

## 幼若マウスにおける長期ビオチンおよびリシンの過剰摂取による生体影響

中尾安澄<sup>1)</sup>, 原 朋宙<sup>1)</sup>, 梁 美恵<sup>1)</sup>, 榎原周平<sup>1)</sup>, 根来宗孝<sup>1)</sup>,  
湯浅正洋<sup>2)</sup>, 渡邊敏明<sup>1,3)†</sup>

(<sup>1)</sup>大阪青山大学\*, (<sup>2)</sup>神戸大学大学院\*\*, (<sup>3)</sup>兵庫県立大学\*\*\*)

(受付 2023年8月31日, 受理 2023年10月6日)

### Effects of long-term intake of excess biotin and lysine on the development in young male mice

Nakao AZUMI<sup>1)</sup>, Tomohiro HARA<sup>1)</sup>, Meihui LIANG<sup>1)</sup>, Shuhei EBARA<sup>1)</sup>, Munetaka NEGORO<sup>1)</sup>,  
Masahiro YUASA<sup>2)</sup>, Toshiaki WATANABE<sup>1,3)</sup>

<sup>1)</sup>Faculty of Health Science, Osaka Aoyama University

<sup>2)</sup>Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University

<sup>3)</sup>School of Health Science and Environment, University of Hyogo

#### Summary

Biotin is involved in carbon fixation reaction as a coenzyme of carboxylase and plays an important role in gluconeogenesis, synthesis of fatty acids and amino acids, and energy metabolism. Lysine is an essential amino acid and plays a role in protein synthesis and liver function enhancement necessary for the body such as internal organs, muscles, bones, and the brain. In this study, we investigated the effects on growth and development and biotin metabolism by feeding with excess biotin and excess lysine for a long term in young male mice.

The four-week-old Slc:ICR male mice were divided into four groups (n = 4 for each group), and the control group was given CE-2 powder diet (CLEA Japan, Inc., Tokyo), and the experimental groups were given CE-2 diet with excess biotin (5 g/kg diet), excess lysine (5 g/kg diet), or excess biotin (5 g/kg diet) + excess lysine (5 g/kg diet). After feeding for five weeks, serum, liver, spleen, kidney, testis and brown adipocyte were sampled. Biotin was determined by the microbiological assay using *Lactobacillus* ATCC 8014, and lysine in serum was determined by HPLC.

No effect of excess biotin and lysine diets on mouse growth and development was observed. As for organ weight, the excess biotin group had less weight of the spleen and liver than in other groups, but there was no significant difference in relative weight among these groups. The concentration of biotin in serum was 40.4 times higher in the excess biotin group than in the control group, but 9.5 times in the excess biotin + excess lysine group compared to the control group. The concentration of biotin in organs was also lower in the excess biotin + lysin group than in the excess biotin group. These findings suggest that excess lysine intake may affect the pharmacokinetics of biotin *in vivo*.

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炭酸固定反応に関与している<sup>1)</sup>。また糖新生、脂肪酸合成、エネルギー代謝に関与している。このため欠乏すると、疲労感や筋肉痛、皮膚炎などを呈する。卵白中に含まれるアビジンに強い親和性を示すため、卵白を長期間大量に摂取すると脱毛や皮膚炎などの症状を誘発し、「卵白障害」(egg white injury)として知られて

いる<sup>2)</sup>。ヒト妊婦は潜在性ビオチン欠乏状態であること<sup>3)</sup>、喫煙がビオチン異化代謝を亢進すること<sup>4)</sup>なども示されており、特定の対象者において軽度の欠乏症の恐れがある。著者らは、妊娠マウスにビオチン欠乏飼料を摂取させると、胎児の形態形成に影響を与えることを見出した<sup>5-7)</sup>。またカルボキシラーゼ活性の低下により、尿中に3-hydroxyisovaleric acid (3-HIA)などの有機酸が排泄される

\*所在地：大阪府箕面市新稲2-11-1 (〒562-8580)

\*\*所在地：神戸市灘区鶴甲3-11 (〒657-8501)

\*\*\*所在地：兵庫県姫路市新在家本町1-1-12 (〒670-0092)

†連絡先：E-mail: t-watanabe@osaka-aoyama.ac.jp 〒562-8580大阪府箕面市新稲2-11-1 TEL: 072-722-4165 FAX: 072-722-5190

ことも知られている<sup>6,8)</sup>。一方、ビオチンを過剰に摂取した場合、雄性マウスにおいて精子形成障害が報告されている<sup>9)</sup>。また妊娠動物においては、母体よりも胎児での影響が顕著である<sup>10)</sup>。

ビオチンの化学的特性として、水への溶解度が0.22 mg/mLと低く、食品や医薬品への利用は限定的である。ビオチンとリシンが共有結合している化合物であるビオシチン（ビオチニルリシン）の水への溶解度も18.6 mg/mLであり、水に溶けにくい物質である。最近新規に合成されたビオチン化合物としてビオチンアミノ酸塩がある。これはビオチンとリシンがイオン結合しており、溶解度が134 mg/mLと水への高い溶解性が認められており、ビオチンの多様な利用が期待されている。

リシンは9種類ある必須アミノ酸の一つであり、ケト原性アミノ酸に分類される。穀物中の含有量は少ないが、大豆などの豆類や動物性食品に豊富に含まれている<sup>11)</sup>。他の必須アミノ酸と同じく、内臓や筋肉・骨・脳など体にとって必要なたんぱく質をつくる役割や肝機能強化などの役割を担っており、欠乏すると慢性疲労、貧血、集中力の低下などをきたす<sup>12)</sup>。またリシン欠乏により肝機能が低下すると、血中の飽和脂肪酸やコレステロールの増加などが起こる<sup>13)</sup>。一方、リシンを過剰に摂取すると、下痢や胃痛などといった症状が起こることがある<sup>14)</sup>。

新規ビオチン化合物であるビオチン・リシン塩は水への溶解度が非常に高いため、ビオチンとして大量投与が可能となった。一方、遊離型ビオチン（遊離ビオチン）に対する食事中ビオチンの相対的な生体利用率が約85%であること<sup>15)</sup>や、ビオチンの吸収率が食品中の他の栄養素等によって変化する可能性が指摘されており<sup>16)</sup>、ビオチンは他の栄養素等によって生体利用率が変化する可能性が考えられる。そこで、本研究はビオチン・リシン塩の体内動態を検討するための一助として、幼若雄性マウスにビオチンおよびリシン過剰飼料を長期間摂取させ、発育およびビオチンの体内動態への影響について検討した。

## 実験方法

### 実験動物および飼料

本実験には離乳直後の4週齢のSlc:ICR系雄性マウス（日本エスエルシー（株）、浜松市）を用いた。動物飼育室は12時間の明暗サイクル（明期：6:00-18:00）とし、室温23±2℃、湿度50±10%に設定した。マウスは4群（各群4匹）に分け、ブラケットケージに個別に入れて飼育した。対照群にはCE-2粉末飼料（日本クレア（株）、東京）、実験群にはCE-2粉末飼料に0.5%ビオチン（（株）トクヤマ、東京）（5 g/kg・飼料）（過剰ビオチン群）、0.5%リシン（富士フィルム和光純薬（株）、大阪）（5 g/kg・飼料）（過剰リシン群）、あるいは0.5%ビオチン（5 g/kg・飼料）および0.5%リシン（5 g/kg・飼料）（過剰ビオチン+過剰リシン群）を添加した粉末飼料を与えた。

なお、マウスに対して1%ビオチン添加飼料を与えると、飼料摂取量が低下することが報告されている<sup>17)</sup>。

体重の増加量及び粉末飼料の摂取量を毎日計測した。飼育5週間後、イソフルラン麻酔下で下行大動脈から採血し、屠殺した。採取した血液から血漿を分離し、血清、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、褐色脂肪組織を採取した。

なお本実験は大阪青山大学の動物実験倫理審査会において承認された（承認番号22-48, 23-49）。

### ビオチンの測定

ビオチンの定量は、定法<sup>6,7)</sup>に準じてビオチン要求株である乳酸菌（*L. plantarum* ATCC 8014）を用いた微生物学的定量法-比濁法により行った。接種菌は、乳酸菌をMRS培地で前培養し、滅菌生理食塩水で洗浄後、菌体数を濁度で調整したものをを用いた。この定量菌株は遊離型のビオチンとビオチン D-スルフォキシドにのみ活性を示すため、たんぱく質と結合しているビオチンの分析に際しては、すべて遊離型にする必要がある。このため試料を2.25 mol/L 硫酸で121℃、2気圧で酸加水分解後、4.5 mol/L 水酸化ナトリウムで中和し、測定したものを総ビオチン量とした。また酸加水分解処理をしない試料のビオチン量を遊離ビオチン量とした。

ビオチン定量用培地（日水製薬（株）、東京）に、濁度を調整した乳酸菌を懸濁して使用した。乳酸菌の培養にはマイクロプレートを用い、37℃で24時間培養した後、乳酸菌の発育量はOD630 nmの波長で濁度を測定して定量した。ビオチン標準溶液は、標準物質グレードのD-ビオチン（メルク（株）、東京）を25%エタノールで調整した後、蒸留水で希釈した。なお、本法はわが国では「日本食品標準成分表2020年報（八訂）」においてビオチン測定法として採用されている<sup>18-20)</sup>。

### アミノ酸分析

リシンは、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）（島津製作所（株）、京都）のアミノ酸自動分析システムを利用して分析した。分析条件として、カラムはイオン交換樹脂を充填したShim-pack ISC-07/S1504（Li形）である。カラム温度39℃、移動相にはリチウム形移動相キット（島津製作所（株）、アミノ酸移動相キットLi型、S228-21195-95）を用いた。流速は0.6 mL/min、最終的にオルトフタルアルデヒドを反応試薬として用いて、アミノ酸の発光を分光蛍光検出器（Ex:350 nm, Em:450 nm）で測定した。マウスの血清は、等量の5%トリクロロ酢酸を添加し、遠心分離した。その上清100 μLに対し60 μLの0.2 mol/L水酸化リチウムを添加し、適宜試料用希釈溶液（クエン酸リチウム緩衝液（pH 2.2））で希釈し、0.45 μm フィルターでろ過して分析に供した。

### 統計解析

測定値は平均値±標準偏差で表記した。飼育期間中の体

重と摂餌量の変化は、2元配置分散分析後、Turkey-Kramer 多重比較検定で解析した。データの集計・解析は Excel 2019 (日本マイクロソフト (株), 東京都港区), エクセル統計 Statcel 3 ((有) オーエムエス出版, 東久留米市) および統計解析には EZR (version 1.61, 自治医科大学附属さいたま医療センター, さいたま市<sup>21)</sup>)で行った。各統計解析の有意水準は5%未満とした。

### 実験結果

Fig. 1 は幼若雄性マウスにおける過剰ビオチン及び過剰リシンの摂餌量に与える影響をまとめたものである。総摂餌量について各飼育群で差異は認められなかった。また平均摂餌量も、群間で差異はみられなかった。このように、過剰ビオチンおよびリシンによる摂餌量への影響はなかった。

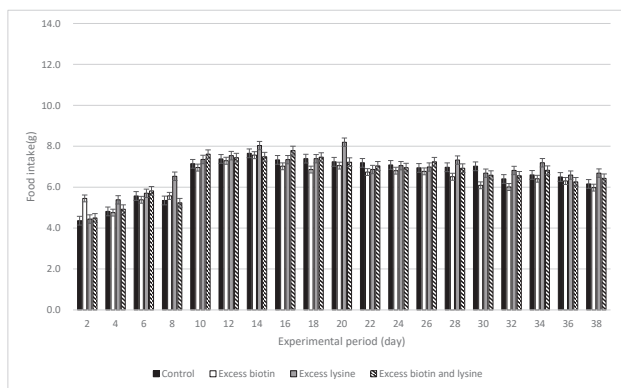


Fig. 1 Effects of excess biotin and lysine on the diet intake in young male mice

Fig. 2 は過剰ビオチンおよび過剰リシンが幼若雄性マウスの成長に与える影響をまとめたものである。飼育期間中の最終体重をみると、対照群に比べ、過剰ビオチン群は低値であったが、対照群と比較して有意差は認められなかった。また、過剰リシン群、過剰ビオチン+過剰リシン群とも対照群と比較して有意差は認められなかった。幼若雄性マウスにおける過剰ビオチン摂取及び過剰リシン摂取が、臓器重量に及ぼす影響についてまとめたものが Table 1 である。臓器重量をみると、過剰ビオチン群は他の群と比較して脾臓と肝臓の重量が低値であったが、有意な差は認められなかった。またこれらの相対重量に関しても有意な差が見られなかった。精巣についても対照群と比べ過剰ビオチン群および過剰リシン群で有意な差は認められなかった。

Table 2 は血清中の総ビオチンおよび遊離ビオチン濃度をまとめたものである。すべての飼育群で遊離ビオチン率に差異はみられなかった。過剰ビオチン群では総ビオチン

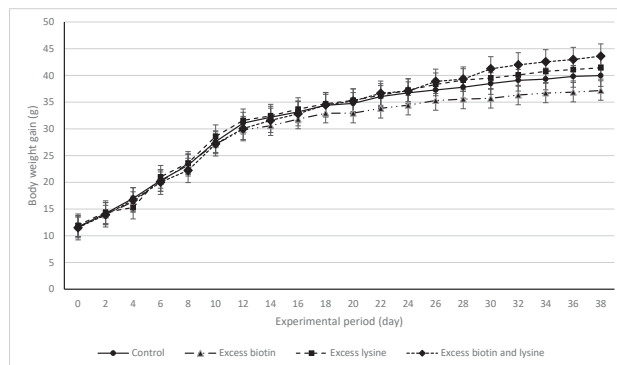


Fig. 2 Effects of excess biotin and lysine on the development in young male mice

Table 1 Effects of excess biotin and lysine on the body weight and organ weight in young male mice

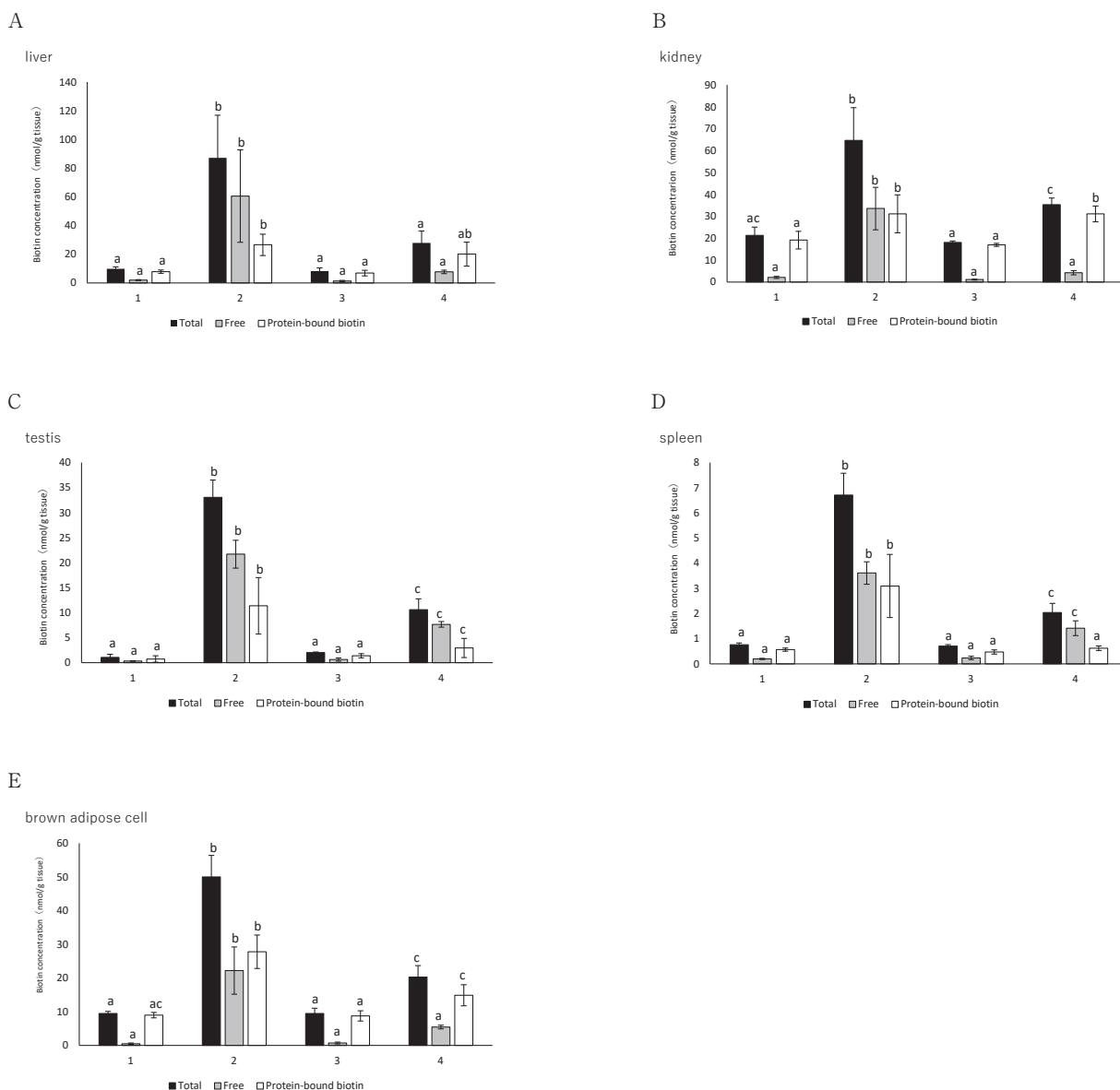
	Control	Excess biotin	Excess lysine	Excess biotin and lysine
Body weight (g)	39.99 ± 3.31	37.19 ± 0.82	41.43 ± 3.11	43.62 ± 1.98
Liver (g)	2.02 ± 0.45	1.93 ± 0.20	2.12 ± 0.19	2.16 ± 0.27
g%	5.05 ± 0.79	5.05 ± 0.26	5.12 ± 0.31	4.97 ± 0.62
Spleen (mg)	109.18 ± 13.88	109.45 ± 18.21	116.18 ± 17.58	125.28 ± 19.16
g%	0.27 ± 0.03	0.29 ± 0.05	0.28 ± 0.03	0.30 ± 0.04
Kidney (g)	0.77 ± 0.12	0.70 ± 0.05	0.77 ± 0.14	0.72 ± 0.08
g%	1.93 ± 0.14	1.87 ± 0.07	1.84 ± 0.18	1.65 ± 0.12
Testis (mg)	114.03 ± 19.01	112.08 ± 20.99	140.95 ± 36.07	127.10 ± 12.81
g%	0.29 ± 0.06	0.30 ± 0.05	0.34 ± 0.06	0.29 ± 0.04

g%: relative weight.

Table 2 Effects of excess biotin and lysine on the serum biotin in male mice

	Control	Excess biotin	Excess lysine	Excess biotin and lysine
Total biotin(pmol/mL)	147 ± 32 <sup>a</sup>	5938 ± 1361 <sup>b</sup>	174 ± 51 <sup>a</sup>	1393 ± 581 <sup>a</sup>
Free biotin(pmol/mL)	137 ± 37 <sup>a</sup>	5088 ± 1341 <sup>b</sup>	139 ± 50 <sup>a</sup>	1131 ± 455 <sup>a</sup>
Free biotin rate	93.2%	85.7%	79.9%	81.2%

Different superscript letters indicate significant difference between groups



**Fig. 3** Effects of excess biotin and lysine intake on the biotin concentration in various organs  
 A: Liver, B: Kidney, C: Testis, D: Spleen, E: Interscapular brown adipose tissue  
 1: Control, 2: Excess biotin, 3: Excess lysine, 4: Excess biotin and lysine  
 Values are the mean±SD (n=4). <sup>a-c</sup>  $p < 0.05$  (Tukey's HSD test), compared between dietary groups in each tissue

量が対照群の40.4倍の濃度を示した。しかし、過剰ビオチン+過剰リシン群では対照群の9.5倍の濃度であった。このことから、過剰のリシン摂取がビオチンの吸収や排泄に影響している可能性が考えられる。

Fig. 3は過剰ビオチン及び過剰リシンの摂取が各種臓器のビオチン含量に与える影響をまとめたものである。過剰ビオチン群の肝臓および腎臓においては、総ビオチン濃度は有意に高値であり、遊離ビオチン率は、対照群のと比較して有意に増加していた (Figs. 3A, 3B)。しかし、過剰ビオチン+過剰リシン群では、ビオチン遊離率は低値であった。これらの臓器においては過剰リシン摂取が、ビオチンの代謝に影響しているものと考えられる。

精巣および脾臓における過剰ビオチン及び過剰リシンのビオチン濃度に与える影響をみると (Figs. 3C, 3D), 過剰ビオチン群では、総ビオチン濃度が肝臓および腎臓と同様

に統計学的に有意な増加がみられた。遊離ビオチン率も対照群と比べ高値であった。過剰ビオチン+過剰リシン群では総ビオチン濃度および遊離ビオチン濃度の増加は抑制されていた。しかし、遊離ビオチン率は高値であった。

褐色脂肪組織においても他の臓器と同様に過剰ビオチン群で総ビオチン量の有意な増加がみられたが、遊離ビオチン率は低値だった (Fig. 3E)。また過剰ビオチン+過剰リシン群で総ビオチン量の増加の抑制がみられ、遊離ビオチン率も低値だった。

以上のように、血清および各臓器のビオチン濃度をみると、過剰ビオチン群では有意な増加がみられたが、過剰ビオチン+過剰リシン群においては総ビオチン量の増加が抑制され、肝臓、腎臓、褐色脂肪組織では遊離ビオチン率も低値だった。これらの臓器においては遊離型ビオチンの吸収が抑制されていることが推測できる。

対照群および過剰リシン群では、血清中のリシン含量に差異は見られなかった。つまり過剰のリシン摂取による血清中のリシン含量への影響はみられなかった。また、リシン以外のアミノ酸においても、特異的な変化は認められなかった。

## 考 察

食品中のビオチンは、ビオチン（ビオチニルリシン）、ビオチニルペプチド、あるいはたんぱく質が結合した化合物として存在している<sup>2)</sup>。これらは消化管でビオチニダーゼによって分解され遊離型となって小腸粘膜から吸収される<sup>22)</sup>。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、遊離型あるいはたんぱく質やペプチドと共有結合した結合型で存在している<sup>23,24)</sup>。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、そのまま補酵素として機能している。このためビオチンが欠乏すると、カルボキシラーゼ活性の低下に起因すると思われる脱毛や皮膚炎などの欠乏症状が誘発される。

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ほとんどない。健常人では、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<sup>25)</sup>。実験動物において、Erikは雌性ラットの生殖能力に影響はないと報告している<sup>26)</sup>。しかしPaulは妊娠ラットの胎盤や胎児の成長抑制を報告している<sup>27)</sup>。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、肝臓に蓄積したビオチンがたんぱく質の機能に影響を及ぼし、毒性が顕在化する可能性が示唆される<sup>28)</sup>。著者らは、妊娠期におけるビオチン過剰摂取の影響は、母体に比べ胎児で顕著であり、短肢症、小顎症および浮腫などの異常がみられることを報告している<sup>10)</sup>。

またビオチンを長期間過剰摂取した幼若ラットにおいては、血中テストステロン濃度の上昇が見られ、ビオチン長期過剰摂取によって精巣の萎縮や精巣上体における精子数の減少や形態異常などの精子形成障害が報告されている<sup>9)</sup>。しかし、今回の結果では成長及び精巣も含め臓器重量への影響は認められなかった。これが動物種の違いによるものか過剰ビオチン量の相違によるものかは今後検討が必要であると考えられる。

リシンはヒトの体内で合成することができない必須アミノ酸の一つである。穀物類の必須アミノ酸組成を見ると、小麦ではリシンが少なく、とうもろこしではリシンとトリプトファンがほとんどない。リシンの欠乏症としては、低タンパクの一般症状の他、頭痛、嘔吐、耳鳴りなどがみられている<sup>29)</sup>。ラットでは、リシン欠乏飼料にすると成長遅延、食欲不振、成長ホルモンの分泌抑制、成長の抑制などが認められている<sup>30,31)</sup>。

リシンは一般的な添加物として広く使われているが、リ

シンを過剰に摂取した時の生理学的な影響については不明な点が多い。一方、雌雄のSDラットに過剰リシン混餌食を13週間与えた後、5週間正常食を与えたが、臨床症状、体重、摂餌量などに投与に起因する変化は認められていない<sup>32)</sup>。Xiaoら（2019）は飼料にリシンを添加するとラットの体重、摂餌量や血液生化学的パラメーターに影響を与えることを報告している<sup>33)</sup>。また高用量のリシンを単独で与えると、ラットにおいて急性腎不全を引き起こす可能性があることが知られている<sup>34)</sup>。リシンの腎毒性は、直接的な尿細管毒性および尿細管閉塞に関連している可能性があることが報告されている<sup>35)</sup>。しかし、リシンの吸収、代謝に対する影響については十分に解明されていない。

リシンの消化吸収との関連について、内藤<sup>36)</sup>およびWassermanら<sup>37)</sup>は、ラットにリシンを経口的に単回投与すると、同時に投与した放射性Caの大腿骨への取り込みが促進されることを認めている。またアルギニンもリシンと同様の効果を示したことから、これらのアミノ酸による特異的効果であることが推定されている。しかしこれまでアミノ酸そのものの輸送性と直接関連する明確なエビデンスは得られない。またリシンとビタミン吸収との相互作用については、著者らが知る限りでは、報告はない<sup>38)</sup>。

今回の研究では、過剰ビオチンおよび過剰リシンの摂取による成長、摂餌量への影響は認められなかった。過剰ビオチンを与えたマウスにおいては、血清総ビオチン量が対照群に対し有意に高値を示した。また過剰リシンを与えたマウスにおいて、血清中のリシン量は対照群と比較して有意差はみられなかった。このことから、過剰リシンによる生体への影響はないと推察される。しかし、過剰ビオチンおよび過剰リシンを与えたマウスにおいて、血清総ビオチン濃度は対照群と比べ有意差はみられなかった。一方、肝臓、腎臓、褐色脂肪組織では遊離ビオチン率が低値（すなわち結合型ビオチンが高値）であり、吸収されたビオチンは結合型として蓄積されていることが示唆される。これらの臓器の総ビオチン濃度についても、過剰ビオチンを与えた群においては有意に濃度が上昇したが、過剰ビオチン+過剰リシン群では対照群と有意差は認められなかった。精巣、脾臓においては、過剰ビオチン+過剰リシン群では遊離ビオチン率が高値であり、結合型ビオチンが低値であった。臓器間で遊離ビオチンと結合型ビオチンの違いは、糖新生などのエネルギー代謝の違いなどが関与していることが考えられる。以上の結果より、過剰リシン摂取によって生体内のビオチン動態が影響される可能性が示唆された。

今後は、ビオチン・リシン塩などの新規ビオチン化合物の効果として、体内動態、腸内細菌への影響などを検討予定である。本研究はその前段階としてビオチンとリシンがイオン結合していない遊離型の状態で、これらの過剰摂取による影響を検討した。その結果、飼料中で高濃度のビオチンとリシンが共存すると、血清や臓器中ビオチン濃度が低下したことから、高濃度のリシンは生体内のビオチン動態に影響する可能性が示唆された。動物実験レベルである

が、高用量のビオチンは脂肪酸の消費を増やすこと<sup>39)</sup>や、本態性高血圧の病態を改善すること<sup>40)</sup>などが報告されており、ビオチンのサプリメントや強化食品による健康増進効果が期待できる。このように、ビオチンは従来の欠乏症<sup>2-8)</sup>予防の観点のみならず、多様な活用が期待されはじめている。以上より、従来よりも溶解性が飛躍的に上昇した新規ビオチン化合物は、多様な活用が期待されるビオチン補給方法の選択性を増やすことが期待され、本研究成果は新規ビオチン化合物の体内動態を理解するための基礎資料として有用であると考えられる。

## 利益相反

本論文の発表に関して、共著者全員に申告すべきCOI状態はない。

## 文 献

- 1) Chapman-Smith A, Cronan JE, Jr (1999) Molecular biology of biotin attachment to proteins. *J Nutr* 129(2S Suppl): 477S-484S.
- 2) 澤村弘美, 渡邊敏明 (2021) 2.8.3 生理学・栄養学 (欠乏症も含む), 2.8 ビオチン, ビタミン・バイオフィクター総合辞典, 朝倉書店: pp. 256-259.
- 3) Mock DM, Stadler DD, Stratton SL, Mock NI (1997) Biotin status assessed longitudinally in pregnant women. *J Nutr* 127: 710-716.
- 4) Sealey WM, Teague AM, Stratton SL, Mock DM (2004) Smoking accelerates biotin catabolism in women. *Am J Clin Nutr* 80: 932-935.
- 5) Watanabe T (1983) Teratogenic effects of biotin deficiency in mice. *J Nutr* 113: 574-581.
- 6) Watanabe T, Nagai Y, Taniguchi A, Ebara S, Kimura S, Fukui T (2009) Effects of biotin deficiency on embryonic development in mice. *Nutrition* 25: 78-84.
- 7) Sawamura H, Namba M, Obama K, Ebara S, Negoro M, Watanabe T (2020) The effects of biotin administration to pregnant mice with biotin deficiency on fetal development. *Trace Nutr Res* 37: 38-43.
- 8) Mock NI, Malik MI, Stumbo PJ, Bishop WP, Mock DM (1997) Increased urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid and decreased urinary excretion of biotin are sensitive early indicators of decreased biotin status in experimental biotin deficiency. *Am J Clin Nutr* 65: 951-958.
- 9) Sawamura H, Ikeda C, Shimada R, Yoshii Y, Watanabe T (2015) Dietary intake of high-dose biotin inhibits spermatogenesis in young rats. *Congenit*

*Anom* (Kyoto) 55: 31-36.

- 10) 永井良子, 榎原周平, 福井徹, 渡邊敏明 (2008) 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. *微量栄養素研究* 25: 85-90.
- 11) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会 (2020) 日本食品標準成分表 2020年版 (八訂) アミノ酸成分表編. [https://www.mext.go.jp/a\\_menu/syokuhinseibun/mext\\_01110.html](https://www.mext.go.jp/a_menu/syokuhinseibun/mext_01110.html). (2023年8月23日接続確認).
- 12) 清水俊雄 (2006) 機能性食品素材便覧 特定保健用食品からサプリメント・健康食品まで. 薬事日報社, 東京.
- 13) Viviani R, Sechi AM (1963) Effect of lysine and threonine deficiency on the endogenous cholesterol content of rat plasma and liver. *Experientia* 19: 188-189. doi: 10.1007/BF02172304.
- 14) Abe M, Iriki T, Kaneshige K, Kuwashima K, Watanabe S, Sato H, Funaba M (2001) Adverse effects of excess lysine in calves. *J Anim Sci* 79: 1337-1345. doi: 10.2527/2001.7951337x. PMID: 11374556
- 15) 福渡努, 柴田克己 (2009) パンを主食とした食事に含まれる水溶性ビタミンの遊離型ビタミンに対する相対利用率. *家政誌* 60: 57-63.
- 16) Ebara S, Aizaki Y, Yuasa M, Sawamura H, Fukui T, Watanabe T (2015) Urinary excretion of biotin after intake of free and protein-bound biotin in healthy women. - A study on bioavailability of food biotin -. *Trace Nutr Res* 32: 67-71.
- 17) 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.
- 18) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会 (2022) 日本食品標準成分表 2020年版 (八訂) 分析マニュアル. [https://www.mext.go.jp/content/20220222-mext\\_kagei-index\\_100.pdf](https://www.mext.go.jp/content/20220222-mext_kagei-index_100.pdf). (2023年8月23日接続確認).
- 19) 福井徹 (2011) ビオチン測定法. *ビタミン* 85: 471-478.
- 20) 小山田絵美, 曾根英行, 平岡真美 (2007) マイクロバイオアッセイによるビオチン定量法の確立とビオチンの体内動態について. *微量栄養素研究* 24:157-162.
- 21) Kanda Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48: 452-458.
- 22) Zempleni J, Wijeratne SS, Hassan YI (2009) Biotin. *Biofactors* 35: 36-46.
- 23) 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.
- 24) Zempleni J, Mock DM (1999) Biotin biochemistry and human requirements. *J Nutr Biochem* 10: 128-138.
- 25) Zempleni J, Mock DM (1999) Bioavailability of biotin given orally to humans in pharmacologic doses. *Am J Clin Nutr* 69: 504-508.
- 26) 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.
- 27) Paul PK (1973) Effect of an acute dose of biotin on the reproductive organs of the female rat. *Curr Sci* 42: 206-208.
- 28) Sawamura H, Fukuwatari T, Shibata K (2007) Effects of excess biotin administration on the growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in young rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 2977-2784. doi: 10.1271/bbb.70381. Epub 2007 Dec 7. PMID: 18071266
- 29) 高柳隆 (1958) 必須アミノ酸 特にリジンについて. *生活衛生* 2: 233-239.
- 30) di Stefano CM, Ruggiero M, Morelli S, Monaco A (1979) Essential amino acids and rat growth. I. Effect of lysine deficiency on hematopoiesis and rat growth. *Boll Soc Ital Biol Sper* 55: 2596-2660.
- 31) Cree TC, Schalch DS (1985) Protein utilization in growth: effect of lysine deficiency on serum growth hormone, somatomedins, insulin, total thyroxine (T4) and triiodothyronine, free T4 index, and total corticosterone. *Endocrinology* 117: 667-673. doi: 10.1210/endo-117-2-667. PMID: 3926459
- 32) Tsubuku S, Mochizuki M, Mawatari K, Smriga M, Kimura T (2004) Thirteen-week oral toxicity study of L-lysine hydrochloride in rats. *Int J Toxicol* 23: 113-118.
- 33) Xiao C-W, Wood C, Bertinato J (2019) Dietary supplementation with L-lysine affects and blood hematological and biochemical parameters in rats. *Molecular Biology Reports* 46:433-442.
- 34) Racusen LC, Whelton A, Solez K (1985) Effects of lysine and other amino acids on kidney structure and function in the rat. *Am J Pathol* 120: 436-442. PMID: PMC1887985. PMID: 3929613.
- 35) Malis CD, Racusen LC, Solez K A Whelton (1984) Nephrotoxicity of lysine and of a single dose of aminoglycoside in rats given lysine. *J lab Clin Med* 103: 660-76.
- 36) 内藤博 (1995) アミノ酸のカルシウム吸収利用性に関する研究. [https://www.j-milk.jp/report/paper/commission/f13cn0000000y63-att/studyreports1995\\_1997-18.pdf](https://www.j-milk.jp/report/paper/commission/f13cn0000000y63-att/studyreports1995_1997-18.pdf). (2023年10月4日接続確認).
- 37) Wasserman RH, Comar CL, Schooley JC, Lengenmann FW (1957) Interrelated effects of L-lysine and other dietary factors on the gastrointestinal absorption of Ca<sup>45</sup> in the rat and chick. *J Nutr* 62: 367-376.
- 38) 鳥居邦夫 (2014) 脳による食物摂取の認知とアミノ酸恒常性維持の仕組みに関する研究 (総説). *日本栄養・食糧学会誌* 67: 65-72. 2014212580, DOI:10.4327/jsnfs.66.65
- 39) Yuasa M, Kawabeta K, Uemura M, Koba K, Sawamura H, Watanabe T (2022) Dietary high-dose biotin intake activates fat oxidation and hepatic carnitine palmitoyltransferase in rat. *J Nutr Sci Vitaminol* 68: 250-259.
- 40) 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.