

ビフィズス菌 Bifidobacterium longum BB536による免疫調節作用とその作用機序

誌名	ミルクサイエンス = Milk science
ISSN	13430289
著者名	岩淵, 紀介 清水, 金忠
発行元	日本酪農科学会
巻/号	59巻3号
掲載ページ	p. 275-281
発行年月	2010年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



平成22年度日本酪農科学会奨励賞 受賞記念総説

ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* BB536 による 免疫調節作用とその作用機序

岩淵 紀介*・清水(肖)金忠

(森永乳業株式会社 食品基盤研究所, 神奈川県座間市東原 5-1-83 228-8583)

Immuno-modulating effects of *Bifidobacterium longum* BB536 and the mechanisms

Noriyuki Iwabuchi and Kanetada Shimizu (JZ Xiao)

(Food Science and Technology Institute, Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Zama, Kanagawa, 228-8583, Japan)

1. はじめに

ヒトの腸の表面積は 400 m² でテニスコート 2 面分に相当する広さであり, そこに生息する腸内細菌は 400 種以上, 数百兆個とされている。ヒト腸管の免疫担当細胞数は 2000 億個, 全末梢リンパ球の 60~70% とされ, パイエル板などを介して腸内細菌と常に接触し, 宿主の免疫系は腸内細菌から強い影響を受けていると考えられている。また, 細菌やウイルスなどの構成成分を認識する Toll 様受容体 (以下 TLR) が発見され, 微生物の構成成分が T 細胞の分化に影響することが明らかになったこと¹⁾, 腸内細菌が宿主の免疫系に影響を及ぼすことは広く受け入れられつつある。このことから, ビフィズス菌や乳酸菌といったプロバイオティクスによるアレルギー予防効果や感染防御効果, 抗腫瘍効果といった様々な免疫調節作用が, 臨床試験や動物試験などで多数検証されている。

プロバイオティクスは「適正な量を摂取した時に, 宿主に有益な生理作用をもたらす微生物」と定義され (FAO/WHO, 2002), ビフィズス菌は乳酸菌と並んで, 発酵乳などの形態でプロバイオティクスとして利用されている。ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* BB536 (以下 BB536) は乳児の糞便から分離した菌株で, 酸素や酸に対して耐性を持ち, 高い安全性が証明され, 世界中の多くの国でヨーグルトやサプリメント, 育児用粉ミルクに利用されているビフィズス菌である。これまでに整腸作用や免疫調節作用など多くの生理調節機能を有す

ることが明らかにされ, プロバイオティクスとしての高い価値が認められている (Fig. 1)。本稿では, 著者らが行ってきた BB536 の研究結果を中心に, ビフィズス菌によるインフルエンザウイルス感染予防効果や抗アレルギー効果およびその作用機序に関する近年の研究結果について紹介する。

2. ビフィズス菌によるインフルエンザウイルス感染予防効果

一部の乳酸菌・ビフィズス菌の菌体では, 細胞性免疫を賦活するなどして抗腫瘍効果を示すことや, 腸管や呼吸器などの粘膜からの IgA の分泌を亢進させ, 様々な感染症に対する防御作用を示すものがあることが報告されている²⁾。インフルエンザウイルスの感染防御効果については, ビフィズス菌 *Bifidobacterium breve* をインフルエンザウイルスの経口免疫時にマウスに投与すると, 経口免疫によって誘導される血中抗インフルエンザウイ



Fig. 1 Physiological effects of *Bifidobacterium longum* BB536

* 連絡者: 岩淵紀介
(Fax: 046-252-3055, E-mail: n-iwabuchi@morinagamilk.co.jp)

2010年11月1日 受付
2010年11月25日 受理

ルスIgG抗体が効果的に誘導され、感染による生存率が改善されることが示されている³⁾。ここでは、ビフィズス菌BB536によるインフルエンザウイルス感染予防効果を検証した結果について述べる。

(1) ビフィズス菌BB536摂取による高齢者のインフルエンザ感染予防効果

インフルエンザウイルス感染は、高齢者のような免疫機能が低下した人で重篤化することが知られている。65歳以上の高齢者を対象にインフルエンザ感染におけるビフィズス菌BB536投与の効果を検証した試験⁴⁾では、プラセボ群に比べてBB536投与群で14週間の観察期間中のインフルエンザ発症者数と38°C以上の発熱者数が有意に減少した。また、BB536投与によってNK細胞活性と好中球殺菌能が有意に上昇したことから、BB536は細胞性免疫を活性化することでインフルエンザ感染を予防することが示唆されている。

(2) ビフィズス菌BB536のマウス経口投与によるインフルエンザウイルス感染予防効果

BB536の経口投与によるインフルエンザウイルス感染予防効果を、マウスを用いて検証した。マウスにBB536 (2×10^9 cfu/day) または生理食塩水を14日間経口投与した後、インフルエンザウイルス (A/PR8/34 (H1N1)) を鼻腔より感染させた。感染後の発症状態を動物の一般状態をスコア化することで評価したところ、BB536投与群で症状スコアの悪化が改善された。感染6日後の感染による体重減少と肺中ウイルス濃度と調べたところ、BB536投与群で体重減少が有意に改善され、肺中のウイルス濃度も有意に低値を示した。また、感染6日後の肺を摘出し肺の組織切片を作製し病理組織学的な評価を行ったところ、BB536投与群で病変の程度が軽度であった。これらの結果から、BB536の経口摂取は、肺でのインフルエンザウイルスの増殖を抑制し、感染による症状の悪化を軽減することが考えられた。

(3) ビフィズス菌BB536の鼻腔内投与がインフルエンザウイルス感染モデルマウスに及ぼす影響

インフルエンザウイルス感染に対するBB536の作用をさらに調べるために、インフルエンザウイルス感染モデルマウスに対してBB536の鼻腔内投与試験を行った⁵⁾。マウスに、生理リン酸緩衝液(コントロール群)またはBB536加熱死菌体(BB536投与群)を鼻腔内に200 μ g/mouse/dayの用量で3日間投与した。その後、インフルエンザウイルス(PR8株(H1N1))を経鼻接種し、3日後に生理リン酸緩衝液でウイルスを下気道に押し流すことで下気道を感染させ、発症率および生残率を観察した。その結果、コントロール群と比べて

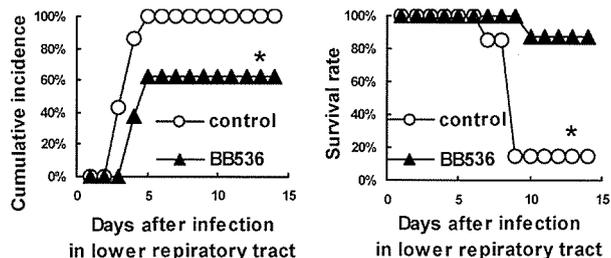


Fig. 2 Reduction of morbidity and mortality due to influenza virus infection in mice administrated *Bifidobacterium longum* BB536 intranasally⁵⁾. *, significant difference between the groups by Log Rank test at $p < 0.05$.

BB536群で、累積発症率が減少する傾向がみられ、生存率の有意な上昇が認められた (Fig. 2)。

3. ビフィズス菌BB536による花粉症症状改善効果

近年、先進諸国を中心にアレルギー疾患の増加が大きな社会問題となっており、その原因の1つとして「衛生仮説」が提唱されている。衛生仮説は、1989年にイギリスのStrachan博士によってアレルギー体質の子供を対象とした疫学調査をもとに提唱された「衛生環境の改善による感染症リスクの低下がアレルギー増加の一因ではないか」というものである⁶⁾。これまでに腸内細菌叢とアレルギー発症との関連を、いくつかの研究が示唆している^{7,8)}。乳酸菌やビフィズス菌の経口摂取によるアレルギーの予防および治療に関する試みが行われてきた。ここでは、著者らが行ったBB536摂取による花粉症症状改善効果に関する臨床試験の結果について述べる。

(1) 花粉シーズンでのビフィズス菌BB536摂取による花粉症症状緩和作用

スギ花粉症はスギ花粉によって引起されるImmunoglobulin E(以下IgE)が関与するI型のアレルギー疾患で、日本人の約26.5%が罹患する。著者らは複数の臨床試験において、BB536含有ヨーグルトまたはBB536菌末の摂取が花粉症症状の改善に有効であることを示している⁹⁻¹¹⁾。大量に花粉が飛散した2005年春のスギ花粉飛散シーズンに実施した試験¹⁰⁾では、スギ花粉症者44名を2群に分け、花粉飛散開始前から13週間にわたってBB536粉末(菌数1000億/日)またはプラセボ粉末を摂取させた。その結果、症状の悪化により試験を早期離脱した被験者は、プラセボ粉末摂取群では22名中9名(40.9%)だったのに対し、BB536粉末摂取群では22名中2名(9.1%)と有意に少なかった。また、BB536摂取群はプラセボ群と比較して、くしゃ

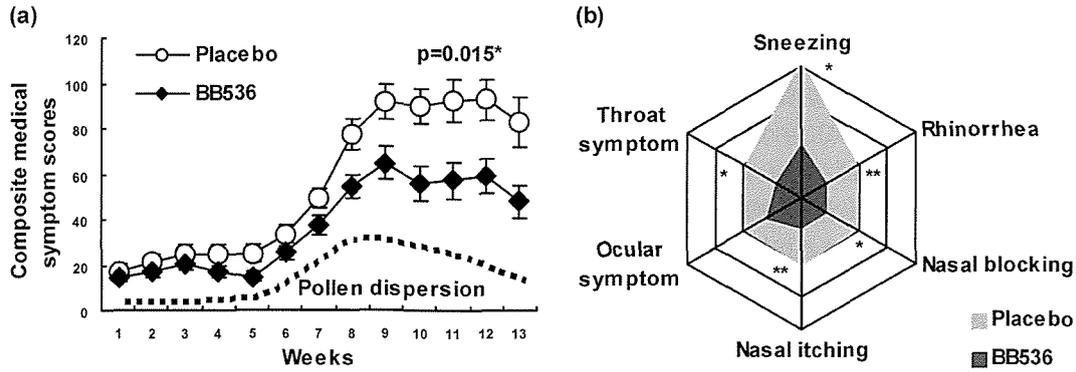


Fig. 3 Effects of *Bifidobacterium longum* BB536 intake on the symptoms of Japanese cedar pollinosis¹⁰⁾. (a) Composite medical symptom scores calculated by summing the weekly total symptom scores for sneezing, rhinorrhea, nasal blockage, nasal itching, eye symptoms and throat symptoms recorded during the pollen season. p value: Two way repeated ANOVA, 5~13 wk, BB536 vs placebo. (b) Area-under-the-curve (AUC) of each individual medical symptom score. *p < 0.05, **p < 0.01, Mann-Whitney U-test, BB536 vs placebo.

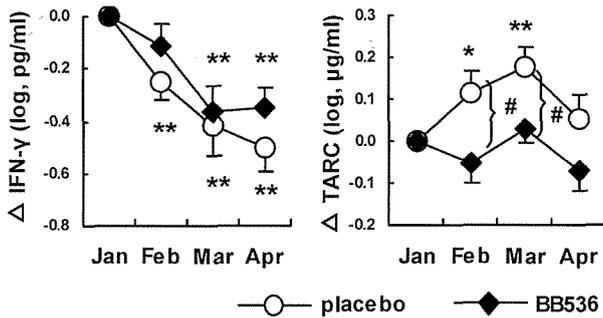


Fig. 4 Effects of *Bifidobacterium longum* BB536 intake on changes in blood parameters of Japanese cedar pollinosis subjects¹⁰⁾. *p < 0.05, **p < 0.01, compared with baseline by Wilcoxon test; # p < 0.05, difference between BB536 and placebo groups, Mann-Whitney U-test.

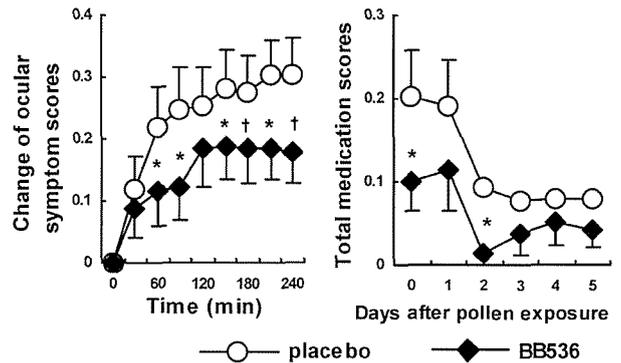


Fig. 5 Effects of *Bifidobacterium longum* BB536 intake on ocular symptom scores during pollen exposure and total medication scores after pollen exposure in the environmental exposure unit¹¹⁾. Total medication scores are the sum of scores for oral medicines, nasal sprays and eye drops. † p < 0.1, *p < 0.05, difference between groups, Wilcoxon signed rank test.

み、水性鼻汁、鼻閉などの自覚症状とそれらの総症状スコアが有意に改善された (Fig. 3)。花粉飛散に伴って、血中 Th1 マーカーである γ interferon (以下 IFN- γ) は著しく減少し、Th2 マーカーである Thymus- and activation-regulated chemokines (以下 TARC) は顕著に上昇していたが、BB536 摂取群では、IFN- γ の減少緩和と、TARC の上昇抑制が認められ (Fig. 4)、血中好酸球比やスギ花粉特異的 IgE の上昇も抑制される傾向を示した。これらの結果は、BB536 の摂取は花粉飛散に伴って生じる体内免疫バランスの歪みを抑制することで、花粉症の自覚症状を改善することを示唆している。

(2) 非花粉シーズンでのビフィズス菌 BB536 摂取試験による花粉症発症予防作用

さらに、花粉飛散量などの影響を受けずに厳密な評価を行うため、非花粉シーズンにて花粉曝露室を利用した試験を行った¹¹⁾。クロスオーバー試験方式で4週間に

わたって BB536 粉末またはプラセボ粉末を摂取した後に花粉曝露試験を行った。その結果、花粉曝露によって発現する目の症状が BB536 摂取群で抑制され (Fig. 5)、帰宅後におこる遅発相の症状も抑制した。さらに、レスキュー薬として帰宅時に渡した第2世代抗ヒスタミン薬、局所ステロイド薬、化学伝達物質遊離抑制薬の点眼薬などの各種の薬剤使用の Medication スコアが有意に低下していた (Fig. 5)。

4. ビフィズス菌 BB536 による免疫調節作用の作用機序

摂取したプロバイオティクスは腸管においてどのように免疫調節作用を発揮するのであろうか？ 腸管での免疫に関わる組織としては、腸管上皮や粘膜固有層ほか

に、パイエル板や腸間膜リンパ節などからなる腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue, GALT) と総称される免疫組織が挙げられる。摂取されたプロバイオティクスは様々な経路によってこれらの免疫器官に作用すると考えられる。たとえば、パイエル板のM細胞は管腔側の細菌を取込み、取込まれた細菌はパイエル板に存在する樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞に作用する¹²⁾。また、腸管上皮下の粘膜固有層に存在する樹状細胞は、腸管上皮細胞間のタイトジャンクションを開き樹状突起を管腔側に伸ばすことで、直接管腔内の細菌をサンプリングする¹³⁾。摂取されたプロバイオティクスはこのような経路を通じて宿主の免疫系に影響を及ぼすと考えられ、ほかにも腸管を通過する際に、菌やその菌体成分、または菌の代謝産物が腸管上皮細胞に作用することが考えられる。また、摂取されたプロバイオティクスは、ほとんどの場合、腸管に棲みつかず一時的な定着に限定されるとされるが、それによる腸内細菌叢への影響が間接的に免疫調節作用を発揮すると考えられる。ここではこれまで報告されているビフィズス菌の抗アレルギー作用の作用機序について述べる。

(1) ビフィズス菌 BB536 による免疫賦活作用

マウスに、生理リン酸緩衝液 (コントロール群) または BB536 加熱死菌体 (BB536 投与群) を鼻腔内に 200 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ の用量で 3 日間投与した後に、鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT) と縦隔膜リンパ組織 (MLN) を採取し、調製した細胞をコンカナバリン A 存在下で 3 日間培養し、培養上清のサイトカインを測定したところ、NALT の細胞からの IFN- γ の産生と MLN の細胞からの IL-12p40 の産生が BB536 群で有意に高かった (Fig. 6)。これらの結果から、BB536 は呼吸器粘膜に関

連したリンパ組織である NALT や MLN の細胞性免疫を賦活化し、インフルエンザウイルス感染を防御したと考えられた⁵⁾。さらに、ヒト試験においても、BB536 投与によって NK 細胞活性と好中球殺菌能が有意に上昇したことが観察され、BB536 は細胞性免疫を活性化することでインフルエンザ感染を予防することが示唆されている⁴⁾。

(2) ビフィズス菌 BB536 による Th2 反応抑制作用

プロバイオティクスがアレルギーを抑制する機序として、プロバイオティク細菌の菌体が IL (Interleukin)-12 といった Th1 免疫反応を誘導するサイトカインを誘導し、Th2 免疫反応と IgE の産生を抑制することが報告されている¹⁴⁾。我々は *Lactobacillus* などの乳酸菌 17 株と BB536 を含むビフィズス菌 15 株の Th1 誘導能を、マウス脾細胞から産生される IL-12 を指標に調べたところ、BB536 を含むビフィズス菌各菌株は乳酸菌より IL-12 誘導能が低いことがわかった (Fig. 7a)。一方、

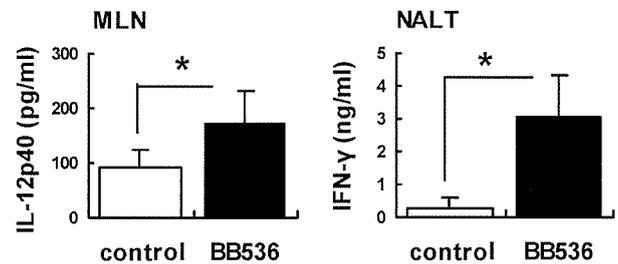


Fig. 6 Effects of intranasal administration of *Bifidobacterium longum* BB536 on cytokine production by cells of mediastinal lymph nodes (MLN) and nasal-associated lymphoid tissue (NALT)⁵⁾. *, significant difference by Student's t-test at (p) < 0.05.

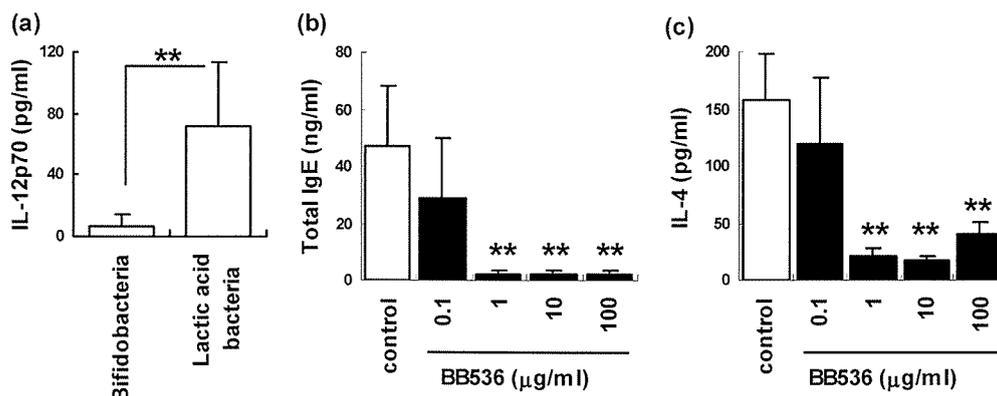


Fig. 7 Effects of bifidobacteria on cytokine production¹⁵⁾. (a) Murine splenocytes were cultured with 15 strains of bifidobacteria or 17 strains of lactic acid bacteria except bifidobacteria and the levels of IL-12 in supernatants were measured. The mean value of *Bifidobacterium* strains and the strains of lactic acid bacteria and the standard deviation of each group. **p < 0.01, Mann-Whitney U tests. (b, c) Suppressive effects of *Bifidobacterium longum* BB536 on IgE and IL-4 production by splenocytes from OVA-sensitized mice. **p < 0.01, ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test.

OVAで抗原感作したマウスの脾細胞を用いた *in vitro* 試験では、BB536菌体は抗原刺激によって細胞から誘導されるIgEとTh2サイトカインであるIL-4を抑制し (Fig. 7b, c), 抗Th1サイトカイン抗体を添加した中和実験でもBB536はIgEとIL-4の産生を抑制した。また、OVA存在下でBB536と共に培養したマウス骨髄由来樹状細胞を、OVA感作マウスのT細胞と共培養したところ、T細胞から産生されるIL-4は抑制された。これらの結果から、BB536はTh1サイトカインを介さずに、抗原提示細胞を介してIgE産生およびTh2免疫反応を抑制することが示唆された¹⁵⁾。

また、2005年の花粉症のヒト臨床試験では、BB536の摂取によって花粉飛散に伴う血中TARCの上昇が抑制された¹⁰⁾ (Fig. 4)。TARCはTh2細胞を特異的に誘引する遊走化因子 (Th2ケモカイン) で、TARCの他にMDC (macrophage-derived chemokine) といったケモカインが知られている。これらのTh2ケモカインの血中濃度は、アトピー性皮膚炎や喘息といったアレルギー性疾患の症状重篤度に強い相関があることが報告されている¹⁶⁾。また、アレルギー性喘息のモデルマウスを用いた実験では、TARC中和抗体の投与により症状が軽減されることから、症状の重篤化にTh2ケモカインが関与していることが示唆されている¹⁷⁾。BB536のTh2ケモカイン抑制作用を、マウス脾細胞を用いて検討したところ、BB536菌体は抗原提示細胞がT細胞との相互作用で産生するTh2ケモカインを抑制することが確認された¹⁸⁾ (Fig. 8)。アレルギー性疾患の炎症部位では種々のリンパ球の浸潤・集積がみられ、これらの集積した細胞同士の相互作用によって症状が進行すると考えられる。このことから、BB536は免疫担当細胞同士の相互作用で産生されるTh2ケモカインを抑制することで、炎症部位でのTh2細胞の浸潤・集積を緩和しTh2反応を抑制していることが推察された。

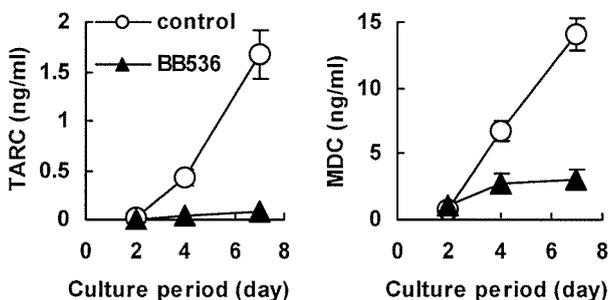


Fig. 8 *Bifidobacterium longum* BB536 suppresses the production of Th2-attracting chemokines by splenocytes¹⁸⁾. Splenocytes were cultured with or without (control) 1 μ g/ml of BB536 and the levels of Th2-attracting chemokines in supernatants after indicated periods were measured.

(3) ビフィズス菌 BB536 による免疫調節作用に関する菌体成分

ビフィズス菌の細胞壁は、TLR2のリガンドであるペプチドグリカンやリポテイコ酸などから構成されていることから、我々はBB536の細胞壁成分の免疫調節作用を検討した。BB536菌体を超音波破碎し、菌体成分によるOVA感作マウスの脾細胞に対するIgEとサイトカイン産生への影響を調べた。その結果、破碎菌体と細胞壁成分では、未破碎菌体と比べてTh1サイトカインの産生が減少したが、IgEとIL-4の産生を抑制したことから、その効果の一部に細胞壁成分が関与することが示唆された¹⁵⁾。

また近年、外来微生物のDNAを認識するToll様受容体 (TLR9) が免疫担当細胞上に発現していることが明らかにされたことにより、プロバイオティクスにおいてもDNA成分の免疫調節作用に関する研究が注目されている^{19,20)}。我々はBB536のゲノムDNAから免疫刺激性配列の検索を行い、マウス脾細胞刺激性とTh1サイトカインを誘導するDNA配列BL07を見出した。この配列は、*in vitro*ではOVA感作マウス脾細胞からのIgE産生を有意に抑制し、Th1サイトカインであるIFN- γ およびIL-12を誘導した²¹⁾。マウスへの投与実験では、皮下および経口投与ともに、抗原特異的IgE産生を有意に抑制し、抗アレルギー作用が示唆されている^{22,23)}。これらの結果から、BB536の細胞壁成分および細胞内DNA成分に免疫を調節する作用があることが示された。

(4) ビフィズス菌 BB536 の腸内菌叢を介した免疫調節作用

前述の通り、腸内細菌は宿主の免疫系に強い影響を及ぼすと考えられている。我々はBB536の強い整腸作用がアレルギー症状の緩和に関与しているのではないかと推測し、BB536の花粉症に対する有効性を検証した臨床試験において、花粉症患者の腸内細菌叢の動態を解析した。試験期間中、BB536の摂取によりBifidobacteriaなどの菌数にも変化が認められたが、ヒト腸管内の優勢菌種である *Bacteroides fragilis* group に大きな変動が認められた^{24,25)}。このグループに属する菌種は、スギ花粉の飛散前には大きな変化を示さなかったが、飛散末期には際立った占有率の上昇が観察された (Fig. 9)。同時期に解析した健常者には、同様の特徴的な変動は認められなかった。さらに、花粉飛散末期の *Bacteroides fragilis* group 占有率と、自覚症状及び血中のスギ花粉特異的IgEとの間に正の相関が認められたことから、腸内細菌叢のアンバランスとアレルギー発症との関連が示唆された²⁵⁾。

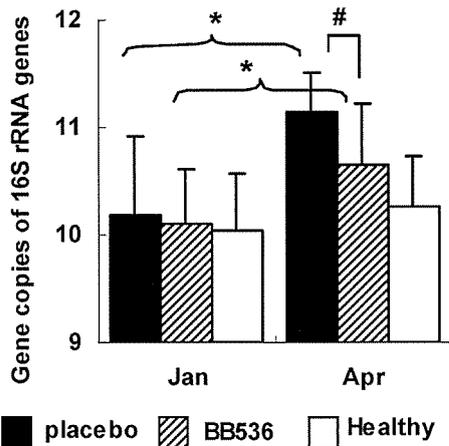


Fig. 9. Fluctuation of *Bacteroides fragilis* group in fecal microbiota before and after the pollen season and the effects of BB536 intake²⁵⁾. * $p < 0.05$, Wilcoxon signed rank test, # $p < 0.05$, Mann-Whitney U-test.

5. おわりに

これまでに、ビフィズス菌には整腸作用や免疫調節作用など多くの生理機能があることが明らかにされ、健康維持に重要な役割を果たしていると考えられている。特に近年、腸内細菌と様々な疾病との関連が明らかになるにつれて、ビフィズス菌による免疫調節作用や脂質代謝改善作用など整腸作用以外の作用への関心が高まっている。本稿で紹介したBB536の花粉症改善作用に関する研究結果からは、ビフィズス菌による免疫調節作用は、菌体による直接的な免疫調節作用および腸内細菌叢を介した間接的な免疫調節作用によってもたらされるのではないかと考えられた。また、ビフィズス菌が腸内細菌の代謝産物や腸管上皮細胞に影響を及ぼすことで生理機能を発揮することも報告され、様々な作用が複合的に作用して効果を示すことが考えられる。今後、ビフィズス菌の生理機能が様々な観点から検証されることで、多くの人々にその有用性がさらに認識され、実生活の中で利用され普及することを期待する。

謝辞

本稿で紹介したビフィズス菌BB536に関する研究は、元日本赤十字社和歌山医療センター耳鼻咽喉科部長榎本雅夫先生、とがしクリニック院長富樫秀生先生、東北大学大学院農学研究科齋藤忠夫教授、北澤春樹准教授、東京大学大学院農学生命科学研究科八村敏志准教授、信州大学大学院農学研究科保井久子教授のご指導、ご協力をいただいで実施したものであり、皆様に深く御

礼申し上げます。

引用文献

- 1) Kaisho, T., and Akira, S.: Toll-like receptor function and signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **117**, 979-987 (2006)
- 2) 細野明義:「発酵乳の科学」, アイ・ケイコーポレーション, 神奈川, pp. 141-147 (2002)
- 3) Yasui, H., Kiyoshima, J., Hori, T., and Shida, K.: Protection against influenza virus infection of mice fed *Bifidobacterium breve* YIT4064. *Clin Diagn Lab Immunol.*, **6**, 186-192 (1999)
- 4) Namba, K., Hatano, M., Yaeshima, T., Takase, M., and Suzuki, K.: Effects of *Bifidobacterium longum* BB536 administration on influenza infection, influenza vaccine antibody titer, and cell-mediated immunity in the elderly. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **74**, 939-945 (2010)
- 5) 岩淵紀介, 蛭田直幸, 清水金忠, 八重島智子, 岩附慧二, 保井久子: *Bifidobacterium longum* BB536の鼻腔内投与がマウスの気道の粘膜免疫とインフルエンザウイルスの感染に及ぼす影響。ミルクサイエンス, **58**, 129-133 (2009)
- 6) Strachan, D. P.: Hay fever, hygiene, and household size. *Br. Med. J.*, **299**, 1259-1260 (1989)
- 7) Björkstén, B., Naaber, P., Sepp, E., and Mikelsaar, M.: The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin. Exp. Allergy*, **29**, 342-346 (1999)
- 8) Björkstén, B., Sepp, E., Julge, K., Voor, T., and Mikelsaar, M.: Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **108**, 516-520 (2001)
- 9) Xiao, J. Z., Kondo, S., Yanagisawa, N., Takahashi, N., Odamaki, T., Iwabuchi, N., Iwatsuki, K., Kokubo, S., Togashi, H., Enomoto, K., and Enomoto, T.: Effect of Probiotic *Bifidobacterium longum* BB536 in relieving clinical symptoms and modulating plasma cytokine levels of Japanese cedar pollinosis during the pollen season, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, **16**, 86-93 (2006)
- 10) Xiao, J. Z., Kondo, S., Yanagisawa, N., Takahashi, N., Odamaki, T., Iwabuchi, N., Miyaji, K., Iwatsuki, K., Togashi, H., Enomoto, K., and Enomoto, T.: Probiotics in the treatment of Japanese cedar pollinosis: a double-blind placebo-controlled trial,

- Clin. Exp. Allergy*, **36**, 1425–1435 (2006)
- 11) Xiao, J. Z., Kondo, S., Yanagisawa, N., Miyaji, K., Enomoto, K., Sakoda, T., Iwatsuki, K., and Enomoto, T.: Clinical efficacy of probiotic *Bifidobacterium longum* for the treatment of symptoms of Japanese cedar pollen allergy in subjects evaluated in an environmental exposure unit, *Allergol. Int.*, **56**, 67–75 (2007)
 - 12) Neutra, M. R., Mantis, N. J., and Kraehenbuhl, J. P.: Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol.*, **2**, 1004–1009 (2001)
 - 13) Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., and Ricciardi-Castagnoli, P.: Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.*, **2**, 361–367 (2001)
 - 14) Fujiwara, D., Inoue, S., Wakabayashi, H., and Fujii, T.: The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **135**, 205–215 (2004)
 - 15) Iwabuchi, N., Takahashi, N., Xiao, J. Z., Miyaji, K., and Iwatsuki, K.: *In vitro* Th1 cytokine-independent Th2 suppressive effects of bifidobacteria. *Microbiol. Immunol.*, **51**, 649–660 (2007)
 - 16) Sugawara, N., Yamashita, T., Ote, Y., Miura, M., Terada, N., and Kurosawa, M.: TARC in allergic disease, *Allergy*, **57**, 180–181 (2002)
 - 17) Kawasaki, S., Takizawa, H., Yoneyama, H., Nakayama, T., Fujisawa, R., Izumizaki, M., Imai, T., Yoshie, O., Homma, I., Yamamoto, K., and Matsushima, K.: Intervention of thymus and activation-regulated chemokine attenuates the development of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice, *J. Immunol.*, **166**, 2055–2062 (2001)
 - 18) Iwabuchi, N., Takahashi, N., Xiao, J. Z., Yonezawa, S., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., and Hachimura, S.: Suppressive effects of *Bifidobacterium longum* on the production of Th2-attracting chemokines induced with T cell-antigen-presenting cell interactions, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **55**, 324–334 (2009)
 - 19) Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., and Klinman, D. M.: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation, *Nature*, **374**, 546–549 (1995)
 - 20) Kitazawa, H., Ueha, S., Itoh, S., Watanabe, H., Konno, K., Kawai, Y., Saito, T., Itoh, T., and Yamaguchi, T.: AT oligonucleotides inducing B lymphocyte activation exist in probiotic *Lactobacillus gasseri*, *Int. J. Food Microbiol.*, **65**, 149–162 (2001)
 - 21) Takahashi, N., Kitazawa, H., Shimosato, T., Iwabuchi, N., Xiao, J. Z., Iwatsuki, K., Kokubo, S., and Saito, T.: An immunostimulatory DNA sequence from a probiotic strain of *Bifidobacterium longum* inhibits IgE production *in vitro*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **46**, 461–469 (2006)
 - 22) Takahashi, N., Kitazawa, H., Iwabuchi, N., Xiao, J. Z., Miyaji, K., Iwatsuki, K., and Saito, T.: Immunostimulatory oligodeoxynucleotide from *Bifidobacterium longum* suppresses Th2 immune responses in a murine model, *Clin. Exp. Immunol.*, **145**, 130–138 (2006)
 - 23) Takahashi, N., Kitazawa, H., Iwabuchi, N., Xiao, J. Z., Miyaji, K., Iwatsuki, K., and Saito, T.: Oral administration of an immunostimulatory DNA sequence from *Bifidobacterium longum* improves Th1/Th2 balance in a murine model, *Biosci Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2013–2017 (2006)
 - 24) Odamaki, T., Xiao, J. Z., Iwabuchi, N., Sakamoto, M., Takahashi, N., Kondo, S., Iwatsuki, K., Kokubo, S., Togashi, H., Enomoto, T., and Benno, Y.: Fluctuation of fecal microbiota in individuals with Japanese cedar pollinosis during the pollen season and influence of probiotic intake, *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, **17**, 92–100 (2007)
 - 25) Odamaki, T., Xiao, J. Z., Iwabuchi, N., Sakamoto, M., Takahashi, N., Kondo, S., Miyaji, K., Iwatsuki, K., Togashi, H., Enomoto, T., and Benno, Y.: Influence of *Bifidobacterium longum* BB536 intake on faecal microbiota in individuals with Japanese cedar pollinosis during the pollen season, *J. Med. Microbiol.*, **56**, 1301–1308 (2007)