

# 日本人のビオチン摂取量の推定

## Estimation of the dietary intake of biotin in Japan

平成 27 年度

梶月（村上） 太郎

Taro (Murakami) Satsuki



第1章 緒言 .....	1
第2章 トータルダイエツト調査法による大阪市民のビオチン摂取量の推定 .....	9
緒言 .....	10
方法 .....	12
1. 試薬 .....	12
2. 試料 .....	12
3. 認証標準物質 .....	12
4. 分析法 .....	14
4.1. 抽出法 .....	14
4.2. ビオチン定量法 .....	14
5. 分析法の精度管理 .....	15
5.1. 検量線の定量範囲の設定 .....	15
5.2. 試料マトリクスによる影響の確認 .....	15
5.3. 真度の確認 .....	15
5.4. 室内再現精度の確認 .....	16
5.5. 頑健性の確認 .....	16
6. 分析法の不確かさの算出 .....	19
6.1. 併行再現精度の不確かさ .....	19
6.2. 回収率の不確かさ .....	19
6.4. 日間変動の不確かさ .....	21
6.5. 分析法の不確かさ .....	22
結果と考察 .....	23
1. 定量範囲 .....	23
2. 真度と日間再現精度 .....	25
3. 頑健性 .....	25

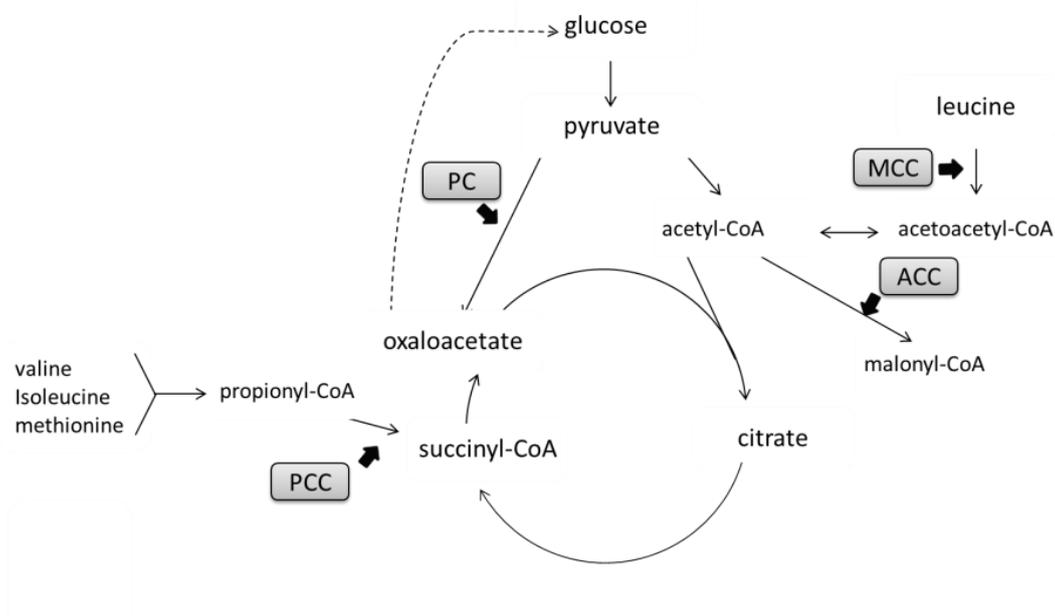
4.	試料マトリクスによる影響 .....	28
5.	各食品群の試料の分析と併行再現精度 .....	28
6.	回収率とその補正 .....	30
7.	摂取量と不確かさ .....	32
第3章	モンテカルロ法による日本人のビオチン摂取量の分布の推定 .....	36
緒言	.....	37
方法	.....	38
1.	食品群別摂取量 .....	38
2.	トータルダイエツト試料中のビオチン量の定量 .....	38
3.	個々の食品中のビオチン含量 .....	41
4.	個々の食品中のビオチン含量の外れ値の検出 .....	41
5.	モンテカルロシミュレーション .....	43
5.1.	モデル1（トータルダイエツト調査法からの推定） .....	43
5.2.	モデル2（個々の食品からの摂取量の推定） .....	44
結果と考察	.....	45
1.	摂取量の分布の推定 .....	45
2.	食品群ごとの摂取量の比較 .....	48
第4章	食品加工・調理によるビオチンの利用効率の評価 .....	50
緒言	.....	51
第4章-1	加熱によるアマランス種子中のビオチンの評価 .....	52
緒言	.....	53
方法	.....	54
1.	試料 .....	54
2.	種子膨化装置による試料調製 .....	54
3.	試薬 .....	56

4.	分析法	56
4.1.	走査型電子顕微鏡による形態の観察	56
4.2.	膨化後の体積の測定	56
4.3.	水分量の定量	56
4.4.	リボフラビンの定量	57
4.5.	ナイアシンの定量	57
4.6.	パントテン酸の定量	58
4.7.	ビタミンB <sub>6</sub> の定量	58
4.8.	ビオチンの定量	59
4.9.	葉酸の定量	59
4.10.	元素の定量	60
5.	統計解析	60
	結果と考察	61
1.	走査型電子顕微鏡による形態の観察	61
2.	必須元素と微量元素	62
3.	水溶性ビタミン	65
	第4章 - 2 鶏卵中のビオチンの生体利用効率の評価	67
	緒言	68
	方法	69
1.	試薬	69
2.	試料	69
2.1.	認証標準物質	69
2.2.	調理用試料	69
2.3.	調理法	70
3.	分析法	72

3. 1.	分析試料の均一化 .....	72
3. 2.	総ビオチンの抽出 .....	72
3. 3.	水に遊離するビオチン（遊離ビオチン）の抽出 .....	73
3. 4.	人工消化液に可溶化するビオチン（溶出ビオチン）の抽出 .....	73
3. 5.	ビオチンの定量法 .....	74
4.	生体利用効率の定義 .....	75
結果と考察 .....		77
1.	人工消化液中の乳酸菌生育阻害因子の除去 .....	77
2.	人工消化液による評価法の精度管理 .....	77
3.	生の鶏卵中のビオチンの生体利用効率 .....	78
4.	鶏卵の調理法ごとの生体利用効率 .....	80
5.	鶏卵の加熱時間ごとの生体利用効率 .....	83
6.	モデル加工食品の生体利用効率 .....	86
総括 .....		90
謝辞 .....		96
参考文献 .....		97
副論文リスト .....		111

## 第 1 章 緒言

ビオチンは水溶性ビタミンの一つであり、糖新生、脂肪酸合成および分岐鎖アミノ酸の代謝などの炭酸固定反応における補酵素として重要な役割を果たしている[1]。すなわち、哺乳類では Fig. 1 に示すメチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ (MCC)、アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC)、プロピニル CoA カルボキシラーゼ (PCC)、ピルビン酸カルボキシラーゼ (PC) の4種のカルボキシラーゼに関与している。



**Fig. 1** ビオチンが補酵素として関与するカルボキシラーゼ  
 MCC: methylcrotonyl CoA carboxylase, ACC: acetyl CoA carboxylase, PCC: propionyl CoA carboxylase, PC: pyruvate carboxylase

一方、ビオチンは、糖尿病との関連についても研究されてきた。抗がん剤のストレプトゾトシンによってⅠ型糖尿病を誘導したラットでは、ビオチンの摂取により血糖値が低下し、糖尿病態を改善することが報告されており、その作用機序は、糖新生関連酵素遺伝子の発現制御であることが報告されている[2,3]。Ⅱ型糖尿病を誘導したラットでも、ビオチンの摂取は糖尿病態を改善することが報告されている[4]。日本人のⅡ型糖尿病患者では、ビオチンの内服により血糖レベルが改善されることが報告されている[5]。しかし、メキシコ人のⅡ型糖尿病患者には、ビオチンの内服は血糖レベルの改善に効果がないと報告されている[6]。このため、ビオチンの内服による糖尿病の改善効果は遺伝的背景や生活習慣によって異なると推定される。

近年、細胞内におけるビオチンの機能として、カルボキシラーゼの補酵素として以外の機能も注目されている。ビオチンは、細胞核内でクロマチンを構成するタンパク質のヒストンを修飾することにより、クロマチンの微小環境を変化させ、核機能に影響を与えていると推定されている[7]。ヒストンのビオチン化の生理的な意義は明らかになっていないが、細胞内での翻訳後修飾の制御や DNA の修復との関連が報告されている[7,8]。

ビオチンが欠乏すると、糖新生、脂肪酸合成および分岐鎖アミノ酸の代謝の障害が起こり、種々の生理機能が障害を受ける [1]。たとえば、顔面周囲の皮膚炎、結膜炎、脱毛、皮膚の感染などの形態的な症状や運動失調、緊張低下、ケト乳酸アシドーシス、有

機酸尿などの症状が報告されている[1]。

ビオチンの欠乏症は、日常の食生活では起こりにくいが、生の鶏卵を長期摂取した成人において報告されている[9]。卵白にはビオチン結合タンパク質のアビジンが含まれるために、長期に生の鶏卵を摂取するとビオチンの吸収阻害が引き起こされる。

乳児での栄養性ビオチン欠乏の疫学調査から、先天性代謝異常症、アトピー性皮膚炎、牛乳アレルギーなどの治療のために治療用特殊ミルクを主な栄養源とした乳児で欠乏症が報告されている[10]。母乳中のビオチン含量は、5 µg/L と報告されており、この母乳中の含量と一日あたりの哺乳量の平均値 0.78 L から見積もると、乳児（0 から 5 か月）のビオチンの目安量は 4 µg/d と推定されている[11,12]。一般調製粉乳中のビオチン含量の平均値は 6.8 µg/L であるが、治療用特殊ミルクでは 2.7 µg/L と母乳や一般調製粉乳と比較して低い[13]。このため、治療用特殊ミルクを長期摂取した場合に、ビオチンの欠乏が起こる可能性がある[14,15]。

栄養性のビオチン欠乏以外にも、妊娠期のビオチンの欠乏が胎児の発育に影響を与えることが報告されている[16]。たとえば、ビオチン欠乏による鶏の胚の生存率と孵化率の低下[17]、マウス胎児における外表奇形や骨格異常[18]などが報告されている。妊娠期のビオチン欠乏による催奇形性は、ラットやハムスターでも報告されている[19, 20]。さらに、ヒトでは妊娠時にビオチンの早期の欠乏指標である 3 ヒドロキシイソ吉草酸 (3HIA) の尿中排泄量が増加することが報告されている[9, 21]。ヒトの妊娠期には胎

児の発育のためにビオチンの必要量が増加し、境界型のビオチンの欠乏症が起こっていると考えられている[16]。このように、健常人は日常の食生活をしていれば問題はないが、妊娠期のビオチン欠乏は重要である。しかし、わが国におけるビオチン摂取量の調査が本格的に実施されたのは、2004年以降である（Table1）。

栄養素摂取量の調査は、一般的には食事記録法、24時間思い出し法、陰膳法などに基づいて行われる。日本で毎年実施される国民健康・栄養調査も1日間の比例案分法に基づき、摂取量の調査法である。しかし、一般的に摂取される食品の食品標準成分表が整備されていない状況で、食事記録法から摂取量を推定することは容易ではない。日本での食品中のビオチン含量は、2010年から日本食品標準成分表に記載された[33]。このため、これまで日本人を対象とした食事調査法によるビオチンの摂取量の情報は限られたものであった。渡邊らは、摂取した食事と同じ試料を分析して摂取量を推定する陰膳法によって、東北地方の中高齢者の摂取量を 29.8–33.3  $\mu\text{g}/\text{d}$  と報告している[22]。齋東および牛尾は、集団における平均的な摂取量の調査法であるトータルダイエツト調査法によって、東京都での摂取量を報告している[23]。この調査では、残留農薬などの食品汚染物質の摂取量の調査法に従って、230食品を13の食品群に分類して試料調製を行い、食品群ごとに分析を行う。食品群ごとのビオチン濃度と東京都民の栄養状況（平成11年）の摂取量[34]から、摂取量は 45.1  $\mu\text{g}/\text{d}$  と推定されている[23]。

Table 1 日本におけるビオチン摂取量調査（2014年）

年	摂取量 ( $\mu\text{g}/\text{d}$ )	調査対象	調査法	参考文献
2004	54.3		陰膳法	[22]
	45.1		TDS（13食品群）	[23]
2005	110	男性	食品群別計算法（18食品群）	[24]
	92.3	女性		
2006	60.7 <sup>*1</sup>		TDS（13食品群）	[25]
	107.8	男性	食品群別計算法（18食品群）	[25]
	91.6	女性		
2007	70.1		TDS（13食品群）	[26]
2008	62.1		TDS（13食品群）	[27]
2009	79.1		TDS（13食品群）	[27]
2009	50.7		TDS（18食品群）	[28]
	54.5		食品群別計算法（98食品群）	[28]
2010	51.0		TDS（18食品群）	[29]
	36.0	妊婦	食事調査法	[30]
2013	51.7	中年男性	食事調査法	[31]
	47.6	中年女性		
	35	男子小学生	食事調査法	[32]
	31	女子小学生		
	28	男子大学生		
	26	女子大学生		
	32	高齢者		

\*1 文献23の摂取量を再解析

谷口らは、個々の食品の分析値を食品群ごとに分類して摂取量の推定を行う食品群別計算法によって、兵庫県でのビオチンの摂取量を報告している[24]。この調査では、日本で日常的に摂取している代表的な 101 の食品の分析値と国民栄養調査（平成 13 年）の摂取量[35]をもとに、摂取量は 110  $\mu\text{g}/\text{d}$ （男性）、92.3  $\mu\text{g}/\text{d}$ （女性）と推定されている[24]。その後の調査で、渡邊および谷口は、東京都でのトータルダイエツト法による食品群ごとのビオチン含量と東京都民の栄養状況（2003 年版）の摂取量[36]をもとに再計算を行い、摂取量を 60.7  $\mu\text{g}/\text{d}$  と報告している[25]。さらに、食品群別計算法による食品群ごとのビオチン含量と国民栄養調査（平成 14 年）の摂取量[37]をもとに再計算を行い、兵庫県での摂取量を 107.8  $\mu\text{g}/\text{d}$ （男性）、91.6  $\mu\text{g}/\text{d}$ （女性）と報告している[25]。このように、日本人のビオチン摂取量の情報は、調査数が限られているだけでなく、調査法ごとに差異が大きい。さらに、日本人の食事摂取基準（2005 年版）では、東京都のトータルダイエツト調査法による 1 報告[23]から、目安量が 45  $\mu\text{g}/\text{d}$  に策定されている[38]。より信頼性の高い食事摂取基準の策定のためには、日本人を対象としたビオチン摂取量についての科学的な知見の蓄積が必要である。

このような状況から、本論文では日本人のビオチン摂取量の推定のために、以下の点を検討した。第 1 章（緒言）に続く、第 2 章では、集団における平均的な摂取量の推定法であるトータルダイエツト法を利用して、大阪市民のビオチンの摂取量を調査した。本調査法の分析法に起因する不確かさの評価し、分析法に起因する信頼区間の推定を行

った。第3章では、集団におけるビオチンの過不足の評価のため、モンテカルロ法による日本人のビオチンの摂取量の分布を推定した。調査法ごとの比較のため、トータルダイエット法と個々の食品からの食品群別計算法の2つのモデルを構築し、摂取量の分布を推定した。第4章では、ビオチンの加工と調理による損失と消化による生体利用効率の摂取量推定への影響を評価した。食品の加熱による損失の影響は、アマランスの種子をモデルとして、加熱による膨化時のビオチンへの影響を評価した。さらに、鶏卵と鶏卵を含むモデル食品を一般的な調理法によって調理し、調理後の試料から人工消化液によって溶出するビオチンを生体利用可能なビオチンの最大量として評価した。第5章では、2-4章までの研究の総括し、各章における課題と進展性を考察し、今後の日本人のビオチン摂取量の推定についての提言を行った。

## 第2章 トータルダイエツト調査法による大阪市民のビオチン摂取量の推定

## 緒言

トータルダイエツト調査法は、残留農薬やポリ塩化ビフェニル (Poly Chlorinated Biphenyl, PCB) などの食品中の有害物質の摂取量調査[39,40]として利用されてきた調査法であり、近年はビタミンやミネラルなどの栄養素の摂取量の調査にも応用されている[23,41,42]。トータルダイエツト調査法は集団における平均的な摂取量の調査法としての信頼性が高く、食品群ごとの寄与率を求めることができる。このため、本章では、トータルダイエツト調査法が大阪市民のビオチン摂取量の推定に応用できるか検討を行った。

これまでにビオチンの定量法としては、微生物学定量法[43]、アビジンを利用した Binding assay 法[44]、高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) を利用する方法[45,46]などが報告されている。Binding assay 法は卵白中のビオチン結合タンパク質のアビジンがビオチンと強固に結合する性質を利用し、食品や薬剤中のビオチンの定量に応用されている[44]。HPLC による定量法は、ビオチンとビオチン類縁物質を個別に定量することができるが、ビオチンを紫外光によって定量する際には微生物学的定量法や Binding assay 法と比較して十分な検出感度が得られない。近年、高速液体クロマトグラフィーで分離後、質量分析装置によって測定する検出感度の高い分析法が報告されている[47]。しかし、本方法は高額な機器の整備が必要となるため、現時点では汎用されていない。高額な機器を

必要とせず、定量における検出感度に優れた微生物学的定量法が、食品中のビオチンの定量に汎用されている。また、栄養表示基準におけるビオチンの分析法にも微生物学的定量法が利用されている。このため、トータルダイエツト試料中のビオチンの定量には、江口らによるマイクロプレートによるビオチンの分析法[43]を利用した。ビタミンの微生物学定量法は、理化学機器による分析法と比較して操作が煩雑であり、定量の手技や精度の管理が必要であることも報告されている[48]。ビオチンの微生物学的定量法が本調査に適用できることを確認するために、Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) [49]および Valid Analytical Measurement (VAM) [50]のガイドラインに基づいて、分析法の妥当性を評価した。評価の結果から分析法についての不確かさの推定し、本調査における分析法に起因する信頼区間を推定した。

## 方法

### 1. 試薬

標準品はビオチン標準品 (Sigma-Aldrich)、前培養用培地は *Lactobacillus* MRS 培地 (Becton Dickinson)、定量用基礎培地はビオチン定量用培地 (日水製薬) を使用した。

### 2. 試料

大阪市での国民健康・栄養調査 (平成 17 年) の摂取量をもとに、2007 年 1 月に購入した 190 品目の食品を残留農薬の摂取量調査に準じて、Table 2 に示す 13 の食品群に分類した。各食品を必要に応じて調理した後に混合し、飲料水として水道水を加えた 14 の食品群をトータルダイエツト調査用の試料とした。

### 3. 認証標準物質

米国国立標準技術研究所 (National Institute of Standards and Technology, NIST) からベビーフードをマトリクスとする認証標準物質 SRM 1846 (ビオチンの認証値  $\pm$  不確かさ :  $0.411 \pm 0.066 \mu\text{g/g}$ ) を入手し、分析法の精度管理のために使用した。

**Table 2. Content list of foodstuff samples**

No. Food group	Food stuffs	Examples	Cooking	Daily Intakes (g)
1	Rice/Processed rice	4 Rice/Rice cake	Boiling, baking.	161
2	Cereal except rice	22 Bread/Potato	Boiling, baking.	170
3	Sugar/Confectionery	19 Biscuit /Chocolate	Raw	30
4	Fat/Oil	8 Butter/Vegetable oil	Raw	13
5	Pulse	10 Soybean/Tofu	Boiling	62
6	Fruit	13 Apple/Orange	Raw	129
7	Green, Yellow vegetables	14 Spinach/Carrot	Boiling	97
8	Other vegetables	23 Onion/Mushroom	Boiling	175
9	Beverage	14 Green tea/Beer	Raw	217
10	Fish/Shellfish	24 Mackerel/Shrimp	Baking, roasting	95
11	Meat/Egg	8 Beef/Pork/Egg	Boiling, roasting	148
12	Milk/Dairy products	11 Cow milk/Yogurt	Raw	138
13	Seasoning	20 Soy sauce/Vinegar	Raw	57
14	Water	1 Tap water	Raw	600
	Total	191		2092

## 4. 分析法

### 4.1. 抽出法

試料 1 g を 50 mL 遠沈管に採取し、2.25 mol/L 硫酸 10 mL を加え、高圧滅菌器（平山製作所，HA-240MIV）により 121°C, 1 h の条件で加水分解した。室温まで冷却した試料溶液を 4.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 7.0 ± 1.0 に調整後、蒸留水で 50 mL に定容した。定容後の抽出液をシリンジフィルター（Sartorius, 17823K, 孔径:0.22 μm）によって、ろ過除菌したものを試料溶液とした。

### 4.2. ビオチン定量法

各試料溶液中のビオチン含量は、乳酸菌（*Lactobacillus plantarum* ATCC8014）によるマイクロプレートを用いた微生物学的定量法で測定した。ビオチン標準溶液と試料溶液を 2 点併行で段階希釈したものに、乳酸菌を接種したビオチン定量用培地（pH 7.1）を加え、嫌気性培養装置（Don Whitley Scientific, MACS）によって、CO<sub>2</sub>濃度 10%, 37°C, 17~19 h 培養した。培養終了後のマイクロプレートの各 well を 8 連マイクロピペットによって混和後、マイクロプレートリーダー（Thermo scientific, Multiskan FC）により 600 nm における吸光度を測定した。ビオチン標準品の対数濃度に対して培養後の吸光度をプロットして 4 parameter logistic 解析によって検量線を作成し、試料溶液中のビオチンを定量した。

## 5. 分析法の精度管理

### 5.1. 検量線の定量範囲の設定

ビオチンの検量線の定量範囲の設定のために、1000 pg/mL のビオチン標準溶液を段階希釈した。希釈した濃度のうち、変動係数が 20%以下となる範囲を定量範囲に設定した。

### 5.2. 試料マトリクスによる影響の確認

食品試料由来のマトリクスによる非特異的な生育や生育阻害の測定への影響を評価するため、各試料溶液を段階希釈して定量した。希釈系列が検量線の定量範囲内にあることを確認後、濃度の変動を希釈系列の前後で確認した。

### 5.3. 真度の確認

真度の評価のため、認証標準物質 SRM1846 を 3 試料抽出し、2 点併行で定量した。この操作を 4 日間繰返し分析した。分析値の平均値から認証値に対する回収率を求め、真度を評価した。

#### 5.4. 室内再現精度の確認

分析法の室内再現精度の確認のため、認証標準物質 SRM 1846 を測定日ごとに 3 試料抽出し、2 点併行で定量した。この操作を 4 日間繰返し分析した。定量結果は 2 元配置の枝分れ分散分析によって統計解析し、定量における well 間誤差 ( $\sigma_w$ )、抽出間誤差 ( $\sigma_e$ )、日間誤差 ( $\sigma_d$ ) をそれぞれ算出した。本定量法の室内再現精度 ( $SD_{within}$ ) は下記の式 (1) によって算出した。

$$SD_{within} = \sqrt{\sigma_w^2 / 2 + \sigma_e^2 / 3 + \sigma_d^2} \quad \text{式 (1)}$$

$\sigma_w$  : well 間誤差,  $\sigma_e$  : 抽出間誤差,  $\sigma_d$  : 日間誤差

#### 5.5. 頑健性の確認

定量に影響を与える分析条件の確認のために、Plackett–Burman 実験計画法[51]により、分析法の頑健性を確認した。分析条件の中で結果に影響を与える可能性のある要因として、加水分解時の硫酸濃度、加水分解時間、加水分解後の pH の 3 要因とマイクロプレートでの定量時の菌株の前培養、試料溶液の希釈率、培養時間、測定吸光度の 4 要因の合計 7 要因を抽出し、Table 3 に示す分析条件を設定した。設定した分析条件が変動した時の標準偏差 ( $SD_i$ ) は式 (2) によって算出した。

$$SDi = \sqrt{2 \times \sum (Di^2 / 7) + (\sigma_w)^2 / 2} \quad \text{式 (2)}$$

$Di$  : 各条件の変動,  $\sigma_w$  : well 間誤差

標準偏差 ( $SDi$ ) は式 (3) によって導かれる室内再現精度 ( $SD_{within}$ ) と  $F$  検定によって統計的評価した。

$$SD_{within}' = \sqrt{\sigma_w^2 / 2 + \sigma_e^2 + \sigma_d^2} \quad \text{式 (3)}$$

$\sigma_w$  : well 間誤差,  $\sigma_e$  : 抽出間誤差,  $\sigma_d$  : 日間誤差

**Table 3. Plackett–Burman experimental design calculations**

Selected factor	Nominal	Low level	High level
concentration of H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mol/L)	2.25	1.5	(a) 3 (A)
hydrolyzed time (min)	60	45	(b) 75 (B)
adjusted value of pH	7	6	(c) 8 (C)
pre-incubated inoculum	-	incubated	(d) freeze stock (D)
dilution factor	-	1/512	(e) 1/128 (E)
incubated time (h)	18	16	(f) 20 (F)
wavelength of microplate reader (nm)	600	570	(g) 620 (G)

Experiment	Combination	Measuremt.
1	ABCDEFGF	X1
2	ABcDefg	X2
3	AbCdEfg	X3
4	AbcdeFG	X4
5	aBCdeFg	X5
6	aBcdEfG	X6
7	abCDefG	X7
8	abcDEFg	X8

Effect	Equation
Effect of A and a	$D_a = [(X1 + X2 + X3 + X4)/4] - [(X5 + X6 + X7 + X8)/4]$
Effect of B and b	$D_b = [(X1 + X2 + X5 + X6)/4] - [(X3 + X4 + X7 + X8)/4]$
Effect of C and c	$D_c = [(X1 + X3 + X5 + X7)/4] - [(X2 + X4 + X6 + X8)/4]$
Effect of D and d	$D_d = [(X1 + X2 + X7 + X8)/4] - [(X3 + X4 + X5 + X6)/4]$
Effect of E and e	$D_e = [(X1 + X3 + X6 + X8)/4] - [(X2 + X4 + X5 + X7)/4]$
Effect of F and f	$D_f = [(X1 + X4 + X5 + X8)/4] - [(X2 + X3 + X6 + X7)/4]$
Effect of G and g	$D_g = [(X1 + X4 + X6 + X7)/4] - [(X2 + X3 + X5 + X8)/4]$

## 6. 分析法の不確かさの算出

### 6.1. 併行再現精度の不確かさ

併行再現精度の不確かさはトータルダイエツト試料の食品群ごとに算出した。各試料を3試料抽出し、2点併行で定量した。定量結果を一元配置分散分析によって統計解析し、各試料中の well 間誤差 ( $\sigma_w$ ) と抽出間誤差 ( $\sigma_e$ ) を算出した。精度の不確かさ ( $u(P)$ ) は式 (4) によって算出した。

$$u(P) = \sqrt{\sigma_w^2 / 2 + \sigma_e^2 / 3} \quad \text{式 (4)}$$

$\sigma_w$  : well 間誤差,  $\sigma_e$  : 抽出間誤差

### 6.2. 回収率の不確かさ

回収率の不確かさはトータルダイエツト試料の食品群ごとに算出した。食品群ごとに、試料中のビオチンの濃度の等量のビオチン標準品を添加した。ビオチン濃度が検出限界以下の食品群 (4 : 油脂類、14 : 飲料水) は 0.1  $\mu\text{g/g}$  のビオチンを添加した。タンパク質の含量が 10  $\text{mg/g}$  以下の食品群には、加水分解時のビオチンの分解を防ぐために、牛血清アルブミンを 10  $\text{mg/g}$  となるように分析前に添加した[52]。回収率 ( $R$ ) は式 (5) によって求めた。回収率の不確かさ ( $u(R)$ ) は式 (6) によって、算出した。

$$R = \frac{(C_s - C_p)}{C_a} \quad \text{式 (5)}$$

$C_s$  : 添加回収試験の試料溶液中のビオチン濃度,  $C_p$  : 試料中のビオチン濃度,  $C_a$  : 試料に添加したビオチン濃度

$$u(R) = \sqrt{\sigma_w^2 / 2 + \sigma_e^2 / 3} \quad \text{式 (6)}$$

$\sigma_w$  : well 間誤差,  $\sigma_e$  : 抽出間誤差

### 6.3. 回収率の補正

回収率と回収率の不確かさから、式 (7) によって  $t$  検定 (信頼水準 95%, 自由度 5) による統計解析を行った。

$$t = \frac{|1 - R|}{u(R)} \quad \text{式 (7)}$$

$R$  : 回収率,  $u(R)$  : 回収率の不確かさ

$t$  検定により回収率が 100% と有意に異なることが確認された食品群は、回収率によって濃度と精度を補正した。回収率を補正しない場合の不確かさ ( $u(R)'$ ) は式 (8) によって算出した。

$$u(R)' = \sqrt{\left[ \frac{(1-R)}{t_{crit}} \right]^2 + u(R)^2} \quad \text{式 (8)}$$

$R$  : 回収率,  $u(R)$  : 回収率の不確かさ

$t_{crit}=2.6$  (95% confidence interval, 自由度 5)

#### 6. 4. 日間変動の不確かさ

Plackett–Burman 実験計画法[51]で確認された各条件の変動 ( $Di$ ) から、通常の分析条件で分析した際の不確かさ ( $u(Di)$ ) を下記の式 (9) によって算出した。

$$u(Di) = Di \times (\delta_{real} / \delta_{test}) \quad \text{式 (9)}$$

$Di$  : 各分析条件の変動,  $\delta_{real}$  : 通常の分析条件での変動,  $\delta_{test}$  : Plackett–Burman 実験計画法で設定した変動

分析法の日間変動の不確かさ ( $u(D)$ ) は下記の式 (10) により算出した。

$$u(D) = \sqrt{u(Di) / C_{SRM}} \quad \text{式 (10)}$$

$u(D)$  : 日間変動の不確かさ,  $C_{SRM}$  : 認証標準物質の認証値

## 6.5. 分析法の不確かさ

分析法の不確かさは、食品群ごとに精度の不確かさと回収率の不確かさを合成し、算出した。回収率を補正しなかった食品群は、式 (11) によって分析法の不確かさ ( $u(M)$ ) を算出した。

$$u(M) = \sqrt{[u(P)/C]^2 + [u(R)/R]^2 + u(D)^2} \quad \text{式 (11)}$$

$u(P)$  : 精度の不確かさ,  $C$  : 各食品群の試料中のビオチン濃度,  $u(R)$  : 回収率を補正しなかった時の不確かさ,  $R$  : 回収率

## 結果と考察

### 1. 定量範囲

培養後の乳酸菌の吸光度とビオチン標準品の濃度の対数をプロットしたところ、シグモイド曲線の関係が得られた。標準曲線の定量範囲を確認するため、合計 25 定量の標準曲線の各濃度における変動係数を Fig. 2 に示した。本分析法では、変動係数が 20% 以下の範囲を定量範囲と定め、マイクロプレートでの標準品の定量範囲は 2~125 pg/mL に設定した。抽出時の希釈率を考慮すると、食品 100 g あたりの定量限界は 0.02  $\mu\text{g}$  であった。標準曲線を直線で近似する江口らの方法での標準品の定量範囲は 2~50 pg/mL であり、シグモイド曲線で近似することにより、より広い定量範囲となることが確認された。江口らの方法では、自動分注装置により測定しているが、変動係数 20% 以下の範囲では手動での分注操作でも本定量法が適用できることが確認された[43]。

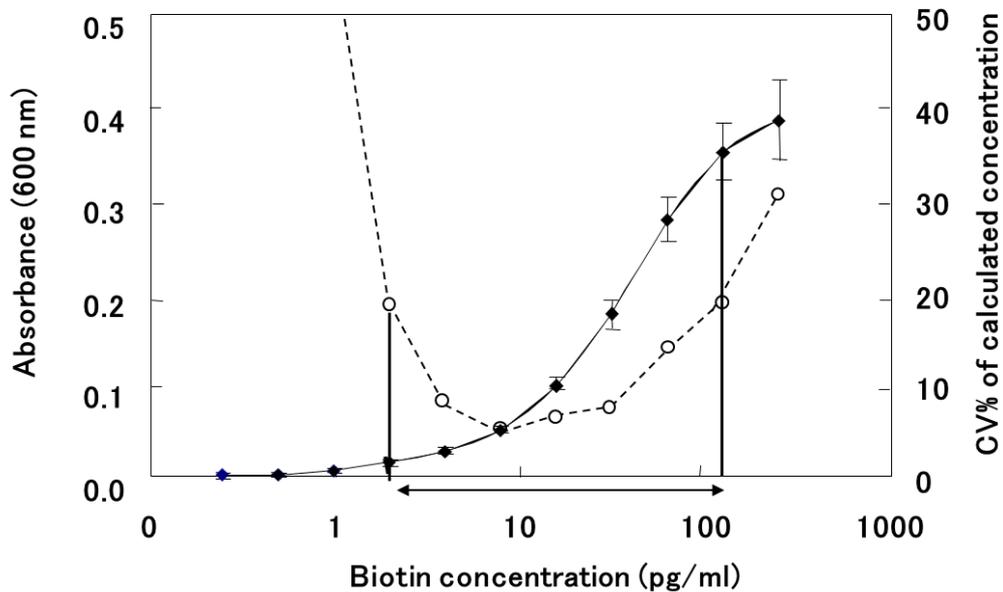


Figure 1. Calibration curve of biotin fitted with 4-parameter logistics.

- ◆— Solid line was mean biotin concentration of twenty-five standard curves
  - -○- - Dotted line was coefficient of variation (CV%) of calculated concentrations.
- Allowed line was working range of this particular curve :  $CV \leq 20\%$ .

## 2. 真度と日間再現精度

真度と日間再現精度の確認のため、認証標準物質を3抽出ずつ4日間繰り返し分析した。分析の結果の平均値と日間再現精度の不確かさ ( $SD_{within}$ ) は  $0.444 \pm 0.060 \mu\text{g/g}$  であり、認証標準物質の認証値  $0.411 \pm 0.067 \mu\text{g/g}$  と比較すると、回収率は  $108 \pm 16\%$  であり、良好な結果を示した。

## 3. 頑健性

分析法の各測定条件が変動した時に、分析結果に与える影響を確認するために、分析法の頑健性を確認した。Table 3 に示す Plackett–Burman 実験計画法によって、分析条件を設定した。分析に影響を与える要因として、加水分解時の硫酸濃度、加水分解時間、加水分解後の pH の 3 要因とマイクロプレートでの定量時の菌株の前培養、試料溶液の希釈率、培養時間、測定吸光度の 4 要因の合計 7 要因による影響を確認した。それぞれの要因が分析に与える影響を、分析結果の差  $Di$  として算出し、すべての要因が与える影響の標準誤差 ( $SDi$ ) を算出した (Table 4)。 $SDi$  は  $F$  検定により、抽出数を考慮しない日間再現精度の不確かさ ( $SD_{within}$ ) と比較した。 $F$  検定により、7 要因が頑健性試験で設定した範囲内で全て変動した場合の変動と室内再現精度を統計評価したところ、試験結果の  $F_{recorded} < F_{tabulated}$  (確率 0.05, 自由度 15, 23) となり、7 要因が全て変動した場合でも測定結果には有意な影響を与えないことが確認された。個々の変動

要因を比較すると、抽出時の変動要因と比較して定量時の変動要因が測定結果に大きな影響を与えることが確認された。変動要因  $u(D_i)$  から分析法の日間変動の不確かさ  $u(D)$  を求めたところ、相対標準偏差として 11.8%であった。

**Table 4. Plackett–Burman test results**

Effect	$D_i$	$\delta_{real}$	$\delta_{test}$	$u(D_i)$
concentration of H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mol/L)	-0.029	0.225	1.5	0.004
hydrolyzed time (min)	-0.036	1.15	20	0.001
adjusted value of pH	0.035	0.58	2	0.010
pre-incubated inoculum	0.085	-	-	-
dilution factor	-0.113	-	-	-
incubated time (h)	-0.163	1.15	4	0.047
wavelength of microplate reader (nm)	0.028	-	-	-
$SD_i$	0.120			
$SD_{within}$	0.113			
$F_{recorded}$	1.14			
$F_{tabulated}$	2.13			

Reference biotin concentration of SRM 1846 was 0.411 µg/g

$\delta_{real}$  : change expected under control in routine use

$\delta_{test}$  : change specified for the ruggedness test

#### 4. 試料マトリクスによる影響

Table 2 に示すように、トータルダイエット試料は 14 の食品群ごとの試料があり、試料溶液中のマトリクスにより乳酸菌の生育に阻害や促進の影響を及ぼす場合がある。このため、試料の定量時はマイクロプレートで 1~1/256 倍の希釈系列をつくり、希釈による定量への影響を評価した。希釈系列が標準曲線の定量範囲内にあることを確認後、希釈系列の前後で濃度の変動がないことを確認した。

#### 5. 各食品群の試料の分析と併行再現精度

各食品群 1 g あたりのビオチン含量と併行再現精度の不確かさを Table 5 に示す。各試料の併行再現精度は 1.4%~12.7%であり、良好な精度を示した。

**Table 5. Biotin concentration and precision uncertainty of each food group**

No.	Food group	$C$ ( $\mu\text{g/g}$ )	$u(P)$ ( $\mu\text{g/g}$ )	$u(P)/C$
1	Rice/Processed rice	0.014	0.002	0.127
2	Cereal except rice	0.021	0.001	0.027
3	Sugar/Confectionery	0.040	0.001	0.024
4	Fat/Oil	0.000	0.000	0.000
5	Pulse	0.072	0.003	0.040
6	Fruit	0.013	0.000	0.030
7	Green, Yellow vegetables	0.030	0.001	0.044
8	Other vegetables	0.016	0.001	0.052
9	Beverage	0.006	0.000	0.048
10	Fish/Shellfish	0.072	0.003	0.046
11	Meat/Egg	0.238	0.003	0.014
12	Milk/Dairy products	0.029	0.001	0.050
13	Seasoning	0.067	0.002	0.036
14	Water	0.000	0.000	0.000

## 6. 回収率とその補正

各食品群のビオチン濃度と等量のビオチン標準品を添加し、添加回収試験を実施した。試料中の分析値が定量限界以下であった4群（油脂類）と14群（水）には、0.1 µg/gとなるように標準品を添加した。添加回収試験の結果、タンパク質の含量の少ない4群（油脂類）、9群（嗜好飲料）と14群（水）では他の食品群と比較して、回収率が低いことが確認された。Mockらは、乳中のビオチンの抽出時に牛血清アルブミンを添加することによって、加水分解時のビオチン分解を抑制できることを報告している[52]。このため、回収率が低かった4、9、14の食品群には、牛血清アルブミンを10 mg/g添加した。牛血清アルブミンの添加によって回収率は改善されたため、タンパク質の含量が低い食品群のビオチンの分析を行う時には、牛血清アルブミンの添加が必要であることが確認された。

回収率と回収率の不確かさをTable 6に示す。回収率は78~110%であり、良好な結果を示した。回収率と回収率の不確かさをt検定によって評価したところ、3、4、7、8、10の食品群は回収率が100%と有意に差があることが確認されたため、分析値を回収率で補正した場合の不確かさを算出した。

**Table 6. Recovery and recovery uncertainty**

No.	Food group	$R$	$t$	$u(R)'$
1	Rice/Processed rice	0.93	0.3	0.22
2	Cereal except rice	0.86	1.2	0.12
3	Sugar/Confectionery	0.75	23.4 *	0.13
4	Fat/Oil	0.78	9.0 *	0.11
5	Pulse	0.82	1.8	0.10
6	Fruit	1.11	2.2	0.07
7	Green, Yellow vegetables	0.82	4.2 *	0.10
8	Other vegetables	0.74	4.8 *	0.15
9	Beverage	1.08	1.5	0.06
10	Fish/Shellfish	0.80	3.9 *	0.11
11	Meat/Egg	1.06	0.7	0.09
12	Milk/Dairy products	1.09	2.2	0.04
13	Seasoning	1.19	2.2	0.09
14	Water	0.97	0.6	0.05

\*: Significantly different from 1 ( $p < 0.05$ )

## 7. 摂取量と不確かさ

各食品群中のビオチン濃度に摂取量をかけることによって、ビオチンの摂取量を算出した。併行再現精度の不確かさと回収率の不確かさを相対不確かさとして合成し、分析値の不確かさを算出した。分析値の不確かさと食品群ごとの摂取量から、ビオチン摂取量の不確かさを算出した。Table 7 には回収率を補正しない場合の食品群ごとの摂取量とその不確かさを示した。本調査での摂取量の平均値と分析法に起因する信頼区間は 70.1 (95%信頼区間: 58.9-81.3, 包含係数  $k=2$ )  $\mu\text{g/d}$  であった。トータルダイエツト調査法によるビオチンの摂取量は、東京都で 45  $\mu\text{g/d}$  と報告されており、この報告を根拠として食事摂取基準 (2005 年版) のビオチンの目安量が定められている[23,38]。大阪市民の摂取量の平均値は、目安量の約 1.6 倍であった。

渡邊らは、18 食品群に分類したトータルダイエツト法によって、ビオチンの摂取量を、50.9  $\mu\text{g/d}$  (2009 年)、51.0  $\mu\text{g/d}$  (2010 年) とそれぞれ報告している[28,29]。また、個々の食品中の含量を 98 食品群に分類した食品群別計算法によって、摂取量を 54.5  $\mu\text{g/d}$  と報告している[29]。渡邊らはトータルダイエツト法によりビオチンの調査と併行して 6 種類の水溶性ビタミンの摂取量を調査し、これらのビタミンの摂取量は国民健康・栄養調査報告 (平成 18 年) で報告されている摂取量との相関が高いことを報告している[29]。

**Table 7. Estimated daily intake of biotin and measurement uncertainty from each food group**

No.	Food group	$M$	$\pm$	$u(M)$
		(μg / d)		
1	Rice/Processed rice	2.3	$\pm$	0.7
2	Cereal except rice	3.5	$\pm$	0.6
3	Sugar/Confectionery	1.2	$\pm$	0.3
4	Fat/Oil	0.0	$\pm$	0.0
5	Pulse	4.5	$\pm$	0.8
6	Fruit	1.7	$\pm$	0.2
7	Green, Yellow vegetables	2.9	$\pm$	0.5
8	Other vegetables	2.7	$\pm$	0.6
9	Beverage	1.4	$\pm$	0.2
10	Fish/Shellfish	6.8	$\pm$	1.3
11	Meat/Egg	35.2	$\pm$	5.2
12	Milk/Dairy products	4.0	$\pm$	0.6
13	Seasoning	3.8	$\pm$	0.6
14	Water	0.0	$\pm$	0.0
Total ( $T \pm u(T)$ )		70.1	$\pm$	5.6

このように、トータルダイエツト法による摂取量の調査は、これまで一般的に利用されてきた有害物質の摂取のリスクの評価だけでなく、栄養素の摂取量の調査への応用が今後も期待される。

文部科学省によって日本食品標準成分表 2010 にビオチンが収載されたことにより、2010 年からは特定の集団を対象とした食事調査法による摂取量の調査が可能となった。溝畑らは、妊婦を対象として妊娠の期間ごとにビオチンの摂取量の調査し、摂取量が  $36.0 \pm 7.2 \mu\text{g/d}$  であることを報告している[30]。Imaeda らは、四季連続 7 日間の秤量法によって、 $51.7 \mu\text{g/d}$  (中年男性)、 $47.6 \mu\text{g/d}$  (中年女性) と報告している[31]。Shibata らは、4 日間の秤量法によって、ビオチンの摂取量を  $35 \mu\text{g/d}$  (男子小学生)、 $31 \mu\text{g/d}$  (女子小学生)、 $28 \mu\text{g/d}$  (男子大学生)、 $26 \mu\text{g/d}$  (女子大学生)、 $32 \mu\text{g/d}$  (高齢者) と報告している[32]。これらの食事調査法によるビオチンの摂取量は、本研究で実施したトータルダイエツト法による摂取量と比較すると低い。Shibata らは、陰膳法より調製した 1 日分の食事の中のビオチン含量の分析値が日本食品標準成分表から計算したビオチン含量と比較して高いことを報告している[53]。このように、同一の食事から推定した際にも、分析から算出した摂取量と食品成分表から計算した摂取量は異なる場合もある。現時点で、調査法の違いによるビオチンの摂取量の推定への影響を考察するためには、さらなる調査が必要である。

トータルダイエツト調査法による推定の精度を向上するためには、次の点を考慮する

必要がある。トータルダイエツト法では、選択する食品の種類や食品中のビオチン含量の季節変動がビオチンの摂取量に影響を及ぼすと考えられる。このため、調査年度の異なるトータルダイエツト試料を分析することにより、食品選択に関する誤差やビオチン摂取量の年次変化を推定できると考える。

### 第3章 モンテカルロ法による日本人のビオチン摂取量の分布の推定

## 緒言

第2章では、大阪市民のビオチンの摂取量を調査し、分析法の不確かさから摂取量の推定における分析に起因する信頼区間を推定した。本章では、集団でのビオチンの摂取量の過不足の評価のために、確率論的な推定法の一つであるモンテカルロ法によって摂取量の分布の推定を試みた。モンテカルロ法は、乱数を用いてシミュレーションや数値計算する手法の一つである。本方法は乱数によって摂取量などの分布を再現し、集団における摂取量の分布の推定が可能である[54]。近年、モンテカルロ法は環境省によるダイオキシンの暴露量の推定などに応用されている[55]。本章では、日本におけるビオチンの摂取量の分布の推定のために、モンテカルロ法が適用できるか検討を行った。ビオチンの摂取量の分布の推定のために、2種類のモデルを設計した。第1のモデルでは、2007年から2009年に実施した3年間のトータルダイエツト調査による試料中の濃度を利用して推定を行った。第2のモデルでは、各国の個々の食品中のビオチンの報告値を利用して推定を行った。各食品群の摂取量の分布は、国民健康・栄養調査（平成17年）の摂取量[56]を利用し、モデルごとにビオチンの摂取量の分布を推定した。

## 方法

### 1. 食品群別摂取量

国民健康・栄養調査報告（平成 17 年）[56]をもとに 13 の食品群ごとの摂取量を算出した。18 歳から 69 歳までの摂取量（男性 2759 名、女性 3106 名）の摂取量を 13 の食品群に分類し、Table 8 に示す食品群ごとの摂取量の平均と標準偏差を求めた。

### 2. トータルダイエツト試料中のビオチン量の定量

前章における試料の調製法と同様に、2008 年と 2009 年に約 200 食品を大阪市内で購入した。各食品を必要に応じて調理後に混合し、13 の食品群をトータルダイエツト調査用の試料とした。トータルダイエツト調査用の試料は、前章と同様に硫酸による加水分解による抽出後、マイクロプレートによる微生物学的定量法によって食品群ごとに分析した[43]。3年分のトータルダイエツト試料中の食品群ごとのビオチン濃度を Table 9 に示す。

**Table 8. Food consumption – National Nutritional Survey 2005**

No.	Food group <sup>1</sup>	Daily intake	
		(g/d)	
		<i>I(i)</i>	
		Mean	SD
1	Rice/ Processed rice	351.1	194.8
2	Cereal/ Potato	163.4	134.9
3	Sugar/ Confectionery	30.1	48.4
4	Fat/ Oil	11.1	9.8
5	Pulse	60.7	75.6
6	Fruit	115.8	154.2
7	Green, Yellow vegetables	96.3	84.7
8	Other vegetables	198.8	129.1
9	Beverage	686.4	524.2
10	Fish/ Shellfish	88.3	81.6
11	Meat/ Egg	121.5	83.6
12	Milk/ Dairy products	97.0	136.2
13	Seasoning	103.0	95.3
		2123.4	654.2

<sup>1</sup> Food consumption data were classified into 13 food groups based on TDS in Japan

**Table 9. Biotin concentration of each food group evaluated using TDS**

No.	Food group	Biotin concentration ( $\mu\text{g/g}$ ), $C_{TDS}$ , ( $n$ ) <sup>1</sup>					
		2007		2008		2009	
1	Rice/ Processed rice	0.014	(4)	0.003	(4)	0.007	(4)
2	Cereal/ Potato	0.021	(22)	0.021	(22)	0.046	(21)
3	Sugar/ Confectionery	0.040	(19)	0.034	(19)	0.048	(18)
4	Fat/ Oil	0.000	(8)	0.000	(6)	0.000	(8)
5	Pulse	0.072	(10)	0.070	(10)	0.060	(9)
6	Fruit	0.013	(13)	0.013	(13)	0.016	(17)
7	Green, Yellow vegetables	0.030	(14)	0.047	(12)	0.028	(18)
8	Other vegetables	0.016	(23)	0.015	(26)	0.025	(24)
9	Beverage	0.006	(14)	0.005	(16)	0.004	(15)
10	Fish/ Shellfish	0.072	(24)	0.111	(27)	0.103	(18)
11	Meat/ Egg	0.238	(8)	0.198	(15)	0.215	(7)
12	Milk/ Dairy products	0.029	(11)	0.023	(10)	0.062	(11)
13	Seasoning	0.067	(20)	0.034	(20)	0.100	(25)
Total n		190		200		195	

<sup>1</sup> Numbers in parentheses show numbers of food samples in respective groups.

### 3. 個々の食品中のビオチン含量

個々の食品中のビオチン含量は、日本[57]、デンマーク [58]、ドイツ[59]、カナダ[60-63]、米国[64]の合計 930 食品のビオチン含量の報告値を使用した。個々の食品はトータルダイエット調査法と同様に 13 食品群に分類した。食品群ごとのビオチンの含量と食品数を Table 10 に示した。

### 4. 個々の食品中のビオチン含量の外れ値の検出

個々の食品中のビオチン含量から外れ値を確認するために、食品群ごとに第 3 四分位から四分位範囲の 1.5 倍以上高い含量の食品を外れ値として検出した。Table 10 には外れ値を除外した時の食品群ごとのビオチンの含量と食品数を示した。

**Table 10. Biotin concentrations of respective food groups evaluated from individual foods**

No.	Food group	Biotin concentration ( $\mu\text{g/g}$ ), $C_{INF}$ , ( $n$ ) <sup>1</sup>							
		All data				Without outliers <sup>2</sup>			
		Mean	Min.	Max.		Mean	Min.	Max.	
1	Rice/ Processed rice	0.116	0.004	0.600	(18)	0.038	0.004	0.120	(15)
2	Cereal/ Potato	0.115	0.001	0.911	(121)	0.056	0.001	0.240	(104)
3	Sugar/ Confectionery	0.034	0.000	0.320	(30)	0.017	0.000	0.053	(27)
4	Fat/ Oil	0.006	0.000	0.034	(8)	0.002	0.000	0.007	(7)
5	Pulse	0.178	0.005	1.140	(38)	0.094	0.005	0.340	(33)
6	Fruit	0.016	0.001	0.100	(109)	0.012	0.001	0.040	(100)
7	Green, Yellow vegetables	0.040	0.002	0.840	(70)	0.016	0.002	0.053	(61)
8	Other vegetables	0.039	0.000	0.414	(118)	0.022	0.000	0.083	(106)
9	Beverage	0.063	0.001	0.603	(26)	0.005	0.001	0.014	(22)
10	Fish/ Shellfish	0.062	0.002	0.410	(110)	0.052	0.002	0.163	(104)
11	Meat/ Egg	0.197	0.000	2.274	(131)	0.069	0.000	0.330	(108)
12	Milk/ Dairy products	0.034	0.002	0.430	(123)	0.024	0.002	0.062	(114)
13	Seasoning	0.312	0.003	2.000	(28)	0.126	0.003	0.600	(24)
Total $n$					930				825

<sup>1</sup> Numbers in parentheses show numbers of food samples in respective groups.

<sup>2</sup> Outliers are located higher than 1.5 fold interquartile range above the third quartile.

## 5. モンテカルロシミュレーション

モンテカルロシミュレーションは統計解析ソフト R statistical package (ver. 2.10.1; The Comprehensive R Archive Network) によって実施した[65,66]。式 (12) によって、食品群ごとの摂取量の推定を 10000 回繰返し、摂取量の分布を推定した。本章では摂取量推定のモデルとして 2 つのモデルを設計した。

$$T = \sum_{i=1}^{13} C(i) \times I(i) \quad \text{式 (12)}$$

$T$ : 個人のビオチンの 1 日摂取量,  $C$ : 各食品群の試料中のビオチン含量,  $I$ : 食品群ごとの摂取量

### 5.1. モデル 1 (トータルダイエツト調査法からの推定)

本モデルでは、食品群ごとのビオチン含量は 3 年間のトータルダイエツト調査による試料中の濃度 ( $C_{TDS}(i)$ ) から摂取量の分布の推定を行った。試料中のビオチン濃度は、 $C_{TDS}(i)$  から無作為に抽出した。食品群ごとの摂取量 ( $I(i)$ ) は国民健康・栄養調査報告での摂取量が 0 から平均値の 5 倍までの対数正規分布に従うと仮定し、摂取量の対数正規分布から無作為に摂取量を抽出した。式 (13) によって、13 食品群の摂取量の合計を求める操作を 10000 回繰返し、本モデルでの摂取量の分布を求めた。

$$T = \sum_{i=1}^{13} C_{TDS}(i) \times I(i) \quad \text{式 (13)}$$

## 5.2. モデル2（個々の食品からの摂取量の推定）

本モデルでは各個人が食品群ごとに 3 種類の個々の食品を無作為に選択して摂取すると仮定し、摂取量を推定した。ビオチン濃度 ( $C_{INF}(i)$ ) は食品群ごとに 3 食品を無作為に抽出し、その平均値を使用した。国民健康・栄養調査報告での摂取量が 0 から平均値の 5 倍までの対数正規分布に従うと仮定し、摂取量の対数正規分布から無作為に摂取量を抽出した。式 (14) によって、13 食品群の摂取量の合計を求める操作を 10000 回繰り返し、本モデルでの摂取量の分布を求めた。

$$T = \sum_{i=1}^{13} \frac{C_{INF1}(i) + C_{INF2}(i) + C_{INF3}(i)}{3} \times I(i) \quad \text{式 (14)}$$

## 結果と考察

### 1. 摂取量の分布の推定

集団における摂取量の過不足の評価のためには、摂取量の分布の推定が重要である。このため、本章では日本でのビオチンの摂取量の分布の推定のために、モンテカルロ法による2種類のモデルを設計した。第1のモデルでは、我々が大阪市で調査したトータルダイエツト法による食品群ごとのビオチン濃度 (Table 9) を利用した。第2のモデルでは各国の食品成分表に記載されている個々の食品中のビオチン濃度 (Table 10) を利用した。

モンテカルロ法により推定された各モデルにおける摂取量の分布を Fig. 3 に示す。トータルダイエツト調査法によるモデル 1 でのビオチンの摂取量の分布は 64.2 (95%信頼区間: 40.1-108.2)  $\mu\text{g/d}$  であった (Fig. 3, model 1)。

Table 9 に示すようにトータルダイエツト法では食品群ごとに 4 から 27 種類の食品を選択し、国民健康・栄養調査で報告されている摂取量に従って、13 の食品群に分類する。各食品は調理後に混合するため、調査試料には調理による影響も考慮されている。モデル 1 の推定法の精度を向上するためには、食品の季節変動や地域差などを考慮して、調査試料を調製していく必要がある。しかしながら、季節変動と地域差を考慮して調査試料を調製する場合には、多大な時間と費用が必要となる。

このため、本章では第2のモデルとして、個々の食品中の含量からの推定するモデル

を構築した。Fig. 3, model 2-1 に示した個々の食品中のビオチン含量を利用して推定したビオチン摂取量は  $189.5 \pm 96.2 \mu\text{g/d}$  (平均値  $\pm$  標準偏差) となり、摂取量の平均値はモデル 1 による推定結果の 2.8 倍となった。各食品群から外れ値を検出したところ、ココア (飲料群) やビール酵母 (調味料群) などの調理しなければ摂取できない食品が外れ値として検出された (Table 10)。外れ値を除外した個々の食品中のビオチン含量を利用したモデル 2-2 によるビオチンの摂取量の分布は、65.3 (95%信頼区間: 34.4-107.6)  $\mu\text{g/d}$  であり、モデル 1 で推定した摂取量の分布とほぼ一致した (Fig. 3, model 2-2)。

食事摂取基準 (2010 年版) の目安量  $50 \mu\text{g/d}$  と比較すると、両モデルで 80%以上の人が目安量以上のビオチンを摂取していることが明らかとなった。

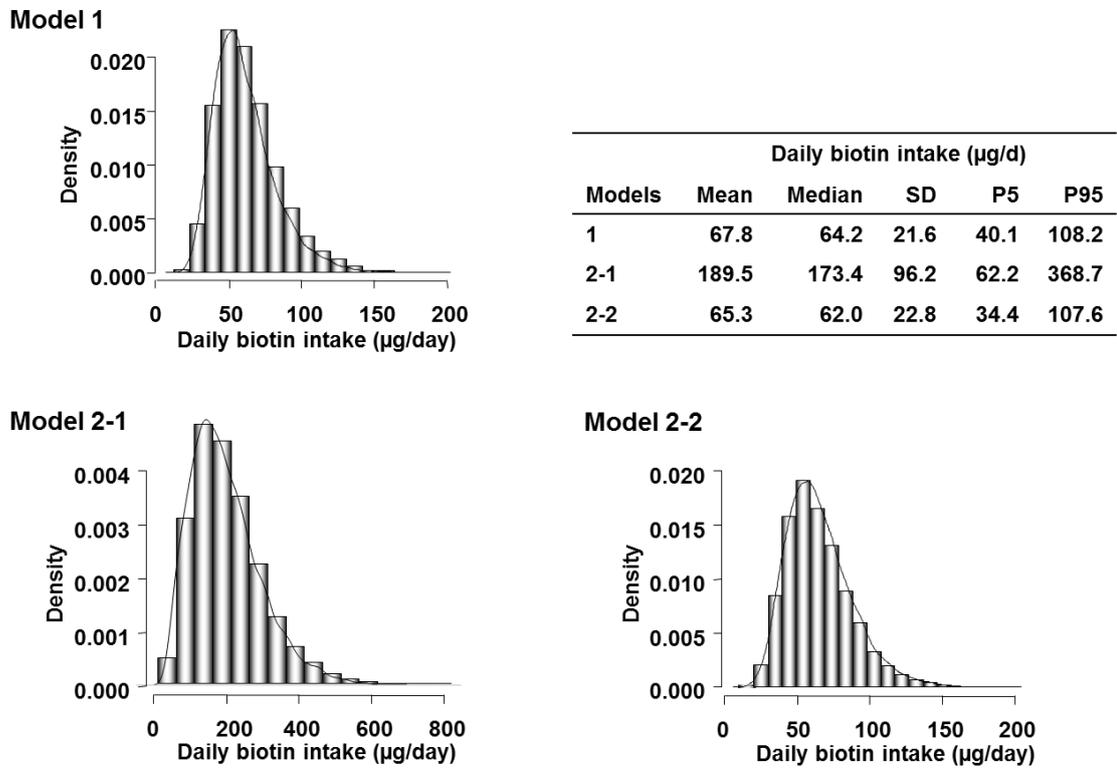


Fig. 3 Probability density distribution of daily biotin intake estimated using Monte Carlo simulation with two models.

Model 1: Model estimated from biotin concentration data by TDS 2007–2009 in Osaka.

Model 2: Model estimated from biotin concentration data from individual foods.

2-1: Estimated with all biotin concentration data in Table 10.

2-2: Estimated with biotin concentration data without outliers in Table 10.

## 2. 食品群ごとの摂取量の比較

Fig. 4 には、各モデルの摂取量の分布の平均値での食品群ごとの摂取量を示した。モデル 1 とモデル 2-2 を比較すると、それぞれのモデルごとに 1 日にあたりのビオチンの摂取量に寄与している食品群は異なっていた。モデル 1 ではビオチンの摂取の寄与率の高い食品群は、肉・卵、魚、調味料の 3 群であり、モデル 2-2 では米・米加工品、調味料、穀類・いも類の 3 群であった。これらの 3 群によるビオチンの摂取量は 1 日摂取量の 50%以上の寄与率であった。

モデル 2 の設計時には、各個人が各食品群から無作為に 3 食品を選択し、均等に食品を摂取すると仮定しているため、各食品の摂取量を正確には反映できていない。渡邊らは国民健康・栄養調査報告と個々の食品中のビオチンの分析値から食品群別計算法による摂取量を調査している[25]。この調査では、101 食品の分析値を 18 食品群に分類し、男性で 107.8  $\mu\text{g}/\text{d}$  および女性 91.6  $\mu\text{g}/\text{d}$  と摂取量を報告している[25]。その後の調査では 330 食品の分析値を 98 食品群に分類し、54.5  $\mu\text{g}/\text{d}$  と摂取量を報告している[28]。これらの摂取量の差異は、食品中のビオチン含量のデータ数だけではなく、食品群の分類数が摂取量の推定に影響を与えていると考えられる。このため、モデル 2-1 の個々の食品を 18 食品群に分類し、再解析した。再解析の結果、モデル 2-1 によるビオチンの摂取量は  $188.0 \pm 96.4 \mu\text{g}/\text{d}$  となり、13 食品群で分類した場合の摂取量  $189.5 \pm 96.2 \mu\text{g}/\text{d}$  と同様の推定値となった。個々の食品含量から外れ値を除いたモデル 2-2 を 18 食品群

で分類した場合のビオチンの摂取量は  $68.4 \pm 22.8 \mu\text{g/d}$  となり、13 食品群で推移した  $65.3 \pm 22.8 \mu\text{g/d}$  と同様の推定値となった。モデル 2 による摂取量の分布の推定では、食品群ごとの分類を細分化していくことにより、推定法の精度を向上することができると考えられる。しかしながら、調査した時点での個々の食品中のビオチン含量の報告数は十分ではなかったため、ビオチン含量の情報の蓄積が必要となる。さらに個々の食品の報告値には、調理前の食品も多く含まれるため、食品加工・調理によるビオチンの利用効率を評価する必要がある。

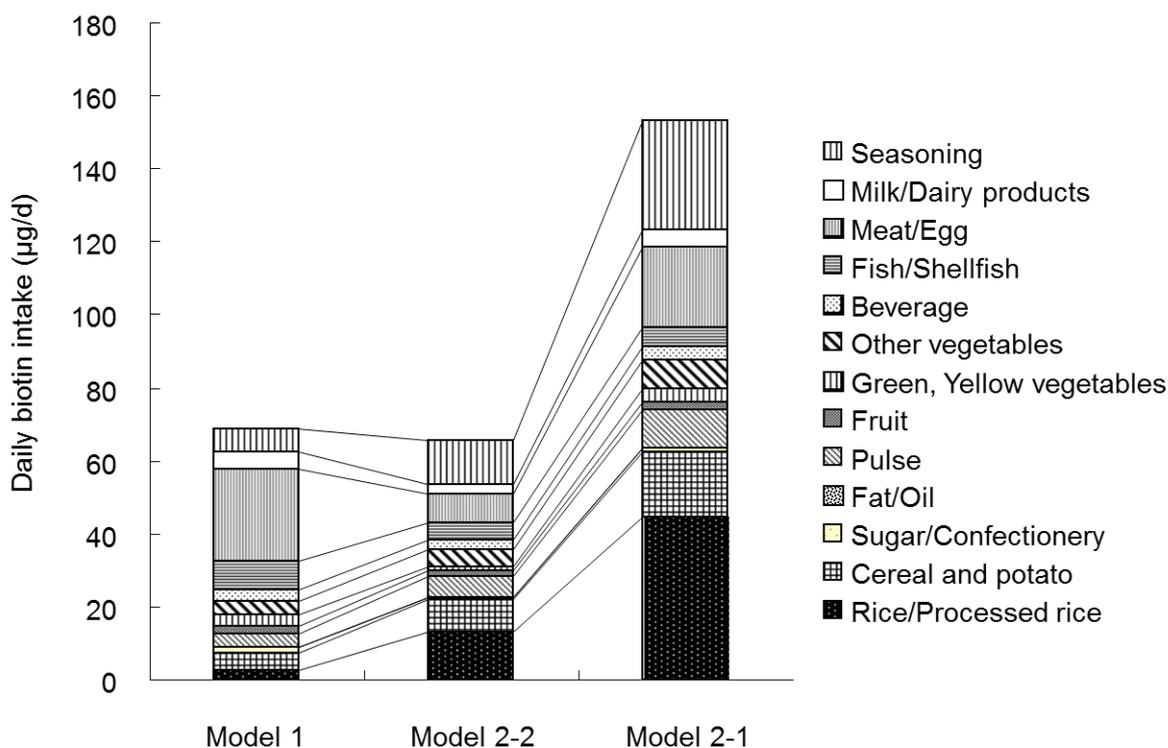


Fig. 4 Contribution of each food group to total daily biotin intake with Monte Carlo simulation using two models.

Models are identical to those presented for Fig. 3

## 第4章 食品加工・調理によるビオチンの利用効率の評価

## 緒言

第3章では、摂取量の分布の推定のために、確率論的な推定法の一つであるモンテカルロ法によるモデルを構築し、日本人のビオチンの摂取量の分布を推定した。2つのモデルにより推定した摂取量の分布はほぼ一致したが、モデルごとに課題が確認された。個々の食品の報告値から推定を行ったモデル2で使用した個々の食品中のビオチン含量の報告値は限られており、調理前の食品も多く含まれるため、妥当性の高い摂取量の推定には食品の加工調理による損失の影響を評価する必要がある。さらに、ビオチンの効率的な摂取を考慮するうえで必要な調理に伴う関連要因についても検討を行う必要がある。

そこで、本章では、食品加工・調理によるビオチンの利用効率について検討を行った。まず、第4-1章では、加熱による食品中のビオチン含量への影響を評価した。アマランス種子をモデルとして、膨化時の加熱による損失の影響を評価した。第4-2章では、ビオチンの効率的な摂取方法を考察するために、ビオチンの摂取量への寄与が高い鶏卵を対象として、各種調理法によるビオチンの消化液による溶出率を評価した。

## 第4章 - 1 加熱によるアマランス種子中のビオチンの評価

## 緒言

アマランスは中南米を原産とする双子葉類ヒユ科ヒユ属 (*Amaranthus*) の雑穀であり、米や小麦などの主要穀類と比較して、タンパク質、ビタミン B 群、ミネラルなどの栄養素の含量が高く、有用植物資源として注目を集めている[67-70]。アマランスは妊娠期に必要な量が増えるビタミンの葉酸や鉄などのミネラルを豊富に含む。妊娠期に潜在的な欠乏が懸念されているビオチンの含量も高い[70]。

アマランスの種子は適切な条件で加熱することによって、種子内部の水分蒸発により常圧下で膨化する性質がある[71]。膨化によって種子の食感と風味を向上し、栄養素の吸収性を向上することもできる。種子の膨化は、従来フライパンなどの調理器具による加熱によって行われてきたが、この方法では不均一な加熱による種子の回収量の低下や過加熱によるビタミン、ミネラル、アミノ酸などの栄養素の損失が問題となってきた[72-74]。このため、井上らによってアマランスの種子の連続膨化装置を開発された[75]。膨化条件の最適化によって、種子を安定して膨化できることは確認されたが、膨化時の加熱がビオチンに与える影響はこれまでに評価されていなかった。

このため、本章ではアマランス種子に含まれるビオチンの膨化前後の含量の変化を評価した。ビオチンとの比較のために、ビタミン B 群 5 種 (ビタミン B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, ナイアシン, 葉酸, パントテン酸) とミネラル 14 種 (Na, Mg, P, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Se, Mo, Ni) を対象として、膨化前後の含量の変化を評価した。

## 方法

### 1. 試料

アマランス種子（米国産）はメキシコ由来の *A. hypochondriacus* とパキスタン由来の *A. hybridus* との雑種後代である K-343 品種を入手した。

### 2. 種子膨化装置による試料調製

Fig. 5には種子膨化装置の構造と写真を示した。これまでに最適化された種子の膨化条件から、加熱条件は260°C, 15 sに設定し、種子を膨化した。原料の種子と膨化処理後の種子は超遠心粉碎装置（ZM200; Retsch GmbH and Co. KG）によって、直径0.5 mm 以下に粉碎後、分析まで -20°Cで保存した。

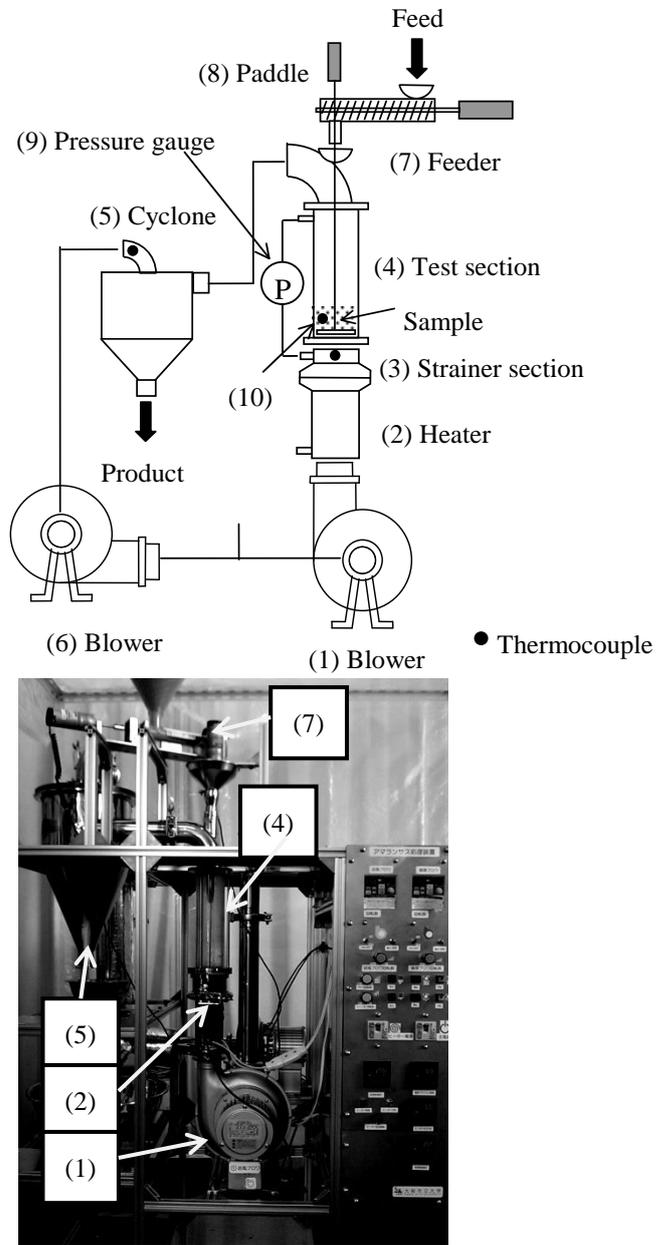


Fig. 5 Fluidized bed continuous processing system for popping amaranth seeds.

### 3. 試薬

Takadiastaseは三共製薬より入手した。その他の試薬および酵素はSigma-Aldrichより入手した。

### 4. 分析法

#### 4.1. 走査型電子顕微鏡による形態の観察

膨化前後の種子は白金-金合金によって真空蒸着後に、走査型電子顕微鏡（日立，S-3500N）によって形態を観察した。

#### 4.2. 膨化後の体積の測定

膨化前後の体積の比較のためにメスシリンダーによって、膨化前後の体積を比較した。

#### 4.3. 水分量の定量

試料中の栄養素の変化量を乾燥重量あたりの含量で示すため、各試料の水分量を測定した。水分量の定量はAOAC法に従い、130°C, 3 h乾燥した後、乾燥前後の重量を秤量した[76]。

#### 4.4. リボフラビンの定量

試料0.1 gを50 mL遠沈管に採取し、0.1 mol/L塩酸10 mLを加え、高圧滅菌器（平山製作所，HA-240MIV）により121°C, 30 minの条件で加水分解した。室温まで冷却した試料溶液を10 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH 4.5に調整後、Takadiastaseによって37°C, 15 h酵素処理後、蒸留水で50 mLに定容した。定容後の抽出液をシリンジフィルター（Sartorius, ミニザルトプラス, 孔径:0.22 μm）によって、ろ過除菌したものを試料溶液とした。リボフラビンは高速液体クロマトグラフ（Agilent, 1100）によって分離後に、蛍光検出器（日立, L-7480）によって定量した[77]。

#### 4.5. ナイアシンの定量

試料0.1 gを50 mL遠沈管に採取し、0.25 mol/L 硫酸10 mLを加え、高圧滅菌器（平山製作所，HA-240MIV）により121°C, 30 minの条件で加水分解した。室温まで冷却した試料溶液を10 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH 6.8に調整後、蒸留水で50 mLに定容した。定容後の抽出液をシリンジフィルターによって、ろ過除菌したものを試料溶液とした。ナイアシンは乳酸菌（*Lactobacillus plantarum* ATCC8014）によるマイクロプレートを用いた微生物学的定量法で測定した[76]。

#### 4.6. パントテン酸の定量

試料0.1 gを50 mL遠沈管に採取し、0.2 mol/L Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 8.3) を10 mL 加え、高圧滅菌器 (平山製作所, HA-240MIV) により121°C, 15 minの条件で加水分解した。加水分解溶液はAlkaline phosphataseとハト肝臓由来Amidaseによって、37°C, 15 min酵素処理後、100°C, 5 min加熱し、酵素を失活した。室温まで冷却した試料溶液を蒸留水で50 mLに定容した。定容後の抽出液をシリンジフィルターによって、ろ過除菌したものを試料溶液とした。パントテン酸は乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* ATCC8014) によるマイクロプレートを用いた微生物学的定量法で測定した[78]。

#### 4.7. ビタミンB<sub>6</sub>の定量

試料0.1 gを50 mL遠沈管に採取し、0.44 mol/L塩酸10 mLを加え、高圧滅菌器 (平山製作所, HA-240MIV) により121°C, 2 hの条件で加水分解した。室温まで冷却した試料溶液を10 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH 5.0に調整後、蒸留水で50 mLに定容した。定容後の抽出液をシリンジフィルターによって、ろ過除菌したものを試料溶液とした。ビタミンB<sub>6</sub>は酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080) によるマイクロプレートを用いた微生物学的定量法で測定した[76]。

#### 4.8. ビオチンの定量

試料0.1 gを50 mL遠沈管に採取し、2.25 mol/L 硫酸10 mLを加え、高圧滅菌器（平山製作所，HA-240MIV）により121°C, 1 hの条件で加水分解した。室温まで冷却した試料溶液を10 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH 7.0に調整後、蒸留水で50 mLに定容した。定容後の抽出液をシリンジフィルターによって、ろ過除菌したものを試料溶液とした。ビオチンは乳酸菌（*Lactobacillus plantarum* ATCC8014）によるマイクロプレートを用いた微生物学的定量法で測定した[43]。

#### 4.9. 葉酸の定量

試料0.1 gを50 mL遠沈管に採取し、57 mmol/L ascorbic acid (Sigma-Aldrich) と0.2 mol/L 2-mercaptoethanolを含むリン酸緩衝溶液（pH 7.0）を10 mLを加え、protease（*Streptomyces griseus*由来）によって37°C, 2 h酵素処理した。100°C, 10 minの加熱によりproteaseを失活後、 $\alpha$ -amylase（*Aspergillus oryzae*由来）と conjugase（ラット血清由来）によって 37°C, 2 h酵素処理後、蒸留水で50 mLに定容した。定容後の抽出液をシリンジフィルターによって、ろ過除菌したものを試料溶液とした。葉酸は乳酸菌（*Lactobacillus plantarum* ATCC7649）によるマイクロプレートを用いた微生物学的定量法で測定した[79]。

#### 4. 10. 元素の定量

試料0.5 gを50 mL遠沈管に採取し、5 mLの硝酸と1 mLの過酸化水素水を加え、マイクロウェーブ分解装置 (Anton Paar GmbH, Multiwave 3000) によって酸分解後、蒸留水で50 mLに定容した。定容後の抽出液をシリンジフィルターによって、ろ過したものを試料溶液とした。14種の元素は ICP-MS (Thermo Fisher Scientific Inc., XSERIES 2) によって分析した。試料由来マトリクスやプラズマガスによる分子干渉が起こった元素は Collision cell technology (CCT) モードによって分析した。

#### 5. 統計解析

全ての分析は3併行で分析し、定量結果は平均値と標準偏差を示した。膨化前後の各栄養素の変化量は、統計解析ソフトR statistical package (ver. 2.10.1; The Comprehensive R Archive Network) によって、*t*検定による統計評価を行い、有意水準5%以下のものを有意に変化があると評価した[65,66]。

## 結果と考察

### 1. 走査型電子顕微鏡による形態の観察

アマランス種子は膨化後に、Fig. 6に示すような泡状や蝶状の形態を示した。種子の体積は膨化前と比較して6.8倍に増加した。過去の報告と同様に、膨化後にも種子の外胚乳組織の外側にある胚組織は残存していた[71]。

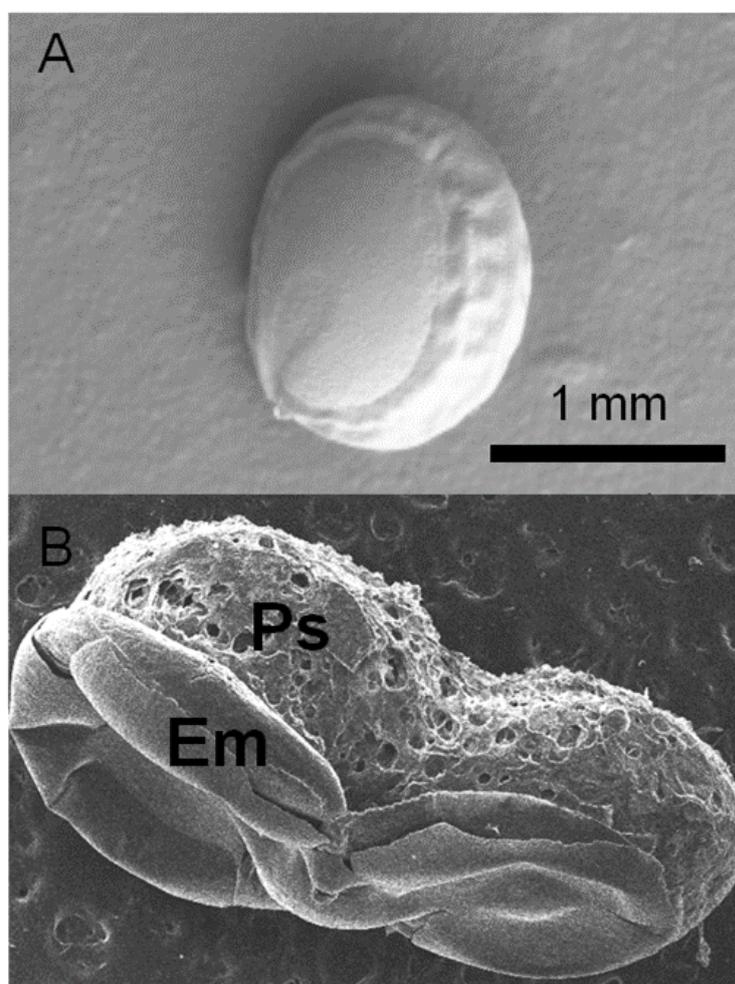


Fig. 6 Scanning electron micrograph of *Amaranthus hypochondriacus*: raw seeds (A) and popped seeds (B).

Ps: perisperm, Em: embryo

## 2. 必須元素と微量元素

Tables 11 と 12 には膨化前後の種子中の主要元素と微量元素の定量結果を示した。加工前の種子中の Mg, K, Ca, Cr, Fe, Cu, と Mo は日本食品標準成分表 2010 [33]に収載されている含量とほぼ同量の定量結果であった。一方、Na, P, Ca と Se の定量値は日本食品標準成分表の含量と比較して 1.5–3.1 倍高く、Mn と Zn は 0.5 から 0.6 倍低い値であった。

膨化後には Mg, P, K, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Mo の有意な増加が確認され、その他の元素は有意な変化は確認されなかった。Gamel らは、Mg, P, K, Ca, Mn, Fe, Cu は 180°C, 10 s のホットプレートでの加熱による膨化時には損失を受けないと報告している[74]。また、Pedersen らは、200°C で 15-20 s の加熱では P, Ca, Fe, Cu, Zn の含量は損失を受けないと報告している[80]。本装置による膨化でもこれらの元素の損失は確認されなかった。

アマランスの種皮と外胚乳組織には Ca, P, K, と Mg が局在していることが報告されている[81]。本装置による膨化では、これらの元素の減少も確認されなかったため、種子の種皮と外胚乳組織が損失していないと考えられた。

Table 11 Effect of popping treatment on macroelements in amaranth seeds

Elements	Raw seeds (A)	Popped seeds (B)	Recovery (B/A) %	Reference <sup>a</sup>
Na	1.9 ± 0.4	2.2 ± 0.3	114	1
Mg	308 ± 4	331 ± 9 <sup>b</sup>	107	270
P	779 ± 36	1,022 ± 9 <sup>b</sup>	131	540
K <sup>c</sup>	632 ± 10	674 ± 16 <sup>b</sup>	107	600
Ca <sup>c</sup>	234 ± 6	243 ± 11	104	160

Data presented as mg/100 g on a dry weight basis of mean ± standard deviation ( $n = 3$ ).

<sup>a</sup> Referred from Standard Table of Food Composition in Japan 2010.

<sup>b</sup> Significant different from raw seeds ( $p < 0.05$ )

<sup>c</sup> Analysis was conducted with CCT (collision cell technology) mode

Table 12 Effect of popping treatment on microelements in amaranth seeds

Elements	Raw seeds (A)	Popped seeds (B)	Recovery (B/A) %	Reference <sup>a</sup>
Cr <sup>c</sup>	6.8 ± 1.2	13.3 ± 1.7 <sup>b</sup>	196	7
Mn	3,510 ± 41	3,780 ± 147 <sup>b</sup>	108	6,140
Fe <sup>c</sup>	10,700 ± 112	11,400 ± 84 <sup>b</sup>	107	9,400
Co	11.7 ± 0.1	15.7 ± 4.2 <sup>b</sup>	134	—
Ni <sup>c</sup>	30.4 ± 1.9	45.4 ± 3.4	149	—
Cu <sup>c</sup>	752 ± 28	807 ± 3 <sup>b</sup>	107	920
Zn	3,110 ± 44	3,380 ± 253	109	5,800
Se <sup>c</sup>	40.4 ± 3.0	39.1 ± 0.5	97	13
Mo	59.6 ± 8.2	69.2 ± 7.3 <sup>b</sup>	116	59

Data presented as µg/100 g on a dry weight basis of mean ± standard deviation ( $n = 3$ ).

<sup>a</sup> Referred from Standard Table of Food Composition in Japan 2010.

<sup>b</sup> Significant different from raw seeds ( $p < 0.05$ )

<sup>c</sup> Analysis was conducted with CCT (collision cell technology) mode

### 3. 水溶性ビタミン

Table 13 には、膨化前後の種子中のビタミン B 群の定量結果を示した。加工前の種子中のリボフラビンと葉酸は日本食品標準成分表に記載されている含量とほぼ同量の定量結果であった[33]。一方、ナイアシンとビオチンはそれぞれ 3.2 倍、1.5 倍高い定量値を示し、ビタミン B<sub>6</sub> とパントテン酸は 0.7 倍低い定量値を示した。日本食品標準成分表の記載値との差異は、加工した種子の品種の違いやアマランスの栽培条件の違いなどの要因が考えられる。曾根らは、緑黄色野菜中のビオチンの含量は栽培時の日照量によって変化することを報告しているため、今後は季節変動、栽培条件の違いを考慮する必要がある[82]。

膨化前後のビタミン B 群の濃度を比較すると、全てのビタミンで有意な含量の変化は確認されなかった。ビオチンは加熱時に損失はなく、その他の水溶性ビタミンと比較して最も安定であることが確認された。Gamel らは、ホットプレートで 180°C, 10 s 加熱した際に、アマランス種子中のアスコルビン酸、ナイアシン、ビタミン B<sub>6</sub> などの水溶性ビタミンが減少し、ナイアシンは加熱の影響を受けやすいことを報告している[74]。今回の評価では、260°C, 15 s で加熱した場合にもナイアシンの減少は 5%未満であった。本研究の種子膨化装置は、15 s 以内の短時間の加熱によって膨化が起こり、膨化後には速やかに加熱部分から回収されて冷却されるため、アマランス種子中のビオチンなどの水溶性ビタミンは加熱による影響を受けなかったと考える。

Table 13 Effects of popping treatment on B-group vitamin contents of amaranth seeds

Vitamins	Raw seeds (A)	Popped seeds (B)	Recovery (B/A) %	Reference <sup>a</sup>
Riboflavin	147 ± 9	140 ± 2	95	140
Niacin	3,230 ± 340	3,080 ± 230	95	1,000
Folate	152 ± 16	137 ± 8	90	130
B <sub>6</sub>	454 ± 47	408 ± 54	90	580
Biotin	24.8 ± 3.7	25.2 ± 2.9	102	16.3
Pantothenic acid	1,150 ± 60	991 ± 78	86	1,690

Data presented as µg/100 g on a dry weight basis of mean ± standard deviation ( $n = 3$ ).

<sup>a</sup> From the Standard Table of Food Composition in Japan 2010.

## 第4章 - 2 鶏卵中のビオチンの生体利用効率の評価

## 緒言

食品中のビオチンは、タンパク質中のアミノ酸のリジンと共有結合した形で存在するため、食品の調理の過程で、水へと遊離するビオチンは少ない。消化の過程で、まずタンパク質が分解を受け、ビオチンにペプチドの結合したビオチニルペプチドやリジンの結合したビオチンとなる。これらが最終的にビオチニダーゼによって加水分解され、遊離したビオチンが小腸から吸収される。これらの過程は食品や調理ごとに異なると考えられるが、個々の食品中のビオチンの生体利用効率の報告は少ない。

我々は大阪市でのトータルダイエツト法によって 13 食品群ごとのビオチンの摂取量を調査し、食品群の中では肉・卵類からの寄与が大きいことを確認した[26]。この食品群に含まれる食品の中で、鶏卵はビオチンの含量が高く、摂取頻度も多いため、主要なビオチンの供給源の一つであると考えられる。一方で、鶏卵には卵白中のアビジンと卵黄中の Biotin binding protein (BBP) I、BBP II のビオチン結合タンパクが存在することが報告されている[83, 84]。ビオチン結合タンパクの結合能は調理による加熱による熱変性によって減少することが報告されており[85]、調理法ごとに、鶏卵を含む食品中のビオチンの生体利用効率は大きく変化すると考えられる。近年、ミネラルやビタミンなどの栄養素の消化による利用効率の評価のために、人工消化液を利用した評価法が応用されている[86, 87]。本章では、鶏卵と鶏卵を含むモデル食品を一般的な調理法によって調理し、調理後の試料から人工消化液によって溶出するビオチンを評価した。

## 方法

### 1. 試薬

ビオチン標準品及び人工消化液による評価用の消化酵素の Pepsin, Pancreatin, Bile extracts は、Sigma-Aldrich より入手した。ビオチン定量に用いた培地は、日水製薬より入手した。その他の一般的な試薬は、和光純薬および関東化学の特級試薬を使用した。

### 2. 試料

#### 2.1. 認証標準物質

米国国立標準技術研究所 (National Institute of Standards and Technology, NIST) よりベビーフードをマトリクスとする認証標準物質 SRM 2383 (ビオチンの認証値  $\pm$  不確かさ:  $5.4 \pm 1.2 \mu\text{g}/100\text{g}$ ) を入手し、評価法の精度管理のために使用した。

#### 2.2. 調理用試料

調理用の食品は大阪市内の量販店で購入した。鶏卵は同一メーカーの白色レグホン種の M サイズのものを使用した。

## 2.3. 調理法

### 2.3.1. 鶏卵

生の鶏卵は、全卵、卵黄、卵白に分けて生体利用効率を評価した。次に全卵は卵の科学[88]に記載されている調理法を参考に調理した。それぞれの調理条件は次のように設定した。

### 2.3.2. ゆで卵

調理鍋に鶏卵と水を入れて加熱し、沸騰後 2 min、4 min、6 min あるいは 8 min 加熱した。

### 2.3.3. 温泉卵

70°C に設定した水浴に鶏卵を入れ、15 min、20 min あるいは 25 min 加熱した。

### 2.3.4. ポーチドエッグ

調理鍋に水、食塩、食酢を加え加熱し、沸騰後に鶏卵を入れ、卵黄が卵白に包まれたのを確認後に火を止め、蓋をして 2 min 加熱した。

### 2.3.5. 目玉焼き

食用油を入れて熱した調理鍋に鶏卵を入れ、卵白の凝固が確認されたら水を少量入れて蓋をして、卵黄の凝固が確認されるまで加熱した。

### 2.3.6. スクランブルエッグ

食塩を加えた全卵を攪拌した後、食用油を入れて加熱した調理鍋に入れ、鶏卵が流動性のある半熟状態になるまで攪拌しながら加熱した。

### 2.3.7. 卵焼き

食塩を加えた全卵を攪拌した後、食用油を入れて加熱した調理鍋に入れ、卵液を攪拌しながら流動性のある半熟状態で巻き上げながら加熱した。

### 2.3.8. 鶏卵を含むモデル加工食品

鶏卵を含む加工食品として、ハンバーグをモデルとする加工食品を調製して評価した。牛豚合挽き肉 250 g、タマネギ 150 g、パン粉 40 g、牛乳 40 g、鶏卵 50 g、塩 5 g、コショウ 5 g の割合でボールの中で均一に混合した後、50 g ずつ小分けにし、直径 5 cm の小判状に成形したものを調理用試料とした。モデル加工食品は、鶏卵として全卵あるいは卵黄の 2 種類のモデルを調製した。モデル加工食品はそれぞれ下記の条件によって

調理を行った。

ゆでサンプル：沸騰した水浴で 10 min 加熱。

揚げサンプル：180°C の食用油で 4 min 加熱。

オーブンサンプル：200°C に加熱したオーブンで 10 min 加熱。

蒸しサンプル：100°C に加熱した蒸し器で 7 min 加熱。

焼きサンプル：食用油を入れて熱した調理鍋で 2 min 加熱。

### 3. 分析法

#### 3.1. 分析試料の均一化

調理後の試料はミルサー（岩谷産業，800DG）により攪拌し、均一化した。試料だけでは均一化が困難だった食品には、等重量の蒸留水を加えて攪拌した。試料は冷蔵で保存し、調製後 7 日以内に抽出した。各試料からの総ビオチン、遊離ビオチン、溶出ビオチンは 2 点併行で抽出した。

#### 3.2. 総ビオチンの抽出

試料 1 g を 50 mL 遠沈管に採取し、2.25 mol/L 硫酸 10 mL を加え、高压滅菌器（平山製作所，HA-240MIV）により 121°C, 1 h の条件で加水分解した。室温まで冷却した試料溶液を 4.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 7.0 ± 1.0 に調整後に蒸留水で 50 mL

に定容した。定容後の抽出液をシリンジフィルター（Sartorius, ミニザルトプラス, 孔径:0.22  $\mu\text{m}$ ）によって、ろ過除菌したものを試料溶液とした[26]。

### 3.3. 水に遊離するビオチン（遊離ビオチン）の抽出

試料 1 g を 50 mL ねじ付遠沈管に採取し、pH 7.0 のリン酸緩衝液 20 mL を加え、pH  $7.0 \pm 1.0$  に調整後に蒸留水で 50 mL に定容した。定容後の抽出液をシリンジフィルターによって、ろ過除菌したものを試料溶液とした。

### 3.4. 人工消化液に可溶化するビオチン（溶出ビオチン）の抽出

溶出ビオチンの抽出は Garret らの方法によって行った[86]。試料 1 g を 50 mL 容量のねじ付遠沈管に採取し、蒸留水 20 mL を加え、1 mol/L 塩酸で pH  $2.0 \pm 0.5$  に調整後、豚由来の Pepsin を含む人工胃液を加えた。振とうウォーターバス（SHIBATA, WS240）によって 37°C, 1 h 消化した。人工胃液による消化後、1 mol/L 炭酸ナトリウム溶液で pH  $7.5 \pm 0.5$  に調整し、豚由来の pancreatin と Bile extract を含む人工腸液を加え、37°C の水浴中で 2 h 消化した。消化後に蒸留水で 50 mL に定容後に、シリンジフィルターによってろ過除菌をしたものを試料溶液とした。試料の抽出と併行して、試料を含まない試薬ブランクを抽出し、人工消化液中の試薬由来のビオチン量を定量した。

### 3.5. ビオチンの定量法

試料溶液中のビオチン量は、乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* ATCC8014) によるマイクロプレートを用いた微生物学的定量法で測定した[43]。ビオチン標準溶液と試料溶液を2点併行で段階希釈したものに、乳酸菌を接種したビオチン定量用培地 (pH 7.1) を加え、嫌気性培養装置 (Don Whitley Scientific, MACS) によって、CO<sub>2</sub>濃度 10%, 37°C, 17~19 h 培養した。培養終了後のマイクロプレートの各 well を8連マイクロピペットによって混和後、マイクロプレートリーダー (Thermo scientific, Multiskan FC) により 600 nm の吸光度を測定した。ビオチン標準品の対数濃度に対して培養後の乳酸菌の吸光度をプロットし、4 parameter logistic 解析によって作成した検量線を用いて、試料溶液中のビオチンを定量した。定量結果は2点の試料溶液を2点併行測定で求めた試料 100 g あたりの平均値と標準偏差を示した。

#### 4. 生体利用効率の定義

摂取した食品中の総ビオチンの中で、人工消化液に可溶化するビオチンを生体内で利用できるビオチンの最大量として生体利用効率を定義した。それぞれの試料の総ビオチン、遊離ビオチン、溶出ビオチンの定量結果の平均値から、下記の式 (15)、(16) によって総ビオチンに対する相対量として評価した。

$$F = \frac{B_{free}}{B_{total}} (\%) \quad (\text{式 15})$$

$F$ : 遊離率,  $B_{free}$ : 水へ遊離する試料中のビオチン,  $B_{total}$ : 試料中の総ビオチン

$$B = \frac{B_{digestion} - B_{blank}}{B_{total}} (\%) \quad (\text{式 16})$$

$B$ : 溶出率,  $B_{total}$ : 試料中の総ビオチン,  $B_{digestion}$ : 試料から消化液に可溶化するビオチン,  $B_{blank}$ : 人工消化液中のビオチン

## 5. 人工消化液による評価法の精度管理

人工消化液による評価法の精度管理のために、試料を含まない試薬ブランクと認証標準物質を2抽出し、2併行で測定した。この操作を5日間の繰り返しして求めた分析結果は、2元配置の分散分析によって統計評価した。試薬ブランクの繰り返し分析時のビオチン濃度の標準偏差の3倍を本評価法の検出限界として求めた。認証標準物質の繰り返し分析の結果から室内再現精度を求め、平均値は認証標準物質中のビオチン量の認証値に対する回収率を式(17)によって求めた。

$$R = \frac{M_{SRM}}{C_{SRM}} (\%) \quad (\text{式 17})$$

$R$ : 回収率,  $M_{SRM}$ : 認証標準物質の繰り返し分析のビオチンの平均濃度,  $C_{SRM}$ : 認証標準物質の認証値

## 結果と考察

### 1. 人工消化液中の乳酸菌生育阻害因子の除去

人工消化液の試薬ブランク溶液中の溶出ビオチンを定量したところ、乳酸菌の生育阻害が確認された。人工胃液中の pepsin は定量時に使用した培地の pH 7.1 では活性を失うため、人工腸液を調製した pancreatin に含まれる trypsin などの消化酵素によって、乳酸菌は生育阻害を受けていると考えられた。このため、試料溶液は遠心式限外ろ過膜 (Sartorius, Vivaspin 6-5K) によって、分子量 5000 以上の画分をろ過後に定量したところ、限外ろ過膜を透過した画分では生育阻害が確認されなかった。人工消化液を利用した評価系では、微生物学的定量法では生育阻害への影響があるため、限外ろ過などの方法で阻害物質を除去する必要がある。

### 2. 人工消化液による評価法の精度管理

鶏卵での評価に先立ち、認証標準物質の繰り返し分析によって、人工消化液による評価法の精度管理を行った。認証標準物質の分析結果の平均値と室内再現精度は  $5.1 \pm 0.7$   $\mu\text{g}/100\text{g}$  であり、標準物質の認証値に対する回収率は  $97 \pm 13\%$  であり良好な結果を示した。過去の人工消化液による評価の室内再現精度は、母乳と幼児用食品中のミネラルについての報告があり、相対標準偏差としてカルシウムで 6.6%、鉄で 19.5%、亜鉛で 13.6% と報告されている [87]。今回のビオチンの評価法の室内再現精度は相対標準偏差

として 13.7 %であり、過去のミネラルの報告と同等の室内再現精度であった。試薬ブランク中のビオチン濃度の標準偏差から求めた評価法の検出限界は 0.1  $\mu\text{g}/100\text{g}$  であった。

### 3. 生の鶏卵中のビオチンの生体利用効率

生の鶏卵中のビオチン含量を Table 14 に示す。一般的に流通する平均的な M サイズの鶏卵の重量を 60 g、卵殻:卵白:卵黄の重量比を 1:6:3 として、各部位の 100 g あたりの総ビオチン濃度から鶏卵一個あたりのビオチンを計算すると、ビオチンは卵黄中に局在していることが確認された。Table 14 に示すように、鶏卵中では総ビオチンは卵黄中に局在していることが確認された。鶏卵中のビオチン含量は、谷口らが 3 製造元の鶏卵の平均値から、全卵 22.1  $\mu\text{g}/100\text{g}$ 、卵黄 63.9  $\mu\text{g}/100\text{g}$ 、卵白 5.0  $\mu\text{g}/100\text{g}$  と報告している[57]。鶏卵中の全卵と卵白の総ビオチン含量は、谷口らの報告とほぼ一致した。また卵黄の総ビオチン含量は 50-80  $\mu\text{g}/100\text{g}$  と、製造元ごとの差異が大きいことが報告されている[24]。卵黄中のビオチン含量  $83.1 \pm 6.7 \mu\text{g}/100\text{g}$  は、谷口らの白色レグホン種の結果 79.7  $\mu\text{g}/100\text{g}$  とほぼ一致した。

Table 14 Concentrations and bioaccessibility of biotin in raw eggs

Parts	Total biotin		<i>F</i> * <sup>1</sup>	<i>B</i> * <sup>2</sup>
	µg/100g	(µg/egg)	(%)	(%)
Whole egg	28.6 ± 1.7	(15.4 ± 0.9)	ND	ND
Egg yolk	83.1 ± 6.7	(14.9 ± 1.2)	13 ± 2	23 ± 3
Egg white	7.1 ± 0.3	(2.6 ± 0.1)	ND	ND

ND: not detected, <0.1µg/100g

\*<sup>1</sup> *F*: Free biotin

\*<sup>2</sup> *B*: Bioaccessible biotin

Values are means ± standard deviation (*n* = 2).

生の全卵と卵白では、ビオチンの水への遊離と消化液への可溶化は確認されず、卵黄では遊離率は  $13 \pm 2\%$ 、溶出率は  $23 \pm 3\%$ であった。谷口らは卵黄中のビオチンの遊離率を  $71.1\%$ と報告している[24]。また、排卵後の卵黄中のビオチンの遊離率を  $90.7 \pm 11.8\%$ と報告している[89]。評価を行った鶏卵は、谷口らの報告と比較すると遊離率が低いことが確認された。Table14の結果から、分析した鶏卵のビオチンは卵黄から卵白への拡散していない。卵黄中のビオチン結合タンパクの結合能は、鶏卵の保存中には25日までは変化しないことが報告されている[90]。親鶏を飼育する飼料中のビオチン量によって、卵黄中のビオチン結合タンパクである BBPI と BBP II の発現量は変化することが報告されている[83]。このため、親鶏を飼育した飼料中のビオチン量によって、卵黄中のビオチン結合タンパクの発現量が変化し、卵黄中の遊離率の差異が生じたと考えられる。本研究で使用した鶏卵は、製造元の飼料中のビオチン量の情報がないため、ビオチン結合タンパクの発現量による卵黄中のビオチンの遊離率の変化については今後検討する必要がある。

#### 4. 鶏卵の調理法ごとの生体利用効率

鶏卵の調理法ごとの遊離率と溶出率を Fig. 7 に示す。調理後の試料の総ビオチン濃度の平均値は  $22.8 \pm 3.3 \mu\text{g}/100\text{g}$  であった。加工前の全卵の総ビオチン濃度  $28.6 \pm 1.7 \mu\text{g}/100\text{g}$  と比較すると、調理後のビオチンの残存率は  $80 \pm 12\%$ であり、調理による総

ビオチンの損失は少ないことが確認された

Fig. 7 に示すように、調理前に卵黄と卵白を攪拌する加工法であるスクランブルエッグと卵焼きでは遊離ビオチンと溶出ビオチンは確認されなかった。一方、卵黄と卵白が分離された状態で調理される調理法では、調理法の違いによって遊離率と溶出率は大きく異なっていた。このことから、調理前の鶏卵の攪拌によって、加熱前にビオチンがビオチン結合タンパクと結合した場合には、胃酸による酸変性や消化酵素による分解ではビオチンは消化液に可溶化しないことが確認された。

卵黄と卵白が分離された状態で加熱される調理の中でも、卵白が凝固していない温泉卵と卵黄が凝固していないポーチドエッグでは遊離率と溶出率が低いことが確認された。卵白と卵黄がいずれも凝固が確認された目玉焼きとゆで卵では遊離率と溶出率が高く、最も溶出率が高かったゆで卵の遊離率は  $33 \pm 1\%$ 、溶出率は  $46 \pm 7\%$  であった。

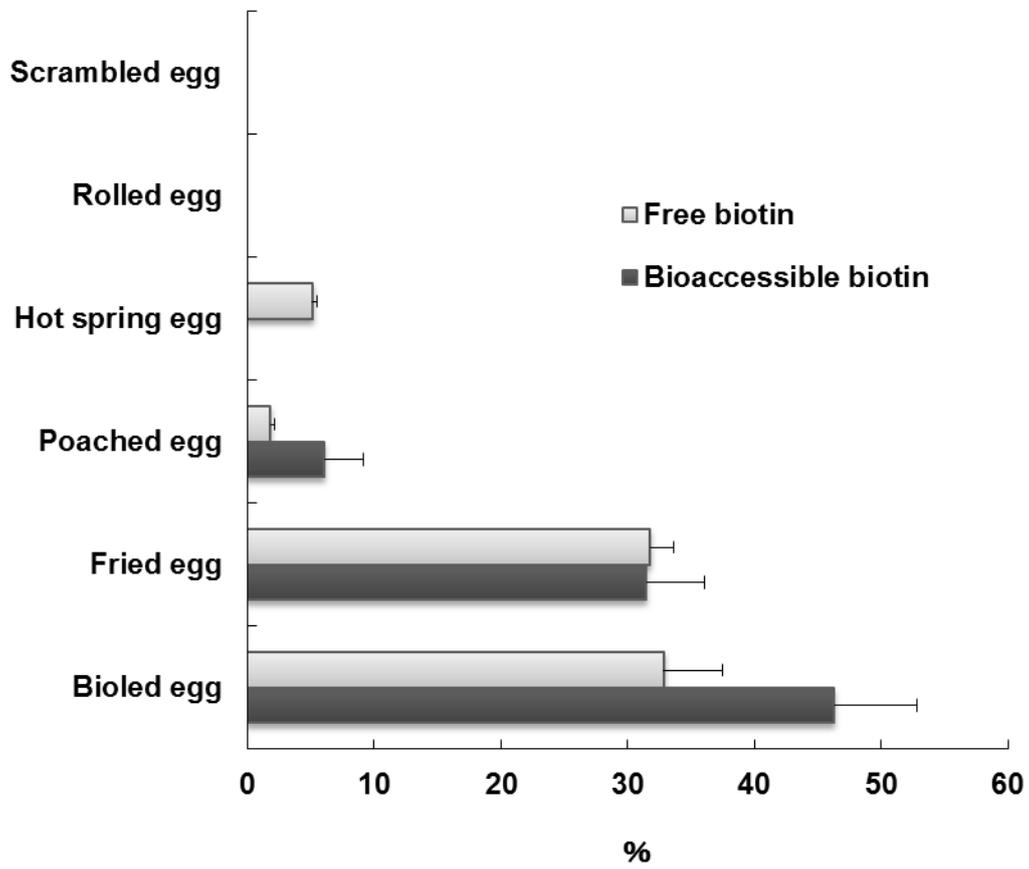


Fig. 7 Bioaccessibility of biotin in cooked eggs

## 5. 鶏卵の加熱時間ごとの生体利用効率

鶏卵の調理法の違いによって、水への遊離率と消化液への溶出率が大きく異なることが確認されたため、ゆで卵と温泉卵の加熱時間ごとのビオチンの遊離率と溶出率を比較した。Fig. 8 の写真に示すように、温泉卵は 70°C の加熱では加熱後 25 分後にも卵白の凝固は確認されず、卵黄は加熱時間の経過にともなって凝固が確認された。温泉卵ではわずかに遊離ビオチンが確認されたが、溶出ビオチンは確認されなかった。Fig. 9 の写真に示すように、ゆで卵は沸騰後 2 分後には卵白の凝固が確認されたが、卵黄の凝固は確認されなかった。ゆで卵では加熱時間の経過にともなって卵黄の凝固が確認され、遊離率と溶出率の増加が確認された。

Fig. 8 に示す温泉卵では遊離ビオチンのみが確認され、溶出ビオチンは確認されなかった。人工消化液による溶出ビオチンの評価法では、試薬由来のビオチン濃度に変動があり、検出限界が遊離ビオチンと比較して高くなるため、検出限界付近の濃度では遊離ビオチンのみが検出されたと考える。

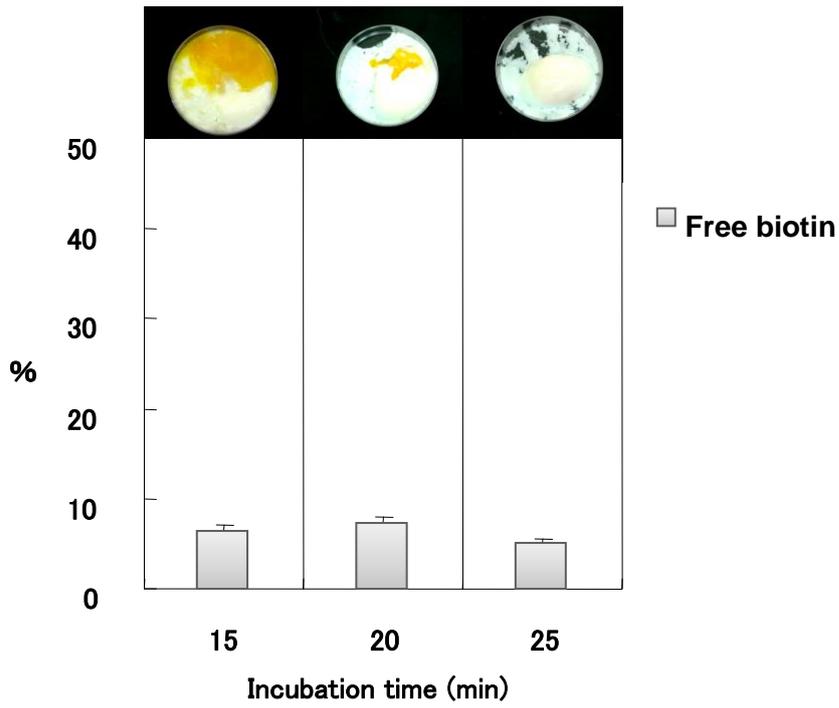


Fig. 8 Bioaccessibility of biotin in hot spring eggs

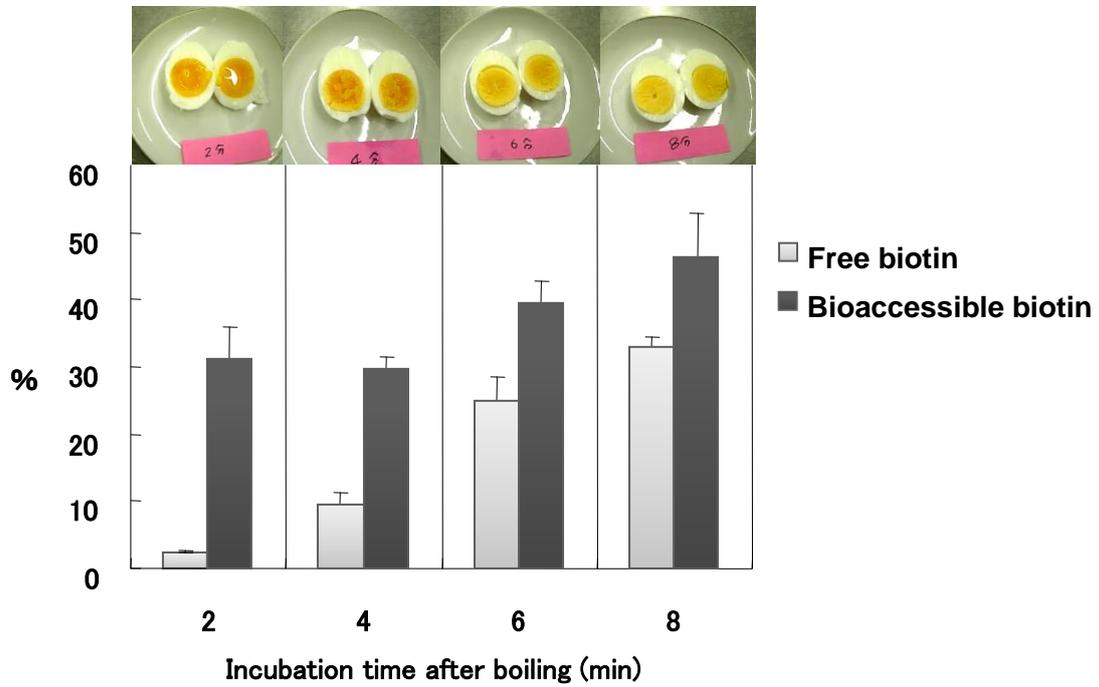


Fig. 9 Bioaccessibility of biotin in boiled eggs

遊離率と溶出率が高いのは、卵黄と卵白が分離された状態で加熱され、卵白と卵黄の凝固が確認されたゆで卵と目玉焼きの調理法であった。ゆで卵は沸騰 2 分後には卵黄の凝固は確認されていない (Fig. 9)。卵黄中のビオチン結合タンパクの変性温度は、BBP I が 65°C、BBP II が 45°C と報告されている [83, 84]。このため、ゆで卵では卵黄中のビオチン結合タンパクの熱変性にともなって、水に遊離するビオチン量が増加したと考える。沸騰 2 分後のゆで卵では卵白の凝固は確認されているが、Durance による 100°C の沸騰浴で 4 分以上加熱した時にアビジンは結合能を失うという報告 [85] から、アビジンは結合能を失ってはいないと推定される。このため、溶出率は沸騰 4 分後までは変化せず、アビジンの熱変性にともなって増加したと考える。以上のことから、卵黄と卵白が分離した状態で調理される調理法では、100°C 以上の加熱によって卵白中のアビジンが十分に熱変性し、結合能を失うことがビオチンの消化液への可溶化に必要であると考えられる。

## 6. モデル加工食品の生体利用効率

ハンバーグをモデルとした加工食品を調製し、鶏卵として卵黄と全卵を使用した時のビオチンの生体利用効率を比較した。モデル加工食品の結果を Fig. 10 に示す。

全卵モデル加工食品の調理前の総ビオチン濃度は  $5.9 \pm 0.4 \mu\text{g}/100\text{g}$  であった。調理前には遊離ビオチン、溶出ビオチンは確認されなかった。調理後の総ビオチンの濃度は  $5.1 \pm 0.7 \mu\text{g}/100\text{g}$  であり、調理前の試料の総ビオチン濃度に対する残存率は  $86 \pm 12\%$  であった。遊離ビオチンはいずれの調理法でも確認されなかった。溶出ビオチンは揚げ、焼き、オーブンなどの表面から加熱する調理法と比較して、ゆで、蒸しなどのモデル食品の内部まで加熱される調理法での溶出率が高いことが確認された。

卵黄モデル加工食品の調理前の総ビオチン濃度は  $9.9 \pm 1.0 \mu\text{g}/100\text{g}$  であった。調理後の総ビオチンの濃度は  $8.5 \pm 0.9 \mu\text{g}/100\text{g}$  であり、調理前の試料の総ビオチン量に対する残存率は  $86 \pm 9\%$  であった。卵黄モデルでは調理前にも遊離ビオチンと溶出ビオチンが確認され、遊離率は  $13 \pm 1\%$ 、溶出率は  $32 \pm 9\%$  であった。調理法の違いによって溶出率は異なり、オーブンで加熱した時の溶出率が最も高いことが確認された。

モデル加工食品の加熱前の両モデルを比較すると、卵黄モデルでのみ遊離ビオチン、溶出ビオチンが確認された (Fig. 10)。

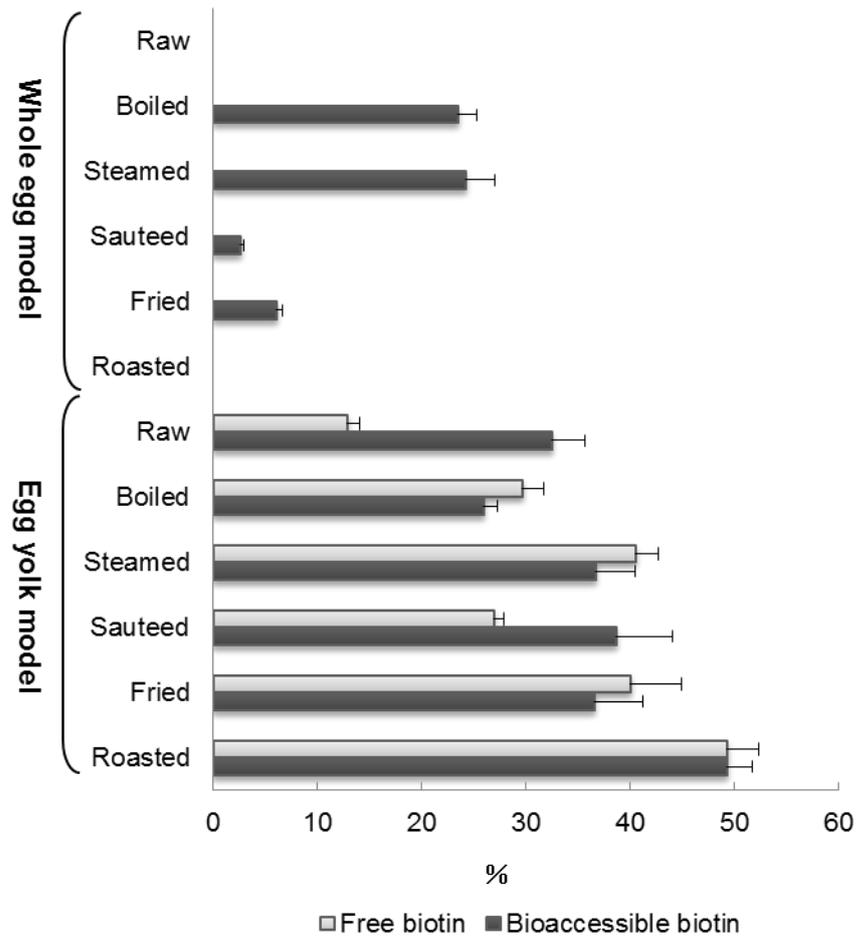


Fig. 10 Bioaccessibility of biotin in various food models

このため、加熱前の全卵モデル中のアビジンは、鶏卵以外の食品中のビオチンにも結合し、ビオチンの水への遊離と消化液への可溶化を妨げていると考えられた。このことは、アビジンを添加した飼料の摂取したハムスターでは母体のビオチンが欠乏し、催奇形性が増加するという報告[20]とも一致する。また、人での生卵の大量摂取によるビオチンの欠乏症が卵白障害として報告されている[91]。

加熱後の全卵モデル加工食品は焼き、揚げ、オーブンなどの表面から加熱する調理法と比較して、ゆでる、蒸すなどの内部まで加熱される調理法によって溶出率の増加が確認された。加熱によって全卵モデル食品中のアビジンが十分に熱変性した時に、消化液への可溶化するビオチン量が増加すると考えられた。

加熱前の卵黄モデルでは、遊離率と比較して溶出率が高かった。水へは遊離しなかった卵黄中のビオチンが胃酸による酸変性や消化酵素による分解によって消化液には可溶化したと考える。この結果は、Table 14 の生の卵黄や Fig. 9 の沸騰 2 分後のゆで卵で遊離率と比較して溶出率が高かった結果とも一致する。

加熱後の卵黄モデルでは、ゆでる、蒸すなどの調理法と比較して、焼き、揚げ、オーブンなどの表面から加熱する調理法によって溶出率の増加が確認された。卵黄モデルでの調理後の遊離率と溶出率の増加は、調理による卵黄中のビオチン結合タンパクの熱変性によるものと考えられた。

全卵モデルと卵黄モデルでは、消化液に可溶化するビオチン量が増加する調理法は異

なっていた。モデル食品ごとの調理時の食品中の温度変化の違いによって、ビオチン結合タンパクの熱変性が異なり、溶出率が変化したと考えられる。しかし、加熱時の食品の中心温度などの温度変化を比較できていないため、さらなる検討が必要である。

本研究では、卵白中のアビジンと卵黄中の BBP I、BBP II などの熱変性を鶏卵の卵白と卵黄の凝固によって確認した。今後の研究では、調理法ごとの熱変性によるビオチン結合タンパクの結合能の変化と消化液へ可溶化するビオチン量を比較することによって、調理法の違いによるビオチンの生体利用効率の変化を解析することができると考える。

ビオチンの人での利用効率は、パンを主食とした食事時のビオチン濃度と尿中のビオチンの排泄量から、ビオチンの相対利用率が 85%であることが、福渡らによって報告されている[92]。この研究では、1 日間の食事時のビオチンの摂取量と尿中のビオチン量の比較からビオチンの人での利用効率の検討が行われている。しかしながら、人での試験を実施することは多大な費用が必要であるため、個々の食品の調理法ごとに評価を行うことは現実的ではない。本論文で検討した人工消化液での評価法では、個々の食品の調理法ごとに生体での利用効率を評価することができる。このため、今後は本評価法をビオチンの摂取に寄与率の高い食品へ応用することによって、調理法ごとのビオチンの生体利用効率の情報を蓄積することができると考える。

## 総括

従来、ビオチンは日常の食生活では欠乏症が起こりにくいビタミンと考えられてきたため、食品中の含量などを検討した報告は限られている。また、日本食品標準成分表 2010[33]に、代表的な食品のビオチン含量が記載されるまでは、日本人を対象とした食事記録法によるビオチンの摂取量調査も困難な状況であった。このため、ビオチンの摂取状況に関する報告は少なく、調査ごとに推定摂取量の差異も大きいことが課題となっている。このような背景から、本研究は、わが国における信頼性の高いビオチン摂取状況を追究することを第一の目的とした。また、国民の健康の保持・増進と生活習慣病の予防を目的として 5 年ごとに厚生労働省が改定している日本人の食事摂取基準に対し、適切な策定根拠を与えることを第二の目的とした。さらに、ビオチンの効率的な摂取を考慮するうえで必要な調理に伴う関連要因についても検討を行った。

第 2 章では、集団における平均的な摂取量の推定法であるトータルダイエツト調査法を応用し、大阪市民のビオチンの摂取量の推定に関する調査を行った。その際、ビオチンの分析法の妥当性を検証し、調査に用いた分析法は日間再現精度、併行再現性、真度について良好な結果を示した。本調査の分析法に起因する信頼区間を求めたところ、大阪市における 1 人 1 日当たりの推定摂取量は 70.1 (95%信頼区間: 58.9-81.3)  $\mu\text{g}$  であった。食品群の中では卵類や肉類の摂取による寄与率が高かった。この調査結果は、厚生労働省による日本人の食事摂取基準 (2010 年版) の改定の際に参考資料として採用され、成人における目安量は本調査を含めた 3 地域の摂取量 [23, 25, 26, 28]をもとに、

50 µg/d に改定された[12]。本研究では摂取量の平均値だけでなく、分析に起因する信頼区間を示すことができたため、食事摂取基準（2010年版）の改定の際に信頼性の高い策定根拠を提供できたと考える。その後の食事摂取基準（2015年版）の改定時には、食事調査法による特定の集団を対象としたビオチンの摂取量の情報が策定根拠として考慮された。しかし、日本食品標準成分表 2010 に記載されたビオチン含量の食品数が限られているため、引き続きトータルダイエツト法による摂取量を策定根拠とした目安量 50 µg/d が採用された[93]。

第 3 章では、日本におけるビオチンの摂取量の過不足を評価するために、ビオチンの摂取量の分布の推定を行った。確率論的な推定法の一つであるモンテカルロ法を摂取量の分布の推定に応用し、2 種類のモデルを構築した。一つ目のモデルは、我々が 2007 年から 2009 年に実施したトータルダイエツト調査法による食品群ごとのビオチン濃度を用いて推定を行ったものであり、ビオチンの 1 日当たりの推定摂取量の分布は 64.2 (95%信頼区間: 40.1-108.2) µg と推定された。2 つ目のモデルは、わが国や諸外国において報告されている個々の食品中のビオチン濃度を食品群ごとに分類して推定を行った。各食品群から外れ値を予め除去して推定を試みたところ、ビオチンの 1 日当たりの摂取量の分布は 65.3 (95%信頼区間: 34.4-107.6) µg と推定された。両モデルから推定したビオチンの摂取量の分布はほぼ一致し、80%以上の人が目安量 50 µg/d 以上のビオチンを摂取していると推定された。しかしながら、モデルごとにビオチンの摂取量に

寄与している食品群が異なっていたため、より精度の高い摂取量の分布の推定を行うためには、それぞれのモデルごとに課題が見出された。第1のトータルダイエツト法による推定モデルの精度を向上するためには、食品の季節変動や地域差などを考慮して、調査試料を調製する必要がある。しかしながら、現時点では東京都、大阪府、兵庫県の3地域のみでトータルダイエツト法による調査が行われており[23, 25-29]、ビオチンの摂取量の季節変動と地域差を議論するためには、さらに多くの地域での調査結果を蓄積する必要がある。

第2の個々の食品からの推定モデルの精度を向上するためには、食品群ごとの分類を細分化する必要がある。2010年に日本食品標準成分表にビオチン含量が収載されたが、食品数が限られている[33]。さらに、調理済みの食品中のビオチン含量はさらに限られた食品のみであるため、妥当性の高い摂取量の推定には食品の調理による損失の影響を評価する必要がある。

そこで、第4章では、食品加工・調理によるビオチンの利用効率について検討を行った。まず、第4章・1では、加熱による食品中のビオチン含量への影響を評価した。アマランス種子をモデルとして、膨化時の加熱による損失の影響を評価した結果、260°Cの高温でも15秒までの短時間の加熱の場合には、ビオチンの損失がないことが確認された。さらに、高温での加熱の場合にも加熱時間を短時間に制御することによって、熱に不安定なビタミンのナイアシン、ビタミン B<sub>6</sub>についても加熱による損失を最小限に

抑えることが可能であることが確認されたため、今後はアマランス種子以外の食品の加工への応用が期待される。

第4章-2では、ビオチンの効率的な摂取方法を考察するために、ビオチンの摂取量への寄与が高い鶏卵を対象として、各種調理法によるビオチンの消化液による溶出率を評価した。鶏卵と鶏卵を含むモデル食品を一般的な調理法によって調理し、調理後の試料から人工消化液によって溶出するビオチンを生体利用可能なビオチンの最大量として評価した。その結果、調理法ごとにビオチンの消化液への溶出率は大きく異なり、特に加熱調理前に鶏卵を混合する調理法では消化液の溶出率が低いことが確認された。加熱調理前に鶏卵を混合した場合には、ビオチンは卵白中のアビジンや卵黄中のBBP I、BBP IIなどのビオチン結合タンパク質と強固に結合するため、消化の過程で分解されず、ビオチンは吸収できないと推定された。このため、ビオチンを効率的に摂取するためには、鶏卵を混合する前に加熱することによって、卵白中のアビジンなどのビオチン結合タンパクを変性する必要がある。

人を対象に食品ごとの生体利用効率の評価を実施することは多額の費用が必要となり、倫理的な点から困難な場合もある。本研究で検討した人工消化液による評価法は、人での評価が困難な場合にも、調理法ごとに食品の消化を含めた生体利用効率についての知見を蓄積できるため、今後はビオチンの寄与率の高い食品への応用が期待される。

日本人のビオチンの摂取量の推定のための科学的根拠は、この10年間に多くの調査

が実施され、大きく進展した。日本食品標準成分表 2010 へのビオチンの収載によって、特定の集団を対象として摂取量の調査を行える状況が整備されたこともその一因である[33]。Shibata らは、ビオチンなどの水溶性ビタミンの摂取量の調査時に血中や尿中のビタミン量などの生体内指標を評価し、食品からの摂取量に比例して、ビオチンの尿中の排泄量が増加することを報告している[32,53]。このように特定の集団での摂取量の調査と併行して、生体内での充足や欠乏を示す指標を比較することは、日本人の食事摂取基準の改定の際の信頼性の高い策定根拠を蓄積することに繋がる。継続した調査によって、より信頼性の高いビオチンの食事摂取基準が策定されることが今後の研究では期待される。

## 謝辞

本論文作成にあたり、ご指導いただきました大阪市立大学大学院生活科学研究科 由田克士先生、佐伯茂先生、増田俊哉先生、畿央大学健康科学部健康栄養学科 小西洋太郎先生に心より感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、ご協力いただきました共著研究者の大阪市立環境科学研究所 山野哲夫様、中間昭彦様、森義明様、油谷藍子様、滋賀県立大学環境科学部生物資源管理学科 高倉耕一先生、大阪市立大学工学研究科 伊與田浩志先生、畿央大学健康科学部健康栄養科学科 小西洋太郎先生に感謝いたします。

最後に、日常の業務の中でご指導・ご協力を戴いた大阪市立環境科学研究所調査研究課の皆さまに感謝いたします。

## 参考文献

- [1] Zempleni J, Mock DM (1999) Biotin biochemistry and human requirements. *J Nutr Biochem* **10**, 128–138.
- [2] Zhang H, Osada K, Sone H, Furukawa Y (1997) Biotin administration improves the impaired glucose Tolerance of streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **43**, 271-280.
- [3] Sugita Y, Shirakawa H, Sugimoto R, Furukawa Y, Komai M (2008) Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **72** , 1290–1298.
- [4] Zhang H, Osada K, Maebashi M , Ito M, Komai M, Furukawa Y (1996) A high biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **42**, 517-526.
- [5] Maebashi M, Makino Y, Furukawa Y, Ohinata K, Kimura S, Sato T (1993) Therapeutic evaluation of the effect of biotin on hyperglycemia in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr* **14**, 211-218.

- [6] Báez-Saldaña A, Zendejas-Ruiz I, Revilla-Monsalve C, Islas-Andrade S, Cárdenas A, Rojas-Ochoa A, Vilches A, Fernandez-Mejia C (2004) Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. *Am.J Clin Nutr* **79**, 238–43.
- [7] Kothapalli N, Camporeale G, Kueh A, Chew YC, Oommen AM, Griffin JB, Zemleni J (2005) Biological functions of biotinylated histones. *J Nutr Biochem* **16**, 446–448.
- [8] Camporeale G, Giordano E, Rendina R, Zemleni J, Eissenberg JC (2006) *Drosophila melanogaster* holocarboxylase synthetase is a chromosomal protein required for normal histone biotinylation, gene transcription patterns, lifespan, and heat tolerance. *J Nutr* **136**, 2735–2742
- [9] Mock NI, Malik MI, Stumbo PJ, Bishop WP, 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 deficiency. *Am J Clin Nutr* **65**, 951–958.
- [10] 鈴木洋一, 坂本修, 真下陽一, 羽田明 (2012) 栄養性ビオチン欠乏症と先天性ビオチン代謝異常症の疫学. *ビタミン* **86**, 499-507

- [11] Sakurai T, Furukawa M, Asoh M, Kanno T, Kojima T, Yonekubo A (2005) Fat-soluble and water-soluble vitamin contents of breast milk from Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **51**, 239-247.
- [12] 安齋正郷 (2010) 日本人の食事摂取基準 (2010 年版). 第一出版, 東京
- [13] 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
- [14] 湯浅正洋, 松本希美, 渡邊敏明 (2012) わが国の特殊調製粉乳による乳幼児におけるビオチン欠乏症の特徴. ビタミン **86**, 678-684
- [15] 野崎章仁, 湯浅正洋, 沈婉媿, 渡邊敏明 (2015) 本邦における特殊ミルクによる二次性ビオチン欠乏症. ビタミン **89**, 119-124
- [16] 渡邊敏明 (2010) 胎児発育におけるビオチンの役割についての研究. ビタミン **84**, 301-312
- [17] Brewer LE, Edwards HM (1972) Studies on the biotin requirement of broiler breeders. *Poult Sci* **51**, 619-624
- [18] Mock DM (2005) Marginal biotin deficiency is teratogenic in mice and perhaps humans: a review of biotin deficiency during human pregnancy and effects of biotin deficiency on gene expression and enzyme activities in mouse dam and fetus. *J Nutr Biochem* **16**, 435-437

- [19] Zemleni, J, Mock DM (2000) Marginal biotin deficiency is teratogenic. *Proc Soc Exp Biol Med* **223**, 14–21
- [20] Watanabe T (1993) Dietary biotin deficiency affects reproductive function and prenatal development in hamsters. *J Nutr* **123**, 2101-2108
- [21] Mock DM, Quirk JG, Mock NI (2002) Marginal biotin deficiency during normal pregnancy. *Am J Clin Nutr* **75**, 295–299
- [22] 渡邊敏明, 大串美沙, 福井徹 (2004) わが国の実年者におけるビオチンの体内動態についての検討. *生物試料分析* **27**, 403-408.
- [23] 齋東由紀, 牛尾房雄 (2004) トータルダイエツト調査による東京都民のビオチン, ビタミン B<sub>6</sub>, ナイアシンの一日摂取量の推定. *栄養学雑誌* **62**, 165-9.
- [24] 谷口歩美, 大串美沙, 武智隆祐, 渡邊敏明 (2005) わが国の食品中のビオチン量の分析. *日本栄養・食糧学会誌* **58**, 185-198
- [25] 渡邊敏明, 谷口歩美 (2006) トータルダイエツト調査によるビオチン摂取量の推定についての検討. *日本臨床栄養学会雑誌* **27**, 304-12.
- [26] Murakami T, Yamano T, Nakama A, Mori Y (2008) Estimation of the dietary intake of biotin and its measurement uncertainty using total diet samples in Osaka, Japan. *JAOAC Int* **91**, 1402-1408
- [27] Murakami T, Takakura K, Yamano T (2010) Evaluation of probabilistic

distribution of dietary biotin intake in Japan using Monte Carlo simulation.

*J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **56**, 449-454

[28] 渡邊敏明, 谷口歩美 (2009) 日本における食事からのビオチン摂取量の推定. *ビタミン* **83**, 461-468

[29] Watanabe T, Suemura K, Taniguchi A, Ebara S, Kimura S, Fukui T (2010) Dietary intake of seven B vitamins based on a total diet study in Japan. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **56**, 279-86

[30] 溝畑秀隆, 伊藤梨紗, 渡邊敏明, 亀田隆 (2010) 妊娠期におけるビオチン摂取量. *微量栄養素研究* **27**, 81-83

[31] Imaeda N, Kuriki K., Fujiwara N, Goto C, Takeda Y, Tokudome S (2013) Usual Dietary intakes of selected trace elements (Zn, Cu, Mn, I, Se, Cr, and Mo) and biotin revealed by a survey of four-season 7-consecutive day weighed dietary records in middle-aged Japanese dietitians. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **59**, 281-288

[32] Shibata K, Tsuji T, Fukuwatari T (2013) Intake and urinary amounts of biotin in Japanese elementary school children, college students, and elderly persons. *Nutr Metab Insight* **6**, 43-50

[33] 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会 (2010) 日本食品標準成分

表 2010. 国立印刷局, 東京

- [34] 東京都衛生局 (1999) 東京都民の栄養状況. 東京都, 東京
- [35] 健康・栄養情報研究会 (2003) 国民栄養の現状 (平成 13 年厚生労働省国民栄養調査結果). 第一出版, 東京
- [36] 東京都衛生局 (2003) 東京都民の栄養状況. 東京都, 東京
- [37] 健康・栄養情報研究会 (2004) 国民栄養の現状 (平成 14 年厚生労働省国民栄養調査結果). 第一出版, 東京
- [38] 厚生労働省 (2005) 日本人の食事摂取基準 (2005 年版), 第一出版, 東京
- [39] Gunderson EL (1995) Dietary Intake of Pesticides, Selected Elements, and Other Chemicals: FDA Total Diet Study, July 1986-April 1991. *JAOAC Int* **78**, 1353–1363
- [40] Chen J, Gao J (1993) The Chinese total diet study in 1990. Part I. Chemical contaminants. *JAOAC Int* **76**, 1193–1205
- [41] Tsuda T, Inoue T, Kojima M, Aoki S (1995) Market basket and duplicate portion estimation of dietary intakes of cadmium, mercury, arsenic, copper, manganese, and zinc by Japanese adults. *JAOAC Int.* **78**, 1363–1367
- [42] Dokkum WV, Vos RHD, Muys TH, Wesstra, JA (1989) Minerals and trace elements in total diets in The Netherlands. *Br J Nutr* **61**, 7–15

- [43] 江口秀敏, 梨子本幸嗣, 佐藤純一, 川原隆一, 岩佐曜 (1990) マイクロプレートを用いたビオチン, ニコチンアミド及びパントテン酸の微生物学的定量. ビタミン **64**, 653–658
- [44] Reyes FD, Romero JMF, Castro MODEL (2001) Determination of biotin in foodstuffs and pharmaceutical preparations using a biosensing system based on the streptavidin–biotin interaction. *Analytica Chimica Acta* **436**, 109–117
- [45] Thompson LB, Schimitz DJ, Pan SJ (2006) Determination of biotin by high-performance liquid chromatography in infant formula, medical nutritional products, and vitamin *premixes*. *JAOAC Int* **89**, 1515–1518
- [46] 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**, 767–776
- [47] Höler U, Wachter F, Wehrli C, Fizet C (2006) Quantification of biotin in feed, food, tablets, and premixes using HPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* **831**, 8–16
- [48] 松本輝樹, 鈴木春奈, 竹林純, 村上太郎, 福島浩太, 飯塚太由, 吉田幹彦, 長尾安紘, 竹村壘, 斎藤利江, 石見佳子 (2012) 微生物学的定量法を用いるビタミン B<sub>12</sub> 強化食品の分析値の信頼性に関する室間共同試験. 分析化学 **61**,

347-351

- [49] Thompson M, Wood R (2006) Accreditation and Quality Assurance **10**, 471–478
- [50] Barwick VJ, Ellison SLR. (2000) VAM Project 3.2.1 Development and Harmonization of Measurement Uncertainty Principles, part d: Protocol for uncertainty evaluation from validation data, Version 5.1
- [51] 村上太郎, 山野哲夫 (2008) Plackett-Burman 試験計画法による分析法の頑健性の確認. 生活衛生 **52**, 274-281
- [52] Mock DM, Mock NI, Langbehn SE (1992) Biotin in human milk: methods, location, and chemical form. *J Nutr* **122**, 535–545
- [53] Shibata K, Hirose J, Fukuwatari T (2014) Relationship between urinary concentrations of nine water-soluble vitamins and their vitamin intakes in Japanese adult males. *Nutr Metab Insight* **7**, 61-70.
- [54] Gibney MJ, van der Voet H (2003) Introduction to the Monte Carlo project and the approach to the validation of probabilistic models of dietary exposure to selected food chemicals. *Food additives and Contaminants* **20**, S1–S7.
- [55] Mato Y, Suzuki N, Katatani N, Katatani N, Kadokami K, Nakano T,

- Nakayama S, Sekii H, Komoto S, Miyake S, Morita M (2007) Human intake of PCDDs, PCDFs, and dioxin like PCBs in Japan, 2001 and 2002. *Chemosphere* **67**, S247–255.
- [56] 健康・栄養情報研究 (2008) 国民栄養の現状－平成 17 年度厚生労働省国民健康・栄養調査報告－. 第一出版, 東京
- [57] 谷口歩美, 武智隆祐, 福嶋厚, 渡邊敏明 (2008) わが国の食品中ビオチン含量の分析. 日本栄養・食糧学会誌 **61**, 27-37
- [58] The Danish food composition data book is on the web. Version 7.01, URL: <http://www.foodcomp.dk/> [November 1, 2015]
- [59] Scherz H, Senser F (2000) Food composition and nutrition tables, 6th ed. CRC Press, Stuttgart.
- [60] Hoppner K, Lampi B, Smith DC (1978) An appraisal of the daily intakes of vitamin B<sub>12</sub>, pantothenic acid and biotin from composite Canadian diet. *Can Inst Food Sci Technol* **11**, 71–74.
- [61] Hoppner K, Lampi B (1989) Total folate, pantothenic acid and biotin in some fish products. *Can Inst Food Sci Technol* **22**, 170–172.
- [62] Hoppner K, Lampi B (1992) Biotin content of cheese products. *Food Res Inst* **25**, 41–43.

- [63] Hoppner K, Lampi B, O'Grady E (1994) Biotin content in vegetables and nuts available on the Canadian Market. *Can. Inst. Food Sci. Technol.* **27**, 495–497.
- [64] Hardinge MG, Crooks H (1961) Lesser known vitamins in foods. *J Am Diet Assoc* **38**, 240–245.
- [65] Ihaka R, Gentleman R (1996) R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **5**, 299–314.
- [66] The R project. The Comprehensive R Archive Network (CRAN), URL: <http://www.r-project.org/> [November 1, 2015].
- [67] Alvarez JL, Arendt EK, Gallagher E (2009) Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *Int J Food Sci Nutr* **60**, 240-257
- [68] Alvarez JL, Arendt EK, Gallagher E (2010) Nutritive value of pseudocereals and their increasing application in the formulation of high-quality gluten-free products. *Trends Food Sci Technol* **21**, 106-113
- [69] Marcone MF, Kakuda Y, Yada RY (2004) Amaranth as a rich dietary source of  $\beta$ -sitosterol and other phytosterols. *Plant Foods Hum Nutr* **58**, 207-211
- [70] Venskutonis PR, Kraujalis P (2013) Nutritional components of amaranth

seeds and vegetables: A review on composition, properties, and uses.

*Comprehensive reviews in food sciences and food safety* **12**, 381-412

- [71] Tovar LR, Valdivia MA, Brito E (1994) Popping amaranth grain, state of the art. In: *Amaranth: Biology, Chemistry, and Technology* (Paredes-López O eds), p 143-151, CRC Press, Boca Raton.
- [72] Tovar LR, Brito E, Takahashi T, Miyazawa T, Soriano J, Fujimoto K (1989) Dry heat popping of amaranth seed might damage some of its essential amino acids. *Plant Foods Hum Nutr* **39**, 299-309
- [73] Gamel TH, Linssen JP, Mesallem AS, Damir AA, Shekib LA (2005) Effect of seed treatments on the chemical composition and properties of two amaranth species: starch and protein. *J Sci Food Agric* **85**, 319-327
- [74] Gamel TH, Linssen JP, Mesallem AS, Damir AA, Shekib LA (2006) Effect of seed treatments on the chemical composition of two amaranth species: oil, sugars, fibers, minerals and vitamins. *J Sci Food Agric* **86**, 82-89
- [75] Inoue T, Iyota H, Uemura T, Yamagata J, Konishi Y, Tatamoto Y (2009) Optimal Conditions for Popping Amaranth Seeds. *Drying Technol* **27**, 918-926
- [76] AOAC (2005) Official Methods of Analysis, 18th ed. MD: Association of

Official Analytical Chemists, Gaithersburg.

- [77] Arella F, Lahély S, Bourguignon JB, Hasselmann C (1996) Liquid chromatographic determination of vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in foods. A collaborative study. *Food Chem* **56**, 81-86
- [78] Gonthier A, Fayol V, Viollet J, Hartmann DJ (1998) Determination of pantothenic acid in foods: influence of the extraction method. *Food Chem* **63**, 287-294
- [79] Hyun TH, Tamura T (2005) Trienzyme extraction in combination with microbiologic assay in food folate analysis: an updated review. *Exp Biol Med* **230**, 444-454
- [80] Pedersen B, Kalinowski LS, Eggum BO (1987) The nutritive value of amaranth grain (*Amaranthus caudatus*) 1. Protein and minerals of raw and processed grain. *Plant Foods Hum Nutr* **36**, 309-324
- [81] Konishi Y, Takezoe R, Murase J (1998) Energy dispersive X-ray microanalysis of element distribution in amaranth seed. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 2288-2290
- [82] 曾根英行, 神山伸, 守木菱 (2011) 緑黄野菜中ビオチン含量の季節変動について. 微量栄養素研究 **28**, 70-73.

- [83] Meslar HW, Camper SA, White HB 3rd (1978) Biotin-binding protein from egg yolk. *J Biol Chem* **253**, 6979-6982
- [84] White HB 3rd, Whitehead CC (1987) Role of avidin and other biotin-binding proteins in the deposition and distribution of biotin in chicken eggs. *Biochem J* **241**, 677-684
- [85] Durance TD (1991) Residual avidin activity in cooked egg white assayed with improved sensitivity. *J food sci* **56**, 707-709
- [86] Garrett DA, Failla ML, Sarama RJ (1999) Development of in vitro digestion methods to assess carotenoid bioavailability from meals. *J Agric Food Chem* **47**, 4301-4309
- [87] Bosscher D, Lu Z, Van Cauwenbergh R, Van Caillie-Bertrand M, Robberecht H, Deelstra H (2001) A methods for in vitro determination of calcium, iron and zinc availability form first-age infant formula and human milk. *Int J Food Sci Nutr* **52**, 173-18
- [88] 中村良 (1998) 卵の科学. p. 94-99, 朝倉書店, 東京
- [89] 谷口歩美, 渡邊敏明 (2007) 鳥類における卵胞ビオチンおよびビオチニダーゼの変化. *ビタミン* **81**, 43-48
- [90] Schreiber RW Jr, White HB 3rd (1991) Biotin diffusion in stored chicken

eggs: A re-assessment. *Comp Biochem Physiol* **98**, 223-225

- [91] Sydenstricker VP, Singal SA, Briggs AP, Devaughn NM, Isbell H (1942) Preliminary observations on "egg white injury" in man and its cure with a biotin concentrate. *Science* **95**, 176-177
- [92] 福渡努, 柴田克己 (2009) パンを主食とした食事に含まれる水溶性ビタミンの遊離型ビタミンに対する相対利用率. *日本家政学会誌* **60**, 57-63
- [93] 菱田明, 佐々木敏 (2015) 日本人の食事摂取基準 (2105年版). 第一出版, 東京

## 副論文リスト

### 第2章

Taro Murakami, Tetsuo Yamano, Akihiko Nakama, Yoshiaki Mori (2008) Estimation of dietary intake of biotin and its measurement uncertainty using total diet samples in Osaka, Japan. *Journal of AOAC International* **91**, 1402-1408

### 第3章

Taro Murakami, Kouichi Takakura, Tetsuo Yamano (2010) Evaluation of probabilistic distribution of dietary biotin intake in Japan using Monte Carlo simulation. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **56**, 449-454

### 第4章-1

Taro Murakami, Aiko Yutani, Tetsuo Yamano, Hiroyuki Iyota, Yotaro Konishi (2014) Effects of popping on nutrient contents of amaranth seed. *Plant Foods for Human Nutrition* **69**, 25-29

### 第4章-2

村上太郎, 山野哲夫 (2012) 鶏卵含有食品のビオチンの生体利用効率. *ビタミン* **86**, 133-140