

ビオチンサプリメントの過剰摂取による胎児発育への影響

永井良子¹⁾, 榎原周平²⁾, 福井 徹³⁾, 渡邊敏明¹⁾

¹⁾兵庫県立大学環境人間学部食環境解析学教室*,

²⁾兵庫県立大学環境人間学部栄養生理学教室**, ³⁾病体生理研究所***)

Effects of Excess Intake of Biotin on Embryonic Development in Mice

Yoshiko NAGAI¹⁾, Shuhei EBARA²⁾, Toru FUKUI³⁾ and Toshiaki WATANABE¹⁾

¹⁾Department of Dietary Environmental Analysis,

²⁾Department of Nutritional Physiology, School of Human Science and Environment,

Himeji Institute of Technology, University of Hyogo,

³⁾Byotai Seiri Laboratory

Summary

This study was conducted to examine the effects of excessive biotin intake during gestation on the reproductive performance in mice. There were no changes in the weight and relative weight of organs in the biotin-excessive dams, which did not exhibit any overt signs of skin. However, the fetal body weight and length were significantly decreased by excessive biotin intake. The biotin concentration in the liver and amniotic fluid in fetuses was higher, compared to that in their dams with an excessive biotin intake. This indicates that much more biotin was easily transported to the fetuses from the dams. In addition, many kinds of external malformations were observed in these fetuses. The predominant malformations were micrognathia, micromelia and edema. However, cleft palate which is induced by biotin deficiency was not induced. These findings demonstrate that in mice the fetuses are more sensitive to excessive biotin intake during gestation than their dams.

ビタミンなどの栄養素を含有するサプリメント (dietary supplements) が、健康の維持や増進の目的で利用されている。しかし、必要量以上に摂取することによる影響も懸念されている。食事摂取基準 2005 年版では、過剰摂取を防ぐために上限量が策定されているビタミンもある¹⁾。

水溶性ビタミンの1つであるビオチンは、生体内でカルボキシラーゼの補酵素として炭酸固定反応に関与し、糖新生やアミノ酸代謝、脂肪酸合成に関わっている^{2,3)}。欠乏すると皮膚炎や脱毛を引き起こす。また、ビオチンは胎児の形態形成において重要な役割を担っていることが知られている⁴⁻⁷⁾。食事摂取基準 2005 年版では、ビオチンの目安量は 45 μg /日であり、妊婦ではさらに付加量 2 μg /日が設定されている。なお、上限量は策定されていない。

食品中のビオチンは、ビオチニン (ビオチニルリジン)、ビオチニルペプチド、あるいはタンパク質が結合した状態で存在している。これらは腸管でビオチニダーゼにより分解され遊離型となり、小腸粘膜で吸収される。一方、サプリメントに含まれるビオチンは、遊離型であるため吸収さ

れやすい。生体内においてビオチンは、遊離型あるいはタンパク質やペプチドと共有結合した結合型で存在している^{8,9)}。遊離型ビオチンは、ホロカルボキシラーゼ合成酵素によりカルボキシラーゼと結合し、補酵素として機能している¹⁰⁾。従って、生体内で遊離型ビオチンは利用型、結合型ビオチンはカルボキシラーゼも含めて貯蔵型と考えられる。

先天性のビオチニダーゼ欠損症やマルチプルカルボキシラーゼ欠損症、あるいは食事性のビオチン欠乏症なども含め、ビオチン欠乏については古くから多くの報告がある。また、ビオチン欠乏の妊娠マウスでは、ビオチン欠乏の早期指標である尿中 3-hydroxyisovaleric acid (3-HIA) 排泄量が増加し、胎児の口蓋裂、小顎症および短肢症などの形態異常が発症すると報告されている¹¹⁾。一方、ビオチンの過剰摂取による生体影響に関する報告は少ない。健常人が食事から摂取するビオチン量の 600 倍以上を経口もしくは静脈投与しても、副作用は報告されていない¹²⁾。また、Erik は雌ラットの生殖能力に影響はないと報告している¹³⁾。し

*,**所在地：姫路市新在家本町 1-1-12 (〒670-0092)

***所在地：東京都板橋区熊野町 47-11 (〒173-0025)

かし、Poul は、妊娠ラットの胎盤や胎児の成長抑制を報告している¹⁴⁾。また、非妊娠動物であるが、過剰ビオチン摂取（ビオチン1% 添加飼料）によって、肝臓中に蓄積したビオチンがタンパク質の機能に影響を及ぼし、毒性が顕在化する可能性を報告されている¹⁵⁾。このように、ビオチンの過剰摂取が母体や胎児発育に影響する可能性があるが十分に検討されていない。そこで、本研究では妊娠マウスを作成し、ビオチン過剰状態における母体および胎児発育への影響について検討した。

実験方法

1. 実験動物

Jcl:ICR 系の8週齢雌性マウス（日本クレア(株)、東京）を実験に用いた。室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明暗サイクル12時間（明サイクル：9:00–21:00）で飼育した。1週間の予備飼育後、同系の雄性マウスと短時間交配（9:00–11:00）させ、妊娠マウスを作成した。一般飼育飼料として使用しているCE-2のビオチン含量は0.00004%である。これまでの非妊娠動物の結果から、ビオチン過剰群としてビオチン0.1%および1% 添加群を設定した。対照飼料と比べ、ビオチン含量は、0.1% 飼料の場合が2,500倍、1% 飼料の場合が25,000倍である。各群11~14匹として、対照群（CE-2）、ビオチン0.1% 添加群、ビオチン1% 添加群にランダムに分けた。ビオチン添加飼料は、CE-2にD-ビオチン（DSM ニュートリションジャパン(株)、東京）を0.1% もしくは1% 添加した飼料を用いた。また、糞食を防ぐため、ステンレス網の中敷のあるプラスチックケージ（日本クレア(株)、東京）で飼育した。妊娠確認日を妊娠0日とし、妊娠17日から絶食させ、妊娠18日に屠殺した。

2. 試料採取

妊娠0, 4, 8, 12, 16日に代謝ケージ（日本クレア(株)、東京）を用いて24時間尿を採取し、妊娠0, 8, 16日に糞便を採取した。屠殺した母体から、血清、羊水、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、心臓、肺、大脳、小脳を採取した。胎児は体重を測定した後、肝臓、脳を採取した。また、一部の胎児は、ブアン固定して外表の観察、あるいは70% エタノールで固定し骨格標本を作成した。

なお、動物実験は「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」（昭和55年3月総理府告示第6号、一部改正平成14年5月28日）に従って行った。

3. 測定方法

血清、肝臓、羊水、尿および糞便中ビオチンは、既報に基づいて前処理をし、微生物学的定量法で測定した¹⁶⁾。酸加水分解して測定した試料中のビオチンを総ビオチン量とし、酸加水分解を行わないビオチンを遊離型とした。総ビオチン量に対する遊離型ビオチン量の割合を遊離ビオチン率とし、総ビオチン量と遊離ビオチン量の差を結合型ビオ

チン量とした。総タンパク質はBCA (Bicinchoninic acid) 法により測定した。

4. 統計学的解析

データの集計・解析にはExcel 2003 (Microsoft) を用いた。分析値は、すべて平均値±標準偏差 (SD) で示した。統計処理には、統計ソフトExcel 統計Statcel 2を用いた。 $P < 0.05$ を統計学的に有意な差異があると判定した。

実験結果

母体の体重増加量は各群間に有意な差はなかった (Table 1)。飼料摂取量は妊娠12日までは各群間に差異はなかったが、妊娠16日では、対照群と比較してビオチン1% 添加群で有意に低値を示した (Fig. 1)。母体には皮膚炎や脱毛などの臨床的徴候はみられなかった。また、母体の臓器の相対重量に有意な差はみられなかった (Table 2)。

母体の血清中ビオチン濃度は、対照群 (0.25 ± 0.50 nmol/mL) と比較し、ビオチン1% 添加群 (31.4 ± 8.64 nmol/mL) で有意に高値を示した (Fig. 2)。遊離ビオチン率は、対照群で16.6% であるのに対し、ビオチン添加群ではほとんどのビオチンが遊離型の状態で存在していた。母体の肝臓中の総ビオチン濃度はビオチン添加量の増加に伴って上昇した (Fig. 3)。しかし、結合型ビオチン濃度は、対照群 (20.7 ± 4.5 nmol/g of protein) およびビ

Table 1 Effects of maternal biotin on reproduction in mice

Dietary groups	Control	0.1%	1%
No. of dams examined	12	11	14
Body weight gain of dams, g	23.1 ± 3.4^1	21.9 ± 7.0	20.8 ± 5.4
No. of live fetuses	158	147	184
	13.1 ± 2.3	13.4 ± 4.6	13.2 ± 3.6
No. of resorption sites	0	4	5
Embryonic death	0	1	2
Fetal weight *, g	1.23 ± 0.10^a	1.18 ± 0.11^b	1.19 ± 0.13^b
Crown-rump length of fetuses*, mm,	23.4 ± 1.0^c	22.7 ± 1.3^d	21.7 ± 1.7^e

¹Values are means \pm SD.

* $P < 0.05$ (one-way ANOVA).

ab, c-e $P < 0.05$ (Tukey-Kramer).

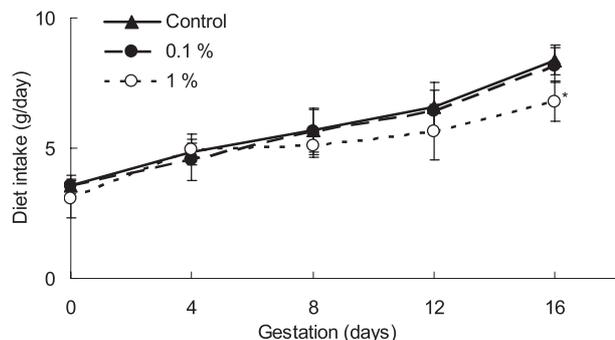


Fig. 1 Diet intake in control and biotin-supplemented dams. means \pm SD.

* $P < 0.05$ (one-way ANOVA).

Table 2 Relative weight in control and biotin-supplemented dams

Relative weight (g%)	Dietary groups		
	Control	0.1 %	1 %
Liver	4.29 ± 0.40	4.18 ± 0.29	4.28 ± 0.50
Kidney	0.81 ± 0.09	0.80 ± 0.04	0.85 ± 0.16
Pancreas	0.10 ± 0.07	0.08 ± 0.03	0.15 ± 0.10
Spleen	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.07
Heart	0.26 ± 0.03	0.25 ± 0.01	0.27 ± 0.05
Lung	0.34 ± 0.04	0.29 ± 0.03	0.35 ± 0.09
Cerebrum	0.62 ± 0.09	0.61 ± 0.06	0.70 ± 0.15
Cerebellum	0.27 ± 0.04	0.25 ± 0.06	0.25 ± 0.04
Bowel	5.25 ± 0.63	5.31 ± 0.38	5.19 ± 1.07

Means ± SD.

オチン 0.1% 添加群 (21.6 ± 5.6 nmol/g of protein) に比べ、ビオチン 1% 添加群 (6.6 ± 8.6 nmol/g of protein) で有意に低値を示した。母体の羊水中ビオチン濃度は、対照群 (0.48 ± 0.70 nmol/mL) と比較し、ビオチン 1% 添加群 (132.4 ± 59.6 nmol/mL) で有意に高値を示した (Fig. 4)。また、遊離ビオチン率は、対照群で 48.3%，ビオチン 0.1% 添加群で 106.9%，ビオチン 1% 添加群で 123.0% であり、ビオチン添加群では遊離型で存在していた。

尿中ビオチン排泄量は、ビオチン添加量の増加に伴い高

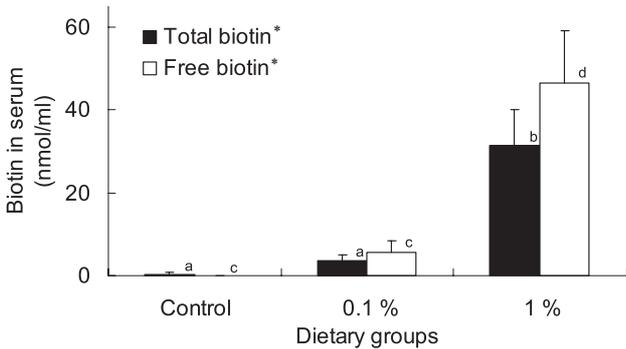


Fig. 2 Biotin concentration in serum in control and biotin-supplemented dams. means ± SD. * $P < 0.05$ (one-way ANOVA). $^{ab,cd}P < 0.05$ (Tukey-Kramer).

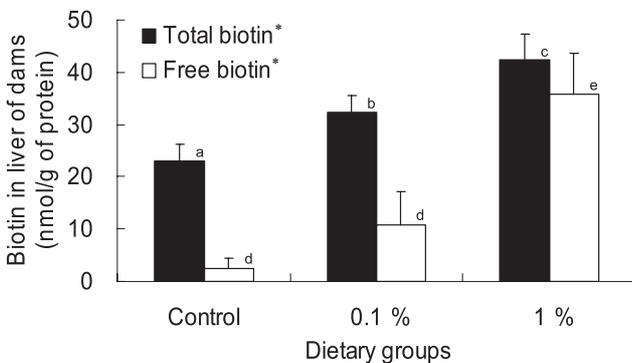


Fig. 3 Biotin concentration in liver in control and biotin-supplemented dams. means ± SD. * $P < 0.05$ (one-way ANOVA). $^{a-c,de}P < 0.05$ (Tukey-Kramer).

値を示した (Fig. 5)。対照群において経時的変化はなかったが、ビオチン 1% 添加群において妊娠 12 日以降に増加した。糞便中ビオチン量は、ビオチン添加量の増加量に伴い高値を示した (Fig. 6)。また、対照群において経時的変化はなかったが、ビオチン添加群において妊娠経過に伴っ

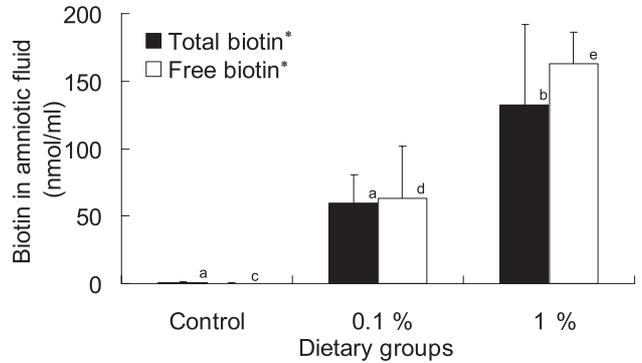


Fig. 4 Biotin concentration in amniotic fluid control and biotin-supplemented dams. means ± SD. * $P < 0.05$ (one-way ANOVA). $^{ab,c-e}P < 0.05$ (Tukey-Kramer).

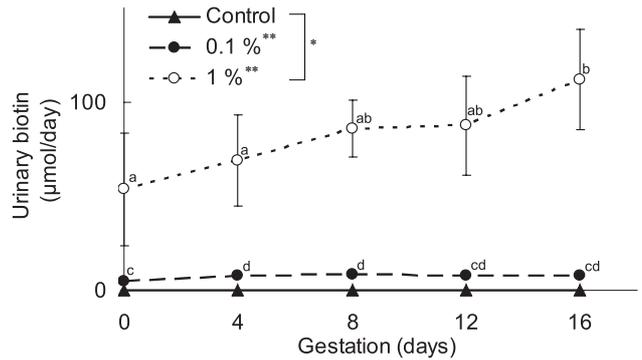


Fig. 5 Effect of excessive biotin-intake on urinary excretion of biotin in mice. means ± SD. * $P < 0.05$ (two-way ANOVA). ** $P < 0.05$ (one-way ANOVA). $^{ab,cd}P < 0.05$ (Tukey-Kramer).

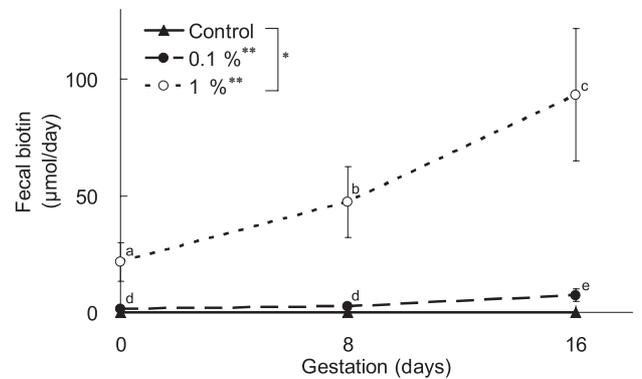


Fig. 6 Effect of excessive biotin-intake on fecal excretion of biotin in mice. means ± SD. * $P < 0.05$ (two-way ANOVA). ** $P < 0.05$ (one-way ANOVA). $^{a-c,de}P < 0.05$ (Tukey-Kramer).

て増加した。

胎児数は、ビオチン過剰摂取による影響はなかったが、胎児体重および頭臀長が減少した (Table 1)。ビオチン 1% 添加群の胎児において、短肢症 (前肢) (53.3%) や小顎症 (34.8%)、浮腫 (31.5%) が有意に高頻度でみられた。また、頭部の異常や脊椎前湾 (8.7%) の形態異常があった (Table 3) (Fig. 7)。

Table 3 Incidences of gross congenital malformations in fetuses of biotin-supplemented mice

Incidences of malformations (%)	Dietary groups		
	Control	0.1%	1%
Microcephaly*	0.0	11.9	6.5
Hydrocephaly*	0.0	3.0	7.6
Open eyelids*	0.0	0.0	4.3
Low-set ear	0.0	0.0	1.1
Micrognathia*	1.4	11.9	34.8
Macroglossia	1.4	1.5	2.2
Cleft palate	0.0	0.0	1.1
Forelimb hypoplasia*	0.0	22.4	53.3
Hindlimb hypoplasia*	0.0	4.5	15.2
Syndactyly	0.0	0.0	1.1
Brachydactyly	0.0	0.0	1.1
Hernia	0.0	0.0	1.1
Short tail	0.0	1.5	3.3
Analatresia	0.0	0.0	3.3
Hematoma	0.0	1.5	0.0
Edema*	0.0	0.0	31.5
Lordosis*	0.0	0.0	8.7

* $P < 0.05$ (χ^2 -test).

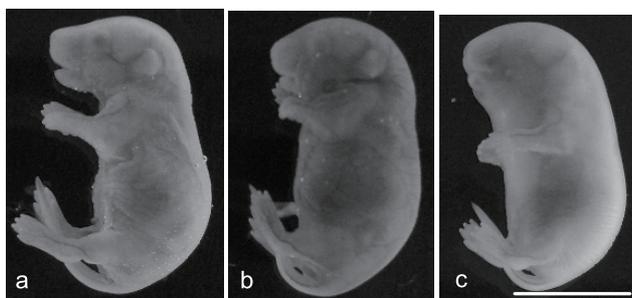


Fig. 7 Representative fetuses observed in the biotin excessive group.
a, control; b and c, biotin-excessive fetuses showing micrognathia micromelia and edema Scale bar, 10mm.

胎児の肝臓中ビオチン濃度は、対照群 ($0.019 \pm 0.002 \mu\text{mol/g}$ of protein) と比較し、ビオチン 1% 添加群 ($3.1 \pm 2.1 \mu\text{mol/g}$ of protein) で有意に高値を示した (Fig. 8)。遊離ビオチン率をみると、対照群の 24.9% と比較し、ビオチン 0.1 および 1% 添加群で、90.8% および 88.9% と高値を示した。胎児の脳中ビオチン濃度は、ビオチン添加量に伴い高値を示した (Fig. 9)。遊離ビオチン率は、対照群で 51.1%、ビオチン 0.1% 添加群で 81.8%、ビオチン 1% 添加群で 100.8% であった。胎児の肝臓および脳中ビオチンにおいて、ビオチン添加群ではほとんどが遊

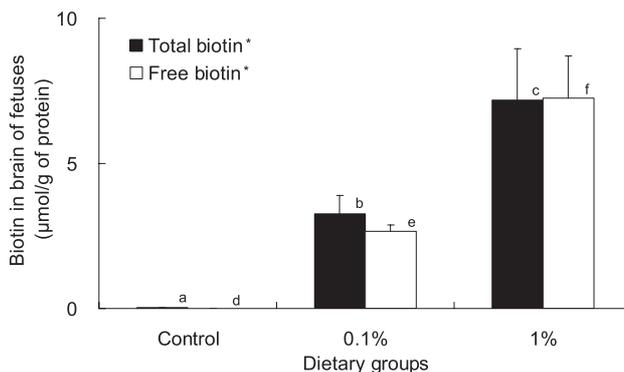


Fig. 8 Biotin concentration in liver in control and biotin-supplemented fetuses.

means \pm SD.

* $P < 0.05$ (one-way ANOVA).

ab, c-e $P < 0.05$ (Tukey-Kramer).

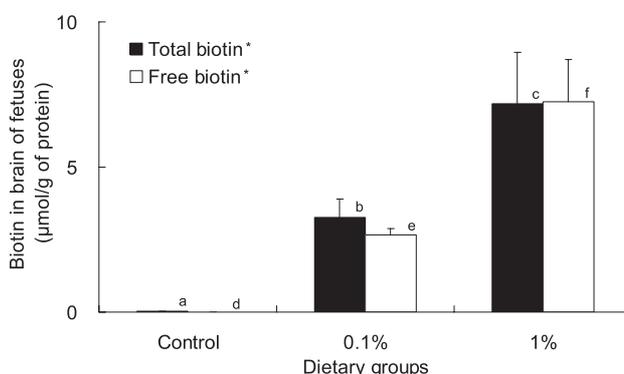


Fig. 9 Biotin concentration in brain in control and biotin-supplemented fetuses.

means \pm SD.

* $P < 0.05$ (one-way ANOVA).

a-c, d-f $P < 0.05$ (Tukey-Kramer).

離型で存在していた。

考 察

母体の血清および肝臓中ビオチン濃度は、ビオチン添加量の増加に伴い有意に上昇し、ほとんどが遊離型ビオチンで存在していた。これは、吸収された遊離型ビオチンが大量に肝臓に流入したことを示している。通常、ビオチンの取り込みは、輸送タンパクとしてビオチニダーゼが介在し、遊離型ビオチンが能動的に細胞中に運び込まれる。本研究の結果では、ビオチン添加量が過剰な場合、血液から肝細胞へのビオチン取り込みについては能動輸送で行われているか、受動輸送がどのように関わっているのか明らかではない。また、肝臓中の結合型ビオチン濃度は、対照群と比較し、ビオチン 0.1% 添加群では差がなく、ビオチン 1% 添加群で低値であった。すなわち、貯蔵型と考えられる肝臓中の結合型ビオチン量が、多量のビオチンを摂取することによって減少した。通常、吸収したビオチンの大部分は肝臓において蓄積され、プロピオニル CoA カルボキシラーゼや β -メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼがビオチンを貯蔵する働きを持っていると報告されている^{17,18)}。し

かし、ビオチン0.1%および1%添加群において、肝臓中総ビオチン量は増加しても貯蔵型ビオチンである結合型ビオチン量が増加していないことは、肝臓中で貯蔵できるカルボキシラーゼがほぼ一定であることを示している。

胎児の肝臓および脳中ビオチン濃度は、対照群に比べビオチン添加群で有意に高値を示した。また肝臓中ビオチン濃度は、母体に比べ対照群で0.8倍、ビオチン0.1%添加群で30.4倍、ビオチン1%添加群で73.3倍であった。すなわち、対照群では母体と同レベルであるのに対し、ビオチン添加群では著しく高値であることが示された。母体の肝臓へのビオチン取り込みは、ビオチン添加量が0.1%においては能動的に行われているが、胎児では、遊離型ビオチンが多量に肝臓へと流入したものと考えられる。それに付随して、胎児の尿および羊水において、対照群と比較しビオチン添加群で高値であった。また、妊娠18日には胎児の形態形成がほぼ完了しており、対照群では48.9%のビオチンが結合型となり、貯蔵されていた。しかし、ビオチン添加群では、ほとんどが遊離型であり、形態形成期において必要量以上のビオチンが流入したと考えられた。

胎児の体重および頭臀長が、対照群と比較しビオチン添加群で低値であったことから、発育遅延の可能性が示唆された。また、形態異常が高頻度でみられ、ビオチン1%添加群では、口蓋裂はみられなかったが、短肢症（前肢）（53.3%）、小顎症（34.8%）および浮腫（31.5%）が高率にみられ、皮膚の肥厚も観察された。なお、ビオチンは皮膚の形成に関与しているが、過剰に摂取した場合でも、胎児の皮膚形成に影響している可能性が考えられた。

採尿および採糞を行ったすべての採取日において、ビオチン添加量の増加に伴い、ビオチン排泄量が増加した。妊娠16日の尿中ビオチン排泄量は対照群で $0.0215 \pm 0.0165 \mu\text{mol/day}$ 、ビオチン1%添加群で $111.8 \pm 26.6 \mu\text{mol/day}$ であり、摂取した遊離型ビオチンは体内に容易に吸収された後、すみやかに排泄されると考えられた。

ビオチン添加群では、胎児に多量のビオチンが移行し奇形が高頻度でみられた。一方、母体にはビオチン過剰摂取による影響はみられなかった。なお、ビオチンの欠乏に関しては、渡邊やMockらが催奇形性は確認されたが母体にはビオチン欠乏症状はみられないと報告している^{4,7)}。本研究の結果から、正常な胎児発育のために、妊娠期のビオチン摂取量に関して、上限量の設定が必要であることが推測された。

結 論

妊娠期におけるビオチン過剰摂取によって、母体の体重増加量および臓器の相対重量に変化はなかった。しかしながら、母体と胎児の肝臓中ビオチン濃度の比較により、ビオチン添加群において胎児に多量のビオチンが供給されたことが明らかとなった。また、対照群と比較しビオチン1%添加群の胎児で、主に短肢症（前肢）、小顎症および浮腫

が高頻度でみられた。過剰摂取の影響は、母体に比べ胎児で顕著であり、胎児発育に影響があることが示された。従って、妊娠期におけるビオチン摂取量に関して、上限量の設定が必要である可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 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: pp. 77-109.
- 2) 渡邊敏明 (1996) ビオチン. 日本ビタミン学会編 ビタミンの事典, 朝倉書店, 東京: pp. 299-323.
- 3) Mock DM (2001) Biotin. In: Handbook of Vitamins. Marcel Dekker, NY: pp.397-426.
- 4) Watanabe T (1983) Teratogenic effects of biotin deficiency in mice. J Nutr 113: 574-581.
- 5) Watanabe T, Endo A (1989) Species and strain differences in teratogenic effects of biotin deficiency in rodents. J Nutr 119: 255-261.
- 6) Watanabe T (1993) Dietary biotin deficiency affects reproductive function and prenatal development in hamsters. J Nutr 123: 2101-2108.
- 7) Mock DM, Mock NI, Stewart CW, LaBorde JB, Hansen DK (2003) Marginal biotin deficiency is teratogenic in ICR mice. J Nutr 133: 2519-2525.
- 8) Sweetman L (2000) Pantothenic acid and biotin. In: Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition. (Stipanuk MH.) WB Saunder Company, Philadelphia, PA: pp. 519-540.
- 9) Zemleni J, Mock DM (1999) Biotin biochemistry and human requirements. J Nutr Biochem 10: 128-138.
- 10) 福井 徹 (1999) ビオチンの体内動態と血液中のビオチン結合タンパク. ビタミン 73: 671-676.
- 11) Taniguchi A, Nagai Y, Watanabe T (2007) Urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid increases and biotin decreases during pregnancy in mice. Trace Nutr Res 24: 33-41.
- 12) Zemleni J, Mock DM (1999) Bioavailability of biotin given orally to humans in pharmacologic doses. Am J Clin Nutr 69: 504-508.
- 13) Erik M (1976) Absence of influence of high doses of biotin on reproductive performance in female rats. Int J Vit Nutr Res 46: 33-39.
- 14) Paul PK (1973) Effect of an acute dose of biotin on the reproductive organs of the female rat. Curr Sci 42: 206-208.
- 15) Sawamura H, Fukuwatari T, Shibata K (2007) Effects of excess biotin administration on growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in young rats. Biosci Biotechnol Biochem 71: 2977-2984.
- 16) Taniguchi A, Nagai Y, Watanabe T (2007) Study on

- teratogenicity of biotin deficiency in mice at midgestation. *Trace Nutr Res* 24: 145–152.
- 17) Shriver BJ, Roman-Shriver C, Allred JB (1993) Depletion and repletion of biotinyl enzymes in liver of biotin-deficient rats: evidence of a biotin storage system. *J Nutr* 123: 1140–1149.
- 18) Petrelli F, Moretti P, Paparelli M (1978) Intracellular distribution of biotin-¹⁴C in rat liver. *Mol Biol Rep* 4: 247–252.