# ヒト腸管内 *Oxalobacter formigenes* の検出と関連遺伝子構造の検討

千葉大学医学研究院遺伝子機能病態学（主任：伊藤晴夫教授）
小玉　孝臣，三上　和男*，赤倉功一郎**，武井　一城***
納谷　幸男，植田　　健，伊藤　晴夫

# DETECTION OF *OXALOBACTER FORMIGENES* IN HUMAN FECES AND STUDY OF RELATED GENES IN A NEW OXALATE-DEGRADING BACTERIUM

Takaomi KODAMA, Kazuo MIKAMI, Koichiro AKAKURA, Kazushiro TAKEI, Yukio NAYA, Takeshi UEDA and Haruo ITO
*From the Department of Urology, Graduate School of Medicine, Chiba University*

The first objective of the present study was to examine the presence of *Oxalobacter formigenes* (an oxalate-degrading bacterium in the human intestine) according to sex in a large number of Japanese. The second objective was to study the presence of three related genes in *Bifidobacterium breve*, which is considered to be a new oxalate-degrading bacterim. Fecal samples were collected from 55 male and 37 female healthy volunteers. *O. formigenes* was detected by a polymerase chain reaction (PCR) and a culture-based method. DNA was amplified by the PCR method including the site of important base sequences of each gene in order to detect *oxc*, *frc*, and *OxlT*. *O. formigenes* was present in 80% of 54 male and 62% of 34 female subjects in the PCR-based assay, while it was present in 62% of 40 male and 50% of 24 female subjects in the culture-based assay. The partial base sequences of the three related genes in *B. breve* were determined. The RNA polymerase-binding site in promoters and the $\rho$-independent termination sequence were preserved in *oxc* and *frc*. In conclusion, the rate of the presence of *O. formigenes* was the same as in previous reports. Female subjects showed a 15% lower rate than males. *B. breve* is considered to be an oxalate-degrading bacterium since it was found to have oxalic acid-degrading ability and three genes involved in oxalate degradation.

(Acta Urol. Jpn. **49**: 371–376, 2003)

**Key words**: Oxalate-degrading bacteria, Human feces, *oxc* gene, Polymerase chain reaction

## 緒　　言

ヒトが日常摂取する食物には，シュウ酸含量の多いものが広範囲に存在する．尿中に排泄するシュウ酸の10～20%が食事に由来すると言われていたが，最近，Holmes らは，それは25～40%に及ぶと報告した[1]残りは，ビタミンCの分解と肝臓で内因性に産生されたものである．尿路結石の約80%が，シュウ酸カルシウムを主成分とするカルシウム結石であるが，Robertson らは，尿路結石の再発率は尿中のカルシウム濃度とは関係がなく，シュウ酸濃度と直線関係があることを示した[2]　結石形成の危険因子は，尿中シュウ酸が重要であることが明らかになった．

1980年 Dawson らは，羊の反芻胃よりシュウ酸塩を分解する細菌を見つけた[3]　この細菌は，後に *Oxalobacter formigenes* と命名，グラム陰性の偏性嫌気性桿菌であった[4]　基準株は OxB である．1985年 Allison らは，ヒト腸管にも類似の菌が存在することを初めて見出した[4,5]　これらの細菌は，炭素源としてシュウ酸塩のみを利用し，これ無くしては生育しえない．以後，腸管におけるシュウ酸の吸収にシュウ酸分解菌が関与する研究が進み始めた．摂取されたシュウ酸が腸内で分解されれば尿中シュウ酸排泄のうち，外因性に由来する部分の吸収を減少させる可能性がある．その結果として，結石の形成を減じることができよう．一方，シュウ酸分解菌の不在は，高シュウ酸尿のリスクを増大し，結石の形成　再発を招くとの報告がされた[6~8]

*O. formigenes* は，菌体に含まれる2つの酵素タンパク，formyl-CoA transferase（コード遺伝子は *frc*）[9]と，oxalyl-CoA decarboxylase（コード遺伝子は *oxc*）[10]により，シュウ酸塩を最終的にギ酸塩と $CO_2$

* 現：済生会習志野病院泌尿器科
** 現：東京厚生年金病院泌尿器科
*** 現：千葉市立青葉病院泌尿器科

| | Gene | Primer | Position (5′; 3′) | Size (bp) |
|---|---|---|---|---|
| A | *oxc* | TATGCGGCATACTCGGAA | (−67; −50) | |
| | | TTCCTTCGATGTAACCGG | (214; 197) | 281 |
| | | ATACTCGGATTGACGT* | (−59; −43) | (273) |
| | *frc* | AGTTAGTACCTTCAGCCCTTTG | (−116; −95) | |
| | | TGATCATCTGTTCCAGAAGCTC | (262; 241) | 378 |
| | | AGCCCTTTGGGCGAAGTTTTTC* | (−103; −82) | (365) |
| B | *oxc* | GAAACCACGCAAACGTCTTGA | (1,242; 1,262) | |
| | | CTGGTTGTGGATCTGCTTCGTT | (1,477; 1,456) | 236 |
| C | *OxlT* | TCGGCCGTTACAAAACCATGT | (845; 865) | |
| | | CTTGGAATAACGAAGGTAGCC | (1,196; 1,176) | 352 |

*: Nested primer.

Fig. 1. Primer set designed for amplification of each genes. A: Promoter regions of *oxc* and *frc* genes. B: Thiamine pyrophosphate binding site of *oxc* gene. C: *OxlT* gene.

に分解する．もう1つ，oxalate$^{2-}$ と formate$^{1-}$ の交互輸送に関与する膜タンパクである *OxlT* 遺伝子も存在する[11]

本研究では，多数の日本人の糞便検体を用い，*O. formigenes* (OxB) の有無について性別で調査した．そして，新たに見出したシュウ酸分解菌については，3つの関連遺伝子について，OxB 株の遺伝子を基にして塩基配列の相違について検討した．

## 対象と方法

1．ヒト糞便中 *O. formigenes* (OxB) の検出

ヒト糞便は採取後，ただちに炭酸ガスを充満した嫌気ボックスにいれて研究室に運んだ．すぐに実験に用いない場合は −80°C に保存した．試料は健康人(20〜70代の成人，結石症の既往は無い) 男性55人，女性37人を集めた．PCR (polymerase chain reaction) 用検体の調製と OxB の検出としての PCR 法については，既発表にしたがった[12] さらに，シュウ酸カルシウムにより白濁した培地がシュウ酸分解菌のコロニーによって透明になる検出法については，Allison らの方法[4]により，培養液を改変して行った．

2．シュウ酸分解菌の遺伝子解析

(1) 検体の調製

細菌株は，*Oxalobacter formigenes* A (ATCC 35274) と *Bifidobacterium breve* (YIT 4014) を用いた．前者は0.2%シュウ酸，1%グルコースを含む PYG，後者は1%グルコースを含む GAM 培地により嫌気培養(37°C) した．培養後，菌体より粗 RNA，DNA を抽出した．

両菌株については，予備実験として0.2%シュウ酸，1%グルコースを含む PYG の寒天培地にて嫌気培養(37°C) し，コロニーの周囲が透明になることより，シュウ酸塩の分解を確認した．さらに，*oxc*, *frc* の各塩基配列より作成したオリゴヌクレオチドプローブを用いて RNA ドットブロット ハイブリダイゼーション (DIG システムキット．ベーリンガーマンハイム㈱) を行い，ともに陽性を示した．

(2) PCR 法と DNA シークエンシング

*oxc*[10], *frc*[9], *OxlT*[11] の各遺伝子の塩基配列より，各プライマーの設定を行った (Fig. 1)．PCR 増幅部位は，各遺伝子の重要塩基配列と考えられるところを選択した．PCR 反応液の組成は既報[12]と同様であり，DNA 量は 50〜100 ng 使用した．ポジティブコントロールは OxB を用いた．アニーリング温度は，プロモーター領域用 (Fig. 1A) *oxc* の場合，第1回 PCR が 52〜53°C，第2回 nested プライマー (*印) 使用時が 50〜51°C である．*frc* は同様に 52〜53°C および 56°C である．Thiamin pyrophosphate 結合部位 (TPP, Fig. 1B) は 55〜56°C，OxlT (Fig. 1C) は 53°C である．PCR のサイクルプログラムは Fig. 2 に示した．

PCR プロダクツに目的バンド以外の非特異的バンドが出現する場合は，必要バンドのみを切り出して，精製後，次のステップに進んだ．再 PCR は，プロダクツの 1/10量を用いて，反応サイクル (Fig. 2) の後半部分にプリヒートを加えて行った．精製した目的バ

| | Temperature | Time | Cycle |
|---|---|---|---|
| Denaturation (first) | 95°C | 3 min | 1 |
| Denaturation | 95°C | 40 sec | |
| Annealing | *x*°C | 2 min | 5 |
| Extension | 72°C | 1 min | |
| | ↓ | | |
| Denaturation | 95°C | 30 sec | |
| Annealing | *x*°C | 30 sec | 30-35 |
| Extension | 72°C | 30 sec* | |
| Extension (final) | 72°C | 7 min | 1 |

*: One min in case of the *frc* gene.

Fig. 2. PCR thermal cycles.

Table 1. Coordinate detection of *Oxalobacter formigenes* using the PCR-based and culture-based assay systems

| Detection | No. of Samples* | |
|---|---|---|
| | Male | Female |
| PCR positive and oxalate degradation positive | 24 | 8 |
| PCR positive and oxalate degradation negative | 14 | 6 |
| PCR negative and oxalate degradation positive | 0 | 2 |
| PCR negative and oxalate degradation negative | 2 | 5 |

* Total no. 61 healthy volunteers (40 males and 21 females).

ンドの DNA は，サブクローニング操作を経て，シークエンシング用 DNA テンプレートを作成した．化学発光を利用した PCR ダイレクトシークエンシングを行い塩基配列を決定した[12]

(3) DNA ドットブロットハイブリダイゼーション

$\rho$ 因子の検出に使用したプローブは，*oxc*[10]，*frc*[9] の塩基配列を利用して作成した．それぞれ下記に示す

5′-NBAAAAAAATGCCCTTCAAGT-3′

5′-NBAAAAAAACGGCACTC-3′

但し，B=C+G+T，N=A+C+G+T

キットは，化学発光核酸検出システムである Gene Images 3′-Oligolabelling and CDP-Star Detection System（アマシャム ファルマシア バイオテク㈱）を用いた．ハイブリダイゼーション温度は 42°C で行った．

## 結　　果

1．日本人におけるヒト糞便中 *O. formigenes* (OxB) の検出

アッセイは3方法で結果をえた．第1は PCR 法にて検出した結果である．男性54名中43名（検出率80%），女性34名中21名（62%）が検出できた．男女総数92名の内70%に当たる．一方，培養法に基づく方法では，男性40名中25名（62%），女性24名中12名（50%）が陽性であった．総数64名中58%に相当する．Table 1 には，上記方法にて共にアッセイした結果を示した．試料は男性40名，女性21名で行った．両アッセイ陽性の者は男性24名（60%），女性8名（38%）であり，逆に陰性の者は男性2名，女性5名であった．

2．シュウ酸分解菌の関連遺伝子解析

(1) プロモーター領域

*O. formigenes* (OxB) の *oxc*[10]，*frc*[9] の DNA シークエンスにしたがって，*B. breve* の塩基配列を Fig. 3A に示した．OxB と比較すると，*oxc*, *frc* 共に，Sidhu ら[9]の解釈にしたがい，ATG 開始コドンより 5′ 上流へ向かって，それぞれ，リボソーム結合部位，TATA ボックス，RNA ポリメラーゼ結合部位の塩基配列が一致していた．塩基の相違は太字で示した．

(2) *oxc* の TPP 部位

TPP 結合部位（1,351～1,437 bp）における OxB

```
A   oxc   -54          -45          -36          -27
    OxB   : CGGAATTGACGTTAA ACAACGTTTATCAAA ACCAACCAAAGAAAG
    B. breveve : CGGAATTGACGTTAA ACCGCGTTTATCAAA ACCAACCAAAGAAAG
              -9          1                                36
    OxB   : GTATTACTCATGAGT AACGACGACAATGTA GAGTTGACTGATGGC
    B. breve : GTATTACTCATGAGT AACGACGACAATGTA GAGTTGACTGATGGC
    frc   -81          -72                              -40
    Oxb   : TTTCTTGGCAGTTCC TTTCGGGGAAACAGC CACAGAGAATAAAAA
    B. breve : TTTCTTGGCAGTTCC TTTCGGGGAAACAGC CACAGAGAATAAAAA
              -36                                -8        1
    OxB   : CCAAAAGTTGTACCA ACGACAAGGAAATGA GAAATTATGACTAAA
    B. breve : CCAAAAGTTGTACCA ACGACAAGGAAATGA GAAATTATGACTATA

B   oxc   1351
    OxB   : GGCGATAGCGCATTC GGTTTCTCCGGTATG GAACTGGAAACCATC
    B. breve : GGCGATAGCGCATTC GGTTTCTCCGGTATG GAACTGGAAACCATC
              1396  1400                                1437
    OxB   : TGCCGTTACAACCTG CCAGTTACCGTTATC ATCATGAACAAT
    B. breve : TGCCCTTACAACCTG CCAGTTACCGTTATC ATCATGAACAAT
```

Fig. 3. Nucleotide sequences of each gene. A: The promoter regions of *oxc* and *frc* genes in *Bifidobacterium breve* strain. From the ATG at position 1 to 5′ upstream, ribosome-binding site, TATA box, and RNA polymerase-binding site are shown underlined. B: The TPP-binding site of *oxc* gene in *B. breve* strain.

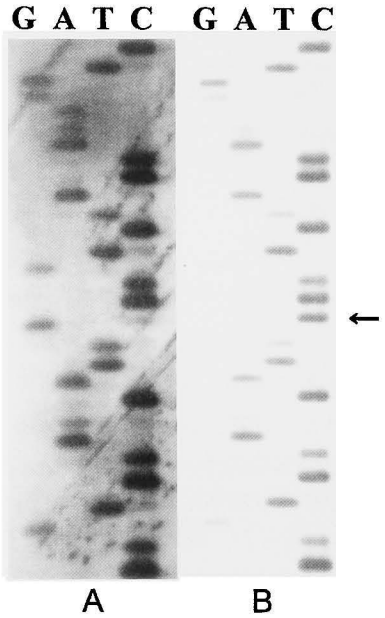


Fig. 4. Sequencing results of the amplified *oxc* gene. A: OxB strain. B: *B. breve* strain. Nucleotide 1400 is cytosine not guanine (arrow).

と *B. breve* との相違は，1,400 bp のGがCに変化(CGT→CCT) の1塩基のみであった（Fig. 3B, Fig. 4 の矢印，上端は 5′ 側）.

(3) *OxlT* の遺伝子

OxB の1,027～1,170 bp の範囲で，*B. breve* の場合と塩基配列を比較したところ，100%ホモロジーを示した．トランスメンブレン切片11にある355番アミノ酸のリジン（AAA）も存在した（データは略）.

(4) ρ 因子の確認

*oxc*, *frc* 共に OxB, *B. breve* において陽性であった（データは略）.

## 考　　察

シュウ酸分解菌である *O. formigenes* の OxB 株のみ，3つの関連遺伝子構造が解明されている．*O. formigenes* に属する菌株は，ヒト糞便より10種類以上見つかり2グループに分類された[13] これらの菌株は，OxB 株を基にして *oxc* の 5′ 上流 −59 bp より 3′-下流へ約 500 bp の塩基配列が各菌株について決定された[13] OxB の検出は，このグループⅠに特異的な DNA シークエンスの相同領域にプライマーを設定して PCR を行い，さらにシークエンシングをすれば菌株の同定がほぼ可能である[12]

ヒト糞便からの *O. formigenes* の検出を初めて男女別で試みた．検出率はいずれのアッセイ法でも男性の方が高かった．特に，PCR 法による検出感度が高く，簡便性から考慮しても検出法として適している．健康人が腸内細菌として，*O. formigenes* などを持つ割合は，およそ60～80%の範囲で報告されている[5,7,8,13~16] われわれの結果もおおかたこの範囲に入っていた．この結果は，*O. formigenes* が腸管内に生息しシュウ酸吸収を制御することによって，宿主と共生関係を維持していることを示唆する．この菌の性差による存在率の差や菌の有無における宿主の要因については，今後のさらなる研究が必要である．要因の1つとして，宿主の食物摂取の偏り，ストレス，抗生物質の服用，老化など環境要因の影響が考えられよう．すなわち，腸管内菌叢のバランスが崩れることで，宿主との共生関係に影響を与え，有用な細菌も減らすことになる[8] 三上らは，年齢が上昇するにしたがってシュウ酸分解菌の存在する割合が低下することを示した[17] また，腸内の pH（健康人では6.5）は，良好な細菌バランスを決定する要因となることから，日常摂取する食物の重要性も推測される．Duncan らは，OxB 株の生理学的特性として，*Bifidobacterium* が繁殖しやすい弱酸性条件においても，耐性を持つ（生存率が高い）との in vitro による興味ある報告をしている[18]

尿路結石の生涯罹患率は，1995年における臨床統計では男性9.4%，女性4.1%であり，男女比は大体2.5：1と報告されている．女性における *O. formigenes* の腸内存在率が男性より15%程度低い結果を示したが，結石形成との因果関係は不明である．Sidhu らによれば，*O. formigenes* は乳児期に腸内に棲み付き始めると報告している[13] 一方，尿路結石患者における存在率は30%程度と低く，結石再発回数が増すごとにさらに低くなる[7,8,15] そして，*O. formigenes* の存在率とシュウ酸カルシウム尿路結石の再発回数は，相関することが報告された[7,8] その他の症例では，$Cl^{1-}$ チャネル疾患である嚢胞性線維症（cystic fibrosis）[6] では16%，Crohn's 疾患[19] では11%と低い．また，抗生物質の処置を受けた結石患者は，腸管内 *O. formigenes* の存在を無くす可能性があり，高シュウ酸尿を引き起こすことも考えられるので，注意が必要であろう[7,20]

*O. formigenes* の基準株である OxB 菌体には，2つの酵素タンパクと1つの膜タンパクを含む．前者においては，可溶性タンパクの10.5%が oxalyl-CoA decarboxylase，0.2%が formyl-CoA transferase として含有し，シュウ酸塩の分解に作用する[17] ヒト腸管より分離された他の菌種では，*Eubacterium lentum*[21]，*Enterococcus faecalis*[22] の報告がある．*oxc* と *frc* 両遺伝子におけるプロモーター領域の塩基配列を，OxB の場合と *B. breve* について比較した．ATG 翻訳開始コドンの 5′-上流，*oxc* は 5′-GAAAGG-(−14～−9 bp)，*frc* は 5′-GAATG-(−13～−8 bp) の各−10領域にリボソーム結合部位が見られ，他の重要部位も塩基配列は一致し保存されていた．Oxalyl-

CoA decarboxylase は，シュウ酸塩分子のオキソ基(O=)に隣接した C-C 結合を切断する触媒反応時に補酵素として TPP を利用する[23] *oxc* 遺伝子に含むこのモチーフは29アミノ酸残基より成り，GD に始まり NN に終わる高度に保存されているシークエンスである[10] *B. breve* においては，OxB と塩基配列のホモロジーは高い．1,400 bp のGがCに変異 (R→P) しているが，重要モチーフからははずれている．*OxlT* は，細菌の細胞膜にある疎水性に富むメンブレン結合輸送タンパクであり，シュウ酸塩 ($oxalate^{2-}$) の取り込みとギ酸塩 ($formate^{1-}$) の排出にかかわる12のトランスメンブレン切片より成る．特に11番切片に，唯一の陽電荷 ($Lys^{355}$) を持つので，アニオン基質の結合と移動に関与していると考えられている[24] PCR 増幅した *B. breve* の DNA は，この11番切片を含むが，$Lys^{355}$ の AAA の存在を確認し，その塩基配列は OxB の場合と一致した．$\rho$ 因子（非依存型ターミネーター）の *oxc* は 1,758～1,783 bp，*frc* は 1,311～1,331 bp の範囲によるパリンドローム構造とその後に続く，7つのチミジン (T) より成る．ドットブロットハイブリダイゼーションにて *B. breve* の *oxc*, *frc* において陽性であることを確認した．以上より，*B. breve* においては，3つの遺伝子の部分的な塩基配列の解明であるが，RNA ポリメラーゼ結合部位やその他の重要と考えられる塩基配列部位の比較において，OxB と高いホモロジーをえた．腸管内に棲むシュウ酸分解菌は唯一ではないので，PCR による検出は簡易であっても，菌種㈱の同定には，慎重に分析技法を駆使すべきであろう．

Sidhu らは，*oxc*, *frc* 遺伝子について，共にプロモーター領域と $\rho$ 非依存型ターミネーターを持つなどの理由から，ポリシストロニック オペロンの一部ではないと推測している[9] Hokama らは，*O. formigenes* より2つの酵素タンパクの抗体を作成し，ウェスタンブロッティングにて *E. faecalis* に両タンパクが在ることを確認した．さらに，同菌体と *O. formigenes* との whole-cell lysate による SDS-PAGE にて，OxlT の 40 kDa タンパクも検出した[22] また，Campieri らは，特発性のシュウ酸カルシウム尿路結石症患者に凍結乾燥した乳酸菌ミックスを毎日摂取させることにより，シュウ酸の腸内吸収を減らすことで，シュウ酸尿を減じることができると報告した．そして，in vitro による各細菌のシュウ酸分解活性を調べ，*Bifidobacterium infantis* が最も適した細菌との結果を示した．しかし，使用した6種の各乳酸菌について PCR による *oxc*, *frc*, *OxlT* の DNA の増幅を試みたが，検出はできなかった[25] 各遺伝子が実際に無いとすれば，シュウ酸塩を分解するのは何に起因するのか疑問が生じよう．われわれの方法による PCR では，その反応液や反応サイクルなどの最適条件を検討してから行っている．同じ *Bifidobacterium* の菌種である *B. breve* において，3つの遺伝子の DNA の増幅は可能であった．

最近では，高シュウ酸尿状態下のラットに *O. formigenes* を投与するプロバイオティック治療にて，尿中シュウ酸のレベルを下げる研究[26]，さらにヒトにおいても，同菌種を用いて in vivo で試験的に検討されている[18] 腸内細菌は約100菌種に及び，ほとんど嫌気性菌で占められている．特に，*Bifidobacterium* は腸内細菌バランスを良い状態に保つのに役立っている．今後も，ヒトの健康維持にとって有用な細菌の探索が望まれる．

## 結　　語

日本人の腸管内 *O. formigenes* 存在率は，既報告と同様の割合を示した．性別では，女性は男性より存在率が15%程度低かった．PCR 法は検出感度が高く検出法として有用である．*B. breve* はシュウ酸分解活性を有し，さらに OxB 株に含む3つの遺伝子を同様に保存されていることが示唆されたので，シュウ酸分解菌である可能性を述べた．

本研究にご協力いただきました，千葉大学医学部附属病院検査部　鈴木理恵子，坂間慶子両氏に深く感謝致します。

## 文　　献

1) Holmes RP, Goodman HO and Assimos DG: Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion. Kidney Int **59**: 270-276, 2001
2) Robertson WG and Hughes H: Importance of mild hyperoxaluria in the pathogenesis of urolithiasis-new evidence from studies in the Arabian Peninsula. Scanning Microsc **7**: 391-402, 1993
3) Dawson KA, Allison MJ and Hartman PA: Isolation and some characteristics of anaerobic oxalate-degrading bacteria from the rumen. Appl Environ Microbiol **40**: 833-839, 1980
4) Allison MJ, Dawson KA, Mayberry WR, et al.: *Oxalobacter formigenes* gen. nov., sp. nov.: oxalate-degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract. Arch Microbiol **141**: 1-7, 1985
5) Allison MJ, Cook HM, Milne DB, et al.: Oxalate degradation by gastrointestinal bacteria from humans. J Nutr **116**: 455-460, 1986
6) Sidhu H, Hoppe B, Hesse A, et al.: Absence of *Oxalobacter formigenes* in cystic fibrosis patients: a risk factor for hyperoxaluria. Lancet **352**: 1026-1029, 1998
7) Sidhu H, Schmidt ME, Cornelius JG, et al.: Direct correlation between hyperoxaluria/oxalate stone disease and the absence of the gastrointestinal tract-dwelling bacterium *Oxalobacter formigenes*: possible

prevention by gut recolonization or enzyme replacement therapy. J Am Soc Nephrol **10**: S334-S340, 1999

8) Kumar R, Mukherjee M, Bhandari M, et al.: Role of *Oxalobacter formigenes* in calcium oxalate stone disease: a study from North India. Eur Urol **41**: 318-322, 2002

9) Sidhu H, Ogden SD, Lung H-Y, et al.: DNA sequencing and expression of the formyl Coenzyme A transferase gene, *frc*, from *Oxalobacter formigenes*. J Bacteriol **179**: 3378-3381, 1997

10) Lung H-Y, Baetz AL and Peck AB: Molecular cloning, DNA sequence, and gene expression of the oxalyl-Coenzyme A decarboxylase gene, *oxc*, from the bacterium *Oxalobacter formigenes*. J Bacteriol **176**: 2468-2472, 1994

11) Abe K, Ruan Z-S and Maloney PC: Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of *OxlT*, the oxalate: formate exchange protein of *Oxalobacter formigenes*. J Biol Chem **271**: 6789-6793, 1996

12) Kodama T, Akakura K, Mikami K, et al.: Detection and identification of oxalate-degrading bacteria in human feces. Int J Urol **9**: 392-397, 2002

13) Sidhu H, Enatska L, Ogden S, et al.: Evaluating children in the Ukraine for colonization with the intestinal bacterium *Oxalobacter formigenes*, using a polymerase chain reaction-based detection system: Mol Diag **2**: 89-97, 1997

14) Doane LT, Liebman M and Caldwell DR: Microbial oxalate degradation: effects on oxalate and calcium balance in humans. Nutr Res **9**: 957-964, 1989

15) 武井一城：尿路結石形成におけるヒト腸管内シュウ酸分解菌の意義．千葉医誌 **75**：33-39, 1999

16) Kwak C, Jeong BC, Lee JH, et al.: Molecular identication of *Oxalobacter formigenes* with the polymerase chain reaction in fresh or frozen fecal samples. BJU Int **88**: 627-632, 2001

17) 三上和男，溝口研一，茂田安弘，ほか：非結石症例における腸内シュウ酸分解菌の存在についての検討．日本尿路結石症学会第11回学術集会記録集：41-44, 2001

18) Duncan SH, Richardson AJ, Kaul P, et al.: *Oxalobacter formigenes* and its potential role in human health. Appl. Environ Microbial **68**: 3841-3847, 2002

19) Allison MJ, Daniel SL and Cornick NA: Oxalate-degrading bacteria. In: Calcium oxalate in biological systems. Edited by Khan S, CRC Press, Inc, Boca Raton, FL, pp 131-168, 1996

20) Siener R, Ebert D and Hesse A: Urinary oxalate excretion in female calcium oxalate stone formers with and without a history of recurrent urinary tract infections. Urol Res **29**: 245-248, 2001

21) Ito H, Miura N, Masai M, et al.: Reduction of oxalate content of foods by the oxalate degrading bacterium, *Eubacterium lentum* WYH-1. Int J Urol **3**: 31-34, 1996

22) Hokama S, Honma Y, Toma C, et al.: Oxalate-degrading *Enterococcus faecalis*. Microbiol Immunol **44**: 235-240, 2000

23) Hawkins CF, Borges A and Perham RN: A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes: FEBS Lett **255**: 77-82, 1989

24) Fu D-X, Sarker RI, Abe K, et al.: Structure/function relationships in OxlT, the oxalate-formate transporter of *Oxalobacter formigenes*. J Biol Chem **276**: 8753-8760, 2001

25) Campieri C, Campieri M, Bertuzzi V, et al.: Reduction of oxaluria after an oral course of lactic acid bacteria at high concentration. Kidney Int **60**: 1097-1105, 2001

26) Sidhu H, Allison MJ, Chow JM, et al.: Rapid reversal of hyperoxaluria in a rat model after probiotic administration of *Oxalobacter formigenes*. J Urol **166**: 1487-1491, 2001

(Received on December 9, 2002
Accepted on March 17, 2003)