抗生物質に対する自然耐性を発揮して腸内定着し、同時に投与されたガラクトオリゴ糖を資化することにより酢酸を産生して (synergistic effect)、感染防御能を発揮したものと考えられる (次ページ 図3)。

以上のような、シンバイオティクスの感染性合併症予防作用の臨床報告や作用メカニズムの解明に基づき、消化器外科以外にも救命救急や新生児科など多様な臨床領域での感染症リスクの高い患者に対してシンバイオティクスが適用されるようになっていく。

おわりに

健康成人の腸内細菌叢は比較的安定的に維持されているが、様々な原因 (高齢化、栄養バランス、薬剤や手術など医原的な理由など) によりその恒常性が破たんした際に、プロ・プレ・シンバイオティクスの役割がむしろより鮮明に発揮されることが示されている。

今後の研究のポイントとして、1) 適切な方法に基づく臨床研究を実施して得られる再現性のある証拠の蓄積、2) さまざまな保健作用を説明する作用メカニズムの解明、および、3) あらたなプロ・プレ・シンバイオティクスの開発研究においては、常在腸内細菌の潜在的な機能性の解明、が重要と考える。

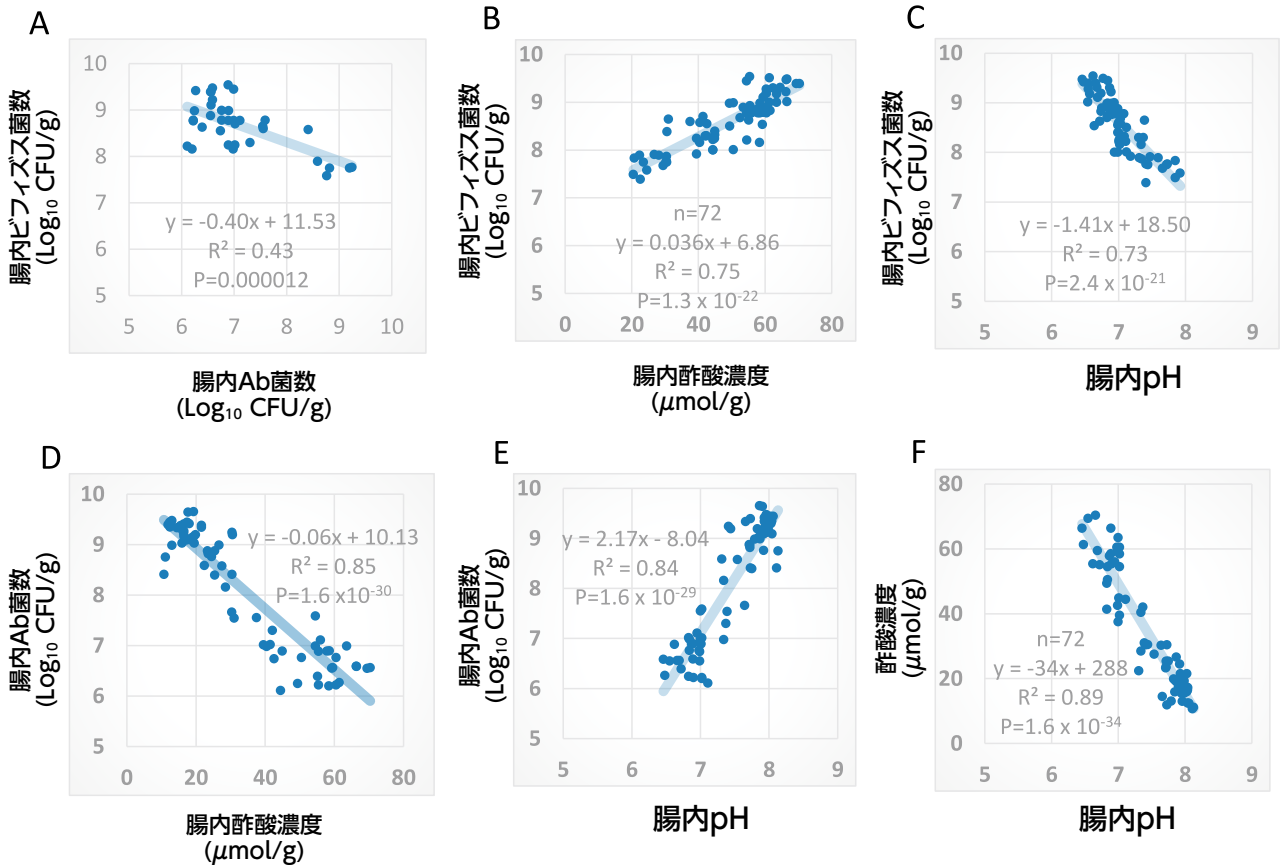


図3 シンバイオティクスによる腸内環境の改善と多剤耐性菌(Ab)の低減

マウスにおける*A. baumannii*感染モデルにおけるシンバイオティクス(ビフィズス菌とガラクトオリゴ糖の併用投与)の感染防御作用において、腸内環境(酢酸やpH)の改善が重要である。
A. baumannii(Ab)感染マウスの腸内の投与ビフィズス菌が多いほど、腸内Ab菌数は少なく(A)、腸内酢酸濃度が高く(B)、pHは低くなる(C)。*A. baumannii*(Ab)感染マウスの腸内のAb菌数が多いほど腸内酢酸濃度が低く(D)、腸内pHが高くなる(E)。腸内酢酸濃度の上昇とともにpHは低下する(F)。

(文献26より改変引用)

【参考文献】

- 1) Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, Kado Y, Nomoto K. Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*, 73: 32-39, 2007.
- 2) Tsuji H, Matsuda K, Nomoto K. Counting the countless: Bacterial quantification by targeting rRNA molecules to explore the human gut microbiota in health and disease. *Front Microbiol*. 2018; 9: 1417. 2018 Jun 29. doi: 10.3389/fmicb.2018.01417.
- 3) 高田敏彦, 角将一, 野本康二. 多重染色 FISH 法による腸内フローラ解析. *腸内細菌学雑誌* 29: 123-134, 2015.
- 4) Diakite A, Dubourg G, Dione N et al. Optimization and standardization of the culturomics technique for human microbiome exploration. *Sci Rep*, 2020 Jun 15;10(1):9674. doi: 10.1038/s41598-020-66738-8.
- 5) Tsuji H, Moriyama K, Nomoto K, Miyanaga N, Akaza H. Isolation and characterization of the equol-producing bacterium *Slackia* sp. strain NATTS. *Arch Microbiol*, 192: 279-287, 2010.
- 6) Tsuji H, Moriyama K, Nomoto K, Akaza H. Identification of an enzyme system for daidzein-to-equol conversion in *Slackia* sp. strain NATTS. *Appl Environ Microbiol*, 78: 1228-1236, 2012.
- 7) Fuller, R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, 66: 365-378, 1989.
- 8) Hill C, Guarner F, Reid G, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Rev Gastroenterol Hepatol*, 11, 506-514, 2014.
- 9) McFarland LV, Goh S. Are probiotics and prebiotics effective in the prevention of travellers' diarrhea: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis*, 27:11-19, 2019. doi: 10.1016/j.tmaid.2018.09.007.

- 10) Guo Q, Goldenberg JZ, Humphrey C, et al. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019 Apr 30;4(4) :CD004827. doi: 10.1002/14651858.CD004827.pub5.
- 11) Yang B, Lu P, Li MX. A meta-analysis of the effects of probiotics and synbiotics in children with acute diarrhea. *Medicine (Baltimore)* , 2019 Sep;98(37) :e16618. doi: 10.1097/MD.00000000000016618.
- 12) Ooi SL, Correa D, Pak SC. Probiotics, prebiotics, and low FODMAP diet for irritable bowel syndrome - What is the current evidence? *Complement Ther Med*, 2019 Apr;43:73-80. doi: 10.1016/j.ctim.2019.01.010.
- 13) Ganji-Arjenaki M, Rafieian-Kopaei M. Probiotics are a good choice in remission of inflammatory bowel diseases: A meta analysis and systematic review. *J Cell Physiol*, 233:2091-2103, 2018. doi: 10.1002/jep.25911.
- 14) Nagahama K, Kumano T, Nakata T, et al. Synthesis and immunostimulating activity of lactobacilli-originated polysaccharide-polymeric microparticle conjugates. *Langmuir*, 31:1489-1495, 2015. doi: 10.1021/la5041757.
- 15) Nagahama K, Kumano T, Nakagawa Y, et al. Enhanced Immunostimulating Activity of Lactobacilli-Mimicking Materials by Controlling Size. *Bioconj Chem*, 26:1775-1781, 2015. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00319.
- 16) Sanders ME, Benson A, Lebeer S, et al. Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. *Curr Opin Biotechnol*, 49:207-216, 2018. doi: 10.1016/j.copbio.2017.09.007.
- 17) Sonnenburg ED, Sonnenburg JL. Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell Metab*, 20:779-786, 2014. doi: 10.1016/j.cmet.2014.07.003.
- 18) 木村郁夫. 腸内細菌叢を介した食事性栄養認識受容体による宿主エネルギー恒常性維持機構. *Yakugaku zasshi*, 134: 1037-1042, 2014.
- 19) Fushinobu S, Abou Hachem M. Structure and evolution of the bifidobacterial carbohydrate metabolism proteins and enzymes. *Biochem Soc Trans*, 49:563-578, 2021. doi: 10.1042/BST20200163.
- 20) Hill C, Guarner F, Reid G, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 11: 506-514, 2014.
- 21) van der Waaij D, Berghuis-de Vries JM, Lekkerkerk Lekkerkerk-v. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond)* , 69:405-411, 1971. doi: 10.1017/s0022172400021653.
- 22) Nomoto K, Yokokura T, Yoshikai Y, et al. Induction of lethal infection with indigenous *Escherichia coli* in mice by fluorouracil. *Can J Microbiol*, 37:244-247, 1991. doi: 10.1139/m91-037.
- 23) Nomoto K, Yokokura T, Mitsuyama M, et al. Prevention of indigenous infection of mice with *Escherichia coli* by nonspecific immunostimulation. *Antimicrob Agents Chemother*, 36:361-367, 1992. doi: 10.1128/AAC.36.2.361.
- 24) Yokoyama Y, Asahara T, Nomoto K, Nagino M. Effects of synbiotics to prevent postoperative infectious complications in highly invasive abdominal surgery. *Ann Nutr Metab*,71(suppl 1) : 23-30, 2017. doi: 10.1159/000479920.
- 25) Yokoyama Y, Nishigaki E, Abe T, et al. Randomized clinical trial of the effect of perioperative synbiotics versus no synbiotics on bacterial translocation after oesophagectomy. *Br J Surg*, 101: 189-199, 2014.
- 26) Asahara T, Takahashi A, Yuki N, et al. Protective effect of a synbiotic against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a murine infection model. *Antimicrob Agents Chemother*, 60: 3041-3050, 2016.