
トピックス

新規形態のビオチン塩の開発とその効果**Development of a novel form of biotinate salt and its effects**

ビオチンは糖代謝、アミノ酸代謝、脂肪酸合成等の反応に関わるカルボキシラーゼの補酵素として作用する¹⁾²⁾。これらの作用に注目して開発されたのがビオチン製剤(または高用量のビオチン療法)であり、次に示すとおりいくつかの神経系疾患に対して1日あたり300 mgを服用する治験が進行している。なお、日本人の食事摂取基準におけるビオチンの目安量は1日あたり50 µg(男女12歳以上)であり、通常の摂取量の約6000倍に相当する³⁾。

その中で最も治験が進んでいたのは、中枢神経系の慢性炎症性脱髄疾患のひとつで、進行性の多発性硬化症に対する高用量のビオチン療法であった。この疾患で高用量のビオチンによるカルボキシラーゼの作用の増大が期待された。特に、脂肪酸合成の初期段階で律速段階でもあるアセチル CoA カルボキシラーゼを活性化し、また、ピルビン酸カルボキシラーゼを活性化することによってオキサロ酢酸を供給し、クエン酸回路によるエネルギー産生を活性化させたり、脂質合成を促進するクエン酸の生成を増加させたりするなどの作用機序である。これらの作用機序により、脂質に富む髄鞘(ミエリン鞘)の脱髄を修復することやニューロンにおけるエネルギー産生を活性化して低酸素等による軸索の変性に対し防御的に作用することが期待されていた⁴⁾⁵⁾。

しかし、本疾患に対してビオチン製剤(1日あたり300 mg)を用いた第Ⅲ相臨床試験において主要評価項目である総合障害度評価尺度や歩行時間の改善等の有効性が示されなかったことが報告された⁶⁾。この理由として、ビオチンの低い溶解度やそれに伴うバイオアベイラビリティ低下が原因ではないかとも指摘された⁷⁾。ビオチンは水溶性ビタミンのひとつとして分類されるが、実際には難水溶性である(220 mg/L, 25°C)⁸⁾。

そこで近年、溶解度を高めたビオチン塩として、ビオチン酸マグネシウム(Magnesium biotinate, 以下MgB)が開発され、安全性と有効性に関する研究が報告されている。本稿ではMgBを用いた複数の報告を

紹介する。

体内動態および毒性評価

MgBはマグネシウムイオン1分子にビオチン2分子がイオン結合した化合物である⁹⁾。水に対する溶解度は通常のビオチン(D-ビオチン)の40倍とされている¹⁰⁾。また、カルボキシラーゼの反応にはATPおよびマグネシウムイオンを必要とするため¹¹⁾、MgBにはマグネシウムの補給効果も期待できる。オスのSDラットに100 mg/kg体重のMgBを投与したところ、同用量のビオチンの投与に比べて血清ビオチン濃度が47%、脳中のビオチン濃度は20%高いことが示された¹⁰⁾。

Blumらの研究では、OECDやFDAのガイドラインに準拠した複数の毒性評価試験が行われた¹²⁾。アミノ酸要求性のサルモネラと大腸菌株を用いた細菌復帰突然変異試験、チャイニーズハムスターの肺由来線維芽細胞を用いた*In vitro*哺乳類細胞小核試験、SDラットを用いた急性経口毒性試験および14日間、90日間の反復経口投与毒性試験である。復帰変異試験および小核試験において、MgBには変異原性、染色体構造異常誘発性あるいは異数性誘発性がないことが示された。また、急性毒性試験では、LD₅₀(半数致死量)は5000 mg/kg体重以上であることが示された。急性経口投与(5000 mg/kg体重)後、すべてのラットで下痢、肛門や生殖器の着色、軟便が観察されたが、24時間までにこれらの症状は回復し、14日後の剖検でも異常はみられなかった。14日間の反復投与試験では1日あたり最大2500 mg/kg体重までのMgB投与で異常や死亡、体重および増加量、摂食量、および食物効率に差はなかった。90日間の反復投与試験では、1日あたり600 mg/kg体重までのMgB投与で異常はみられず、NOAEL(無毒性量)であると結論づけられた。これは、体重70 kgのヒトの場合、1日あたり39 gに相当する。

これらの結果から、著者らは1日あたり600 mg/kg体重までのMgBの長期使用はヒトにおいても安全であると結論づけた。

糖代謝および脂質代謝に与える影響

ビオチンは高用量で投与すると糖代謝や脂質代謝に影響を与える¹³⁾⁻¹⁶⁾。Sahin らの研究では、8 週齢のオスの SD ラットを用いて、糖代謝および脂質代謝への影響を報告した¹⁷⁾。ビオチン群 (0.01, 1, 100 mg/kg 体重) および MgB 群 (0.01, 1, 100 mg/kg 体重) の 6 群に分け、それぞれ食餌による通常の摂取量、食餌による高摂取量、薬理量に相当する量として扱った。これらをタンパク質源を卵白に置き換えた標準精製飼料に混餌し、35 日間飼育した。

その結果、飼育期間後に測定した血清グルコース濃度、血清インスリン濃度は群間で差がなかった。一方、血清総コレステロール濃度はビオチン摂取 (1, 100 mg/kg 体重) または MgB 摂取 (1, 100 mg/kg 体重) により減少し、血清トリグリセリド濃度は MgB 摂取 (1, 100 mg/kg 体重) によって減少した。さらに、摂取量 1 mg/kg 体重の比較では、ビオチン摂取に比べ MgB 摂取で血清総コレステロール濃度および血清トリグリセリド濃度が減少していた。

高用量のビオチンの摂取は、可溶性グアニル酸シクラーゼの活性化を介した cGMP 量の増加や、脂肪酸酸化の促進に関与する AMPK の活性化を介して脂肪酸合成を抑制し、血清および肝臓中のトリグリセリド濃度が減少することが知られている¹⁸⁾⁻²¹⁾。これらの先行研究と一致して、本研究ではビオチンまたは MgB の摂取により、肝臓中の cGMP 量が増加し、肝臓における脂肪酸合成に関わる SREBP-1c および脂肪酸合成酵素のタンパク質発現量が低下し、AMPK を構成するサブユニット (AMPK- α 1) のタンパク質量は増加した。肝臓のビオチン依存性のカルボキシラーゼ (ACC-1, ACC-2, PCC, MCC) のタンパク質発現量も同様に増加した。これらの変化は同用量のビオチン摂取 (1, 100 mg/kg 体重) と比べ、MgB 摂取でより顕著であった。これらの結果から、著者らは MgB がビオチンに比べてより効果的に、血清中の中性脂肪およびコレステロールを減少させると結論づけた。

自閉症スペクトラム症モデルラットにおける治療効果

Sahin らは、プロピオン酸 (PPA) 皮下投与による自閉症スペクトラム症 (ASD) モデルラットにおける MgB 経口投与の効果を報告した²²⁾。PPA は血液脳関門を通過し、神経細胞に酸化ストレスや炎症反応を誘導する。500 mg/kg 体重を 5 日間皮下投与すると、攻撃的行動の増加、探索活動の減少、孤立的で受動的な

行動など ASD 様の症状を引き起こすことが報告されている²³⁾。

この研究では、3 週齢のオスの Wistar ラットを用いて、コントロール群、PPA (500 mg/kg を 5 日間) を皮下投与した群、および PPA の皮下投与に続いて 3 段階の MgB (160.7 μ g, 1606.9 μ g, 8034.4 μ g. それぞれヒト等価用量 : HED で 10 mg, 100 mg, 500 mg 相当を 2 週間) を経口投与した 3 群の計 5 群に分けて実験を行った。

その結果、血清中のマグネシウム濃度およびビオチン濃度は PPA 投与により減少したが、MgB 投与により用量依存的に増加した。3 コンパートメント社会行動試験による社交性行動や社会的新規探索性、モリス水迷路試験による空間学習および記憶機能は PPA 皮下投与により減少し ASD 様の症状がみられたが、MgB 投与によりこれらが改善した。また、MgB 投与による改善には用量依存性がみられた。

PPA 投与によって小脳のプルキンエ細胞数の減少および密度の低下など組織学的変異がみられ、セロトニンの減少、ドーパミンの増加などがみられた。脂質過酸化マーカーであるマロンジアルデヒド濃度は血清、脳中ともに PPA 投与により増加した。これらは MgB 投与により改善し、用量依存的であった。脳中の抗酸化酵素 (カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ) 活性および還元型グルタチオンは PPA 投与により顕著に減少したが、MgB 投与により用量依存的に増加した。一方、脳中の炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6, IL-17, CCL-3, CCL-5, CXCL-16) は PPA 投与により、コントロール群に比べて増加したが、MgB 投与により用量依存的に減少した。この他にも、MgB 投与による神経系の発達やシナプス可塑性マーカーの改善もみられた。これらの結果は、MgB が PPA 誘発による酸化ストレスおよび炎症性サイトカインの減少に対して、保護的に作用し、ASD 様症状を改善することを示している。

ビオチン欠乏では炎症性サイトカインの増加や炎症との関連が報告されている²⁴⁾⁻²⁶⁾。ビオチンのカルボキシラーゼの補酵素としての機能以外にも、ビオチンが免疫機能や炎症反応を調節する機能の存在が示唆されている。また、cGMP 量の増加による神経系の抗炎症作用など²⁷⁾²⁸⁾ も考えられるが、詳細な作用機序は明らかでない。

おわりに

MgB は通常のビオチンに比べ、溶解性やバイオアベイラビリティに優れ、複数の毒性評価においても特筆

すべき問題はないとされた。高用量のビオチンでみられる糖代謝や脂質代謝への効果は MgB でより強く期待でき、神経系疾患の改善効果についても優れた有効性を示す可能性がある。

この他にも、紫外線 (UVB) 誘発皮膚損傷に対する皮膚の保護効果を明らかにした Cicek らの研究²⁹⁾や剃毛後の毛髪や爪の成長に注目して行われた Demir らの研究³⁰⁾も報告されている。ただし、これらはイノシトール安定化アルギニンケイ酸塩複合体 (Inositol-stabilized arginine silicate complex, 以下 ASI) を併用した研究である。MgB を単独で投与した研究ではないものの、Cicek らの研究では、10 週間の試験期間中に背部を剃毛した SD ラットへの週 4 回の UVB 刺激および毎日の ASI の投与 (HED でアルギニン 140 mg 相当) および MgB の投与 (HED で 1.5 mg または 10 mg 相当)、背部への MgB クリーム (2% 含有) を行った。その結果、UVB 刺激による炎症からの保護やアポトーシスの抑制を介して皮膚の損傷に対して防衛的に作用し、弾力を改善したと報告されている。また、Demir らの報告では、SD ラットへの ASI (HED でアルギニン 140 mg 相当) および MgB (HED でビオチン 1.5 mg または 10 mg 相当) の投与による Wnt/ β カテニンシグナル経路の活性化により、剃毛後の毛髪の成長を促進し、爪の成長を促進した (ASI と高用量の MgB の併用) と結論づけている。

近年、高用量のビオチンは生殖器系への影響も報告されている³¹⁾⁻³⁴⁾。ビオチンには補酵素としての作用だけでなく、細胞内シグナル伝達による非補酵素的作用など多様な作用機序があると解明されている^{15) 21) 33)}。今後、MgB の安全性および有効性のさらなる解明が進み、臨床への応用等につながることを期待される。

Key words :biotin, magnesium, magnesium biotinate, biotin salt, bioavailability

Laboratory of Nutrition, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

Kota Shiozawa, Yusuke Ohsaki, Hitoshi Shirakawa
東北大学大学院農学研究科 栄養学分野
塩沢 浩太, 大崎 雄介, 白川 仁

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2023.10.13 受付)

文 献

- 1) Zempleni J, Wijeratne SSK & Hassan YI (2009) Biotin. *Biofactors*, 36–46
- 2) Mock DM (2017) Biotin: From Nutrition to Therapeutics. *J Nutr* **147**, 1487–1492
- 3) 日本人の食事摂取基準 2020 年版 (2020) 厚生労働省
- 4) Tourbah A, Lebrun-Frenay C, Edan G, Clanet M, Papeix C, Vukusic S, De Sèze J, Debouverie M, Gout O, Clavelou P, Defer G, Laplaud D-A, Moreau T, Labauge P, Brochet B, Sedel F, Pelletier J, MS-SPI study group (2016) MD1003 (high-dose biotin) for the treatment of progressive multiple sclerosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Mult Scler* **22**, 1719–1731
- 5) Sedel F, Bernard D, Mock DM, Tourbah A (2016) Targeting demyelination and virtual hypoxia with high-dose biotin as a treatment for progressive multiple sclerosis. *Neuropharmacology* **110**, 644–653
- 6) Cree BAC, Cutter G, Wolinsky JS, Freedman MS, Comi G, Giovannoni G, Hartung H-P, Arnold D, Kuhle J, Block V, Munschauer FE, Sedel F, Lublin FD, SPI2 investigative teams (2020) Safety and efficacy of MD1003 (high-dose biotin) in patients with progressive multiple sclerosis (SPI2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol* **19**, 988–997
- 7) Motte J, Gold R (2020) High-dose biotin in multiple sclerosis: the end of the road. *Lancet Neurol*, 965–966
- 8) Buntrock RE (2013) Review of The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 15th Edition. *J. Chem. Educ* **90**, 1115–1115. American Chemical Society.
- 9) PubChem Magnesium biotinate. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Magnesium-biotinate> (2023-09-27).
- 10) Ojalvo SP, Sylla S, Komorowski J, Orhan C, Tuzcu M, Sahin N, Sahin K (2019) The Safety and Absorption of Magnesium Biotinate in Rats (P06-029-19). *Current Developments in Nutrition* **3**. American Society for Nutrition.
- 11) Knowles JR (1989) The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* **58**, 195–221
- 12) Blum JL, Ellis M, Chen JX, Mendes O, Sylla S, Ojalvo SP, Komorowski J (2021) Toxicologic evaluation of a novel, highly soluble biotin salt, magnesium biotinate. *Food Chem Toxicol* **153**, 112267
- 13) Riverón-Negrete L, Fernandez-Mejia C (2017) Pharmacological effects of biotin in animals. *Mini-Rev Med Chem* **17**, 529–540. Bentham Science Publishers B.V.
- 14) Sone H, Ito M, Sugiyama K, Ohneda M, Maebashi M, Furukawa Y (1999) Biotin enhances glucose-stimulated insulin secretion in the isolated perfused pancreas of the rat. *J Nutr Biochem* **10**, 237–243
- 15) Boone-Villa D, Aguilera-Méndez A, Miranda-Cervantes A, Fernandez-Mejia C (2015) Effects of Biotin Supplementation in the Diet on Adipose Tissue cGMP Concentrations, AMPK

- Activation, Lipolysis, and Serum-Free Fatty Acid Levels. *J Med Food* **18**, 1150–1156
- 16) Sone H, Kamiyama S, Higuchi M, Fujino K, Kubo S, Miyazawa M, Shirato S, Hiroi Y, Shiozawa K (2016) Biotin augments acetyl CoA carboxylase 2 gene expression in the hypothalamus, leading to the suppression of food intake in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **476**, 134–139
- 17) Sahin K, Orhan C, Kucuk O, Erten F, Tuzcu M, Sahin N, Perez Ojalvo S, Komorowski JR (2021) Effects of magnesium biotin supplementation on serum insulin, glucose and lipid parameters along with liver protein levels of lipid metabolism in rats. *Magnes Res* **34**, 9–19
- 18) Aguilera-Méndez A, Fernández-Mejía C (2012) The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation. *Biofactors* **38**, 387–394
- 19) Larrieta E, Velasco F, Vital P, López-Aceves T, Lazo-de-la-Vega-Monroy ML, Rojas A, Fernandez-Mejia C (2010) Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *Eur J Pharmacol* **644**, 263–268
- 20) Pacheco-Alvarez D, Solórzano-Vargas RS, González-Noriega A, Michalak C, Zempleni J, León-Del-Río A (2005) Biotin availability regulates expression of the sodium-dependent multivitamin transporter and the rate of biotin uptake in HepG2 cells. *Mol Genet Metab* **85**, 301–307
- 21) Watanabe-Kamiyama M, Kamiyama S, Horiuchi K, Ohinata K, Shirakawa H, Furukawa Y, Komai M (2008) Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr* **99**, 756–763
- 22) Sahin K, Orhan C, Karatoprak S, Tuzcu M, Deeh PBD, Ozercan IH, Sahin N, Bozoglan MY, Sylla S, Ojalvo SP, Komorowski JR (2022) Therapeutic Effects of a Novel Form of Biotin on Propionic Acid-Induced Autistic Features in Rats. *Nutrients* **14**
- 23) Choi J, Lee S, Won J, Jin Y, Hong Y, Hur T-Y, Kim J-H, Lee S-R, Hong Y (2018) Pathophysiological and neurobehavioral characteristics of a propionic acid-mediated autism-like rat model. *PLoS One* **13**, e0192925.
- 24) Kuroishi T, Endo Y, Muramoto K, et al. (2008) Biotin deficiency up-regulates TNF-alpha production in murine macrophages. *J Leukoc Biol* **83**, 912–920
- 25) Kuroishi T, Endo Y, Muramoto K, Sugawara S (2009) Biotin status affects nickel allergy via regulation of interleukin-1beta production in mice. *J Nutr* **139**, 1031–1036
- 26) Kuroishi T (2015) Regulation of immunological and inflammatory functions by biotin. *Can J Physiol Pharmacol* **93**, 1091–1096
- 27) Taoro-González L, Cabrera-Pastor A, Sancho-Alonso M, Felipe V (2022) Intracellular and extracellular cyclic GMP in the brain and the hippocampus. *Vitam. Horm* **118**, 247–288
- 28) Jehle A, Garaschuk O (2022) The Interplay between cGMP and Calcium Signaling in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* **23**.
- 29) Cicek D, Demir B, Orhan C, Tuzcu M, Ozercan IH, Sahin N, Komorowski J, Ojalvo SP, Sylla S, Sahin K (2021) The Protective Effects of a Combination of an Arginine Silicate Complex and Magnesium Biotinate Against UV-Induced Skin Damage in Rats. *Front Pharmacol* **12**, 657207
- 30) Demir B, Cicek D, Orhan C, Er B, Erten F, Tuzcu M, Ozercan IH, Sahin N, Komorowski J, Ojalvo SP, Sylla S, Sahin K (2023) Effects of a Combination of Arginine Silicate Inositol Complex and a Novel Form of Biotin on Hair and Nail Growth in a Rodent Model. *Biol Trace Elem Res* **201**, 751–765
- 31) Sawamura H, Ikeda C, Shimada R, Yoshii Y, Watanabe T (2015) Dietary intake of high-dose biotin inhibits spermatogenesis in young rats. *Congenit Anom* **55**, 31–36
- 32) Pastén-Hidalgo K, Riverón-Negrete L, Sicilia-Argumedo G, Canul-Medina G, Salazar-Anzures T, Tapia-Rodríguez M, Hernández-González EO, Roa-Espitia AL, Cedillo-Peláez C, Fernandez-Mejia C (2020) Dietary Biotin Supplementation Impairs Testis Morphology and Sperm Quality. *J Med Food* **23**, 535–544
- 33) Shiozawa K, Maeda M, Ho H-J, Katsurai T, Howlader MZH, Horiuchi K, Sugita Y, Ohsaki Y, Agista AZ, Goto T, Komai M, Shirakawa H (2022) Biotin Enhances Testosterone Production in Mice and Their Testis-Derived Cells. *Nutrients* **14**
- 34) Báez-Saldaña A, Camacho-Arroyo I, Espinosa-Aguirre JJ, Neri-Gómez T, Rojas-Ochoa A, Guerra-Araiza C, Larrieta E, Vital P, Díaz G, Chavira R, Fernandez-Mejia C (2009) Biotin deficiency and biotin excess: effects on the female reproductive system. *Steroids* **74**, 863–869