

# プロバイオティクス，臨床応用への新しい方向性

高橋 志達

ミヤリサン製薬株式会社東京研究部\*

受付日：2017年12月18日 受理日：2018年2月13日

ヒトの生体各部位には多種多様な微生物が定着し，常在細菌叢を形成している。この常在細菌叢は宿主との共生関係を維持しながら生体反応に大きな影響を与えており，近年では，炎症性腸疾患，*Clostridium difficile* 腸炎，大腸癌等の消化器系疾患や，糖尿病や動脈硬化，喘息をはじめとしたアレルギー疾患，さらには自閉症等の精神疾患への関与が明らかとなりつつある。

プロバイオティクスは，宿主の健康に寄与する生きた微生物を用いた生菌製品であり，これらには発酵乳を含む飲料および食品に加え，実臨床の場において応用可能な医療用医薬品としての生菌製剤などが挙げられる。

プロバイオティクスには *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp. および *Clostridium butyricum* 等の幅広い細菌や *Saccharomyces boulardii* 等の酵母が用いられるが，それらの安全性や有効性は菌属や菌種よりも菌株の特性に依存し，臨床的に期待する効果も菌株特異的な研究の成果として見極める必要性が指摘されている。プロバイオティクスの基礎研究分野では，オミックス解析の発展に伴い，遺伝子レベルでの機能解析 (Genome) やプロバイオティクスにより産生または誘導される各種代謝産物 (短鎖脂肪酸やビタミン等) のメタボローム解析 (Metabolome)，さらには遺伝子の発現系解析 (Transcriptome) を介した作用メカニズムの検証が試みられている。

臨床現場においては，プロバイオティクスは主に感染性腸炎や過敏性腸症候群等の各種慢性および急性の消化器系疾患や抗菌薬誘導下痢症 (Antibiotic Associated Diarrhea ; AAD) および *C. difficile* 感染の予防または治療に広く用いられている。

本稿では，最近の常在細菌叢と疾病の関連性に関する研究を総括しながら，分子生物学的研究手技を用いたプロバイオティクスの有効性の検討，ならびに臨床応用の可能性，さらには将来性について概説したい。

**Key words:** probiotics, microbiota, microbiome, dysbiosis

## はじめに

人の口腔，鼻腔，消化器官，皮膚，膣などには数百兆個，数千種類の細菌で構成される常在細菌叢 (マイクロバイオータ) が存在し，一定のバランスのもとに宿主の恒常性を維持させている。このマイクロバイオータは，ヒトゲノムの数百倍に及ぶ微生物由来遺伝子を保有し，その代謝産物を含めて宿主との関係性の解明を目指す「マイクロバイオーム」研究が広く展開されている<sup>1)</sup>。宿主とマイクロバイオー

タの interaction を研究する場合に，対象となる臓器 (腸管や皮膚または膣など) の細菌叢を DNA レベルで解析する手法は，次世代シーケンサーの登場により飛躍的に発展し，国際的なコンソーシアムによる全容解明が目指されている<sup>2)</sup>。次世代シーケンサーを用いたマイクロバイオータの解析には細菌特異的な 16SrRNA 遺伝子を標的とした菌種の同定や菌種間の組成解析を検討するメタ 16S 解析，標的とする細菌が培養可能であれば，分離培養された菌株を用いた比較ゲノム解析および細菌叢の構成菌種

\*東京都北区上中里 1-10-3

すべてのゲノムを一度に解析するメタゲノム解析がある。中でもメタ 16S 解析はその汎用性から多数の研究に用いられ，その成果としてマイクロバイオータは宿主の生命活動に重要な働きを担っているが，そのバランスの破たん (dysbiosis) はさまざまな病態と関連することが解明されつつある<sup>3)</sup>。

1980 年代に Fuller<sup>4)</sup>により提唱された「プロバイオティクス (probiotics)」とは，「マイクロバイオータのバランスを変えることにより宿主に有益な作用をもたらす生きてきた微生物」と定義され，Salminen ら<sup>5)</sup>により「宿主の健康や栄養に優位に働く生菌剤または発酵製品」と再定義された。この定義の中では，プロバイオティクスの評価は安全性および有効性について，菌種レベルではなく菌株レベルで科学的に証明することを要求し，且つ，臨床評価を医学的，栄養学的に行うべきであると指示されている。プロバイオティクスには，ヨーグルトや乳酸菌飲料等の発酵食品として健康増進を目的に摂取されるものや，整腸剤 (薬) として医療分野において疾病の治療や予防に用いられるものまで幅広い分野で用いられている。

本稿では，マイクロバイオータとさまざまな疾患との関連性から，その制御法としてのプロバイオティクスの可能性について最近の話題を概説する。

## I. マイクロバイオータと疾患

マイクロバイオータがヒトの健康維持に重要な働きをもつことは良く知られており，その dysbiosis

がさまざまな疾患の原因になることも明らかになりつつある<sup>6)</sup>。Table 1 には，dysbiosis の主な原因と，関連が疑われる疾患または症状を示した。Dysbiosis が原因の疾患としては，これまで，炎症性腸疾患や過敏性腸症候群等の消化器系疾患に関する研究が行われてきたが，近年は全身性の疾患との関連性が注目されている。Dysbiosis 関連疾患とその特徴を Table 2 に示した。いずれの研究においても，分子生物学的な細菌叢解析が応用され，健康人と比較してマイクロバイオータの門レベルおよび属レベルでのダイナミックな変化が各種疾患にかかわっていることが報告されている。

## II. プロバイオティクス研究の現状

### 1. プロバイオティクスの種類と作用

プロバイオティクスは，ヨーグルトや乳酸菌飲料の食品のみならず，消化器系疾患の治療を目的に用いられる整腸剤として古くから臨床応用されている。プロバイオティクスに用いられる微生物としては *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp. および *Clostridium butyricum* 等の幅広い菌属，菌種が存在するが，最近では，菌種ごとの有効性や安全性を検証するよりも，菌株ごとの科学的な特性を証明することが重要視されている<sup>16)</sup>。

プロバイオティクスの作用機序はさまざまな角度から検討されており，特に，菌体成分による宿主免疫応答の修飾，産生されるビタミンや酵素および短

Table 1. Cause of dysbiosis and its related diseases

Major cause of dysbiosis	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduction of immune responses</li> <li>• Malnutrition</li> <li>• Drugs (antibiotics and/or steroidal substances etc.)</li> <li>• Aging</li> <li>• Dietary shift</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intestinal infection</li> <li>• Tissue injury</li> <li>• Stress</li> <li>• GI tract disorders</li> </ul>
Related diseases	
GI tract diseases	Non-GI tract diseases
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acute or chronic diarrhea</li> <li>• Constipation</li> <li>• Inflammatory bowel disease</li> <li>• Antibiotic associated diarrhea</li> <li>• <i>Clostridium difficile</i> infection</li> <li>• Irritable bowel syndrome</li> <li>• Lactose intolerance</li> <li>• Leaky gut syndrome</li> <li>• Nonalcoholic fatty liver disease</li> <li>• Nonalcoholic steatohepatitis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Autism</li> <li>• Dental caries and periodontitis</li> <li>• Allergic diseases</li> <li>• Obesity</li> <li>• Rheumatoid-related</li> <li>• Hypoglycemia</li> <li>• Low weight</li> <li>• Diabetes</li> </ul>

Table 2. Differences in intestinal microbiota between healthy human and dysbiosis related diseases

Diseases	Differences between healthy human	Reference
Inflammatory bowel diseases	Increase phylum Proteobacteria including <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Bacteroides</i> spp. Decrease phylum Firmicutes including <i>Clostridium</i> spp.	7)
Irritable bowel syndrome	Increased <i>Veillonella</i> spp. and <i>Lactobacillus</i> spp.	8)
Colorectal carcinoma	Increased <i>Fusobacterium</i> spp.	9)
Autism	Increase in phylum Bacteroidetes and Proteobacteria. Decrease in phylum Firmicutes and Actinobacteria	10)
Cardiovascular disease	Gut microbiota-dependent metabolism of phosphatidylcholine	11)
Nonalcoholic fatty liver disease	Increase in phylum Bacteroidetes and decrease in phylum Firmicutes	12)
Obesity	Reduction in the ratio of Bacteroidetes to Firmicutes	13)
Type II diabetes	Decrease in phylum Firmicutes (clostridia) and increase in phylum Proteobacteria. Changes in the ratio between phylum Bacteroidetes and Firmicutes	14)
Acute cellular rejection and bloodstream infections during liver transplantation	Increase in <i>Bacteroides</i> spp., <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> and <i>Bifidobacteriaceae</i> . Decrease in <i>Enterococcaceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i> , <i>Ruminococcaceae</i> and <i>Peptostreptococcaceae</i>	15)

Table 3. Mode of action of probiotics

Microbiological action	Mucosal function	Immune response
<ul style="list-style-type: none"> <li>Improvement in the of balance of microbiota (total number and/or diversity)</li> <li>Colonization resistance</li> <li>Growth reduction of pathogenic bacteria by bacteriocin or Short Chain Fatty Acids (SCFA)</li> <li>Inhibition/reduction of toxin production by toxigenic pathogens</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Improvement in barrier function</li> <li>Improved function of tight junction</li> <li>Improvement in mucosal function and anti-inflammatory effect by SCFA</li> <li>Reduction in carcinogenic enzymes or substances</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Improved innate immunity</li> <li>Controlled Th1/Th2 balance</li> <li>Improved regulatory T cell</li> <li>Induction of SIgA</li> <li>Adjuvant activity</li> </ul>

鎖脂肪酸（酢酸，酪酸およびプロピオン酸）などの代謝産物によるエビジェネティックな恒常性の維持，栄養素の吸収促進や水分調節，バクテリオシンや有機酸による抗病原微生物作用，免疫応答による腸管内の炎症や潰瘍の抑制作用，発癌関連酵素の活性低下による大腸癌の予防等が研究されている（Table 3）。

## 2. プロバイオティクスの安全性

一般的にプロバイオティクスは安全であると考えられている。しかしながら，生きた細菌を直接接種させる本療法は，生菌特有の安全性について考慮する必要がある，特に患者のバックグラウンドによっては投与後の感染症発症や薬剤耐性因子の伝播の可能性が懸念されている。

### 1) プロバイオティクスによる感染症例

プロバイオティクスに用いられる細菌および真菌による bacteremia または fungemia は Doron らの総説にまとめられている<sup>17)</sup>。プロバイオティクスが原因菌となる感染症はまれではあるが，敗血症の報告は複数あり，最も多いのが *Lactobacillus* spp. に

よるもので，次いで *Bifidobacterium* spp. および *Enterococcus* spp. による症例が報告されている。また，*Lactobacillus* spp. では心内膜炎を惹起する可能性が指摘されている。

プロバイオティクスによる感染症例は主に消化管の基礎疾患によるところが大きく，腸管壁浸漏症候群（Leaky Gut Syndrome）や新生児壊死性腸炎，各種の免疫不全状態（先天性免疫不全，後天性免疫不全症候群，骨髄や臓器移植後），低栄養状態や長期間の経腸または経静脈栄養管理などが Bacterial Translocation（BT）を誘導し菌血症にいたるものと考えられている。

### 2) プロバイオティクスと薬剤耐性菌

プロバイオティクスに用いられる各種細菌が保有するプラスミドにテトラサイクリン，クロラムフェニコール，エリスロマイシン，マクロライド，ストレプトマイシンおよびストレプトグラミン耐性遺伝子がコードされており，薬剤耐性の伝播を助長する可能性が指摘されている<sup>18)</sup>。

この薬剤耐性因子の伝播に関しては，いくつかの

Table 4. Discoveries regarding drugs targeting the microbiome

Target disease	Pipeline	Developer	
Pseudomembranous colitis and intestinal infection	R type bacteriocin <sup>24)</sup>	AvidBiotics	South San Francisco, CA
Analysis of intestinal microbiota	Prediction of type 2 diabetes and arteriosclerosis <sup>25)</sup>	MetaboGen	Goteborg, Sweden
Diabetes	Advanced metformin (diabetes drug) <sup>26)</sup>	MicroBiome Therapeutics	New Orleans, LA
Fecal sample formulation	Fecal sample formulation for FMT (enteral treatment) <sup>27)</sup>	Rebiotix	Roseville, MN
Lactose intolerance	Galacto-oligosaccharide <sup>28)</sup>	Ritter Pharmaceuticals	Los Angeles, CA
Pseudomembranous colitis	Ethanol treated human fecal sample <sup>29)</sup>	Seres Health	Cambridge, MA
Pseudomembranous colitis	Capsulated human fecal sample <sup>30)</sup>	Symbiotic Health	New York, NY
Pseudomembranous colitis, irritable bowel syndrome, multiple sclerosis	Bacterial low molecular weight compound and advanced lovastatin <sup>31)</sup>	Symthetic Biologics	Ann Arbor, MI
Inflammatory bowel diseases	Treg inducible 17 strains of <i>Clostridium</i> Cluster IV, XIa formulation <sup>32)</sup>	Vedanta Biosciences	Boston, MA
HIV infection	Low molecule protein expressing <i>Lactobacillus jensenii</i> <sup>33)</sup>	Osel Inc	Mountain View, CA

実験の根拠が示されており,例えば,プロバイオティクス菌株として用いられる *Lactococcus* spp.の薬剤耐性プラスミドが *Leuconostoc* spp.や *Pediococcus* spp.に受け入れられることが示されている<sup>19)</sup>。また, enterococci が保有する薬剤耐性因子が *in vitro* の接合伝達実験により lactobacilli や lactococci に伝播し,この作用は生体内,すなわち宿主腸管内でも認められることが報告されている<sup>20)</sup>。

### 3) プロバイオティクスに求められる安全性試験

プロバイオティクスに用いられる菌株に対する安全性試験として2002年にFood and Agriculture Organization (FAO)およびWorld Health Organization (WHO)は,新規にプロバイオティクスに用いられる菌株の安全性評価に関するガイドラインを提唱した<sup>21)</sup>。本ガイドラインでは,プロバイオティクスに用いられる菌株の抗菌薬耐性パターンや,その菌株が毒素産生性を有する菌属に由来する場合には,その毒素産生性について検討すること等を指示している。特に,多剤耐性菌の増加は公衆衛生上の重要な問題であり,プロバイオティクスについても,プラスミドやトランスポゾンにコードされ,水平伝播する可能性のある薬剤耐性遺伝子を保有する菌株の使用は禁止すべきである<sup>22)</sup>。本邦において医薬品に用いられる成分はGood Laboratory Practice (GLP) 準拠の安全性試験として単回投与毒性試験(急性毒性試験), 亜急性毒性試験および慢性毒性試験等の反復投与毒性試験が実施されているが,Isa

らはそれら医薬品としての安全性試験に加え,前述のプロバイオティクスに求められる薬剤感受性試験や細菌性毒素にかかわる遺伝子レベルでの調査,さらには生殖関連毒性試験を報告している<sup>23)</sup>。

### 3. マイクロバイオーム研究の臨床応用(社会実装を目指すバイオベンチャー)

#### 1) プロバイオティクスの応用

マイクロバイオームの研究成果を臨床応用するためにプロバイオティクスを含むいくつかの戦略的開発が推進されており,その代表的なパイプラインをTable 4に示した。開発戦略として最も一般的なものは,有効性が証明されている既知のプロバイオティクス菌種または菌株を単独(単一菌株製剤)あるいは複数種混合(カクテル製剤)した形態の製剤を用いてdysbiosisや,原因となる代謝産物の異常を改善させることで疾患の治療に応用させるものである。現在では,エビデンスの創出を目的に標的となる疾患に対して国際共同治験が実施され,日米欧での臨床応用が目指されているものもある。例えば,本邦においても生菌整腸剤として臨床応用されている *C. butyricum* MIYAIRI588株はAADや *C. difficile* 感染症を対象に欧米において臨床開発が進行しており,特に,再発性 *C. difficile* 感染症の再発防御が期待されている。また,カクテル製剤としては,数種の *Lactobacillus* spp.や *Bifidobacterium* spp.を混合した製剤が複数のRandomized Control Trials (RCT)により有効性を証明されているほか<sup>34)</sup>,17

種類の clostridia (*Clostridium* cluster IV および XIV) のカクテル製剤による TGF- $\beta$  や IL-10 を産生する制御性 T 細胞 (Treg) の誘導を介した自己免疫疾患治療剤の開発も注目されている<sup>25)</sup>。

## 2) 菌体成分または代謝産物の応用

プロバイオティクスのように生菌そのものを投与するのではなく，細菌の産生する低分子の生理活性物質を臨床応用する可能性も検討されている。例えば，腸内細菌叢に影響を及ぼさずに *C. difficile* のみを抑制することが可能な R 型バクテリオシン (抗菌性ペプチド)<sup>24)</sup> や *Bacteroides* 属細菌の多糖体である Polysaccharide A (PSA) が Treg を誘導することを根拠に，本多糖体を用いた炎症性腸疾患および多発性硬化症の治療薬としての応用が検討されている<sup>35)</sup>。

## 4. オミックス解析を用いたプロバイオティクス開発の可能性

マイクロバイーム研究では，細菌叢を網羅的に検討するメタゲノム解析 (メタゲノミクス) にとどまらず，遺伝子の発現を解析するトランスクリプトミクスや質量分析計を用いた低分子の代謝産物解析を目指すメタボロミクスが実施されており，これらを包括的に行う統合オミックス解析が，プロバイオティクスの開発や有効性の検証でも応用されつつある<sup>36)</sup>。Fukuda ら<sup>37)</sup> は，無菌マウスを用いた腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*; EHEC) O157 感染致死モデルにおいて，EHEC の感染を防御できる *Bifidobacterium* spp. と防御できない *Bifidobacterium* spp. を統合オミックス解析により検討し，防御可能な *Bifidobacterium* spp. では *in vivo* においてフルクトーストランスポーター遺伝子が発現しており，腸管内における糖の代謝能が高く，短鎖脂肪酸の一つである酢酸の産生量が防御不可能な *Bifidobacterium* spp. に比べて有意に高いことを見出した。さらに，EHEC の感染を防御する *Bifidobacterium* spp. であっても，フルクトーストランスポーター遺伝子を欠損させると感染防御能が喪失することから，*Bifidobacterium* spp. による EHEC 感染防御能は *Bifidobacterium* spp. が産生する酢酸により誘導されることを証明した。これらの研究手技および成果は，統合オミックス解析をプロバイオティクスの機能解析へ応用した研究である。

さらに，マイクロバイームを外的に制御するこ

とで二次的に感染症防御能を高める研究も行われている。Kamada らは<sup>38)</sup>，マウスの病原性大腸菌感染モデルにおいて食餌に含まれる食物繊維を中心とした多糖類の量を制限すると，通常の餌を摂取している時には競合関係になかった *Bacteroides* 属細菌が限られた栄養素を巡って病原性大腸菌と競合関係を構築し，最終的に病原性細菌を排除することを報告している。また，トランスクリプトミクス解析を応用した研究では，ヒトの粘膜に存在する *Lactobacillus* spp. は菌種や菌株の違いによって宿主粘膜細胞の遺伝子パスウェイ (遺伝子の発現パターン) に与えるエピジェネティックな作用が明確に異なることを詳細に説明している<sup>39)</sup>。

## III. プロバイオティクスの臨床応用例

プロバイオティクスが応用されている主な疾患について，過去 10 年間にわたって PubMed に掲載されてきた論文数の経年変化を Fig. 1 に示した。相対的に報告数は増加傾向にあるが，近年では，糖尿病やアレルギーなどの消化管以外の疾患に対する有効性の検討が注目されている。

### 1. 胃腸炎および急性下痢症 (主に感染性腸炎)

小児を中心とした胃腸炎，急性胃腸炎に対するプロバイオティクスの有効性調査は，ウイルス性腸炎や細菌性下痢症を中心に多数のエビデンスが蓄積されている。その一例として，欧州小児消化器・肝臓・栄養学学会 (The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition; ESPGHAN) が実施した中等度から重症の下痢症と診断された 1~36 カ月の小児 287 例を対象とした *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) の多施設 RCT の結果では，プロバイオティクス摂取群において重症度，疾病期間および入院期間に有意な改善が示され，下痢の持続期間の短縮にも期待が持てることが明示された<sup>40)</sup>。近年では，疾患の治療成績を検討した RCT の報告をまとめてメタ解析することで，その効果を客観的に評価する方法が取り入れられており，プロバイオティクスにおいても応用されている。感染性腸炎に対しては，Cochrane Infectious Diseases Group's Trials Register (2010 年)，The Cochrane Controlled Trials Register (2010 年)，MEDLINE (1966~2010 年) および EMBASE (1988~2010 年) 等の医学薬学系データベースを中心に収集した 63 の RCT (内 56 は小児を対象)，

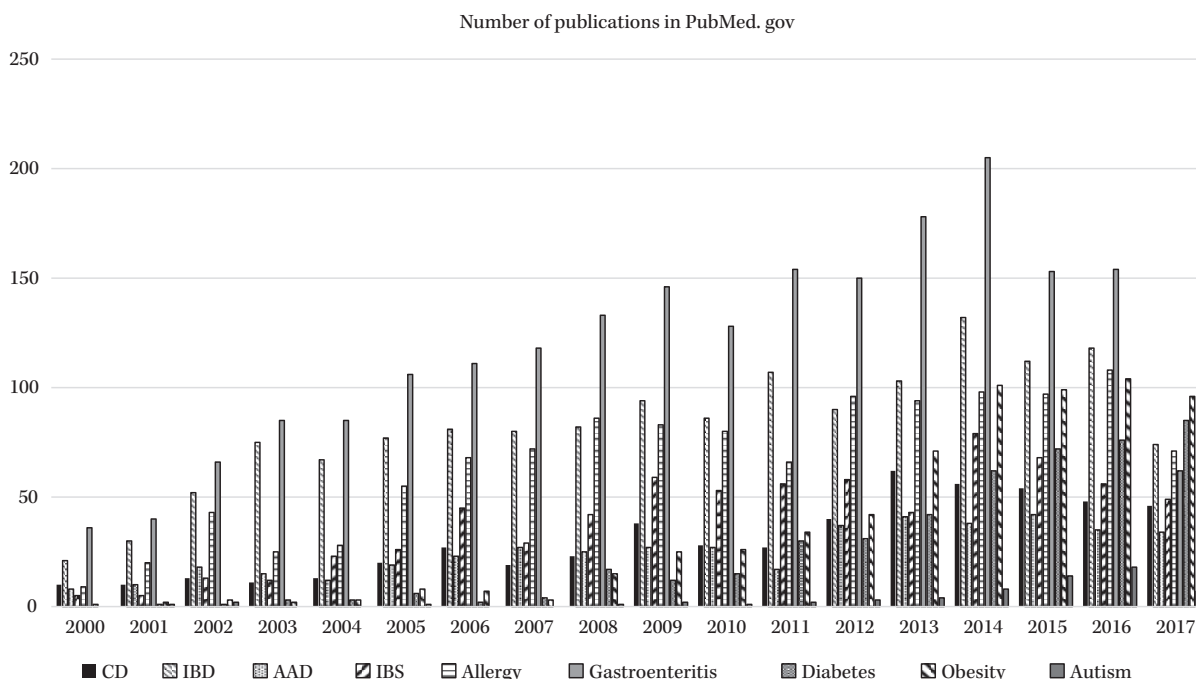


Fig. 1. Time trend of probiotics and several diseases in PubMed.gov (assessed in 31<sup>st</sup> August 2017). CD; *Clostridium difficile*, IBD; Inflammatory Bowel Diseases, AAD; Antibiotic Associated Diarrhea, IBS; Irritable Bowel Syndrome.

8,014 症例を対象とした systematic review の結果，下痢の持続時間の短縮 (mean difference 24.76 hours ; 95% confidence interval 15.9 to 33.6 hours ; n=4,555, trials=35)，下痢の4日以上の持続性の低下 (risk ratio 0.41 ; 0.32 to 0.53 ; n=2,853, trials=29) および発症2日目の下痢回数の減少 (mean difference 0.80 ; 0.45 to 1.14 ; n=2,751, trials=20) において統計学的有意なプロバイオティクス効果が示された。尚，すべてのRCTにおいてプロバイオティクスの介入による有害事象の報告がなかったことから，Allenらは，プロバイオティクスの投与が感染性下痢症に対して安全且つ有用であると結論づけている<sup>41)</sup>。

## 2. 抗菌薬誘導下痢症 (Antibiotic Associated Diarrhea ; AAD) および *Clostridium difficile* 感染症 (*Clostridium difficile* Infection ; CDI)

感染症治療のために抗菌薬化学療法を施行されている患者の約20%においてAADを発症するリスクがあり，これらは患者の治療および入院期間の延長につながる<sup>42)</sup>。AADは抗菌薬投与によるマイクロバイオータの攪乱により惹起されるが，その原因菌として *Clostridium difficile* が知られている。本菌は，通常はマイクロバイオータにより腸管内での増

殖が抑制されているが，抗菌薬を含む dysbiosis を惹起させる可能性のある薬剤投与時に，抑制にかかわる細菌叢の減少に反して増殖し，毒素を産生することで下痢症を中心としたCDIを発症させる。米国におけるAADおよびCDIの医療費に関する調査では，2013年の453,000症例に対し症例あたり\$3,427~\$9,960の医療費が加算されたと報告されている<sup>43)</sup>。

### 1) AADに対するプロバイオティクスの臨床効果

Ritchieら<sup>44)</sup>は，各種消化器系疾患に対するプロバイオティクスの効果をメタ解析し，AADの予防や治療がプロバイオティクスのターゲットになりえることを報告している (Fig. 2)。本報告ではプロバイオティクスがさまざまな消化器系疾患に有効であることが示されているが，加えて，複数のプロバイオティクスを混合したカクテル製剤と1菌株を用いた場合との比較や投与された各プロバイオティクスの菌数 (投与量) ごとの調査を実施している点で興味深い。本報告の中の各菌種間の有効性比較では，*S. boulardii* は *L. plantarum* および *B. infantis* よりも高い効果があり，*C. butyricum* は *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* および *B. infantis* よりも有効性が高かったと説明

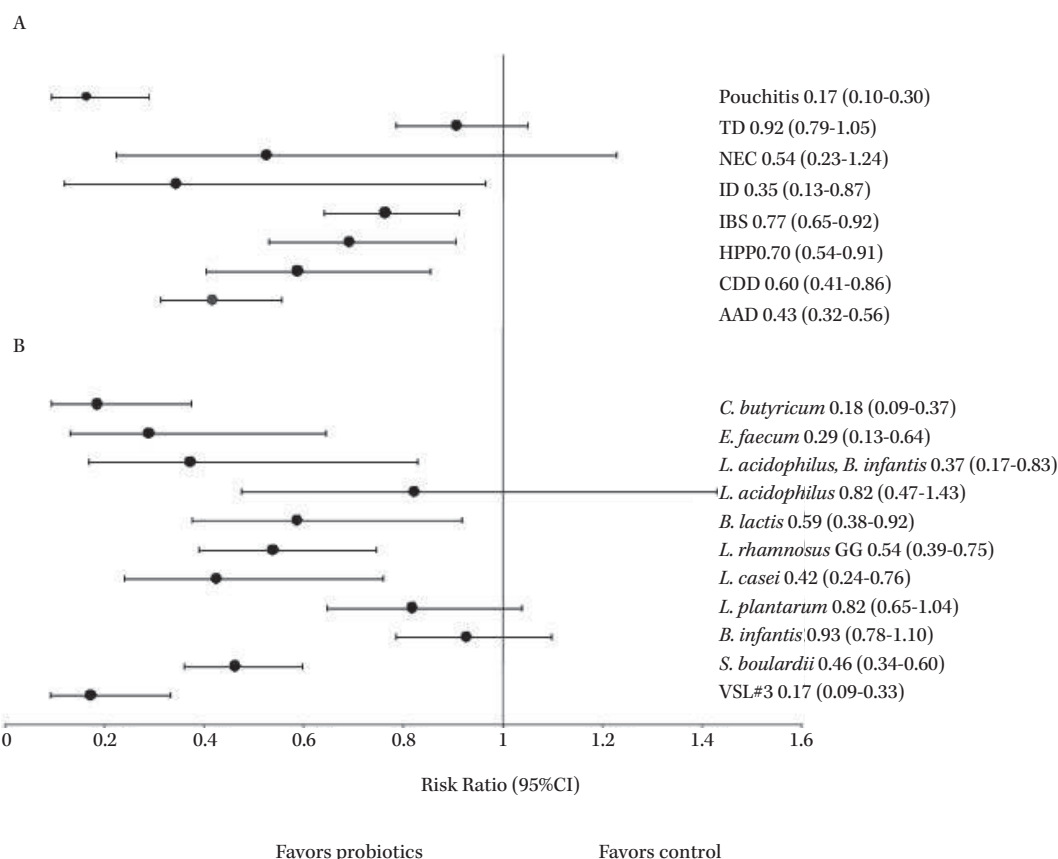


Fig. 2. The effect size (risk ratio) for gastrointestinal diseases and for probiotic species<sup>44</sup>.

(A) The effect size including the 95% confidence intervals for the total events of Antibiotic Associated Diarrhea (AAD), *Clostridium difficile* Disease (CDD), *Helicobacter pylori* Positive (HPP), Irritable Bowel Syndrome (IBS), Infectious Diarrhea (ID), Necrotizing Enterocolitis (NE), Traveler's Diarrhea (TD), and pouchitis during which probiotics were taken. (B) The effect size including 95% confidence intervals for the type of probiotic species that were used to treat and prevent gastrointestinal disease. The species that were used were VSL#3, *L. rhamnosus* GG, *S. boulardii*, *B. infantis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *C. butyricum*, *E. faecium*, *L. plantarum*, *B. lactis* and *L. acidophilus* combined with *B. infantis*. Risk ratios below one favor the probiotic while risk ratios above one favor the placebo.

されている。また、さまざまなプロバイオティクスのカクテル製剤である VSL#3 (炎症性腸疾患の項で詳述) は *S. boulardii*, *B. infantis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* GG, *B. lactis* および *L. acidophilus* よりも高い効果を示したとされている。本検討に含まれる RCT の中には Seki らの報告が本邦のプロバイオティクスによる RCT としてリクルートされている<sup>45</sup>。この報告では、110 例 (生後 1 カ月から 15 歳) の小児を対象に、抗菌薬療法中の腸内細菌叢の変動と、*C. butyricum* MIYAIRI588 株を含有する整腸剤ミヤ BM<sup>®</sup>の抗菌薬誘導下痢症の抑制効果を検討しており、抗菌薬を単独で投与された患者の腸内細菌叢では、偏性嫌気性菌の顕著な減少および *Bifidobacterium* の検出率の有意な低下を認め、59%

の患者が腹部症状を訴えたのに対し、抗菌薬投与開始 3 日目からミヤ BM<sup>®</sup>を併用した患者ではその発症率を 5% まで低下させ、また、抗菌薬投与開始と同時に併用した群では 9% まで低下させ、その臨床的有効性が示されている。

## 2) CDI に対するプロバイオティクスの臨床効果

CDI もプロバイオティクスが用いられる疾患ではあるが、その効果に関しては議論の余地がある。例えば、IDSA/SHEA のガイドラインによれば、CDI に対するプロバイオティクスの効果はエビデンスが未だ乏しく、臨床応用に否定的であるのに対し<sup>46</sup>、ESCMID のガイドラインでは、一定の評価を受けており、ある程度の使用が推奨されている<sup>47</sup>。プロバイオティクスの CDI に対する臨床応用では、CDI

症例の30~60%にみられる難治性の再発性CDIに対する効果が期待されている。その一例としてMNZまたはVCMによる治療時に*L. rhamnosus* GGを併用させると、プラセボ群が再発率60%であったのに対して、プロバイオティクス併用群では再発率が16%まで低下するとともに、94%の再発例において、それ以降の再発が起きなかったと報告されている<sup>48)</sup>。さらに、前述のガイドライン上での臨床応用への否定的な見解を元に実施された成人入院患者6,261例を含む19編の臨床論文のsystematic review およびメタ解析の結果によれば、対照群では3.9% (115/2,984)のCDI発症率であったのに対し、プロバイオティクス投与コホートでは1.6% (54/3,277)に抑えられ、統計学的有意 ( $P < 0.001$ ) にプロバイオティクスの有効性が認められ、特に抗菌薬の初回投与時に併用するとCDIのリスクを半減できることが示唆されており<sup>49)</sup>、客観的にプロバイオティクスのCDI対策への有効性を明らかにしている。

本邦では、黒岩らが抗菌薬療法施行患者の糞便内細菌叢の変化を検討する中で、*C. difficile*の陽性化について報告している<sup>50)</sup>。本検討では抗菌薬療法を受けた成人のうち、抗菌薬投与前に*C. difficile*が検出されなかった陰性例34例を対象とし、抗菌薬療法に*C. butyricum* MIYAIRI 588株を主成分とする生菌整腸剤を併用した患者14例、非併用患者20例の*C. difficile*の陽性率を調査している。その結果、整腸剤非併用群では20例中6例(30%)において*C. difficile*の陽性化が認められたのに対し、整腸剤併用群では14例中1例(7%)のみであり、抗菌薬療法時の生菌整腸剤併用はCDIのリスクが低減できる可能性を示唆している。

プロバイオティクスとは一線を画すことから、本稿の趣旨とは異なるが、CDIに対するマイクロバイオームの臨床応用の一例として糞便移植療法(Fecal Microbiota Transplant: FMT)が注目されている。FMTは、その名のとおり難治性の炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease: IBD)であるクローン病(Crohn's Disease: CD)や潰瘍性大腸炎(Ulcerative Colitis: UC)、器質的異常をもたないものの、各種の腹部症状を訴える過敏性腸症候群や再発性CDIを標的疾患として、特定の健常人(ドナー)の糞便そのものまたは糞便抽出物を生理食塩

水に懸濁し内視鏡下で投与する方法や注腸または凍結乾燥粉末をカプセルに封入して投与することでレシピエントの腸内細菌叢の構成を改善し疾患の治療を目指すものである<sup>51)</sup>。CDIに対するFMTのRCT結果が複数報告されており、特に再発性CDIに対するFMTの効果は顕著である<sup>52)</sup>。しかしながら、ドナー選択における各種検査が高額である点や適当なドナーがタイミングよく用意できるかなどの問題点も指摘されており、FMTが治療行為として応用されるためには研究開発以外にもレギュレーションを含む各種の環境整備が必要であると指摘されている<sup>53)</sup>。さらに、FMTの副作用は一般的に軽度とされているが、菌血症や腸管穿孔などの重篤な症例も報告されている。特に、再発性CDIに対してFMTを施行した寛解期のUC症例において、UCを再燃させたことが症例報告されており<sup>54)</sup>、今後の長期間のフォローアップを含めた安全性調査が必要である。

### 3. IBD

IBDは、消化管粘膜に慢性の炎症または潰瘍を引き起こす疾患であり、口腔から肛門にまで病変が広がるCDと主に大腸に病変が局限するUCに大別される。本疾患は、自己免疫疾患と理解されているが、近年のマイクロバイオーム研究の成果から、dysbiosisが病態の発症、増悪または再燃に密接に関与することが明らかとなり、Tregを誘導するマイクロバイオータによる疾患制御の可能性が期待されている<sup>55,56)</sup>。本疾患もプロバイオティクスによる制御が期待される領域であり、複数のRCTの結果が報告されている。中でも、*L. salivarius*、*E. coli* Nissle株、*S. boulardii* または複数の*Lactobacillus* spp.および*Bifidobacterium* spp.と*Streptococcus* spp.を配合したカクテル製剤(VSL#3, VSL pharmaceuticals)等の摂取が疾患の再燃予防効果やステロイドの減量などに寄与することが示されている<sup>57~59)</sup>。

IBDの外科的治療に良く用いられる大腸全摘、回腸囊肛門吻合術(Ileoanal Anastomosis: IPAA)は有効性が高いことで知られるが、IPAAを受けた患者の回腸囊に発生する非特異的炎症である回腸囊炎(pouchitis)の発症や再燃が懸念される。Pouchitisは日本人のIPAA施行患者の10%程度に発症すると報告されており、抗菌薬投与が奏効する症例もあることから、特定の細菌による感染も疑われてきたが、現在はdysbiosisが要因であると考えられてい



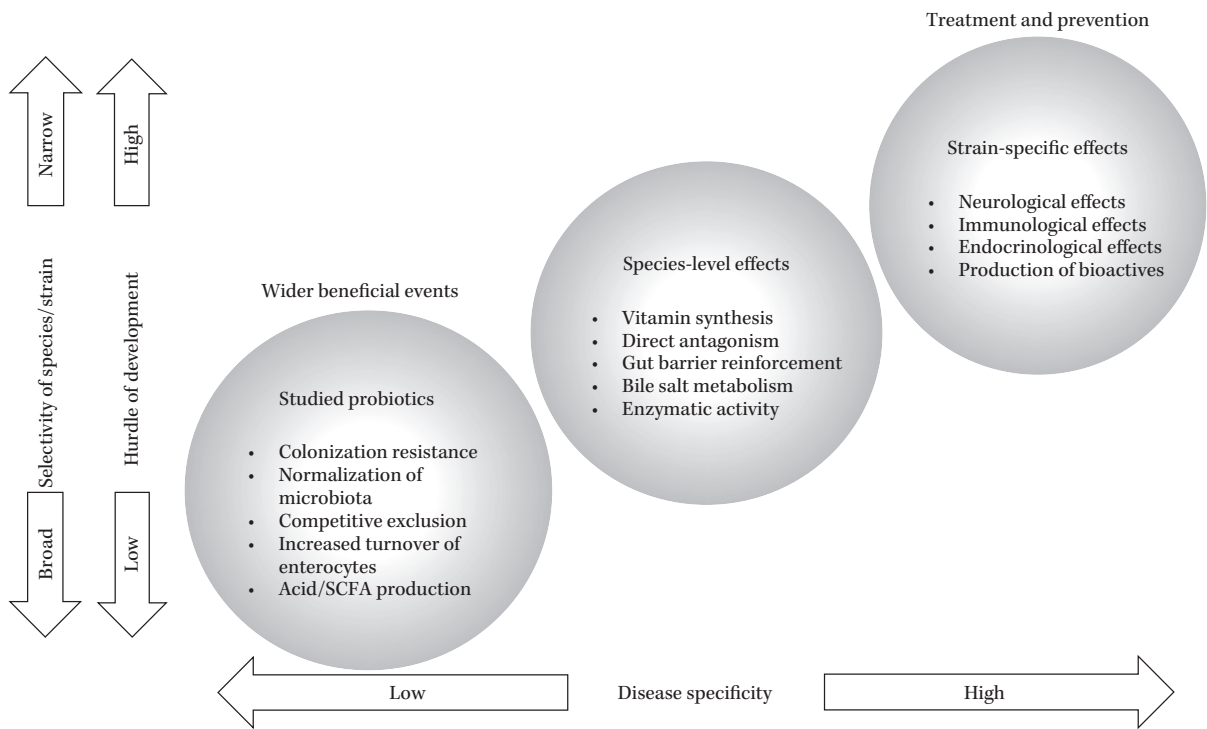


Fig. 3. Schematic image of the disease specific probiotics development (prepared based on Hill et al<sup>69)</sup>)

る<sup>60)</sup>。

Pouchitis に対しては，VSL#3 を用いたプラセボ対照 RCT により顕著な再燃予防効果が複数報告されている<sup>61-63)</sup>。また，Yasueda ら<sup>64)</sup>は，*C. butyricum* MIYAIRI 588 株を用いたプラセボを対象とした RCT により，プラセボ投与群の pouchitis 再燃数がリクルートされた 8 症例中 4 症例に認められたのに対し，*C. butyricum* MIYAIRI 588 株投与群では 9 症例中 1 例のみであったと報告している。尚，いずれの検討においてもプロバイオティクス投与による有害事象は認められていないことから，特に再燃予防には安全で有効な選択肢と考えられる。

#### 4. アレルギー性疾患

Kalliomäki ら<sup>65)</sup>は妊婦へのプロバイオティクス投与が新生児のアトピー性疾患発症を予防する可能性を報告している。本研究では 159 名の妊婦に出産前 2~4 週間に *L. rhamnosus* GG を継続的に摂取させ，出産後に母乳を乳児に与えることを希望した場合には母親に継続して *L. rhamnosus* GG を摂取させ，母乳を与えない場合には乳児に *L. rhamnosus* GG を摂取させたところ，摂取群ではプラセボ群に比べ出生後 2 年間で乳児のアトピー性疾患発症が 50% 抑制され，プロバイオティクスによるアレルギー

ギー発症の予防効果を示唆している。さらに，本研究は 4 年間の追跡調査の結果でも継続的な発症率低下の維持を統計学的有意に示している<sup>66)</sup>。同様なアトピー性疾患のプロバイオティクスによる予防効果を調査した RCT の論文 18 報を用いたメタ解析の報告では，プロバイオティクスが統計学的有意に発症を予防できることを示唆しており (RR = 0.79 [95% CI=0.71-0.88])，特に IgE 関連アトピー性皮膚炎では RR=0.80 (95% CI=0.66-0.96) の有効率であった<sup>67)</sup>。

#### IV. マイクロバイオータ/マイクロバイーム研究からの創薬

##### 1. プロバイオティクスの創薬

マイクロバイオータが関与するさまざまな疾患にはプロバイオティクスが有効であることが前述のとおり理解されつつあるが，未だ科学的エビデンスは十分ではないことも指摘されている<sup>68)</sup>。その一因には投与方法を如何にして，またはどのようなタイミングで，さらにはどの程度の用量 (菌数) の投与が最も効果を発揮させられるのか? という基本的な疑問に対する科学的な証明が不十分であることが挙げられる。しかしながら，現在のマイクロバイオータ/マイクロバイーム研究によって，dysbiosis や疾

Table 5. Development of Live Biotherapeutic Products (LBPs)

Candidates	Target	Characteristics of product	Stage	Reference
<i>Bacteroides xylanisolvens</i> DSM 23964	Cancer	Safety in humans has been established while levels of TNF $\alpha$ -specific IgM have been shown to be elevated in humans	Human	71)
<i>Bacteroides ovatus</i> D-6	Cancer	Increases levels of murine TNF $\alpha$ -specific IgM and IgG	Preclinical	72)
<i>Bacteroides dorei</i> D8	Heart disease	Depletes cholesterol <i>in vitro</i>	Preclinical	73)
<i>Bacteroides fragilis</i> ZY-312	Clearance of infectious agents	Enhances phagocytosis and polarization of macrophages	Preclinical	74)
<i>Bacteroides acidifaciens</i> JCM 10556 (T)	Clearance of infectious agents	Increases IgA levels in the large intestine of gnotobiotic mice	Preclinical	75)
<i>Clostridium butyricum</i> MIYAIRI 588	Multiple targets including cancer, inflammation and infectious agents	Evidence available for indication in human and animal trials	Human	45, 50, 55, 64), 76 ~ 78)
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Mainly IBD but also asthma, eczema and type 2 diabetes	Mainly focused on animal models of colitis and in associative studies	Preclinical	79, 80)
<i>Akkermansia muciniphila</i>	Obesity, diabetes	Controls intestinal epithelium function to reduce the risk of obesity	Preclinical	81, 82)

Table 6. Development of genetically modified probiotics

Candidates	Target	Expressed genes	Reference
<i>Bacteroides ovatus</i> V975	Inflammatory bowel diseases	Keratinocyte Growth Factor-2 (KGF-2)	84)
<i>Bacteroides ovatus</i> V975	Inflammatory bowel diseases	Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)	85)
<i>Lactococcus lactis</i>	Inflammatory bowel diseases	Elafin	86)
<i>Lactococcus lactis</i>	Autoimmune diseases, diabetes	Trefoil Factor 1 and IL-10	87, 88)
<i>Lactobacillus jensenii</i>	HIV infection	HIV-1 inhibitor and cyanovirin-N	33)

患の発症機序がより詳細に証明され，制御すべき対象菌種や菌属，または要因になる代謝産物が明確になれば治療効果を数値化して評価できる可能性があり，マイクロバイオータの創薬のポイントになるものとする。Hillら<sup>69)</sup>はこれまでプロバイオティクスに期待されていた作用に対し，将来的にはよりspecificで且つ効果を十分に発揮させられる疾患をターゲットとした治療薬へ展開されていくものと指摘している (Fig. 3)。

## 2. 疾患特異的な Live Biotherapeutic Product (LBP) の開発

将来的なプロバイオティクスは，栄養補助等の観点から従来どおり食品分野で応用されるものと，前述のマイクロバイオータ/マイクロバイオーム研究の成果から，疾患特異的な有効性が科学的に証明できる医薬品成分とに二極化することが議論されている<sup>70)</sup>。医薬品成分として創薬が進められている候補生菌剤とその標的疾患および開発段階を Table 5 に示した。O'Tooleら<sup>70)</sup>は，一般的に用いられる既知のプロバイオティクスである *Lactobacillus* spp.や *Bifidobacterium* spp.は十分な歴史的背景を元に高

い安全性と栄養学的な機能を有していることから食品としてさらに広く用いられるのに対し，それらとは一線を画し，疾患特異的な「治療効果」を有する新たな菌種または菌株を，「次世代プロバイオティクス (New Generation Probiotics)」と表現している。これらは，米国FDAのガイダンスにおいてLBPという新領域として開発が進められている<sup>83)</sup>。この新たに制定されたレギュレーションでは，(1) 生菌 (細菌) を含み，(2) 疾病の予防や治療に用いられる，(3) ワクチンではない成分をLBPと指定し，これらは生物学的製剤としての規制を受けることを明確にしている。この点は，本邦の整腸剤に求められる規制とは大きく異なるため，日本初のLBPを世界に発信するためには産官学による研究開発の促進に加え，レギュレーションへ柔軟に対応できる体制も必要である。

## 3. 遺伝子組み換えプロバイオティクスの可能性

これまで述べてきたプロバイオティクスは細菌学的手法に基づき，健康人の常在細菌として，または環境中から分離された細菌そのものの有する機能を疾病の治療や宿主の恒常性の維持に応用することを

基本的な考え方としている。一方、そうした細菌のもつ生理活性ではなく、意図的に新たな生理活性をつくり出す、すなわち、ある種の細菌への遺伝子導入によって新たな機能をもたせる遺伝子組み換えプロバイオティクスの開発も進められている。その代表的な開発例を Table 6 に示した。いずれも、一般的な常在細菌に人の遺伝子を導入し、それらを生体内で発現させることで疾患の治療効果を期待する試みである。この技術には *Lactococcus lactis* をベクターとした検討が進められており、Motta ら<sup>86)</sup>は、炎症抑制を目的としてセリンプロテアーゼ阻害機能を有する elafin を発現する組み換え細菌を作成している。また、同菌種では、抗炎症活性のある IL-10 の発現系を導入された開発品も知られている<sup>87,88)</sup>。さらに、消化管に対する作用のみならず、腔内常在細菌の一菌種である *L. jensenii* に HIV の侵入を阻害する cyanovirin-N の合成遺伝子を導入した組み換えプロバイオティクスを作成し、これを経腔的に投与することで HIV 感染を予防する技術が開発されている<sup>33)</sup>。これらの遺伝子組み換え技術を応用したプロバイオティクスも将来的には広く開発されると考えられるが、遺伝子導入法や発現系の安定的な機能性等、さらなる検討を要すると考える。

#### おわりに

研究分野としてのマイクロバイオーーム/マイクロバイオータ領域は国内外において急速に発展しており、その方向性にはこれまで中心的に捉えられてきた消化管疾患から多方面、全身性の研究に移行しつつある。同時に、その疾患の予防や治療を目指すツールとして新たなプロバイオティクスの研究開発が始まっている。この世界的な流れの中で、わが国から発信されており標的領域をリードする研究もある。今後は研究段階から社会実装に向けて産官学のさらなる戦略的な取り組みが重要である。

#### 謝辞

本稿は、2017年4月6～8日に京王プラザホテルにて開催された第65回日本化学療法学会学術集会(草地信也総会長)、第91回日本感染症学会総会学術講演会(岩田敏総会長)合同学会における教育講演9「プロバイオティクス、臨床応用への新しい方向性」の講演に基づいて詳述したものである。本教

育講演の機会をいただいた草地信也総会長ならびに岩田敏総会長、座長の労をお取り計らいいただいた杏林大学保健学部田口晴彦教授に深謝するとともに、同講演を本誌の総説として発表することをご了承いただいた館田一博編集委員長のご高配に深く感謝する。

利益相反自己申告：著者はミヤリサン製薬株式会社の社員である。

#### 文献

- 1) The Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The Integrative Human Microbiome Project: Dynamic Analysis of Microbiome-Host Omics Profiles during Periods of Human Health and Disease. *Cell Host & Microbe* 2014; 16: 276-89
- 2) Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, et al: An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 834-41
- 3) Mandal R S, Saha S, Das S: Metagenomic surveys of gut microbiota. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2015; 13: 148-58
- 4) Fuller R: Probiotics. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 1986; 15: 1S-7S
- 5) Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault M C, Cummings J H, Franck A, Gibson G R, et al: Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 1998; 80 (Suppl 1): S147-71
- 6) Buford T W: (Dis)Trust your gut: the gut microbiome in age-related inflammation, health, and disease. *Microbiome* 2017; 5: 80
- 7) Garrett W S, Gallini C A, Yatsunencko T, Michaud M, DuBois A, Delaney M L, et al: *Enterobacteriaceae* act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell Host Microbe* 2010; 8: 292-300
- 8) Tana C, Umesaki Y, Imaoka A, Handa T, Kanazawa M, Fukudo S: Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 512-9, e114-5
- 9) Castellarin M, Warren R L, Freeman J D, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, et al: *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012; 22: 299-306
- 10) Robinson C J, Bohannon B J, Young V B: From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; 74: 453-76
- 11) Wang Z, Klipfell E, Bennett B J, Koeth R, Levison B S, Dugar B, et al: Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular

- disease. *Nature* 2011; 472: 57-63
- 12) Wong V W, Tse C H, Lam T T, Wong G L, Chim A M, Chu W C, et al: Molecular characterization of the fecal microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis—a longitudinal study. *PLoS One* 2013; 8: e62885
  - 13) Turnbaugh P J, Ley R E, Mahowald M A, Magrini V, Mardis E R, Gordon J I: An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444: 1027-31
  - 14) Aw W, Fukuda S: Understanding the role of the gut ecosystem in diabetes mellitus. *J Diabetes Investig* 2018; 9: 5-12
  - 15) Kato K, Nagao M, Miyamoto K, Oka K, Takahashi M, Yamamoto M, et al: Longitudinal Analysis of the Intestinal Microbiota in Liver Transplantation. *Transplant Direct* 2017; 3: e144
  - 16) Rowland I, Capurso L, Collins K, Cummings J, Delzenne N, Goulet O, et al: Current level of consensus on probiotic science—report of an expert meeting—London, 23 November 2009. *Gut Microbes* 2010; 1: 436-9
  - 17) Doron S, Snyderman D R: Risk and safety of probiotics. *Clin Infect Dis* 2015; 60 (Suppl 2): S129-34
  - 18) Tannock G W, Luchansky J B, Miller L, Connell H, Thode-Andersen S, Mercer A A, et al: Molecular characterization of a plasmid-borne (pGT633) erythromycin resistance determinant (ermGT) from *Lactobacillus reuteri* 100-63. *Plasmid* 1994; 31: 60-71
  - 19) Dessart S R, Steenson L R: High frequency intergeneric and intrgeneric conjugal transfer of drug resistance plasmids in *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. *J Dairy Sci* 1991; 74: 2912-9
  - 20) Morelli L, Sarra P G, Bottazzi V: *In vivo* transfer of pAM beta 1 from *Lactobacillus reuteri* to *Enterococcus faecalis*. *J Appl Bacteriol* 1988; 65: 371-5
  - 21) FAO/WHO Working Group: Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group, 30 April-1 May 2002, Ontario, Canada, 2002 [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf) (accessed June 2016)
  - 22) Barkay T, Smets B F: Horizontal gene flow in microbial communities. *ASM News* 2005; 71: 412-9
  - 23) Isa K, Oka K, Beauchamp N, Sato M, Wada K, Ohtani K, et al: Safety assessment of the *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588<sup>®</sup> probiotic strain including evaluation of antimicrobial sensitivity and presence of *Clostridium* toxin genes *in vitro* and teratogenicity *in vivo*. *Hum Exp Toxicol* 2016; 35: 818-32
  - 24) Gebhart D, Lok S, Clare S, Tomas M, Stares M, Scholl D, et al: A modified R-type bacteriocin specifically targeting *Clostridium difficile* prevents colonization of mice without affecting gut microbiota diversity. *MBio* 2015; 6: e02368-14
  - 25) Shoaie S, Ghaffari P, Kovatcheva-Datchary P, Mardinoglu A, Sen P, Pujos-Guillot E, et al: Quantifying Diet-Induced Metabolic Changes of the Human Gut Microbiome. *Cell Metab* 2015; 22: 320-31
  - 26) Burton J H, Johnson M, Johnson J, Hsia D S, Greenway F L, Heiman M L: Addition of a Gastrointestinal Microbiome Modulator to Metformin Improves Metformin Tolerance and Fasting Glucose Levels. *J Diabetes Sci Technol* 2015; 9: 808-14
  - 27) Orenstein R, Dubberke E, Hardi R, Ray A, Mullane K, Pardi D S, et al: Safety and Durability of RBX2660 (Microbiota Suspension) for Recurrent *Clostridium difficile* Infection: Results of the PUNCH CD Study. *Clin Infect Dis* 2016; 62: 596-602
  - 28) Savaiano D A, Ritter A J, Klaenhammer T R, James G M, Longcore A T, Chandler J R, et al: Improving lactose digestion and symptoms of lactose intolerance with a novel galactooligosaccharide (RP-G28): a randomized, double-blind clinical trial. *Nutr J* 2013; 12: 160
  - 29) Lagier J C, Cadoret F, Raoult D: Critical Microbiological View of SER-109. *J Infect Dis* 2017; 215: 161-2
  - 30) Martin J, Wilcox M: New and emerging therapies for *Clostridium difficile* infection. *Curr Opin Infect Dis* 2016; 29: 546-54
  - 31) Muskal S M, Sliman J, Kokai-Kun J, Pimentel M, Wacher V, Gottlieb K: Lovastatin lactone may improve irritable bowel syndrome with constipation (IBS-C) by inhibiting enzymes in the archaeal methanogenesis pathway. *Version 3. F1000Res* 2016; 5: 606
  - 32) Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Naganoya Y, Nishikawa H, et al: Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 2013; 500: 232-6
  - 33) Lagenaur L A, Swedek I, Lee P P, Parks T P: Robust vaginal colonization of macaques with a novel vaginally disintegrating tablet containing a live biotherapeutic product to prevent HIV infection in women. *PLoS One* 2015; 10: e0122730
  - 34) Dong J, Teng G, Wei T, Gao W, Wang H: Methodological Quality Assessment of Meta-Analyses and Systematic Reviews of Probiotics in Inflammatory Bowel Disease and Pouchitis. *PLoS One* 2016; 11: e0168785
  - 35) Round J L, Mazmanian S K: Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 12204-9
  - 36) Franzosa E A, Hsu T, Sirota-Madi A, Shafquat A, Abu-Ali G, Morgan X C, et al: Sequencing and beyond: integrating molecular 'omics' for microbial community profiling. *Nat Rev Microbiol* 2015; 13: 360-72
  - 37) Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al: *Bifidobacteria* can pro-

- tect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 2011; 469: 543-7
- 38) Kamada N, Kim Y G, Sham H P, Vallance B A, Puente J L, Martens E C, et al: Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science* 2012; 336: 1325-9
  - 39) van Baarlen P, Troost F, van der Meer C, Hooiveld G, Boekschoten M, Brummer R J, et al: Human mucosal *in vivo* transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108 (Suppl 1): 4562-9
  - 40) Guandalini S, Pensabene L, Zikri M A, Dias J A, Casali L G, Hoekstra H, et al: *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 54-60
  - 41) Allen S J, Martinez E G, Gregorio G V, Dans L F: Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 11: CD003048
  - 42) McFarland L V: Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and treatment. *Future Microbiol* 2008; 3: 563-78
  - 43) Lessa F C, Winston L G, McDonald L C; Emerging Infections Program *C. difficile* Surveillance Team: Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *N Engl J Med* 2015; 372: 2369-70
  - 44) Ritchie M L, Romanuk T N: A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. *PLoS One* 2012; 7: e34938
  - 45) Seki H, Shiohara M, Matsumura T, Miyagawa N, Tanaka M, Komiyama A, et al: Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI. *Pediatr Int* 2003; 45: 86-90
  - 46) Cohen S H, Gerding D N, Johnson S, Kelly C P, Loo V G, McDonald L C, et al: Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31: 431-55
  - 47) Crobach M J, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer E M, Dekkers O M, et al: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22 (Suppl 4): S63-81
  - 48) Gorbach S L, Chang T W, Goldin B R: Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *Lancet* 1987; 2: 1519
  - 49) Shen N T, Maw A, Tmanova L L, Pino A, Ancy K, Crawford C V, et al: Timely Use of Probiotics in Hospitalized Adults Prevents *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review With Meta-Regression Analysis. *Gastroenterology* 2017; 152: 1889-1900.e9
  - 50) 黒岩豊秋, 岩永正明, 小張一峰, 東恩納厚, 金城福則, 齊藤 厚: 抗菌剤投与後の *Clostridium difficile* 検出に対する生菌性整腸剤の併用について. *感染症誌* 1990; 64: 1425-32
  - 51) Kelly C R, Kahn S, Kashyap P, Laine L, Rubin D, Atreja A, et al: Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook. *Gastroenterology* 2015; 149: 223-37
  - 52) van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal E G, de Vos W M, et al: Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013; 368: 407-15
  - 53) Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, Rajilić-Stojanović M, Kump P, Satokari R, et al: European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* 2017; 66: 569-80
  - 54) De Leon L M, Watson J B, Kelly C R: Transient flare of ulcerative colitis after fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11: 1036-8
  - 55) Hayashi A, Sato T, Kamada N, Mikami Y, Matsuoka K, Hisamatsu T, et al: A single strain of *Clostridium butyricum* induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. *Cell Host Microbe* 2013; 13: 711-22
  - 56) Kashiwagi I, Morita R, Schichita T, Komai K, Saeki K, Matsumoto M, et al: Smad2 and Smad3 Inversely Regulate TGF- $\beta$  Autoinduction in *Clostridium butyricum*-Activated Dendritic Cells. *Immunity* 2015; 43: 65-79
  - 57) Malchow H A: Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol* 1997; 25: 653-8
  - 58) Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni P A: *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1462-4
  - 59) Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, Johansson R, Zucconi E, Brigidi P, et al: Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 1103-8
  - 60) Hashimoto T, Itabashi M, Ogawa S, Hiroswa T, Bamba Y, Kaji S, et al: Treatment strategy for preventing pouchitis as a postoperative complication of ulcerative colitis: the significance of the management of cuffitis. *Surg Today* 2014; 44: 1730-4
  - 61) Mimura T, Rizzello F, Helwig U, Poggioli G, Schreiber S, Talbot IC, et al: Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 2004; 53: 108-14
  - 62) Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, et al: Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-

- controlled trial. *Gastroenterology* 2000; 119: 305-9
- 63) Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers K M, Brigidi P, et al: Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2003; 124: 1202-9
- 64) Yasueda A, Mizushima T, Nezu R, Sumi R, Tanaka M, Nishimura J, et al: The effect of *Clostridium butyricum* MIYAIRI on the prevention of pouchitis and alteration of the microbiota profile in patients with ulcerative colitis. *Surg Today* 2016; 46: 939-49
- 65) Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E: Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357: 1076-9
- 66) Rautava S, Kalliomäki M, Isolauri E: Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 119-21
- 67) Pelucchi C, Chatenoud L, Turati F, Galeone C, Moja L, Bach J F, et al: Probiotics supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis. *Epidemiology* 2012; 23: 402-14
- 68) Singh S, Stroud A M, Holubar S D, Sandborn W J, Pardi D S: Treatment and prevention of pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; 11: CD001176
- 69) Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson G R, Merenstein D J, Pot B, 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* 2014; 11: 506-14
- 70) O'Toole P W, Marchesi J R, Hill C: Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol* 2017; 2: 17057
- 71) Ulsemer P, Toutounian K, Kressel G, Goletz C, Schmidt J, Karsten U, et al: Impact of oral consumption of heat-treated *Bacteroides xylanisolvens* DSM 23964 on the level of natural TF $\alpha$ -specific antibodies in human adults. *Benef Microbes* 2016; 7: 485-500
- 72) Ulsemer P, Henderson G, Toutounian K, Löffler A, Schmidt J, Karsten U, et al: Specific humoral immune response to the Thomsen-Friedenreich tumor antigen (CD176) in mice after vaccination with the commensal bacterium *Bacteroides ovatus* D-6. *Cancer Immunol Immunother* 2013; 62: 875-87
- 73) Gérard P, Lepercq P, Leclerc M, Gavini F, Raibaud P, Juste C: *Bacteroides* sp. strain D8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 5742-9
- 74) Deng H, Li Z, Tan Y, Guo Z, Liu Y, Wang Y, et al: A novel strain of *Bacteroides fragilis* enhances phagocytosis and polarises M1 macrophages. *Sci Rep* 2016; 6: 29401
- 75) Yanagibashi T, Hosono A, Oyama A, Tsuda M, Suzuki A, Hachimura S, et al: IgA production in the large intestine is modulated by a different mechanism than in the small intestine: *Bacteroides acidifaciens* promotes IgA production in the large intestine by inducing germinal center formation and increasing the number of IgA+ B cells. *Immunobiology* 2013; 218: 645-51
- 76) Kamiya S, Taguchi H, Yamaguchi H, Osaki T, Takahashi M, Nakamura S: Bacterioprophyllaxis using *Clostridium butyricum* for lethal caecitis by *Clostridium difficile* in gnotobiotic mice. *Rev Med Microbiol* 1997; 8 (SUPPL1): s57-9
- 77) Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, Osaki T, Komatsu A, Kamiya S: The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 41: 219-26
- 78) Weng H, Endo K, Li J, Kito N, Iwai N: Induction of peroxisomes by butyrate-producing probiotics. *PLoS ONE* 2015; 10: e0117851
- 79) Simonyte Sjödin K, Vidman L, Rydén P, West C E: Emerging evidence of the role of gut microbiota in the development of allergic diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2016; 16: 390-5
- 80) Song H, Yoo Y, Hwang J, Na Y C, Kim H S: *Faecalibacterium prausnitzii* subspecies-level dysbiosis in the human gut microbiome underlying atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137: 852-60
- 81) Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk J P, Druart C, Bindels L B, et al: Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 9066-71
- 82) El Hage R, Hernandez-Sanabria E, Van de Wiele T: Emerging Trends in "Smart Probiotics": Functional Consideration for the Development of Novel Health and Industrial Applications. *Front Microbiol* 2017; 8: 1889
- 83) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration: Early Clinical Trials with Live Biotherapeutic Products: Chemistry, Manufacturing, and Control Information. Guidance for Industry. 2016 <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/General/UCM292704.pdf> (accessed June 2016)
- 84) Hamady Z Z, Scott N, Farrar M D, Lodge J P, Holland K T, Whitehead T, et al: Xylan-regulated delivery of human keratinocyte growth factor-2 to the inflamed colon by the human anaerobic commensal bacterium *Bacteroides ovatus*. *Gut* 2010; 59: 461-9
- 85) Hamady Z Z, Scott N, Farrar M D, Wadhwa M, Dilger P, Whitehead T R, et al: Treatment of colitis with a commensal gut bacterium engi-

- neered to secrete human TGF- $\beta$ 1 under the control of dietary xylan I. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 1925-35
- 86) Motta J P, Bermúdez-Humarán L G, Deraison C, Martin L, Rolland C, Rousset P, et al: Food-grade bacteria expressing elafin protect against inflammation and restore colon homeostasis. *Sci Transl Med* 2012; 4: 158ra144
- 87) Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeier F, Falk W: Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000; 289: 1352-5
- 88) Robert S, Steidler L: Recombinant *Lactococcus lactis* can make the difference in antigen-specific immune tolerance induction, the Type 1 Diabetes case. *Microb Cell Fact* 2014; 13 (Suppl 1): S11

## Probiotics—new era of research and development—

Motomichi Takahashi

Tokyo R&D center, Miyarisan Pharmaceutical Co., Ltd.

It has become widely known that the interaction between normal microbiota and the human biological function is essential for homeostasis. Metagenomics studies have demonstrated that the microbiota influences several human diseases due to its dysbiosis. In fact, microbiota may even offer targets for drugs that help to counter diseases such as gastrointestinal disorders (inflammatory bowel diseases, *Clostridium difficile* infection, irritable bowel syndrome, etc.) as well as other systematic diseases such as obesity, allergy, diabetes and so on.

Probiotics are defined as “live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” and have a long history of use in the food/feed chain or pharmaceutical materials. The probiotic organisms that feature in these products have been sourced from the intestinal tract or from soil and traditional fermented foods.

The results of the research into the composition and function of human microbiota by OMICS analysis with deep sequencing, metabolomics and transcriptomics showed a dramatic extension of the range of organisms with potential health benefits.

In this article, I would summarize current topics of the use of probiotic organisms in the treatment or prevention of several diseases related to dysbiosis and then introduce a potential future research and development pathway/strategy for live microorganism products.