

プロバイオティクス研究開発のポイントについて



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

1. はじめに：プロバイオティクスの概念と歴史的背景

エリー・メチニコフ (1845-1916) は、ロシア生まれの大学教師で、パリのパスツール研究所に移って研究を行った。「細胞性免疫の発見」(1908年)、すなわち、自然免疫系の主役となっている食細胞の発見で、ノーベル生理学・医学賞を受賞している。メチニコフは晩年、大腸に住む腸内細菌が腸の腐敗を引き起こすという説を唱え、乳酸菌(当時はブルガリア菌)による乳酸発酵に基づく腸の防腐効果の考えを進め、乳酸発酵の産物としてヨーグルトの摂取を推奨した。このメチニコフの考え方は、今日のプロバイオティクスの概念につながっている。

プロバイオティクスの語源は、「生命のための」という意味のギリシャ語である。この言葉が初めて学術的に使われたのは、1954年、フェルディナンド・ヴァーギンによる報告における「Anti-und

Probiotika」である²⁾。1965年、リリーとスティルウェルはプロバイオティクスを「他の微生物の増殖を促進する微生物」と表現し³⁾、1974年にはパーカーが「腸内フローラのバランスを改善する生物または物質」と表現している⁴⁾。1989年にはFullerがプロバイオティクスを「微生物バランスを改善することで宿主に有益な作用を及ぼす生きた微生物」と定義し⁵⁾、約10年間プロバイオティクスに対する世界的な共通理解に貢献した。さらに最近では、国際プロバイオティクス・プレバイオティクス科学協会 (ISAPP) の専門研究者らが、プロバイオティクスの定義を「適量を摂取することで宿主に有益な効果をもたらす生きた微生物」と提唱して現在に至っている⁶⁾(表1)。

2. プロバイオティクスの保健作用

プロバイオティクスとは、有益な微生物の総称

表1 主な各種「○○バイオティクス」用語の定義

	定義	効果因子
プロバイオティクス	適正な量を摂取した時に、宿主の健康に有益な作用をもたらす生きた微生物 (Hill C et al., 2014)	安全性の担保されている主に乳酸菌類を主体とする細菌
プレバイオティクス	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 (Gibson GR et al., 2017)	各種オリゴ糖など
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 (Swanson KS et al., 2020)	ビフィズス菌とオリゴ糖など
ポストバイオティクス	不活化された微生物やその構成成分 (Salminen S et al., 2021)	各プロバイオティクスの加熱菌体など

であり、その効果は個々のプロバイオティクス菌株（単一または複数の菌株の組み合わせ）ごとに実証されている。科学的根拠に基づくプロバイオティクスの効果は、下痢、慢性炎症性腸疾患、アレルギーの軽減など、幅広い疾患や症状に及んでいる。口腔分野では、プロバイオティクスが歯周病の予防・改善に導入され、*Porphyromonas gingivaris*、*Tannerella forsythia*、*Treponema denticola*などの歯周病原菌の数や歯肉炎などの臨床症状を軽減することが報告されている⁷⁾。また、乳製品のプロバイオティクス摂取が口腔および唾液のいくつかのパラメータに及ぼす影響に関するメタアナリシスでは、ストレプトコッカス・ミュータンスの減少、唾液のpHの上昇、プラークの促進といった結果が示され⁸⁾、*Lactobacillus reuteri*、*L. rhamnosus*、*L. salivarius*などのプロバイオティクス菌株が、口腔内細菌叢の乱れを是正することが示唆されている。

年々増加している炎症性腸疾患の補助療法としてのプロバイオティクスに関するシステマティックレビューでは、VSL#3など限られたプロバイオティクスが潰瘍性大腸炎の寛解導入・維持に有効であったが、参考にした複数の臨床研究報告全体としての大きな効果は認められなかった⁹⁾としている。

胃粘膜に常在するヘリコバクター・ピロリは慢性胃炎を引き起こし、消化性潰瘍や胃がんの原因とされ、その除菌が一般化している。ピロリ菌の除菌療法にプロバイオティクスを併用すると除菌率が向上することがメタアナリシスで示されている^{10, 11)}。米国における最近の臨床実践ガイドラインに、「プロバイオティクスは*H. pylori*除菌の補助療法として有効である」と記載されているが、使用するプロバイオティクスの種類や投与方法には注意が必要であるとされている¹²⁾。

また、代表的な機能性胃腸症である機能性ディスペプシア（いわゆる慢性胃炎）や過敏性腸症候群（IBS）のプロバイオティクスによる症状改善に関する臨床研究結果も蓄積されつつある。日本消化器病学会のIBSの治療ガイドラインでは、IBSの治療の第一段階としてプロバイオティクスが挙げられている¹³⁾。しかし、「乳酸菌やビフィズス菌などの有用菌」に言及するにとどまり、プロバイオティクスの種類や菌株については特に明記されていない。患者が食品やサプリメントとしてプロバイオティクス

を摂取する場合、有効性が確認されている菌株を選択するための適切な情報提供が不可欠と考えられる。

Kalliomäkiらによるアトピー性皮膚炎（AD）の家族歴を持つ妊婦を対象としたプラセボ対照無作為化比較試験（RCT）では、妊娠末期と産後にプロバイオティクスを継続摂取すると、被験者から誕生した児のアトピー発症に伴う湿疹などの臨床症状が有意に軽減すると報告された¹⁴⁾。その後、同様の試験プロトコールに基づく十数件のプロバイオティクスの臨床試験が世界中で実施された。これらの結果を踏まえて示された世界アレルギー機関のガイドラインでは、AD発症リスクの高い子どもを出産する可能性のある母親（妊娠中を含む）およびAD発症の可能性のある子どもによるプロバイオティクスの摂取を推奨しているが、「プロバイオティクスによる有効性の根拠は強固ではない」という注意書きがなされている¹⁵⁾。さらに最近の2006年から2018年にかけて世界中で実施された28件の同様の臨床試験の結果をまとめたメタアナリシスでは、産前産後のプロバイオティクス摂取が産後の児のアトピー発症率を有意に低下させると結論されている¹⁶⁾。

食物アレルギーに対する免疫療法の有効性が注目されている。例えば、ピーナッツアレルギーに対しては、アレルゲンを継続的に摂取する経口免疫療法（OIT）の有効性が示唆されており、OITと同時にプロバイオティクス乳酸菌を摂取することで効果が高まることが報告されている¹⁷⁾。また、プロバイオティクス摂取によりOIT治療後のアレルゲン無反応期間が持続すること、治療開始から終了までピーナッツ特異的免疫グロブリンE（IgE）値の低下とピーナッツ特異的IgG4値の上昇が見られることが報告されている。その作用機序として、プロバイオティクスがアジュバント的にアレルギー抑制性免疫反応を促進することが提唱されている。

Misraらは、“psychobiotics”（精神衛生に良い影響を与える生きた微生物）という概念を提唱している¹⁸⁾。例えば、動物モデルでは、*Bifidobacterium longum*が*Trichuris muris*感染モデルマウスにおいて興奮や認知ストレスを改善することが示されており¹⁹⁾、*Lactobacillus rhamnosus*は腸管のGABA受容体の発現調節を介してラットのうつ症状を改善

させる²⁰⁾。また、以上のような乳酸菌やビフィズス菌を用いたヒトでの多数の臨床試験において、これらのプロバイオティクスによる感情やストレスに対する改善作用が報告されている²¹⁾。しかし、*L. rhamnosus*を用いたヒトでの介入試験では、抑うつ作用の改善は認められなかった²²⁾。さらに、2004年から2017年に実施された乳酸菌とビフィズス菌の不安改善効果に関する12の臨床試験の結果をメタ分析した結果、プロバイオティクスとプラセボの間に有意差は見られなかった²³⁾。一方で、一部のプロバイオティクス菌株については、ストレス下におかれた被験者が継続摂取することで、身体症状の改善(睡眠の質の向上、風邪や腹部症状などの軽減)やストレスに伴う唾液コルチゾール値の上昇の軽減、に至ったことが示されている^{24, 25)}

3. プロバイオティクス研究開発のポイント

高齢化社会における健康維持(疾病予防)意識の高まりを反映して、世界のプロバイオティクス市場が拡大を続けている。筆者は、プロバイオティクスの要件として、1) 安全性、2) 健康効果を説明する確かな科学的根拠、3) 適切な品質管理、の3点が重要であると考え。2) については、日本では“特定保健用食品”や“機能性表示食品”などの規制のもとに食品の保健作用を提示することができる。世界的には、日本と同様の規制を設けている国もあるが、EU諸国では、「プロバイオティクス」

表2 プロバイオティクス研究・開発のポイント

- ◎保健作用を説明する臨床研究から得られる証拠
- ◎臨床効果を説明する明確な作用メカニズムの提示 ⇒ 作用メカニズムを共有する菌種あるいは菌株のグループ化
- ◎食品の保健作用：予防(未病予防) and/or 治療(アジュバント) ⇒ 適切な効果量とは？ 摂取法：量、期間、副作用 X
- ◎新規菌種：由来、摂取履歴、安全性を明らかにする
- ◎腸内定着：colonization resistance 機構の解明、FMT、接着性
- ◎生菌 - 死菌：postbiotics
- ◎代謝：薬物代謝など
- ◎消化管外における適用：泌尿生殖器系、皮膚など
- ◎ヒト以外へのプロバイオティクスの適用：畜産、伴侶動物など

として保健作用を表示するためにEFSA(欧州食品安全機関)の厳しい審査をクリアする必要がある。一方、米国では、食品の保健作用を検証するためのヒト臨床試験の実施に大きなハードルがある。

腸内細菌叢やプロバイオティクスの健康への関与に関する研究が進み、学術的な報告が蓄積している。しかし、ヘルスクレームや各菌株の作用機序については、個々の菌株(製品)のレベルで報告される場合が多く、作用機序の共通する菌株を体系化するという考え方は採用されていないため、消費者が適切なプロバイオティクス菌株(およびそれを含む製品)を選択することを難しくしている。そこで、プロバイオティクス全般、種や株のレベルでの効果や作用機序の認識について、共通するものを体系化することが提案されている²⁶⁾。

今後のプロバイオティクスの研究開発のポイントを表2に示した。その概要は以下の通りである。

1) 適切なプロトコールに基づき実施された臨床試験から得られた確かなエビデンス

臨床的に明確な証拠を得るために、二重盲検プラセボ対照試験などの精度の高いヒト試験を行う必要がある。一方、臨床症状にリンクする定量的なバイオマーカーの利用が有効と考えられる。バイオマーカーには、宿主因子と微生物因子(例えば、プロバイオティクスや腸内細菌叢を構成する特徴的な微生物とその代謝物や成分)がある。近年、“未病”あるいは病前状態という概念が浸透してきた^{27, 28)}。これは、病気の発症に至らない程度の軽い

症状で、グレーゾーンと呼ばれる、症状がないため生活上の問題は少ないが、検査値に異常があり、放置しておくといずれ病気を発症する状態のことである。プロバイオティクスは薬としてではなく、食品やサプリメントとして摂取することがほとんどなので、その効果は病気の治療というより、「未病」の予防や改善が基本と考える。

2)臨床効果を説明するための明確な作用機序

プロバイオティクスと呼ばれる菌種に乳酸菌やビフィズス菌が多いのは、乳酸や酢酸などの有機酸を産生するためと考えられる。これらの菌を液体培地で試験管内培養すると、数十mMに達する有機酸を産生する。ヒトの下部腸管内の有機酸濃度も同程度であり、最優勢の嫌気性菌群は、酢酸、プロピオン酸、酪酸などのいわゆる短鎖脂肪酸を中心とした有機酸を生産して腸内環境を弱酸性に保っている。また、腸内フローラのホメオスタシスが乱れ、嫌気性菌による有機酸産生が弱まると、腸管を介した健康維持の不具合につながる事が分かってきた。健康な状態では、外部から摂取されたプロバイオティクス株の多くは、外来微生物のコロニー形成に対する内因性腸内フローラの抵抗性 (colonization resistance, CR)²⁹⁾により、長く腸内に定着することはなく、便とともに排泄される。腸内フローラのホメオスタシスを著しく乱す様々なストレス (例：侵襲性の高い消化管手術や積極的な化学療法) により、腸のCR能が低下することが知られている。このような状態では、外部から摂取したプロバイオティクス細菌が一過性に腸内に定着し、場合によっては増殖することで、腸内細菌

叢の崩壊 (CRの低下) を補完する働きをすることが示唆されている。

健康者においてもプロバイオティクスを継続的に摂取することで、腸内細菌叢のホメオスタシスの維持に同様の効果が期待される。しかし、健康者における臨床試験において、陰性対照として使用するプラセボと比較してプロバイオティクスの明確な保健作用を示す結果を得ることは必ずしも容易ではない。プロバイオティクスに対する反応性には個人差があり (いわゆるレスポnderとノンレスポnderが存在する)、プロバイオティクスの効果を明確に示しえない可能性がある³⁰⁾。この意味では、健康な宿主のCRを乗り越えて、個人差が少なく安定的に腸管に定着して機能を発揮できる微生物株の開発が魅力的である。

他方で、プロバイオティクスによる宿主の免疫調節作用を示唆する研究も多い。筆者らは、特に、マクロファージを中心とする自然免疫系により認識されるプロバイオティクスに特異的な菌体構造の重要性を示す結果を得ている。すなわち、典型的なプロバイオティクス菌株である*L. casei*シロタ株 (LcS) の加熱菌体をマクロファージ (MΦ) の培養系に作用させると、MΦの様々な機能 (サイトカインと

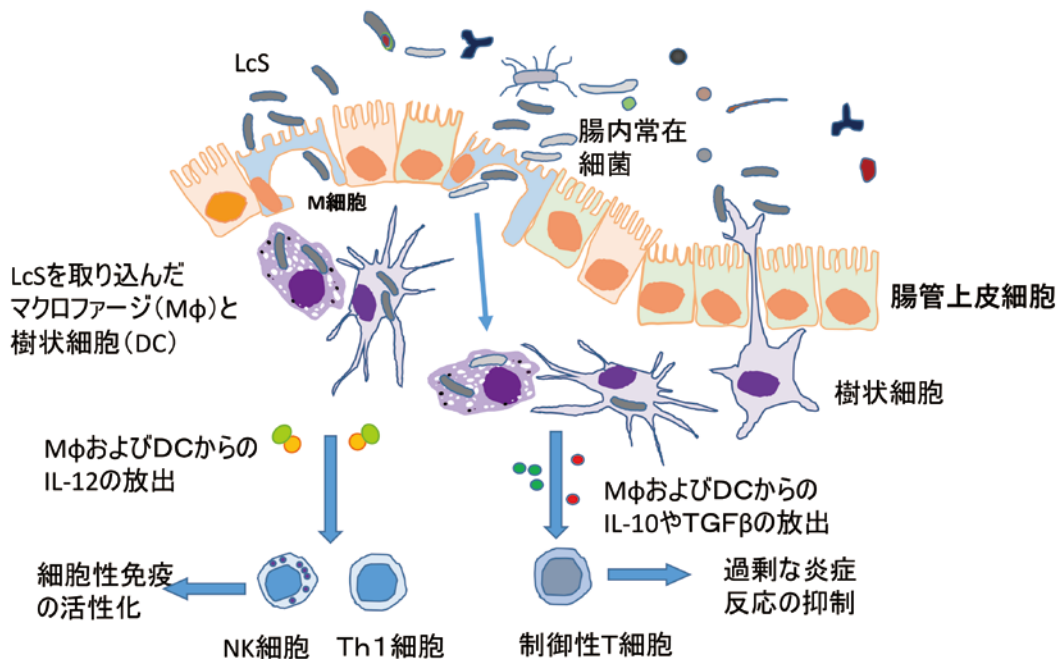


図1 プロバイオティクス (*L. casei* シロタ株 : LcS) の免疫調節作用のメカニズム (仮説)

経口的に摂取されたLcSは十分な菌体密度を保った状態で小腸に到達する。腸管に備わっている免疫細胞、特にM細胞 (消化管内の抗原を取り込む) によりLcSが取り込まれる。また、腸管上皮細胞の間隙から樹状細胞 (DC) を介してLcSが取り込まれる。腸管上皮内 (粘膜固有層) では、LcSを取り込んだマクロファージ (MΦ) やDCにより、獲得免疫系へ刺激が伝えられる。この際に、刺激伝達物質 (サイトカイン) の種類によって、促進される獲得免疫系の方向性が異なる。インターロイキン-12 (IL-12) はNK細胞やTh1細胞を介する細胞性免疫応答を促進し、一方で、IL-10やTGF-βは制御性T細胞の働きを促進して、過剰な免疫応答を鎮める。

(Shida K et al., Gut Microbes, 2: 109-114, 2011より改変・引用)

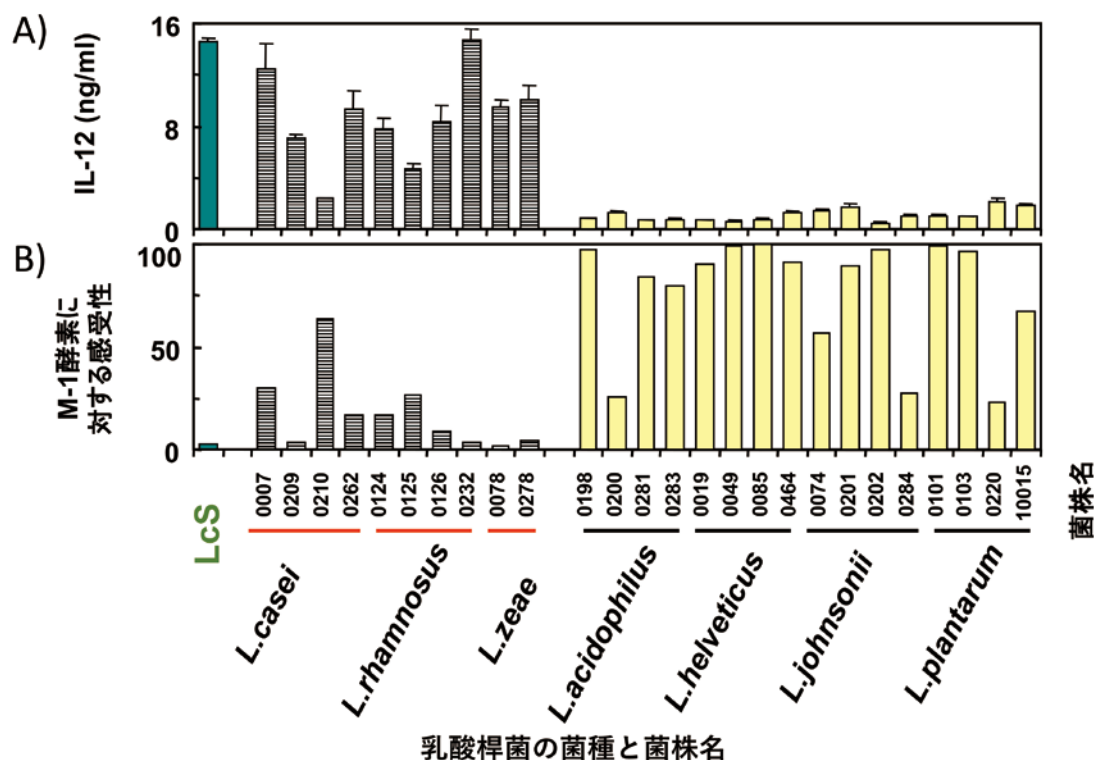


図2 さまざまな乳酸桿菌株によるマクロファージのIL-12誘導能と細胞壁溶解酵素に対する感受性の差異

図2A): 乳酸桿菌で刺激した腹腔内滲出マクロファージにより分泌されるIL-12濃度の差異

マウスの腹腔内マクロファージ(MΦ: 2×10^5 cells/ml)に、乳酸桿菌の加熱菌体(27菌株)を添加($10 \mu\text{g/ml}$)して試験管内にて24時間培養した。各菌株を添加した培養液の培養上清中のIL-12(p70)をELISA法で測定した。

図2B): 細胞壁溶解酵素(M-1酵素)に対する乳酸菌株の感受性の差異

各乳酸菌株の加熱菌体を 2mg/ml となるようにM-1酵素を含む緩衝液に懸濁し、これを 37°C にて10分間反応させた。反応後に、溶解されずに残った菌体の濃度を 600nm の吸光度にて測定した。

酵素感受性(%) = $100 \times (\text{反応開始時の菌液吸光度} - \text{反応後の菌液吸光度}) / \text{反応開始時の菌液吸光度}$

(Shida K, et al., J. Dairy Sci. 89:3306-3317, 2006より抜粋・改変引用)

いう免疫細胞間の信号伝達の役割を果たす糖タンパクの分泌などを促進するが、その作用においてシロタ株の表層を覆っている細胞壁多糖体が重要な働きを發揮することが明らかとなっている^{31, 32)}。さらに、この細胞壁多糖を菌体から抽出して微小なポリスチレン粒子の表層にまぶしたものをマウス脾細胞の培養系に加えて刺激すると、脾細胞の細胞性免疫機能が高まることも示されている^{33, 34)}。LcSの免疫調節作用の作業仮説として、LcSの刺激を受けたMΦや樹状細胞を介する獲得免疫系の免疫反応の方向付けにより、体液性免疫あるいは細胞性免疫の反応の偏りを是正することで、上記のアレルギー反応などさまざまな免疫異常や疾患を改善することが提唱されている³⁵⁾(図1)。特に、IgE産生など体液性免疫の亢進を伴うアレルギー反応において、LcSの細胞性免疫促進により相対的にアレルギー反応が軽減されるが、この作用においてIL-12やIFN γ などの細胞性免疫促進サイトカインが重要な働きをする。さまざまな菌種の乳

酸菌株の加熱菌体を試験管内のMΦ培養に添加して、その刺激を受けてMΦから分泌されるIL-12の量を測定したところ、乳酸菌の菌種により、IL-12産生誘導能の強い菌種とそうでない菌種とに分かれた³⁶⁾。しかも、各菌株のIL-12産生誘導能が強い菌株は細胞壁溶解酵素に対する抵抗性が強い(溶かされにくい)ことも判明した(図2)。このような免疫刺激機能の強弱は、前述した、プロバイオティクス菌株の機能による体系化の有用なマーカーとなり得るものと考えられる。

4. 内在性有用菌の可能性

*C. difficile*関連下痢症の患者に健常者の便微生物を移植したところ(便微生物移植:FMT)、顕著な症状の改善が認められたとの報告(2013)³⁷⁾を受けて、近い将来、様々な疾患の治療・予防への有効性と、これを担う腸内常在菌の組み合わせ

が解明されるものと期待されている³⁸⁾。Atarashiらは、ヒト腸内常在菌から分離した17種類の嫌気性菌のカクテルを無菌マウスの腸内に移植することにより、実験的に誘導される腸炎の症状が軽減されること、および、これらの菌が腸内で産生する酪酸によって炎症を抑制する制御性T細胞の分化が促進されることを示した³⁹⁾。さらに最近、同じ研究グループは、ヒトの便から分離した他の11種類のヒト腸内細菌株のカクテルが、がんや細胞内寄生菌に対する細胞性免疫応答を高めることを明らかにした⁴⁰⁾。これらの結果はいずれも動物実験のレベルではあるが、ヒトの内在性腸内細菌が健康や疾病の防御に深く関与していることを示唆している。

有用な腸内常在菌として、いわゆる「次世代プロバイオティクス」の候補がいくつか示されている。代表的な菌種として、健康な成人の腸内フローラの最優勢菌種の一つである*Fecalibacterium prausnitzii*があり、酪酸産生菌として、免疫や炎症の調節、腸管バリア機能の維持など腸を介した健康維持に有用であることが報告されている⁴¹⁾。しかし、*F. prausnitzii*の亜種によって酪酸産生能に差があり、例えば、アトピー性皮膚炎(AD)児は非AD児と比較して腸内の*Fecalibacterium prausnitzii*の量は同等であるが、健康児より酪酸産生能の低い亜種の割合が高いことが報告されている⁴²⁾。また、腸内の優勢な嫌気性細菌群の一種である*Akkermansia muciniphila*は、肥満者で検出頻度の低い細菌種として分離され、マウスの食事誘発性肥満モデルで抗肥満効果があることが示されている⁴³⁾。筆者らは、ヒトの腸内で最も優勢な嫌気性菌群である*Fusicatenibacter saccharivorans*を分離し⁴⁴⁾、臨床研究室と共同で、慢性炎症性腸疾患患者の腸内*F. saccharivorans*菌数が低いこと、腸炎モデルマウスにおいて*F. saccharivorans*が抗炎症作用を示すことを明らかにした⁴⁵⁾。

【参考文献】

- 1) Élie Metchinikoff. The prolongation of life – optimistic studies, the English translation, edit: Mitchell PC, p151-183, G. P. Putman's sons, New York & London, The Knickerbocker Press, 1908.
- 2) Vergin, F. Anti-und Probiotica. Hipokrates, 25: 116-119, 1954.
- 3) Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics; Growth promoting factors produced by microorganisms. Science, 147: 747-748, 1965.
- 4) Parker RB. The other half of the antibiotic story. Anim Nut Health, 29: 4-8, 1974.
- 5) Fuller R. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol, 66: 365-378, 1989.

興味深いことに、上記の報告の*A. muciniphila*と*F. saccharivorans*について、生菌製剤と同様に死菌製剤でも効果が確認されている。特に、*A. muciniphila*では、精製した外膜タンパク質画分による宿主免疫系を介する抗炎症作用も実証された。さらに、太り気味のインスリン抵抗性成人を対象としたヒトでの予備的研究において、低温殺菌した*A. muciniphila*細胞の摂取によりインスリン抵抗性、末梢血中の肝機能および炎症のマーカーが改善されたことが報告されている⁴⁶⁾。最近では、「宿主の健康に有効な作用を発揮する不活化菌体やその構成成分」として「ポストバイオティクス」という新しい概念が提唱されている⁴⁷⁾(表1)。ポストバイオティクスは加熱菌体や溶菌およびその成分を含むが、有機酸など代謝産物はこれに含めない。さまざまな症状(下痢、アレルギー疾患、過敏性腸症候群、など)の症状緩和についての証拠が蓄積されつつあり、腸管局所や全身の免疫応答の改善、腸管上皮のバリア機能の増強から全身的な代謝や神経伝達まで、プロバイオティクス(生菌)と同様の作用メカニズムが提唱されている。

5. まとめ

プロバイオティクスの保健作用において、CRの制御に基づく再現性のある臨床研究成果を得ることにより、強い復元力を持つ腸内フローラの確立とこれに基づくQOLの向上が可能と考えている。適切な実験モデルやバイオマーカーを用いた作用機序の解明は、プロバイオティクスの適切な摂取方法や効果の上昇につながる可能性がある。ヒト内在性細菌の新規なプロバイオティクスとしての開発(特に摂取履歴のない菌種)においては、明確な作用機序を示すとともに安全性の確保が肝心である。

- 6) 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. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 11: 506-514, 2014.
- 7) Meurman JH, Stamatova IV. Probiotics: Evidence of oral health implications. *Folia Med (Plovdiv)*, 60:21-29, 2018. doi: 10.1515/folmed-2017-0080.
- 8) Nadelman P, Magno MB, Masterson D, da Cruz AG, Maia LC. Are dairy products containing probiotics beneficial for oral health? A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Invest* 22, 2763-2785, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2682-9>.
- 9) Derwa Y, Gracie DJ, Hamlin PJ, et al. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 46:389-400, 2017. doi: 10.1111/apt.14203.
- 10) Lü M, Yu S, Deng J, et al. Efficacy of probiotic supplementation therapy for *Helicobacter pylori* eradication: A meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*, 11 (10) :e0163743, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0163743
- 11) Goderska K, Agudo Pena S, Alarcon T. *Helicobacter pylori* treatment: antibiotics or probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018 Jan;102 (1) :1-7. doi: 10.1007/s00253-017-8535-7.
- 12) Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, et al. ACG clinical guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*, 112:212-239, 2017. doi: 10.1038/ajg.2016.563.
- 13) Japanese Society for Digestive Diseases (ed.). Are probiotics and prebiotics effective for IBS? Guidelines for the treatment of functional gastrointestinal disorders 2014- Irritable bowel syndrome. Nankodo, Tokyo, p60-61, 2014.
- 14) Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, et al. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 357:1076-1079, 2001.
- 15) Fiocchi A, Pawankar R, Cuello-Garcia C, et al. World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P) : Probiotics. *World Allergy Organ J*, 2015 Jan 27;8 (1) :4. doi: 10.1186/s40413-015-0055-2.
- 16) Li L, Han Z, Niu X, et al. Probiotic supplementation for prevention of atopic dermatitis in infants and children: A Systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Dermatol*, 20: 367-377, 2019. doi: 10.1007/s40257-018-0404-3.
- 17) Tang ML, Ponsonby AL, Orsini F, et al. Administration of a probiotic with peanut oral immunotherapy: A randomized trial. *J Allergy Clin Immunol*, 135: 737-744, 2015.
- 18) Misra S, Mohanty D. Psychobiotics: A new approach for treating mental illness? *Crit Rev Food Sci Nutr*, 30: 1-7, 2017. doi: 10.1080/10408398.2017.1399860.
- 19) Bercik P, Verdu EF, Foster JA, et al. Chronic gastrointestinal inflammation induces anxiety-like behavior and alters central nervous system biochemistry in mice. *Gastroenterology*, 139: 2102-2112, 2010. doi: 10.1053/j.gastro.2010.06.063
- 20) Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 16050-16055, 2011. doi: 10.1073/pnas.1102999108.
- 21) Sarkar A, Harty S, Lehto SM, et al. The microbiome in psychology and cognitive neuroscience. *Trends Cogn Sci*, 22: 611-636, 2018. doi: 10.1016/j.tics.2018.04.006.
- 22) Kelly JR, Allen AP, Temko A, et al. Lost in translation? The potential psychobiotic *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) fails to modulate stress or cognitive performance in healthy male subjects. *Brain Behav Immun*, 61: 50-59, 2017. doi: 10.1016/j.bbi.2016.11.018.
- 23) Liu B, He Y, Wang M, et al. Efficacy of probiotics on anxiety-A meta-analysis of randomized controlled trials. *Depress Anxiety*, 35: 935-945, 2018. doi: 10.1002/da.22811.
- 24) Takada M, Nishida K, Kataoka-Kato A, et al. Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota relieves stress-associated symptoms by modulating the gut-brain interaction in human and animal models. *Neurogastroenterol Motil*, 28:1027-1036, 2016. doi: 10.1111/nmo.12804.
- 25) Takada M, Nishida K, Gondo Y, et al. Beneficial effects of *Lactobacillus casei* strain Shirota on academic stress-induced sleep disturbance in healthy adults: a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Benef Microbes*, 8: 153-162, 2017. doi: 10.3920/BM2016.0150.
- 26) Sanders ME, Merenstein D, Merrifield CA, Hutkins R. Probiotics for human use. *Nutrition Bulletin*, 43: 212-222, 2018. doi: 10.1111/nbu.12334.

- 27) Tsushima M. The concept of Mibyou and the need of its treatment for the coming advanced aged society-in order to prevention for nursing and care. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi*, 43: 74-77, 2006. doi: 10.3143/geriatrics.43.74.
- 28) Koizumi K, Oku M, Hayashi S, et al. Suppression of dynamical network biomarker signals at the predisease state (Mibyou) before metabolic syndrome in mice by a traditional Japanese medicine (Kampo formula) bofutsushosan. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020 Aug 4;2020:9129134. doi: 10.1155/2020/9129134.
- 29) van der Waaij D, Berghuis-de Vries JM, Lekkerkerk-van der Wees JEC. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond)*, 69: 405-411, 1971. doi: 10.1017/s0022172400021653.
- 30) Reid G, Gaudier E, Guarner F, et al. Responders and non-responders to probiotic interventions: How can we improve the odds? *Gut Microbes*, 2010 May-Jun; 1 (3) : 200-204. doi: 10.4161/gmic.1.3.12013
- 31) Nomoto K, Nagaoka M, Yokokura T, Mutai M. Augmentation of resistance of mice to bacterial infection by a polysaccharide-peptidoglycan complex (PSPG) extracted from *Lactobacillus casei*. *Biotherapy*, 1: 169 -177, 1989.
- 32) S. Matsumoto, T. Hara, M. Nagaoka, et al. A component of polysaccharide peptidoglycan complex on *Lactobacillus* induced an improvement of murine model of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. *Immunol*, 128, Issue 1pt2 p. e170-e180, 2009.
- 33) Nagahama K, Kumano T, Nakata T, et al. Synthesis and immunestimulating activity of lactobacilli-originated polysaccharide-polymeric microparticle conjugates. *Langmuir*, 31: 1489-1495, 2015.
- 34) Nagahama K, Kumano T, Nakagawa Y, et al. Enhanced Immunostimulating Activity of Lactobacilli-Mimicking Materials by Controlling Size. *Bioconjugate Chem*, 26: 1775-1781, 2015.
- 35) Shida K, Nanno M, Nagata S. Flexible cytokine production by macrophages and T cells in response to probiotic bacteria: a possible mechanism by which probiotics exert multifunctional immune regulatory activities. *Gut Microbes*, 2: 109-114, 2011. doi: 10.4161/gmic.2.2.15661.
- 36) Shida K, Kiyoshima-Shibata J, Nagaoka M, et al. Induction of interleukin-12 by *Lactobacillus* strains having a rigid cell wall resistant to intracellular digestion. *J Dairy Sci*, 89: 3306-3317, 2006.
- 37) van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. (2013) . Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*, 368:407-415.
- 38) Wang JW, Kuo CH, Kuo FC, et al. (2019) . Fecal microbiota transplantation: Review and update. *J Formos Med Assoc*, 118 Suppl 1: S23-S31.
- 39) Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, et al. (2013) . Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*, 500:232-236. doi: 10.1038/nature12331.
- 40) Tanoue T, Morita S, Plichta DR, et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature*, 565: 600-605, 2019. doi: 10.1038/s41586-019-0878-z.
- 41) Martín R, Bermúdez-Humarán LG, Langella P (2018) . Searching for the bacterial effector: the example of the multi-skilled commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii*. *Front Microbiol*, 2018 Mar 6;9:346. doi: 10.3389/fmicb.2018.00346.
- 42) Song H, Yoo Y, Hwang J, Na YC, Kim HS. *Faecalibacterium prausnitzii* subspecies-level dysbiosis in the human gut microbiome underlying atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 137: 852-860, 2016.
- 43) Cani PD, de Vos WM. Next-generation beneficial microbes: The case of *Akkermansia muciniphila*. *Front Microbiol*, 2017 Sep 22;8:1765. doi: 10.3389/fmicb.2017.01765.
- 44) Takada T, Kurakawa T, Tsuji H, Nomoto K. *Fusicatenibacter saccharivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63: 3691-3696, 2013. doi 10.1099/ijms.0.045823-0.
- 45) Takeshita K, Mizuno S, Mikami Y, et al. A single species of *Clostridium* subcluster XIVa decreased in ulcerative colitis patients. *Inflamm Bowel Dis*, 22: 2802-2810, 2016.
- 46) Depommier C, Everard A, Druart C, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nat Med*, 25: 1096-1103, 2019. doi: 10.1038/s41591-019-0495-2.
- 47) Salminen S, Collado MC, Endo A, et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 18: 649-667, 2021.