

厚生労働科学研究費（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）

日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

分担研究報告書

水溶性ビオチンの食事摂取基準の妥当性の検討 - ビオチン -

分担研究者 渡邊敏明 姫路工業大学 教授

研究協力者 福井徹 病体生理研究所 室長

研究要旨

本年度においては、成人男女各 10 名を対象として、一定期間に所要量に見合った試験食およびサプリメントとして所用量と同量のビタミン混合物を摂取させた。ビタミン混合物中のビオチンは 30 μ g で、1 日 3 回に分けて摂取させ、血清および尿中ビオチン濃度を寒天プレート法により測定した。

血清中濃度は本実験中の変動は認められなかったが、尿中排泄量は男女ともに経日的に増加し、男女間で有意な差が見られた。以上の結果から、血液中ではビオチンの動的平衡が保たれていると考えられた。しかしながら、来年度においては蛋白を含む物質中のビオチン測定法の検討、尿中ビオチン代謝物測定法の検討、ビオチン必要量の指標の検索が必要である。

第1章

A 歴史

ビオチンは1927年、酵母の成長促進の有機成分として Boas によって発見された。この成分はビオス (bios) とよばれ、その後3つの異なった成分からなることが明らかになった。その一つのビオス b がビオチン (biotin) で、Kogl と Tonnis(1936)によって卵黄からメチルエステル化合物として単離、結晶化された。

一方、実験動物においては生卵白を多量に与えると、皮膚炎や脱毛などの特徴的な症状が引き起こされる卵白障害 (egg white injury) が知られており、これらの症状は肝臓に存在する因子によって治癒することができた。

また、これとは別に、Gyogy(1931)も肝臓に存在する同様の因子を見出し、ビタミン H (Haut:皮膚の意) と名づけた。この因子は卵白障害防御因子とも呼ばれたが、根粒菌 (*Rizolium trifolii*) に存在している成長呼吸促進因子 (コエンチーム R: coenzyme R) と同じものであった。このほか、factor S, factor W, vitamin Bw などとも呼ばれたが、後にビオチンとビタミン H は生理学的、生化学的、生物学的に同一の特性をもつことが認められた。さらに、du Vigneaud ら (1940)、Harris ら (1945) によってビオチンの構造が決定され、化学合成も可能になった。

その後、ビオチンはカルボキシラーゼの補酵素として炭酸固定や炭酸転移反応に直接関与していることが判明し、さらに種々のビオチン酵素の機能を介して糖新生、アミノ酸代謝、脂肪酸合成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。一方ではビオチンの生合成経路の解明や定

量法の開発がされ、ビオチン含有酵素の異常による先天性代謝異常症をはじめ臨床面のビオチンの研究も進み、皮膚疾患や種々の疾患においてビオチンとの関連性に興味もたれている。また、ビオチンの新しい生理機能として、胎児の発育・分化における成長因子 (growth factor) としての役割も解明されつつある。

B 生化学的特性

ビオチンの化学名は (+)-cis-hexahydro-2-oxo-1H-thieno[3,4]-imidazole-4-valeric acid で、分子量は244.3である。天然に存在するビオチンはD型で、2つの5員環の結合がシス配位し、ウレイド環を形成する6個の原子 (C,N,O) は同一平面上にあり、環状部分は舟型をしている (図1)。

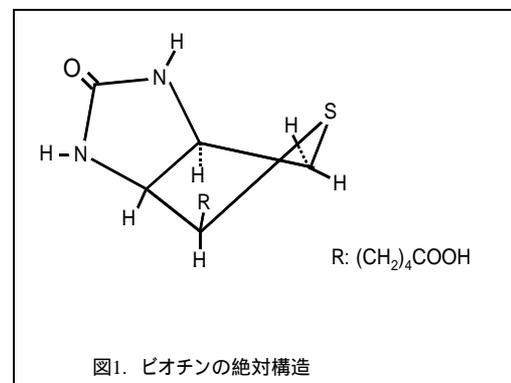


図1. ビオチンの絶対構造

5員環部分は輸送タンパク質やアビジンとの結合に重要な役割を果たし、特にアビジンやストレプトアイジンとは特異的に強固な結合 ($K_d=10^{-15}M$) をする。吉草酸部分はビオチン補酵素のペプチド結合への関与や細胞内取り込みの際の認識部位となっている。

C 測定方法

ビオチンの定量は微生物学的定量法

(microbioassay)、アビジンやストレプトアビジンとの結合法(バインディングアッセイ、binding assay)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法に大別できる。

ビオチンは大部分がタンパク結合型であるため、総ビオチンの定量には前処理が必要である。酸加水分解やパインによる酵素処理によって遊離型とする。

生体試料の場合には微生物学的定量法が一般的であり、特異性も高いため、試料の分離精製が不要である。測定には特異性の点で乳酸菌の *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を使用する場合が多い。この中でも比濁法を改良した寒天プレート法は簡便性、測定範囲、精度、感度などにおいて優れている。

バインディングアッセイは競合的タンパク結合反応を利用したもので、酵素やラジオアイソトープを標識したビオチンと試料中のビオチンとをアビジンもしくはストレプトアビジンに競合させる方法で、検出法としては比色法、同位体希釈法が行われてきたが、最近では電子スピン共鳴法、バイオセンサー法も報告されている。

HPLC 法はある程度の試料の精製が必要であり、電気化学検出(ECD)、ラジオアイソトープ、蛍光、分離後のバインディングアッセイとの組み合わせで測定されている。

D 生理作用

ビオチンの生理作用は直接的にはビオチン酵素の補欠分子族としてカルボキシル化反応への関与であり、間接的にはそれらの酵素反応が関与する糖新生、分岐鎖アミノ酸代謝、脂肪酸合成、エネルギー代謝である。ビオチンの欠乏はビオチン酵素を介して体内代謝に影響し、特定の代謝物の

体内レベルや尿中排泄量の増減として現れる。

ビオチン酵素は哺乳動物では、ピルビン酸カルボキシラーゼ(pyruvate carboxylase: PC)、 α -メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ(α -methylcrotonyl-CoA carboxylase: MCC)、プロピオニル CoA カルボキシラーゼ(propionyl-CoA carboxylase: PCC)、アセチル CoA カルボキシラーゼ(acetyl-CoA carboxylase: ACC)の4種類が知られており、それぞれビオチンと共有的に結合している。4種はともにミトコンドリア内に存在するが、アセチル CoA カルボキシラーゼは細胞質内にも存在している。ミトコンドリア内のアセチル CoA カルボキシラーゼはアポ酵素としてビオチン貯蔵の役割を果たしている。

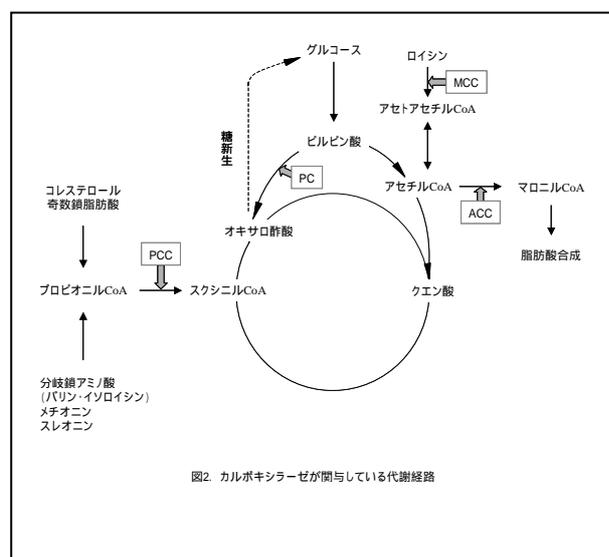
アセチル CoA カルボキシラーゼはアセチル CoA のマロニル CoA への反応を進め、脂肪酸合成に関与する。

ピルビン酸カルボキシラーゼはピルビン酸をオキサロ酢酸に変える。そしてそれは肝臓、腎臓などでグルコースに変えられる。ビオチン欠乏で本酵素の活性が低下すると、ピルビン酸や乳酸の蓄積が起こる。脳におけるビオチン欠乏は乳酸の蓄積による緊張低下、けいれん、運動失調、発育遅延などの神経系症状と関連している。

α -メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼは分岐鎖アミノ酸のロイシンの分解に必要な酵素である。ビオチン欠乏での本酵素活性の低下によって、ロイシンの他の経路による分解が進み、3-ヒドロキシイソ吉草酸(3-hydroxyisovaleric acid:3-HIA)と3-メチルクロトニルグリシン(3-methylcrotonylglycine)の産生が増加する。

プロピオニル CoA カルボキシラーゼはプロピオニル CoA をD-メチルマロニル CoA の形にする。その後、スクシニル CoA になり、ひきつづいて

TCA サイクルに入る。本酵素の活性低下は尿中に 3 - ヒドロキシプロピオン酸と 3 - メチルクエン酸排泄の増加として現れる(図 2)。



細胞内でこれらのビオチン酵素はビオシチン (γ-N-biotinyl-L-Lysin) あるいはビオチン結合のリジン残基を含む短鎖のオリゴペプチドに分解される。加水分解酵素のビオチニダーゼがこのオリゴペプチドからビオチンを遊離し、ビオチンは再利用される。

分子生物学的にはグルコキナーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼの mRNA への影響が報告されている。また、細胞分裂などの細胞周期の進行に必須であることが判明している。

E ビオチン欠乏症

ビオチン欠乏障害を最初に報告したのは

Boas(1927)である。多量の生卵白飼料を与えたラットに脱毛を伴った湿疹性の皮膚炎を観察した。その後、多くのげっ歯類や小型の哺乳動物では、卵白飼料を長時間与えると、体重の減少に伴って口周囲に赤色鱗状斑や眼瞼の炎症を生じ、体毛が粗になり脱毛が現れる。特に眼瞼周囲の脱毛(眼鏡状脱毛: spectacle eye)、後肢のけいれん、異常姿勢(カンガルー様姿勢)などが特徴的である。これらは卵白に含まれているアビジンが消化管内でビオチンと特異的に結合し、腸管からのビオチン吸収を阻害しているためである。これらの症状はビオチンの飼料への添加や皮下注射により速やかに消失する。

ヒトでは Sydenstricker による卵白障害の実験(1942)がある。毎日 200 g の乾燥卵白を与えたとき、7 週以降では体内のビオチン低下に伴って皮膚の発赤、疲労感、筋肉痛、知覚異常、嘔吐などの症状が現れ、血液学的にもヘモグロビン減少、コレステロールの増加などが観察されている。これらの症状はビオチン 150 μg/日を投与すると 3 ~ 5 日後に消失し、尿中ビオチンも正常にもどっている。

栄養性ビオチン欠乏症は腸管から吸収されるビオチンの不足によって引き起こされる。

摂取不足によるビオチン欠乏症として、わが国ではアレルギー治療用特殊ミルクやメチルマロン酸血症治療用ミルクの摂取によるビオチン欠乏症、またビオチン無添加の高カロリー輸液によるビオチン欠乏症も報告されている。

ヒトのビオチン欠乏症は、このような栄養性ビオチン欠乏症のほか、先天性代謝異常症としてビオチニダーゼ欠損症、カルボキシラーゼ欠損症がある。

ビオチニダーゼ欠損症は活性低下によって、細

胞内ではカルボキシラーゼの分解によるビオチンのリサイクルに障害を起こし、細胞外ではビオシチンあるいはビオチニルペプチドからのビオチンの遊離、細胞内へのビオチン取り込みの低下を起こし、結果的にビオチン欠乏を引き起こすものである。血清ビオチンダーゼ活性が正常平均値の10%以下を完全欠損、10%～30%を部分欠損としている。

カルボキシラーゼ欠損症は単一あるいは多数のカルボキシラーゼ欠損がある。マルチプルカルボキシラーゼ欠損症は新生児・乳児型と遅発・乳幼児型があり、前者はホロカルボキシラーゼ合成酵素の欠損でビオチン薬理量のビオチン経口投与によってカルボキシラーゼ活性は正常に戻るが、後者は繊維芽細胞のカルボキシラーゼ活性は正常であり、腸管でのビオチン吸収異常によって起こる。

アセチル CoA カルボキシラーゼとプロピオニル CoA カルボキシラーゼは前者が脂肪酸合成、後者がコレステロール側鎖および奇数鎖脂肪酸の代謝に直接関与するビオチン酵素であるが、ビオチン欠乏により引き起こされたこれらの酵素の活性低下は肝臓、皮膚、血清中の脂肪酸の割合を変化させ、特に奇数鎖脂肪酸の割合を増加させる。

ヒトでの臨床所見は顔面周囲の皮膚炎、結膜炎、脱毛、運動失調、緊張低下、ケト乳酸アシドーシス、有機酸尿、けいれん、皮膚感染、乳児や幼児の発育遅延である。さらに、慢性的に生卵白を摂取した成人や青少年では毛髪の退色を伴う脱毛、落屑性の脂漏性湿疹、紅斑性湿疹、うつ、嗜眠、幻覚、四肢の感覚異常がみられている。

免疫系では細胞性、体液性の免疫機能において影響が現れ、先天性ビオチン代謝異常の小児においてカンジダ皮膚炎が観察されている。このよう

な小児では皮内テストで反応が遅く、IgA 欠乏や T 細胞の割合が低い。ラットでは抗体産生が低下し、マウスではビオチン依存性カルボキシラーゼの活性の低下、脾臓 B 細胞数は減少するが、T 細胞の割合は増加する。

ビオチン欠乏症に対して5～40mg/日のビオチン投与が一般的である。

F その他のビオチン関連疾患

糖尿病では、インスリン依存性糖尿病でビオチン内服により絶食時血糖の低下が観察され、ビオチン欠乏ラットではインスリン分泌応答が低下し、ビオチン投与によって回復すること、さらにインスリン抵抗性糖尿病ラットへのビオチン投与による筋肉への糖の取り込みの実験においてビオチンはインスリン抵抗性を改善することが示唆されている。

乳幼児の脂漏性湿疹、レイナー病 (Leiner's disease: 落屑性紅皮症) で血中、尿中のビオチンが低下している。これは母乳中ビオチンの不足や腸管からのビオチン吸収障害が考えられている。一般に乳児では母乳からのビオチン供給が妨げられると、容易にビオチンの不足状態になる。突然死の乳幼児の肝臓ビオチン量が先天異常などを原因として死亡した乳幼児と比べ低くなっていることから突然死にビオチンの関与が考えられている。

掌蹠膿疱症性骨関節炎や乾癬、アトピー性皮膚炎がビオチンの大量投与によって改善が見られる例があり、ビオチンの免疫機能やアミノ酸代謝への関与が考えられている。

長期血液透析患者でもビオチン欠乏症状と種々の神経障害がみられ、ビオチン投与により神経症状の改善が報告されている。

抗けいれん剤の長期投与で血中ビオチン濃度の低下と有機酸の増加が認められている。特にプリミドンやカルバマゼピンは腸管でのビオチン吸収を妨げることが判明し、フェノバルビタール、フェニトイン、カルバマゼピンはビオチンダーゼとビオチンの結合を阻害し、細胞への取り込みに影響があると考えられている。

G ビオチン欠乏の催奇形作用

ビオチン欠乏は数種類の動物で催奇形性作用が報告されているが、哺乳動物ではげっ歯類において、ラットを妊娠前からビオチン欠乏状態にすると、胎子や出産仔の数や体重の減少、吸収胚、死亡胎子の増加がある。しかし、形態異常は認められていない。マウスでは妊娠中のビオチン欠乏は胎子の奇形や死亡を著しく増加させる。主な形態異常は口蓋裂、小顎症、短肢症で、骨格は下顎骨、頭骸の低形成や頸椎弓の異常が特徴的である。ハムスターにおいても胎子発育の抑制や吸収胚、死亡胎子の増加があり、生存胎子には妊娠中期から形態異常や骨格異常がみられる。げっ歯類の中での催奇形性の違いは母体から胎子へのビオチン輸送の違いによって起こるものと思われる。

ビオチン欠乏によって生じた脂質代謝の変化がビオチン欠乏のヒナの発育と骨格に影響を及ぼしている可能性も報告されている。

雄の哺乳動物の生殖器およびその付属機関においても、長期間のビオチン欠乏状態で前立腺や精巢の萎縮、細精管の変性があり、ビオチンは雄性生殖腺の発育、機能維持に必要であり、性ホルモン合成と分泌に関連している。

H 疫学調査

部分欠損を含む先天的なビオチンダーゼ欠損

症、ビオチン依存性のカルボキシラーゼ欠損症、特殊ミルクやビオチン無添加の高カロリー輸液によるビオチン欠乏症などはごくまれである。

このうち、先天性代謝異常症としてのビオチンダーゼ欠損症は、わが国ではこれまで完全欠損が1例のみで、部分欠損症の報告は数例に過ぎない。

海外では部分欠損を含む先天性ビオチンダーゼ欠損症の頻度は新生児の6万人に一人の割合である。単独のカルボキシラーゼ欠損症として最多のプロピオニル CoA カルボキシラーゼ欠損症の推定頻度は35万人に一人の割合である。他のカルボキシラーゼ欠損症の発生頻度はさらに低い。

わが国におけるビオチン欠乏症は、日常遭遇する疾患の中でのビオチン欠乏や依存症の可能性が推測されてはいるが、データの蓄積は不十分である。

一方、健常者のビオチン状態については、血液や尿を材料として測定されてきたが、測定法、報告者によりさまざまであり、かつ疾患グループとの比較や診断のための対照として測定されていたにすぎず、比較的多数の健常者の血液中濃度(表1)でもすべて微生物学的定量法で、近年ではWatanabeら(1998)の調査のみである。

表1 健常者測定数100例以上の血液中ビオチン濃度

	対象数(年齢)	Biotin(ng/mL)	測定法	報告年	著者
血漿	642(10-13y)	0.22-0.68	Microbioassay (<i>O.danica</i>)	1967	Baker H et al.
全血	204(20-50y)	0.22-0.75	Macrobioassay (<i>O.danica</i>)	1980	Baker H
血漿	264(42.3 ± 14.5y)				
	男 57	0.44 ± 0.18	Microbioassay (<i>L.plantarum</i>)	1982	Krause KH et al.
	女 36	0.46 ± 0.23			
血漿	112(小児)	0.40 ± 0.12	Microbioassay (<i>L.plantarum</i>)	1985	Krause KH et al.
血清	190	2.7 ± 0.53	Microbioassay (<i>L.plantarum</i>)	1994	Fukui T et al.
血清	685 (65j<)	2.5 ± 1.76	Microbioassay (<i>L.plantarum</i>)	1998	Watanabe T. et al.
	2,004 (65j>)	2.5 ± 1.76			

尿中ビオチン濃度は比較となる単位表記が報告者により異なり、さらに問題を複雑にしている

(表 2)。

対象(年齢)	Biotin	単位	測定法	報告年	著者
成人 600(20-50y)	6-50	μg/day	Microbioassay (<i>O.danica</i>)	1981	Sweetm
小児 11	65.9 ± 34.6	μg/gCre	Avidinbinding	1986	Chan P
成人 28	10	μg/day	Avidin binding	1989	Bitsch
成人 31	9.8-63.5	μg/gCre	Isotope dilution	1989	Velazq
成人 30(21.1-51.9y)	23.2 ± 6.1	μg/day	Avidin binding	1989	Lomba
小児 29(2.4-15.1y)	20.0 ± 9.8	μg/day	Avidin binding	1989	Lomba
成人 10	6.5 ± 2.1	μg/L	HPLC/avidin binding	1993	Mock D
成人 59	12.4 ± 5.56	μg/gCre	Microbioassay (<i>L.plantarum</i>)	1994	Fukui T
成人 14 (25-50y)	7.8 ± 4.9	μg/gCre	HPLC/avidin binding	1997	Mock D
成人 13	10.0 ± 4.4	μg/L	HPLC/avidin binding	1997	Mock N
成人 40 (45.7 ± 10.9y)	14.7 ± 12.1	μg/day	ELISA (avidin binding)	1998	Jung U
成人 23	4.5-17.3	μg/gCre	HPLC/avidin binding	2002	Mock D

母乳中濃度も測定されているが、研究も少なく、日本人のビオチン必要量を推定するには至っていない。

I 所要量

健常者での食品からのビオチン吸収と血中濃度、尿中排泄との関係、食品中濃度とビオチン欠乏発症の関係からビオチンの平均必要量 (EAR) を推定し、栄養所要量を算出するためには、現在のデータはきわめて不十分である。さらに、通常の食品中のビオチン濃度と生物学的有用性の測定の標準化が課題となっている。

食品中ビオチン濃度は前述したように測定法の課題が残っており、生物学的有用性についても Mock らが HPLC とアビジン結合法の組み合わせによってビオチンとビオチン代謝物の分別定量を報告したが、研究は緒についたところである。

母乳がビオチン代謝物を含めて測定されてきた唯一の食品である。初乳と成乳にいたるまでの過

渡的な母乳のビオチン代謝物濃度はビオチン濃度を上回るが、成乳ではビオチンは約 70% となっている。この意義付けも明確ではない。また、多くの食品におけるビオチンの存在形態はタンパク結合であり、ビオチン測定のための前処理段階でビオチン自体の分解も問題となる。酸加水分解法では母乳の場合、ビオチンの 12~37% 破壊されたと報告されており、食品中のビオチン濃度を真の値よりも低く算出することになる。

測定法の確立と標準化が焦眉の課題である。

J A I

ビオチン欠乏の指標として、血清あるいは血漿ビオチン濃度があるが、生卵白摂取者の 50%、明らかなビオチン欠乏症の例でも低下が認められず、必ずしも良い指標とはいえない。

また、ビオチン欠乏によるプロピオニル CoA カルボキシラーゼ活性低下に伴って、血漿脂質の奇数鎖脂肪酸が蓄積され、コレステロールエステル、リン脂質、トリグリセリド、遊離脂肪酸の増加があるが、組成の変化が一定ではなく、この測定の感度と臨床的意義が残された課題である。

尿ではビオチン欠乏によって尿中排泄が異常低下し、 γ -メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼの活性低下によるロイシン代謝の変化で 3-HIA の異常増加があり、同時にビスノルビオチンの排泄も減少し、ビオチンの生物学的有用性の低下を表している。3-HIA は比較的早期に出現し、ビオチン欠乏の良い指標といわれている。

以上のような新しい知見がありながらも、健常者でのビオチン摂取不足に起因したビオチン欠乏症を証明した決定的な研究がない。したがって、現行のビオチンの食事からの平均摂取量をそのまま必要量とすることになる。その出発点となる

のが母乳中ビオチン濃度である。

母乳は各種報告から $6\mu\text{g/L}$ と概算され、乳児の摂取量が算出されている。その摂取量を基本とし、体重比の変動を加味して算出されてきた。ただし、妊婦の尿中のビオチン、ビスノルビオチンの低下、3-HIA の増加、血清ビオチンの低下は、軽度のビオチン欠乏が起きていることを示しており、また、授乳はビオチンの必要性を高めるため、妊婦においてはビオチン必要量を増やしている(表 3)。

年齢 (歳)	所要量 (μg)	許容上限 摂取量
0 ~ (月)	5	-
6 ~ (月)	6	-
1 ~ 2	8	-
3 ~ 5	10	-
6 ~ 8	14	-
9 ~ 11	18	-
12 ~ 14	22	-
15 ~ 17	26	-
18 ~ 29	30	-
30 ~ 49	30	-
50 ~ 69	30	-
70以上	30	-
妊婦	+0	-
授乳婦	+5	-

第六次改定日本人の栄養所要量

K 食品

食品中のビオチン濃度は微生物学的定量法が使われている。ビオチンは種々の食品に含まれ、他のビタミン B 複合体とともに存在している。特にローヤルゼリー (約 $400\mu\text{g}/100\text{g}$)、酵母 ($200\mu\text{g}$)、レバー ($100\mu\text{g}$)、卵黄 ($50\mu\text{g}$) や魚肉 ($20\mu\text{g}$) などに多く含まれているが、肉 ($2\sim 10\mu\text{g}$)、野菜 ($2\sim 10\mu\text{g}$)、果物 ($1\sim 3\mu\text{g}$) には少ない。また、食品加工や保存加工によって損失し、残存率は $20\sim 90\%$ (肉では 70%) である。西洋人の食事からのビオチン摂取量は $35\sim 70\mu\text{g}/\text{日}$ ($143\sim 287\text{nmol}/\text{日}$) と推定されている。

これまでの各国の報告で、ビオチン濃度は $3.9\sim 12.7\mu\text{g/L}$ の範囲で平均 $6\mu\text{g/L}$ である。成乳 $750\text{mL}/\text{日}$ を飲んでいる乳児はビオチン摂取量は $4.5\mu\text{g}/\text{日}$ である。腸内細菌叢のビオチン産生がどのように関係しているかは不明である。

L 毒性

薬理的な量のビオチンを摂取しても、安全であると考えられる。ビオチン欠乏症患者に健常人が食品から摂取する 600 倍以上のビオチン量 ($20\text{mg}/\text{日}$) で長期間治療しても毒性や副作用は報告されていない。

M 食品添加物

ビオチンサプリメントはビオチン摂取に十分役立つものと思われる。

ビオチンは哺乳動物の妊娠、胎仔発育・分化、乳児の成長の維持に関与しており、胎仔の形態形成過程において細胞増殖因子として重要な役割を果たしている。

乳幼児の食品である調製粉乳は、牛乳が粉ミルクとなる過程とその希釈化によってビオチン総量や生物活性は著しく減少するため、WHO はビオチン添加を勧告し、世界中の粉乳にはビオチンが添加されるようになった。例外はわが国である。わが国の粉ミルク中のビオチン量は母乳や FAO/WHO の推奨値に比べ低値であり、添加されていないために引き起こされた、治療用特殊ミルクの摂取によるビオチン欠乏症が報告されており、ビオチン添加を早急に実施する必要がある。

ビオチンはまた、高血糖やグルコース利用能との関連、およびその他の潜在的なビオチン欠乏状態による疾患も示されており、ビオチンの食品添加物としての有用性に期待できる。

第2章

A. 目的

ビオチンはウレイド環と吉草酸が結合した構造をもち、ウレイド環はビオチン輸送蛋白やアビジンとの特異的結合の認識部位であり、吉草酸部分はリジンと結合し、ビオチン補酵素や蛋白のペプチド結合に関与している。

ビオチンはヒトにおいて4つのカルボキシラーゼ、すなわちピルベイトカルボキシラーゼ、メチルクロトニルカルボキシラーゼ、プロピオニル CoA カルボキシラーゼ、アセチル CoA カルボキシラーゼの補酵素として機能し、ビオチンはそれぞれと共有的に結合している。4つのカルボキシラーゼは糖新生と TCA サイクルの中間体の供給、脂肪酸の炭素鎖伸長、分岐鎖アミノ酸のロイシン分解に重要な役割を果たしている。

ビオチンは食物中で遊離型とタンパク結合型として存在するが、腸内でタンパク結合型から遊離型への加水分解の機序は十分に解明されていないが、タンパクとの共有結合からのビオチンの解離において膵臓からのビオチニダーゼが重要な役割を果たすと考えられている。

ビオチン欠乏症の臨床的特徴は皮膚炎、結膜炎、脱毛、中枢神経系障害で、成人においては眼、鼻、口の周囲の皮疹、抑うつ、無気力、幻覚、末端の知覚異常などの中枢神経系症状があり、薄毛、髪の毛の脱色を伴うことが報告されている。小児においては成人同様の皮膚症状が成人よりも早く現れ、全身脱毛と、自閉症状、低血圧、倦怠、発達遅延がみられる。

日本人におけるビオチン欠乏症は、部分欠損を含む先天的なビオチニダーゼ欠損症、マルチプル

カルボキシラーゼ欠損症、特殊ミルクやビオチン無添加の高カロリー輸液によるビオチン欠乏症などごくまれな例とともに、日常遭遇する疾患の中でのビオチン欠乏や依存症の可能性の報告がされているが、第6次改定での「極端な偏食者や人工栄養を行っている人を除いて、通常の食生活をしている人では、これまでにビオチン欠乏の報告はない」という状況は現在においても変わりはない。

ビオチンの所用量は、食事からの摂取可能量として成人で 30 μg (122.8nmol)/日、授乳婦での付加量は 5 μg (20.5nmol)/日であり、米国と同様である。しかし、性差、毒性などビオチンの所用量策定の根拠となるデータの蓄積が不十分であるため、本年度においては健常な成人男女を対象として、所要量のビオチンを与えその出納を検討した。

B. 研究方法

ビオチンの出納を検討するために、成人男女の各 10 名を対象として、女子は平成 14 年 2 月 28 日から 3 月 7 日、男子は同年 8 月 28 日から 9 月 7 日の期間にヒト試験を実施した。ビオチンサプリメントの 1 日量 30 μg を 3 回に分け、試験食摂取後のサプリメントとして服用させ、血清および尿中ビオチン濃度の変化を解析した。

ビオチンは血清や食物中では蛋白と結合しているため、測定前にビオチンを遊離させる必要があり、酸加水分解あるいはパインによる方法が用いられている。ビオチンの定量は大きくは微生物学的方法、アビジンやストレプトアビジンとの結合による方法、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法があり、ビオチンとの特異性の利用との組み合わせでさまざまな方法が報告されてい

る。さらに、最近ではバイオセンサーによる方法も報告されている。しかし、いずれの方法もタンパク含有材料の測定値が真値であるか否かという問題を残している。

今回の研究には前処理を硫酸加水分解、定量を *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた寒天プレート法（微生物学的定量法）により実施した。

測定手順は以下の通りである（図1）。

1. ビオチン標準水溶液の調製

D・ビオチン（和光）を50%エタノールにて、100mg/mL 溶液を作製し、95%エタノールにて1.0 μg/mL まで希釈した後、蒸留水にて0.1ng/mL までの希釈系列溶液を作製し、検量線作製用標準液とする。測定に使用する標準溶液は4 保存で1 ヶ月間安定である。また、エタノール溶液は-30 凍結保存で長期に安定である。

2. 定量用菌液の調製

Lactobacillus plantarum ATCC 8014 をオートクレーブ滅菌したMR S プロス（Oxoid）1 mL に接種し、35~37 、1 夜静置培養し、3,000 rpm, 4 , 10 分間遠心後、沈渣を2 mL 滅菌生理食塩水にて混濁、遠心の洗浄操作を2 回繰り返した後、1 mL 滅菌生理食塩水で混濁させ、定量用菌液とする。

3. 定量用寒天プレートの作成

ビオチン定量用基礎培地（日水製薬）7.7 g を 180 mL 蒸留水で水浴中加温溶解し、冷却後 2N-塩酸にて pH6.8±±0.1 に調製し、ブロムクレゾールパープル 0.002%、トリトンX 0.1%となるように加えた後、蒸留水にて全量 200m L とし、Agar Noble (Difco) 1.5% Agar mate 0.1%を均一に混濁させ、オートクレーブにて 121 , 2 気圧、5 分間高圧蒸気滅菌後、十分に攪拌し、50 まで冷却する。本寒天培地溶液に定量用菌液 200 μ L、

さらにアビジンを 5ng/mL となるように添加し、すばやく混和し、50m L を水平板上の滅菌角 1 号シャーレ（栄研器財）に流しこみ、室温にて固化させる。使用前にクリーンベンチ内で 15 分間培地表面を乾燥させ、直径 3mm のウェルを作成する（通常 30 ウェル）。

4. 血清前処理

血清 100 μ L をスクリーキャップ付き小試験管に採取し、4.5N-硫酸 100 μ L を加え、軽くキャップを閉めた後、オートクレーブにて 121 , 2 気圧、1 時間加水分解し、冷却後、管壁の水滴を遠心にて落下させ、4.5N-水酸化ナトリウム 100 μ L を添加し、pH 試験紙にて pH6.0 から 8.0 の間にあることを確認し、調整が必要な場合には 0.45N-硫酸または水酸化ナトリウムにて添加量 100 μ L 以内で微調整を行い、測定試料とする。

5. 測定

定量用寒天プレートの各ウェルに標準溶液、測定試料を 10 μ L 接種し、35~37 にて 18~48 時間培養し、標準溶液での発育円直径をノギスにて 0.1mm 単位まで読みとり、片対数グラフにて検量線を作製する ($Y=aX+b$)。測定試料の発育円を計測 (S) し、次式より試料中濃度 (X_s) を求める。

Y : 発育円直径 (mm) X : ビオチン濃度

$$X_s = \{ 10^{(S-b)/a} \} \times 3$$

図 1. 寒天プレート法によるビオチン測定

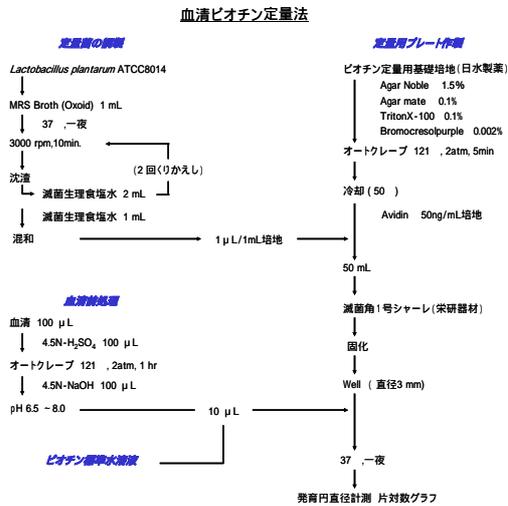


図 3. 成人男女における尿中排泄量の変動

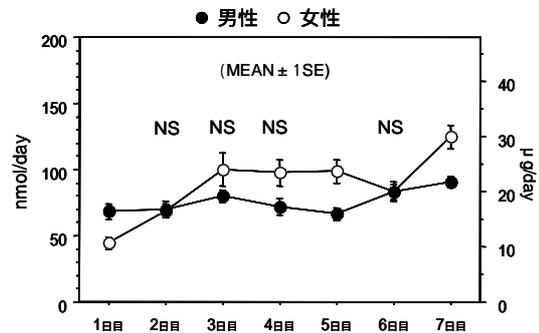


表 2. 成人男女における尿中排泄量の変動

	男性		女性		男性		女性	
	μg/day		μg/day		nmol/day		nmol/day	
	MEAN	SE	MEAN	SE	平均	SE	MEAN	SE
1日目	14.6	1.8	10.8	1.1	68.2	6.2	44.3	4.4
2日目	17.0	1.9	16.9	1.2	69.7	6.5	69.1	4.8
3日目	16.9	2.0	24.4	3.0	79.8	4.6	100.0	12.3
4日目	15.3	1.9	23.8	2.4	71.8	5.9	97.6	9.6
5日目	14.0	1.7	24.2	2.2	66.2	4.4	98.9	8.8
6日目	17.6	2.1	20.3	1.7	82.9	5.8	83.1	7.1
7日目	19.1	2.2	30.4	2.1	90.7	4.3	124.6	8.4
Total	18.5	1.1	21.6	1.6	75.6	4.3	88.2	6.5

C 研究成果

図 2. 成人男女の血清ビオチン濃度の変動

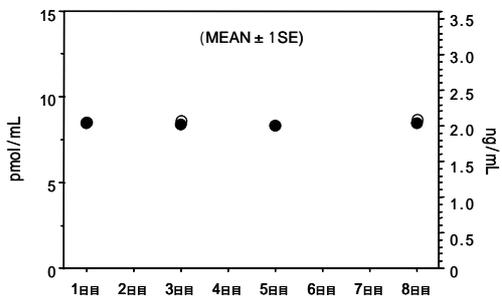


表 1. 成人男女の血清ビオチン濃度の変動

	男性		女性		男性		女性	
	ng/mL		ng/mL		pmol/mL		pmol/mL	
	MEAN	SE	MEAN	SE	MEAN	SE	MEAN	SE
1日目	2.0	0.0	2.0	0.0	8.3	0.2	8.3	0.1
3日目	2.0	0.0	2.0	0.0	8.2	0.1	8.4	0.2
5日目	2.0	0.0	-	-	8.1	0.1	-	-
8日目	2.0	0.0	2.1	0.0	8.3	0.2	8.4	0.1
Total	2.0	0.0	2.0	0.0	8.2	0.1	8.4	0.1
MIN	1.8		1.8		7.4		7.4	
MAX	2.2		2.3		9.0		9.4	

成人男女の血清ビオチン濃度はともに 2.0ng (8.2 pmol) /mL と、すべて基準値内 1.6-3.7ng (6.5-15.1pmol) /mL であり、本実験中の変動は認められなかった。

男女の比較では女性の変動が大きいと思われた。女性は初日に男性を下回ったが、経日的に排泄量は増加し、3日目で男性を上回った。その後大きな変動はなく、6日目には若干減少し、最終日には再度増加した。初日 10.8 μg (44.3nmol) /day, 最終日 30.4 μg (124.6nmol) /day, 総平均 21.6 μg (88.2nmol) /day であった。男性は初日 14.6 μg (68.2nmol) /day から日を追って増加してはいるものの、変動は顕著ではなかった。女性と同様、最終日には排泄量は最大となった。初日 14.6 μg (68.2nmol) /day、最終日 19.1 μg (90.7nmol) /day、総平均 18.5 μg (75.6nmol) /day であった。

図 4. 成人男女における尿中ビオチン濃度のクレアチニン比による経日変動

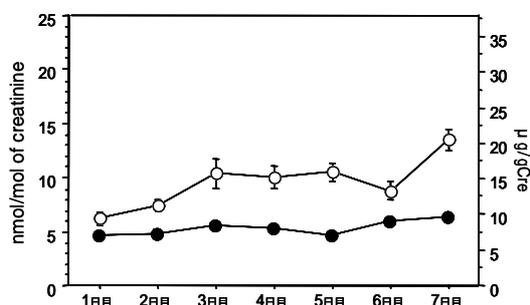


表 3. 成人男女における尿中ビオチン濃度のクレアチニン比による経日変動

	男性		女性		男性		女性	
	μg/gCre		μg/gCre		nmol/mol Cre		nmol/mol Cre	
	MEAN	SE	MEAN	SE	MEAN	SE	MEAN	SE
1日目	10.6	0.7	13.4	1.3	4.7	0.2	6.2	0.6
2日目	11.4	1.5	16.1	1.2	4.8	0.4	7.4	0.5
3日目	13.2	1.0	22.4	3.1	5.6	0.3	10.4	1.4
4日目	12.5	1.4	21.7	2.2	5.3	0.4	10.1	1.0
5日目	11.7	1.2	22.8	1.9	4.7	0.2	10.5	0.9
6日目	14.8	1.7	19.0	1.8	6.0	0.3	8.8	0.8
7日目	15.5	1.2	28.4	2.2	6.6	0.3	13.2	1.0
Total	12.8	1.1	20.5	1.6	5.4	0.2	9.5	0.7

クレアチニン比では男女差が明確になった ($p < 0.0001$)。女性の平均値は $20.5 \mu\text{g/gCre}$ (9.5nmol/mol Cre) で、最終日を除いて基準域内 ($4.0 \sim 25.5 \mu\text{g/gCre}$) であったが、本試験を通じて排泄量は男性の $12.8 \mu\text{g/gCre}$ (5.4nmol/mol Cre) を上回り、また、増加傾向が顕著であった。男性では大きな変動がみられず、すべて基準域内であった。このクレアチニン比による男女間の差は筋肉量の差に起因しているものと思われ、所用量に性差が存在する可能性がある。

図 5. 成人男女における尿中ビオチン濃度のクレアチニン比による日内変動

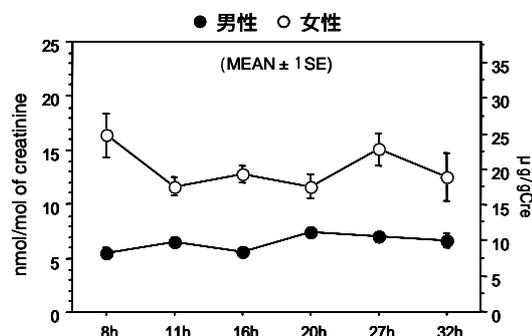


表 4. 成人男女における尿中ビオチン濃度のクレアチニン比による日内変動

	男性		女性		男性		女性	
	μg/gCre		μg/gCre		nmol/mol Cre		nmol/mol Cre	
	MEAN	SE	MEAN	SE	MEAN	SE	MEAN	SE
8h	14.4	2.2	36.9	5.2	5.5	0.5	16.4	2.0
11h	16.7	2.3	24.9	1.8	6.5	0.4	11.6	0.8
16h	12.4	0.8	27.4	1.7	5.6	0.3	12.7	0.8
20h	19.0	2.8	25.1	2.4	7.4	0.4	11.6	1.1
27h	16.8	1.9	32.5	3.3	7.0	0.4	15.0	1.5
32h	16.6	2.4	27.7	5.3	6.6	0.7	12.5	2.2
Total	16.0	1.7	29.1	2.5	6.4	0.3	13.3	1.1

6日目の日内変動である。日内変動においても女性のクレアチニン比は平均 $29.1 \mu\text{g/gCre}$ (13.3nmol/mol Cre) と男性 $16.0 \mu\text{g/gCre}$ (6.4nmol/mol Cre) よりも有意に高く ($p < 0.0001$)、変動も大きかった。採取時間によって、一定のサイクルがあるように思えるが、これはサプリメント服用時間と密接な関係があることを表している。一方、男性の日内変動は女性ほど大きくはなく、かつ変動のパターンが女性と逆の傾向を示した。

図 6. 成人男女における尿中ビオチン濃度の単位時間あたりの日内変動

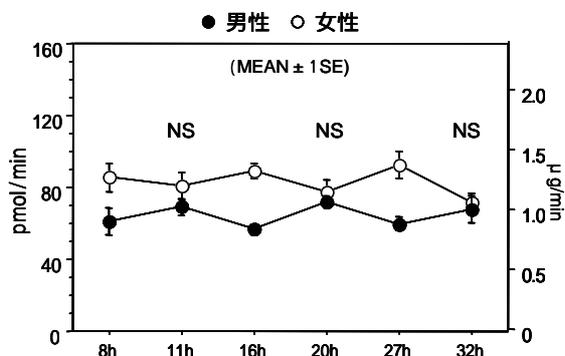


表 5. 成人男女における尿中ビオチン濃度の単位時間あたりの日内変動

	男性		女性		男性		女性	
	μg/min	μg/min	μg/min	μg/min	pmol/min	pmol/min	pmol/min	pmol/min
8h	14.9	1.8	20.9	2.0	60.7	7.5	85.7	8.0
11h	16.8	1.2	19.8	1.8	68.8	4.9	80.9	7.5
16h	13.8	0.7	21.8	1.0	56.3	2.9	89.4	4.2
20h	17.5	0.8	18.9	1.6	71.7	3.3	77.5	6.7
27h	14.5	0.9	22.5	1.8	59.4	3.7	92.3	7.5
32h	16.5	1.8	17.6	1.2	67.2	7.5	72.0	4.8
Total	15.6	0.9	20.3	1.3	64.0	3.8	82.9	5.3

単位時間あたりの排泄量は男性 15.6 μg (64.0nmol)/min、女性 20.3 μg (82.9nmol)/min で、クレアチニン比よりも男女の排泄サイクルの違いが顕著であった。これは、吸収と排泄の速度や行動パターンで男女間に差異があることを示唆している。

図 7. 成人男女におけるサプリメント摂取量に対する尿中ビオチン排泄率

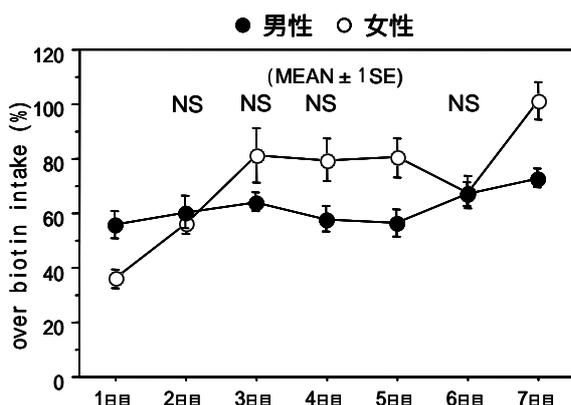


表 6. 成人男女におけるサプリメント摂取量に対する尿中ビオチン排泄率

	男性				女性			
	MEAN	SE	MIN	MAX	MEAN	SE	MIN	MAX
1日目	55.6	5.0	39.3	86.4	36.1	3.5	18.7	55.3
2日目	56.8	5.3	35.9	85.4	56.3	3.9	37.0	81.0
3日目	65.0	3.7	50.5	84.4	81.4	10.0	40.3	151.3
4日目	58.5	4.8	39.5	86.1	79.5	7.8	47.3	123.7
5日目	53.9	3.6	40.1	70.5	80.5	7.2	51.3	118.3
6日目	67.5	4.7	48.0	91.4	67.7	5.8	43.7	97.7
7日目	73.9	3.5	51.3	87.4	101.4	6.9	70.0	129.0
累積	62.5	3.6			72.9	3.6		

排泄率は毎日の 30 μg 服用に対しても算出した。女性では 100%を越える者(最大 151%)もあった。

7日間のサプリメント総摂取量に対する総排泄率は男性 62.5 ± 3.6%、女性 72.9 ± 3.6%であった。

D. 考察

1. ビオチン所要量の指標

前述したように、通常の食生活をしている人では、これまでにビオチン欠乏の報告はない。したがって、所要量の指標に関してはビオチンが含まれない輸液を受けている患者、先天性代謝異常、大量の生卵白摂取によるビオチン欠乏症など、限られた症例やビオチンの生物学的利用や体内動態の研究を参考とする以外にないように思われる。

これまで、ビオチン欠乏の指標とされてきた血清または血漿中濃度は、微生物学的定量法、アビジン結合法、その他の方法で大きな開きがある。さらに、最も頻繁に使用される微生物学的定量法においても用いられる微生物種、さらに同一微生物種によっても大きな隔りがある。このことは臨床的には通用するにしても、所要量策定のような真値が必要となる場合には大きな問題である。

尿中のビオチン濃度は臨床的意義の点ではビ

オチン欠乏症の一つの指標となり、ピオチン欠乏症の尿ではピオチンの低下とともにロイシン分解に關与するメチルクロトニル CoA カルボキシラーゼの活性低下によるロイシン分解異経路の産物としての 3-ヒドロキシイソ吉草酸の増加があり、ピオチン欠乏の初期の指標として有用であるとされる。ピオチン欠乏の初期の指標として有用であるとされる。ピオチン欠乏症に対するピオチン投与量は 10~20mg/日 が最多であるが、ピオチン欠乏症に対しては 50~150 µg/日の範囲でのピオチン投与で症状発現を防止できるとされている。

一方、栄養所要量の観点ではピオチンの体内動態が重要な要因となる。血漿および尿中でのピオチンとその代謝物の割合は分子量としてピオチン：ピスノルピオチン：ピオチンスルフォキシドが 3：2：1 の割合で存在し (Mock DM, 1996)、多量のピオチンの輸液や経口投与においてもほぼ同様の形態で増加すると報告されている (Mock DM and Heird GM, 1997; Zempleni J and Mock DM, 1999)。

ピオチンの単回投与実験 (2mg 投与) においては、血中濃度、尿中濃度ともに投与後 1 時間で最高値に達し、その後は排泄され、血中濃度の半減期は約 3 時間で、比較的すみやかに血液中から消失する。尿においても同様の経過をたどるが、投与 1 時間後に最高値に達した後はゆるやかに排泄され、9 から 10 時間で投与前の値になる。したがって、今回の試験のように 1 日 3 回、7 日間の連続投与においては尿中への排泄は前回服用の影響があるものと考えなければならない。

2. 結果考察

今回のヒト試験の結果から所要量について言及するには以上の条件が必要であろうと思われる。

すなわち、測定法の問題を含むこと 尿中ピオチンは分子量として測定値の 2 倍濃度が吸収されたと考えられること、ピオチン連続投与でのキャリーオーバーの考慮である。

血清においては、所要量とされるという少量であるが、今回の 30 µg/日の 7 日間連続投与において、服用前採血による血中濃度の推移は変動がみられなかった。このことは個々の被験者において血中のピオチン濃度に多少の変動はあっても動的な平衡状態が保たれていることを示している。

尿中排泄では男女間で差がみられた。女性では初回服用から増加し始め、高いレベルを一定期間維持し、低下後上昇するというパターンであった。男性は女性ほどの変化がなく、かつ女性よりも低レベルであったが、連続服用によって排泄量は増加していた。このことは、サプリメントが 100% 吸収されたものと仮定すれば、男性は女性よりもピオチンを必要としているのかもしれない。これはクレアチニン比においても同様で、筋肉量の違いがピオチン排泄量の差として明確に表れたと思われる。日内変動はクレアチニン比や単位時間の排泄量で、服用時間との関係からは女性が早期に排泄し、男性が遅く排泄するという、異なった排泄パターンを示した。これが単なる性差によるものか、試験時の季節の違いによるものか、生活の状態や活動量によるものか、あるいはその他の要因によるものか興味深い。

サプリメント総服用量に対するピオチンの総排泄率は男性 62.5%、女性 72.9%であり、その 2 倍濃度が吸収されたと考えれば、今回の 30 µg/日以上の方が吸収されていたことになる。今回の食事でのピオチン濃度は 25.5 µg/100g であった。当然摂取食品からのピオチン吸収があったと考えられるべきであろう。食品の消化、ピオチン遊離、

腸内細菌叢の影響、腸管からの吸収の相互関係や変動要因は良く解っていない。したがってサプリメントを服用しない一定の期間の評価が必要である。さらに、今回の試験は遊離の水溶性ビタミン混合物としての負荷試験であり、本来食事から吸収されるべきビオチンの形態ではないという問題がある。

E. 結論

1. 試験食とともにサプリメントとしてビオチンを 30 μ g の摂取では、血清中のビオチン濃度に変化はなかった。
2. 尿中排泄量は男女ともに経日的に増加し、男性に比し女性で明らかに排泄量が多かった。
3. クレアチニン比、単位時間でのビオチン排泄量の日内変動においては変動パターンに男女間の差が見られ、今後さらに詳細な検討が必要である。
4. ビオチン濃度測定法、ビオチン代謝物測定法の更なる検討を中心に、ビオチン必要量の指標の検索が必要である。

F. 健康危機情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Watanabe, T., Ohkawa, K., Kasai, S., Ebara, S., Nakano, Y., and Watanabe, Y.: The effects of dietary vitamin B12 deficiency on sperm maturation in developing and growing male rats. Cong. Anom., 43:57-64, 2003.

2) 大川恵子、葛西重信、渡邊敏明、野田博昭：

トコフェロールによる THP-1 細胞のアポトーシス誘導．生物ラジカル研究所平成 14 年度報告書、43-47、2003.

3) 葛西重信、大川恵子、渡邊敏明、野田博行：白血球細胞におけるサイトカイン及び活性酸素産生評価．48-53、生物ラジカル研究所平成 14 年度報告書、2003.

4) 渡邊敏明、谷口歩美、飯野久和：イヌリンおよびイヌリン加水分解物（フラクトオリゴ糖）摂取によるカルシウム吸収についての検討．(投稿中)

2. 学会発表

1) 谷口歩美、渡邊敏明：電子スピン共鳴装置を利用したビオチン測定法の開発．日本栄養・食糧学会代 41 回近畿支部大会、28、2002.

2) 渡邊敏明、福井徹：健常成人におけるビオチンの必要量に関する検討．第 56 回日本栄養・食糧学会講演要旨集．201、2002.

3) 渡邊敏明、若林一郎、榎原修平、中野長久：ビタミン B12 欠乏状態のラット精子形成に及ぼす影響．日本ビタミン学会第 52 回大会、226、2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特許
なし
3. その他
なし