

ビオチン使用基準改正要望書

D S M ニュートリション ジャパン株式会社

2013 年 7 月 30 日提出

《目 次》

頁

本改正要請の目的及び理由	- 1 -
概 要	- 2 -
(1) 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況に関する資料	- 3 -
① 起源又は発見の経緯	- 3 -
② 外国における許可及び使用状況	- 3 -
(2) 物理化学的性質及び成分規格に関する資料	- 4 -
① 名称	- 4 -
② 構造式又は示性式	- 4 -
③ 分子式及び分子量	- 4 -
④ 含量規格	- 4 -
⑤ 製造方法	- 4 -
⑥ 性状	- 5 -
⑦ 確認試験	- 5 -
⑧ 純度試験	- 5 -
⑨ 乾燥減量	- 6 -
⑩ 強熱残分	- 6 -
⑪ 定量法	- 6 -
⑫ 物質の安定性	- 6 -
⑬ 母乳代替食品中の目的物質の分析法	- 8 -
(3) 有効性／必要性に関する資料	- 10 -
ア 栄養素としての機能	- 10 -
イ 乳幼児における有効性	- 10 -
(4) 安全性に関する資料	- 11 -
① 毒性試験	- 11 -
ア 単回投与毒性試験	- 11 -
イ 亜急性毒性試験	- 11 -
ウ 1年間反復投与毒性試験	- 13 -
エ 生殖発生毒性試験	- 13 -
オ 出生前発生毒性試験	- 13 -
カ 遺伝毒性試験	- 13 -
② 体内動態	- 15 -

③ ヒトにおける知見	- 17 -
④ 1 日摂取量の推計	- 19 -
 (5) 使用基準（案）	 - 20 -
文献集：資料目録	- 21 -

本改正要請の目的及び理由

ビオチンは、水溶性ビタミンの一種で必須栄養素であり、その安全性が認められ、平成 15 年 6 月 26 日に食品添加物として指定された。その際に「ビオチンは、保健機能食品以外の食品に使用してはならない。」と、使用基準が設定されている（添付資料 1）。栄養表示基準は、「ビオチンは、皮膚や粘膜等の健康維持を助ける栄養素です。」という表示が認められており、下限値 $14\mu\text{g}$ ～上限値 $500\mu\text{g}$ の用量での使用が認められている（添付資料 2）。

近年、「母乳代替食品（母乳の代替として飲用に供する調製粉乳及びこれ以外の育児用粉乳（添付資料 3））」や牛乳アレルギーや先天代謝異常などの病児に対する栄養管理や治療を目的とする「特殊医療用調製乳」の摂取により、一部の乳幼児において、皮膚炎や脱毛などのビオチン欠乏症が報告されており、その原因はこれら母乳代替食品及び特殊医療用調製乳にビオチンが殆ど含まれていないためと考えられる（添付資料 4）。

海外では、ビオチンは必須栄養素として栄養強化の目的で広く使用されており、母乳代替食品においても、FAO / WHO のコーデックス委員会栄養・特殊用途食品部会が定める「乳幼児用調製乳および乳児用特殊医療用調製乳規格（添付資料 5）」に準じたビオチンの添加がなされている。コーデックス委員会の定める乳児用調整乳成分としてのビオチンの必要量は $1.5\mu\text{g}/100\text{kcal}$ 以上であり、上限値は定められていない。Guidance Upper Level（十分に科学的根拠が確定していない栄養素についての上限目安）は $10\mu\text{g}/100\text{kcal}$ である。実際に、米国やヨーロッパ等諸外国では $2\sim 9\mu\text{g}/100\text{kcal}$ の範囲で添加されている（添付資料 6）。

これに対し、我が国で販売されている乳児用調製粉乳のビオチン含有量は、平均 $1.04\pm 0.36\mu\text{g}/100\text{kcal}$ 、特殊医療用調製乳中のビオチン量は平均 $0.40\pm 0.39\mu\text{g}/100\text{kcal}$ であり、コーデックス基準と比較して著しく低く（添付資料 7）、これらの乳にその栄養を依存している乳児は潜在的なビオチン欠乏の状態にある可能性が考えられる。

乳児用調製乳及び一部の特殊医療用調製乳は「特別用途食品」に分類されるが、現在、これら母乳代替食品及び特殊医療用調製乳へのビオチンの添加は認められていない。

以上の理由により、ビオチンの、乳児用調製乳をはじめとする母乳代替食品への適用拡大を要請するものである。

概 要

(1) 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況に関する資料

① 起源又は発見の経緯

ネズミの栄養障害で起こる皮膚炎として、多量の生の卵白を与えると起こる「卵白障害」と呼ばれるものが有り、目の周囲の皮膚が眼鏡状に脱毛し、姿勢の異常や痙攣性歩行も起こる。

1927 年ボアス (M. A. Boas) は、この皮膚炎を防ぐ因子が種々の食物に含まれていることを認めた。これは、ジェルジー (P. Gyorgy) が 1931 年にビタミン H と呼んで発表したものと同じ因子と考えられた (添付資料 8)。一方、1936 年ケーグル (F. Kogl) らは、卵黄から酵母の発育素ビオスであるビオス II b という因子をビオチンと呼んでいた (添付資料 9)。ジェルジーは、ビタミン H の性質がビオチンと酷似していることに気付き、ケーグルからビオチン結晶の分与を受けて、ビタミン H とビオチンが同一物質である事を確かめた (添付資料 10)。

② 外国における許可及び使用状況

諸外国においては、米国ではビオチンは GRAS 物質として位置づけされており、栄養成分として一般食品への添加が認められている (添付資料 48)。また、サプリメントに対する本品の使用は、食品・食品成分の扱いとされている。欧州連合 (EU) では、ビオチンを含む栄養強化剤は添加物の範疇に含まれておらず、食品・食品成分として扱われている。このため、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA : FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives) 及び欧州食品安全機関 (EFSA : European Food Safety Authority) による安全性評価はなされていない。EU の食品科学委員会 (SCF : Scientific committee on food) は、2001 年にビオチンの許容上限摂取量 (UL : Tolerable Upper Intake Level) について検討が行ったが、系統的な経口投与試験が行われていないため定量的なリスク評価は行えず、UL を設定することはできないと結論づけている (添付資料 11)。

乳児用ミルクへの使用については、米国では、乳ベースでないミルクには $1.5 \mu\text{g}/100\text{kcal}$ の用量での添加が義務付けられており (添付資料 12)、EU では乳児用調製乳及びフォローアップミルクへのビオチンの添加が、下限値 $1.5 \mu\text{g}/100\text{kcal}$ ~ 上限値 $7.5 \mu\text{g}/100\text{kcal}$ の範囲で認められている

(添付資料 13)。オーストラリア及びニュージーランドにおいては、下限値 $0.36 \mu\text{g}/100\text{kJ}$ (約 $1.5 \mu\text{g}/100\text{kcal}$) での乳児用調製乳及びフォローアップミルクへのビオチンの添加が義務付けられている (添付資料 14)。

FAO / WHO のコーデックス委員会 栄養・特殊用途食品部会が定める「乳幼児用調製乳および乳児用特殊医療用調製乳規格 (添付資料 5)」によると、ビオチンの乳幼児用調製乳への推奨添加量の下限値は $1.5 \mu\text{g}/100\text{kcal}$ であり、上限値は定められていない。Guidance Upper Level (十分に科学的根拠が確定していない栄養素についての上限量) は $10 \mu\text{g}/100\text{kcal}$ である。

実際に、米国やヨーロッパ等諸外国では、 $2\sim 9\mu\text{g}/100\text{kcal}$ の範囲で添加されている（添付資料 6）。

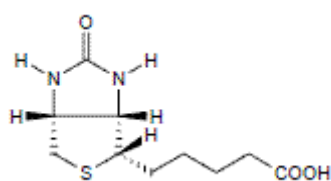
（２）物理化学的性質及び成分規格に関する資料

ビオチンはすでに食品添加物として指定され、その規格は第 8 版食品添加物公定書に収載されている（添付資料 1）。

① 名称 ビオチン

CAS 番号 58-85-5

② 構造式又は示性式



③ 分子式及び分子量

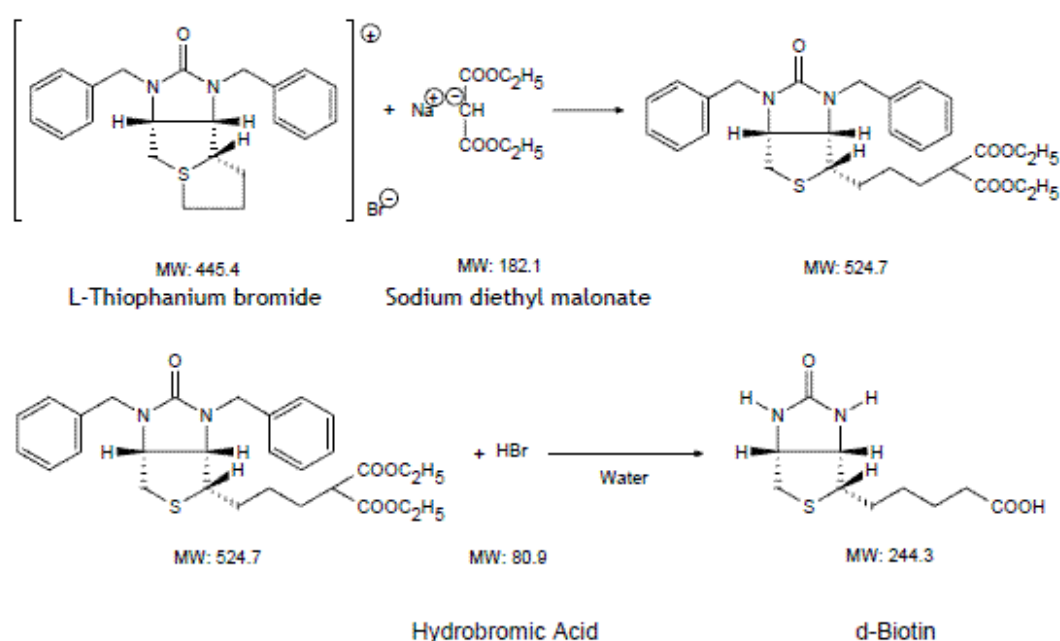
$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ 244.31

④ 含量

本品を乾燥したものは、ビオチン ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$) 98.0%以上を含む。

⑤ 製造方法

L-トリメタファンとマロン酸ジエチルを縮合反応させ、次に臭化水素酸で処理するとベンジル基が脱離し、ケン化により脱炭酸してビオチンを合成する。



⑥ 性状

本品は、白色の結晶又は結晶性の粉末で、におい及び味はない。

⑦ 確認試験

1. 本品のエタノール溶液（1→10,000）5ml に *p*-ジメチルアミノシンナムアルデヒド試液 1ml 及び硫酸 3 滴を加えて振り混ぜるとき、液は、だいだい～赤色を呈する。
2. 本品を乾燥し、赤外吸収スペクトル測定法中の臭化カリウム錠剤法により測定するとき、 $3,315\text{cm}^{-1}$ 、 $1,708\text{cm}^{-1}$ 、 $1,687\text{cm}^{-1}$ 、 $1,481\text{cm}^{-1}$ 、 $1,320\text{cm}^{-1}$ 及び $1,274\text{cm}^{-1}$ のそれぞれの付近に吸収帯を認める。

⑧ 純度試験

1. 比旋光度 $[\alpha]_D^{20} = +89 \sim +93^\circ$ （0.4g、希水酸化ナトリウム試液、20ml、乾燥物換算）
2. 溶状 無色、澄明（1.0g、0.5mol/L 水酸化ナトリウム試液 10ml）
3. 重金属 Pb として $10\mu\text{g/g}$ 以下（2.0g、第 2 法、比較液 鉛標準液 2.0ml）
4. ヒ素 As_2O_3 として $2.8\mu\text{g/g}$ 以下
本品 0.70g をケルダールフラスコに入れ、硝酸 5ml 及び硫酸 2ml を加えて、フラスコの口に小漏斗をのせ、白煙が発生するまで加熱する。冷後、硝酸 2ml ずつを 2 回加えて加熱し、更に過酸化水素 2ml ずつを数回加えて液が無色～微黄色となるまで加熱を続ける。冷後、飽和シュウ酸アンモニウム溶液 2ml を加え、再び白煙が発生するまで加熱濃縮する。冷後、水を加えて 5ml とし、検液とする。装置 B を用いる。
5. 類縁物質
本品 0.10g を量り、アンモニア水（7→100）を加えて溶かし、正確に 10ml とし、検液とする。検液 1ml を正確に量り、アンモニア水（7→100）を加えて正確に 500ml とし、標準液とする。検液及び標準液 $5\mu\text{l}$ を量り、1-ブタノール／水／酢酸混液（5：2：1）を展開溶媒として薄層クロマトグラフィーを行い、展開溶媒の先端が原線より約 10cm の高さに上昇したとき展開をやめ、風乾し、更に 105°C で 30 分間乾燥した後、*p*-ジメチルアミノシンナムアルデヒド・エタノール溶液（1→500）／硫酸・エタノール溶液（1→50）混液（1：1）を均等に噴霧するとき、一つの赤色のスポットを認めるか、又は他のスポットを認めても標準液から得たスポットより濃くない。ただし、薄層板には、担体として薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを 110°C で 1 時間乾燥したものを使用する。

⑨ 乾燥減量 0.50%以下 (105℃, 4 時間)

⑩ 強熱残分 0.10%以下

⑪ 定量法

本品を乾燥し，その後 0.25g を精密に量り，0.1mol/L 水酸化ナトリウム液 20ml を正確に加えて溶かし，過量の水酸化ナトリウムを 0.1mol/L 塩酸で滴定する（指示薬 フェノールフタレイン試液 2 滴）。空試験を行い補正する。

0.1mol/L 水酸化ナトリウム液 1ml = 24.43mg $C_{10}H_{16}N_2O_3S$

⑫ 物質の安定性

製造元で実施された安定性試験において、本品（ロット番号 607027）を 5℃、室温、35℃の条件下で 3 年間保存した結果、性状、融点、旋光度及び含量は、表 1-1～1-3 に示すように試験開始時と比べ、ほとんど変化は認められなかった。それ故、本品は室温で 3 年間は安定であると判断された（添付資料 15）。

表 1-1 保存期間：5℃

保存期間 試験項目		試験開始時	3 箇月	6 箇月	12 箇月	24 箇月	36 箇月
性 状	外観	結晶性の粉末	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし
	色	白色	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし
	におい 注)	ほとんどに おいがない	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし
融点 (℃)		231	232	232	232	231	230
比旋光度 [α] _D ²⁰ (°)		+90.8	+91.4	+90.9	+90.9	+90.6	+90.5
含 量	実測値 (%)	100.1	99.8	99.5	99.7	99.7	100.1
	残存率 (%)	—	99.7	99.4	99.6	99.6	100.0

表 1-2 保存期間：室温（20～25℃）

保存期間 試験項目		試験開始時	3 箇月	6 箇月	12 箇月	24 箇月	36 箇月
性 状	外観	結晶性の粉末	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし
	色	白色	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし
	におい	ほとんどにおいが無い	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし
融点（℃）		231	231	231	232	229	231
比旋光度 [α] _D ²⁰ （°）		+90.8	+90.9	+90.8	+90.8	+90.9	+90.5
含 量	実測値 （%）	100.1	99.6	99.5	99.8	99.7	99.7
	残存率 （%）	—	99.5	99.4	99.7	99.6	99.6

表 1-3 保存期間：35℃

保存期間 試験項目		試験開始時	3 箇月	6 箇月	12 箇月	24 箇月	36 箇月
性 状	外観	結晶性の粉末	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし
	色	白色	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし
	におい	ほとんどにおいが無い	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし
融点（℃）		231	232	230	232	231	231
比旋光度 [α] _D ²⁰ （°）		+90.8	+91.3	+91.2	+91.0	+90.8	+90.7
含 量	実測値 （%）	100.1	99.9	99.5	99.8	99.9	99.5
	残存率 （%）	—	99.8	99.4	99.7	99.8	99.4

⑬ 母乳代替食品中の目的物質の分析法

平成 13 年 3 月 27 日、食新発 第 17 号 別紙の ビオチンの微生物定量法により分析を行う（添付資料 16）。

(1) 微生物定量法

① 試薬

- ・ ビオチン標準溶液：D-ビオチン標準品^{注1)} 20 mg を 25% (V/V) エタノール溶液に溶かし、正確に 200ml とする。更に、水で希釈して 0.5 ng/ml となるようにする。
- ・ 使用菌株：*Lactobacillus plantarum*^{注2)} (ATCC 8014)
- ・ ビオチン測定用培地（1 L 中、pH 6.8 ± 0.1）

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	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	グルコース	40 g
パントテン酸カルシウム	400 μg		
- ・ 乳酸菌保存用培地（1 L 中、pH 6.8 ± 0.1）

酵母エキス	5.5 g	リン酸二水素カリウム	0.25 g
ペプトン	12.5 g	酢酸ナトリウム（無水）	10 g
ブドウ糖	11.0 g	硫酸マグネシウム	0.1 g
リン酸一水素カリウム	0.25 g	硫酸マンガン	5.0 mg
硫酸第一鉄	5.0 mg	粉末寒天	20.0 g
- ・ 前培養培地：上記培地より粉末寒天を除く。
 なお各培地はそれぞれ調製したものが市販されている^{注3)}。
- ・ その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

② 接種菌液の調製

Lactobacillus plantarum の保存菌株を前培養培地に接種し、35℃で 20 時間培養する。この菌浮遊溶液を遠心分離し、600 nm における透過率が 80～90% になるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

③ 試験溶液の調製

試料 2 g を精秤し、2 mol/L あるいは 3 mol/L 硫酸 25ml を加え、121℃で 1 時間オートクレーブで加圧分解する。冷却後、5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 4.5 に調整後、水を加えて 100 ml に定容し、ろ過する。ろ液 25 ml を分取して 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 6.8 に調整後、50 ml に定容し、ろ過して試験溶液とする^{注4)}。

④ 測定

試験管 2 本ずつに試料溶液 0.5, 1.0 及び 2.0 ml を正確に加え、次に各試験管に測定用培地 2.5 ml 及び水を加えて全量を 5 ml とする。別に検量線作成のため、ビオチン標準溶液 (0~0.15 μ g 相当量) を試験管 2 本ずつにとり、それぞれに測定用培地 2.5 ml 及び水を加えて全量を 5 ml とする。121℃で 5 分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌溶液 1 滴 (約 30 μ l) ずつを無菌的に接種し、37℃で 18 時間恒温水槽に入れて培養する。

培養後、増殖度を 600 nm の濁度を用いて測定する^{注5)}。標準溶液の濁度より検量線を作成し、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中のビオチン量を求め、試料中のビオチン含量を算出する。

[注]

- 1) 関東化学 特級、または同等品を用いる。
- 2) 旧名称は、*Lactobacillus arabinosus* である。
- 3) ビオチン定量用基礎培地「ニッスイ」：日水製薬
一般乳酸菌保存検出用培地「ニッスイ」：日水製薬
一般乳酸菌接種用培地「ニッスイ」：日水製薬 (前培養培地に同じ)
- 4) ビオチン含量の高い食品については、水で振とう抽出し、ろ過して得られたろ液を 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 6.8 に調整し、試験溶液とすることもできる。また、この場合、ビオチンを紫外吸収あるいは蛍光を有する誘導体に導いた後、勾配溶出液体クロマトグラフ法で定量する方法も適用できるが、詳細は下記の文献に譲る。
- 5) マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダー (たとえば、日本モレキュラーデバイス社製、スペクトラMAX型など) で濁度を測定することもできる。

(2) 食品中 (調整粉乳) のビオチンの定量法について、添加回収試験を実施した結果を表 2 に示す (添付資料 17)。

表 2 食品中ビオチンの定量法の添加回収試験結果

測定結果			
試行	ビオチン（ μ g/100g）		回収率（%）
	無添加試料	添加試料	
1			
2			
3			
4			
5			
平均			
変動係数			

(3) 有効性／必要性に関する資料

ア) 栄養素としての機能

ビオチンは、哺乳動物において、カルボキシラーゼの補酵素として炭素固定反応や炭素転移反応に不可欠であり、脂肪酸の生合成や糖新生、アミノ酸代謝等に深く関与しており、ビオチンが欠乏するとエネルギー代謝やさまざまな生理機能が障害される（添付資料 18）。特に、皮膚や粘膜の健康維持に関わる、必須栄養素である。

イ) 乳幼児における有効性

ビオチンは動物の肝臓や卵黄、豆類をはじめさまざまな食品に含まれており、また腸内細菌によっても生合成されるため一般的に欠乏は起こらないと考えられている。

- ・しかしながら、近年、特殊医療用調製乳を摂取する一部の乳幼児に、皮膚炎や脱毛症など（皮膚の乾燥、びらん、発赤、重症の場合眼瞼・口唇・肛門周辺の紅斑及びびらん、脱毛）のビオチン欠乏症状が見られる。特に、アレルギー用ミルクを摂取している症例が多く、眼瞼・口唇・肛門周囲の紅斑及び脱毛などが起こる。ビオチンの経口投与により、症状の改善あるいは完治が報告されている（添付資料 4）。

- ・これら欠乏症の原因は、特殊医療用調製乳中のビオチン量が不足しているためである。

- ・乳児用調製乳にあっても、製造の工程で原材料に含まれるビオチンが取り除かれてしまうため、栄養を調製乳に依存している乳児（人口栄養児）は、潜在的なビオチン欠乏状態にある可能性が考えられる。

- ・実際に、我が国で販売されている一般調製粉乳のビオチン含有量は、平均 $1.04 \pm 0.36 \mu\text{g}/100\text{kcal}$ 及び特殊医療用調製乳中のビオチン量は平均 $0.40 \pm 0.39 \mu\text{g}/100\text{kcal}$ であり、コーデックス基準（下限値： $1.5 \mu\text{g}/100\text{kcal}$ 以上、上限値：なし、guidance upper level： $10 \mu\text{g}/100\text{kcal}$ ）と比較して著しく低い（添付資料 5）。（コーデックスのこの規格は、乳児の正常な栄養要求を満たすことを目的とするものである。）

- ・しかし、現在、ビオチンの食品添加物としての使用は保健機能食品に限定されており、これらミルクへの添加は認められていない。

(4) 安全性に関する資料

ビオチンは、天然の食物の中に微量ながら含まれており、食品常在成分として古くからその存在が知られている。ビオチンは、人体に必要な物質であり、医薬品として大量に摂取した場合の過剰症等は知られていない。医薬品としては、栄養剤等の一般用医薬品及び医療用医薬品として一日当たり 200mg 摂取された経験があること、後述する 120 日間反復投与毒性試験等により特段の毒性は認められていないこと及び必須物質であり、過剰症等は認められていないことから、適正な量の摂取においては、安全性に問題はないものと考えられる。ヒトでの安全な使用経験があることから、発がん性試験、1 年反復投与毒性／発がん性併合試験及び抗原性試験は実施していない。

また、ビオチンの発がん性に関して、以下の国際機関による評価はなされていない（添付資料 19-1、19-2、19-3、19-4）。

- International Agency for Research on Cancer (IARC)
- European Chemicals Agency (ECHA)*
- the Joint Research Centre's Institute for Health & Consumer Protection (IHCP)*
- US Environmental Protection Agency (EPA)
- National Toxicology Program (NTP)

*2008 年以降、European Chemicals Bureau (ECB) の活動を引き継いでいる機関。

① 毒性試験

ア 単回投与毒性試験

動物種	投与経路	投与量 (g/kg 体重)	LD ₅₀ , (mg/kg 体重)	結果
1) マウス	経口投与	—	>10,000	—
2) マウス	静脈内投与	1	—	毒性症状発現なし

- 1) National Academy of Science (米国国立科学アカデミー) /National Research Council (米国研究協議会) の 1972 年の報告では、マウスに 10,000mg/kg 体重のビオチンを経口投与して LD₅₀ を調べた結果、LD₅₀ は 10,000mg/kg 体重以上であった（添付資料 20）。
- 2) 平均体重 20g のマウスに、1g/kg 体重 の dl-ビオチンを 1 回静脈内投与したところ、毒性症状の発現を認めなかった（添付資料 20、21）。

イ 亜急性毒性試験

1) 60 日間反復投与毒性試験

動物種		マウス
試験方法	投与経路	経口投与
	投与量	1mg/日
	投与期間	60 日間
結果		毒性認めず。群間の死亡率に差認めず。

7 週令（15 匹）及び 14 週令（10 匹）の 2 群のマウスに 60 日間経口投与した。生理食塩水 0.2mL に溶解した 1mg の d1-ビオチンを投与し、対照として、それぞれの 10 匹の 2 群のマウスに 0.2mL の生理食塩水のみを投与した。ビオチンによると思われる毒性症状の発現は認められず、また、死亡率でも群間に有意差は認められなかった（添付資料 20、21）。

2) 10 日間反復投与毒性試験

動物種		雄ラット
試験方法	投与経路	経口投与
	投与量	50mg／日
	投与期間	10 日間
結果		血液検査及び剖検時の肉眼所見で変化認めず。

平均体重 141g の 5 匹の雄ラットに、胃管により 50mg の d-ビオチンを毎日 10 日間投与し毒性を調べた。毒性症状の発現は認められず、赤血球数、白血球数及びヘモグラビン量についても変化は認められなかった。また、解剖時の肉眼所見についても変化は認められなかった（添付資料 20、21）。

3) 28 日間反復投与毒性試験

動物種		雄ラット
試験方法	投与経路	経口投与
	投与量	0.00002% (0g/100g 飼料：対照群)、0.04% (0.04g/100g 飼料)、0.08% (0.08g/100g 飼料)、0.10% (0.10g/100g 飼料)、0.20% (0.20g/100g 飼料)、0.50% (0.50g/100g 飼料)、0.80% (0.80g/100g 飼料)、1.00% (1.00g/100g 飼料)
	投与期間	28 日間
結果		対照群と比較し、0.08%以上のビオチン投与群で、摂餌量の減少と体重増加の抑制が認められた。

3 週齢の雄ラットに、0.00002%のビオチン添加飼料投与群を対照として、0.04%～1.00%のビオチンを添加した飼料を 28 日間経口投与した。その結果、対照群と比較して、0.08%以上の投与群において、摂餌量の減少と体重増加の抑制が認められた（添付資料 22）。0.08%のビオチン投与量は 79.2 mg/kg 体重/日に相当するが、ヒトにおけるビオチン摂取量に換算した場合、保健機能食品において設定されているビオチンの一日の摂取目安量の上限值である 500 μ g と比較しても極めて多量であり（添付資料 2）、通常ヒトが加工食品等から摂取しうるビオチン量をはるかに上回ると考えられる。

4) 120 日間反復投与毒性試験

動物種		雄ラット
試験方法	投与経路	経口投与
	投与量	5mg／日
	投与期間	120 日間
結果		試験終了時の平均体重は、対照群に比べ 35g 低かった。一般症状に異常は認められず、血液検査及び腎・肝機能にも異常は認められなかった。

1 群 5 匹の雄ラットに、5mg の d-ビオチンを毎日 120 日間投与し、また、対照として 5 匹のラットに生理食塩水 1mL を与えた。試験終了時の平均体重は、対照群に比べ d-ビオ

チン投与群で 35g 低い値を示した。試験期間を通じ一般症状に異常は認められず、血球数、ヘモグロビン量については有意な変化はなく、肝及び腎機能にも異常は認められなかった（添付資料 20、21）。

5) 10 日間反復投与毒性試験

動物種		イヌ
試験方法	投与経路	静脈内投与
	投与量	10mg／日
	投与期間	10 日間
結果		行動、体重、尿検査、血液検査及び組織に変化認めず。

体重 6～10.8kg の 4 頭のイヌに、10mg の d-ビオチンを連続 10 日間静脈内投与した。一般行動、体重、直腸温並びに被毛、皮膚、頬粘膜、舌及び歯の状態、角膜反射、引っ掻き反射、瞳孔反射、心拍数及び呼吸数などの検査項目において、変化は認められなかった。尿については、尿量、pH、比重、尿沈査（顕微鏡的検査）並びにアルブミン及び血液の存在について検査したが、いずれの変化も認めなかった。赤血球数、白血球数及びヘモグロビン量についても変化は認められず、注射に用いた静脈にも血栓形成の徴候は見られなかった。解剖した一匹のイヌについても肉眼的に組織の変化は認められなかった（添付資料 20、21）。

ウ 1 年間反復投与毒性試験

動物での慢性毒性試験に関する報告はなく、長期毒性試験（一年間反復投与毒性試験）資料について検索を行ったが、該当する文献は認められなかった（添付資料 23）。

エ 生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験に関する報告はない（添付資料 24）。

オ 出生前発生毒性試験

8 週齢の妊娠マウスにビオチンを 0.1%または 1%添加した飼料を与えたところ、ビオチン 1%添加群の胎児において、短肢症、小顎症、浮腫等の催奇形性が認められたとの報告がある（添付資料 25）。この際の 1%添加群の飼料中のビオチン含量は、対照となる通常飼料（ビオチン含量は 0.00004%）と比較して 2500 倍と極めて多量であった。

雌ラットの生殖器官に及ぼす急性用量のビオチンの影響についての報告がある（添付資料 26）。0.1N 水酸化ナトリウム 2ml に溶解したビオチンを一日 2 回、5mg／100g 体重 皮下投与した結果、ラットに不妊の徴候が見られたと報告されている。ビオチン投与により卵巣、子宮、肝臓及び体重増加に関する有意な影響は見られていない。ビオチンは、卵巣から放出されるプロゲステロン及びエストロゲンの比率を変えることによって、肝及び子宮のグリコーゲンに影響を及ぼすと推測されているが、対照群との間に有意な差は認められていない。このように、ビオチンによるラットでの生殖への負影響を認めた試験が報告されているものの、この場合のビオチンの投与量は、50mg/kg 体重を一日 2 回と極めて多量であった。この量は、ヒトがビオチン含有の加工食品や食品の常在成分として摂取し得る量をはるかに上回っている。

一方、渡辺は胚の発育についてマウスを用い過剰のビオチン投与による影響について報告している（添付資料 27）。すなわち、ビオチンをオイル及び 0.1N 水酸化ナトリウムに懸濁または溶解し、それぞれ 50mg/kg 体重を妊娠期間中皮下投与した。あるいは、0.1%のビオチンを含む飼料を妊娠期間中自由に摂取させた。その結果、いずれのビオチン投与群においても、死亡仔数、吸収胚数、胚の発育等において、対照群との間に差は認められず、有害な生体への影響は認められなかった。

また、妊娠後期からビオチン 10mg/日が妊婦に経口投与された症例があるが、健康が維持されたとの報告もある（添付資料 28）。

カ 遺伝毒性試験

1) Ames 試験（添付資料 29）

Salmonella typhimurium（ネズミチフス菌）の TA98、TA100、TA1535、TA1538、4 種を用いて試験を行った。ビオチンの濃度は、0、0.3、1.0、3.0mg/100ml であった。

表 3 に示すように、各群間に有意差は見られず、変異原性は認められなかった。

通常、ビオチンが変異原性を有しないことは、Ames 試験での培地に栄養素として添加されていることからわかる。

Salmonella typhimurium

* TA100、TA1535：一対の塩基の置換変異誘発素に対し感受性が強い。

* TA98、TA1538：フレームシフト変異誘発素に対し感受性が強い。

表 3：コロニー形成能（%）

ビオチン濃度 (mg/100ml)	TA98		TA100		TA1535		TA1538	
	平均値	S. D.	平均値	S. D.	平均値	S. D.	平均値	S. D.
0	100	17.3	100	9.9	100	14.9	100	39.3
0.3	115	3.7	99	15.6	114	57.9	86	28.3
1.0	115	9.8	98	11.7	103	29.6	86	12.7
3.0	117	22.9	96	20.9	111	14.5	88	19.5

ビオチン無添加を 100 とし、%で表した。

いずれの場合も有意差は認めなかった。

2) 米国において「一般に安全とみなされた物質（GRAS 物質）」の 41 物質について FDA により Ames 試験が実施されており、この中に D-ビオチンも含まれている（添付資料 30）

細菌は、ヒスチジン要求性の変異を指標とするネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*: TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538) を、また、トリプトファン要求性の変異を指標とする大腸菌 (*Escherichia coli* strain WP2) を用いて試験が実施されており、D-ビオチンの濃度は、

33.3、100.0、333.3、1000.0、3333.3 及び 10000.0 μ g/プレートであった。

結果として、いずれの菌株においても D-ビオチンの変異原性及び毒性は認められなかった。

3) ビオチンの L5178Y マウスリンフォーマ細胞を用いる突然変異試験 (添付資料 31)

ビオチンの変異原性を調べる為に、L5178Y/tk^{+/+}-3.7.2C マウスリンフォーマ細胞 (L5178Y) を用い、トリフルオロチミジン (TFT) 耐性を指標とする突然変異試験を実施した。

突然変異試験におけるビオチンの濃度を求める為に、細胞毒性試験を行った。その結果、すべての系列で細胞毒性は認められなかったことから、突然変異試験では、S9 mix 非存在下及び存在下 (1 回目)、及び 24 時間処理においては 0.5~2.5 mg/mL の範囲で 6 濃度、S9 mix 存在下の 2 回目においては、1.5~2.5 mg/mL の範囲で 6 濃度を設定して試験を行った。その結果、すべての処理系列において、突然変異頻度の上昇は認められず、また、濃度依存性も認められなかった。

以上の結果より、ビオチンは本実験条件下において、L5178Y 細胞で突然変異を誘発しないと結論した。

なお、小核試験は実施していないが、上記の *in vitro* の遺伝毒性試験の結果遺伝毒性は認められず、また、ヒトでの医薬品及びサプリメントとしての長年にわたる安全な使用経験から、ビオチンは安全に使用することができると考えられる。

② 体内動態

ラット 6 匹に、D-カルボニル-¹⁴C ビオチンを 57pmol/g の用量で投与した試験では、全放射活性の 98%以上が尿中に排泄された。尿中全放射活性の 90%以上が、ビオチン、ビスノルビオチン、及び硫酸ビオチンであり、投与後 24 時間では、未変化体ビオチンが全放射活性の 51%、ビスノルビオチンが 29%、硫酸ビオチンが 10%であった。これらとヒト 10 検体から得られたデータを比較した結果、両者の代謝プロファイルは類似していた (添付資料 32)。

ラットに、ウレイド基をラベルした ¹⁴C ビオチンを 13.5 μ g の用量で腹腔内投与した試験では、投与後 3 日間での総排泄量は全放射活性の 87%であり、そのうち約 85%が投与後 24 時間以内に尿中に排泄された。糞中からは投与後 3 日間で全放射活性の約 7%が回収され、また、投与 3~6 日後で、肝臓に約 5~8%の放射活性が残存していた。その他の臓器では放射活性の残存はわずかであるか、あるいは検出されなかった (添付資料 33)。

雄のラットに、ウレイド基をラベルした ^{14}C ビオチンを 5、40 μg 又は 10mg/kg の用量で腹腔内投与した試験では、投与後 24 時間以内で投与量のほぼ 100%が排泄され、そのうち 90%以上が投与後 12 時間以内に尿中に排泄された。呼気及び糞中からは放射活性はほとんど検出されなかった（添付資料 34）。

通常食あるいはビオチン欠乏食を摂取した雄ラットから単離した肝臓を用いて d-[8, 9- ^3H (N)] ビオチンの取り込みを検討した試験においては、ビオチン欠乏食を摂取したラットから得られた細胞においては、ビオチンの取り込みの減少が認められた。ビオチンの取り込みは著しく温度の影響を受けた。また、 ^3H -ビオチンの取り込みはナトリウムイオン濃度に依存しており、acid-anion キャリアーによって促進された（添付資料 35、36）。

ヒトとラットにおいて、ビオチンの総排泄量は摂取量よりも多く、これは結腸内微生物によりビオチンが生合成されているためと考えられた。また、ビオチンの吸収に関してはいくつかの文献報告がなされており、ヒト及びラットにおけるビオチンの主要吸収部位は近位、中位小腸であり、ビオチンが高濃度に存在する場合には単純拡散により吸収されるが、低濃度の場合には輸送担体を介して吸収されると報告されている（添付資料 37、38、39）。

ヒトにビオチンを 600 又は 900 μg を 5 日間経口摂取させた試験では、2 日後に尿中排泄率が増加し、また、健康なヒトに最初の 7 日間にビオチンを 300 μg 、次の 7 日間には 900 μg を経口摂取させた別の試験では、血漿中のビオチン濃度と尿中のビオチン濃度が持続的に増加したと報告されている（添付資料 49）。

ヒトにビオチンを 1200 μg を 2 週間経口摂取させた試験では、ビオチンの血清濃度が当初の 60ng/L から試験開始初日で平均 3738ng/L、14 日後には平均 5521ng/L まで上昇し、ビスノルビオチンとビオチンスルホキシドは試験開始初日で開始前のそれぞれ 24 倍、46 倍に、14 日後には初日のそれぞれ 2.5 倍、2.3 倍となった。また、尿中排泄率は、ビオチン、ビスノルビオチン、ビオチンスルホキシドでそれぞれ開始前の 324 倍、85 倍、114 倍になったと報告されている（添付資料 50、51）。

ヒトにビオチンを 2 週間以上、2.1、8.2、81.9 μmol を経口摂取又は 18.4 μmol 静脈内投与させた試験では、2.1、8.2 μmol 経口投与群と比べて、81.9 μmol 経口投与群及び静脈内投与群で尿中排泄率が高く、代謝物としてビスノルビオチン（13～23%）、ビオチン-d,1-スルホキシド（5～13%）、ビスノルビオチンメチルケトン（3～9%）、ビオチンスルホン（1～3%）が認められたと報告されている（添付資料 52）。

③ ヒトにおける知見

ビオチンは、天然の食物の中に微量ながら含まれており、食品常在成分として古くからその存在が知られている。その安全性については、長い食経験からも安全な成分であることが推察される。

これまで、医薬品の経口ビオチン製剤での警告・禁忌、使用上の注意、副作用等の報告はなく（添付資料 40）、また、経口ビオチン製剤および食品添加物としてのビオチンが原因となる有害事象報告も認められていない（添付資料 41）。

ヒトでの報告は、すべて治療目的である。

医薬品としての使用経験から以下の臨床試験成績においても、副作用等の報告はない。

1) 皮膚科での臨床試験（添付資料 42）

対象		皮膚科の患者
試験方法	投与経路	経口投与、筋肉内投与
	投与量	60mg／日（経口）、100mg（筋肉内）
	投与期間	3 週間
結果		ともに副作用は認めず。

皮膚科の臨床試験で、ヒトに 60mg／日のビオチンを 3 週間経口投与した場合、及び 100mg／日のビオチンを 3 週間筋肉内投与した場合、ともに副作用は認められなかった。

2) 乳児の皮膚炎に対する臨床試験（添付資料 42、43）

対象		皮膚炎の乳児 30 名
試験方法	投与経路	①経口投与、②筋肉内投与、③：①②併用
	投与量	①2～6mg／日、②5mg／日
	投与期間	①7～28 日間、②5～17 日間
結果		いずれも副作用は認めず、大部分の症例において改善が見られた。

3 ヶ月齢以下の皮膚炎の症状が見られる 30 人の乳児に対し、3 種類のビオチン投与試験を行った。9 人の乳児に 2～6mg／日のビオチンを 7～28 日間経口投与、15 人の乳児に 5mg／日のビオチンを 5～17 日間筋肉内投与、その他の乳児には頻度を少なくした筋肉内投与或いは経口・筋肉内の併用投与を行った。副作用は認められず、大部分の症例において改善が見られた。

3) 爪異常症に対する臨床試験（添付資料 42）

試験の種類		臨床試験
対象		爪異常症、18 歳から 48 歳までの 5 名
試験方法	投与経路	経口投与
	投与量	120mg／日
	投与期間	40 日間
結果		副作用は認められず、症状の一部緩解が見られた。

18 から 48 歳までの爪異常症の 5 人の患者に対し、120mg／日のビオチンを 40 日間経口投与した。ビオチンの大量投与による副作用は認められず、症状の一部緩解が認められた。

4) 禿頭症に対する臨床試験（添付資料 42、44）

試験の種類		臨床試験
対象		禿頭症の女性 28 名
試験方法	投与経路	経口投与
	投与量	10mg／日（約 200 μ g／kg 体重）
	投与期間	28 日間
結果		毛根の状態及び皮脂分泌量に何ら影響はなく、副作用も見られなかった。

17 から 51 歳まで禿頭症の 28 人の女性患者に対し、10mg／日（約 200 μ g／kg 体重）のビオチンを 28 日間経口投与した。毛根の状態及び皮脂分泌物の量に何ら影響はなく、副作用も認められなかった。

ビオチンは、海外において食品成分等として食品に広く用いられていること、我が国においても長期服用も含めた一般用医薬品として使用経験も長く、これまでに副作用の報告はなされていないこと、及びビオチンは水溶性のビタミン B 群に属し、基本的には長期投与による蓄積性はないと考えられることから、ビオチンの安全性については、基本的に問題はないと考えられる。

④ 1日摂取量の推計

現在、ビオチンには「保健機能食品以外の食品に使用してはならない。」と、使用基準が設定されており（添付資料1）、一日当たりの摂取目安量の上限は500 μ gとされている（添付資料2）。

日本人の食事摂取基準（2010年度版、厚生労働省）によると、乳児期の哺乳量は、生後15日目～5か月では780mL/日、6か月～11か月では525mL/日となっている（添付資料45）。これより、乳児用ミルク及びフォローアップ用ミルクの摂取量をそれぞれ780mL/日、525mL/日として、乳児用調製乳、特殊医療用調製乳、調製液状乳にビオチンを添加した場合の1日当たりのビオチン摂取量を算出した。添加量は、乳児用の場合はCodex規格（添付資料5）を参照し1.5～10 μ g/100kcal、フォローアップ用の場合はEU指令（添付資料46）を参照し1.5～7.5 μ g/100kcalとした。その結果、ビオチン摂取量は5.07～52.9 μ g/人/日となり、推定最大摂取量は約53 μ g/人/日となった（表4）。

なお、現在ビオチンの耐容上限量は定められていない（添付資料47）。

表4 乳児及び小児におけるビオチンの推定1日摂取量

		乳の1日摂取量		ビオチン添加量 (μ g/100 kcal)	ビオチンの 1日当たり の摂取量 (μ g/日)
		mL/ 日	kcal/日 (平均) *		
乳児用調製乳	乳児用	780	523.5	1.5～10	7.85～52.4
	フォローアップ用	525	345	1.5～7.5	5.18～25.9
特殊医療用調製乳		780	528.6	1.5～10	7.93～52.9
調製液状乳	乳児用	780	521	1.5～10	7.82～52.1
	フォローアップ用	525	338	1.5～7.5	5.07～25.4

*1日当たりのカロリー摂取量の値は、国内各社の製品の調乳液100mL当たりのカロリーに、乳児用では780mL/日、フォローアップミルクでは525mL/日を乗じた数値の平均値である。

(5) 使用基準（案）

	使用基準
現行	ビオチンは、保健機能食品以外の食品に使用してはならない。
改正（案） （改正部分は 下線箇所）	ビオチンは、保健機能食品及び母乳代替食品以外の食品に使用してはならない。 <u>ビオチンは、乳及び乳製品の成分規格等に関する省令別表の二 乳等の成分規格並びに製造、調理及び保存の方法の基準の部(五) 乳等の成分又は製造若しくは保存の方法に関するその他の規格又は基準の款(6)の規定による厚生労働大臣の承認を受けて調製粉乳に使用する場合を除き、母乳代替食品を標準調乳濃度に調乳したとき、その 100kcal につき、ビオチンとして 10 μg を超える量を含むないように使用しなければならない。</u>

文献集：資料目録

資料 番号	題名	出典	年号
1	ビオチン 第 8 版食品添加物公定書	日本食品添加物協会	2007 年
2	栄養表示基準	消費者庁告示第 9 号	平成 21 年 12 月 16 日 一部改訂
3	環食化第 38 号：食品衛生法施行 規則、乳及び乳製品の成分規格 等に関する症例及び食品、添加 物等の規格基準の一部改正につ いて	厚生省環境衛生局	昭和 58 年 8 月 27 日
4	特殊ミルク・経腸栄養剤使用時 のピットホール	日本小児科学会雑誌 116 巻 4 号	2012 年
5	STANDARD FOR INFANT FORMULA AND FORMULAS FOR SPECIAL MEDICAL PURPOSES INTENDED FOR INFANTS	CODEX STAN 72-1981	2007 年 2011 年改正
6	海外で販売されているミルク (IF) の微量元素組成	社内資料	2012 年 1 月 31 日
7	わが国の調製粉乳に含まれてい るビオチン量の分析	日本栄養・食糧学会誌 Vol. 49, No. 6	1996 年
8	XCV. THE EFFECT OF DESICCATION UPON THE NUTRITIVE PROPERTIES OF EGG- WHITE	Biochem. J M. A. Boas	1927 年
9	ビオス問題に関して卵黄由来の 結晶性ビオチンの特性 植物性成長促進物質に関する 第 20 回報告書 Über das Bios-Problem. Darstellung von krystallisiertem Biotin aus Eigelb	Z. Physiol. Vol. 242 Von Fritz Kogl und Benno Tonuis	1936 年
10	A FURTHER NOTE ON THE IDENTITY OF VITAMIN H WITH BIOTIN	SCIENCE P. Gyorgy et al.	1940 年
11	Opinion of the Scientific Committee on Food the Tolerable Upper Intake Level o Biotin	Scientific Committee on Food, European Commission	2001 年 10 月 10 日

12	Code of Federal Regulations Title 21- Food and Drug: 350a Infant formulas	U.S. Food and Drug Administration	
13	COMMISSION DIRECTIVE 2006/141/EC of December 2006 on infant formulae and follow-on formulae and amending Directive 1999/21/EC	Official Journal of the European Union	2006 年
14	STANDARD 2.9.1 INFANT FORMULA PRODUCTS	Australia New Zealand Food Standards Code	
15	Stability Data: d-BIOTIN PURE: Lot 607027	社内資料	
16	食新発第 17 号： 保健機能食品制度の創設に伴う 取扱い及び改正等について	厚生省医薬局	平成 13 年 3 月 27 日
17	試験報告書 食品中ビオチンの定量法の検討	社内資料	平成 5 年 1 月 26 日
18	調製粉乳における食品添加物と してのビオチン添加の重要性	JJPEN Vol. 20, No. 8 渡辺敏明	1998 年
19-1 19-2 19-3 19-4	国際機関によるビオチンの評価 の検索結果	社内資料	
20	ビオチン - ビオチンの安全性に関する 文献調査 -	化学物質の安全性調査 (化学工業日報社)	1982 年
21	STUDY ON THE PHARMACOLOGY OF BIOTIN	Arch. Int. pharmacodyn P. J. Crittenden	1948 年
22	Effects of Excess Biotin Administration on the Growth and Urinary Excretion of Water-Soluble Vitamins in Young Rats	Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 71, No. 12 H. Sawamura <i>et al.</i>	2007 年
23	PubMed 文献検索結果： 1 年間反復投与毒性試験	社内資料	
24	PubMed 文献検索結果： 生殖毒性試験	社内資料	
25	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	Trace Nutrients Research, Vol. 25 永井良子 他	2008 年
26	EFFECT OF AN ACUTE DOSE OF BIOTIN ON THE REPRODUCTIVE ORGANS OF THE FEMAL RAT	Curr. Sci. Vol. 42, No. 6 P. K. Paul <i>et al.</i>	1973 年

27	Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice	Experientia, Vol.52 T. Watanabe	1996
28	ビタミンを摂りすぎると	からだの科学 渡辺敏明	
29	Mutagenicity d-Biotin: The role of Biotin in monitoring the toxicity of chemicals to the Ames tester strains	A. L. Bhatia A. Wottawa	1981
30	Bacterial mutagenicity testing of 49 food ingredients gives very few positive results	Mutat. Res, Vol.260 M. J. Prival et al.	1991
31	ビオチンの L5178Y マウスリン フォーマ細胞を用いる 突然変異試験	社内資料	2002 年 2 月 21 日
32	The Metabolite Profile of Radioisotope-Labeled Biotin in Rats Indicates That Rat Biotin Metabolism In Similar to That in Humans	J. Nutr. K. S. Wang <i>et al.</i>	1996
33	Metabolic Fate of Biotin and of Avidin-Biotin Complex Upon Parenteral Administration	Biochem Biophys Acta, Vol.8 J. Freankel-Conrat and H. Freankel-Conrat	1952
34	Metabolism of Carbonyl-labeled ¹⁴ C-Biotin in the Rat	J Nutr, Vol.102 H. M. Lee <i>et al.</i>	1972
35	Transport and metabolism of vitamins	Federation Proceeding Vol. 45 R. C. Rose <i>et al.</i>	1986
36	Biotin Uptake by Isolated Rat Liver Hepatocytes	Ann N Y Acad Sci, Vol.447 D. Bowers-Komro and D.B. McCormick	1985
37	Intestinal Absorption of Water-Soluble Vitamins	Proc Soc Exp Biol Med, Vol. 212 R.C. Rose	1996
38	A carrier -mediated system for transport of biotin in rat intestine in vitro	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol H. M. Said and R. Redha	1987

39	Biotin Transport in the Human Intestine: Site of Maximum Transport and Effect of pH	Gastroenterology, Vol. 95, No. 5 H. M. Said, R. Redha, and W. Nylander	1988
40	日本薬品集 医薬品 2013 年版 一部抜粋	JH0	2013
41	食品添加物 ビオチン 有害事象検索結果	社内資料	
42	Evaluation of the Aspects of Biotin as a Food Ingredient	Life Sciences Research Office, Federation of American Societies for Experimental Biology M. D. Bethesda	1978
43	Dermatite seborrhoide et Biotine	P. Gautier <i>et al.</i>	1957
44	Effect of Biotin on Hair Roots and Sebum Excretion in Women with Diffuse Alopecia	Pol Med J, Vol V A. Pawlowski and B. W. Kostanecki	1966
45	日本人の食事摂取基準 (2010 年版) 一部抜粋	厚生労働省	平成 21 年 5 月
46	Commission Directive 2006/141/EC of 22 December 2006 on infant formulae and follow-on formulae and amending Directive 1999/21/EC	Official Journal of the European Union	2006 年 12 月 30 日
47	日本人の食事摂取基準 (2010 年版) 一部抜粋	厚生労働省	平成 21 年 5 月
48	Code of Federal Regulations Title 21- Food and Drug: 182.8159 Biotin.	U.S. Food and Drug Administration	
49	Studies on bioavailability of oral biotin doses for humans	R. Bitsch, I. Salz and D. Hötzel	1989
50	Urinary biotin analogs increase in humans during chronic supplementation: the analogs are biotin metabolites	D. M. Mock and G. M. Heird	1997
51	Serum concentrations of bisnorbiotin and biotin sulfoxide increase during both acute and chronic bitin supplementation	D. M. Mock and N. I. Mock	1997
52	Bioavailability of biotin given orally to humans in pharmacologic doses	J. Zempleni and D. M. Mock	1999