

小児における25(OH)-Vitamin D代謝-1-健康小児および各種疾患における血中25(OH)-Vitamin Dの変動

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8801

小児における 25(OH)-Vitamin D 代謝

第1編 健康小児および各種疾患における 血中 25(OH)-Vitamin D の変動

金沢大学小児科 (主任: 谷口 昂教授)

森 尻 悠 一 郎

(昭和54年11月17日受付)

本論文の要旨の一部は第26回日本内分泌学会東部部会 (1978)
および第52回日本内分泌学会秋期大会 (1979) で発表した。

最近の10年間における Vitamin D (以下 VD) 代謝に関する進歩は目ざましいものがある。DeLuca¹⁾の VD 作用発現までの retention time の報告に端を発し VD よりも retention time が短い最初の metabolite である 25-OHD₃ が発見された²⁾。さらにいくつかの新たな metabolite が同定されるに及び³⁾⁻⁶⁾ VD₃ 代謝経路もほぼ次のように判明した。すなわち cholesterol から誘導された 7-dehydrocholesterol は皮下組織中で紫外線により VD₃ に転化され経口摂取された VD₃ と共に肝臓の endoplasmic reticulum で microsomal enzyme によって水酸化され⁷⁾ 25-OHD₃ となる。この metabolite は腎臓の mitochondria に含まれる hydroxy enzyme によって 1,25-(OH)₂D₃ に変換されるかあるいは 24,25-(OH)₂D₃ となる⁸⁾。そしてこれらはさらに代謝されることも分った⁹⁾。植物由来の VD₂ も経口摂取された後同様に代謝されると考えられている⁹⁾。又これらの metabolite を血中レベルで測定する方法も radioassay 法やカラムクロマトグラフィーを導入して開発され、特に 25-OHD assay は Belsey ら¹⁰⁾ Haddad ら¹¹⁾によって VD 欠乏性ラット (以下 D 欠ラット) の血清又は腎ホモジネートを結合蛋白とした competitive protein binding radioassay 法が確立された。又血中 25-OHD 値は内因性、外因性の VD 供給や肝臓の代謝の状況により影響をうけ、それぞれに関係する因子、すなわち地域、生活様式、季節、肝や消化器等の障害などにより変動

するとされている。そこで著者は Belsey ら¹²⁾の direct assay 法を基に多少の修正を加え血中 25-OHD 測定法の基礎的検討を行い、1) 小児での反復測定のための測定感度の鋭敏化、2) 本法による測定系への 24,25-(OH)₂D₃ の影響を検討した。さらに血中 25-OHD 値について臨床的検討を行い、1) 正常小児の年齢別推移、2) 正常児の季節変動、3) 新生児テタニー、乳児肝炎、腎炎、神経性食欲不振症、下垂体性小人症などの疾患、4) VD₂ 剤、抗痙攣剤、steroid 剤などの薬剤に対する影響などについて考察を加えた。

I 測定法の基礎的検討

1. 材 料

1) 25-OHD 測定系 : 標準物質は結晶 25-OHD₃ (Upjohn Co. courtesy Dr. John Babcock) を ethanol に溶解し、1 μg/ml の濃度で 0.5 ml ずつ遮光アンプルに窒素下で分注し -20℃ で保存したものを使用した。標識物質は [26,27-³H]-25-OHD₃ の比活性 9ci/mmol (R.C.C.) を用いた。結合蛋白は Wister 系の幼若ラットを VD 欠乏食で飼育し 5~6 週目に採血した血清を用いた。Buffer は 3.5mM sodium acetate, 3.5mM sodium barbital, 0.13M NaCl を 1N の HCl で pH 8.6 に調整した。Dextran-coated charcoal は dextran T-60 (和光) 0.025%, norit-A charcoal (和光) 0.25% を上記 buffer に溶解したものを使用した。シンチレーターは Rcs シンチレーター (ボクスイ

Studies on the Metabolism of 25(OH)-Vitamin D Children-[I] Changes in Serum 25(OH)-Vitamin D Level in Health and Diseases-Yuichiro Morijiri, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University.

ブラウン)を使用した。

2) 24,25-(OH)₂D 測定系 : 標準物質は結晶 24,25-(OH)₂D₃ の ethanol 溶液を用いた。標識物質 24,25-(OH)₂ [23・24-³H]D₃ は比活性 70ci/mmole (R.C.C.) を使用した。測定サンプルは正常血清で 25-OHD 値 28.5ng/ml (direct assay) のものを標識血清とし、これの 24,25-(OH)₂D 値について検討した。

2. 方法

1) 25-OHD測定 : 採血後 -20℃ で保存したサンプル血清 0.1 ml に ethanol 0.9 ml を加え、振盪後 4℃ 30 分間放置し 3,000rpm 4℃ 30 分間遠心後上清 0.05 ml を competitive assay に供した。標準物質として 0, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10 ng/ml の各 25-OHD₃ ethanol 溶液を調整した。competitive assay は上記サンプル又は標準物質に 1:40,000 に希釈した結合蛋白を含む buffer 0.9 ml と ³H-25-OHD₃ を 1.3nci (= 60pg) を含む ethanol 溶液 0.05 ml を加え混合し 4℃ 120 分間 incubate した。終了後 dextran-charcoal 0.2 ml を加え振盪後 4℃, 20 分間放置した。ついで 3,000rpm 4℃ 5 分間遠心し上清 1.0 ml をカウント用ミニバイアル内でシンチレーター 1.5 ml と混合しゲル状態で Aloca LSL 671 液体シンチレーションカウンターを用い 10 分間カウントを行った。なお competitive assay は duplicate で行い、操作は ice-bath 内で行った。又この assay 系は VD₂ と VD₃ 系の分離が不可能であるため、その total を VD metabolite として示した。

2) 24,25-(OH)₂D の測定法 : 標準血清 0.5 ml を Bligh らの方法¹³⁾ に従って chloroform と methanol で抽出した。抽出物は窒素下で乾固し 0.6 × 15.5 cm の Sephadex LH-20 column に chloroform-hexane (55:45)¹⁴⁾ を溶出液とし展開した。24,25-(OH)₂D₃ 分画を乾固し、次に isopropanol-hexane (1:9)¹⁵⁾ を展開液とし Zorbax-SIL column, 島津 830 で高速液体クロマトグラフィー (以下 HPL) を行い 24,25-(OH)₂D₃ の分画を採集した。分画は乾固後 ethanol に溶解し 25-OHD assay 系を用い測定した。

3. 結果

1) 25-OHD の溶解性についての検討 : 25-OHD₃ は barbital-acetate buffer に対する溶解性が低く、報告では β-lipoprotein¹⁶⁾, bovine serum albumin¹⁶⁾, human serum albumin¹⁷⁾ などを buffer に添加して溶解性の増加を図っている。著者は buffer に gelatin を 0.01% 溶解することにより

blank tube に干渉することなく 25-OHD の溶解性を 2.7 倍に増加し得た。

2) Binding protein の濃度についての検討 : 小児科では採血量が少ない場合が多いため、サンプル血清は 0.1 ml とし測定感度を 3ng/ml 以上を目標とし 15pg/tube を検出できる binding protein 濃度を検討したところ、4 万倍希釈時に良好な結果が得られた (図 1)。

3) 標準曲線 : 以上の条件で標準曲線を作成した。0 standard から 10% fall を最小感度とするとき 10pg/tube ~ 500pg/tube まで測定可能であり、血清サンプルを 0.1 ml とすれば 2 ~ 100ng/ml の範囲で測定可能であった (図 2)。低 25-OHD 血症の sample は血清量を 0.2 ml とすることにより 1ng/ml までの測定が可能であった。

4) 測定精度 : 測定間変動係数は 12% であった。血清 sample に既知量 (12.5ng/ml) の標準 25-OHD₃ を加えて行った回収率は 94 ~ 102% と良好な結果が得られた。

5) 24,25-(OH)₂D の干渉 : VD metabolite の分画は Sepadex LH-20 column で図 3, zorbax SIL column で図 4 に示す様に分離出来た。そこで 24,25-(OH)₂D の assay には LH-20 の 12 ~ 27 ml の分画を採り更に zorbax-SIL で精製し、その 12 ~ 16 ml の分画を採集した。抽出から HPL までの回収率は 65% であったので標準血清の 24,25-(OH)₂D 値に補正を加え 2.2 ± 0.3ng/ml の結果を得た。すなわち、24,25-(OH)₂D は direct-assay による 25-OHD 値の 7.7% にすぎず、25-OHD assay の inter-assay variation は 12% であるためほぼ無視出来る値であ

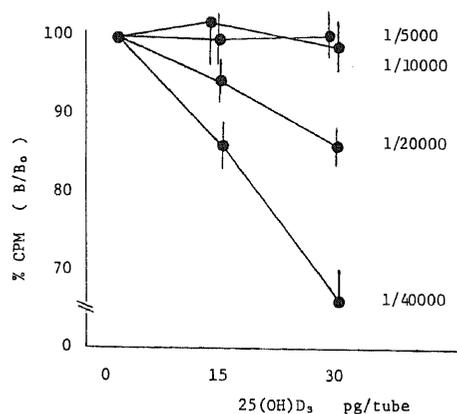


Fig. 1. Effect of binding protein concentration on the sensitivity of the assay system. Vertical bars show mean ± SD.

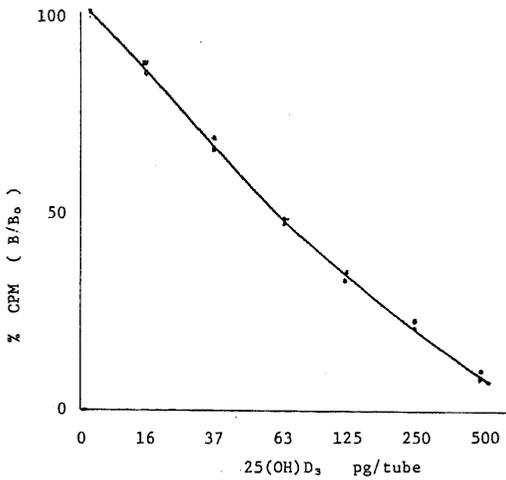


Fig. 2. Standard curves for 25(OH)D₃.

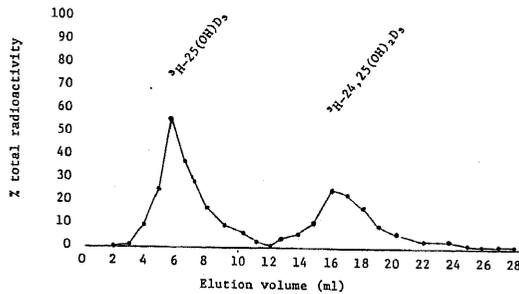


Fig. 3. Elution of 25(OH)D₃ and 24, 25(OH)₂D₃ from a 0.6 by 15cm. Sephadex LH-20 column developed with a solvent system of chloroform: hexan(55:45).

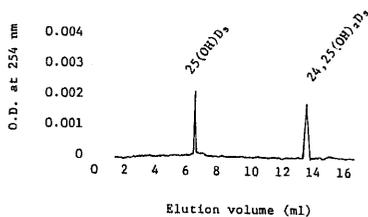


Fig. 4. Chromatography of 25(OH)D₃ and 24, 25(OH)₂D₃ by high-pressure liquid chromatography. The column used was a 0.46 by 25cm Zorbax-SIL column with a flow rate of 1.5 ml/min and a solvent system of 10% isopropanol in hexane.

と考えられた。

II 臨床的検討

1. 対象

1) 正常小児群は74人でその内訳は未熟児13人(体重1500~2500g 生後8~31日), 正熟新生児22人(生後3~4日), 乳児10人(2ヶ月~2才), 幼児10人(2~6才), 学童19人(6~17才)で特殊疾患, 薬剤服用者を除いた。

2) 季節変動調査群はアレルギー性疾患をもつ通院患児より一般状態の良好な9人(7~14才)について53年7~8月, 10月, 12月~54年2月, 3~4月のそれぞれを夏, 秋, 冬, 春期としその4回の採血分について検討した。

3) 疾患群は新生児テタニー2人, 乳児肝炎7人, 腎炎7人, 神経性食不振症2人, 下垂体性小人症10人について検討した。

4) 薬剤投与群. VD₂剤大量服用患者はVD抵抗性クル病の5人で, うち4人は1αHCC剤(1α hydroxy cholecalciferol)に変更したためその後の経過も調査した. ステロイド剤服用患者は腎炎1人, ネフローゼ症候群4人, 若年性リウマチ様関節炎1人であった. 抗痙攣剤長期服用患者には, 通院患者50人の他, 重症身心障害(以下重身)施設の収容児94人についても調査を行った. 2)以外は昭和52年3~6月, 53年の3~6月の採血分について血中25-OHD値を測定した。

2. 結果

1) 正常群の血中25-OHD値は生後2ヶ月以後のグループで差を認めずそのtotalの平均値は20.5 ± 5.2ng/mlであった. しかし成熟新生児で17.2 ± 5.1ng/ml (P < 0.05), 特に未熟児で12.3 ± 4.0ng/ml (P < 0.001)と生後2ヶ月以後の平均値に比較しそれぞれ有意の低値を示した(図5)。

2) 季節変動調査では夏, 秋, 冬, 春期でそれぞれ38.9 ± 12.3, 40.4 ± 12.3, 26.1 ± 7.4, 32.4 ± 9.3ng/mlで夏, 秋期で冬期に比較し有意に高値を示した(P < 0.02, 図6). 彼らの戸外活動時間は一般に多く, 特に9~10月は学校行事の訓練もあって日光露出時間は非常に多かったと考えられ, この結果は紫外線の影響を十分に反映しているものと想定された。

3) 疾患群では新生児テタニーの2人でいずれも低値を示した. 乳児肝炎は6.3 ± 4.3ng/mlと低く測定下限を示す例もみられた. 腎炎では11.5 ± 4.7ng/mlと正常グループに比較し有意に(P < 0.001)低下していた. 神経性食不振症の2人は低い傾向にあった. 下垂体性小人症では31.3 ± 8.3ng/mlであった。

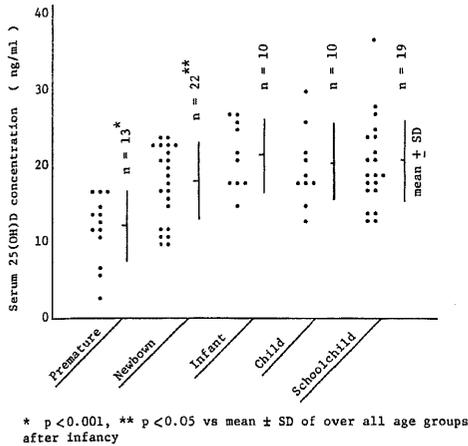


Fig. 5. Serum 25(OH)D concentration in normal groups.

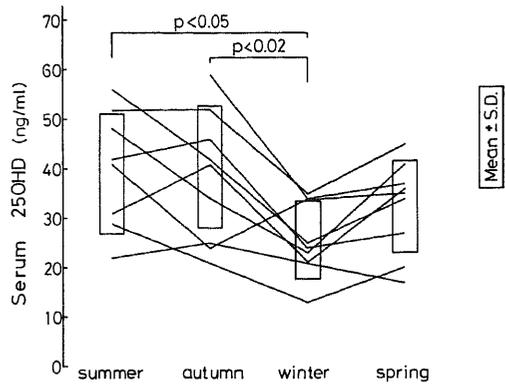


Fig. 6. Seasonal variation in serum 25(OH)D in nine healthy children.

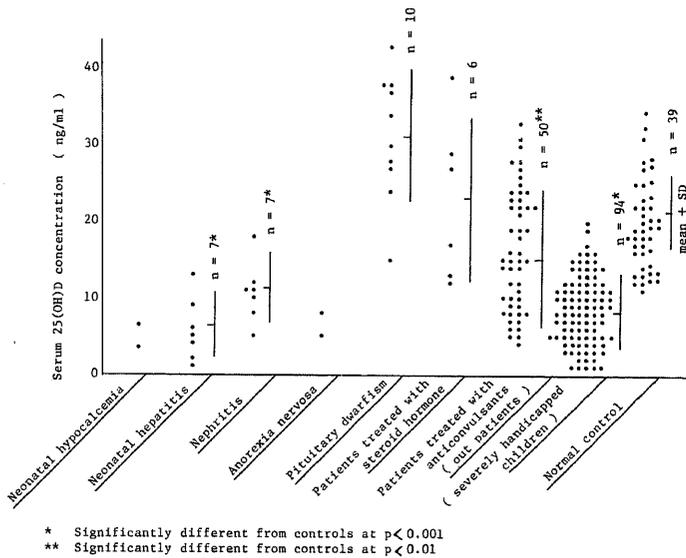


Fig. 7. Serum 25(OH)D concentration in patients with various disease.

(図7).

4) 薬剤投与群ではステロイド剤服用患者は $22.8 \pm 10.6 \text{ ng/ml}$ と正常域であった。抗痙攣剤長期服用患者は通院患者で $15.8 \pm 8.4 \text{ ng/ml}$ と正常対照に比較し有意の低下がみられ ($P < 0.01$)。重身患者では $7.7 \pm 4.4 \text{ ng/ml}$ とさらに低く、測定下限値を示すものも多かった(図7)。VD₂ 剤服用患者は $86 \sim 164 \text{ ng/ml}$ と高値を示した。1αHCC 剤に変更後は3～6ヶ月で正常域に回復しているが、VD₂ 剤中止9ヶ月後も

55 ng/ml と高値を示すものもみられた。(図8)

考 按

I 25OHD 測定法の基礎的検討

D 欠ラットから得られる 25-OHD 結合蛋白には VD や他の metabolite との弱い交叉反応があるためカラムによる前処理が必要とされていた。しかし Belsey は hypervitaminotic D animal でも血中 25-OHD₃ は VD₃ に比較し 3～5 倍も高いこと、又

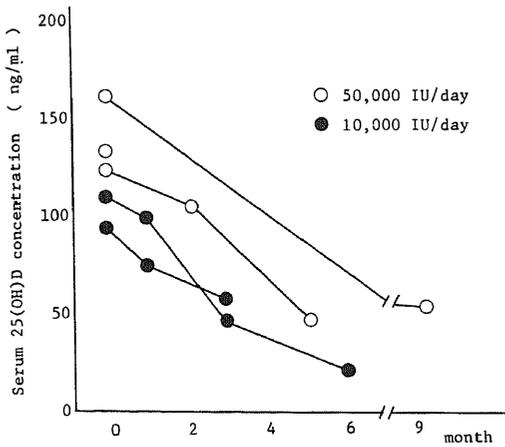


Fig. 8. Decrease in serum 25(OH)D levels of the patients with vit-D resistant rickets following change in the medication from high dose vit-D₂ to 1 α (OH)D₃.

1,25-(OH)₂D 値は非常に低値であること、交叉反応についても incubation time を短くすることによりこれらの物質の干渉は無視出来るためカラム操作は省けると指摘した。しかし最近、24,25-(OH)₂D₃ や 25,26-(OH)₂D₃ などの metabolite の affinity は 25-OHD と同等であると指摘され¹⁸⁾¹⁹⁾又一部では非常に高い血中 24,25-(OH)₂D 値を報告するグループもあった¹⁸⁾。24,25-(OH)₂D の血中濃度は Taylor らによれば 1.68 ± 0.82ng/ml で、VD を大量に投与して高 25-OHD 血症がある場合でも 4ng/ml 以上に上昇せず逆に VD 欠乏患者では感度以下に低下するとされている¹⁹⁾。

しかしその値は報告者によって異なり 25-OHD 値の 20%²⁰⁾から 5%²¹⁾などといまだ意見が一致していない。著者の調査では例数が少なく今後の検討が必要であるが 2.2ng/ml で direct assay の 25-OHD 値の 7.7%であった。これは本法の inter-assay variation からしても特に問題にならないようである。又 25,26-(OH)₂D の血中濃度に関しては報告が少なく 0.8 ± 0.4ng/ml¹⁸⁾ という低値が発表されている。以上より、25-OHD の direct assay はいくつかの metabolite の total を測定していると考えられるが、1) 少なくとも 80%以上は真の 25-OHD を反映しているものと考えられること、2) 低 25-OHD 血症の場合測定感度も考慮すれば全く問題にならないこと、3) 測定操作が簡易になるので特に大量の検体を処理するのに有利なこと、などから臨床的

研究には充分使用しうる方法と思われる。

II 25-OHD 血中濃度の臨床的検討

1. 血中 25-OHD の正常域について : その正常域は報告者によって異なり米国の成人で 20 ~ 100 平均 35ng/ml¹²⁾、又は 11 ~ 55 平均 27.3ng/ml¹¹⁾、英国の成人で 15.2 ± 5.6ng/ml²¹⁾、又は成人で 11.9 ± 5.7、小児で 11.0 ± 4.8ng/ml¹⁶⁾、本邦では中井ら²²⁾、清野ら¹⁷⁾はそれぞれ 28.9 ± 2.95、21.5 ± 11.0ng/ml などと報告している。又米国では白人は黒人よりも高値であり²³⁾、英国ではアジアの移民族で低値を示すと言われている²⁴⁾。その他新生児、特に未熟児の低 25-OHD 血症が報告され²³⁾²⁵⁾²⁶⁾、血中 25-OHD の正常能力は在胎 36 ~ 38 週で完成すると予想する報告もある²⁷⁾。著者の成績では生後 2 ヶ月以後のグループで中井らの報告よりも低いのはほぼ一定であった。又新生児、特に未熟児では諸家らの成績とほぼ同様に低値を示した。このように血中で 25-OHD 正常域はおおよそ米国で高く英国で低い。我国はその中間ぐらいだが、同じ国、地域でも皮膚の色によって異なる。又年齢差はないが新生児、特に未熟児で低い。その理由として紫外線や食餌内容などの違い、又未熟児では肝臓の酵素系の未熟性などが考えられる。

2. 血中 25-OHD 濃度と季節変動について : Stamp らは紫外線の照射により血中 25-OHD 濃度の上昇が得られたと報告している²⁸⁾。すなわち血中 25-OHD 濃度は VD を介して紫外線の影響を受け増減するものと考えられる。実際に米国で冬期の 25-OHD 血中濃度は有意に低下していると報告され²⁹⁾、英国でも夏と冬の平均はそれぞれ 14.3、8.6ng/ml と発表されている²⁴⁾。本邦でも大原らは夏と冬の平均はそれぞれ 32.6、24.7ng/ml と発表し³⁰⁾、類似報告もある³¹⁾。又最近 Stryd らは米国の成人で³²⁾、Poskitt らは英国の小児で³³⁾年間を通じた調査を行い、夏高く冬に低い季節変動がみられると指摘している。特に Poskitt らは食餌よりも紫外線の影響が強かったことを強調している。著者の成績では、四季により変動が認められたが全般に高値で特に秋でも高値を示すものが多かった。それは対象となった児童らの戸外活動時間が長かったため紫外線の影響が大きく反映されたものと推定される。

3. 各種疾患について : 乳児肝炎はクル病を併発することが多く³⁴⁾その予防には多量の VD 剤が必要であり³⁵⁾骨変化の認められるものでは VD 剤は効果が弱く 25-OHD 剤が著効を示すと言われ³⁶⁾、又低 25-OHD 血症を来たすものが多い³⁶⁾³⁷⁾。著者の成績でも低値を示す患児が多かった。以上からも肝細胞障害の

ためVDの水酸化障害があると考えられる。腎不全患者は低25-OHD血症になることが多いが^{38,39}、その理由は血中25-OHD値は摂取蛋白量と相関するためと言われている³⁸。しかし著者の症例ではむしろ長期間の入院生活による日光露出不足が原因すると考えられる。神経性食不振症の2例も低値であったが、食餌摂取不足に加え室内に閉じ籠りがちな生活になるためであらう。

4. 薬剤との関係について : VD投与量と血中25-OHD値はdose response^{40,41}を示すと言われ、著者の成績でも大量服用者は高値を示している。しかしVD₂剤中止後でも回復が遅い。

25-OHDの血中半減期は12日とされ⁴¹、又1 α HCC剤のassay系への干渉は無視できるため³⁰、その原因はVD剤の体内蓄積によるものと推定される。ステロイド剤を大量連日投与すると血中25-OHD値が低下すると言われているが⁴²、著者の症例では大量連日投与されているものはなくほぼ正常域であった。抗痙攣剤を長期間服用すると肝臓でのVD代謝に異常が発生し血中25-OHDなどのmetaboliteが低下すると言われている。これについてHahnらは人でphenobarbital(以下PB)を2週間前投与した者では³H-VD₃の血中半減期の短縮が見られ長期間の前投与ではさらに短くなること⁴³、又PBやhydantoinの長期服用患者では25-OHDの低下がありその改善には多量のVD剤が必要であること⁴⁴、又in vitroの実験でもPBで処理したラットの肝のmicrosomeにそれぞれ³H-VD₃、³H-25-OHD₃、³H-1,25-(OH)₂D₃を加えてincubateするといずれも生物学的活性をもたないmetaboliteの増加がみられたと報告している⁴⁵。著者の成績では、通院患者でも低下があったが重身患者では特に低値を示すものが多く、これらの薬剤以外のfactorの存在が想定された。その詳細はオII編で検討する。

結 論

1. 25-OHD測定はD欠ラット血清を4万倍に希釈すること、gelatinを加えることにより少量の血清でも高感度測定が可能であった。

2. 血中25-OHDの正常平均値は20.5±5.2ng/mlであった。しかし新生児特に未熟児では低値を示した。

3. 血中25-OHDは夏高く冬に低い季節変動がみられ紫外線の影響が強く反映された。

4. 乳児肝炎、腎炎の長期入院患者で血中25-OHDの低下がみられた。

5. VD₂剤長期服用患者では血中25-OHD値は高く服用中止後でも正常化に3ヶ月以上要した。抗痙攣剤長期服用患者の場合低値を示したが、それは重身施設収容児で特に低下傾向が強かった。

文 献

- 1) DeLuca, H. F. : Vitamin and Hormons, P 335 - 367 In R. S. Harris, I. G. Wool. & J. A. Lorain (ed.), Mechanisms of action and metabolic fate of vitamin D, Academic, New York, Press, 1967.
- 2) Blunt, T. W., DeLuca, H. F. & Schones, H. K. : 25-hydroxycholecalciferol : A biologically active metabolite of vitamin D. Biochemistry, 7, 3317-3322 (1968).
- 3) Suda, T., DeLuca, H. F. Schones, H. K. & Blunt, T. W. : The isolation and identification of 25 hydroxyergocalciferol. Biochemistry, 8, 3515 - 3520 (1969).
- 4) Holick, M. F., Schonoev, H. K., DeLuca, H. F., Suda, T. & Cousins, R. J. : Isolation and identification of 1, 25-dihydroxycholecalciferol. Biochemistry, 10, 2799-2804 (1971).
- 5) Holick, M. F., Schonoes, H. K., DeLuca, H. F., Gray, R. W., Boyle, I. T. & Suda, T. : Isolation and identification of 24, 25-dihydroxycholecalciferol. Biochemistry, 11, 4251-4255 (1972).
- 6) Holick, M. F., Kleiner-Bossaller, A., Schnoes, H. K., Kasten, P. M., Boyl, I. T. & DeLuca, H. F. : A metabolite of vitamin D effective on intestine. J. Biol. Chem., 284, 6691-6696 (1973).
- 7) Bhattacharyya, M. H. & DeLuca, H. F. : Subcellular location of rat liver calciferol-25-hydroxylase. Arch. Biochem. Biophys., 160, 58 - 62 (1974).
- 8) Fraser, D. R. & Kodicek, E. : Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite. Nature, 228, 764 - 766 (1970).
- 9) Kleiner - Bossaller, A. & DeLuca, H. F. : Formation of 1, 24, 25-tri-hydroxyvitamin D₃ from 1, 25-dihydroxyvitamin D₃. Biochim. Biophys. Acta., 338, 489-495 (1974).
- 10) Belsey, R. E., DeLuca, H. F. & Potts, J. T. : Competitive binding assay for vitamin D. J. Clin. Endocrinol. & Metab., 33, 554-557 (1971).
- 11) Haddad, J. G. & Chyu, K. J. : Competitive

- protein-binding radio-assay for 25-hydroxycholecalciferol. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, **38**, 992-995 (1971).
- 12) **Belsey, R. E., Deluca, H. F. & Potts, J. T.** : A rapid assay for 25-OH vitamin D₃ without preparative chromatography. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, **38**, 1046-1051 (1974).
- 13) **Bligh, E. G. & Dyer, W. J.** : A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian J. Biochem. & Physiology*, **37**, 911-917 (1959).
- 14) 加納健一・保崎純郎・矢田純一・吉田久・阿部悦子・須田立雄: ヒト血清中の25OHD及び24R, 25(OH)₂D. Competitive protein-binding assay について, *ビタミン*, **53**, 11-19 (1979).
- 15) **Horst, R. L., Shepard, R. M., Jorgensen, N. A. & DeLuca, H. F.** : The determination of 24, 25-dihydroxyvitamin D and 25, 26-dihydroxyvitamin in plasma from normal and nephrectomized man. *J. Lab. Clin. Med.*, **93**, 277-285 (1979).
- 16) **Preece, M. A., O'Riordan, J. L. H., Lawson, D. E. M. & Kodicek, E.** : 25-hydroxyergocalciferol in serum. *Clinica. Chemica. Acta.*, **54**, 235-242 (1974).
- 17) 清野佳紀・岡田伸太郎・日衛島禎介・藪内百治: Competitive protein binding assay による 25-hydroxycholecalciferol 測定法. **79**, 706-711 (1975).
- 18) **Haddad, J. G., Chong Min, Jr., Walgate, J. & Hahn, T.** : Competition by 24, 25-dihydroxycholecalciferol in the competitive protein binding assay of 25-hydroxycholecalciferol. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, **43**, 712-715 (1976).
- 19) **Taylor, C. M., Huges, S. E. & Silva, P.** : Competitive protein binding assay for 24, 25-dihydroxycholecalciferol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 1243-1249 (1976).
- 20) **Haddad, J. G., Chong Min, Jr., Mendelsohn, M., Slatopolsky, E. & Hahn, T. J.** : Competitive protein binding assay of 24, 25-dihydroxyvitamin D in sera from normal and anephric subjects. *Archives of biochem. & Biophys.*, **182**, 390-395 (1977).
- 21) **Edelstein, S., Charman, M., Lawson, D. E. M. & Kodicek, E.** : Competitive protein-binding assay for 25-hydroxycholecalciferol. *Clin. Science & Molec. Med.*, **46**, 231-240 (1974).
- 22) 中井瑠美子・岡野一年・吉川政己・大畑雅洋・藤田拓男: Competitive protein binding assay による ヒト 25-OHD vitamin D₃ の測定法について, *骨代謝*, **9**, 192-195 (1976).
- 23) **Hillman, L. S., & Haddad, J. G.** : Human perinatal vitamin D in maternal and cord blood. *J. Pediatrics*, **84**, 742-749 (1974).
- 24) **Preece, M. A., Ford, J. A., McIntosh, W. B., Dunnigan, M. G., Tomlinson, S. & O'Riordan, J. L. H.** : Vitamin D deficiency among Asian immigrants to Britain. *Lancet*, **28**, 907-908 (1973).
- 25) **Hillman, L. S., Rojanasathit, S., Slatopolsky, E. & Haddad, J. G.** : Serial measurements of serum calcium, magnesium, parathyroid hormone, calcitonin, and 25-hydroxyvitamin D in premature and term infants during the first week of life. *Ped. Res.*, **11**, 739-744 (1977).
- 26) 下辻常介・石田允・清野佳紀・石井経康・池原千枝子・日衛禎介: 新生児期のカルシウム代謝調節に関する研究(1) 血漿 25(OH)D とカルシウムについて. *日本小児学会誌*, **82**, 590-596 (1978).
- 27) **Hillman, L. S. & Haddad, J. G.** : Serial 25-hydroxyvitamin D concentrations in sera of term and premature infants. *J. Pediatrics*, **86**, 928-935 (1975).
- 28) **Stamp, T. C. B., Haddad, J. G. & Twigg, C. A.** : Comparison of oral 25-hydroxycholecalciferol, vitamin D and ultraviolet light as demonstrations of circulating 25-hydroxyvitamin D. *Lancet*, **1**, 1341-1343 (1977).
- 29) **Lester, E., Skinner, R. K. & Wills, M. R.** : Seasonal variation in serum 25-hydroxyvitamin D in the elderly in Britain. *Lancet*, **1**, 979-980 (1977).
- 30) 大原憲一・吉田政彦・大野丞二・須田立雄・佐々木哲・若林清重・西井易徳・阿部悦子: 正常ヒトおよび各種疾患患者の血清 25hydroxy-vitamin D₃ の濃度について. *骨代謝*, **9**, 189-191 (1976).
- 31) **Ohata, M. & Fujita, T.** : Vitamin D and osteoporosis. *Endocrinol. Japon*, **1**, 7-13 (1979).
- 32) **Strydom, R. P., Gilbertson, T. J. & Brunden, M. N.** : A seasonal variation study of 25-hydroxyvitamin D serum levels in humans. *J.*

- Clin. Endocrinol. & Metab. **48**, 771-775(1979).
- 33) **Poskitt, E. M. E., Cole T. J. & Lawson, D. E. M.** : Deit, sunlight, and 25-hydroxyvitamin D in healthy children and adults. *British Med. J.*, **1**, 221-223 (1979).
- 34) **Yu, J. S., Walker-Smith, J. A. & Burnard, E. D.** : A common complication of neonatal hepatitis. *Med. J. Australia*, **10**, 790-792 (1971).
- 35) **Bastis - Moounis, B., Matsaniotis, N. & Maounis, F.** : Serum alkaline phosphatase in infants with obstructive jaundice. *J. Pediatrics*, **82**, 68-72 (1973).
- 36) **Wagonfeld, J. B., Nemchausky, B. A. Bolt, M., Horst, J. V., Boyer, J. L. & Rosenberg, I. H.** : Comparison of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in the therapy of primary biliary cirrhosis. *Lancet*, **2**, 391-394 (1976).
- 37) **Seino, Y., Simotuzi, T., Kai, H., Ikehara, C. & Yabuuchi, H.** : *Acta. Pediatr. Scnd.*, **67**, 39-42(1978).
- 38) **Offerman, G., Herrath D. & Schaefer, K.** : Serum 25-hydroxycholecalciferol in uremia. *Nephron*, **13**, 269-277 (1974).
- 39) **Bayard, F., Bec, Ph., That, H. T. & Louvet, J. P.** : Plasma 25-hydroxycholecalciferol in chronic renal failure. *Europ. J. Clin. Invest.*, **3**, 447-450(1973).
- 40) **Fukushima, M., Nishii, Y., Suzuki, M. & Suda, T.** : *Biochem. J.*, **170**, 495-498 (1974).
- 41) **Haddad, J. G. & Stamp, T. C. B.** : Circulating 25-hydroxyvitamin D in man. *American J. Med.*, **57**, 57-62 (1974).
- 42) **Klein, R. G., Arnaud, S. B., Gallagher, J. C., DeLuca, H. F. & Liggs, B. L.** : Intestinal calcium absorption in exogenous hypercortisonism. *J. Clin. Invest.*, **60**, 253-259 (1977).
- 43) **Hahn, T. J., Birge, S. J., Scharp, C. R. & Avioli, L. V.** : Phenobarbital induced alterations in vitamin D metabolism. *J. Clin. Invest.*, **51**, 741-745 (1972).
- 44) **Hahn, T. J., Haid, S. D. & Halstead, L. R.** : Phenobarbital induced alterations in hepatic metabolism of 1, 25-dihydroxycholecalciferol. *Clin. Res.*, **21**, 626 (1973).
- 45) **Hahn, T. J., Hendin, B. A., Scharp, C. R. & Haddad, J. G.** : Effect of chronic anticonvulsant therapy on serum 25-hydroxycalciferol levels in adults. *New Engl. J. Med.*, **2**, 900-904 (1972).

Studies on Metabolism of 25(OH)-Vitamin D in Children—[I]Changes in Serum 25(OH)-Vitamin D Level in Health and Diseases—Yuichiro Morijiri, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. *J. Jusen Med. Soc.*, 88, 780—788 (1979).

Abstract Serum 25(OH)-vitamin D (25OHD) concentration was measured by a modification of the competitive protein binding assay reported by Belsey et al. The binding protein was prepared by a 1 : 40,000 dilution of rachitic rat serum with barbital-acetate buffer containing 0.01% of gelatin, which increased the solubility of 25OHD three-fold. With these modifications, the sensitivity of the assay was enhanced and 10pg per tube of 25OHD was detectable.

The mean concentration of 25OHD in sera of normal children aged two months to 17 years was 20.5 ± 5.2 ng/ml (mean \pm SD), while that of full-term and premature infants was significantly decreased (17.2 ± 5.1 , $P < 0.05$, and 12.3 ± 4.0 ng/ml, $P < 0.001$ respectively). In 9 healthy children, serum 25OHD showed seasonal variation; high in summer and low in winter. Patients with infantile hepatitis and those with nephritis hospitalized for a long term had low levels of 25OHD; 6.3 ± 4.3 and 11.5 ± 4.7 ng/ml respectively ($P < 0.001$). In contrast, 5 patients with vit-D resistant rickets receiving large doses of vit-D (10,000–50,000 IU/day) were found to have markedly elevated 25OHD levels (86–164 ng/ml), which fell gradually during 3 to 6 months by the change in treatment from vit-D to 1α -hydroxycholecalciferol. In 50 patients with epilepsy and 94 hospitalized patients with cerebral palsy receiving long term anticonvulsant medications, mean 25OHD value was 15.8 ± 8.4 and 7.7 ± 4.4 ng/ml respectively, both of which were significantly lower than the normal level ($P < 0.01$ and $P < 0.001$).

These results indicate that serum 25OHD concentration is a sensitive indicator of body store of vit-D, which is influenced by several factors such as dietary intake, age, birth weight, sun light, various diseases and medications.