

母乳および人工栄養乳児におけるビオチンの体内動態の検討

福井 徹¹⁾, 石盛嘉浩²⁾, 榎原周平²⁾, 木村幸子²⁾, 渡邊敏明²⁾
(¹⁾病体生理研究所*, (²⁾兵庫県立大学環境人間学部**)

Biotin Status in Infants Fed Breast Milk and Formula

Toru FUKUI¹⁾, Yoshihiro ISHIMORI²⁾, Shuhei EBARA²⁾, Sachiko KIMURA²⁾ and Toshiaki WATANABE²⁾

¹⁾*Byotai-seiri Laboratory*

²⁾*Laboratory of Dietary Environment Analysis School of Human Science and Environment*

Himeji Institute of Technology, University of Hyogo

Summary

We have pointed out that biotin is scarcely included in special formulas made in Japan. In this study, we describe the biotin status in 22 infants with phenylketonurea (PKU) who have been fed special formulas. Serum free and total biotin level, biotinidase activity, vitamin B₁₂, folate level, urine biotin, 3-hydroxyisovaleric acid (3-HIA), lactate, pyruvate and creatinine (Cre) were measured and compared with healthy infants fed breast milk and formula. Serum total biotin level (2.5 ± 0.4 ng/mL) and biotinidase activity (6.6 ± 0.9 nmol/min/mL) in infants with PKU were in the normal range and there were not significant differences compared with those in the 18 infants fed breast milk (2.3 ± 0.6 ng/mL and 5.0 ± 1.3 nmol/min/mL, respectively). In the urine of infants with PKU, the biotin level (16.8 ± 24.2 μ g/g Cre) was significantly lower than infants fed breast milk (70.2 ± 61.8 μ g/g Cre). 3-HIA, lactate and pyruvate levels tended to be high. It is shown that the state of low biotin levels is latent in infants fed special milk.

ビオチンは、通常、食物から摂取される。食物中でビオチンは大部分が蛋白と結合しており、腸内に入った食物は蛋白分解を受け、最終的に腸臓由来のビオチニダーゼによってビオチンは遊離され、吸収される。

血液中では肝臓由来のビオチニダーゼが輸送蛋白として働き、細胞内にとりこまれる。そして、4つのカルボキシラーゼの補酵素として働いたあと、細胞内のビオチニダーゼによって遊離され、再利用される一方で、ビオチニルペプチドとして細胞外へ出、再びビオチニダーゼによって遊離と吸収が血液と細胞間で行われる。また腎での再吸収もあり、幾重にも損失がないように、微量のビオチンが有効に使われるような機構になっている。そして、ビオチン自身も異化代謝を受け尿中に排泄される (Fig. 1)。

ビオチン欠乏症の原因には、先天的には酵素欠損によるもの、すなわちビオチニダーゼ欠損症やカルボキシラーゼ欠損症があり、後天的には食物由来によるものがある。これには第一に食品中にビオチンが非常に少ない場合、第二に生卵白中のアビジンのようにビオチンと強固に結合する物質を含む食品を大量に、長期にわたって摂取する場合が挙げられる。

ビオチン酵素であるカルボキシラーゼが関与する反応は、糖新生、アミノ酸代謝、脂質合成に重要な役割を担っている。この中で、ロイシンの代謝に関与する β -メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ (MCC) はビオチン欠乏状態の影響を早期に受けやすく、ビオチン欠乏によるMCC活性の低下は3-HIAの尿中排泄を増加させる。したがって、尿中

*所在地：東京都板橋区熊野町47-11 (〒173-0025)

**所在地：兵庫県姫路市新在家本町1-1-12 (〒670-0092)

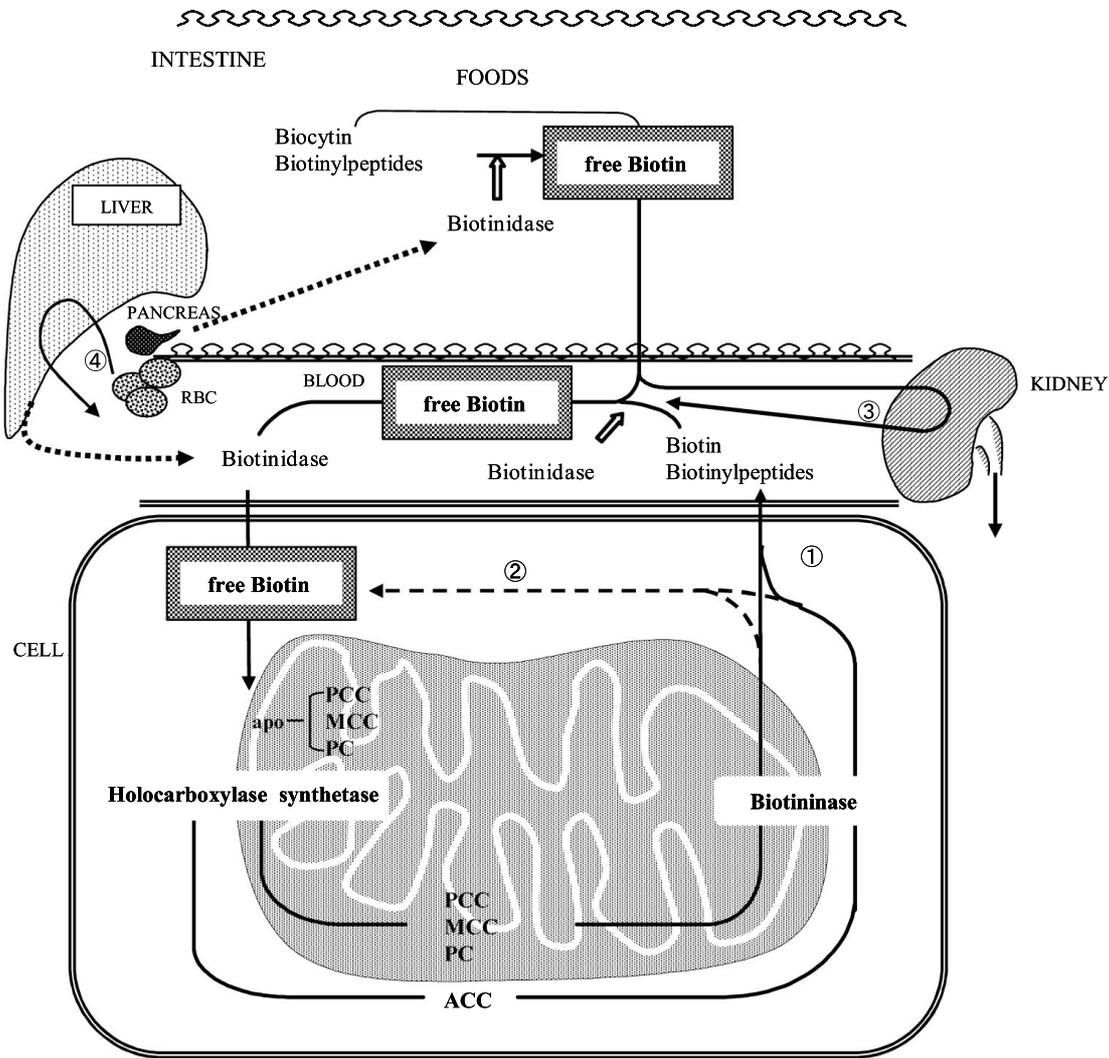


Fig. 1 Biotin movement.

ACC: acethyl CoA carboxylase, PCC: propionyl CoA carboxylase,
MCC: β -methylcrotonyl CoA carboxylase, PC: pyruvate carboxylase,
① to ④: biotin recycling.

の3-HIAの増加はビオチン欠乏の早期の指標とされている¹⁾ (Fig. 2)。

明らかなビオチン欠乏症は、皮膚症状や神経症状となって現われ、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、けいれんなどの臨床的特徴を示す。乳幼児のビオチン欠乏症は、発育や知育不全を伴う。

著者らは乳幼児の食品である粉ミルクに含まれるビオチン量を比較したところ、一般用・治療用ともに米国製品と比較してビオチン含量が少なく、特に治療用は低値で、殆ど含まれていない製品もあり、ビオチン欠乏を起こす危険性を指摘してきた²⁾ (Fig. 3)。

ビオチンは、食品添加物として2003年に栄養機能食品に使用できるようになったが、調製粉乳への添加は認可されておらず、治療用粉ミルクによるビオチン欠乏症は2003年以降も報告されており³⁾、わが国では治療用粉ミルクによるビオチン欠乏症が潜在的に存在するものと推測される。そこで、本研究では、治療用粉ミルクを摂取しているフェニルケトン尿症 (PKU) 小児を対象として、ビオチン状態の評価を試みた。

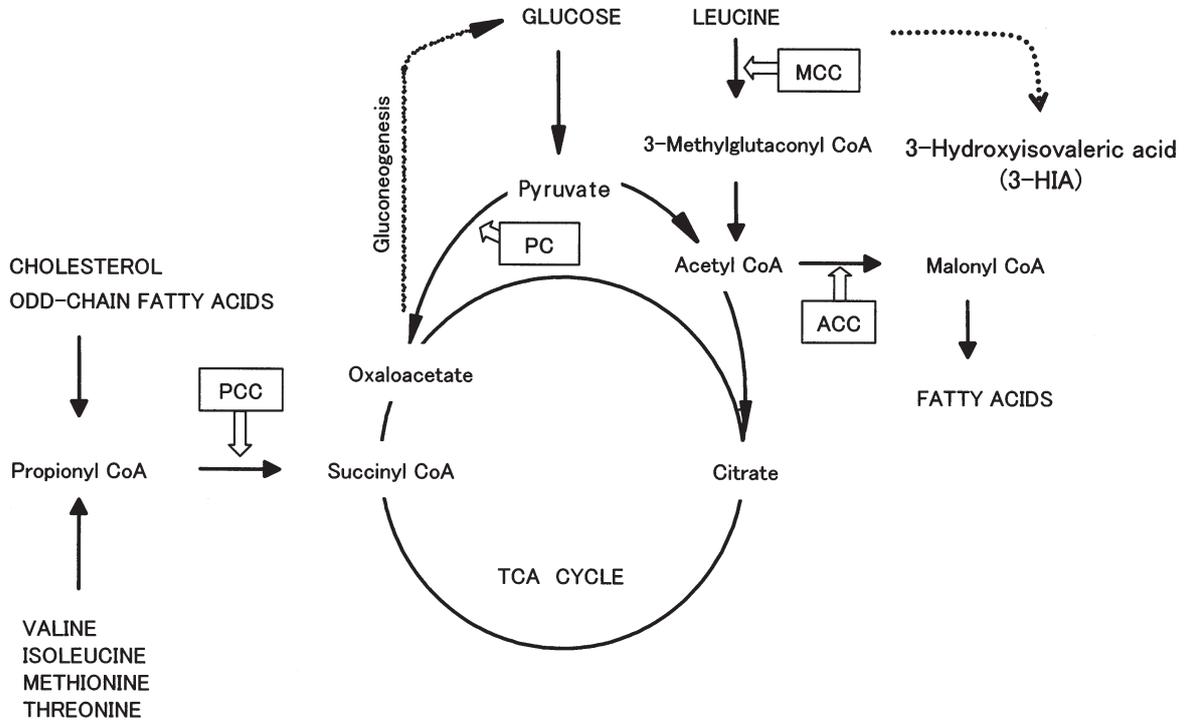


Fig. 2 Metabolic pathway in which biotin-dependent enzymes are involved.
ACC: Acetyl CoA carboxylase, PCC: Propionyl CoA carboxylase,
PC: Pyruvate carboxylase, MCC: β-Methylcrotonyl CoA carboxylase.

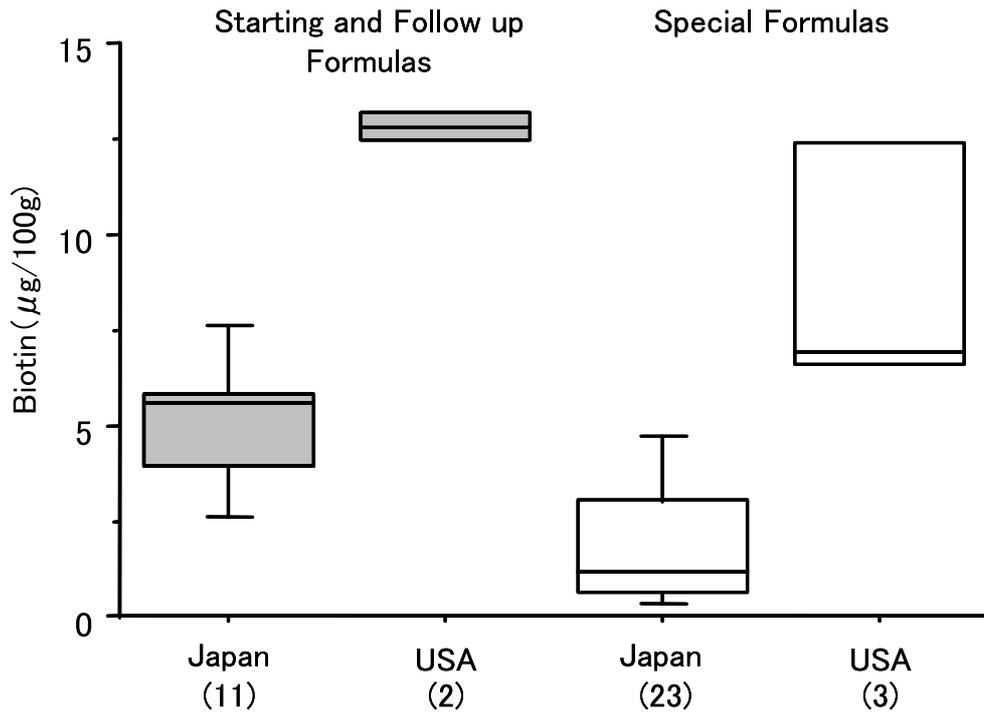


Fig. 3 Biotin content of infant fomulas.
(): number of samples.

対象および方法

1. 対象者

本研究での対象は協力していただいた病院に通院もしくは入院している健康な早期新生児と乳児、およびPKU児の計92名で、内訳は生後4-6日の健康な早期新生児で母乳栄養児20名（男児12名，女児8名，平均4.5日齢）人工栄養児20名（男児15名，女児5名，平均4.5日齢），乳児では母乳栄養児18名，混合栄養児5名，一般調製粉乳による人工栄養児7名，一般調製粉乳と治療用特殊ミルクが与えられているPKU児22名である。

2. サンプルの採取および分析

対象者の血液，尿は保護者の承諾を得て採取し，血清では遊離および総ビオチン量，ビオチンの遊離と輸送蛋白としての役割をもつビオチニダーゼ活性，ビタミンB₁₂および葉酸量を測定した。尿ではビオチン，3-HIA，乳酸，ピルビン酸量を測定し，クレアチニン（Cre）比を求めた。

測定方法は，ビオチンは福井らの寒天プレート法⁴⁾，ビオチニダーゼ活性はWolfらの方法⁵⁾，ビタミンB₁₂と葉酸は化学発光免疫測定（CLIA）法⁶⁾，尿中3-ヒドロキシイソ吉草酸（3-HIA），乳酸，ピルビン酸測定には有機酸分析装置（島津製作所株，京都）を用い，クレアチニンはJaffe法により測定した。

3. 統計学的解析

ビオチンおよび有機酸の分析データの集計や解析には，エクセル統計（マイクロソフト株，東京）を用いた。

結 果

Table 1およびFig. 4は血清のビオチン量とビオチニダーゼ活性の測定結果である。母乳栄養児，人工栄養児，母乳人工混合栄養児，PKU児の各グループは遊離ビオチン，総ビオチン，ビオチニダーゼ活性のそれぞれの基準域内0.4～1.1 ng/mL，1.6～3.7 ng/mL⁴⁾，3.4～7.5 nmol/min/mL⁵⁾にあり，PKU乳児は遊離ビオチン，総ビオチンそれぞれが0.6 ng/mL，2.5 ng/mLであった。これは母乳栄養児の0.6 ng/mL，2.3 ng/mLと比較して差はなかった。また，グループ間に有意な差は認められなかった。

Fig. 5は血清中のビタミンB₁₂と葉酸の濃度である。各グループともに基準域（ビタミンB₁₂ 233～914 pg/mL，葉酸 3.6～12.9 ng/mL）内もしくは基準域よりも高値であり，母乳栄養児に比べ人工栄養児・PKU児でビタミンB₁₂，葉酸ともに有意に高値であった。

Table 2は早期新生児を含めた尿でのビオチン濃度，および有機酸の測定結果である。ビオチン排泄量（Fig. 6）は各グループともに基準域（4.0～25.0 μg/g Cre）⁴⁾もしくは高値であった。早期新生児は母乳栄養児，人工栄養児ともに幼児の母乳栄養児，人工栄養児と比較するとそれぞれに有意に低値であり，特に母乳栄養幼児（70.2 ± 61.8 μg/g Cre）の1/5程度のビオチン排泄量であった。PKU児（16.8 ± 11.1 μg/g Cre）は母乳栄養幼児，人工栄養幼児（39.3 ± 24.2 μg/g Cre）と比べ有意に低かった（p < 0.01）。

ビオチン欠乏状態の早期の指標とされる3-HIAはPKU児（平均498 mmol/mol Cre）は他と比べ有意な差はなく，母乳栄養幼児（平均511 mmol/mol Cre）とも大きな差はなかったが，極端に高い例があった。

Fig. 7の乳酸ではPKU児が最も高く（855 mmol/mol Cre），母乳栄養幼児（389 mmol/mol Cre）と比べ，人工栄養の

Table 1 Serum biotin level and biotinidase activity in infants

Infants	Type of milk	n	Free biotin	Total biotin	Biotinidase activity
			(ng/mL)	(ng/mL)	(nmol/min/mL)
Normal	Breast milk	18	0.6 ± 0.2	2.3 ± 0.6	5.0 ± 1.3
Normal	Breast milk and formula	5	0.6 ± 0.1	2.4 ± 0.4	4.9 ± 1.9
Normal	Formula	7	0.8 ± 0.4	2.4 ± 0.5	6.2 ± 1.6
PKU	Special milk	22	0.6 ± 0.1	2.5 ± 0.4	6.6 ± 0.9
Normal range			0.4 - 1.1	1.6 - 3.7	3.4 - 7.5

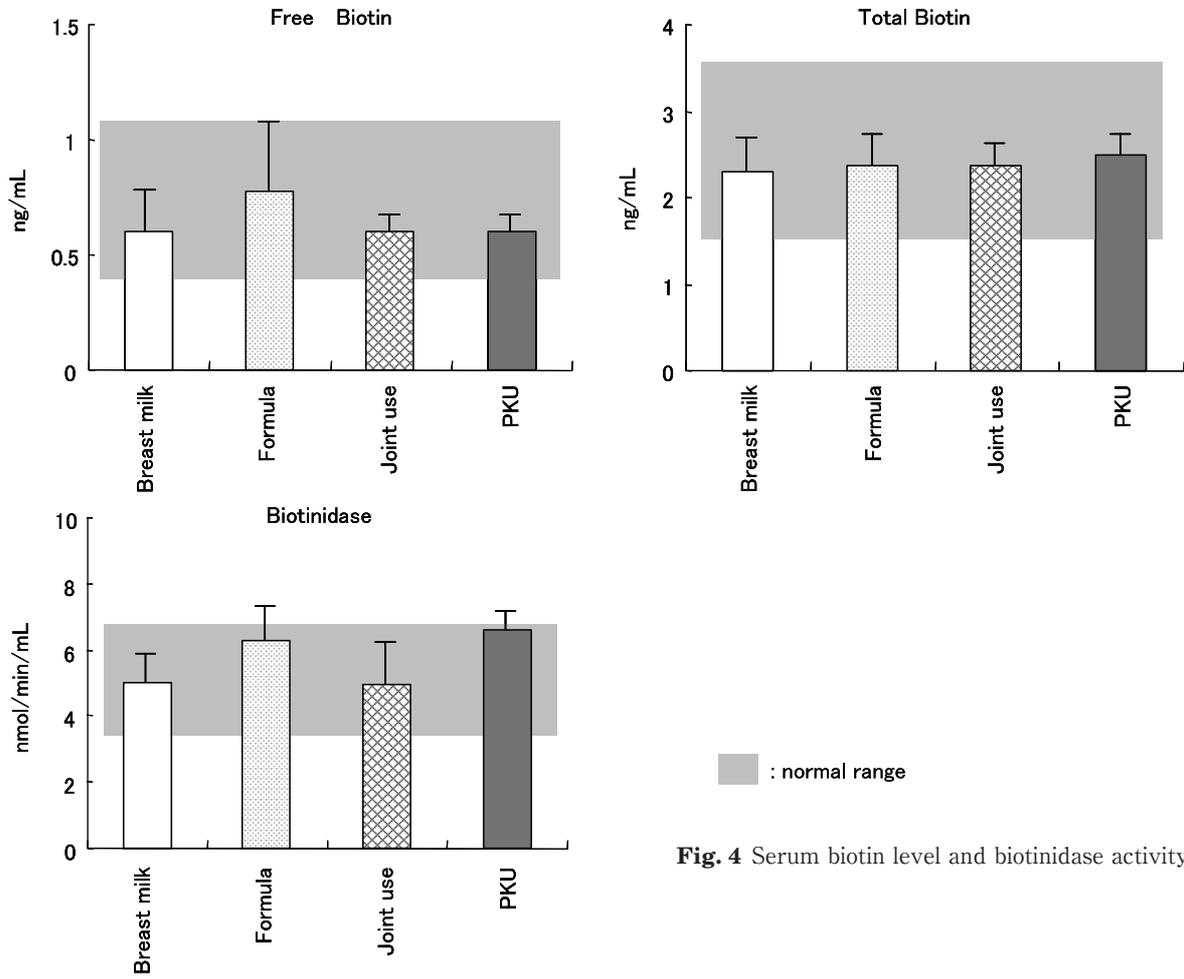


Fig. 4 Serum biotin level and biotinidase activity.

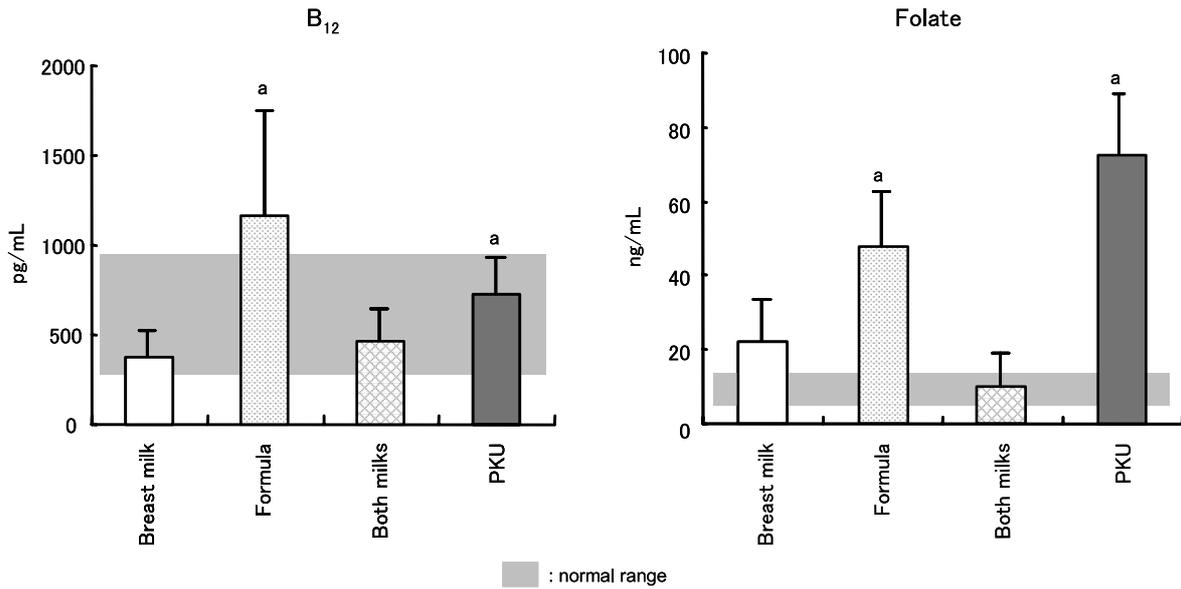


Fig. 5 Serum vitamin B₁₂ and folate level.
a: p < 0.01 vs infants fed breast milk.

Table 2 Levels of biotin and organic acids in urine

		Biotin		3-HIA		Lactate		Pyruvate	
		n	µg/g Cre	n	mmol/mol Cre	n	mmol/mol Cre	n	mmol/mol Cre
Newborn	Breast milk	20	14.1 ± 8.2	15	369 ± 374	15	311 ± 140	15	1194 ± 479
	Formula	20	12.6 ± 8.9	15	408 ± 229	15	540 ± 295	15	1331 ± 667
Infants	Breast milk	8	70.2 ± 61.8	8	511 ± 322	8	389 ± 146	8	2379 ± 834
	Formula	5	39.3 ± 24.2	6	230 ± 190	6	702 ± 547	6	2814 ± 834
	Both milks	5	24.1 ± 6.5	7	465 ± 194	6	567 ± 286	7	3518 ± 1741
	PKU	20	16.8 ± 11.1	11	498 ± 921	14	855 ± 1021	14	4890 ± 6348

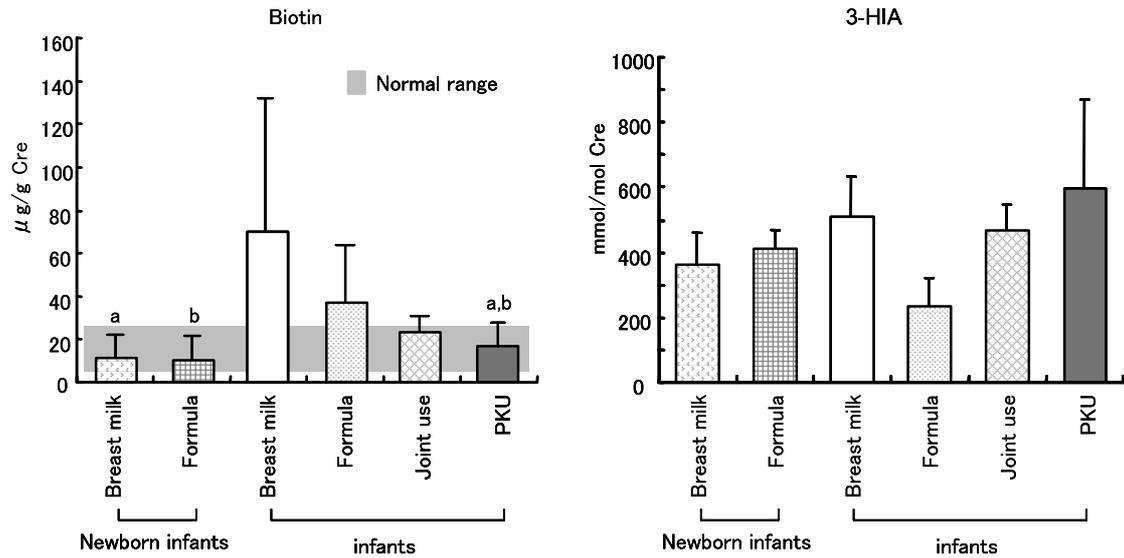


Fig. 6 Urine biotin and 3-HIA level.

a: $p < 0.01$ vs infants fed breast milk, b: $p < 0.01$ vs infants fed formula.

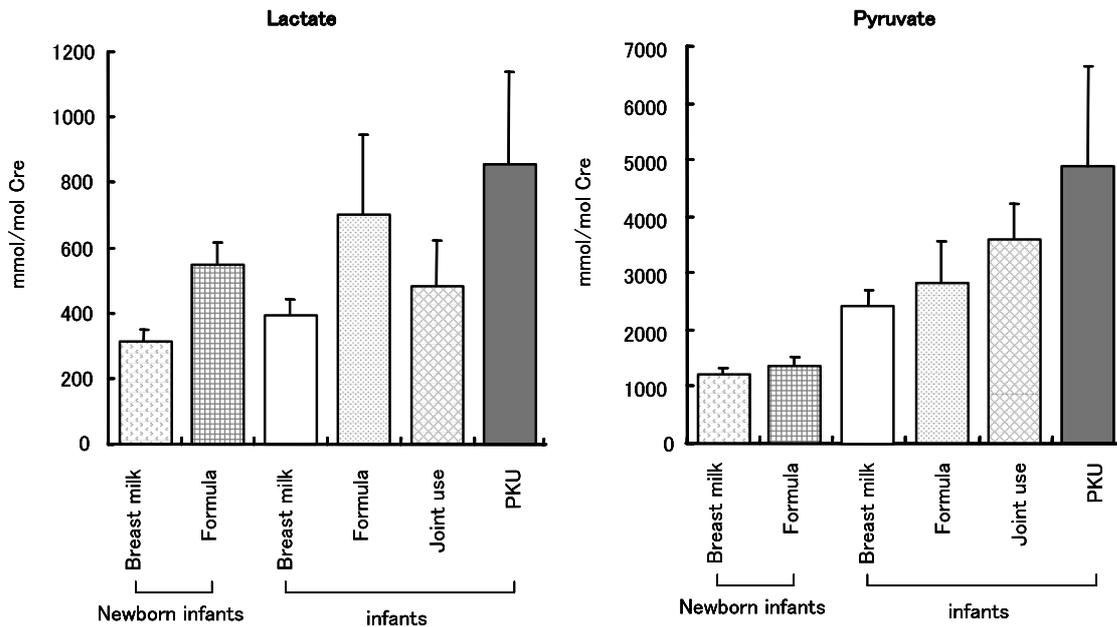


Fig. 7 Urine lactate and pyruvate level.

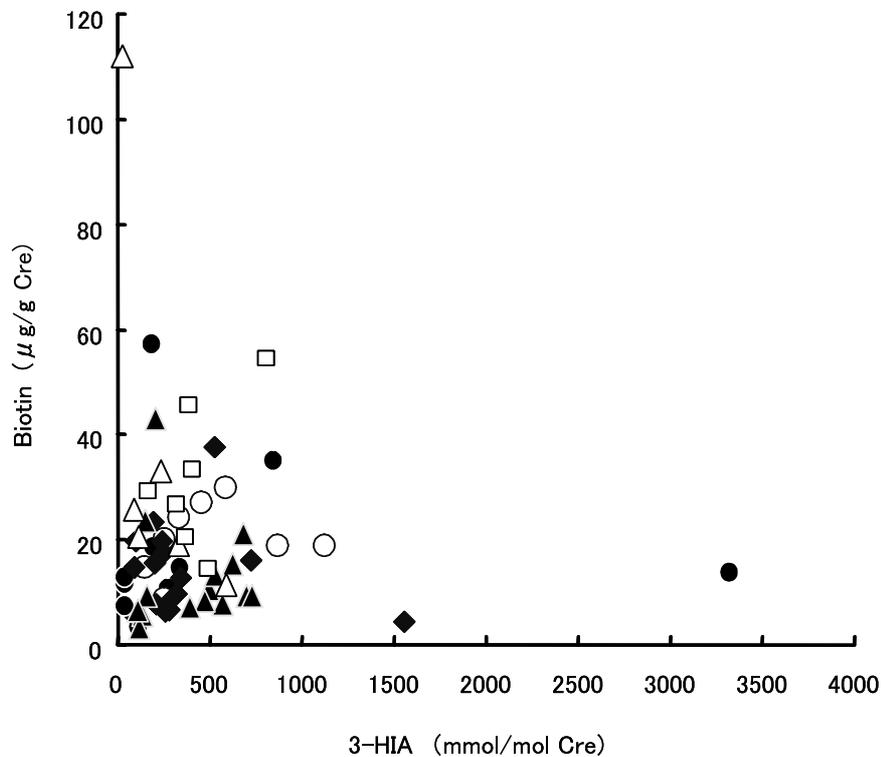


Fig. 8 The correlation between urine biotin and 3-HIA level.

◆: Newborn infant fed breast milk, △: Newborn infant fed formula, ○: Infant fed breast milk, ▽: Infant fed formula, □: Infant taken together breast milk and formula, ●: Infant with PKU.

摂取状況が高くなるにつれ、乳酸排泄も高くなる傾向であった。ピルビン酸は早期新生児よりも幼児、母乳よりも人口栄養の方がピルビン酸の排泄量が高い傾向にあり、特にPKU児では最も高値であった。

Fig. 8はビオチン排泄量と3-HIAの関係である。ビオチンが低値で3-HIAが高い例が早期新生児の母乳栄養児で1例、PKU児で1例あった。

考 察

ビオチンは、食品添加物としては栄養機能食品に限り使用できるようになったが、調製粉乳にはいまだに使用することができない。調製粉乳には、ビオチンがほとんど含まれていないものがあり、人工栄養児において皮膚炎などが発症することが報告されている。

本研究においては、調製粉乳、特に治療用特殊粉ミルクが与えられているPKUの乳児において、ビオチンが十分に摂取されているか否か、母乳栄養児と比べて検討を行った。

血清ビオチン量とビオチニダーゼ活性は母乳栄養児・人工栄養児・母乳と人工栄養併用児、PKU児間で有意な差は認められなかった。尿へのビオチン排泄との関係では、排泄量の多い順に、母乳栄養児>人工栄養児>併用児>PKU児であり、血液中では一定の範囲で平衡性を保ち、母乳や調製粉乳中のビオチン量は尿に反映しているものと思われた。

血清中のビタミンB₁₂と葉酸が母乳栄養児に比べ人工栄養児とPKU児で有意に高いのは調製粉乳中にビタミンB₁₂と葉酸が添加されているためであろう。

早期新生児の尿中ビオチン量は母乳栄養児、人工栄養児ともに幼児に比べ有意に低値であるのは、初乳中ビオチン量が成乳と比較して少なく⁷⁻⁹⁾、一般の調製粉乳でも乳児用はフォローアップ用よりもビオチン含量が低い⁴⁾ということに関係していると思われる。

尿でのビオチン、3-HIA、乳酸、ピルビン酸の関係では、ビオチンは摂取された量を反映していると推察されるが、

他の三者は体内代謝の状態を反映したものと捉えることができる。3-HIAの増加はビオチン欠乏の指標とされてはいるが、その排泄量は必ずしも尿中ビオチン量との相関性をもっていない。しかしながら、PKU児でビオチンが低値で3-HIAが極端に高い例があり、ビオチン欠乏の可能性が高いと思われた。これはビオチンが添加されていない特殊ミルクに起因するものと思われる。早期新生児で母乳栄養児においても1例のビオチン低値・3-HIA高値例があったが、母乳中のビオチン濃度が不明であるため、ビオチン状態の評価は困難であるが、母乳栄養児においても、3-HIAの通常排泄量の範囲であるのかも知れない (Fig. 8)。

ピルビン酸はビオチンとは逆相関関係にあった。すなわち、尿へのビオチン排泄量が多いほど、ピルビン酸量が少なく、ビオチン排泄が少ないほどピルビン酸量は多い。また、乳酸も母乳栄養児に比べ人工栄養児、PKU児の順に高い傾向にあり、ビオチン依存症での報告¹⁰⁾に傾向が類似している。

PKU患児は特殊ミルクによる栄養摂取を余儀なくされる。本研究によって、PKU患児ではビオチンが添加されていない特殊ミルクの摂取によってビオチン欠乏が発生する可能性を示した。

また、乳酸やピルビン酸の高値を考えれば、PKU乳児では総じてビオチンの潜在的な低値状態にあることが推測される。治療用特殊粉ミルクへのビオチン添加が必要である。

参考文献

- 1) Mock NI, Malik MI, Stumbo PJ, Bishop WP, Mock DM (1997) Increased urinary excretions of 3-hydroxyisovaleric acid and decreased urinary excretion of biotin are sensitive early indicators of decreased biotin status in experimental biotin deficiency. *Am J Clin Nutr* 65: 951-958.
- 2) 渡邊敏明, 福井 徹 (1996) わが国の調製粉乳に含まれているビオチン量の分析. *日本栄養・食糧学会誌* 49: 343-347.
- 3) Fujimoto W, Inaoki M, Fukui T, Inoue Y, Kuhara T (2005) Biotin deficiency in an infant fed with amino acid formula. *J Dermatol* 32: 256-261.
- 4) Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y (1994) Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* 40: 491-498.
- 5) Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL (1983) Biotinidase deficiency: the enzyme defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. *Clin Chim Acta* 131: 272-281.
- 6) 石渡幸久, 遠藤紀子, 池田律子, 安田和人 (1995) 全自動化学発光免疫測定装置 ACS-180を用いた化学発光による血清ビタミンB₁₂・葉酸の測定. *日本臨床検査自動化学会誌* 20: 29-37.
- 7) Ford JE, Zechalko A, Murphy J, Brooke OG (1983) Comparison of the B vitamin composition of milk from mothers of preterm and term babies. *Arch Dis Child* 58: 367-372.
- 8) Salmenpera L, Perheentupa J, Pispala JP, Siimes MA (1985) Biotin concentration in maternal plasma and milk during prolonged lactation. *Int J Vit Nutr Res* 55: 281-285.
- 9) Hirano M, Honma K, Daimatsu T, Hayakawa K, Oizumi J, Zaima K, Kanke Y (1992) Longitudinal variations of biotin content in human milk. *Int J Vitam Nutr Res* 62: 281-282.
- 10) Mardach R, Zemleni J, Wolf B, Cannon MJ, Jennings ML, Gress S, Boylan J, Roth S, Cederbaum S, Mock DM (2002) Biotin dependency due to a defect in biotin transport. *J Clin Invest* 109: 1617-1623.