

平成 17 年度厚生労働科学研究費（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
主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

Ⅲ. 分担研究者の報告書

10. ビオチン欠乏状態における 3-hydroxyisovaleric acid の新規な指標としての有用性についての検討

分担協力者 渡邊敏明 兵庫県立大学 教授
研究協力者 榎原周平 兵庫県立大学 助手
研究協力者 福井徹 病体生理研究所 室長

研究要旨

3-ヒドロキシイソ吉草酸 (3-hydroxyisovaleric acid, 3-HIA) がビオチンの早期欠乏指標として注目されている。とくに妊娠前期から後期にかけて妊婦の尿中への排泄量が増加している。しかし、妊娠全期間を通じて、どの期間でどのように変動しているかに関してはまだ不明である。そこで本研究では、尿中 3-HIA がビオチン欠乏を鋭敏に示す指標として有用であるかどうかを検討した。尿中 3-HIA 量は妊娠 8 ヶ月をピークに増加した後、出産後 1 ヶ月かけて低下した。一方、尿中ビオチン量は妊娠 8 ヶ月に減少している。また、差は見られないものの、妊娠 8 ヶ月から産後 1 ヶ月にかけて 12 人中 10 人の尿中ビオチン量が増加している。このことから、妊娠 8 ヶ月の段階で最も体内のビオチン不足が引き起こされることが推察される。尿中ビオチン量が妊娠 8 ヶ月にかけて減少すると同時に尿中 3-HIA は 8 ヶ月にかけて上がっていることから、ヒトの妊娠においてもビオチンの栄養状態を示す指標として有用であることが示唆される。

A. 目的

1. ビオチンとは

ビオチンは、ビタミン B 群に分類される水溶性ビタミンの一つである。2 つの 5 員環の結合がシス配位しており、ウレイド環を構成する 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 (Fig. 1)。生理作用としては、カルボキシラーゼの補酵素として炭酸固定反応に関与し、糖新生、脂肪酸やアミノ酸の合成、エネルギー代謝において重要な役割を果たしている¹⁾。このためビオチンが欠乏すると皮膚炎や脱毛といった症状が現れることが報告されている²⁾。また、カルボキシラーゼの低下によって、尿中に有機酸が排泄されることも知られている。例として、生後 5 ヶ月の幼児がビオチン欠乏により、尿中に 3-Hydroxyisovaleric acid (3-HIA) や β -メチルクロトニルグリシンが尿中に排出され、アシドーシスやケトーシスといった酸血症を発症し、ビオチン補給をすることでその症状が消えることが報告されている³⁾。

2. ビオチン欠乏

ビオチンは、卵白を多量に摂取すると、卵白中のアビジンと呼ばれる糖タンパク質がビオチンと結合して吸収を阻害したり²⁾、抗生物質を摂取することでビオチン合成を行う腸内細菌の減少により欠乏することが報告されている。しかし、ビオチンは食品に広く分布しており、また腸内細菌によって産生されているため、一般的にビオチン欠乏状態になることは稀である²⁾。

近年、欠乏症状は見られないものの、体内に十分なビオチンが充足されないビオチン不足が問題になっている。偏った食生活に加え、抗けいれん治療⁴⁾や妊娠^{5,6)}、喫煙⁷⁾などによってビオチン不足に陥ると言われている。特に妊娠中にビオチン不足を起こすと、母親には脱毛や皮膚炎といったビオチン欠乏症状を示さない⁸⁾が、いくつかの動物種では催奇形性を起こすことが報告されている⁹⁾。このようなことから、ビオチン不足を回避するためには、鋭敏なビオチン栄養指標が必要である。

3. 3-HIA とは

3-HIA は、ビオチンが関与している 4 つのカルボキシラーゼのうち、ロイシンの異化作用に関与している β -メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ (MCC) の活性がビオチン欠乏により低下することで尿中に排泄される有機酸である。他の栄養状態の指標と言わ

れている血漿中のビオチン量や、同じく尿中に有機酸である 3-hydroxyisopropionic acid や Methylcitric acid はビオチン欠乏状態とコントロールと比較しても体内の栄養状態を判断する指標として十分でない。よって、3-HIA が潜在型ビオチン欠乏を早期に判断できる指標として有用であることを Mock らは報告している^{10,11)}。

4. 現状および問題点

Mock らの研究で使用されているガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC/MS) による測定法¹²⁾は、前処理が煩雑な上に、高価な機器を要するために汎用性が低く、この研究以外の報告例が少なく、十分な検討がなされているとはいえない。そこでこれまでに、前処理が簡素で汎用性の高い高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて尿中 3-HIA 量の測定法を開発し、ビオチン欠乏マウスを用いた 3-HIA とビオチンとの関連について基礎的検討を行ってきた^{13,14,15)}。

しかし、ビオチン欠乏時における尿中ビオチンと 3-HIA、欠乏症との関連や、ヒト妊婦における 3-HIA とビオチン動態に関してはまだ十分に明らかにされていない。そこで本研究では、尿中 3-HIA がビオチン欠乏を鋭敏に示す指標として有用であるかどうかを検討した。

B. 実験方法

1. 材料と方法

1) 調査対象

2004 年 3 月～2005 年 2 月にかけて杉山産婦人科 (東京都) に通院していた妊娠女性 12 名に協力してもらった。被験者の条件として、以下の項目についてアンケートを行い、全ての項目に該当する人を対象にした。

- ・精神的、肉体的に健康であること。
- ・偏食がなく、規則正しい生活を行っていること。
- ・採尿前日には飲酒、喫煙、ミネラル剤、ビタミン剤は差し控えられること。

2) 採尿方法

被験者には、該当月の来院時に中間尿を紙コップにて採取してもらった。採尿後、サンプルは測定時まで -40°C 下で冷凍保存した (Fig. 5)。

3) 倫理事項

本実験を行うにあたり、被験者には事前にインフォームドコンセントを行い、また大阪府立大学倫理委員会の承認を得て、個人情報

などや倫理に関係した事項を遵守した上で行った。

2. 分析方法

1) 尿中ビオチン

乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* ATCC8014) を用いたバイオアッセイで測定した。

2) 尿中 3-HIA

有機酸分析システム法の原理

有機酸分析システム HPLC は分析対象成分が引き起こすイオン量の変化を測定することで、イオン性の物質を選択的に検出することができる電気伝導度検出と、有機酸を分離するのに適しているといわれているイオン排除クロマトグラフを組み合わせた HPLC である^{16,17)}。しかし、移動相に強酸水溶液 (p-トルエンスルホン酸水溶液) を用いるために、有機酸の脱離が抑制され、感度の低下が引き起こされる。そこで、アルカリ緩衝溶液をカラムの溶出液と混合させて pH を緩衝させることにより、有機酸検出の感度を向上させている^{18,19)}。この方法により、夾雑成分のために面倒な前処理を必要としていた試料でも、希釈やろ過といった簡単な処理だけで分析が可能になるという利点がある。

3) サンプル前処理方法

尿は 0.45 μ m マイクロフィルター Minisart RC4 (sartorius(株), 東京) でろ過したものを使用した。

4) 使用装置

この方法は、(株)島津製作所(京都)の「有機酸分析システム」専用の HPLC を使用している。使用装置については以下の通りである (Fig. 6)。

システムコントローラ : SCL-10A_{VP}

ポンプ : LC-10AD_{VP}

電気伝導度検出器 : CDD-6A

カラムオーブン : CTO-10AC_{VP}

オートサンプラー : SIL-10AD_{VP}

クロマトデータ処理 : CLASS-VP ワークステーション

5) 分析条件

本実験の分析条件については以下の通りである。

使用カラム : Shim-pack SPR-H,

およびガードカラム SPR-H(G)

(どちらも(株)島津製作所, 京都)

移動相 : 4mM p-トルエンスルホン酸水溶液

緩衝液 : 4mM p-トルエンスルホン酸,

および 100 μ M EDTA を含む 16mM

Bis-Tris 水溶液

流速 : 0.8ml/min. (移動相, 緩衝液)

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

6) 尿中クレアチニン

Jaffe 法を原理としたクレアチニン・テストワコー(株)和光純薬,大阪)を用いてクレアチニン量を算出し、補正に使用した。

3. 統計学的方法

妊娠の経過における差異については、ANOVA および Fisher's PLSD 多重比較検定を用いて解析を行った。有意水準は $p < 0.1$ とした。解析ソフトには第 3 章と同じく Microsoft Excel (マイクロソフト社, ワシントン), およびアドインソフトである「Statcel」((有)OMS 出版, 埼玉)を使用した。

C. 結果

尿中ビオチン量

Figure. 7 は妊婦の尿中ビオチンの平均値の推移を示したグラフである。3 ヶ月から 8 ヶ月にかけて尿中ビオチンが下がっていた。

Figure. 8 は個体ごとの妊娠 3 ヶ月, 8 ヶ月および産後一ヶ月の尿中ビオチン量の推移を示したグラフである。妊娠 3 ヶ月~8 ヶ月にかけて, 12 人中 8 人の妊婦の尿中ビオチン量が低下していた。また, 妊娠 8 ヶ月~産後 1 ヶ月にかけて, 12 人中 10 人の尿中ビオチンが上昇した。

尿中 3-HIA 量

Figure. 9 は尿中 3-HIA を示したグラフである。3-HIA は妊娠 3 ヶ月から 6 ヶ月にかけて変化があまりなかったものの, 妊娠 6 ヶ月から 8 ヶ月にかけて有意に増加した。その後, 産後 1 ヶ月にかけて有意に減少した。特に産後 1 ヶ月の時点では 12 人中 6 人の妊婦から 3-HIA が検出されなかった。

D. 考察

尿中 3-HIA 量は妊娠 8 ヶ月をピークに増加した後, 産後 1 ヶ月かけて低下した。一方, 尿中ビオチン量は妊娠 8 ヶ月に減少している。また, 差は見られないものの, 妊娠 8 ヶ月から産後 1 ヶ月にかけて 12 人中 10 人の尿中ビオチン量が増加している。このことから, 妊

娠8ヶ月の段階で最も体内のビオチン不足が引き起こされることが推察される。

尿中ビオチン量が妊娠8ヶ月にかけて減少すると同時に尿中3-HIAは8ヶ月にかけて上がっていることから、ヒトの妊娠においてもビオチンの栄養状態を示す指標として有用であることが示唆される。

ビオチン状態を示す指標として、尿中ビオチン量や血中ビオチン量などがあげられる。しかし、尿中ビオチン量は一日の食事内容によって大きく変動するため、長期的な栄養状態を見る上での指標として有用とはいえない。血中ビオチン量に関しても、被験者10人に人為的にビオチン欠乏にさせても、有意な減少が見られないとの報告例がある¹⁰⁾。

また、ビオチン欠乏妊娠マウスの遊離ビオチンの割合(ビオチン遊離率)がコントロール群と比べて低い、という報告²⁰⁾がある。しかし、欠乏と判断するためのcut off値を決めるのが難解である。また、ヒトの血中ビオチン量を測定時の酸加水分解処理段階で結合しているタンパクにより、測定値に影響をおよぼすという報告²¹⁾もある。よって、ビオチン遊離率も指標として有用であるとはいえない。一方、尿中3-HIAは前で示したように、欠乏症が発症する前に、尿中に検出されることから、ビオチンの欠乏指標として有用であることが示唆された。

妊娠に関して、今回の実験では、尿中ビオチンの低下と同時に尿中3-HIAの増加が見られた。また、妊娠後期になるに従い、妊婦の血中ビオチン濃度や尿中へのビオチン排泄が減少し、尿中の3-HIA排泄が有意に増加するという報告がある²²⁾。さらに妊婦によるビオチン補給実験では、ビオチン補給群がプラセボ群と比較して3-HIAが有意に減少するという報告がある⁶⁾。

またビオチン欠乏時にロイシンを与えると尿中3-HIAが増加することから、ビオチン欠乏がロイシン異化に関与するMCCの活性に影響を与えた結果3-HIAが排泄されるということがわかっている²³⁾。

しかし、妊娠時のビオチン不足だけでなく、ビオチン関連疾患によるビオチン欠乏時でも3-HIAがビオチン栄養状態の指標として有用なのであろうか。

これまでに、ビオチン欠乏症患者、および特殊ミルク依存によってビオチン欠乏した小児の尿の3-HIA量を測定した。ビオチン欠乏部分欠損症患者の尿中3-HIA量は

61.9 μ g/mg creatinine, 特殊ミルク依存によって欠乏した小児の尿中3-HIA量は81.7 μ g/mg creatinineだった。

これらの患者にビオチンを投与し、一ヵ月後の尿中3-HIAは、ビオチン欠乏症患者は5.9 μ g/mg creatinineと減少し、特殊ミルク依存小児の尿からは検出されなくなった。以上の点から、尿中3-HIAがヒトにおいてもビオチン栄養状態を反映する指標として有用であることが示唆される。

今後の課題としてはまず、ビオチン欠乏群の尿中3-HIAの減少、またビオチン添加群の尿中ビオチン量の減少など、それぞれの体内動態に関しては未だ不明な点が多い。実験動物を用いてMCCなどのビオチン関連酵素活性を検討する必要がある。特に、ヒトにビオチンを投与するとビオチンスルホンやビスノビオチンメチルケトンといった、ビオチン異化代謝物の尿中への排泄が増加するという報告²⁷⁾もあり、これらの動態についても検討する必要がある。

また、ヒト妊婦の尿中3-HIA増加がビオチン欠乏によるものなのか、妊娠中における母体、体内での特異的な変化からなのかが不明である。よって今後、食事調査によって妊娠期間中におけるビオチン出納についての検討し、妊娠期におけるビオチンと3-HIAとの関係について詳細に解析する必要がある。

以上の問題を解決し、尿中3-HIAがビオチンの必要性を検討する為の基礎的データとなるよう、ビオチン栄養状態の指標としての有用性をさらに高めることが今後の課題として考えられる。

E. 健康危機情報
特記する情報なし

F. 研究発表
1. 発表論文
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許予定
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

なし

H. 引用文献

- 1) 渡邊敏明 (日本ビタミン学会編) : ビタミンの事典, pp.307-310, 朝倉書店, 1996.
- 2) 成沢邦明 (日本ビタミン学会編) : ビタミン学(II), p.473, 東京化学同人, 1980.
- 3) Gompertz D, Draffan G.H, Watt, J.L, Watt, D.H. : Biotin-Responsive β -Methylcrotonylglyciburia. *Lancet*, 22-24, 1971.
- 4) Mock D.M, Dyken, M.E. : Biotin catabolism is accelerated in adults receiving long-term therapy with anticonvulsants. *Neurology*, 49, 1444-1447, 1997
- 5) Mock, D.M., Stadler, D.D., Stratton, S.L., Mock, N.I. : Biotin status assessed longitudinally pregnant women. *J.Nutr.*, 127, 710-716, 1997.
- 6) Mock, D.M, Quirk, J.G, Mock, N.I. : Marginal biotin deficiency during normal pregnancy. *Am J Clin Nutr*, 75, 295-99, 2002.
- 7) Sealey M.S, Teague, A.M, Stratton, L.S, Mock, D.M. : Smoking accelerates biotin catabolism in women. *Am J Clin Nutr*, 80, 932-935, 2004
- 8) Watanabe, T. : Teratogenic effects of biotin deficiency in mice. *J.Nutr.*, 113, 574-581, 1983.
- 9) Zemleni, J, Mock, D.M. : Marginal biotin deficiency is teratogenic. *Proc Soc Exp Biol Med* 223, 14-21, 2000.
- 10) Mock N.I, Malik, M.I, Stumbo, P.J, Bishop, W.P, Mock, D.M. : 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, 951-958, 1997.
- 11) Mock D.M, Henrich C.L, Carnell N, Mock, N.I. : 3-hydroxypropionic acid and methylcitric acid are not reliable indicators of marginal biotin deficiency in humans. *J.Nutr.*, 134, 317-320, 2004
- 12) Mock D.M, Jackson H, Lankford G.L, Mock N.I, Weintraub S.T. : Quantification of urinary 3-hydroxyisovaleric acid using deuterated 3-hydroxyisovaleric acid as internal standard. *Biomed Environ Mass Spectrom.* Sep; 18(9):652-6, 1989
- 13) 渡邊敏明, 大口憲一, 榎原周平, 福井徹 : ビオチン欠乏状態の指標としての尿中3-ヒドロキシイソ吉草酸の高速液体クロマトグラフィによる測定法の検討 生物試料研究, 27: 309-312, 2004
- 14) Watanabe T, Oguchi K, Ebara S, Fukui T. : Measurement of 3-hydroxyisovaleric acid in urine of biotin-deficient infants and mice by HPLC. *J. Nutr.*, 135, 615-618, 2005
- 15) 大口憲一 : ビオチン欠乏状態の指標としての尿中有機酸の有用性についての基礎的研究 姫路工業大学環境人間学部学士論文, 2004
- 16) Miwa H, Yamamoto M, Nishida T, Nunoi K, Kikuchi M. : High-Performance Liquid Chromatographic analysis of serum long-chain fatty acids by direct derivatization method. *J Chromato*, 416, 237-245, 1987.
- 17) Miwa H, Yamamoto M. : High-Performance Liquid Chromatographic analysis of serum short-chain fatty acids by direct derivatization. *J Chromato*, 421, 33-41, 1987.
- 18) 島津校則液体クロマトグラフ有機酸分析システム応用データ集
- 19) 有機酸分析システムの応用(その2) -UV検出方途の比較-島津アプリケーションニュースNO.L21
- 23) Mock, D.M Margaret, I.M. : Distribution of biotin in human plasma most of the biotin is not bound to protein. *Am J Clin Nutr.*, 56, 427-432, 1992
- 24) Mock D.M, Stadler D.D, Stratton S.L, Mock, N.I. : Biotin status assessed longitudinally pregnant women. *J.Nutr.*, 127, 710-716, 1997.
- 25) Mock D.M, Henrich C.L, Carnell N, Mock N.I. : Indicator of marginal biotin deficiency and repletion in humans: validation of 3-Hydroxyisovaleric acid excretion and leucine challenge. *Am J Clin Nutr*, 76, 1061-1068, 2002.
- 26) Zemleni J, McCormick D.B, Mock D.M. : Identification of biotin sulfone, bisnorbiotin methyl ketone, and tetranorbiotin-L-sulfoxide in human urine. *Am J Clin Nutr* 65:508-511, 1997

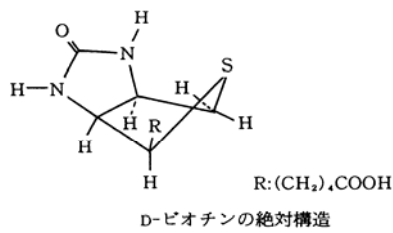


Fig. 1 ビオチンの化学構造

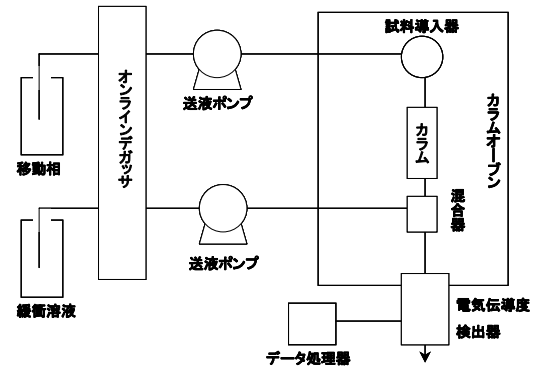


Fig. 6 有機酸分析システムの HPLC 流路図

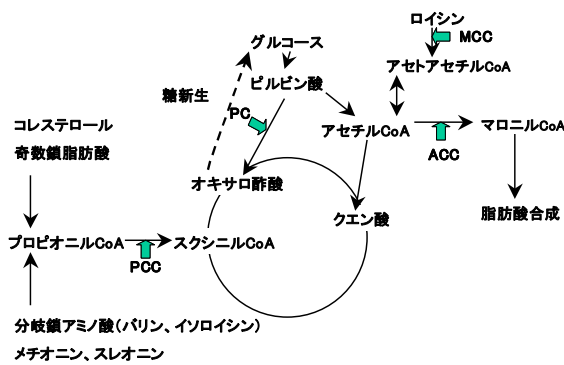
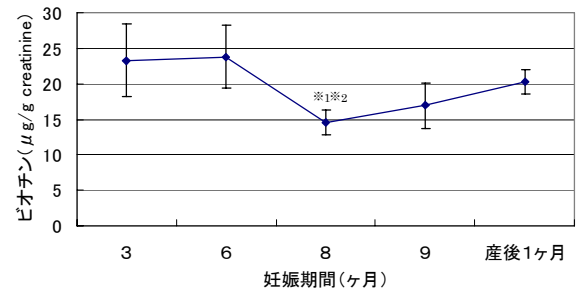


Fig. 2 ビオチンが関与する代謝経路

PC: ピルビン酸カルボキシラーゼ
PCC: プロピオニル CoA カルボキシラーゼ
ACC: アセチル CoA カルボキシラーゼ
MCC: β-メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ



Mean ± SE n=12

※1 p=0.09 (vs. 妊娠 3 ヶ月)

※2 p=0.07 (vs. 妊娠 6 ヶ月)

Fig. 7 尿中ビオチン量推移

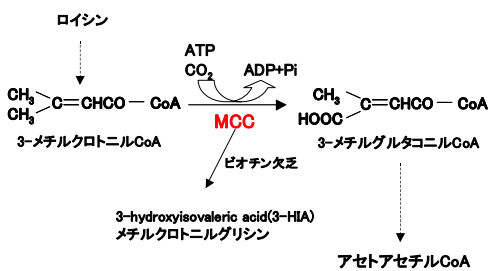


Fig. 3 MCC が関与している反応経路

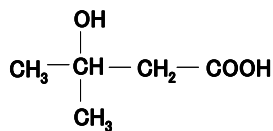


Fig. 4 3-HIA の化学式

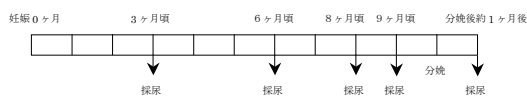


Fig. 5 採尿スケジュール

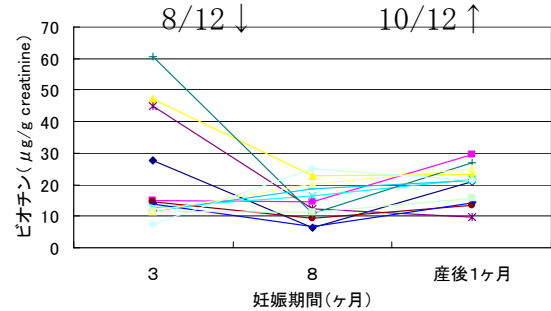


Fig. 8 妊娠 3 ヶ月・8 ヶ月・産後 1 ヶ月の尿中ビオチン推移

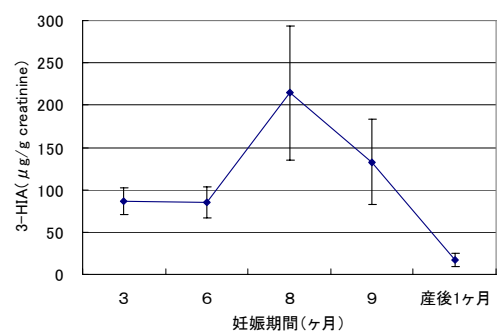


Fig. 9 尿中 3-HIA 推移