

図 36. 母乳中のビタミン B₂ とビタミン B₆ 含量の関係

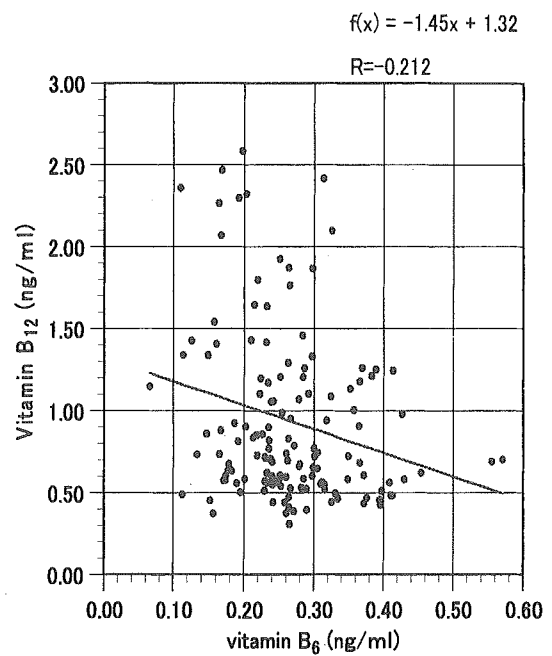


図 37. 母乳中のビタミン B₂ とビタミン B₁₂ 含量の関係

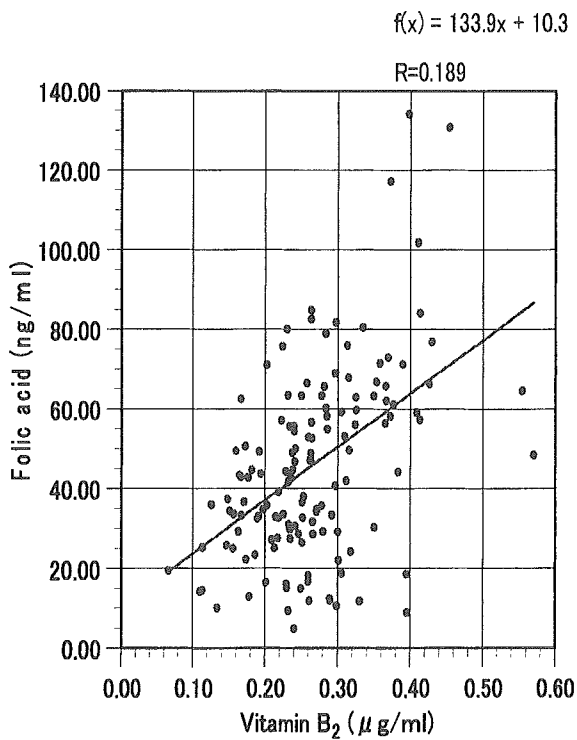


図 38. 母乳中のビタミン B₂ と葉酸 含量の関係

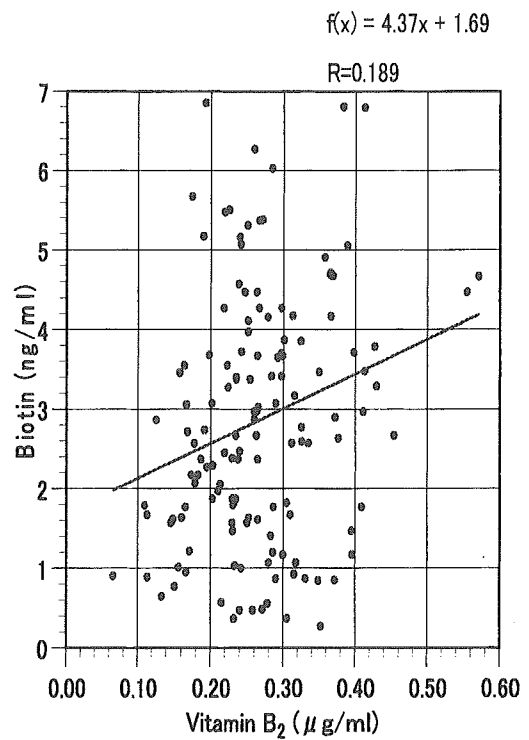


図 39. 母乳中のビタミン B₂ とビオチン 含量の関係

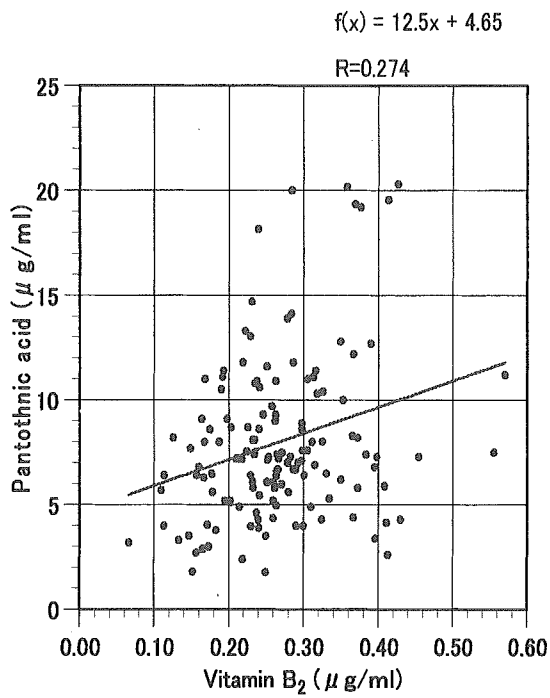


図 40. 母乳中のビタミン B₂ とパントテン酸
含量の関係

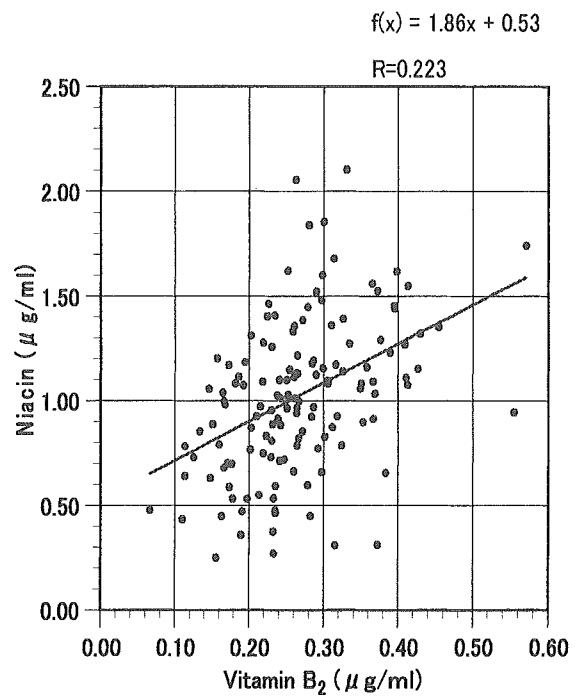


図 41. 母乳中のビタミン B₂ とナイアシン
含量の関係

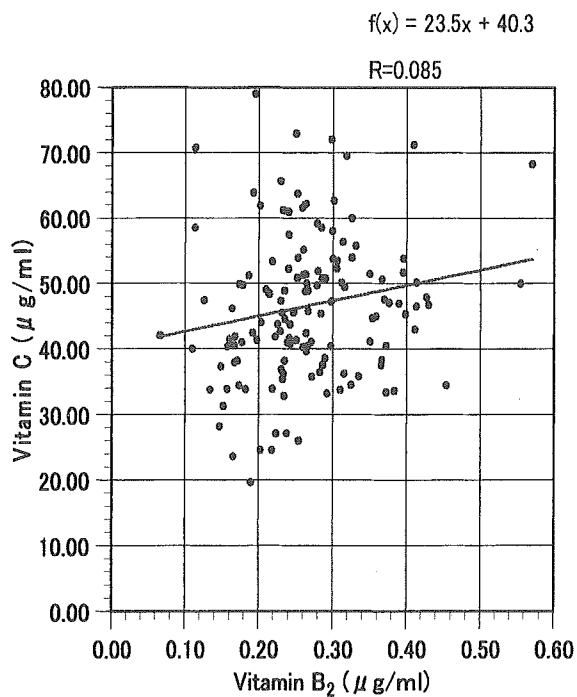


図 42. 母乳中のビタミン B₂ とビタミン C
含量の関係

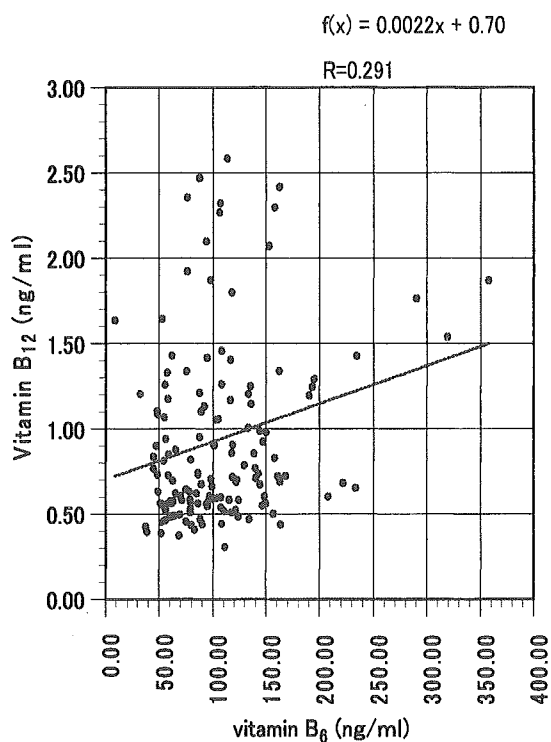


図 43. 母乳中のビタミン B₆ とビタミン B₁₂ 含量の関係

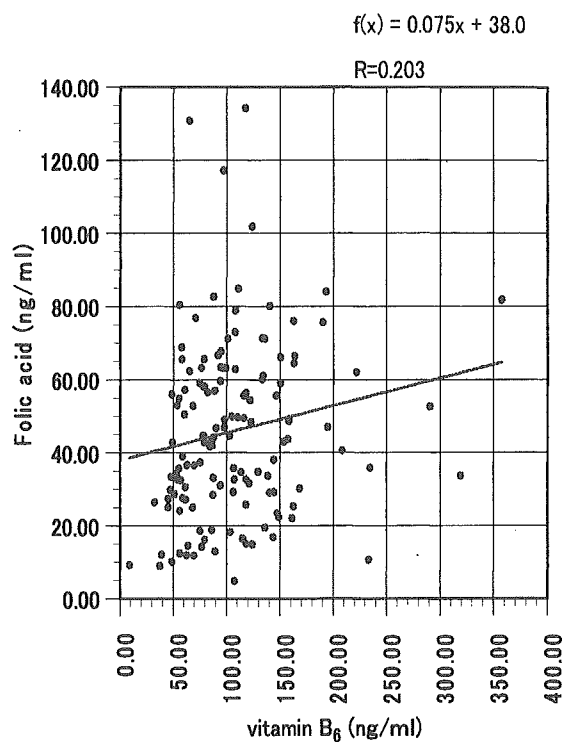


図 44. 母乳中のビタミン B₆ と葉酸 含量の関係

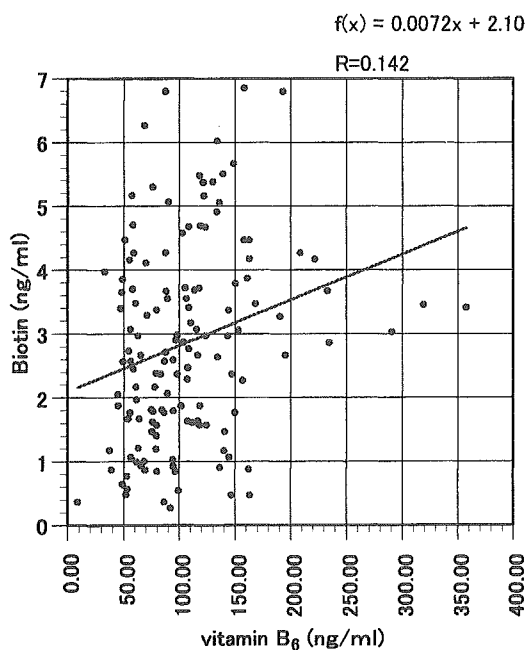


図 45. 母乳中のビタミン B₆ とビオチン 含量の関係

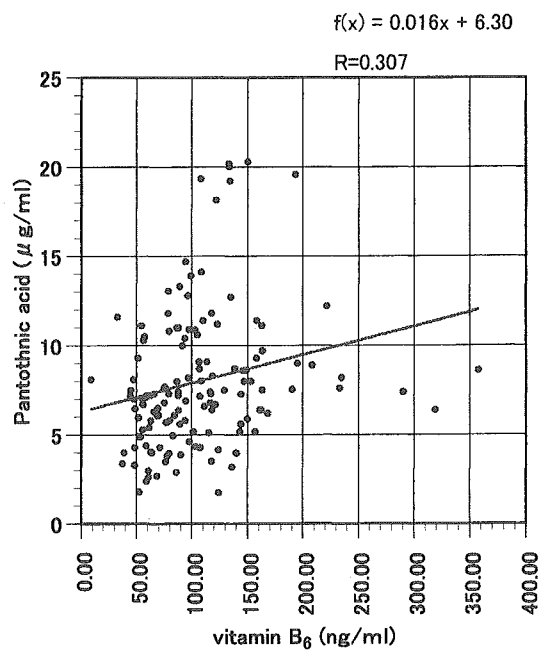


図 46. 母乳中のビタミン B₆ とパントテン 酸含量の関係

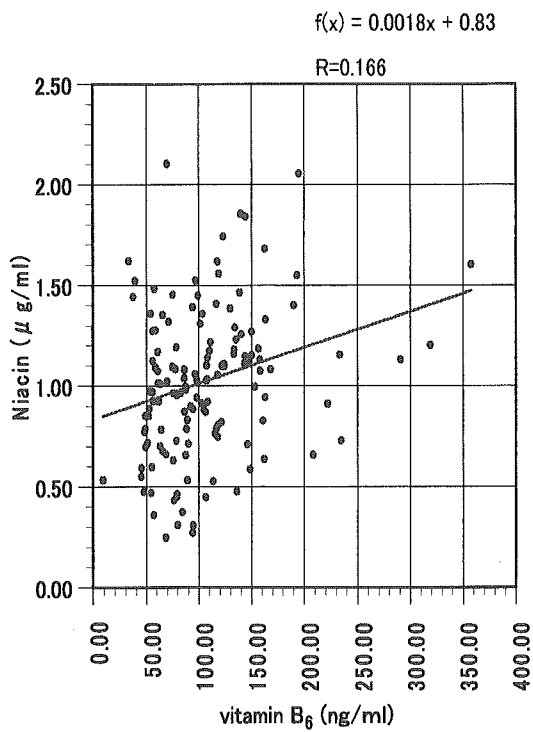


図 47. 母乳中のビタミン B₆ とナイアシン
含量の関係

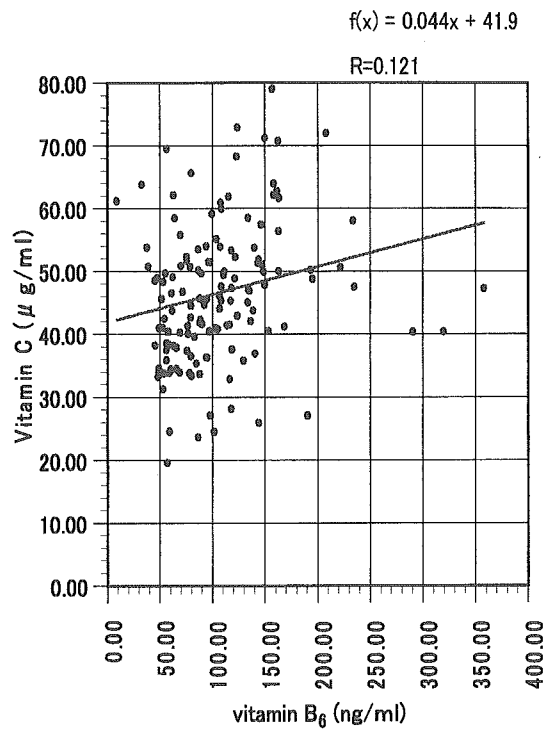


図 48. 母乳中のビタミン B₆ とビタミン C
含量の関係

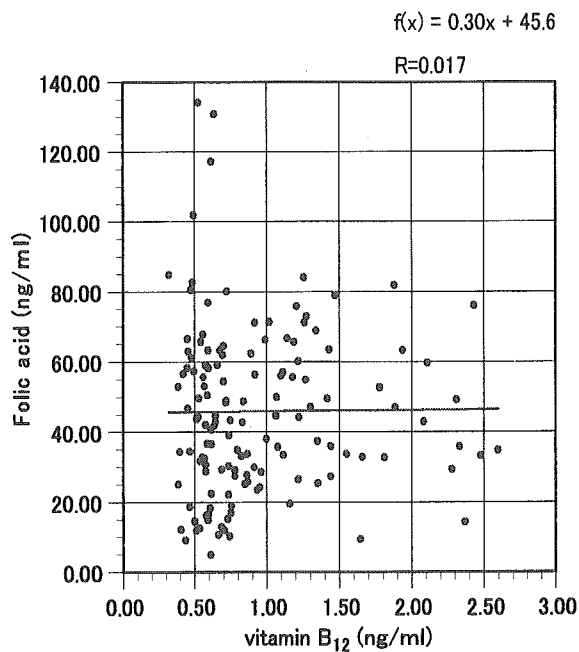


図 49. 母乳中のビタミン B₁₂ と葉酸
含量の関係

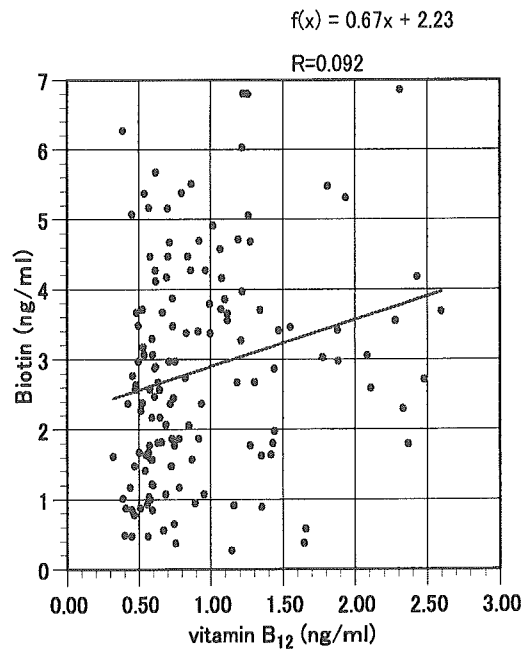


図 50. 母乳中のビタミン B₁₂ とビオチン
含量の関係

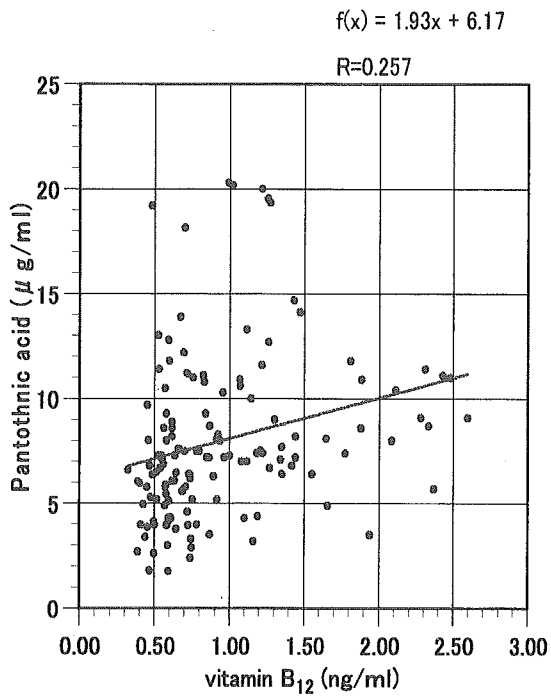


図 51. 母乳中のビタミン B₁₂ とパントテン酸
含量の関係

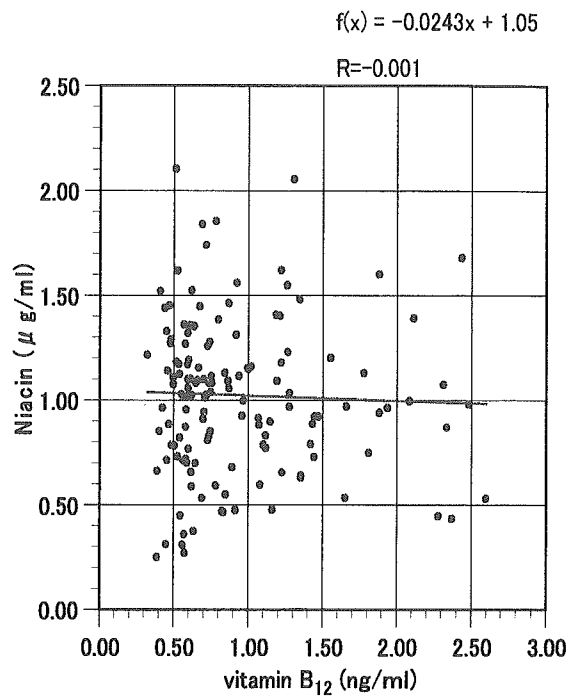


図 52. 母乳中のビタミン B₁₂ とナイアシン
含量の関係

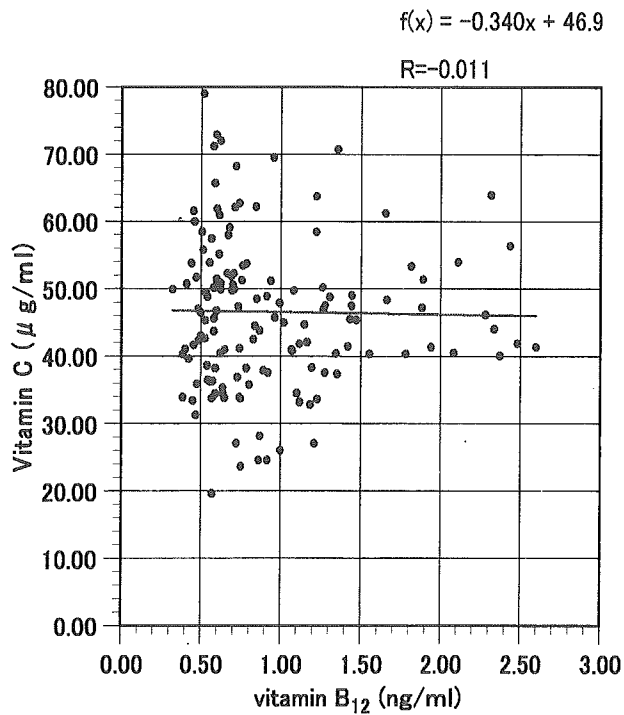


図 53. 母乳中のビタミン B₁₂ とビタミン C
含量の関係

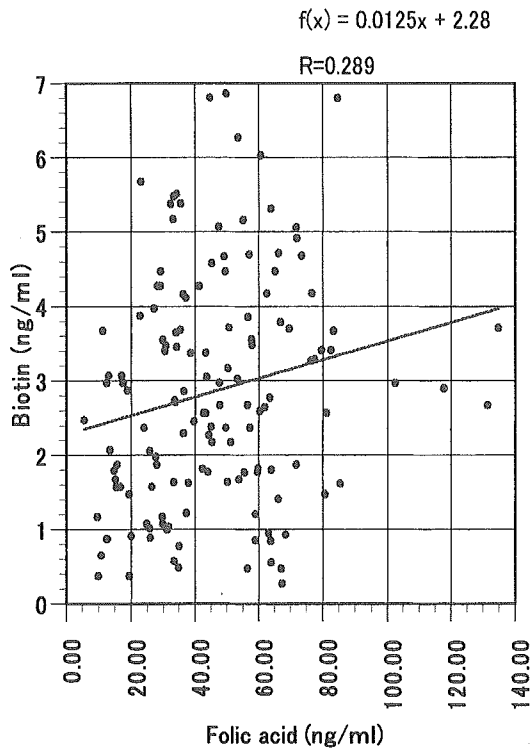


図 54. 母乳中の葉酸とビオチン
含量の関係

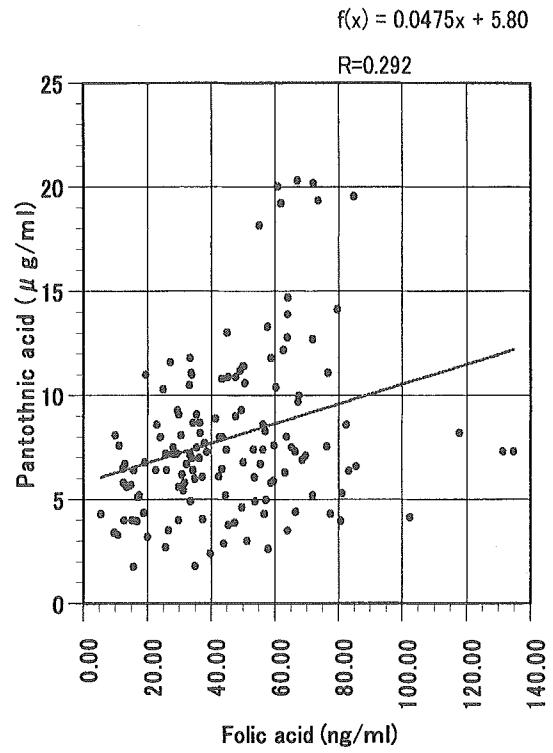


図 55. 母乳中の葉酸とパントテン酸
含量の関係

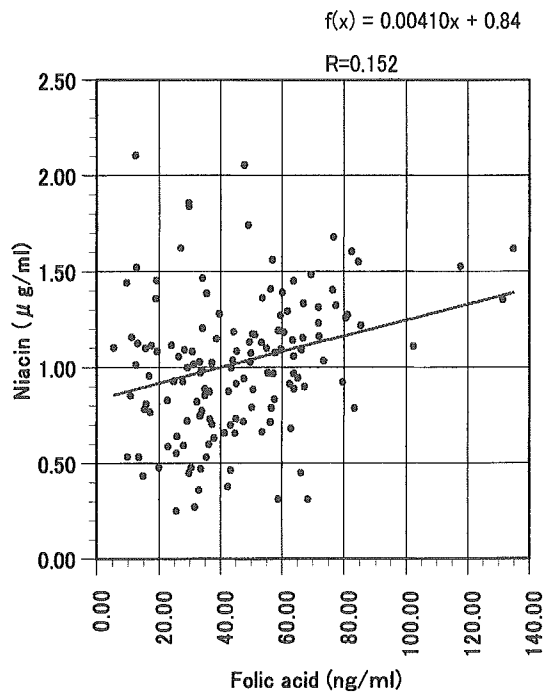


図 56. 母乳中の葉酸とナイアシン
含量の関係

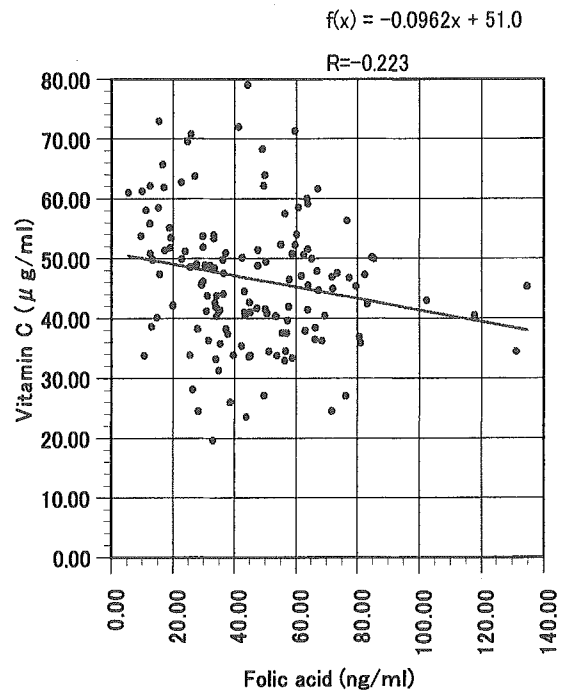


図 57. 母乳中の葉酸とビタミンC
含量の関係

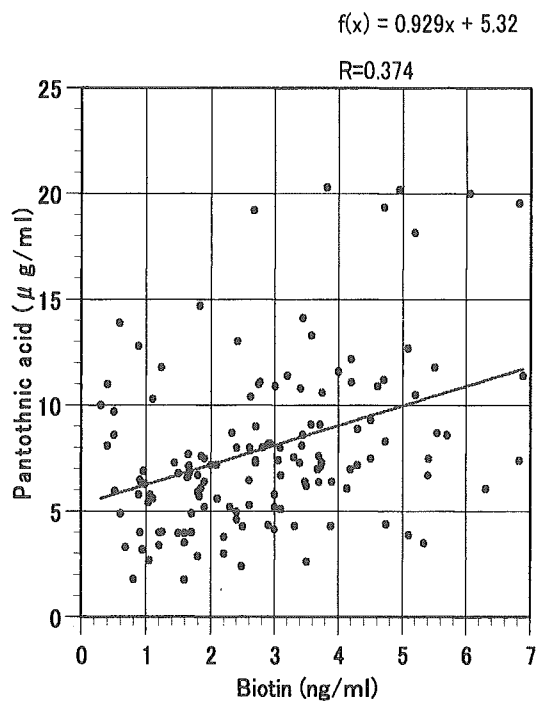


図 58. 母乳中のビオチンとパントテン酸
含量の関係

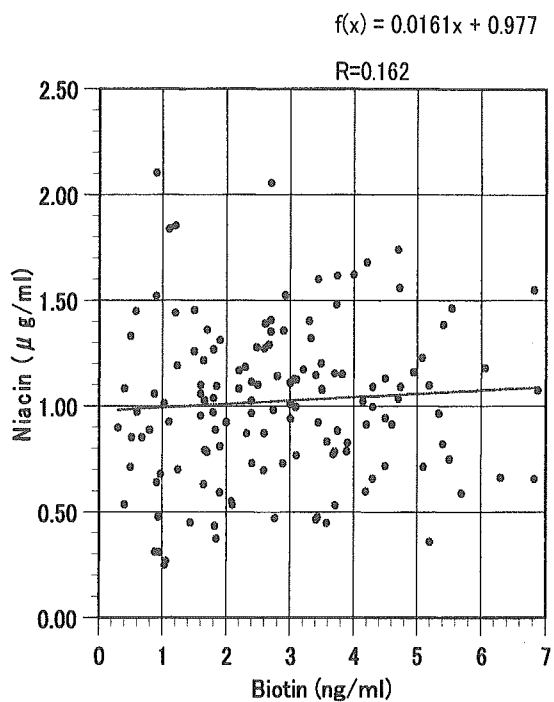


図 59. 母乳中のビオチンとナイアシン
含量の関係

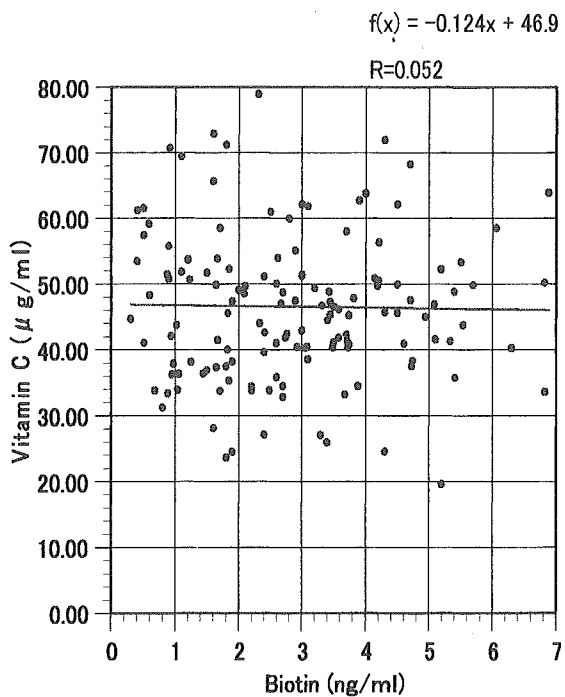


図 60. 母乳中のビオチンとビタミン C
含量の関係

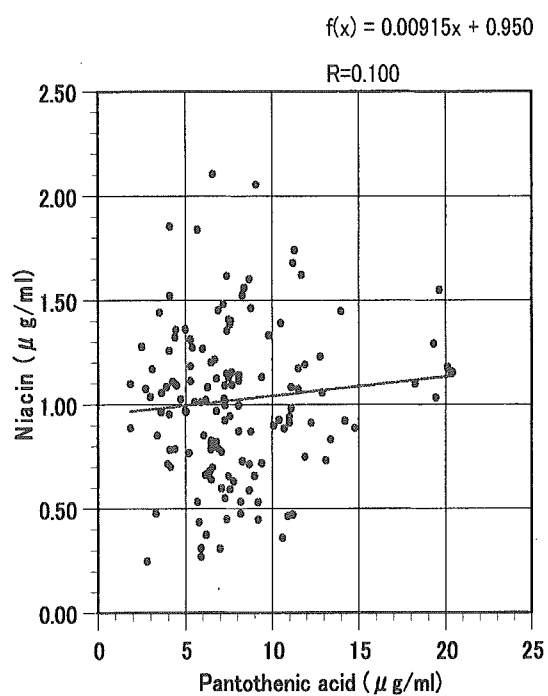


図 61. 母乳中のパントテン酸とナイアシン
含量の関係

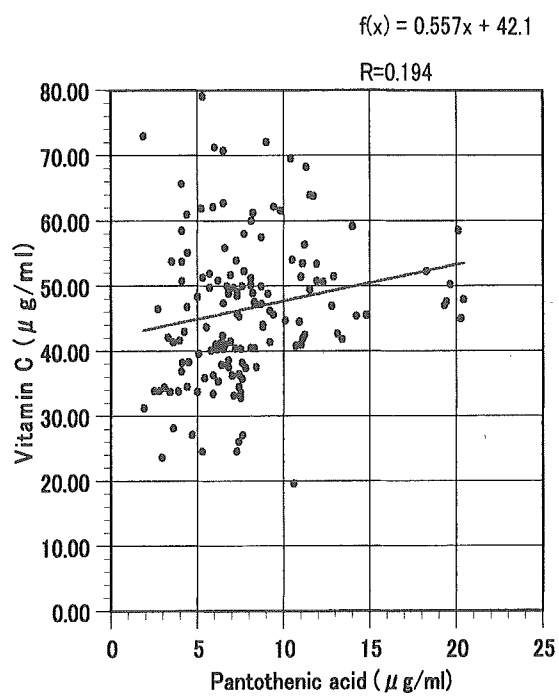


図 62. 母乳中のパントテン酸とビタミン
C 含量の関係

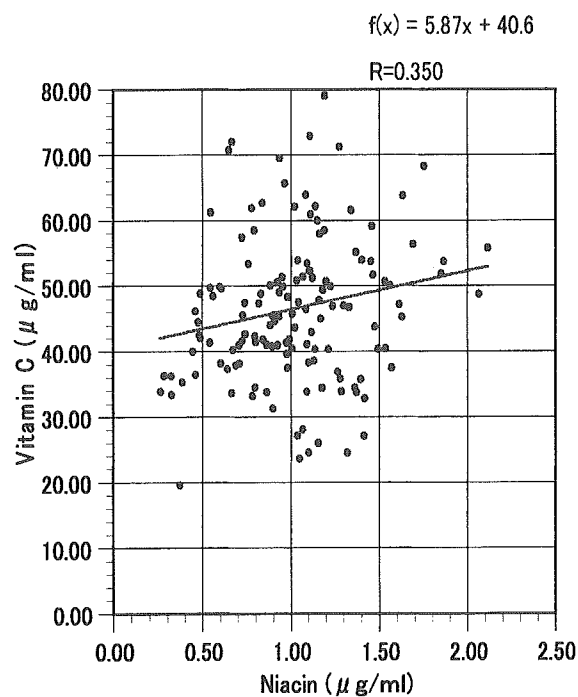


図 63. 母乳中のナイアシンとビタミン C
含量の関係

平成 17 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

II. 主任研究者の報告書

4. ビオチンの大量摂取がラットに与える影響

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

3 週齢のラットを用いて、20%カゼイン食にビオチンを 0.00002%（対照群）、0.1%、0.5%、0.8%、1%となるように添加した飼料を 28 日間与えて飼育し、ビオチンの大量投与が生体に与える影響を調べた。B 群ビタミンは協調して、糖質、脂質、アミノ酸の代謝に関与し、補酵素として重要な役割を担うことが知られている。ビオチンの大量投与によりこれらの均衡が崩れる可能性があると考え、他の B 群ビタミンの代謝に及ぼす影響を調べた。体重増加量、飼料摂取量において、対照群と 0.1%群との間に差異は認められなかったが、0.5%以上では有意に減少した。ビオチンの尿中排泄量はビオチン摂取量にほぼ依存して増加した。他の水溶性ビタミンの尿中排泄量については、ビタミン B₁ 排泄量とビタミン B₆ の異化代謝産物排泄量がビオチン摂取量にほぼ依存して低下した。血液中、肝臓中のビオチン量はビオチン添加量に依存して増加した。ビオチンの摂取量に伴い、臓器中のビオチン含量が増加していることから、代謝・排泄しきれなかったビオチンが生体内に蓄積していると考えられ、このことから、ビオチンがラット生体内において何らかの悪影響を与えたと考えられる。また、それぞれの結果について NOAEL、LOAEL の検討を行ったが、筋肉、血清、尿などの影響から、0.1%添加群で影響が認められたものが多く、0.1%群を LOAEL とした。今回の実験では NOAEL を決定することはできなかった。

A. 目的

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、糖新生、アミノ酸代謝および脂肪酸合成などに関与している¹⁻³⁾。このため、ビオチンが欠乏するとエネルギー代謝経路が阻害されたり、種々の生理機能が障害されたりすることにより、神経炎、感染症などが引き起こされる。鳥類や哺乳動物においては、ビオチンが胚形成や形態形成にも重要な役割を果たしている⁴⁾。最近では、妊娠の経過に伴って、血中や尿中のビオチン濃度が低下することや、ビオチンが皮膚疾患や糖尿病と係わっていることが示唆されている⁵⁻⁷⁾。このように、注目を浴びている栄養素であるので過剰に摂取する危険性がある。そこで、本研究では、ラットを用いて、ビオチンの大量投与が生体に与える影響を調べた。また、B群ビタミンは協調して、糖質、脂質、アミノ酸の代謝に関与し、補酵素として重要な役割を担うことが知られている。ビオチンの大量投与によりこれらの均衡が崩れる可能性があると考え、他のB群ビタミンの代謝に及ぼす影響を調べた。

B. 実験方法

1. 動物実験法

3週齢のWistar系雄ラット20匹を日本クレア株式会社より購入し、平均体重がほぼ均等になるように4匹ずつ5群に分けて、一匹ずつラット用代謝ケージ（日本クレア株式会社製、CT-10）に入れて28日間飼育した。その日から表1に示した飼料を与えた。20%カゼイン食にビオチンを対照群として0.00002%、試験群として0.1%、0.5%、0.8%、1%となるように添加した。飼料と水

は自由摂取とし、毎日新しいものに交換した。ラットの世話は午前8時～午前10時の間に行い、体重と飼料摂取量を測定した。飼育条件としては、室温約20°C、湿度約60%、午前6時～午後6時を明、午後6時～翌朝6時を暗とする明暗サイクルで行った。

実験開始日をDay 0として、飼育最終日にあたるDay 27の一日尿（午前9時～翌朝午前9時：24時間）を集めた。尿は塩酸酸性下で、-20°Cで保存し、一部はビタミンC測定用に、尿と同量の10%メタリン酸を加えて処理したものを-20°Cで保存した。

採尿が終了したDay 28の午前9時に断頭屠殺し、採血および肝臓、腎臓、肺、心臓、脳、精巣、脾臓の摘出を行い、各臓器の重量を測定した。筋肉は大腿筋の一部のみの摘出した。肝臓中、筋肉中、血清中のビオチン量を測定し、尿はすべての水溶性ビタミンを測定した。

2. 分析方法

血清、筋肉、肝臓中ビオチン

血清は、全血5mlを室温にて30分放置後、800×g、10分間、遠心分離した上清を測定用試料とした。筋肉、肝臓は各臓器0.5gに重量の2倍量の2.25 M硫酸（1 ml）を加えてホモジネートしたものを、121°C、1時間オートクレーブし、冷却後、9100×g、10分間遠心分離した上清を測定試料とした。

ビオチンの分析は、すべてビオチン要求株である乳酸菌（*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014）を用いた微生物学的定量法⁸⁾に従い、比濁法で測定した。

尿中の水溶性ビタミン

① ビタミン B₁

尿をそのまま測定用試料とした。尿中のチアミンは木村らによる HPLC 法に従って測定した⁹⁾。

②ビタミン B₂

尿をそのまま測定用試料とした。尿中のリボフラビンは HPLC 法に従って測定した¹⁰⁾。

③ビタミン B₆

尿をそのまま測定用試料とした。ビタミン B₆ の異化代謝産物である 4-ピリドキシン酸の測定は HPLC で測定した¹¹⁾。

④ビタミン B₁₂

尿をそのまま測定用試料とした。尿中のビタミン B₁₂ は *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*L. leichimannii*) ATCC 7830 を用いた微生物学的定量法にて測定した¹²⁾。

⑤ナイアシン

尿をそのまま測定用試料とした。尿中ニコチンアミド、ニコチンアミドの異化代謝産物である N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py), N¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) は柴田らによる HPLC 法に従って測定した¹³⁾。尿中 N¹-メチルニコチンアミド (MNA) は柴田らによる方法に従って測定した¹⁴⁾。

⑥パントテン酸

尿をそのまま測定用試料とした。尿中のパントテン酸は乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) を用いた微生物学的定量法にて測定した¹⁵⁾。

⑦葉酸

尿をそのまま測定用試料とした。尿中の葉酸は乳酸菌 *Lactobacillus casei* ATCC 2773 を用いた微生物定量法を用いて測定した¹⁶⁾。

⑧ビオチン

尿をそのまま測定用試料とした。尿中のビオチンはビオチン要求株である乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014) を用いた微生物学的定量法⁸⁾に従って測定した。

⑨ビタミン C

尿に同量の 10%メタリン酸を加えて処理したものを測定用試料とした。尿中のビタミン C は HPLC 法にて測定した¹⁷⁾。

3. 統計処理

結果はすべて平均値±標準偏差 (SEM) で表した。有意差検定には Instat software Ver. 2.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を用いた。値を常用指数に変換し、One-way Analysis of Variance (ANOVA) により、有意差が認められた場合は、Turkey-Kramer Multiple Comparisons Test で個々の群の間の有意差をみた。

C. 結果

肉眼的所見, 体重増加量, 飼料摂取量

実験期間中の飼料摂取量, 体重増加量を図 1 に示した。

0.1%添加群は対照群と差異は認められなかったが, 0.5%添加群では, 下痢をしているラットが認められた。0.8%添加群では, 4 匹中 1 匹, 1.0%添加群では, 4 匹中 2 匹が死亡した。剖検により, 0.8%と 1.0%添加群では, 腸が肥大化し, 排泄物がたまっていることを確認した。肉眼的所見において, 毛並みに影響は認められず, 行動異常は認められなかった。

体重増加量, 飼料摂取量において, 対照群と 0.1%添加群との間に差異は認められず, 0.5%添加群で有意に減少し, 成長障害が見られた。0.1%添加群が NOAEL, 0.5%添加

群が LOAEL と考えられた。

臓器重量

ビオチンの大量摂取が臓器重量（ラットの体重 100g 当たりの値での比較）に及ぼす影響を表 2 に示した。脳は 0.1% 添加群で有意に増大した。心臓、肺、副腎において差異は認められなかった。腎臓は 0.5% 添加群で有意に増大した。脾臓は 0.5% 添加群で有意に減少した。精巣は 0.8% 添加群で有意に減少し、肝臓は 0.5% 添加群で有意に増大したが、他の添加群では差異が認められなかったため、影響はなかったと判断した。

筋肉と肝臓中のビオチン含量

ビオチンの大量投与が筋肉中におよぼす影響を図 2 に、肝臓中におよぼす影響を図 3 に示した。筋肉中のビオチン量はビオチン摂取量にほぼ依存して増加し、肝臓中のビオチン量はビオチン添加量に依存して増加した。筋肉中ビオチン量は 0.1% 添加群で有意に増加したので、0.1% 添加群を LOAEL とした。肝臓中ビオチン量は 0.5% で有意に増加したので、0.1% 添加群を NOAEL、0.5% 添加群 LOAEL とした。

血清中のビオチン含量

ビオチンの大量投与が血液中のビオチン含量に与える影響を図 4 に示した。血液中ビオチン量はビオチン添加量に依存して増加した。0.1% 添加群で有意に増加したため、0.1% 添加群を LOAEL とした。

尿中のビオチン排泄量

ビオチンの大量投与が尿中ビオチン排泄量に及ぼす影響を図 5 に示した。尿中ビオチン排泄量はビオチン摂取量に、ほぼ依存して増加した。0.1% 添加群で有意に増加したため、0.1% 添加群を LOAEL とした。

尿中の B 群ビタミン排泄量

ビオチンの大量投与が B 群ビタミン代謝に及ぼす影響を図 6 に示した。尿中ビタミン B₁ 排泄量とビタミン B₆ 異化代謝産物排泄量はビオチン摂取量にほぼ依存して低下した。ビタミン B₁ は 0.8% で有意に低下したため、0.5% 添加群を NOAEL、0.8% 添加群を LOAEL とした。ビタミン B₆ は 0.5% 添加群で有意に低下したので、0.1% 添加群を NOAEL、0.5% 添加群を LOAEL とした。尿中葉酸排泄量とアスコルビン酸排泄量はビオチン摂取量に依存して増加した。葉酸は 0.1% 添加群で有意に増加したため、0.1% 添加群を LOAEL とした。アスコルビン酸は 0.5% 添加群で有意に増加したので、0.1% 添加群を NOAEL、0.5% 添加群を LOAEL とした。尿中ナイアシン異化代謝産物排泄量とパントテン酸排泄量は 0.5% 添加群で有意に低下したが、他の添加群では差異が認められなかったため、影響はなかったと判断した。尿中ビタミン B₁ 排泄量とビタミン B₁₂ 排泄量に差異は認められなかった。

D. 考察

ビオチンの毒性が強かったため、0.8% 以上のビオチン添加群では、ラットが死亡してしまっただけでなく、0.1% と 0.5% 添加群では死亡ラットはでなかった。

試料摂取量、体重増加量、筋肉中、肝臓中、血清中および尿中ビオチン量のすべてにおいて、ビオチンの大量投与による影響が見られた。また、他の B 群ビタミンについても、尿中排泄量に影響が見られた。ビオチンの摂取量に伴い、臓器中のビオチン含量が増加していることから、代謝・排泄しきれなかったビオチンが生体内に蓄積していると考えられ、このことから、ビオチ

ンがラット生体内において何らかの悪影響を与えたと考えられる。また、それぞれの結果について NOAEL, LOAEL の検討を行ったが、筋肉、血清、尿など、今回の実験で最も添加量が低かった0.1%添加群でも影響が認められたものが多く、暫定的ではあるが、0.1%群を LOAEL とした。今後、NOAEL の検討およびより正確な LOAEL の検討のために、ビオチン添加量を少なくし、影響を検討する必要がある。

E. 健康危機情報

特記する情報なし

F. 研究発表

1. 発表論文

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許予定

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 引用文献

1. 日本ビタミン学会編ビオチン：ビタミン学, pp437-476, 東京化学同人, 東京, 1980.
2. 渡辺敏明ビオチン：ビタミンの辞典, pp299-323, 朝倉書店, 東京, 1996.
3. 日本ビタミン学会編ビオチン：ビタミン 研究のブレークスルー—発見から

最新の研究まで—, pp231-250, 学進出版, 大阪, 2002.

4. Cravens WW, Mcgibbon WH, and Sebesta EE. Effect of biotin deficiency on embryonic development in the domestic fowl. *Anat. Rec.*, **90**, 55-64 (1944).
5. 渡辺敏明 胎児の発育および形態形成におけるビオチンの役割. *ビタミン*, **69**, 503-510, (1995).
6. 渡辺敏明 妊娠による母体ビオチン状態の変化. *ビタミン*, **72**, 425-426, (1998).
7. John CC, John PH, Martin CR and Herman B, Biotin status and plasma glucose in diabetics. *Ann. NY. Acad. Sci.*, **447**, 389-392 (1985).
8. Fukui T, Iinura K, Oizumi J and Izumi Y, Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 491-498 (1994).
9. Kimura M, Fujita T and Itokawa Y, Liquid chromatographic determination of total thiamin content of blood. *Clin. Chem.*, **28**, 29-31 (1982).
10. Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K, New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5623-5628, (1983).
11. Gregory, JF and Kirk, JR, Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 879-883 (1979).
12. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M and Nakano Y, Biological activity of

- hydroxo-vitamin B₁₂ degradation product formed during microwave heating. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 5177-5180 (1998).
13. Shibata K, Kawada T and Iwai K, Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N¹-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **424**, 23-28 (1988).
 14. Shibata K, Ultramicro-determination of N¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamin*, **61**, 599-604 (1987).
 15. Skeggs HR and Wright LD, The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **156**, 21-26 (1944).
 16. Tamura T, Microbiological assay of folates. In *Folic Acid Metabolism in Health and Disease. Contemporary Issues in Clinical Nutrition*, vol. 13 (Picciano MF, Stolstad ELR, and Gregory JF, III, eds) pp. 121-137, Wiley-Liss, New York, USA, 1990.
 17. Kishida K, Nishimoto Y, and Kojo S, Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **64**, 1505-1507 (1992).

表 1. 飼料組成

	Control 群	Test 群			
		0.1%	0.5%	0.8%	1.0%
Casein	20	20	20	20	20
L-Methionine	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Gelatinized cornstarch	46.9	46.9	46.9	46.9	46.9
Sucrose	23.4	23.4	23.4	23.4	23.4
Corn oil	5	5	5	5	5
Mineral mixture(AIN-93M MX)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture(AIN93-VX)	1	1	1	1	1
添加した D-biotin (μg/上記飼料 100g)	0	100	500	800	1000

表 2. ビオチンの大量投与がラットの臓器重量に及ぼす影響
値の記載のないものは%で示した.

	Control 群	Test 群			
		0.1%添加群	0.5%添加群	0.8%添加群	1.0%添加群
脳	0.51 ± 0.03 ^a	0.67 ± 0.02 ^b	0.94 ± 0.07 ^c	1.05 ± 0.02 ^c	0.99 ± 0.07 ^c
心臓	0.41 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.43 ± 0.02	0.45 ± 0.01	0.42 ± 0.00
腎臓	0.87 ± 0.02 ^a	0.90 ± 0.02 ^a	1.05 ± 0.03 ^{b,c}	1.07 ± 0.02 ^c	0.98 ± 0.01 ^{a,c}
肺	0.67 ± 0.05	0.66 ± 0.03	0.56 ± 0.03	0.61 ± 0.01	0.54 ± 0.02
脾臓	0.37 ± 0.01 ^a	0.32 ± 0.02 ^{a,b}	0.29 ± 0.02 ^b	0.30 ± 0.02 ^{a,b}	0.26 ± 0.00 ^b
精巣	1.04 ± 0.01 ^a	1.15 ± 0.03 ^a	1.15 ± 0.05 ^a	0.78 ± 0.09 ^b	1.16 ± 0.14 ^a
肝臓	4.73 ± 0.09 ^a	4.84 ± 0.09 ^a	5.84 ± 0.29 ^b	5.36 ± 0.20 ^{a,b}	4.95 ± 0.21 ^{a,b}
副腎	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00

値は平均値±SEM(n=4)で示した.

異なるアルファベット間で有意差あり (p<0.05) .

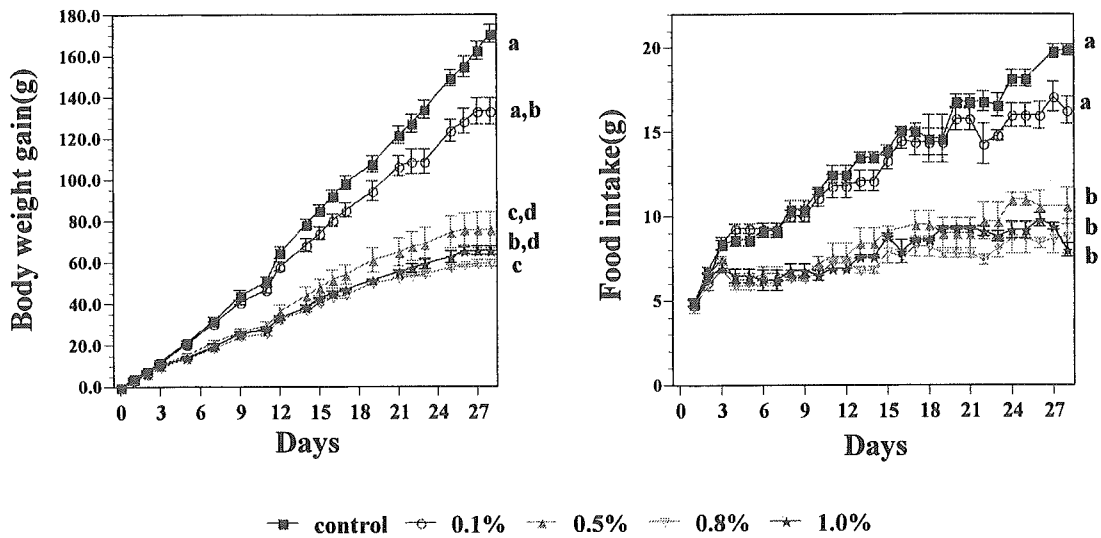


図1. ビオチンの大量投与が幼若ラットの体重増加量と(A)と飼料摂取量(B)に及ぼす影響
 数値は平均値±SEM (n=4) で示した。
 異なるアルファベット間で有意差あり (p<0.05) .

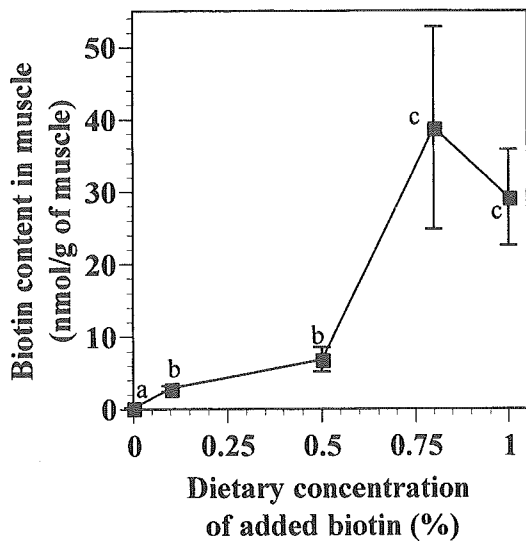


図2. ビオチンの大量投与がラット筋肉中のビオチン含量に及ぼす影響
 数値は平均値±SEM (n=4) で示した。
 異なるアルファベット間で有意差あり (p<0.05) .

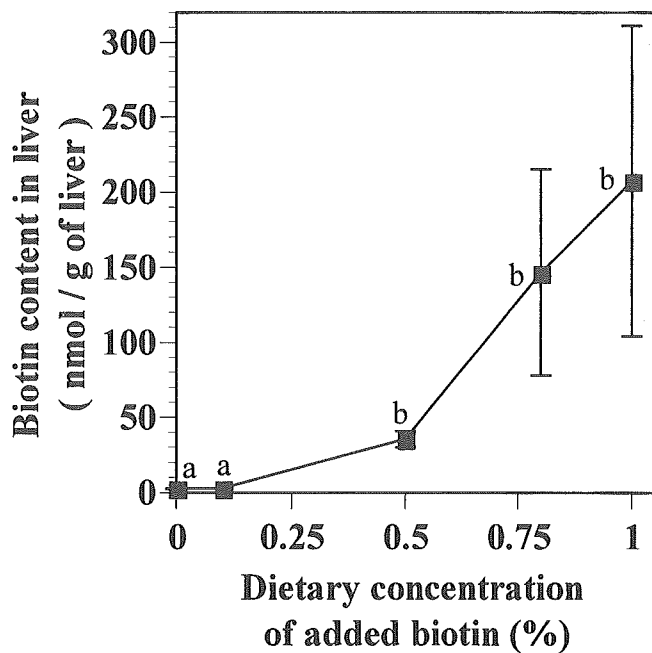


図3. ビオチンの大量投与がラット肝臓中のビオチン含量に及ぼす影響
 数値は平均値±SEM (n=4)で示した。
 異なるアルファベット間で有意差あり (p<0.05) .

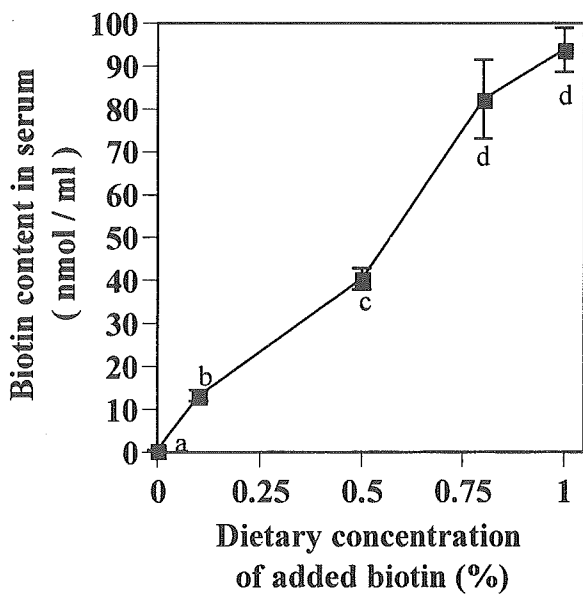


図4. ビオチンの大量投与が血液中のビオチン含量に及ぼす影響
 数値は平均値±SEM (n=4)で示した。
 異なるアルファベット間で有意差あり (p<0.05) .

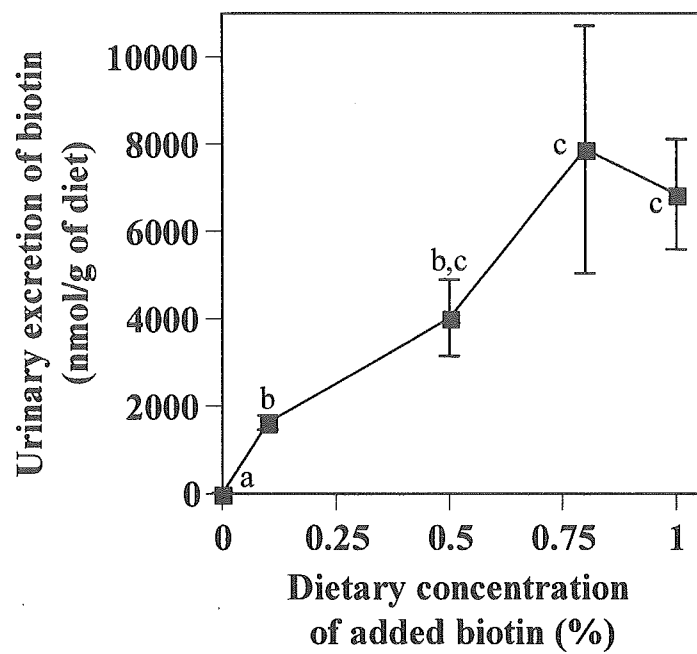


図 5. ビオチンの大量投与が尿中へのビオチン排泄量に及ぼす影響
 数値は平均値±SEM (n=4)で示した。
 異なるアルファベット間で有意差あり (p<0.05) .

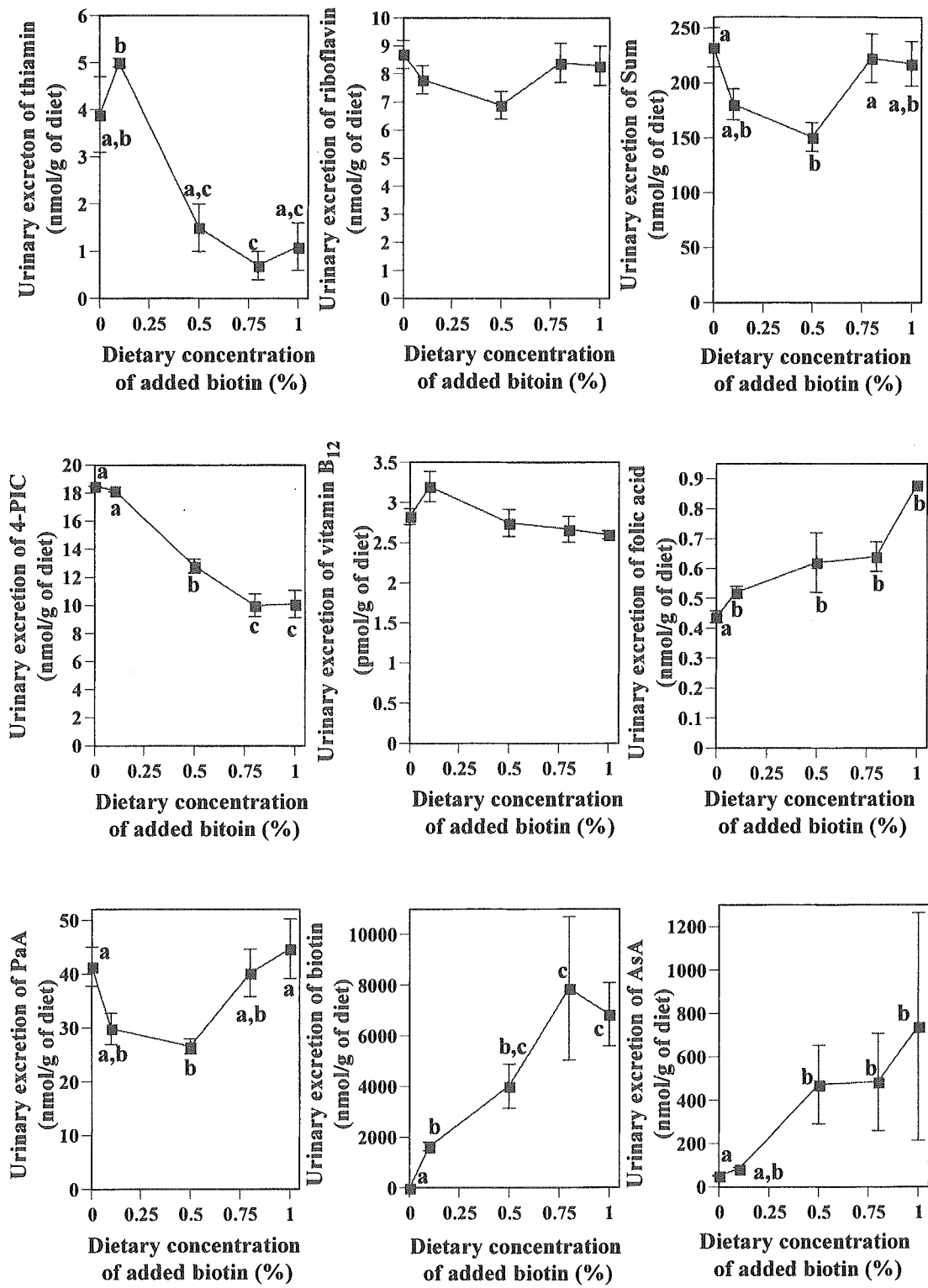


図 6. ビオチンの大量投与が B 群ビタミン代謝（尿中排泄量）に及ぼす影響
 数値は平均値±SEM (n=4) で示した。
 異なるアルファベット間で有意差あり (p<0.05) .

平成 17 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）

日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

II. 主任研究者の報告書

5. ビタミンの上限量の検討 - ピリドキシン塩酸塩 -

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

本研究では、ピリドキシン塩酸塩の上限量を考える際に必要な基礎データを得るために、ピリドキシン塩酸塩を継続的に大量摂取させた影響について、幼若ラットを用いて調べた。その結果、①ピリドキシン塩酸塩大量添加食（0.8%）において、幼若ラットの成長障害、試料摂取量の低下が認められた。②B 群ビタミン代謝では、パントテン酸においてピリドキシン塩酸塩の大量投与（0.1%添加食）による影響は認められたが、他の B 群ビタミンでは影響が認められなかった。③ラットにおいて、ピリドキシン塩酸塩を少なくとも 72mg/kg weight/日まで継続的に摂取させても悪影響は現れず、ラットの NOAEL は 72mg/kg weight /日以上であるといえた。④ラットにおいて、ピリドキシン塩酸塩を少なくとも 357mg / kg weight /日まで継続的に摂取させると悪影響は現れ、ラットの LOAEL は 357mg / kg weight /日以下であるといえた。