

ATPを指標としたビオチンの微生物学的定量法の検討

奥田 涼子¹⁾, 谷口 歩美¹⁾, 榎原 周平¹⁾, 福井 徹²⁾, 渡邊 敏明¹⁾
(¹⁾兵庫県立大学環境人間学部*, ²⁾病体生理研究所**)

A New Microbioassay for Biotin using ATP Production in *Lactobacillus plantarum*

Ryoko OKUDA¹⁾, Ayumi TANIGUCHI¹⁾, Shuhei EBARA¹⁾, Toru FUKUI²⁾ and Toshiaki WATANABE¹⁾

¹⁾Department of Environment for Life and Living

School of Human Science and Environment, University of Hyogo

²⁾Clinical Laboratory, Byotai Seiri Laboratory

Summary

The microbiological assay is one of the most common methods for biotin determination, which generally uses biotin-dependent *L. plantarum* ATCC 8014. The growth of microorganisms in the presence of biotin was evaluated by turbidity optical density of the assay solution at 610 nm, which is known as a turbidimetric assay. We developed a new improved bioassay for biotin levels using ATP production in *L. plantarum*. The standard curve was linear in the range from 0.01 to 800 pg/ml and the detection levels of this assay as low as 50 pg/ml could be realized. The intra-assay precision test revealed that the reproducibility of duplicates was within 8%. These findings suggest that this ATP assay is more sensitive and simple for the determination of biotin than the classic turbidimetric assay, thus making it appropriate for clinical laboratory use.

ビオチンは、水溶性ビタミンの一つで、カルボキシラーゼの補酵素として、炭酸の転移反応を触媒し、糖新生や分岐鎖アミノ酸代謝、脂肪酸合成及びエネルギー代謝に関与している。このため、ビオチンの摂取量が低下したり、欠乏すると種々の生体影響がおこることが知られている¹⁾。

ヒトではビオチンが欠乏すると、皮膚炎や食欲不振、精神活動の低下などの症状が表れることが確認されている。しかし、ビオチンは種々の食品に含まれているため、成人ではほとんど食事性ビオチン欠乏症はないとされている。一方、乳児では稀ながら認められている。これは、母乳のビオチン含有量が低いこと、消化機能が未熟であること、あるいは難治性下痢によって、吸収障害がもたらされることなどによる。また、妊婦の尿から、ビオチンが不足したときに排泄される3-HIA (3-ヒドロキシイソ吉草酸) が検出されることが報告されており、妊娠期での生理的なビオチン欠乏が示唆されている²⁾。このように、乳幼児や妊婦において、ビオチンの栄養状態を正確に把握することが必要である。

実験動物では、ビオチン欠乏ラットで、体重増加の抑制や、皮膚炎、脱毛などの症状が表れる。また、妊娠動物にビオチン欠乏飼料を与えると、胎仔(胚)の発育や形態に影響をおよぼすことが知られている³⁾。

生体内のビオチン濃度を測定する際、サンプルを採取するときに、被験者の負担をできるだけ軽減する必要がある⁴⁾。このためには採取量を少なくすることが不可欠である。少量のサンプルで測定するには、高感度測定法の開発が必要となる。

*所在地：兵庫県姫路市新在家本町1-1-12 (〒670-0092)

**所在地：東京都板橋区熊野町47-11 (〒173-0025)

現在確立されているビオチンの定量法としては、微生物学的定量法、理学的定量法、酵素定量法などがあり、一般には微生物学的定量法が広く使用されている⁵⁾。しかしながら、濁度に基づく測定では、培養液やサンプル中の不溶性物質の影響を受けやすく、感度を上げることは困難である。そこで、細菌が産生するATPを利用して細菌の増殖を測定する新しい測定法(ATP法)を確立することを検討した。

実験方法

Fig. 1はATP法の手順を示したものである。乳酸菌*L. plantarum* ATCC 8014をMRS培地で前培養し、菌数を濁度で調整($OD_{610nm} = 0.2$)した後、1/100に希釈した。ビオチン定量用培地(日水製薬(株), 東京)に、調整した乳酸菌を30:1の割合で混ぜ合わせ、よく攪拌した後、エッペンチューブに1mlずつ分注し、さらにサンプルあるいは標準物質を30 μ l添加し、37℃で24時間培養した。培養後、培養液を約pH7.75に調整するためにリン酸緩衝液(pH7.75)で10倍に希釈し、白色マイクロプレートへ50 μ l分注した。さらに、乳酸菌のATPを抽出するため、ATP抽出試薬(東洋ビーネット(株), 東京)50 μ lを加え、さらに、ルシフェリン・ルシフェラーゼ試薬(L-L試薬)(東洋ビーネット(株), 東京)を50 μ l添加し、ただちに発光量をマイクロプレートリーダー(Wallac 1420 ARVOsx, パーキンエルマー・ジャパン(株), 東京)で測定し、ATP量を求めた。

また、ATP測定にあたり、測定条件設定のため、発光時間の安定性を検討した。ATP標準溶液にL-L試薬を添加した後、1分毎に発光量を測定した。

なお、本定量法の同時再現性は、同一のサンプルを5回測定し、その平均値と標準偏差から、CV(%)を求めた。また、添加回収率は、既知の濃度のサンプル溶液に、ビオチン標準溶液を同量添加し、実測値と理論値の差(%)を求めた。

次に本定量法の実用性を確かめるために、生体試料中のビオチン濃度を定量した。生体試料としては、健常な男性1名から採取した尿を用いた。1日目は、普通食で、午前9時から2時間毎に採尿をし、「コントロール尿」とした。2日目は朝9時に空腹の状態ですら10mgビオチン(ビオチン散“フソー”, 扶桑薬品工業(株), 大阪)を服用後、2時間毎に採尿をし、「サプリメント尿」とした。三日目は普通食で、尿は採取せず、四日目は、朝9時に空腹の状態ですら5個の

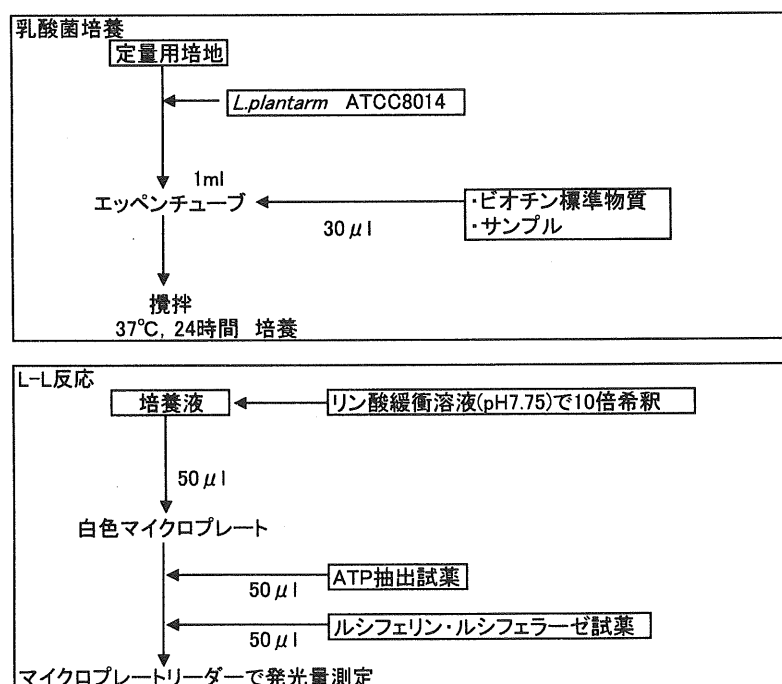


Fig. 1 Procedure of ATP assay.

負荷し2時間毎に採尿をし、「卵黄尿」とした。尿 (100 μ l) は、4.5N硫酸を100 μ l添加し、オートクレーブで加水分解 (121 $^{\circ}$ C, 2気圧, 60分) を行った後、4.5N水酸化ナトリウム (約100 μ l) で中和し、サンプルとして供し、ATP法及び比濁法でビオチン濃度を測定した。

尿中のクレアチニン (Cre) 濃度はクレアチニンテストワコー (和光純薬工業株, 東京) を用いて測定し、尿中ビオチン量 (μ g/g Cre) の補正を行った。

なお、本研究は、ヘルシンキ宣言 (1964年) (2000年修正)「ヒトを対象とする医学研究の倫理的原則」に則って実施した。

結 果

今回使用したL-L試薬は試薬添加後、時間とともに発光量が減衰するといわれている。Fig. 2は減衰の様子をみたものである。発光量は5分間で40%減衰した。

ビオチン濃度が0pg/mlから800pg/mlの標準溶液で発光量 (RLU) をみたものがFig. 3である。発光量をみると、50pg/ml以上でビオチン濃度に依存して増加した。ビオチン濃度と発光量の相関係数は $r = 0.99$ ($p < 0.01$) であった。発光量からS/N比を算出すると、ビオチン10pg/mlで1.4, 25pg/mlで1.8と差がみられなかったが、50pg/mlで2.2, 100pg/mlで3.3であった。なお、同時再現性は8.0%で、添加回収率は、94.1%であった。

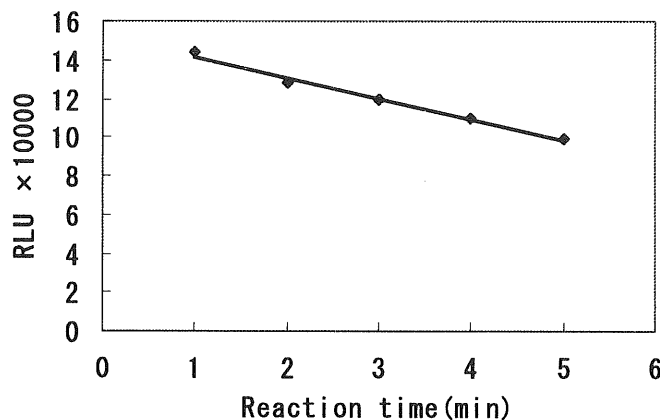


Fig. 2 Time course of luminescent intensity after adding reaction mixture (luciferin and luciferase).

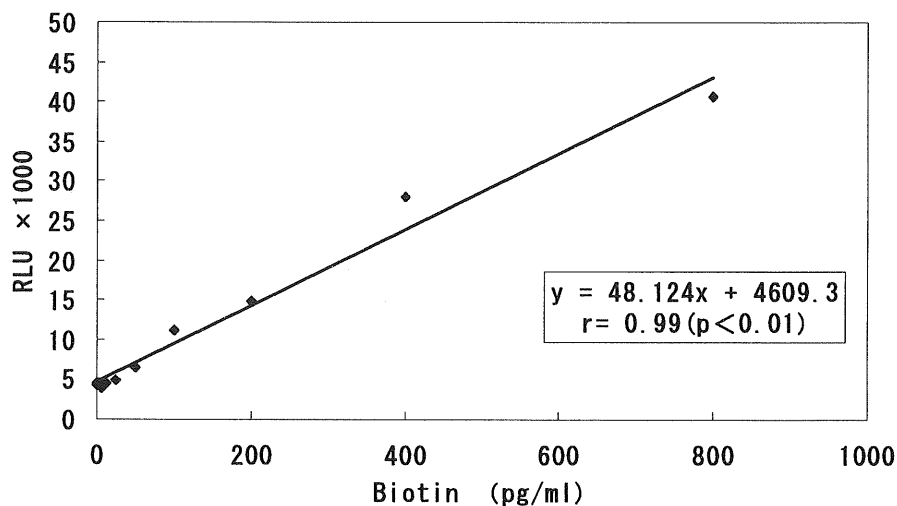


Fig. 3 Standard curve for quantification of biotin using ATP assay.

Each calibrator sample was determined in duplicate. Points are mean values.

ATP法と従来から用いられてきた比濁法との関係をみたものがFig.4である。両者の回帰直線は $y = 1.88x - 0.32$ で、相関係数は $r = 0.73$ ($p < 0.01$) と有意な正の相関がみられた。しかし、ATP法でのビオチン濃度は平均 $0.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、比濁法でのビオチン濃度は平均 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ と、ATP法で分析した値の方が低い濃度となった。

生体試料での測定結果をFig. 5およびFig. 6に示した。コントロール尿のビオチン濃度は、 $2.0 \sim 4.4 \mu\text{g}/\text{g Cre}$ で、一日を通して大きな変動は見られなかった。一方、卵黄尿のビオチン濃度は摂取2時間後で $112 \mu\text{g}/\text{g Cre}$ と高値を示し、摂取4時間後には2時間後と比較して、 $55.9 \mu\text{g}/\text{g Cre}$ と約半量となった。その後も尿中ビオチン濃度は徐々に減少した。

サプリメント尿のビオチン濃度は摂取2時間後で $3170 \mu\text{g}/\text{g Cre}$ と高値を示し、摂取6時間後で $659 \mu\text{g}/\text{g Cre}$ と2時間後に比べ約80%減少した。摂取6時間後以降は、ビオチン濃度に目立った変動は見られなかった。

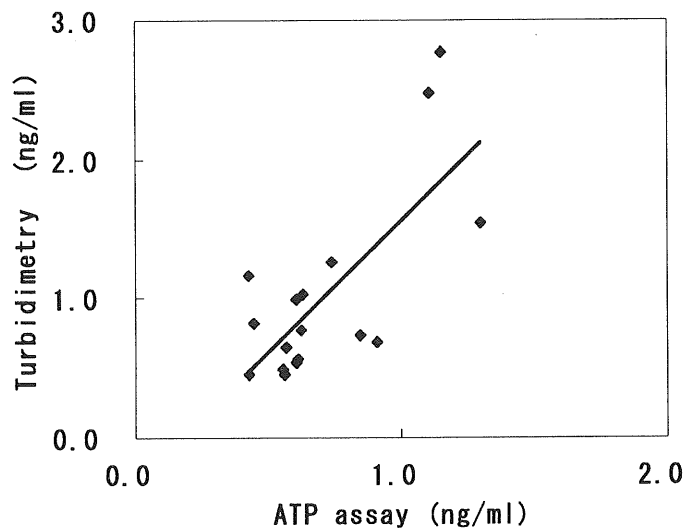


Fig. 4 Correlation between turbidimetric assay and ATP assay.

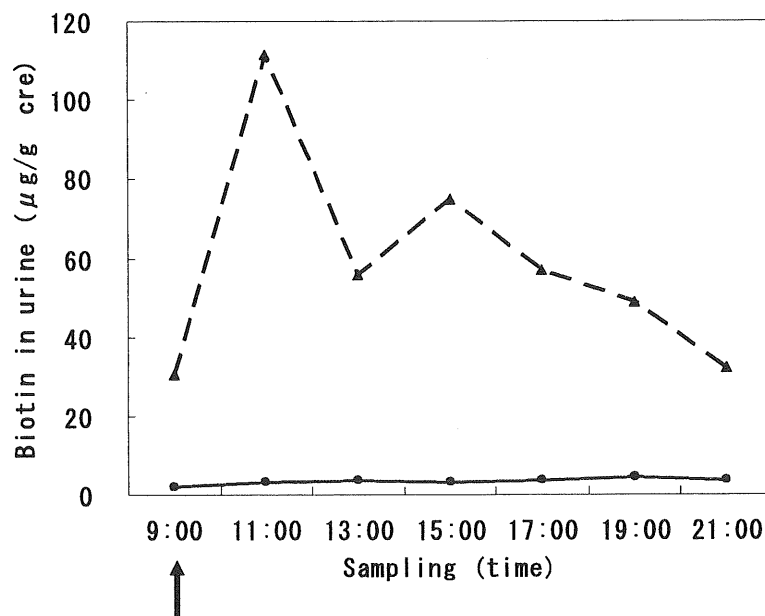


Fig. 5 Change in urine biotin levels after consuming 5 boiled egg yolks containing $60.7 \mu\text{g}$ of biotin totally (free biotin: 70%) in a healthy man.

▲: loading, ●: control. Arrow: loading time.

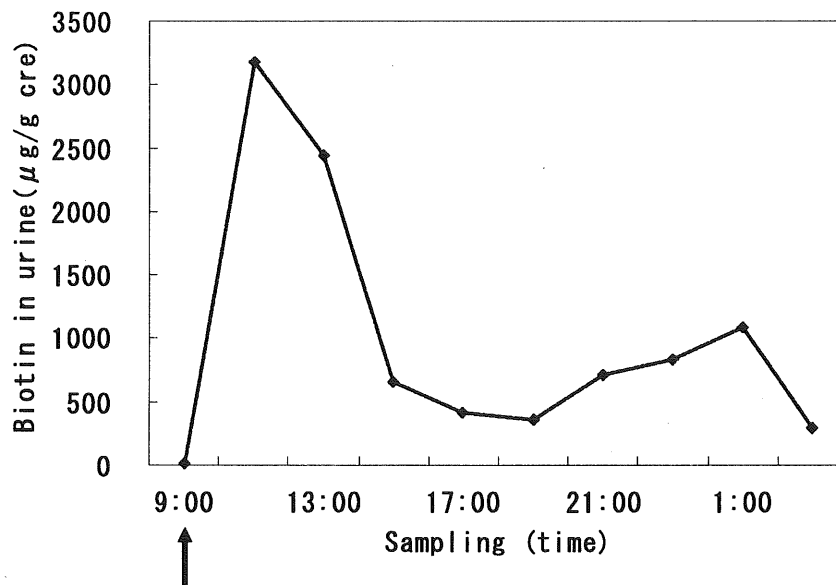


Fig. 6 Change in urine biotin levels after taking 10 mg of biotin in a healthy man.
Arrow: loading time.

考 察

本ATP法の特徴として、ビオチンの低濃度域において、ビオチン標準液の濃度と発光量との間には極めて高い相関が認められた。S/N比より、本定量法における検出限界は50pg/mlとした。このように、ATP法は、従来の比濁法の感度200pg/mlに比べ高い感度を示した⁶⁾。しかしながら、同時再現性は8.0%と高い精度が得られなかった。この原因のとして、L-L試薬添加後の測定時間を0.1秒にしたため、測定が安定しなかったのかもしれない。

L-L試薬は反応後、Fig. 2のように発光量が5分で40%減少する。本定量法ではL-L試薬の分注をマニュアルで行っているため、多数のサンプルを一度に測定する際に発光量に差が生じる。このため、測定時間を0.1秒に設定した。しかし、0.1秒では発光量が不安定なため、測定値にばらつきがみられたものと考えられる。今後、安定した測定結果を得るためには、測定時間を長くする必要があるかもしれない。あるいは、自動分注器によるL-L試薬の添加が不可欠かもしれない。

本実験では、ビオチン濃度が比濁法に比べてATP法で低くなった。これは、反応液pHが影響しているものと考えられる。L-L反応はpHが低下すると発光量が減少する。本測定系では、乳酸菌の増殖にともなう乳酸の産生によりpHが低下し、発光量が減少したものと思われた。本来、培養液の遠心沈渣を使用することが望ましいが、測定に迅速性が要求されるため、本定量法では、10倍量のpH7.75のリン酸緩衝液を用いた。しかし、結果的に、pH調整が不十分であった可能性が高い⁷⁾。

Table 1は、現在使用されているビオチン定量法の特徴をまとめたものである。微生物学的定量法は、汎用性の高い測定法である⁸⁻¹⁰⁾。本実験で示したように、微生物が産生するATPを指標として感度をあげることによって、本定量法の用途がさらに広がる。

今回の場合、尿中のビオチン濃度をみると大きな変動はみられなかったことから、一日を通してほぼ一定量のビオチンが尿中に排泄されていると推察される。また、ビオチンサプリメントを摂取した時と、ゆでた卵黄を摂取した時の尿中へのビオチン排泄パターンは、類似していた。尿中への排泄ピークはほぼ2時間後であった。しかし、ビオチンサプリメントを摂取したときの尿の方が、ピーク後尿中ビオチン濃度の減少が著しかった。これは、ビオチンサプリメントに含まれるビオチンは全てが遊離型であるため、すみやかに吸収された。これに対して、ゆでた卵黄中にはタンパク結合型(生卵の卵黄の遊離率71.1%)ビオチンが含まれている。タンパク結合型ビオチンは徐々に遊離し、吸収されたことによるものと推察される。

Table 1 Characteristics of biotin assays.

名前		感度	利点	欠点
微生物学的定量法	比濁法	0.2 ng/ml	感度が高い。また、特異性が高いので、試料を完全に精製しなくて良い。	大部分が結合型であるので、総ビオチン量を定量する時には、前処理として加水分解や酸素処理を行い、遊離型にする必要がある。また再現性があまりよくない。微生物の増殖を利用するため、培養に時間を要し、迅速性にかける。(8～15時間)
	ろ紙ディスクプレート法	10 ng/ml	多くの試料を一度に簡単に測定できる。	
	ATP 法	0.05 ng/ml	感度が高い。また、特異性が高いので、試料を完全に精製しなくて良い。	
理学的定量法	DACA 法	1～10 μ g/ml	操作が簡単で迅速に定量できる。	感度が低い。
	アビジン-HABA 法	0.4 μ g/ml		
	同位体希釈法	1 ng/ml	感度が高く、操作が簡単で迅速に定量できる。	放射性物質を使用して測定を行うので、測定できる場所が限定される。
	高速液体クロマトグラフィ法	3～400 ng/ml	構造的に類似したビオチン関連物質がよく分離されるため同時に分別定量できる。	精製の必要があり、前処理の複雑さが問題である。
酸素定量法		0.05 ng/ml	特異的で感度が高い。また、迅速に測定できる。	試料に酸素反応の妨害物質が存在すると不正確になるので、注意が必要である。また、放射性物質を使用して測定を行うので、測定できる場所が限定される。

結 語

今回開発した微生物学的定量法は、乳酸菌が産生するATPを利用した方法である。本ATP法は、検出限界が50pg/mlと、従来の濁度法と比べ、高感度である。測定範囲は50pg/ml～800pg/ml、添加回収率は94.1%、同時再現性は8%であった。

引用文献

- 1) 日本ビタミン学会編 (1996) ビタミンの事典, 日本ビタミン学会編, (株)朝倉書店. pp.307-313, pp.319-320.
- 2) Mock, NI, Malik, MI, Stumbo, PJ, Bishop, WP, and Mock, DM (1997) Increased urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid and decreased urinary excretion of biotin are sensitive early indicators of decreased biotin status in experimental biotin. Am J Clin Nutr, 65: 95-98.
- 3) Watanabe, T (1983) Teratogenic effects of biotin deficiency in mice. J Nutr, 113: 574-581.
- 4) 渡邊敏明, 福井 徹 (1995) 糖尿病患者精密検査該当者における血清ビオチンと血糖との関連についての検討. 微量栄養素研究, 12: 99-105.
- 5) Voigt, MN, Eitenmiller, RR (1984) Microbiological assays. In: Methods of Vitamin Assay, 4th Ed, A Wiley-Interscience. pp.43-63.
- 6) 和泉好計, 山田秀明 (1985) ビタミン学実験法 [I] 水溶性ビタミン, 日本ビタミン学会編, (株)東京化学同人. pp.481-485, pp.486-499.

- 7) 午島義雄 (1990) 生物, 化学発光の生物学, 医学への応用. ルミネッセンスの測定と応用～生物－化学発光の基礎と各種領域への応用～, 稲場文男, 後藤俊夫, 中野 稔 編, エヌ・ティー・エス. pp.233-271.
- 8) Fukui,T (1994) Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. J Nutr Sci Vitaminol, 40: 491-498.
- 9) Wright, LD, and Skeggs, HR (1944) Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*. Proc Soc Exp Biol Med, 56: 95-98.
- 10) DeMoll, E, and Shive, W (1986) Assay for biotin in the presence of dethiobiotin with *Lactobacillus plantarum*. Anal Biochem, 158: 55-58.