

表4 基準体位

年齢	男性		女性*	
	身長(cm)	体重(kg)	身長(cm)	体重(kg)
0～5 カ月	62.2	6.6	61	6.1
6～11 カ月	71.5	8.8	69.9	8.2
1～2 歳	85	11.9	84.7	11
3～5 歳	103.5	16.7	102.5	16
6～7 歳	119.6	23	118	21.6
8～9 歳	130.7	28	130	27.2
10～11 歳	141.2	35.5	144	35.7
12～14 歳	160	50	154.8	45.6
15～17 歳	170	58.3	157.2	50
18～29 歳	171	63.5	157.7	50
30～49 歳	170	68	156.8	52.7
50～69 歳	164.7	64	152	53.2
70 歳以上	160	57.2	146.7	49.7

*妊娠中の者を除く。

長因子には、WHO/UNA が採用し⁴⁾、アメリカ/カナダの食事摂取基準⁵⁾も踏襲している値を、表3に示すように、わが国の年齢階級区分に合うように改定した。この結果、今回の改定からわが国の年齢階級の区分が変わるために、3歳児の補正係数が日本では0.15、米国では0.3と、日米で2倍の違いがあるが、科学的根拠はとくにない。

4. 基準体位

食事摂取基準では、性・年齢階級別に一つの代表値を算定するにとどまっておき、階級内における体位特性(身長や体重)は考慮に入れていない。つまり、食事摂取基準は、年齢階級内のもっとも典型的な体位として策定する。その体位として、1歳以上には、2001(平成13)年国民栄養調査⁶⁾における当該の性・年齢階級における身長・体重の中央値を用い、0～11カ月の乳児に関しては、平成12年乳幼児身体発育調査⁷⁾のデータより該当月数の集団の中央値を用いている。これを「基準体位」と呼ぶ(表4)。

5. 外挿法の留意点

推定平均必要量・目安量は、1日当たりの摂取量(g/日、など)として得られることが多く、一方、上限量は体重1kg当たりの摂取量として得られ

ることが多い。このため、上限値を外挿する場合は、同じ栄養素でも異なる方法が必要とされる。

異なる性に対する外挿が必要な場合、たとえば、男性の値が既知で女性の値を求めたい場合にも、特定の理由がない場合は、性差は考慮せず外挿する。ただし、栄養素ごとに、対象とする性・年齢階級の特徴を十分に考慮したうえで外挿方法を定めるべきである。

なお、推奨量については、外挿はせず、当該の性・年齢階級の推定平均必要量から求めている。また、目標量については、年齢階級ごとに、推奨量や目安量、現在の摂取量中央値を用いて求め、外挿はしていない。

6. 乳児からの外挿法

●0～5カ月児

出生後6カ月未満の乳児では「推定平均必要量」や「推奨量」を決定するための実験は不可能である。そして、健康な乳児が摂取する母乳の質と量は乳児の栄養状態にとって望ましいものと考えられる。このような理由から、例外を除き、乳児における食事摂取基準は、母乳の栄養成分ならびに健康な乳児の母乳摂取量を根拠に「目安量」を算定することができる。この期間を通じた哺乳量は0.78 l/日前後との報告があるため⁸⁾、今回は0.78

l/日を基準哺乳量としている。

しかしながら、栄養素によっては、母乳中含量の個人差が大きく、母乳中含量から必要量を算出できないことがある。たとえば、ビタミンDの場合には、欠乏症であるくる病の発症率を指標として、必要量が算出されている。

●6~11カ月児

この時期の食事摂取基準を算出する方法としては、3つに大別できる。これらの方法は、栄養素のそれぞれの特徴を考慮して、使い分けられている。

1) 0~5カ月児からの外挿

0~5カ月児の食事摂取基準から外挿する場合には、

$$X_{6-11/0-5} = X_{0-5} \times (W_{6-11}/W_{0-5})^{0.75}$$

という式が提案されている。ただし、

$X_{6-11/0-5}$ = 求めたい6~11カ月児の食事摂取基準

W_{6-11} = 求めたい6~11カ月児の基準体位の体重(kg)

X_{0-5} = 基準とする0~5カ月児の食事摂取基準

W_{0-5} = 基準とする0~5カ月児の基準体位の体重(kg)

なお、この場合、成長因子は考慮しない。これは、0~5カ月児が成長途中であり、その食事摂取基準のなかに成長因子に帰する分が含まれていると考えられるからである。

基準体位の体重を代入すると、男女それぞれ、 $(8.8/6.6)^{0.75}$ 、 $(8.2/6.1)^{0.75}$ となり、1.24、1.25となる。いずれの式を用いるかは、栄養素によって異なるが、おおむね、近似した値が得られる。水溶性ビタミンであるパントテン酸とビオチンは、この方法で外挿した。

2) 母乳と離乳食の混合食

食事摂取基準を算定すべき科学的根拠が乏しい場合には、6~11カ月の乳児は、母乳(または人工乳)と通常の食品との混合食であると仮定し、0~5カ月児の食事摂取基準と1~2歳児のそれを考慮

して算定することができる。算定のための十分な根拠が得られない場合は、5カ月と2歳間の食事摂取基準の変化が直線的であると仮定して得られる式、

$$X_{6-11} = (5 \times X_0 + 2 \times X_1) / 7$$

を用いる。ただし、

X_{6-11} = 求めたい6~11カ月の乳児の食事摂取基準

X_{0-5} = 基準とする0~5カ月児の食事摂取基準

X_{1-2} = 基準とする1~2歳児の食事摂取基準

第2の方法としては、0~5カ月の食事摂取基準(AI)および成人の食事摂取基準(RDAあるいはAI)を利用して、それぞれから食事摂取基準を平均したものを6~11カ月児の食事摂取基準とすることができる。

つまり、

$$X_{6-11} = (X_{6-11/0-5} + X_{6-11/A}) / 2$$

という式を用いる。ただし、

X_{6-11} = 求めたい6~11カ月の乳児の食事摂取基準

$X_{6-11/0-5}$ = 0~5カ月児から外挿した6~11カ月児の食事摂取基準： $X_{0-5} \times (W_{6-11}/W_{0-5})^{0.75}$

$X_{6-11/A}$ = 成人から外挿した6~11カ月児の食事摂取基準： $X_A \times (W_{6-11}/W_A)^{0.75} \times (1+0.30)$

水溶性ビタミンのパントテン酸とビオチン以外は、この方法で外挿している。

このほかの方法としては、ビタミンKは、離乳期以降は母乳のほかに食事からとるようになるので、母乳以外の食事からの摂取量も考慮して、6~11カ月の乳児の食事摂取基準を算出することができる。

3) 0~5カ月児と同量

乳児期を通して、哺乳量を0.78lとしているので、ビタミンAは0~5カ月児の食事摂取基準と同じ値にしている。

つまり、

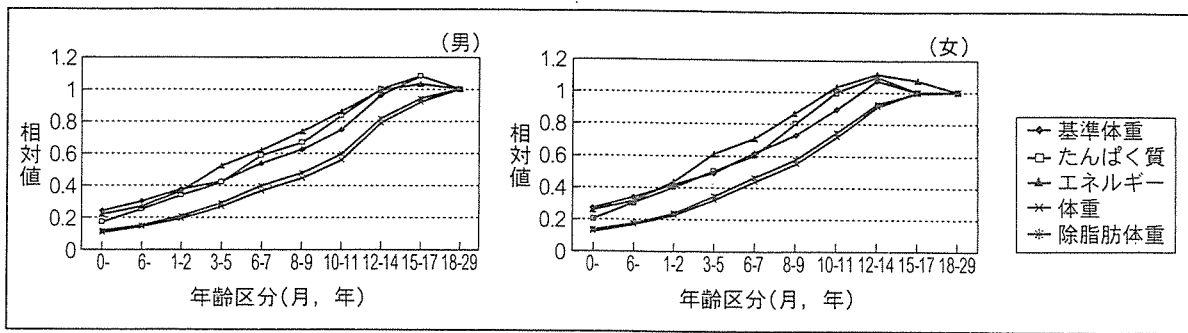


図1 わが国の成人男女からの外挿の比較

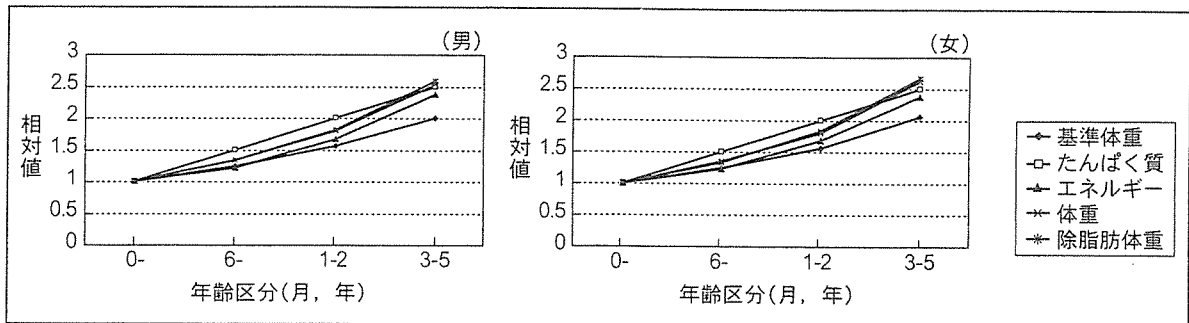


図2 わが国の0~5カ月乳児からの外挿の比較

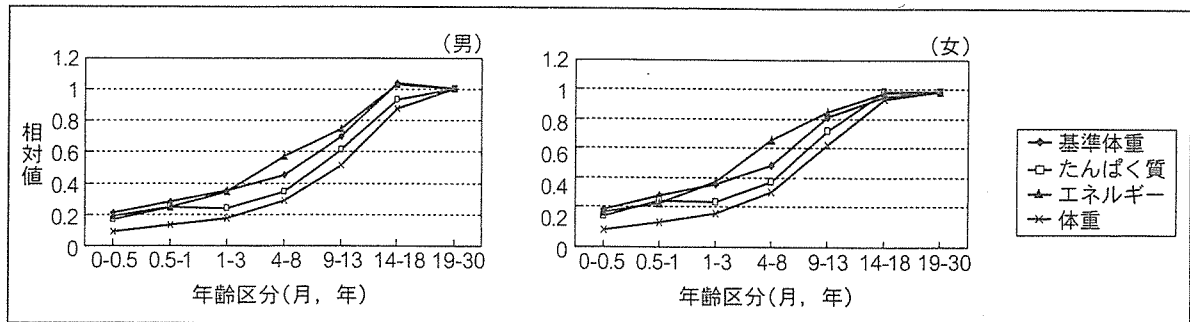


図3 米国における成人男女からの外挿の比較

$$X_{6-11} = X_{0-5}$$

となる。ただし、

X_{6-11} = 求めたい6~11カ月の乳児の食事摂取基準

X_{0-5} = 基準とする0~5カ月の乳児の食事摂取基準

なお、ビタミンDおよびEは、母乳中の含有量に個人差が大きいため使用できないうえ、乳児での調査データが0~5カ月の乳児と6~11カ月の乳児とが分けられていないために、同じ食事摂取基準を使用している。

7. 若年者（小児および青少年者）

食事摂取基準の策定のための資料価値を有する研究で、発育期にある若年者を対象としたものは少ない。そこで、十分な資料が存在しない場合には、一般に、先に示した3-1)および3-2)の外挿方法を用いて、成人の算定値から推定することができる。

図1および図2は、わが国における18~29歳の年齢階級の成人を基準にして、5つの方法で外挿した場合の違いを比較したものである。男女とも、

表5 外挿方法の違いによる比較(成人からの外挿) (男性)

年齢	体表面積 ^a	体表面積 ^b	基準体重 ^c	EER ^d	たんぱく質 ^e	除脂肪体重 ^f
0-(月)	42.0	42.0	42.0	42.0	52.0	26.8
6-(月)	52.1	52.5	56.0	49.0	78.0	35.6
1-2	88.9	163.9	45.0	87.2	104.0	48.6
3-5	114.6	192.2	63.1	124.0	115.0	69.1
6-7	128.9	193.2	86.9	148.3	161.0	94.6
8-9	149.3	213.1	105.8	176.2	184.0	114.6
10-11	178.4	239.2	134.2	206.7	230.0	142.3
12-14	230.7	265.4	189.0	239.1	276.0	195.4
15-17	258.9	276.0	220.3	248.1	299.0	225.6
18-29	240.0	240.0	240.0	240.0	240.0	240.0
30-49	252.6	245.4	257.0	238.2	240.0	249.8
50-69	241.4	246.4	241.9	216.6	240.0	234.8
70-	221.9	239.4	216.2	165.4	240.0	214.1

^a体表面積(Kleiberの式): 体重(W:kg)から算出
 $(W/W)^{0.75}(1+G)$

^b体表面積(Du Boisの式の変形): 身長(H:cm)と体重(W:kg)から算出
 $(H^{0.725} \times W^{0.425} \times 75.05)(1+G)$

^c基準体重:(kg)

^dEER: 推定エネルギー必要量(kcal/日)

^eたんぱく質: 1g当たりの摂取量を4とした場合

^f除脂肪体重: 身長(H:m)と体重(W:kg)から算出

男性= $1.10 \times W - 128 \times W^2 / (100 \times H)^2$

女性= $1.07 \times W - 148 \times W^2 / (100 \times H)^2$

体重(いわゆる発育)、除脂肪体重と比較して、基準体重、たんぱく質の摂取量および推定エネルギー必要量(EER)との間に大きな差異が認められる。しかしながら、前者3つのどの方法で外挿しても、あまりはつきりとした違いはみられない。特定の年齢階級によっては、いずれの外挿でもほとんど同じ値となっている。水溶性ビタミンのビタミンB₁、B₂およびナイアシンは、エネルギーのEERから外挿入している。ビタミンB₆およびビタミンEの外挿は、それぞれたんぱく質摂取量および除脂肪体重から行っている。このほかのビタミンB₁₂、葉酸、ビオチン、アスコルビン酸およびビタミンKは体表面積から外挿している。

8. 高齢者

高齢者の特徴は、栄養摂取能力、栄養吸収能力などの生理機能の個人差が大きいことである。また、多くの人々が、なんらかの疾患を有していることも特徴としてあげられる。そのため、年齢だけ

でなく、個人の特徴に十分に注意を払うことが必要である。水溶性ビタミンのビタミンB₁、B₂およびナイアシンは、エネルギーのEERから外挿しているため、高齢者で食事摂取基準が成人に比べて低くなっている。しかし、これ以外の水溶性および脂溶性ビタミンは成人と同じ値である。なお、ビタミンDは、骨折の予防のため、食事摂取基準が成人より高値である。

9. 今後の課題

図3は米国のデータを基に成人からの外挿を試みたものである。わが国のものと異なる点としては、基準体重、たんぱく質、およびエネルギー摂取量による外挿がそれぞれ異なっており、特色がみられている。わが国との相違については、今後検討が必要と考えられる。

表5は、異なった外挿方法で、成人から食事摂取基準を算出したものである。いずれの値を使用するかは、個々の栄養素が有している生理的機能

に依存している。しかしながら、すべての栄養素は複雑な関連をもちながら生理機能を維持している。このようなことから、今後すべての栄養素に共通した外挿方法が必要と考えられる。

文献

- 1) Kleiber, M.: Body size and metabolic rate. In: Kleiber, M.: The Fire of Life: An Introduction to Animal Energetics, Robert Krieger Publishing Company, Huntington, New York, 1975, p. 179-222.
- 2) Kleiber, M.: Body size and metabolic rate. *Physiol. Rev.*, 27: 511-541, 1947.
- 3) West, G.B., Brown, J.H., Enquist, B.J.: A general model for the origin of allometric scaling laws in biology. *Science*, 276: 122-126, 1997.
- 4) FAO/WHO/UNA (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization/United Nations): Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNA expert consultation. Technical report series. No. 724. World Health Organization, Geneva, 1985.
- 5) The B vitamins and choline: overview and methods. In: Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes For Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. National Academy Press, Washington D.C., 1998, p. 27-40.
- 6) 健康・栄養情報研究会: 平成 13 年厚生労働省国民栄養調査結果, 2003.
- 7) 加藤則子, 奥野晃正, 高石昌弘: 平成 12 年乳幼児身体発育調査結果について. *小児保健研究*, 60: 707-720, 2001.
- 8) 鈴木久美子, 佐々木晶子, 新澤佳代・他: 離乳前乳児の哺乳量に関する研究. *栄養学雑誌*, 62 (印刷中), 2004.

●お知らせ

10月号次号予告欄でご案内しました〔特別企画〕第26回欧州静脈経腸栄養学会 (ESPEN) ハイライトニュースは、12月号より掲載いたします。

<短報>

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

渡邊 敏明^{*1)}、大口 憲一¹⁾、榎原 周平¹⁾、福井 徹²⁾

Assay of 3-hydroxyisovaleric acid determination as an indicator of biotin deficiency

Toshiaki Watanabe^{*1)}, Ken-ichi Oguchi¹⁾, Shuhei Ebara¹⁾ and Toru Fukui²⁾

Summary The determination of 3-hydroxyisovaleric acid (3-HIA) using high-performance liquid chromatography (HPLC) after derivatization with 2-nitrophenylhydrazine hydrochloride (2-NPH·HCl) was studied. The derivatized 3-HIA was extracted into *n*-hexane and separated isocratically on a C8 reversed-phase column with YMC-FA. 3-HIA was detected in urine obtained from biotin-deficient mice. 3-HIA was assayed with high accuracy by the present HPLC method, which is superior to the previously published GC/MS method because of its simplicity, time savings, and cost.

Key words: 3-Hydroxyisovaleric acid, High-performance liquid chromatography, Biotin deficiency, Methylcrotonyl CoA carboxylase

I. 緒言

ビオチンは、カルボキシラーゼの補酵素として、炭酸固定反応や炭酸転移反応などに関与している。カルボキシラーゼは、糖新生、アミノ

酸代謝および脂肪酸合成などに重要な役割を果たしている。このうちβ-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ (MCC) は、ロイシンの分解過程における酵素の一つである。このため、ビオチンが欠乏すると、この酵素の活性が低下し、

*1) 兵庫県立大学環境人間学部生活環境学大講座
〒670-0092 姫路市新在家本町1-1-12

2) 病体生理研究所
〒173-0025 東京都板橋区熊野町47-11

受領日 平成16年7月1日
受理日 平成16年8月10日

*1) Department of Environment for Life and Living,
School of Human Science and Environment, University
of Hyogo,

1-1-12 Shinzaike Honcho, Himeji, Hyogo 670-0092,
Japan

E-mail: watanabe@shse.u-hyogo.ac.jp

2) Byotai Seiri Laboratory
47-11 Kumano, Itabashi-ku, Tokyo 173-0025, Japan

有機酸の一つである3-ヒドロキシイソ吉草酸 (3-hydroxyisovaleric acid, 3-HIA) の尿中への排泄が増加する¹⁾。

3-HIAは、一般に一定期間のビオチン欠乏状態が続かなければ尿中への顕著な増加となって表れてこない。しかし、ビオチン欠乏症状である皮膚炎や脱毛が発現する前に尿中での増加が認められることから、ビオチン欠乏の早期発見の診断指標として期待されている。Mockら (1997) は、妊婦の尿中に3-HIAが増加することを見出し、これが生体内ビオチン状態の指標として有用であることを報告している²⁾。

3-HIAの測定には、これまでガスクロマトグラフィ質量分析装置 (GC/MS) が用いられていた³⁾。しかしGC/MSを利用した測定法は、前処理が煩雑な上に、高価な機器を要することが多いため、汎用性が低い。このため、これまでGC/MS測定法に関しては十分な検討がなされているとは言えない。そこで、本研究では、前処理が簡単で、汎用性の高い高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いた尿中3-HIAの定量方法について検討した。

II. 方法

1. 前処理方法

3-hydroxyisovaleric acid (東京化成工業 (株) 東京) は脱イオン水にて1 mg/ml溶液を作製し3-HIA標準溶液とした。試料は、ビオチン欠乏飼料およびビオチン対照飼料を6週間与えたマウスから採取した尿を用いた。なお、本動物実験は「実験動物の飼育及び保管等に関する基準 (昭和55年3月総理府告示第6号)」に則って実施した。

3-HIA標準溶液および試料の前処理には、高速液体クロマトグラフィ用遊離型短鎖・長鎖脂肪酸分析キット ((株)ワイエムシー、京都) を用いた^{4),5)}。本キットは脂肪酸のカルボキシル基を2-ニトロフェニルヒドラジド (2-NPH) に変換する標識化試薬である。これにより、簡単な操作で紫外および可視部での高感度検出が可能になる。

前処理の手順は以下のとおりである。

1) 試料100 μ lを共栓付試験管に入れ、20 mM 2-NPH \cdot HCl 200 μ l、および250 mM 1-ethyl-3-

(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide \cdot HCl 200 μ lを順次加えて混合し、60 $^{\circ}$ C、20分間加温した。

2) 15% KOH (20%メタノール溶液) 200 μ lを加え、混合し、60 $^{\circ}$ C、15分間加温し、その後室温冷却した。

3) 1/30 mMリン酸緩衝液 (pH6.4) - 0.5M HCl (3.8:0.4) 4 mlおよび*n*-ヘキサン 5 mlを加え、十分に混合した後、3000rpm、5分間遠心した。

4) 分離したヘキサン層を除去し、*n*-ヘキサン 5 mlを加えて混合した。3000 rpm、5分間遠心後、再びヘキサン層を除去した。

5) ジエチルエーテル 5 mlを加え、十分に混合した後、3000 rpm、5分間遠心した。遠心後、エーテル層を別の共栓付試験管に採取した。

6) 採取したエーテルに超純水を3 ml加え、十分混合した後、3000 rpm、5分間遠心した。エーテル層を新しい試験管に採取した。

7) 採取したエーテル溶液を減圧乾固後、残渣をメタノール 1 mlで溶解し、測定試料とした。

2. スペクトル解析

測定波長設定のため、分光光度計UV mini-1240 (島津製作所 (株)、京都) を用いてスペクトル解析を行った。標識化した3-HIA標準溶液を石英ブラックマイクロセルに入れ、波長190 nm-500 nmの範囲でスペクトル解析を行った結果、波長225 nm-230 nmで吸収極大が認められた。したがって、測定波長は230 nmとした。

3. 測定条件

高速液体クロマトグラフィはHITACHI L-6200インテリジェントポンプ (日立製作所 (株)、東京) を用いた。カラムはシリカゲルを基材とした逆相系のカルボン酸専用分析カラムであるYMC-Pack FA ((株)ワイエムシー、京都) を使用した。カラム温度は50 $^{\circ}$ C、移動相はアセトニトリル、メタノール、純水 (30:16:54, v/v/v) の割合で混合し、0.01N HClでpH4.5に調整した溶液を用いた。流速は1.0 ml/min、UV (230 nm) で測定した。また、3-HIA標準溶液を用い、検量線を作成した。

III. 結果および考察

Fig. 1Aは3-HIA標準液 (1 mg/ml) のクロマト

グラムである。3-HIAは、保持時間 (retention time, RT) 8.32分の位置に検出された。ビオチン欠乏マウスの尿では、RT 8.33分の位置にピークが検出され、マウス尿においても3-HIAの測定が可能であることが示された (Fig. 1B)。一方、ビオチン欠乏マウスにビオチン添加飼料を与えたマウスの尿では、RT 8.73分にピークが認められるが、同じ位置にピークは認められなかった (Fig. 1C)。なお、3-HIAとpeak areaとの間には直線的な関連がみられ、5-1000 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で定量可能であることが示された。

これまでビオチン状態の把握には血清・尿中ビオチン濃度、血清ビオチンナーゼ活性の測定が行われていた。しかし、最近、尿中3-HIAが、ビオチン欠乏症が強く疑われる場合の確定診断として利用されるようになった。

現在、尿中3-HIAはGC/MSによって測定されているが、機器が高価であるだけでなく、測定前処理で、尿中有機酸の抽出・溶離を繰り返す

た後、GCによる分離のために誘導体化する必要があり、操作が煩雑である⁶⁾。このような点も3-HIA測定がビオチン欠乏の指標として一般化しない一つの要因であろう。

今回の著者らの検討で、カルボン酸標識による尿中3-HIA測定法は、前処理が比較的簡易であり、標準的なHPLCシステムで測定可能である。また、ビオチン欠乏尿において十分な感度を得られることが明らかとなった。このことから、生体のビオチン状態の把握において、本法は簡易かつ有用な方法であると考えられる。

IV. 結語

高速液体クロマトグラフィーを利用して、ビオチン欠乏の指標となる尿中有機酸の1つの3-ヒドロキシイソ吉草酸 (3-HIA) を検出する方法を検討した。前処理として3-HIAのカルボキシル基を2-ニトロフェニルヒドラジドに変換し、

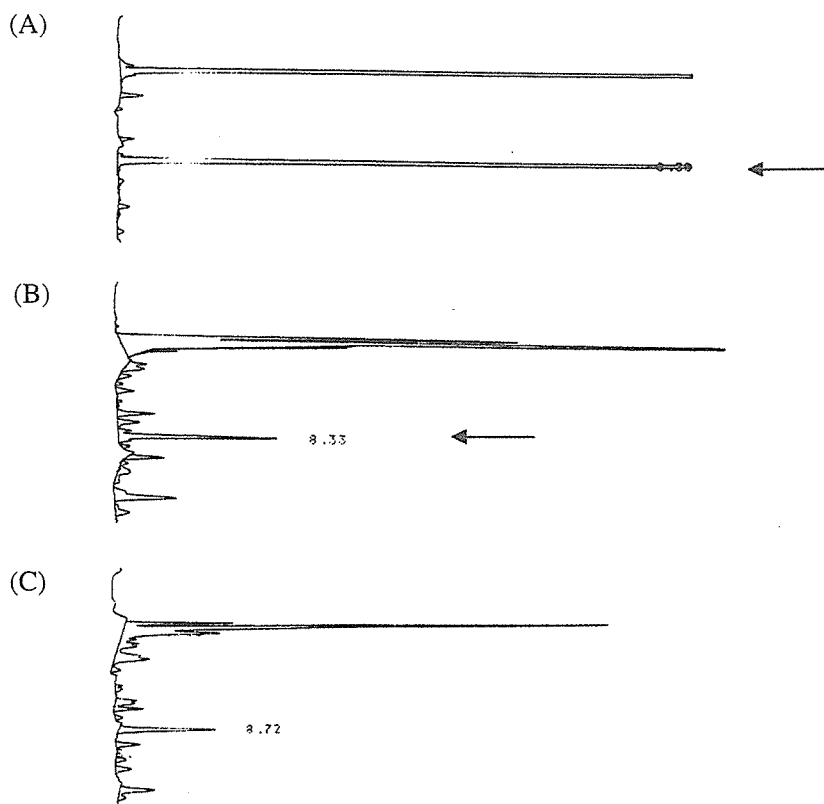


Fig. 1 Chromatogram of HPLC of the derivatized 3-hydroxyisovaleric acid. A, standard; B, urinary extract of biotin-deficient mice; C, urinary extract of control mice. Arrows indicate 3-hydroxyisovaleric acid.

逆相系のカルボン酸専用分析カラムで、アセトニトリル、メタノール、純水の混合液を移動相として、UVにより検出を行なった。標準物質およびビオチン欠乏尿ともほぼ同じ保持時間の位置に3-HIAが検出された。カルボン酸標識によって、高速液体クロマトグラフィを用いた尿中3-HIAが容易に検出できるようになった。

文 献

- 1) 渡邊敏明: ビオチン. ビタミンの事典、日本ビタミン学会編、pp.299-323. 朝倉書店、東京、1996
- 2) Mock NI, Malik MI, Stumbo PJ, Bishop WP, Mock DM: Increased urinary excretion 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, 1997
- 3) Mock DM, Jackson H, Lankford GL, Mock NI, Weintraub ST: Quantification of urinary 3-hydroxyisovaleric acid using deuterated 3-hydroxyisovaleric acid as internal standard. *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.*, 18: 652-656, 1989
- 4) 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. Chromatogr.*, 416: 237-245, 1987
- 5) Miwa H, Yamamoto M: High-performance liquid chromatographic analysis of serum short-chain fatty acids by direct derivatization. *J. Chromatogr.*, 421: 33-41, 1987
- 6) Teran-Garcia M, Ibarra I, Velazquez A : Urinary organic acids in infant malnutrition. *Pediatr. Res.*, 44: 386-391, 1998

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°C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めでた卵黄5個を

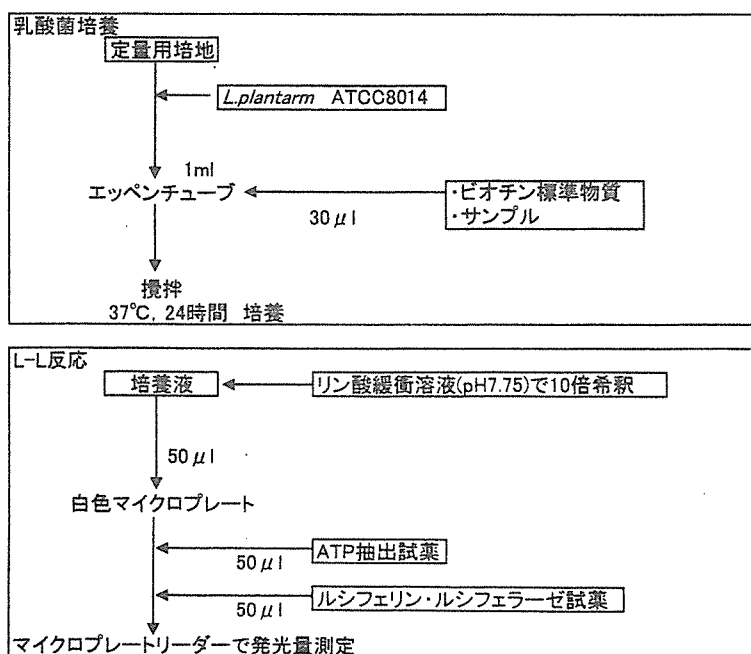


Fig. 1 Procedure of ATP assay.

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。発光量を見ると、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。

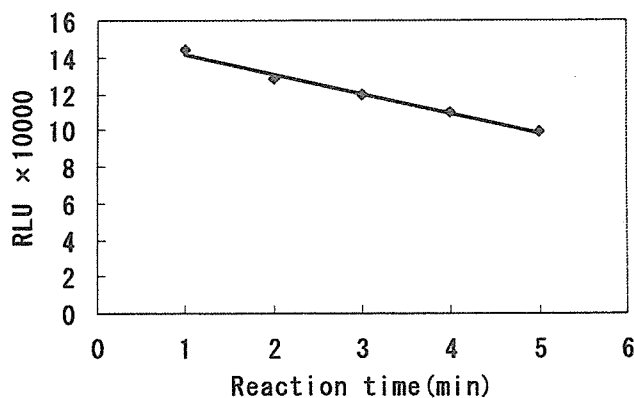


Fig. 2 Time course of luminescent intensity after adding reaction mixture (luciferin and luciferase).

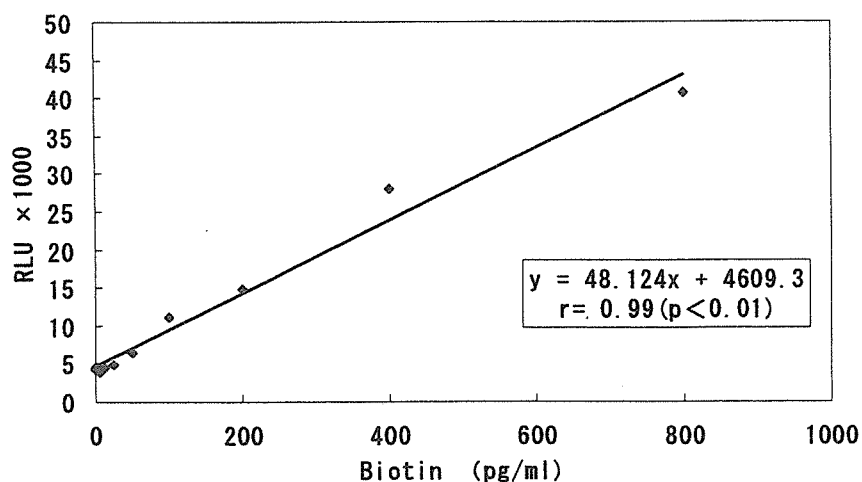


Fig. 3 Standard curve for quantification of biotin using ATP assay.

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見たものが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。

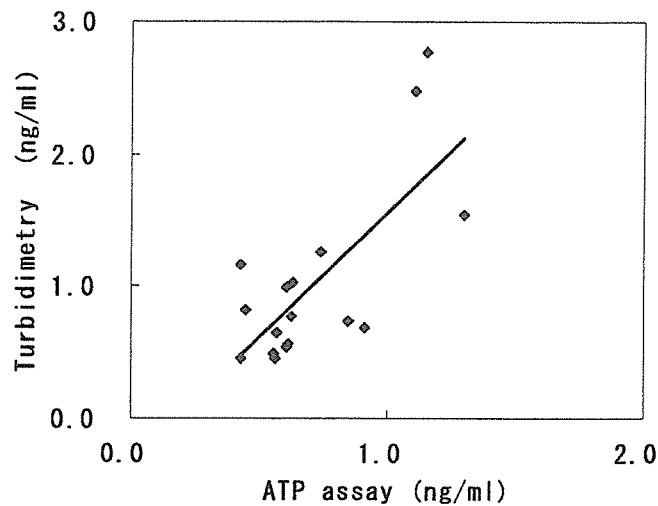


Fig. 4 Correlation between turbidimetric assay and ATP assay.

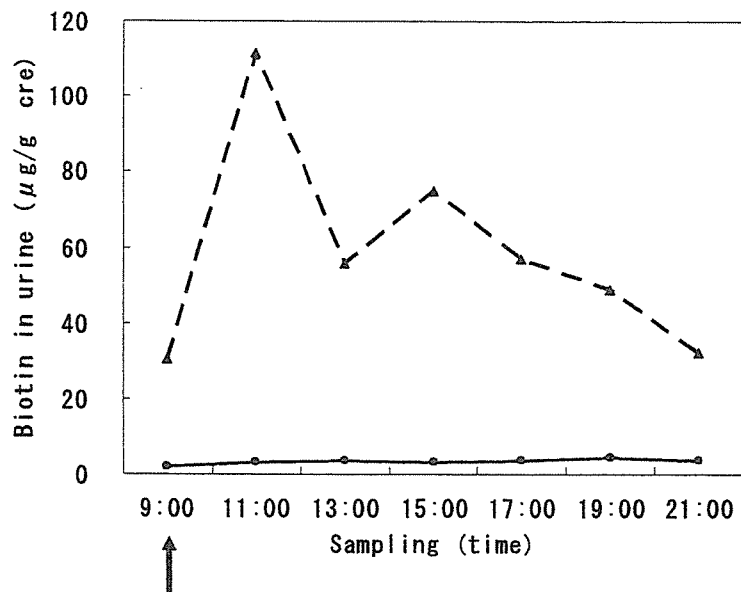


Fig. 5 Change in urine biotin levels after consuming 5 boiled egg yolks containing $60.7 \mu\text{g}$ of biotin totally (free biotin: 70%) in a healthy man.

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

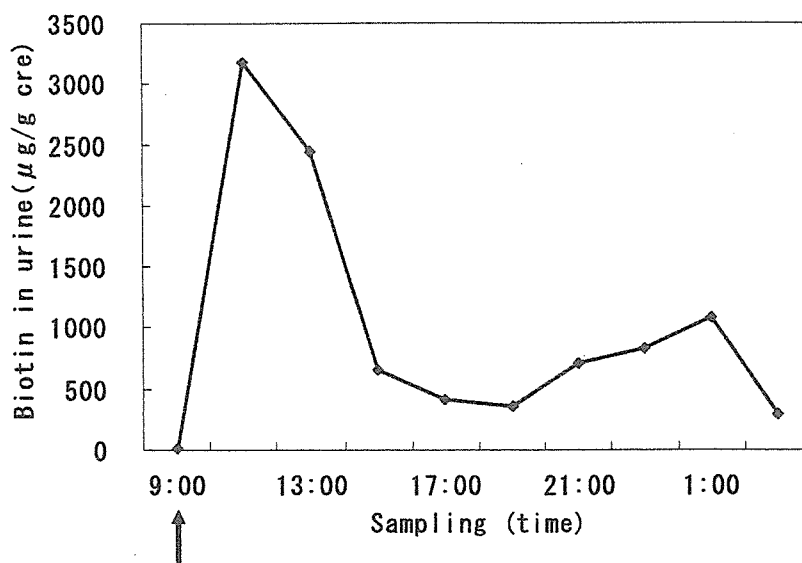


Fig. 6 Change in urine biotin levels after taking 10 mg of biotin in a healthy man. Arrow: loading time.

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。
	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。
	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。
	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。
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.

Measurement of 3-Hydroxyisovaleric Acid in Urine of Biotin-Deficient Infants and Mice by HPLC¹

Toshiaki Watanabe,² Ken-Ichi Oguchi, Shuhei Ebara, and Toru Fukui*

School of Human Science and Environment, Himeji Institute of Technology, University of Hyogo, Himeji, 6700092, Japan and *Byotai Seiri Laboratory, Tokyo, 1730025, Japan

ABSTRACT We developed an assay for measuring urinary 3-hydroxyisovaleric acid (3-HIA) using HPLC after derivatization with 2-nitrophenylhydrazine hydrochloride (2-NPH · HCl). The derivatized 3-HIA was extracted into *n*-hexane and separated isocratically on a C8 reversed-phase column for fatty acids (YMC-Pack FA). We used this method to measure 3-HIA in urine extracts from mice fed a biotin-deficient diet for >4 wk and in an infant who was fed a special Japanese formula and was suspected of being biotin deficient. Urinary 3-HIA could be assayed within the range of 0.42–8.5 mmol/L with high accuracy by this method, as an indicator of biotin deficiency. Therefore, the HPLC method for 3-HIA described here may be a useful tool clinically as well as in the research laboratory. *J. Nutr.* 135: 615–618, 2005.

KEY WORDS: • 3-hydroxyisovaleric acid • HPLC • biotin deficiency • methylcrotonyl CoA carboxylase • urine

Biotin is a cofactor for several carboxylases used in fatty acid synthesis, gluconeogenesis, and BCAA metabolism. The major biotin-containing enzymes are β -methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC),³ propionyl-CoA carboxylase, pyruvate carboxylase, and acetyl CoA carboxylase. MCC catalyzes an essential step in the degradation of leucine, which converts β -methylcrotonyl-CoA to 3-methylglutaconyl-CoA. The reduced activity of MCC leads to an elevated excretion of 3-methylcrotonic acid, the product of its hydration (3-hydroxyisovaleric acid: 3-HIA), and 3-methylcrotonylglycine, formed by conjugation with glycine. The increased urinary excretion of these abnormal metabolites reflects reduced activity of MCC or is due to dietary biotin depletion in genetically normal individuals.

Conditions that cause biotin deficiency include the following: long-term consumption of undenatured egg white; infant diets that do not include biotin; deficiency of one or more of the biotin-dependent carboxylases in inherited metabolic disorders; biotinidase deficiency and holocarboxylase synthetase deficiency; and biotin transporter deficiency (1,2). One of the most important criteria for the diagnosis of biotin deficiency is the detection of organic acids in urine, such as 3-HIA and 3-hydroxypropionic acid, which are elevated in biotin deficiency (3–5).

In general, 3-HIA in the urine and/or serum of biotin-deficient patients and experimental animals has been assayed by GC/MS, which is specific for assaying 3-HIA in screening tests for biotin deficiency. However, the procedure is complex

and difficult. Therefore, we devised an assay for urinary 3-HIA by HPLC, using equipment that is available in most laboratories. We also discuss the usefulness of this method for assaying 3-HIA in the urine of biotin-deficient and biotin-supplemented mice and human infants.

MATERIALS AND METHODS

Animal care and urine collection. Male mice (ICR/Jcl) were obtained from CLEA Japan at 8 wk of age. The biotin-deficient diet was purchased from Oriental Yeast in pelleted form. The components of the biotin-deficient diet (g/kg) were as follows: egg white, 245; cornstarch, 465; sucrose, 100; nonnutritive cellulose, 50; corn oil, 60; mineral mix, 70; and vitamin mix, 10. The control diet was made by supplementing the biotin-deficient diet with biotin (5.0 mg of biotin/kg diet). Mice were kept in an animal room maintained at constant temperature (23 \pm 2°C) with a 12-h light:dark cycle (0700–1900 h).

The mice consumed a biotin-deficient or biotin-supplemented diet ad libitum and had free access to distilled water for 6 wk. The body weights of the 14-wk-old mice were 27.9 \pm 2.5 and 28.2 \pm 2.0 g in the biotin-deficient and biotin-supplemented groups, respectively. Consumption of the diet was also confirmed to be approximately the same in both diet groups, as shown in our previous study (6). Urine was collected from 3 mice fed the biotin-deficient or biotin-supplemented diet every week for 6 wk. The urine of the mice in the individual metabolic cages was collected for 24 h and stored at –40°C until use. All procedures were performed in accordance with the standards related to the care and management of experimental animals of the Japanese Prime Minister's Office (7).

Urine collection in an infant. Because biotin is not yet registered in Japan as a food additive, except in some foods such as dietary supplements, it cannot be added to infant formulas. We demonstrated previously that the biotin concentration of special formulas for medical treatment and prevention of disease in Japan was less than a fifth of the level in American products (8). Therefore, it has often been

¹ Supported by a grant from the University of Hyogo 2004.

² To whom correspondence should be addressed.

E-mail: watanabe@shse.u-hyogo.ac.jp.

³ Abbreviations used: 3-HIA, 3-hydroxyisovaleric acid; MCC, methylcrotonyl CoA carboxylase; 2-NPH, 2-nitrophenylhydrazide; RT, retention time.

reported that biotin deficiency develops in infants with food allergies or inborn errors of metabolism who have been fed special Japanese formulas (9).

In the present case, the infant studied was a 5-mo-old Japanese male. At 4 wks of age, he was diagnosed as having dyspepsia and started to receive maternal milk and/or special formula called Elemental Formula (Meiji Milk Products). Afterwards, prominent erythematous skin lesions developed on his eyelids, perioral region, and neck. Dietary biotin deficiency was strongly suspected and oral treatment with 1 mg/d biotin was started. After 2 wk, the skin lesions disappeared rapidly, and the infant recovered and remained well. Urine was collected 1 wk before and after the biotin treatment. This study was performed in accordance with the ethical principles for medical research involving human subjects (Declaration of Helsinki, World Medical Association). Informed consent was obtained from the parents at enrollment.

Reagents. For the HPLC analysis of standards, 3-HIA was obtained from Tokyo Kasei Kogyo. A kit (X8RFAR 01) for the analysis of short- and long-chain FFA by HPLC (YMC) was used for the pretreatment of the 3-HIA standard solution and urine samples. This kit contains a derivatized reagent that converts the carboxyl moiety of FFA into 2-nitrophenylhydrazide (2-NPH). Sensitive detection in the UV-visible range thus becomes possible after a simple derivatization procedure. Analytical reagent-grade acetonitrile was obtained from Wako Chemical Industries. The control urine "AUTION CHECK II," which is prepared from human urine and is used to monitor the precision of urinalysis, was obtained from Arkray.

Derivatization procedures. The derivatization procedure for fatty acids, including 3-HIA, was a modification of a previously reported technique (10,11) and was as follows:

1. Sample and standard solutions of 3-HIA (100 μ L), 200 μ L of 2-NPH \cdot HCl (20 mmol/L) solution, and 200 μ L of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (250 mmol/L) solution were added in turn to a 15-mL tube. The mixture was heated at 60°C for 20 min.
2. After the addition of 200 μ L of 15% KOH solution (in 20% methanol), the mixture was heated at 60°C for 15 min and then cooled to room temperature.
3. To the resulting mixture, 4 mL of 0.033 mmol/L phosphate buffer (pH 6.4)-0.5 mol/L HCl (3.8:0.4 v:v) and 5 mL of *n*-hexane were added and mixed on a vortex mixer.
4. The *n*-hexane layer, separated after centrifugation at 2800 \times g for 5 min, was taken to remove the long-chain fatty acids. This step was repeated.
5. Diethyl ether (5 mL) was added and mixed on a vortex mixer. After centrifugation at 2800 \times g for 5 min, the diethyl ether layer was collected in a new 15-mL tube.

6. Milli-Q water (3 mL) was added to the diethyl ether layer, mixed on a vortex mixer, and centrifuged at 2800 \times g for 5 min. The diethyl ether layer was collected in a fresh tube.
7. The diethyl ether layer was collected and dried under decompression at room temperature. The residue was dissolved in 1 mL of methyl alcohol, and an aliquot (10 μ L) was used as a sample for measurement.

Chromatographic analyses and conditions. Chromatographic separations were performed using a HITACHI HPLC system (Hitachi). The HPLC column was a C8 reversed-phase column for fatty acids (YMC-Pack FA), which was packed with Si 60 (particle size 5 μ m, 250 \times 4.6 mm) only for carboxylic acid.

The solvent system for elution from the YMC-Pack FA column consisted of acetonitrile:methyl alcohol:Milli-Q water (30:16:54, by vol). Solvents were adjusted to pH 4.5 with 0.01 mol/L HCl; they were filtered through a 0.45- μ m membrane filter and degassed under decompression with ULVAC (Sinku Kiko). Separations were made at a flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was kept constant at 50°C. The elution patterns were monitored at 230 nm to detect the derivatized carbonyl moiety of 3-HIA. The retention time (RT, in min) on a YMC-Pack FA column ranged from 5 to 11 min.

Biochemical analyses. The biotin concentrations in the urine were quantified using a microtiter plate adaptation of the microbiological assay with *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. The microbioassay lacks specificity compared with biotin analysis using an HPLC/streptavidin assay. Urinary specimens were filtered through 0.45- μ m membranes and assayed without hydrolysis. The creatinine concentrations were measured in all urine samples with the picric acid method using a Creatinine Test Wako kit (Wako Chemical Industries). The concentrations of urinary biotin and 3-HIA were expressed as μ mol/mol creatinine and mmol/mol creatinine, respectively.

Statistical analyses. For statistical evaluation of the data in mice, repeated-measures ANOVA and Student's *t* test were used. Differences of *P* < 0.05 were considered significant. StatView 5.01 (SAS Institute) software was used for all statistical analyses. Values in the text are means \pm SD.

RESULTS

In the chromatograms of the 3-HIA standard solution and of the urine analyzed by HPLC, the peak of authentic 3-HIA was identified as the position with an RT of 8.32 min (Fig. 1a). In the chromatogram of the extract of the urine of mice fed a biotin-deficient diet for 6 wks, a high peak was detected at 8.33 min and low unknown peaks appeared (Fig. 1b). 3-HIA was

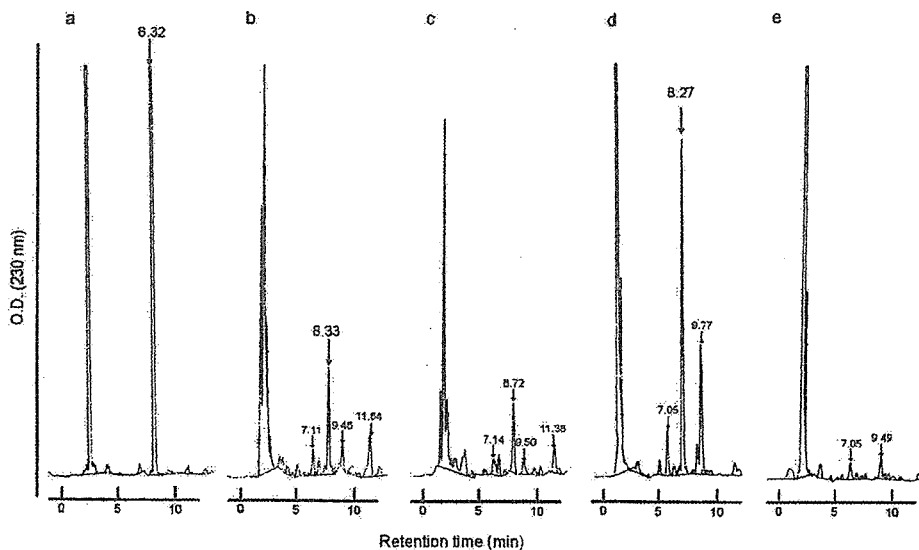


FIGURE 1 Chromatograms (HPLC) of derivatized 3-HIA in biotin-deficient and -supplemented mice and in an infant suspected of being biotin deficient. (a) Standard 3-HIA; (b) Urinary extract of biotin-deficient mice; (c) Urinary extract of biotin-supplemented mice. A new peak appeared at 8.72 min at a position markedly different from that of the 3-HIA peak; (d) Extract of the infant's urine collected before biotin treatment; (e) Extract of the infant's urine collected after biotin treatment. Large arrows and figures indicate the peak of 3-HIA.

separated completely from other fatty acids in each sample. A peak was detected at 8.72 min in the urine of the biotin-supplemented mice at a position markedly different from the peak of 3-HIA (Fig. 1c). No peak was present at 8.33 min.

Standard 3-HIA concentrations ranging from 0.42 to 8.5 mmol/L and the peak area were correlated ($r = 0.999$, $P < 0.01$) (Fig. 2a). In mice fed the biotin-deficient diet for 6 wk, the concentration of urinary 3-HIA was 114.2 ± 69.6 mmol/mol creatinine, which was higher than the concentration of 35.2 ± 23.8 mmol/mol creatinine in mice fed the biotin-deficient diet for 4 wk ($P < 0.046$; Table 1). However, no profound clinical signs of biotin deficiency, such as loss of hair or dermatitis, were observed in these biotin-deficient mice during the experimental period.

3-HIA was detected by HPLC in the urine of biotin-deficient mice (3-HIA-positive mice) (Table 1). The incidence of 3-HIA-positive mice increased with the length of time the biotin-deficient diet was fed. There were no 3-HIA-positive mice within 3 wk of feeding, but all biotin-deficient mice excreted 3-HIA in their urine after 4 wk of feeding. Urinary biotin and 3-HIA concentrations in biotin-deficient mice were inversely correlated ($r = -0.58$, $P = 0.021$; Fig. 2b). When the biotin concentration in the urine was < 15 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine, 3-HIA was detected in the urine of 6 of 7 mice. On the other hand, no 3-HIA was detected in the urine of 8 biotin-deficient mice that had a urinary biotin level > 15 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine. Moreover, no 3-HIA was detected in the urine of the biotin-supplemented mice (Table 1).

The chromatogram of urine obtained from the infant fed a special formula manufactured in Japan and suspected of being biotin deficient had its highest peak at 8.27 min (Fig. 1d). Another peak was detected at 8.77 min. However, these peaks were not detected in the urine after biotin treatment (Fig. 1e).

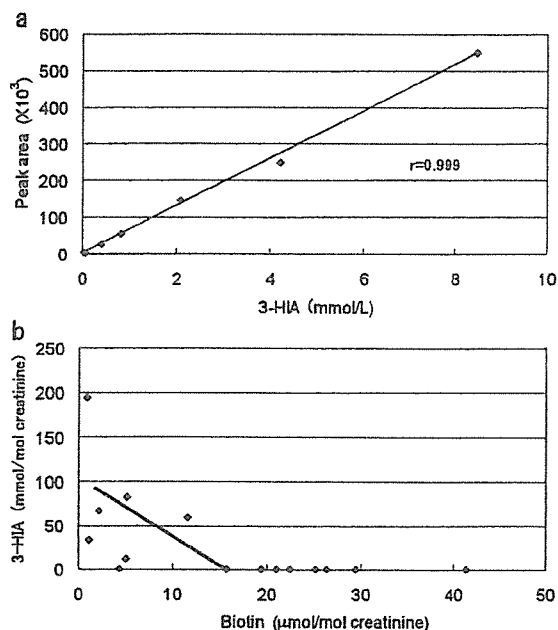


FIGURE 2 Development of the standard curve (panel a) and assessment of the relation between urinary biotin and 3-HIA concentrations in biotin-deficient mice (panel b, $r = -0.581$, $P = 0.021$).

TABLE 1

Effects of biotin deficiency on the excretion of 3-HIA in urine of mice¹

Duration of feeding	Mice excreting 3-HIA/mice examined	3-HIA	Biotin
wk	n/n	mmol/mol creatinine	$\mu\text{mol/mol}$ creatinine
Biotin deficient			
1	0/3	ND ²	22.3 ± 3.6
2	0/3 ³	ND	29.7 ± 10.3
3	0/3	ND	16.5 ± 12.6
4	3/3	35.2 ± 23.8	5.9 ± 5.3
6	3/3	114.2 ± 69.6	2.8 ± 2.2
Biotin supplemented			
1	0/3	ND	263 ± 175
2	0/3	ND	772 ± 476
3	0/3	ND	1020 ± 680
4	0/3	ND	591 ± 387
6	0/3	ND	493 ± 319

¹ Values are n or means \pm SD.

² ND, not detected.

³ 3-HIA was positive in only 1 mouse with a urinary level of 12.0 mmol/mol creatinine, a value below the limit of detection.

DISCUSSION

GLC was used previously to detect 3-HIA and β -methylcrotonylglycine after hydrogenation of urinary extracts from humans with MCC deficiency (12). Subsequently, the first application of GC/MS for the quantitative detection of 3-HIA in urine was reported by Mock et al. (13). Derivatized 3-HIA was detected in urine extracts of patients with biotin deficiency. However, in addition to the high cost of the necessary equipment, after repeated extraction and the separation of the organic acids in the urine, a derivative for separation by GC must also be made (14). In addition, measurement of urinary 3-HIA is a time-consuming process.

Several HPLC methods were developed for the analysis of fatty acids in serum and urine; these employ precolumn derivatization techniques to increase the sensitivity and specificity of detection (10,11,15,16). In the present study, the preprocessing, including labeling, was simplified by the use of the derivatization technique, and a method for 3-HIA measurement was established using a standard HPLC system. The lower limit of detection of urinary 3-HIA was 0.042 mmol/L. This sensitivity was sufficient to measure 3-HIA in urine samples from an infant suspected of being biotin deficient. A relatively higher peak of 3-HIA was obtained before biotin treatment compared with other fatty acids present in the urine. These findings suggest that this HPLC method is sufficiently sensitive for assaying urinary 3-HIA in screening tests for biotin deficiency in humans.

The recovery of 3-HIA was in the range of 90.1–108.8%. This indicates that the present method does not have completely satisfactory precision for analyzing the 3-HIA concentration in urine because the method used here has several extraction and separation steps, which may affect the recovery of 3-HIA. The normal range of urinary 3-HIA in humans was reported to be from 5.1 to 10.7 mmol/mol creatinine as assessed by GC/MS, and it is increased several-fold by biotin deficiency (17). In the present study, the urinary 3-HIA concentration was 78.6 mmol/mol creatinine in an infant fed a special Japanese formula. However, no 3-HIA was detected after biotin treatment of this infant.

The concentrations of biotin and organic acids, and the activity of carboxylase in the serum and urine are generally used as indicators of biotin status (18,19). Mock et al. (3–5) demonstrated that decreased urinary biotin and increased urinary 3-HIA are sensitive indicators of early biotin deficiency, but methylcrotonylglycine and isovaleryl-glycine, which are also produced due to the decreased activity of MCC, are not. 3-HIA is detected in urine before the appearance of clinical signs of biotin deficiency; thus, it is expected to be a useful indicator of early biotin deficiency. The measurement of 3-HIA in urine may thus be useful for the diagnosis of biotin deficiency.

3-HIA is also a sensitive indicator of biotin deficiency in mice. 3-HIA was detected within a short time after the beginning of the feeding of a biotin-deficient diet, along with a decrease of biotin in the urine. Thus, the HPLC method for 3-HIA described here can be a useful tool clinically as well as in the research laboratory.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Ms. Ayumi Taniguchi for excellent technical support with the biotin assay.

LITERATURE CITED

1. Mock, D. M., DeLorimer, A. A., Liebman, W. M., Sweetman, L. & Baker, H. (1981) Biotin deficiency: an unusual complication of parenteral alimentation. *N. Engl. J. Med.* 304: 820–823.
2. Wolf, B. & Feldman, G. L. (1982) The biotin-dependent carboxylase deficiencies. *Am. J. Hum. Genet.* 34: 699–716.
3. Mock, N. I., Malik, M. I., Stumbo, P. J., Bishop, W. P. & Mock, D. M. (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 deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 65: 951–958.
4. Mock, D. M., Henrich-Shell, C. L., Carnell, N., Stumbo, P. & Mock, N. I. (2004) 3-Hydroxypropionic acid and methylcitric acid are not reliable indicators of marginal biotin deficiency in humans. *J. Nutr.* 134: 317–320.
5. Mock, D. M., Henrich, C. L., Carnell, N. & Mock, N. I. (2002) Indicators of marginal biotin deficiency and repletion in humans: validation of 3-hydroxyisovaleric acid excretion and a leucine challenge. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 1061–1068.
6. Watanabe, T. (1983) Teratogenic effects of biotin deficiency in mice. *J. Nutr.* 113: 574–581.
7. Japanese Prime Minister's Office (1980) The Standards Related to the Care and Management of Experimental Animals. Notification No. 6, March 27.
8. Watanabe, T. & Fukui, T. (1998) Low biotin content of infant formulas made in Japan. *Food Add. Contam.* 15: 619–625.
9. Higuchi, R., Noda, E., Koyama, Y., Shirai, T., Horino, A., Juri, T. & Koike, M. (1996) Biotin deficiency in an infant fed with amino acid formula and hypoallergenic rice. *Acta Paediatr.* 85: 872–874.
10. Miwa, H., Yamamoto, M., Nishida, T., Nunoi, K. & Kikuchi, M. (1987) High-performance liquid chromatographic analysis of serum long-chain fatty acids by direct derivatization method. *J. Chromatogr.* 416: 237–245.
11. Miwa, H. & Yamamoto, M. (1987) High-performance liquid chromatographic analysis of serum short-chain fatty acids by direct derivatization. *J. Chromatogr.* 421: 33–41.
12. Stokke, O., Eldjarn, L., Jellum, E., Pande, H. & Waaler, P. E. (1972) Beta-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: a new metabolic error in leucine degradation. *Pediatrics* 49: 726–735.
13. Mock, D. M., Jackson, H., Lankford, G. L., Mock, N. I. & Weintraub, S. T. (1989) Quantification of urinary 3-hydroxyisovaleric acid using deuterated 3-hydroxyisovaleric acid as internal standard. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 18: 652–656.
14. Teran-Garcia, M., Ibarra, I. & Velazquez, A. (1998) Urinary organic acids in infant malnutrition. *Pediatr. Res.* 44: 386–391.
15. D'Amboise, M. & Gendreau, M. (1979) Isocratic separation of human blood plasma long chain free fatty acid derivatives by reversed phase liquid chromatography. *Anal. Lett.* 12: 381–395.
16. Yamaguchi, M., Matsunaga, R., Hara, S., Nakamura, M. & Ohkura, Y. (1986) Highly sensitive determination of free fatty acids in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* 375: 27–35.
17. Mock, D. M., Quirk, J. G. & Mock, N. I. (2002) Marginal biotin deficiency during normal pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 75: 295–299.
18. Chastain, J. L., Bowers-Komro, D. M. & McCormick, D. B. (1985) High-performance liquid chromatography of biotin and analogues. *J. Chromatogr.* 330: 153–158.
19. Zempleni, J., McCormick, D. B. & Mock, D. M. (1997) Identification of biotin sulfone, bisnorbiotin methyl ketone, and tetranorbiotin-*l*-sulfoxide in human urine. *Am. J. Clin. Nutr.* 65: 508–511.