

## II. 主任研究者の報告書

### 2. 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

昨年度の報告書によるラットのビオチン大量投与実験では、3 週齢のラットを用いて、通常食（20% カゼイン食）に、ビオチンを対照群として 0.00002%、添加群として 0.1%、0.5%、0.8%、1.0% となるように添加し、28 日間投与した。その結果、ビオチンの毒性が予想以上に強く、全ての添加群で飼料摂取量の低下と体重増加量の遅延が認められた。そこで、本研究では、ビオチンの添加量を減らし、添加群として 0.04%、0.08%、0.1%、0.2%となるようにし、同様の実験を行った。飼料摂取量は、対照群と比較して、0.2% 添加群で有意に低値を示した。体重増加量は、対照群と 0.04% 群との間に差異は認められなかったが、0.08% 以上では有意に低い値であった。本実験結果から、0.04 %添加群を毒性が見られなかった最大飼料摂取量、0.08% 添加群を毒性が見られた最小飼料摂取量とした。これより、ラットにおけるビオチンの no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) は 38.4mg / kg body weight, lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL) は 79.2mg / kg body weight となった。

## A. 目的

ビオチンは水溶性ビタミンの一つであり、カルボキシラーゼの補酵素として、糖新生、脂肪酸合成、分岐鎖アミノ酸の代謝に関与している<sup>1-3)</sup>。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、脱毛や感染症などが引き起こされる<sup>4)</sup>。最近では、ビオチンが皮膚疾患や糖尿病に効果があるといわれており、糖尿病患者において、ビオチンの大量投与による血糖値の低下が観察されている<sup>5)</sup>。そのため、今後、サプリメントによるビオチンの過剰摂取が危惧される。また、アメリカ・カナダの食事摂取基準<sup>6)</sup>では、Zempleni<sup>7)</sup>らによる、ビオチン欠乏患者に、経口投与で200 mg / 回、静脈注射で20 mg / 回投与しても毒性は見られなかったという報告と、Paul<sup>8,9)</sup>らによる、妊娠ラットにビオチンを10 mg / 100 g body weight 投与すると、胎盤や胎児の成長を抑制したという二つの報告が記載されているが、これらのデータは上限量策定に有用なデータではないことから、ビオチンの上限量は策定されていない。

昨年度の報告書<sup>10)</sup>による、ラットのビオチン大量投与実験では、Wistar 系雄ラットを用い、通常食(20% カゼイン食)にビオチンを対照群として0.00002%、添加群として0.1%、0.5%、0.8%、1.0%となるように添加し、28日間飼育を行ったところ、全ての添加群において飼料摂取量の低下と体重増加量の遅延が見られた。また、ビオチンが大量に臓器に蓄積したことから、代謝・排泄しきれなかったビオチンが大量に臓器中

に蓄積し、その結果、毒性につながったと考えられた。そこで、本研究では、ビオチンの添加量を減じ、ラットを用いて、ビオチン大量投与実験を行った。本研究の目的は、ビオチンの大量投与が生体に与える影響を調べ、さらに、蓄積したビオチンについて解析を行うことによって、ビオチンの上限量策定が急務であるかどうか検討することである。

## B. 実験方法

### I ラットにおけるビオチン大量投与実験

#### 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(東京)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。通常食(0.00002% ビオチン食)を対照群とし、添加群として0.04%、0.08%、0.1%、0.2%となるようにビオチンを添加した。飼料と水は自由摂取とし、1日おきに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22°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)を塩酸酸性下で集めた。採尿後、尿は-20°Cで保存した。なお、本実験は、滋賀県立大学動物実験委員会の承認

を得たものである。

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、盲腸、副腎と筋肉の一部の摘出を行い、各臓器の重量を測定した。各臓器中、全血中ビオチン量および尿中ビオチン排泄量を測定した。さらに、尿はビオチン以外の水溶性ビタミン排泄量も測定した。

## 2. 分析方法

### 全血中ビオチン

結合型のビオチンを血液中のビオチンダーゼで全て自己消化させるために、採血した全血 5 ml を 37°C で 1 時間インキュベーションした。除タンパクしてビオチンを抽出するために、全血 0.05 ml に水 1 ml を加え、100°C で 5 分間加熱処理した。冷却後、9100×g、4°C で 10 分間遠心分離した上清を測定用試料とした。

### 臓器中ビオチン

各臓器 0.5 g に重量の 2 倍量の 2.25 M 硫酸を加えてホモジネートした。そのホモジネートを、121°C、1 時間オートクレーブした。冷却後、9100×g、4°C で 10 分間遠心分離した上清を測定用試料とした。

### 尿中ビオチン

800 × g、5 分間遠心分離した上清を測定用試料とした。ビオチンの分析は、Wright<sup>11)</sup>や福井ら<sup>12)</sup>の報告による、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を基に改変した、以下に記す方法にて測定した。

## 微生物定量方法

### (1)保存用培地及び斜面培地の作成

①表 1 に組成を示した「一般乳酸菌接種用培地」(日水製薬株式会社、東京) 3.96 g と、「寒天、粉末」(和光純薬工業株式会社、大阪) 1.5 g をビーカーに秤量し、水 90 ml を加え、沸騰水浴中で加熱溶解した(通常 10 分程度)。

②直ちに溶解させた培地を 50°C くらいまで自然放置させた後、水にて全容を 100 ml にした。

③②の液(冷えすぎると固まる)をねじ口試験管(16.5 mm × 105 mm, 丸底, 株式会社マルエム, 大阪) 4 ml ずつに分注し、軽くふたをした。

④オートクレーブ(121°C, 10 min)を用いて滅菌した後、平面保存用寒天培地作成の場合はそのまま立てて室温に放置して固め、継代用斜面寒天培地作成の場合は斜めにして室温に放置して固めた。作成した両寒天培地は冷蔵庫中で保存した。

### (2)接種用液体培地の作成

①表 1 に組成を示した「一般乳酸菌接種用培地」3.96 g に水 90 ml を加え、沸騰水浴中で加熱溶解した(通常 10 分程度)。

②直ちに溶解させた培地を 20°C くらいまで冷却した後、水にて全容を 100 ml にした。

③②で作成した培地を試験管(12 × 120 mm)に 5 ml ずつ分注し、アルミキャップをした。

④オートクレーブ(121°C, 10 min)を用いて滅菌した後、氷冷した。作成した液体培地は冷蔵庫中で保存した。

(3) ビオチン定量用培地の作成(当日調製)  
ビオチン定量用基礎培地(日水製薬株式会社, 東京)の組成を表 2 に示した。ビオチン定量用培地 7.7 g を秤量し, 水を 90 ml 加え, 沸騰水浴中で 10 分間加熱溶解した。直ちに氷水中で冷却後, 水にて全容を 100 ml にした。この液を定量用 2 倍濃度基礎培地とした。

#### (4) 使用菌株の継代方法と保存方法

① *Lactobacillus plantarum*, ATCC 8014 (American Type Culture Collection, USA) が植えてある「保存用平面寒天培地」から菌体を一白金耳とり, 「継代用斜面寒天培地」に塗布した。菌を繁殖させるために 37°C で 20 時間培養した。

② 活力の高い菌を得るために, 培養した「継代用斜面寒天培地」から新しい「継代用斜面寒天培地」に塗布し, 菌を繁殖させるために 37°C で 20 時間培養した。

③ 液体培地に「継代用斜面寒天培地」から一白金耳とり, 菌を繁殖させるために 37°C で 20 時間培養した。

④ 菌を保存する場合は, 液体培地で培養した菌体を一白金耳として平面保存用寒天培地に尖刺し, 37°C で 18~24 時間培養した。培養後は冷蔵し, 1 か月に 1 回植え継ぎした。

#### (5) 定量操作方法

##### (5)-1 接種用菌の作成方法

①(4)-③の操作で得た菌浮遊溶液を 1000 × g, 20°C で 5 分間遠心分離し, 沈殿部分の菌体を得た。

②菌体を 0.9 %滅菌 NaCl 5 ml に懸濁し, 遠心分離 (1000 × g, 20°C, 5 min) 後, 再び

0.9% 滅菌 NaCl 5 ml で洗浄した。この洗浄操作を計 3 回行った。

③最終的に集めた菌体に滅菌生理食塩水 5ml を加えた菌懸濁液 (660 nm の吸光度が 1.0 になるように調製すること) から 50 μl 取り, 滅菌生理食塩水 5 ml を加えた液を接種菌溶液とした。

##### (5)-2 定量方法

①表 3 に従って溶液を定量用試験管 (12 × 75 mm, 旭テクノグラス株式会社, 東京) に分注した。検量線用のビオチン標準溶液には (+)-ビオチン (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いた。検量線用, サンプル用共に 3 連で行った。

②試験管にアルミキャップをしてオートクレーブで 121°C, 5 分間, 加熱滅菌した。

③ただちに氷水中で冷却後, 各試験管に接種菌溶液を 50 μl ずつ無菌的に分注した。ビオチン標準溶液 0 μl のうち一本は欠菌とし, 接種菌溶液を分注しなかった。

④37°C で 21 時間培養した。

⑤分光光度計を 660 nm の波長にし, 欠菌の試験管で吸光度の 0 合わせを行った。

⑥全ての試験管の吸光度を測定した。(ビオチン標準溶液 0 μl (有菌) の吸光度が 0 であることを確認すること)。標準溶液の吸光度から検量線を作成し, 未知試料中の葉酸濃度を算出した。検量線は, 通常, 図 1 のようになる。

##### (6) 計算方法

まず検量線より試験溶液あたりのビオチン量 (ng / tube) を求めた。これを  $x$  とし, 尿中のビオチン量を,  $x /$  分注した試料量 (50μl) × 希釈倍率 × 1000 / 244.3 × 尿量 (ml)

より尿中ビオチン量 (nmol / day) を求めた。

#### (7) サンプルの使用法

尿は水にて適宜希釈し，そのまま測定用試料とした。通常，ヒト尿の場合は 20 倍希釈，ラット尿の場合は 15 倍希釈したものを 50  $\mu$ l 使用すれば，検量線内に入る。

### 尿中水溶性ビタミン

#### ① ビタミン B<sub>1</sub>

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<sup>13)</sup>を改変した福渡らの方法<sup>14)</sup>に従って測定した。詳細は II-6. に記載した。

#### ② ビタミン B<sub>2</sub>

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<sup>15)</sup>。詳細は II-6. に記載した。

#### ③ ビタミン B<sub>6</sub>

尿をそのまま測定用試料とした。ビタミン B<sub>6</sub> の異化代謝産物である 4-ピリドキシン酸の尿中排泄量の測定は HPLC で測定した<sup>16)</sup>。詳細は II-6. に記載した。

#### ④ ビタミン B<sub>12</sub>

尿をそのまま測定用試料とした。尿中のビタミン B<sub>12</sub> 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<sup>17)</sup>。詳細は II-3. に記載した。

#### 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 N<sup>1</sup>-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py)，N<sup>1</sup>-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<sup>18)</sup>。尿中 N<sup>1</sup>-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<sup>19)</sup>。詳細は II-6. に記載した。

#### 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<sup>20)</sup>。詳細は II-1. に記載した。

#### 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 27773 を用いた微生物定量法を用いて測定した<sup>21,22)</sup>。詳細は II-1. に記載した。

#### 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<sup>23)</sup>。詳細は II-6. に記載した。

### 3. 統計処理

結果はすべて平均値  $\pm$  標準偏差 (SEM) で表した。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。統計処理には，GraphPad Software, Inc. (San Diego, USA) から購入した GraphPad Prism 4.0 を用いた。

### II 蓄積したビオチンの解析

ビオチン大量投与ラットの肝臓約 0.1 g に 10 倍量の 50 mM リン酸カリウム緩衝液

(pH7.0) を加えてホモジネートした。そのホモジネート 50  $\mu$ l に等量の 2 $\times$  サンプルバッファー (0.25 M Tris-HCl (pH6.8) 25 ml, 2-メルカプトエタノール 5 ml, ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 2 g, スクロース 5 g, ブロモフェノールブルー 2 g) を加えたのち、100 $^{\circ}$ C で 20 分間処理した。その後、試料を、20  $\mu$ l ずつ 2 レーンに分けて SDS 電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、泳動後、一方をクマジーブリリアントブルーR-250 で染色した。また、もう一方の染色していないゲルは 5 mm  $\times$  7 mm 画分に切断した。切断したゲルに 2.25 M 硫酸 500  $\mu$ l を加えて、121 $^{\circ}$ C, 1 時間オートクレーブした。冷却後、9100  $\times$  g, 4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離した上清中のビオチン含量を測定した。ビオチンの分析は、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<sup>12)</sup>に従い、比濁法で測定した。

## C. 結果

### I ラットにおけるビオチン大量投与実験 幼若ラットの体重増加量、飼料摂取量

実験期間中の飼料摂取量、体重増加量を図 2 に示した。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。飼料摂取量において、対照群と 0.04% 添加群、0.08% 添加群および 0.1% 添加群との間に有意な差異は認められなかったが、一方、0.2% 添加群では有意に低値を示した。体重増加量においては、対照群と 0.04% 添加群との間に有意な差異は認められなかったが、0.08% 以上の添加群では有意

に低値を示した。

### 臓器重量

ビオチンの大量投与が臓器重量に及ぼす影響を表 2 に示した。脳、心臓は、対照群と 0.04% 添加群、0.08% 添加群、0.1% 添加群との間に差異は認められなかったが、0.2% 添加群で有意に増大した。肝臓は、対照群と 0.04% 添加群との間に有意な差異は認められなかったが、0.08% 以上の添加群で有意に増大した。腎臓、肺、脾臓、精巣、副腎において対照群と添加群との間に有意な差異は認められなかった。

### 筋肉・肝臓中ビオチン

ラットの筋肉中ビオチン含量を図 3 に、肝臓中ビオチン含量を図 4 に示した。筋肉中ビオチン含量は 0.04% 以上の添加群で、対照群と比較して有意に増加した。肝臓中ビオチン含量は、対照群と比較して、0.04% 添加群、0.08% 添加群、0.1% 添加群との間に差異は認められなかったが、0.2% 添加群で有意に高値を示した。どちらの組織中にも、ビオチン大量投与によるビオチンの蓄積が見られた。

### 血液中ビオチン

血液中のビオチン含量を図 5 に示した。血液中ビオチン量は、対照群と比較して 0.04% 以上の添加群で、有意に増加した。

### 尿中ビオチン排泄量

尿中ビオチン排泄量を図 6 に示した。尿中ビオチン排泄量はビオチン摂取量に依存して増加した。

### 脾臓、腎臓、脳、心臓、肺、副腎、盲腸、 精巣中ビオチン

脾臓、腎臓、脳、心臓、肺、副腎、盲腸、

精巢中ビオチン含量を図7に示した。腎臓、精巢、脳、心臓、肺中ビオチン量は、対照群と比較して、0.04%以上の添加群で有意に増加した。脾臓、盲腸、副腎中ビオチン含量は、対照群と0.04%添加群、0.08%添加群、0.1%添加群との間に差異は認められなかったが、0.2%添加群で有意に高い値となった。ビオチン以外の尿中水溶性ビタミン排泄量

ビオチンの大量投与がビオチン以外の尿中水溶性ビタミン排泄量におよぼす影響を図8に示した。尿中チアミン排泄量は、対照群と0.04%添加群との間に有意な差異は認められなかったが、0.08%以上の添加群で有意に低値を示した。尿中ナイアシン異化代謝産物排泄量は、対照群と0.04%添加群、0.08%添加群との間に有意な差異は認められなかったが、0.1%以上の添加群で有意に低値を示した。尿中パントテン酸排泄量は、対照群と0.04%添加群、0.08%添加群、0.1%添加群との間に有意な差異は認められなかったが、0.2%添加群で有意に高い値となった。尿中葉酸排泄量は、対照群と0.04%添加群との間に有意な差異は認められなかったが、0.08%以上の添加群で有意に高い値となった。尿中リボフラビン排泄量、尿中B<sub>6</sub>以下代謝産物排泄量、尿中シアノコバラミン排泄量、尿中アスコルビン酸排泄量においては、対照群と添加群との間に有意な差異は認められなかった。

以上の結果より、今回測定した全ての組織において、ビオチン大量投与によるビオチンの蓄積が見られた。

## II 蓄積したビオチンの解析

肝臓には様々な分子量のタンパク質が存在しているので、ビオチンがどのタンパク質と結合しているのか調べてみた。肝臓中に蓄積していたビオチンのうち、9.8%は分子量が約130,000のタンパク質と結合しており、27.5%は分子量が約25,000のタンパク質と結合していた(図9)。

## D. 考察

### I ラットにおけるビオチン大量投与実験

試料摂取量、体重増加量、全血・筋肉・肝臓・脳・心臓・肺・脾臓・副腎・腎臓・盲腸・精巢中ビオチン含量、尿中ビオチン排泄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。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、蓄積した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、ビオチン以外の水溶性ビタミンの尿中排泄量に及ぼす影響については、尿中チアミン排泄量、尿中ナイアシン異化代謝産物排泄量、尿中パントテン酸排泄量、尿中葉酸排泄量において、ビオチンの大量投与による影響が見られ、他の水溶性ビタミンの代謝に何らかの影響を及ぼしたと考えられる。

体重増加量において、0.04%添加群では影響が見られず、0.08%以上の添加群で影響が見られたことから、0.04%添加群を、ラットにおいて過剰毒性が見られなかった最大飼料摂取量、0.08%添加群を、過剰毒性が見ら

れた最小飼料摂取量とした。これより、ラットのビオチン摂取量と最終日の体重から、ラットにおけるビオチンの no-observed-adverse-effect-level (NOAEL), lowest-observe-adversed-effect-level (LOAEL) を算出し、NOAEL は 38.4mg / kg body weight, LOAEL は 78.2 mg / kg body weight とした。

## II 蓄積したビオチンの解析

肝臓中に蓄積したビオチンのうち、約40%がタンパク質と結合していたと考えられ、組織中に蓄積したビオチンが何らかのタンパク質と共有結合していると考えられた。最近、ヒストンのビオチン化が、細胞増殖への反応性を増加させると報告されている<sup>24)</sup>。本研究でも、ビオチンが結合したタンパク質の機能が影響されたことにより、毒性が顕在化したのではないかと推測された。

以上のことより、ビオチンの毒性が非常に強く、蓄積したビオチンがタンパク質と結合し、何らかの悪影響を与えた可能性が推測されたことから、早急にビオチンの上限量策定の検討を行う必要があると考えられた。

## 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

澤村弘美, 福渡努, 柴田克己 第45回日本栄養・食糧学会近畿支部大会(武庫川女子大学) 2006年10月28日 ビオチンの

過剰投与に関する研究

## 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) 橋本隆 (1980) ビタミン学 (日本ビタミン学会編), pp.437-76, 東京化学同人, 東京
- 2) 渡辺敏明 (1996) ビタミンの辞典 (日本ビタミン学会編), pp.307-10, 朝倉書店, 東京
- 3) 古川勇次 (2002) ビタミン研究のブレイクスルー—発見から最新の研究まで— (日本ビタミン学会編), pp.231-50, 学進出版, 大阪
- 4) 成沢邦明 (1980) ビタミン学II (日本ビタミン学会編), pp.473, 東京化学同人, 東京
- 5) John CC, John PH, Martin CR, Herman B (1985) Biotin status and plasma glucose in diabetics. *Ann NY Acad Sci* **447**, 389-92.
- 6) Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (1998) The B vitamins and choline: overview and methods. *In: Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes: For thiamine, riboflavin, niacin, vitamin B<sub>6</sub>, folate, vitamin B<sub>12</sub>, pantothenic Acid, biotin, and choline.* National Academy Press,



- Washington, DC. pp.384-85.
- 7) Zempleni J, Mock DM (1998) Bioavailability of biotin given orally to humans in pharmacologic doses. *Am J Clin Nutr* **69**, 504-8.
  - 8) Paul PK, Duttagupta PN (1975) The effect of acute dose of biotin at the pre-implantation stage and its relation with female sex steroids in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol* **21**, 89-101.
  - 9) Paul PK, Duttagupta PN (1976) The effect of acute dose of biotin at the post-implantation stage and its relation with female sex steroids in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol* **22**, 181-6.
  - 10) 平成 17 年厚生労働科学研究費補助金循環器疾患等総合研究事業 (2006) 日本人の食事摂取基準 (栄養所要量) の策定に関する研究 平成 17 年度 総括・分担研究報告書.
  - 11) Wright LD, Skeggs HR (1944) Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*. *Proc Soc Exp Biol Med* **56**, 95-8.
  - 12) Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y (1994) Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* **40**, 491-8.
  - 13) Kimura M, Fujita T, Itokawa Y (1982) Liquid chromatographic determination of total thiamin content of blood. *Clin Chem* **28**, 29-31.
  - 14) 福渡努, 鈴浦千絵, 佐々木隆造, 柴田克己 (2004) 代謝攪乱物質ビスフェノール A のトリプトファンニコチンアミド転換経路の攪乱作用部位. *食衛誌* **45**, 231-8.
  - 15) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1983) New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol Chem* **258**, 5623-8.
  - 16) Gregory JF, Kirk JR (1979) Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin. Nutr* **32**, 879-83.
  - 17) Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, Nakano Y (1998) Biological activity of hydroxo-vitamin B<sub>12</sub> degradation product formed during microwave heating. *J Agric Food Chem* **46**, 5177-80.
  - 18) Shibata K, Kawada T, Iwai K (1988) Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N<sup>1</sup>-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **424**, 23-8.
  - 19) Shibata K (1987) Ultramicro-determination of N<sup>1</sup>-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)* **61**, 599-604.
  - 20) Skeggs HR and Wright LD (1944), The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem* **156**, 21-6.
  - 21) Tamura T (1990) Microbiological assays of

- folates. In *Folic acid metabolism in Health and Disease. Contemporary Issues in Clinical Nutrition*, vol.13 (Picciano MF, Stolstad ELR, Gregory JF III, eds) pp. 121-37, Wiley-Liss, New York, USA
- 22) Tamura T. Determination of food folate. *J Nutr Biochem*, 9, 285-93, 1998.
- 23) Kishida K, Nishimoto Y, Kojo S (1992)  
Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* **64**, 1505-7.
- 24) Rodriguez-Melemedez R, Zempleni J (2003)  
Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem* **14**, 680-90.

表1 一般乳酸菌用摂取培地 組成

39.6g (1L分) 中

酵母エキス	5.5 g	酢酸ナトリウム	10.0 g
ペプトン	12.5 g	硫酸マグネシウム	0.1 g
ブドウ糖	11.0 g	硫酸マンガン	5.0 mg
リン酸二水素カリウム	0.25 g	硫酸第一鉄	5.0 mg
リン酸一水素カリウム	0.25 g		

表2 ビオチン定量用基礎培地 組成

全量 1L分

カザミノ酸	14 g	ニコチン酸	1 mg
L-シスチン	400 mg	塩酸ピリドキシン	800 µg
DL-トリプトファン	200 mg	リン酸二水素カリウム	1 g
硫酸アデニン	20 mg	リン酸一水素カリウム	1 g
塩酸グアニン	20 mg	硫酸マグネシウム	400 mg
ウラシル	20 mg	硫酸第一鉄	20 mg
塩酸チアミン	200 µg	硫酸マンガン	20 mg
リボフラビン	400 µg	酢酸ナトリウム(無水)	20 g
パラアミノ安息香酸	200 µg	ブドウ糖	40 g
パントテン酸	400 µg		

表3 ビオチンの定量操作方法（全量 2ml）

試験管 No.	ビオチン量 (ng / tube)	2倍濃度基礎培地 (ml)	1ng/ml ビオチン標準液 またはサンプル(μl)	0.5M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 緩衝液, pH7.0 (μl)	水 (μl)
1	0	1	0	200	800
2	0.02	1	20	200	780
3	0.04	1	40	200	760
4	0.06	1	60	200	740
5	0.08	1	80	200	720
6	0.1	1	100	200	700
サンプル	x	1	50	200	750

表 4 飼料組成

	対照群	ビオチン添加群			
		0.04%	0.08%	0.1%	0.2%
カゼイン	20	20	20	20	20
L-メチオニン	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
$\alpha$ -コーンスターチ	46.9	46.9	46.9	46.9	46.9
スクロース	23.4	23.4	23.4	23.4	23.4
コーン油	5	5	5	5	5
ミネラル mix (AIN-93M MX)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
ビタミン mix (AIN93-VX)	1	1	1	1	1
添加した D-biotin ( $\mu$ g/上記飼料 100g)	0	40	80	100	200

表 5 ビオチンの大量投与がラットの臓器重量 (g / 100g body weight) に及ぼす影響

	対照群	ビオチン添加群			
		0.04%添加群	0.08%添加群	0.1%添加群	0.2%添加群
脳	0.90 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.95 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	1.14 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.24 $\pm$ 0.06 <sup>a,b</sup>	1.65 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>
心臓	0.46 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.43 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.45 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.47 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.56 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
腎臓	0.98 $\pm$ 0.02 <sup>a,b</sup>	0.97 $\pm$ 0.01 <sup>a,b</sup>	0.84 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	1.10 $\pm$ 0.01 <sup>a,b</sup>	1.23 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
肺	0.86 $\pm$ 0.06	0.73 $\pm$ 0.03	0.78 $\pm$ 0.04	0.84 $\pm$ 0.03	0.80 $\pm$ 0.03
脾臓	0.36 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.00	0.40 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.02
精巣	1.11 $\pm$ 0.14	1.29 $\pm$ 0.01	1.53 $\pm$ 0.10	1.61 $\pm$ 0.04	1.97 $\pm$ 0.12
肝臓	5.44 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	5.99 $\pm$ 0.10 <sup>a,b</sup>	5.78 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	5.64 $\pm$ 0.21 <sup>b,c</sup>	6.13 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup>
副腎	0.02 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.00

数値は平均値  $\pm$  SEM (n=4) で示した。

異なるアルファベット間で有意差あり。

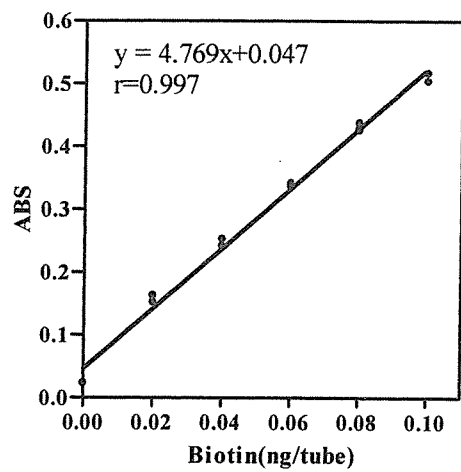


図1 ビオチン標準に対する *Lactobacillus Plantarum* ATCC 8014 のレスポンス (検量線の一例)

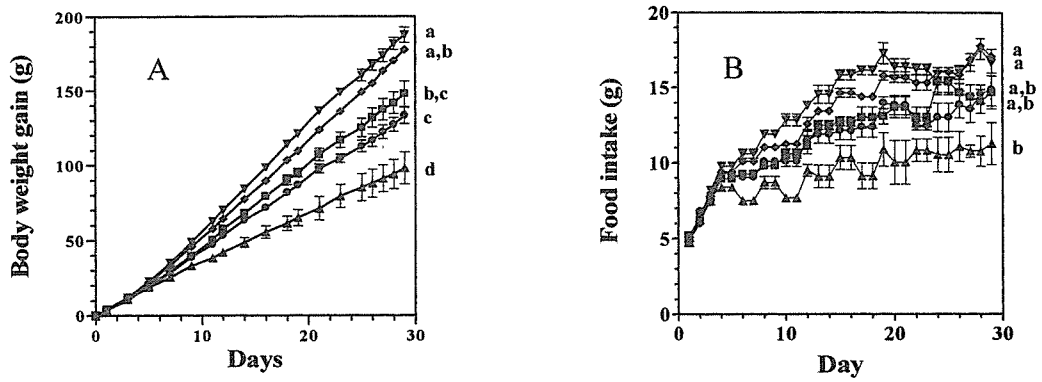


図2 ビオチンの大量投与が幼若ラットの体重増加量と (A) と飼料摂取量 (B) に及ぼす影響

▼ : 対照群, ◆ : 0.04% ビオチン添加群, ■ : 0.08% ビオチン添加群, ● : 0.1% ビオチン添加群, ▲ : 0.2% ビオチン添加群.

数値は平均値  $\pm$  SEM (n=4) で示した.

異なるアルファベット間で有意差あり.

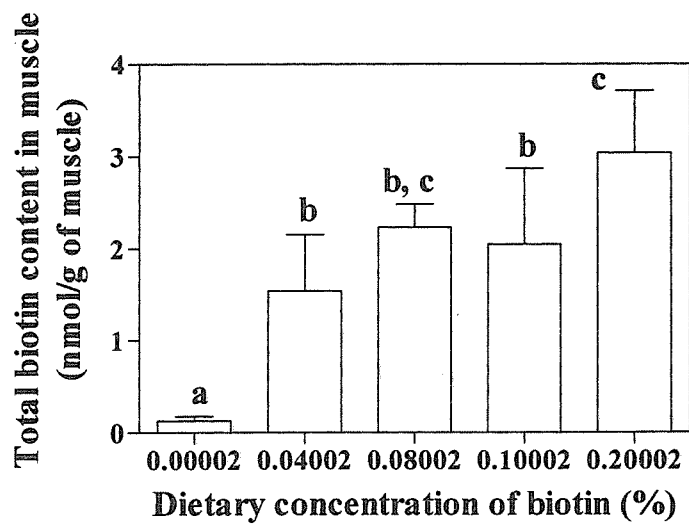


図3 ビオチンの大量投与がラット筋肉中のビオチン含量に及ぼす影響

数値は平均値  $\pm$  SEM (n=4) で示した.

異なるアルファベット間で有意差あり.

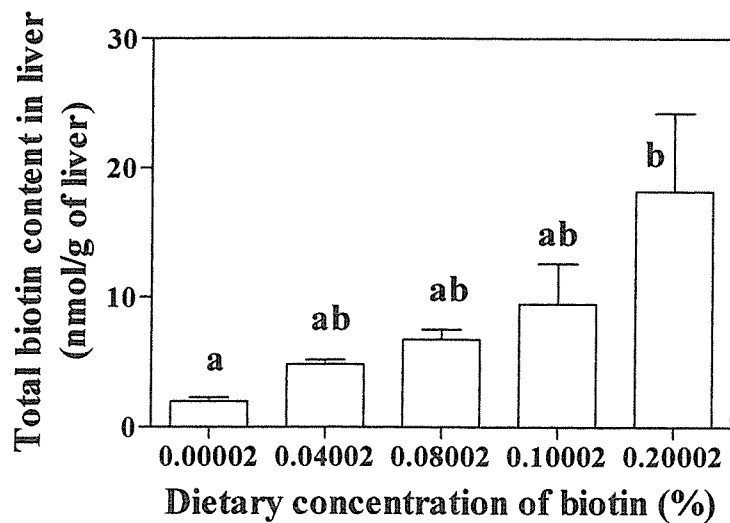


図4 ビオチンの大量投与が肝臓中のビオチン含量に及ぼす影響  
 数値は平均値 ± SEM (n=4)で示した。  
 異なるアルファベット間で有意差あり。

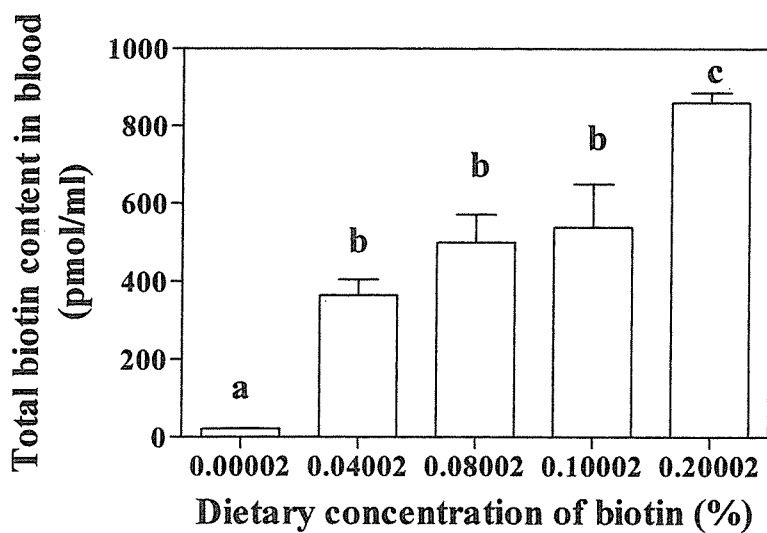


図5 ビオチンの大量投与が全血中のビオチン含量に及ぼす影響  
 数値は平均値 ± SEM (n=4)で示した。  
 異なるアルファベット間で有意差あり。



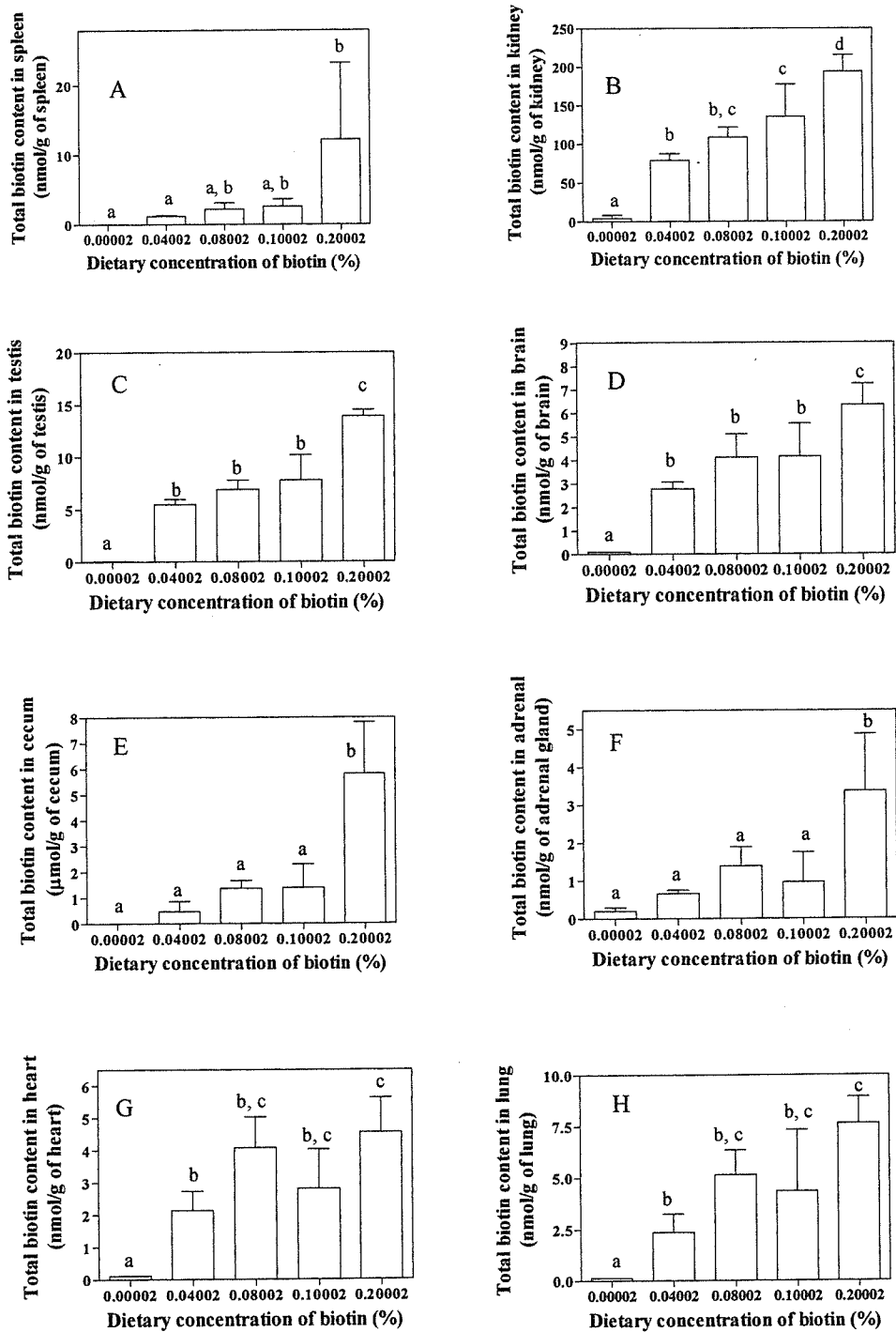


図 6 ビオチンの大量投与が脾臓 (A), 腎臓 (B), 精巣 (C), 脳 (D), 盲腸 (E), 副腎 (F), 心臓 (G), 肺 (H) 中ビオチン含量に及ぼす影響  
 数値は平均値 ± SEM (n=4)で示した。  
 異なるアルファベット間で有意差あり。

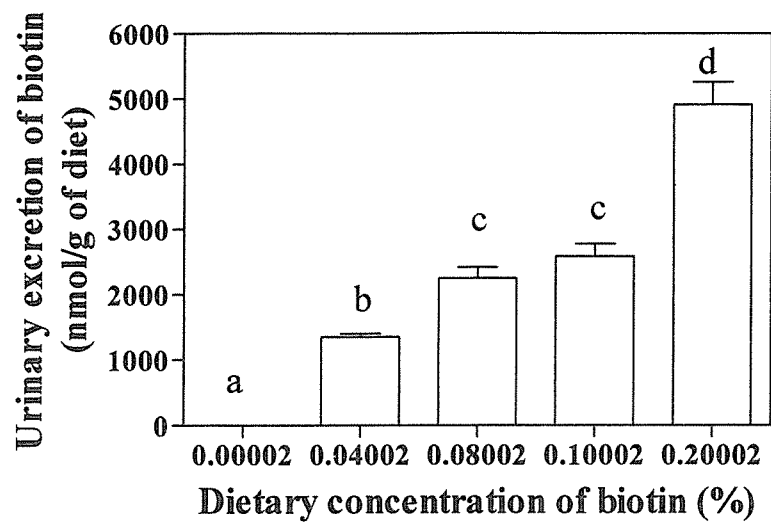


図7 ビオチンの大量投与が尿中ビオチン排泄量に及ぼす影響

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。

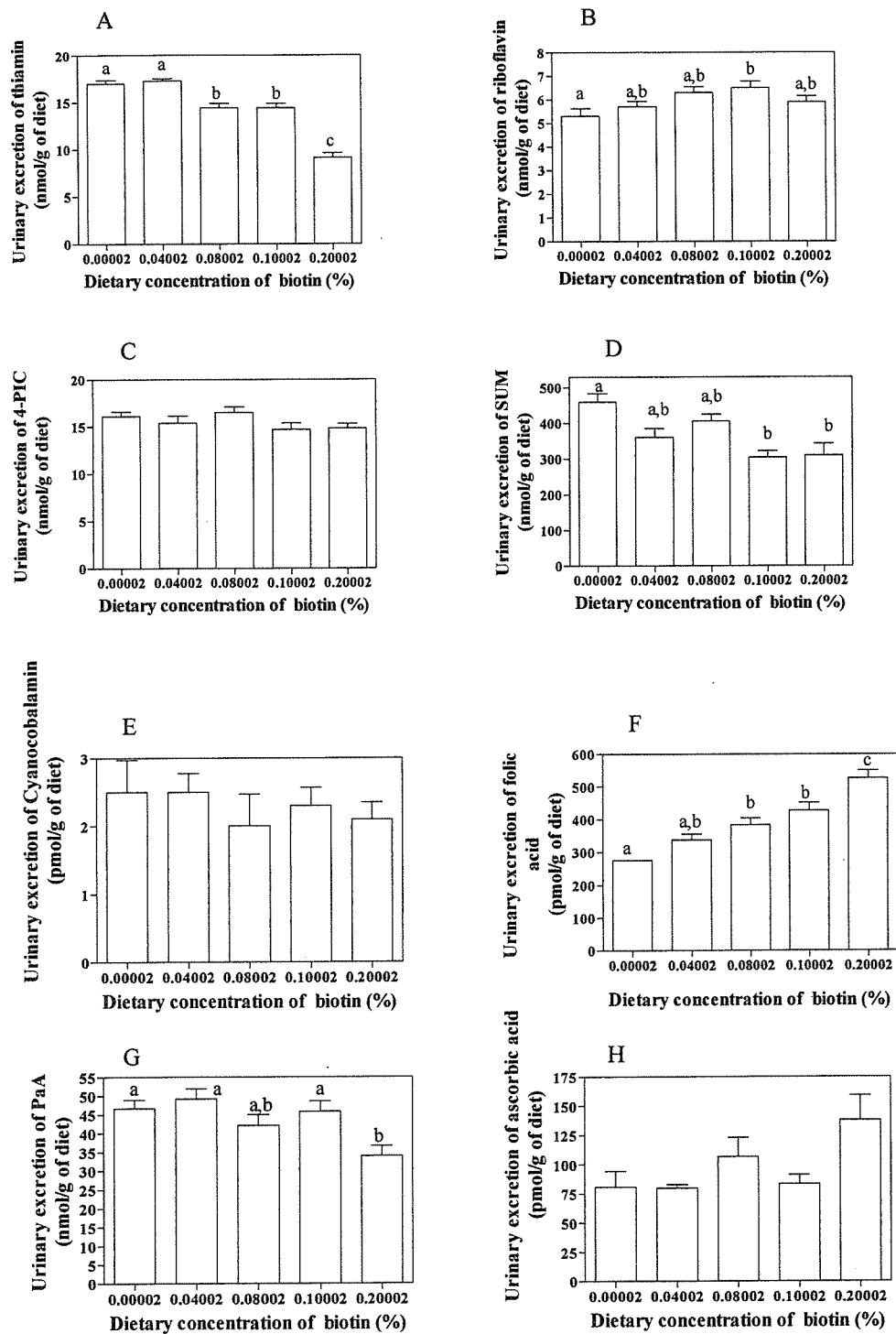


図8 ビオチンの大量投与がビオチン以外の尿中水溶性ビタミン排泄量に及ぼす影響  
 チアミン (A), リボフラビン (B), B<sub>6</sub>異化代謝産物 (C), ナイアシン異化代謝産物 (D),  
 シアノコバラミン (E), 葉酸 (F), パントテン酸 (G), アスコルビン酸 (H)  
 数値は平均値 ± SEM (n=4)で示した。  
 異なるアルファベット間で有意差あり。

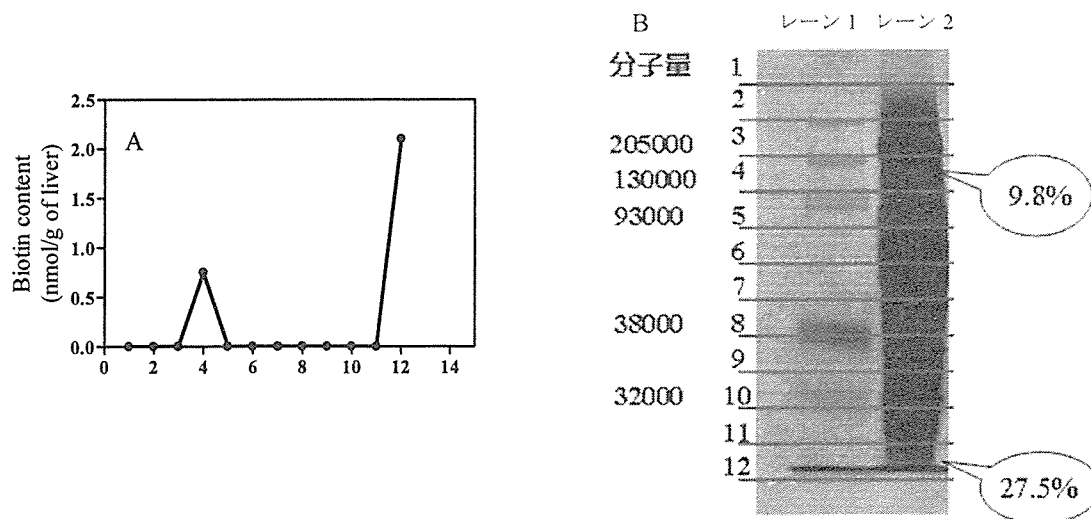


図9 SDS-PAGEで分離したゲル中のビオチン含量 (A) とその分画区分 (B)

レーン1：分子量マーカー

レーン2：肝臓ホモジネートをクマジーブリリアントブルーR-250で染色した

※ビオチンの定量には染色していないゲルを用いた。