

ヒト腸内シュウ酸分解菌に対する 乳果オリゴ糖経口投与の効果

武井 一城^{*1}, 赤倉功一郎^{*2}, 植田 健^{*3}

三上 和男^{*4}, 伊藤 晴夫^{*5}

千葉大学大学院医学研究院泌尿器科学

EFFECT OF ORAL LACTOSUCROSE SUPPLEMENTATION ON HUMAN ENTERIC OXALATE-DEGRADING BACTERIA

Kazushiro TAKEI, Koichiro AKAKURA, Takeshi UEDA,
Kazuo MIKAMI and Haruo ITO

The Department of Urology, Graduate School of Medicine, Chiba University School of Medicine

A variety of oxalate-degrading bacteria including *Oxalobacter formigenes* and some species of *Bifidobacterium* are known to colonize the human intestinal tract. Oral lactosucrose supplementation promotes the growth of *Bifidobacterium* in the human intestine. Therefore, we investigated the effect of oral lactosucrose supplementation on enteric oxalate-degrading bacteria in twelve healthy men (age ranging from 25 to 39 years). Lactosucrose was orally administered 10 g daily for 2 weeks without restriction of dietary intake. The total number of oxalate-degrading bacteria in feces and the 24-hour urinary excretion of oxalate were examined before and after lactosucrose supplementation. The total number of oxalate degrading-bacteria was significantly increased by lactosucrose supplementation (9.20 ± 0.44 versus 9.77 ± 0.46 , $p < 0.05$), although there was no significant change in the urinary oxalate excretion. The oxalate degrading-bacteria isolated from feces was biochemically identified as *Bifidobacterium adolescentis*. In conclusion, oral supplementation of 10 g lactosucrose daily for 2 weeks was effective in multiplying oxalate-degrading bacteria, but not in reducing urinary oxalate excretion under free non-restricted dietary intake. In addition, it was suggested that various species of *Bifidobacterium* were related to degradation of oxalate in the human intestine.

(Hinyokika Kyo 52 : 687-691, 2006)

Key words : Oxalate-degrading bacteria, Lactosucrose, *Bifidobacterium*

結 言

尿中シュウ酸の由来は内因性と外因性に分けられる。内因性は体内合成により、外因性は食事中に由来する。従来、尿中シュウ酸のうち食事に由来する部分の割合は10～30%といわれてきた^{1,2)}が、最近では通常の食事と同程度のシュウ酸を含んだ実験食で尿中シュウ酸に食事由来が占める割合は27～40%という実験報告³⁾もされている。シュウ酸カルシウム結石においては、以前よりも、食事に含まれるシュウ酸がより重要視されるようになった。Robertson ら²⁾は、尿路結石の発生率は尿中シュウ酸排泄量と直線的な関係があり、尿中シュウ酸排泄量が軽度上昇した mild hyperoxaluria の状態は結石形成に重要であることを

示した。尿中シュウ酸のうち食事由来の部分が一部減少するだけでも結石形成には大きく影響する。シュウ酸分解菌が腸内細菌叢の一部として生息していると、菌が食事中のシュウ酸を分解することで、結果として低シュウ酸食を摂取したのと同じ効果が得られる。ヒト腸管内にシュウ酸を分解する細菌が存在することは多くの報告者により証明されてきた。1985年 Allison ら⁴⁾は、ヒト腸管内から初めてシュウ酸分解菌を分離同定した。これが *Oxalobacter formigenes* である。その後、ヒト糞便中から分離された *Eubacterium lentum*⁵⁾, *Enterococcus faecalis*⁶⁾, *Providencia rettgeri*⁷⁾ の一部においても、シュウ酸分解能力があると報告された。実際に *Oxalobacter formigenes* をヒトに経口投与することで尿中シュウ酸排泄を減少させたとの報告⁸⁾もなされている。Campieri ら⁹⁾も、*Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* といった乳酸菌のある菌株にもシュウ酸分解能力があることを確認し、これらの菌群を経口投与することで、自由食下において尿中シュウ酸排泄量を減少させたと報告した。

*¹ 現：沼津市立病院泌尿器科

*² 現：東京厚生年金病院泌尿器科

*³ 現：千葉県立がんセンター泌尿器科

*⁴ 現：済生会習志野病院泌尿器科

*⁵ 現：NPO 千葉健康づくり研究ネットワーク

本邦でも、われわれが *Bifidobacterium breve* にシュウ酸分解能があることを確認している¹⁰⁾。シュウ酸分解菌を保有する群では、所有しない群に比べて有意に尿中シュウ酸排泄量が少ないと報告^{11, 12)}されている。また、シュウ酸カルシウム結石患者においてはシュウ酸分解菌の保有率が低いことも報告¹²⁻¹⁵⁾されている。腸管内にシュウ酸分解菌群がより多く生息することで尿中シュウ酸排泄を減らせる可能性がある。

オリゴ糖類はビフィズス菌を腸管内で選択的に増殖させる効果が認められている¹⁶⁾。そこで、われわれはシュウ酸分解能力のあるビフィズス菌を腸管内で増殖させる目的でオリゴ糖を経口投与する研究を行った。

対 象 と 方 法

1. オリゴ糖経口投与の実験方法

われわれが既報に示した糞便培養法¹²⁾にてあらかじめシュウ酸分解菌を保有することが判明している12人の健康成人男性（25～39歳）に乳果オリゴ糖（商品名：ワナナイト）1日10gを14日間服用させた。被検者には試験の主旨と方法の説明を紙面にて行い、同意を得て実施した。オリゴ糖は腸管から吸収されないため、その効果を最大限発揮させるために、服用はなるべく就寝前とした。オリゴ糖服用前1カ月以内に抗菌薬の服薬はしていない。実験は自由食下に行ったが、普段と変わらない食生活をするように指示した。オリゴ糖服用開始日および終了日に24時間尿中シュウ酸排泄量測定および糞便培養を実施した。糞便中の総嫌気性菌数、総シュウ酸分解菌数を測定した。尿中シュウ酸は電気泳動法を用いて測定した。

2. ヒト糞便中シュウ酸分解菌の培養および同定

ヒト糞便中からシュウ酸分解菌を分離同定することを試みた。糞便採集法およびサンプルの培養法は既報¹²⁾の通りである。採取した糞便サンプルはただちに嫌気環境下で培地へ接種し、37℃で7日間嫌気培養した。PYG 寒天培地での総嫌気性菌数およびシュウ酸加 PYG 寒天培地での総シュウ酸分解菌数を測定した。シュウ酸分解菌が存在すると、シュウ酸加培地中のシュウ酸が分解されてコロニー周囲の寒天白濁が消失して透明になることで判定される。

また、シュウ酸分解コロニーからの分離同定検査を行った。嫌気下にて、透明帯を形成するコロニーから白金耳にて菌採集して半流動 GAM 培地で増菌したのち、ふたたびシュウ酸加 PYG 寒天培地に移して嫌気培養した。培養後のコロニーは肉眼上単一の形態で、透明帯を形成していた。これを細菌同定キットである API 50ch[®] で同定した。

結 果

1. シュウ酸分解菌に対するオリゴ糖の効果

糞便培養検査で12例中1例は、シュウ酸加 PYG 寒天培地でのシュウ酸分解菌発育は見られたが、PYG 寒天培地で菌発育が見られず総嫌気性菌数は測定不可であった。糞便中の総嫌気性菌数はオリゴ糖投与前の 9.82 ± 0.49 (log 10/g wet feces) から投与後は 10.08 ± 0.42 (log 10/g wet feces) へ増加した ($p < 0.05$) (Fig.

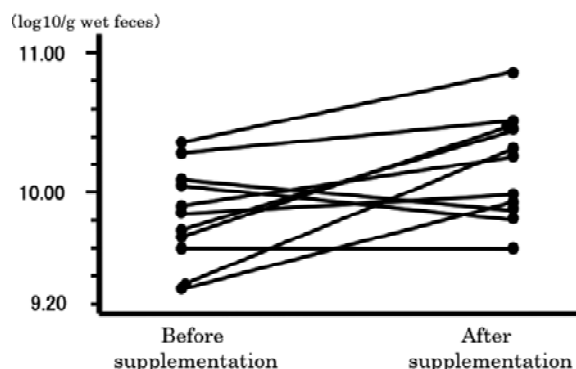


Fig. 1. Total number of anaerobes in feces. 9.82 ± 0.49 (before lactosucrose supplementation) vs 10.08 ± 0.42 (after lactosucrose supplementation). $p < 0.05$.

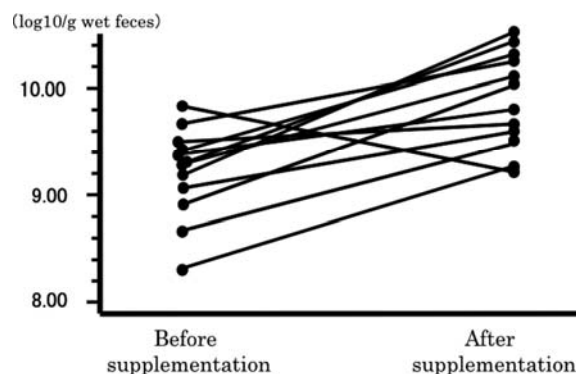


Fig. 2. Total number of oxalate degrading bacteria in feces. 9.20 ± 0.44 (before lactosucrose supplementation) vs 9.77 ± 0.46 (after lactosucrose supplementation). $p < 0.05$.

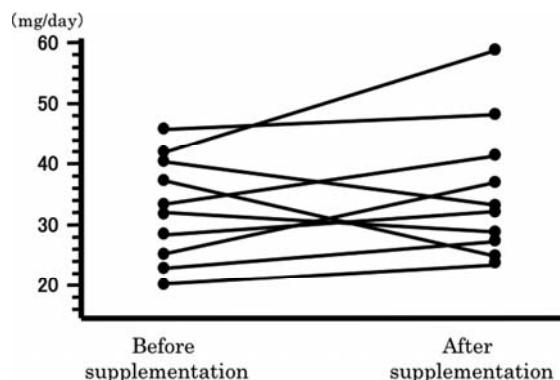


Fig. 3. 24-hr urinary oxalate excretion. 32.5 ± 8.5 (before lactosucrose supplementation) vs 34.1 ± 11.3 (after lactosucrose supplementation). p ; not significant.

Table 1. Biochemical identification by API 50ch®

	API 50ch		API 50ch
Glycerol	—	Salicine	+
Erythritol	—	Cellobiose	+
D-Arabinose	—	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	+	Saccharose	+
L-Xylose	—	Trehalose	+
Abonitol	—	Inuline	+
β -Methyl-xyloside	—	Melezitose	+
Galactose	+	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Amidon	+
D-Fructose	+	Glycogene	+
D-Mannose	+	Xylitol	+
L-Sorbose	—	β -Gentiobiose	+
Rhamnose	—	D-Turanose	+
Dulcitol	—	D-Lyxose	—
Inositol	+	D-Tagatose	—
Mannitol	+	D-Fucose	—
Sorbitol	+	L-Fucose	—
α -Methyl-D-mannitole	±	D-Arabitol	—
α -Methyl-D-glucoside	+	L-Arabitol	—
N-Acethyl-glucosamine	+	Gluconate	±
Amygdaline	+	2-ceto-gluconate	—
Arbutine	+	5-ceto-gluconate	—
Esuculine	—		

1). 総シュウ酸分解菌数も投与前の 9.20 ± 0.44 (log 10/g wet feces) から投与後は 9.77 ± 0.46 (log 10/g wet feces) へ増加した ($p < 0.05$) (Fig. 2). 24時間尿中シュウ酸排泄量検査は10例に可能であった. 尿中シュウ酸排泄量は投与前の 32.5 ± 8.5 mg/day に対して投与後は 34.1 ± 11.3 mg/day で統計学的には有意差がなかった (Fig. 3).

2. シュウ酸分解菌の同定および同菌種におけるシュウ酸分解能

シュウ酸分解菌として分離同定された細菌は, API 50ch® を用いた細菌生化学的検査によると *Bifidobacterium adolescentis* であった (Table 1).

そこで, *Bifidobacterium adolescentis* の type strain YIT 4011 (ヤクルト(株)本社より提供) におけるシュウ酸分解能の有無を同培養法にて調べた. また, 対照として *Bifidobacterium breve* の type strain YIT 4014 (ヤクルト(株)本社より提供) を用いた. *Bifidobacterium breve* YIT 4014 はシュウ酸加 PYG 寒天培地上でコロニー辺縁に淡い透明帯を形成したが, *Bifidobacterium adolescentis* YIT 4011 ではこれを形成しなかった. すなわち, *Bifidobacterium adolescentis* において, われわれの糞便から分離同定された一株はシュウ酸分解能を有したが, type strain YIT4011 にはシュウ酸分解能を認めなかつ

た.

考 察

ヒト腸管内シュウ酸分解菌のうちシュウ酸分解様式が解明されている菌は *Oxalobacter formigenes* のみである¹⁷⁾. *Oxalobacter formigenes* は取り込んだシュウ酸を formyl-CoA transferase の働きで oxalyl-CoA とし, さらに oxalyl-CoA decarboxylase の作用でギ酸と二酸化炭素に分解する. シュウ酸とギ酸は membranous antiporter である OxIT を通して細胞内外に交換される. Formyl-CoA transferase, oxalyl-CoA decarboxylase, OxIT ともそれらをコードする遺伝子は解明されている¹⁷⁾. われわれは *Bifidobacterium breve* YIT 4014 が, この3つの遺伝子との高い相同性をもっていることをすでに報告している¹⁰⁾. しかし, Campieri ら⁹⁾ は, 実験に使用したシュウ酸分解能を有する *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* の3種の乳酸菌群で, この3つの遺伝子を検出できなかったと述べている. ヒト腸管内以外に自然界で生息するシュウ酸分解菌である *Pseudomonas* sp. OX-53¹⁸⁾ ではシュウ酸分解様式が *Oxalobacter formigenes* とは異なり, oxalate oxidase で直接シュウ酸を二酸化炭素に分解する. ヒト腸内シュウ酸分解菌でも

シュウ酸分解様式または分解酵素の構造がすべて *Oxalobacter formigenes* に同じではない可能性がある。

われわれの実験では、シュウ酸分解菌の一部に *Bifidobacterium adolescentis* が存在することを認めたが、type strain の1つである YIT 4011 ではシュウ酸分解能を認めなかった。*Bifidobacterium adolescentis* において、すべての菌株でシュウ酸分解能があるわけではないと考える。これに関しては同様に、*Eubacterium lentum*⁵⁾ および *Enterococcus faecalis*⁶⁾、*Providencia rettgeri*⁷⁾ においても、すべての菌株がシュウ酸分解能を持つわけではないと報告されている。

シュウ酸分解菌の一種である *Oxalobacter formigenes* は健常成人の約70%に存在¹⁷⁾し、腸内細菌叢での構成比率は低いが、強力なシュウ酸分解能力を有する。通常の食事には70~200 mg 程度のシュウ酸が含まれる¹⁷⁾が、*Oxalobacter formigenes*は1日あたり100 mg のシュウ酸も分解可能である¹⁷⁾ため、この細菌の有無で尿中シュウ酸排泄量に差が出る¹¹⁾ほどである。Sidhu ら¹⁹⁾は *Oxalobacter formigenes* の生息しない実験ラットに高シュウ酸食を与え、高シュウ酸尿症となったところで *Oxalobacter formigenes* を経口投与することで、高シュウ酸尿症を改善したと報告した。Duncan ら⁸⁾は *Oxalobacter formigenes* を非保菌者に経口投与し、その後の尿中シュウ酸排泄を減少させたと報告した。*Oxalobacter formigenes* を保有していない場合に、この菌を経口投与することで尿中シュウ酸が減少することは事実である。

ただし、*Oxalobacter formigenes* をヒトに投与する場合は、現時点での安全性はいかかなものであろうか。この点については、Campieri ら⁹⁾の用いたシュウ酸分解能を有する *Bifidobacterium infantis*、*Lactobacillus acidophilus*、*Streptococcus thermophilus* の3菌種の含まれる乳酸菌群乾燥菌体製剤は体によいとされる菌群であり、安全性の点で心配はない。乳酸菌はシュウ酸以外の糖類でも発育するので、シュウ酸分解能力としてはこれらの菌群は“generalist”であり、シュウ酸のみを炭素源とする“specialist”としての *Oxalobacter formigenes* には及ばないであろう。しかし、彼らはこの菌群を経口投与して自由食下でも尿中シュウ酸排泄を低下せたと報告している。菌自体のシュウ酸分解能力は低くても、投与菌数が多いため結果としては尿中シュウ酸排泄量に影響をおよぼすほどの効果をもたらすのだと考える。

今回われわれはこの乳酸菌群を投与するのではなく、すでに腸管内にいるビフィズス菌群の数を増やす目的でオリゴ糖を経口投与した。腸内細菌叢のおもな構成は *Bacteroidaceae*、*Eubacterium*、*Peptococcaceae* などであり、ビフィズス菌は準主要構成菌で全フローラの5~15%である^{16, 20)}。オリゴ糖とはブドウ糖やガラ

クトースなどの単糖が数個結合した糖類の総称である²⁰⁾。実験に用いた乳果オリゴ糖はブドウ糖および果糖とガラクトースからなる3糖類であり、腸管内で分解吸収されずにおもにビフィズス菌に利用される^{16, 20)}。その結果ビフィズス菌が選択的に増菌され腸内細菌叢に占める割合が増加する。オリゴ糖は通常3~5 g 程度で対象菌を増加させる効果を発揮し始め、15 g 程度までは許容量とされるので、オリゴ糖10 g の投与は十分量であると考え²¹⁾。また、実験的には、オリゴ糖の経口投与開始から *Bifidobacterium* 菌数の増加を経時的に認め、1週間ではほぼプラトーとなるが、2週間投与のほうやや増加傾向にある^{16, 20)}。このため、今回の14日間という投与期間は妥当であると考え。

しかし、本研究では、オリゴ糖の投与でシュウ酸分解菌数は有意に増加したものの尿中シュウ酸排泄量は不変であった。これには幾つかの理由が考えられる。まず1つは、シュウ酸分解菌数は増加したが、尿中シュウ酸が減少するほどの菌数増加ではなかったという可能性。オリゴ糖は、強力な“specialist”である *Oxalobacter formigenes* ではなく、“generalist”であるビフィズス菌を増殖させる。ビフィズス菌が増殖してシュウ酸分解量が明らかに増加するためにはCampier ら⁹⁾のごとくにかなりの菌数増加が必要なのかもしれない。もう1つはオリゴ糖が選択的にビフィズス菌に取り込まれて増殖を促進はしたが、逆にオリゴ糖過投与による炭素源での栄養が行き渡ってシュウ酸利用が低下した可能性である。*Oxalobacter formigenes* はビフィズス菌の繁殖しやすい環境条件でも耐性である⁸⁾ことから、ビフィズス菌の増殖による *Oxalobacter formigenes* の発育抑制の影響は少ないかもしれない。さらに、実験中の食事によるシュウ酸摂取量が一定でなかったことは、尿中シュウ酸排泄の検討としては正確性に欠く可能性がある。理想的には被検者間において2週間のあいだ食事中シュウ酸量を一定にしておく必要がある。ただし、ヒトにおける臨床実験では困難を呈する。また、Campieri ら⁹⁾のように自由食下でも尿中シュウ酸排泄が減少しなければ臨床上的効果としての意義は低いと考える。

結論として、オリゴ糖の投与量の多少の問題はあるが、オリゴ糖10 g の2週間経口投与はシュウ酸分解菌数を増加させたが、自由食下での尿中シュウ酸排泄量を減少させるほどの効果はなかった。食事由来の尿中シュウ酸を減少させる目的としては、オリゴ糖でシュウ酸分解菌を増やす方法は効果が低いと思われる。

結 語

1. オリゴ糖10 g の2週間経口投与でシュウ酸分

解菌数は有意に増加したが, 自由食下の尿中シュウ酸排泄量は低下しなかった.

2. シュウ酸分解菌の1つに *Bifidobacterium adolescentis* が同定された. 用いた type strain ではシュウ酸分解能を有さなかったため, すべての *Bifidobacterium adolescentis* にシュウ酸分解能があるわけではないことを確認した.

文 献

- 1) Williams HE and Wandzilak TR: Oxalate synthesis, transport and the hyperoxaluric syndromes. *J Urol* **141**: 742-747, 1989
- 2) Robertson WG and Hughes H: Importance of mild hyperoxaluria in the pathogenesis of urolithiasis: new evidence from studies in the Alabian Peninsula. *Scanning Microsc* **7**: 391-402, 1993
- 3) Holmes RP, Goodman HO and Assimios DG: Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion. *Kidney Int* **59**: 270-276, 2001
- 4) Allison MJ, Dawson KA, Mayberry WR, et al.: *O. formigenes* gen. nov., sp. nov.: oxalate degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract. *Arch Microbiol* **141**: 1-7, 1985
- 5) Ito H, Masai M, Miyake M, et al.: New oxalate-degrading bacterium from human feces. *Int J Urol* **3**: 83-84, 1996
- 6) Hokama S, Honma Y, Toma C, et al.: Oxalate-degrading *Enterococcus faecalis*. *Microbiol Immunol* **44**: 235-240, 2000
- 7) Hokama S, Toma C, Iwanaga M, et al.: Oxalate-degrading *Providencia rettgeri* isolated from human stools. *Int J Urol* **12**: 533-538, 2005
- 8) Duncan SH, Richardson AJ, Kaul P, et al.: *Oxalobacter formigenes* and its potential role in human health. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3841-3847, 2002
- 9) 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
- 10) 小玉孝臣, 三上和男, 赤倉功一郎, ほか: ヒト腸管内 *Oxalobacter formigenes* の検出と関連遺伝子構造の検討. 泌尿紀要 **49**: 371-376, 2003
- 11) 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
- 12) Mikami K, Akakura K, Takei K, et al.: Association of absence of intestinal oxalate degrading bacteria with urinary calcium oxalate stone formation. *Int J Urol* **10**: 293-296, 2003
- 13) Kwak C, Jeong BC, Lee JH, et al.: Molecular identification of *Oxalobacter formigenes* with the polymerase chain reaction in fresh or frozen fecal samples. *BJU Int* **88**: 627-632, 2001
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 藤井智恵美, 久米村 恵, 橋本文雄, ほか: 4^G-β-D-Galactosylsucrose (ラクトスクロース) のヒト腸内細菌叢に及ぼす影響. ビフィズス **6**: 31-41, 1992
- 17) 武井一城, 伊藤晴夫: *Oxalobacter formigenes* と結石形成. *Urol View* **1**: 20-26, 2003
- 18) Koyama H: Purification and characterization of oxalate oxidase from *Pseudomonas* sp. OX-53. *Agric Biol Chem* **52**: 743-748, 1988
- 19) 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
- 20) 光岡知足: プレバイオティクスと腸内フローラ. 腸内細菌誌 **16**: 1-10, 2002
- 21) 奥 恒行: オリゴ糖. 薬の知識 **53**: 230-231, 2002

(Received on December 12, 2005)
(Accepted on April 17, 2006)