

マイクロバイオアッセイによるビオチン定量法の確立とビオチンの体内動態について

小山田 絵美¹⁾, 曾根 英行¹⁾, 平岡 真美²⁾, 宮西 邦夫¹⁾,
渡邊 敏明³⁾, 安田 和人²⁾, 香川 靖雄²⁾

(¹⁾県立新潟女子短大*, (²⁾女子栄養大**, (³⁾兵庫県立大・環境人間***)

Establishment of Microbiological Assay for Biotin and Investigation of Biotin Status in Young Japanese Women

Emi OYAMADA¹⁾, Hideyuki SONE¹⁾, Mami HIRAOKA²⁾, Kunio MIYANISHI¹⁾,
Toshiaki WATANABE³⁾, Kazuto YASUDA²⁾ and Yasuo KAGAWA²⁾

¹⁾Course of Food and Nutrition, Department of Human Life and Environmental science, Niigata Woman's College

²⁾Department of Medical Chemistry, Kagawa Nutrition University

³⁾School of Human Science and Environment, Himeji Institute of Technology, University of Hyogo

Summary

To establish a microbiological assay for biotin using *Lactobacillus plantarum* (ATCC8014) in a 96-well microtiter plate, we studied the influence of several pretreated biotin standard solutions on the microbial growth. Then, we measured serum biotin levels by our method, and assessed dietary biotin intake by a 3-day weighed food record to evaluate the biotin status in young Japanese women. A series of pretreatments, including an acid hydrolysis, inhibited growth of the organism. An inverse relationship was observed between growth inhibition and the dilution ratio of biotin standard solutions. These results indicated that biotin standard solutions should be pretreated in a way similar to that of the examination samples. Serum biotin levels ($48.3 \pm 17.4 \mu\text{g/mL}$) were above normal ($1.0 \mu\text{g/mL}$) and did not change after 14-day biotin supplementation ($60 \mu\text{g/day}$). Daily biotin intake ($48.3 \pm 17.4 \mu\text{g/day}$) calculated using the German food composition table was higher than the adequate intake (AD; $45 \mu\text{g/day}$) of Dietary Reference Intakes for Japanese. There was no correlation between biotin intake and serum biotin level. These results suggest that AD of biotin is sufficient to maintain normal biotin levels. However, further investigations considering other factors such as urine output and supply from enteric bacteria, are necessary to evaluate a more accurate biotin status.

ビオチンは、水溶性ビタミンの1つでアセチルCoAカルボキシラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、プロピオニルCoAカルボキシラーゼ、 β -メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼの補酵素として、糖新生、アミノ酸異化および脂肪酸合成に関与している。ビオチンは、レバー、大豆、卵黄など数多くの食品に含まれており、腸内細菌によっても供給されるため、欠乏症は起きないものと考えられてきた。しかし、生体を取りまく種々の環境因子による腸内細菌叢の変化やビオチンの生体内消費の異常増加が引き金となり、潜在性あるいは不顕在性ビオチン欠乏に陥る可能性が指摘されている^{1, 2)}。最近では、健常者においても腸内細菌叢由来のビオチンだけでは生体必要量を維持できないことが示

*所在地：新潟県新潟市東区海老ヶ瀬471 (〒950-8680)

**所在地：埼玉県坂戸市千代田3-9-24 (〒350-0288)

***所在地：兵庫県姫路市新在家本町1-1-12 (〒670-0092)

唆されており、食事由来のビオチンの重要性が再認識されている³⁾。しかし、食品中のビオチン含有量は、平成17年に改訂された「五訂増補日本食品標準成分表」には収載されておらず、「日本人の食事摂取基準 [2005年版]」についても、データの不足から生体利用率を考慮していない目安量の掲載にとどまっているのが現状である。

現在確立されているビオチン定量法には、微生物定量法、HPLC法、酵素定量法がある。微生物定量法は、大別して比濁法、ディスクプレート法、ATP法に分類される。比濁法は、感度が良く、試料の前処理の簡便さや多くの試料を一度に測定できることから一般に広く利用されている⁴⁾。しかしその反面、これまでの報告では、血清ビオチン濃度や食品中ビオチン含量に関するデータの不均一性から定量法としての信頼性を欠き、それが原因となって科学的データの不足につながっていると考えられる。微生物定量法では、ビオチンの酸や熱に対する安定性から、試料調整の際に行われる加熱-酸加水分解を含めた一連の前処理を標準液には施さないことが一般的である。しかし、これまでのビオチン含量に関するデータの不一致は、これら標準液と試料溶液の調整法の違いに起因すると考えられる。そこで本研究では、まずクリーンかつ簡便な96穴プレートを用いたマイクロバイオアッセイにより標準液に与える調整法の違いの影響を検討し、さらに、食事摂取基準を策定するための基礎的データの蓄積のため、健康な女子大学生の血清ビオチン濃度と食事調査の結果からビオチンの体内動態について検討した。

実験方法

96穴プレートを用いたマイクロバイオアッセイは、ビオチン要求菌株である乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* ATCC8014) を用いた微生物定量法-比濁法を採用した。接種菌は、乳酸菌をMRS培地で前培養し、滅菌生理食塩水で洗浄後、菌体数を濁度で調整した後1/100に希釈したものをを用いた。ビオチン定量用培地 (日本製薬株, 東京) に、pHを安定させるため10 mM HEPESを添加した後 (HEPESの添加により同一試料でのCV値の低下を確認した, Data not shown), 調整した乳酸菌を17:1の割合で混濁し、96穴プレートに1穴あたり180 μ Lずつ分注した。標準液あるいは試料を20 μ L添加後、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養し、乳酸菌の生育度をOD₆₅₅でマイクロプレートリーダー (BIO RAD) を用いて測定した。ビオチン標準溶液は、D-ビオチン (純度97.0%以上, 和光純薬工業株) を50%エタノールで1 mg/mLに調製し、再蒸留水で適宜希釈した。

生体中のビオチンは、通常タンパク質に結合した状態で存在する (結合型ビオチン)。乳酸菌は結合型ビオチンを利用することができないため、測定の際は以下に示す前処理が必要となる。

- 1) 試料と同量の4.5 N H₂SO₄添加
- 2) 加熱-酸加水分解 (121 $^{\circ}$ C, 1.2気圧, 1時間)
- 3) 同量の4.5 N NaOHで中和
- 4) 適宜, 再蒸留水で希釈

ビオチン標準液への加熱-酸加水分解を含めた一連の前処理と希釈の影響を検討するため、上記、加熱-酸加水分解、中和処理を施し、再蒸留水で1, 5, 10倍に希釈したビオチン標準液を調整し、乳酸菌の生育度の違いについて検討した。

次いで、ビオチンの体内動態について検討するため、血清ビオチン濃度とビオチン摂取量を測定した。健康な女子大学生 (18~22歳) 86人を対象とし、3日間連続の食事調査を4週間毎に4回行った。それぞれのビオチン摂取量は、食事記録をもとに海外の成分表値を使用して算出した。食事調査2回目と4回目では、前回の調査 (1回目と3回目) 以後の4週間、それぞれ30 μ gおよび60 μ gのビオチン負荷を行った。食事調査終了翌朝、採血して得た血液から血清ビオチン濃度を測定した。

結果と考察

1. マイクロバイオアッセイによるビオチン定量法の確立

はじめに、加熱処理によるビオチンの安定性を確認するために、標準液を121 $^{\circ}$ C, 1.2気圧, 60分間オートクレーブで加熱し、乳酸菌の生育度を検討した。その結果、標準液の加熱による影響は観察されず、生育曲線に大きな差は認め

られなかった (Data not shown)。以上のことから、ビオチンは121℃、1.2気圧、60分間程度の加熱に対し安定であることが示された。

ついで、加熱-酸加水分解を含めた一連の前処理を施した後、1、5、10倍に希釈したビオチン標準液での乳酸菌の生育度を検討した (Fig. 1)。乳酸菌の生育は、前処理によって低下し、その程度は希釈度と反比例する傾向にあった。検量線の検出領域であるビオチン濃度0~0.5 ng/mLの範囲においても、生育曲線に明らかな差異が観察された。以上のことから、微生物定量法によるビオチン測定の場合、標準液は試料と同様の前処理と希釈が必要であることが示された。

標準液の前処理で乳酸菌の生育が悪化した原因として、(i) 加熱-酸加水分解処理中でのビオチンの構造変化とそれに伴う乳酸菌の生育低下、(ii) 前処理に伴う SO_4^{2-} や Na^+ の測定培地への混入による乳酸菌の生育阻害、の可能性が考えられる。

(i) については、Mock等により詳細に報告されている^{5,6)}。彼らの報告によると、脂質含量の多い試料では、ビオチンは加熱-酸加水分解中にビオチンスルホキシドへと酸化され、さらに血清アルブミン非存在下では酸化率は100%となる。また、脂質含量の少ない試料の場合においても、ビオチンは加熱-酸加水分解により95%以上がタンパク質から遊離するが、10%程度の遊離ビオチンはビオチンスルホキシドへと酸化される。しかし、ビオチンスルホキシドは、乳酸菌の生育においてほぼ100%ビオチンと同じ活性を示すため^{7,8)}、乳酸菌の生育に及ぼすビオチンスルホキシドの影響はないものと推察される。これらのことから判断すると、乳酸菌の生育低下の原因として、上記(i)は棄却できるものと考えられる。

乳酸菌の生育が希釈の程度に従い変化したことから、その原因として(ii)の可能性が考えられる。前処理を施した溶液を適宜希釈した場合、標準液に含まれる SO_4^{2-} (H_2SO_4 由来)濃度と Na^+ (NaOH 由来)濃度は、1倍希釈では0.75 Mと1.5 M、5倍希釈では0.15 Mと0.3 M、10倍希釈では0.075 Mと0.15 Mとなる。そこで、乳酸菌の生育に及ぼす Na^+ の影響を検討するために、1.5 M NaClを含むビオチン標準液を調整し、バイオアッセイを行った (Fig. 2)。その結果、NaCl添加による影響は観察されず、生育曲線に大きな差は認められなかった。このことから、今回使用した濃度の Na^+ では、乳酸菌の生育に影響しないことが示された。

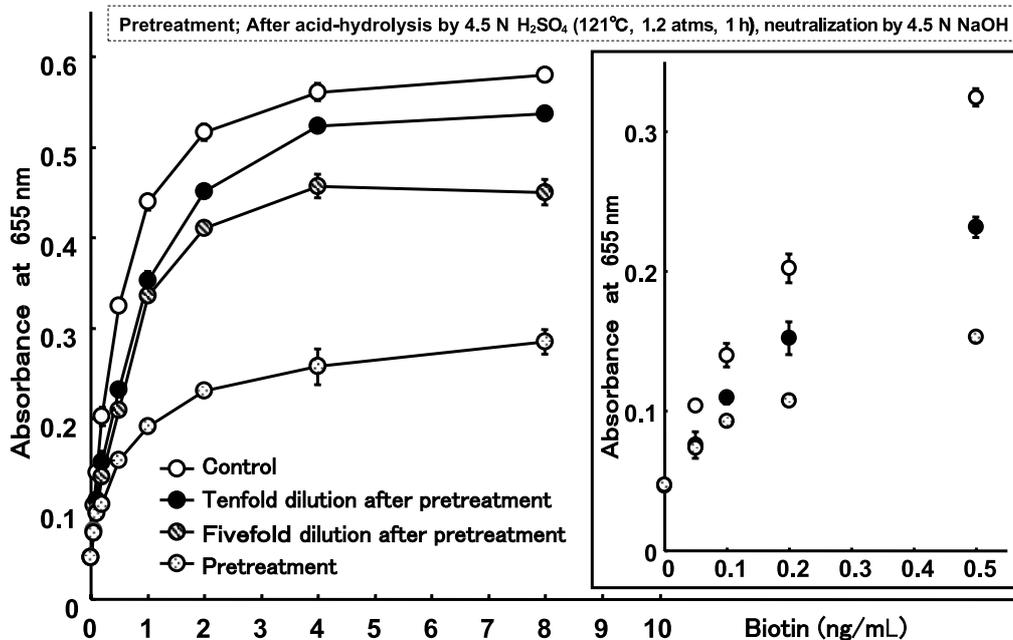


Fig. 1 The influence of several pretreatment of biotin standard solutions on the growth of *Lactobacillus plantarum* (ATCC8014).

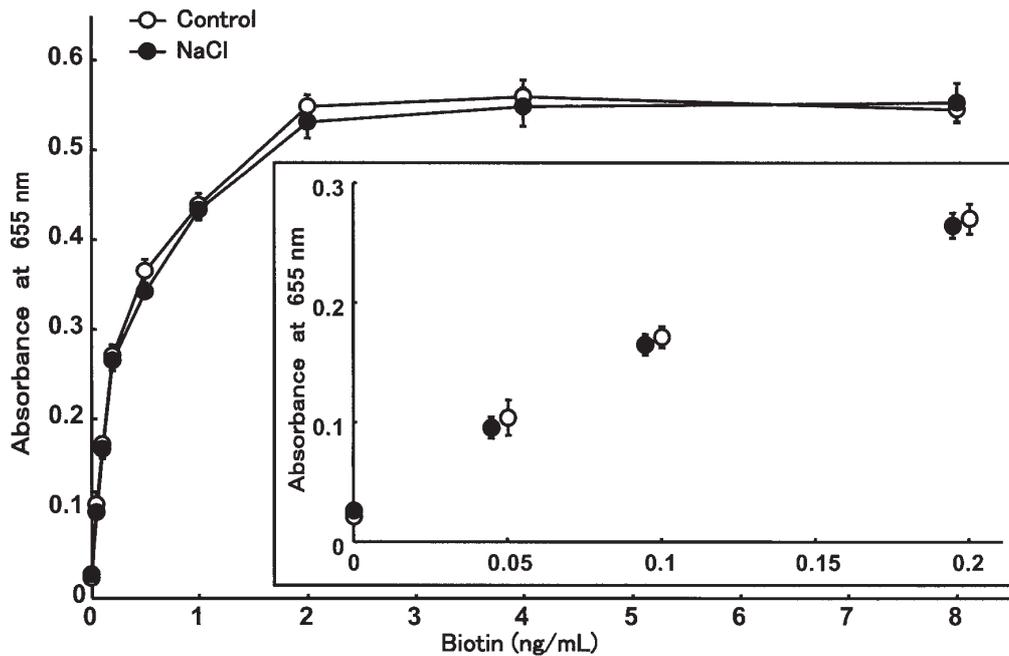


Fig. 2 The influence of NaCl on the growth of *Lactobacillus plantarum* (ATCC8014).

以上のことから判断すると、標準液の前処理により使用した硫酸由来の SO_4^{2-} が、乳酸菌の生育を悪化させる原因と推察される。 H_2SO_4 による酸加水分解処理による影響が懸念される一方で、4.5 M NaCl添加では影響が認められなかったことから、 Cl^- が乳酸菌の生育に影響を与えることは考え難い。つまり、HClを用いた酸加水分解処理では乳酸菌の生育に与える影響は少ないと考えられる。今後、これらの方法についても検討していきたい。また、(i)の可能性については上記理由により否定したが、前処理により、ビオチンがビオチンの光学異性体もしくはビオチンスルホキシドの光学異性体へと構造変化した場合、ビオチン活性は完全に失われることになる²⁾。これらについては、今後NMR等による詳細な機器分析が必要と考える。

2. 食事調査によるビオチン摂取量と血清ビオチン濃度の検討

食事記録からドイツの食品成分表の総ビオチン値を利用し、摂取量を算出したところ、 $48.3 \pm 17.4 \mu\text{g}/\text{day}$ となり、日本人の食事摂取基準(2005年版)の目安量 $45 \mu\text{g}/\text{day}$ を満たしていた。その人数は、86人中53人であり、その割合は61.6%であった(Fig. 3)。ビオチンの主な供給源は、大豆、同製品を中心とする豆類(全摂取量の20.4%)、穀類(16.3%)、卵類(16.3%)、乳類(13.0%)などであった。食品別にみると、鶏卵 $7.6 \mu\text{g}/\text{日}/\text{人}$ 、豆腐 $4.7 \mu\text{g}/\text{日}/\text{人}$ 、精白米 $2.6 \mu\text{g}/\text{日}/\text{人}$ 、普通牛乳 $2.4 \mu\text{g}/\text{日}/\text{人}$ 、スパゲッティ $2.0 \mu\text{g}/\text{日}/\text{人}$ 、糸引き納豆 $1.5 \mu\text{g}/\text{日}/\text{人}$ であった。血清ビオチン濃度は、 $1.94 \pm 1.41 \text{ ng}/\text{mL}$ であり、境界域である $1.0 \text{ ng}/\text{mL}$ を大きく上回っていた。その人数は、86人中70人であり、その割合は81.4%であった(Fig. 3)。以上のことから、本被験者は健常な集団であり、日本人の食事摂取基準(2005年版)の目安量 $45 \mu\text{g}/\text{day}$ は、妥当な数値であると推察される。また、ビオチン摂取量が十分であるにもかかわらず、血清ビオチン濃度が $1.0 \text{ ng}/\text{mL}$ 以下の対象者が10名程度観察され、ビオチン摂取量と血清ビオチン濃度の間に正の相関が認められなかった。これらの原因として、ビオチンの出納に関わる摂取量以外の要因、特に腸内細菌からの供給に問題があるのではないかと考えられる。今後、これらの影響についても検討していきたい。

ビタミン剤による4週間のビオチン負荷($30 \mu\text{g}/\text{日}$ と $60 \mu\text{g}/\text{日}$)前後での血清ビオチン濃度の変化をFig. 4に示した。なお、対象者は78人であり、4回の採血前3日間の食事由来ビオチン摂取量($48 \pm 3 \mu\text{g}$)に有意差は認められなかった。 $30 \mu\text{g}$ および $60 \mu\text{g}$ のビオチン負荷による血清ビオチン濃度の変化は観察されなかった。経口摂取されたビオチンは、速やかに尿中へと排泄されることが知られている。また、生体におけるビオチンの貯蔵には閾値が存在することが示唆

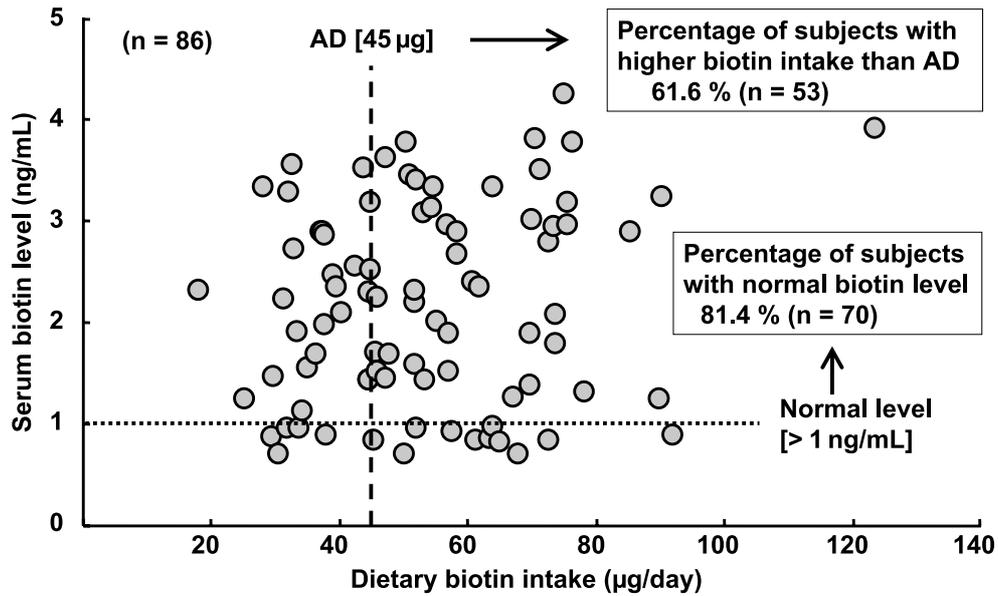


Fig. 3 Correlation between dietary biotin intake and serum biotin level in young Japanese women.

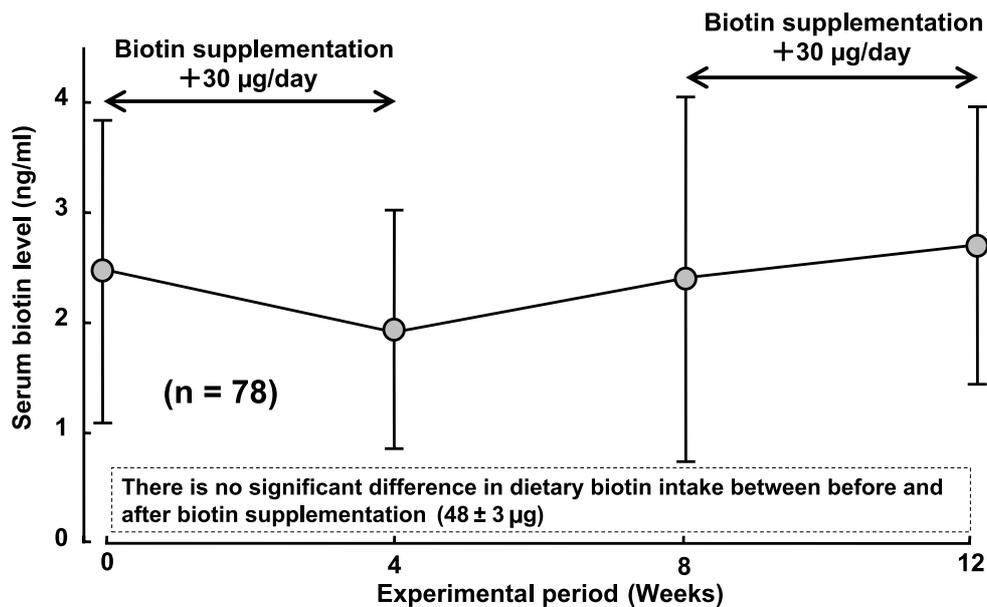


Fig. 4 Change in serum biotin level after biotin supplementation.

されている。そのため、ビオチンの経口負荷が血清ビオチン濃度に反映されるためには、対象者が摂取量をはるかに凌ぐ多量のビオチンを摂取するか、生体内ビオチン量が不足した状態にあることが不可欠と推察される^{3,9,10}。

事実、調査開始時とビオチン(60 µg/日)負荷後の血清ビオチン濃度のヒストグラムを比較すると、血清ビオチン濃度の平均値(2.46 ± 1.41 ng/mL vs 2.70 ± 1.26 ng/mL)に有意差は見られないものの、調査開始時に11人いた境界領域である1.0 ng/mL以下の対象者(全体の14.1%)は5人(全体の6.4%)へと回復し、不均衡であったヒストグラムのパターンは正規分布を示すようになった。この結果は、60 µg程度のビオチン負荷が、生体内ビオチン不足状態の予防に一定の効果を示すことを示唆している。しかし、ビオチンの体内動態を正確に把握するためには、尿中排泄量や腸内細菌からの供給などビオチンの出納に関わる全ての要因について詳細に検討する必要があるものと考えられる。

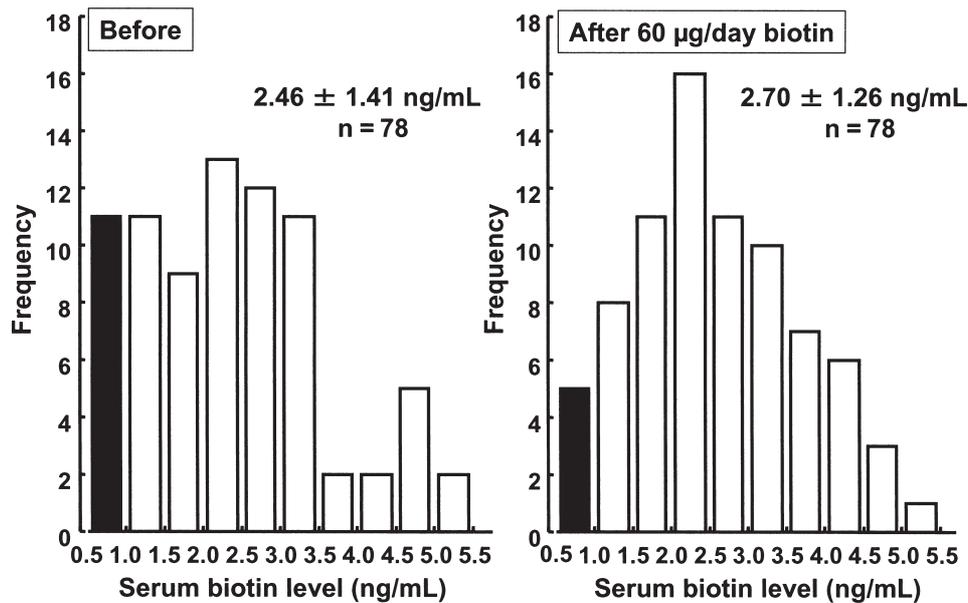


Fig. 5 Histograms of serum biotin levels before and after biotin supplementation (60 mg/day).

参考文献

- 1) 福井 徹, 石盛嘉浩, 榎原周平, 木村幸子, 渡辺敏明 (2006) 母乳および人口栄養乳児におけるビオチンの体内動態の検討. *Trance Nutrients research* 23 : 5-12.
- 2) 木村修一, 小林修平 (2002) 最新栄養学 [第8版] - 専門領域の最新情報 -. 社建白社 : pp. 249-260.
- 3) 奥田涼子, 谷口歩美, 榎原周平, 福井 徹, 渡辺敏明 (2004) ATPを指標としたビオチンの微生物学的定量法の検討 *Trance Nutrients research* 21 : 141-147.
- 4) Fujimoto W, Inaoki M, Fukui T, Inoue Y, Kuhara T (2005) Biotin deficiency in an infant fed with amino acid formula. *J Dermatol.* 2005 32(4): 256-261.
- 5) Mock DM, Mock NI, Langbehn SE (1992) Biotin in human milk: methods, location, and chemical form. *J Nutr.* 122(3): 535-45.
- 6) Staggs CG, Sealey WM, McCabe BJ, Teague AM, Mock DM (2004) Determination of the biotin content of select foods using accurate and sensitive HPLC/avidin binding. *J Food Compost Anal* 17(6): 767-776.
- 7) Wright LD, Creason EL Driscoll CA (1956) Biotin Derivatives in Human urine. *Proc Soc Exp Biol Chem* 91: 248-252.
- 8) Melville DB, Genghof DS Lee JM (1954) Biological properties of biotin d- and l-sulfoxides. *J Biol Chem* 208(2): 503-512.
- 9) 柴田克己 (2006) ビオチンの大量摂取がラットに与える影響 厚生労働科学研究費補助金 (循環器疾患等総合研究事業) 日本人の食事摂取基準 (栄養所要量) の策定に関する研究, 平成17年度報告書 : pp. 66-90.
- 10) 永井良子, 谷口歩美, 榎原周平, 福井 徹, 渡辺敏明 (2007) マウスにおけるビオチン過剰摂取による生体影響の検討 *ビタミン* 81(4) : 175.