

しかし、添加回収率、希釈試験については、定量性が得られておらず(表2, 図4), 血清中の他の成分による妨害, あるいはビオチンの存在形態による影響を受けているものと考えられる。特に血清ビオチンは、遊離状態では存在せず, そのほとんどがタンパク質と結合した状態で存在すると言われており¹⁾, 限外ろ過による前処理を検討した目的の一つも, タンパク結合性および非結合性ビオチンの分別定量にあったわけである。しかし, ビオチンのウレイド環の認識に基づくアビジン-ビオチンの結合力および反応速度は, ビオチンのカルボキシル基の修飾により影響を受けることが知られており¹⁰⁾, 今回の条件で, ビオチンとリジンのペプチド化合物であるビオシチンについては, ビオチンと同じ力価で測定されることは確認しているが, より分子量の大きいペプチドあるいはタンパク質と結合して存在するビオチンがどの程度測定されてくるのか, あるいは全く測定されないのか, 明らかではない。ただ, 立体障害による影響により, 真のビオチン量よりも低値を示すことは確かであると考えられる。このことは, 添加回収試験の血清直接添加 Direct assay において, ビオチン添加量の増大に係わらず回収率が低値のままであったことから推察される。従って Direct assay の測定値は, かなり不明確な値と言わざるを得ないが, タンパク結合型を含めた総ビオチンの大まかな推定値となる可能性はあると考えられる。また, Filtrate assay については分子量10,000カットのフィルターろ過を行っており, タンパク非結合性ビオチン(遊離およびペプチド結合ビオチン)の量を反映すると考えられる。ただ, この場合も, ペプチド結合ビオチンのアビジンに対する反応性の問題は, 本質的に Direct assay の場合と同じであり, 正確性には欠けることになる。

上述のように, Direct, Filtrate assay とともに, 測定値の意味は明確ではないが, 両者の間には正の相関が得られていること(図5), また, ビオチン不足状態を示すとの報告がある乾癬および掌蹠膿疱症

の皮膚疾患患者¹¹⁾ の測定結果は Direct assay では差が認められていないが, Filtrate assay において10例中9例でコントロール群より低値を示していることから(図7), 少なくとも Filtrate assay の値はビオチンの不足状態の指標となり得ると考えられる。

本法による測定値, 特に Direct assay の値は, 前述のように総ビオチンの量をかなり低く見積もっていると考えられ, 実際, バイオアッセイによる総量の測定値とされている硫酸加水分解による値に比べ1桁低い値となっている。ところが, バイオアッセイの場合, ビオシチンなどのビオチニルペプチドやタンパク結合性ビオチンは測定されないことが知られているにも係わらず, 血清を直接測定した値の方が, 硫酸加水分解を行った値よりも, 1桁も高くなっており, 硫酸加水分解あるいはバイオアッセイ自体の信頼性についても大きな疑問が残るところである。血清総ビオチンの正確な測定のためには, アビジン競合法, バイオアッセイ法いずれの測定系においてもペプチド結合, タンパク結合状態からの完全なビオチンの遊離が必要であり, 今後の重要な検討課題である。

血清の測定値が血漿よりも低値を示すこと(表3), また Direct assay の値だけが経時的に減少すること(図6)についても, これまでのビオチンに関する研究では説明できないわけであるが, 血液凝固系へのビオチンの関与, ビオチンを結合したタンパク質の3次元構造の変化などが原因として推測される。

最後に, 本法の Direct, Filtrate assay による測定値の真の評価は, 実際のビオチン欠乏状態およびビオチン内服中の血清を用いた測定を積み重ね, 臨床症状も考慮した総合的な判断により, はじめて可能となるものであり, 今後, 真の総ビオチン測定のための前処理法の開発とともに, 慎重に検討を加えて行く必要がある。

5. 結 語

血清ビオチンの測定法として, 酵素標識アビジンとマイクロプレート固相化ビオチンとの競合反応を

利用した方法を，血清の限外ろ過処理とともに検討した。その結果，標準溶液系では，良好な定量性を示したが，血清試料では，マトリックスあるいはビオチンの存在形態に起因すると思われる影響を受け，タンパク結合性および非結合性ビオチンの正確な測定は困難であった。今後，血清総ビオチン測定のための前処理法の開発が強く望まれる。

謝 辞

乾癬，掌跖膿疱症患者の血清試料のご提供並びに貴重ご助言を頂いた，北海道大学医学部皮膚科学教室加藤直子先生に深謝致します。

6. 文 献

- 1) 大泉純：代謝，27(2)，3-11，1990.
- 2) Wolf, B., et al: Clin. Chim. Acta, 131, 273-281, 1983.
- 3) Wright, L. D., and Skeggs, H. R.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 56, 95-98, 1944.
- 4) Baker, H., et al: Anal. Biochem., 3, 31-39, 1962
- 5) Fukui, T., et al: Abstract for International Screening Symposium of Inborn Errors of Metabolism, No. 124, 1988
- 6) Yankofusky, S. A., et al: Anal. Biochem., 118, 307-314, 1981.
- 7) Mock, D. M., and DuBois, D. B.: Anal. Biochem., 153, 272-278, 1986
- 8) Livaniou, E., et al: Clin. Chem., 33, 1983-1988, 1987.
- 9) Hansen, S. I., and Holm, J.: Anal. Biochem., 172, 160-164, 1988.
- 10) Green, N. M.: Biochem. J., 89, 599-609, 1963.
- 11) 牧野好夫，他：皮膚科MOOK, No.2, 237-244, 金原出版（東京），1985.

Microassay for Biotin in Serum by Competition with Solid-phase Biotin for Binding to HRP-Avidin

Akihiro Yamaguchi, Kanako Nishio, Yoshikiyo Mizushima, Masaru Fukushi, Katsumi Abe, Yuko Kikuchi and Nobuo Takasugi

ABSTRACT

We describe a simple and fast microcolorimetric assay for determination of biotin in serum based on the competition between biotin in sample and immobilized biotinyl-IgG coated onto microplate wells for binding to horseradish peroxidase-avidin conjugate. In addition to direct assay for serum, biotin in ultra-filtrate of serum obtained through membrane filter (Mw 10,000 cut), attached to a microcentrifuge tube, is also measured for fractional determination of protein binding- and nonbinding-biotin. The detection range of this assay is sensitive enough for measurement of biotin level in serum (0.1 to 1.0ng/ml), and the reproducibility is adequate for practical use (CV values: around 10%). But, the results of recovery and serum dilution tests are not quantitative, suggesting the interference of coexistent substances or influence of biotin species itself.