(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5918784号
(P5918784)
(45)発行日　平成28年5月18日(2016.5.18)　(24)登録日　平成28年4月15日(2016.4.15)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/82	(2006.01)	G01N	33/82	
G01N 33/68	(2006.01)	G01N	33/68	
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	33/543	５４５Ａ
G01N 30/72	(2006.01)	G01N	33/543	５７５

請求項の数 7　(全 78 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-548558 (P2013-548558)
(86)(22)出願日　平成24年1月6日(2012.1.6)
(65)公表番号　特表2014-506332 (P2014-506332A)
(43)公表日　平成26年3月13日(2014.3.13)
(86)国際出願番号　PCT/US2012/020407
(87)国際公開番号　WO2012/094550
(87)国際公開日　平成24年7月12日(2012.7.12)
審査請求日　平成27年1月5日(2015.1.5)
(31)優先権主張番号　61/430,643
(32)優先日　平成23年1月7日(2011.1.7)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　592017633
ザ　ジェネラル　ホスピタル　コーポレイション
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　ボストン　フルーツ　ストリート　５５
(73)特許権者　301033259
ベス・イスラエル・ディーコネス・メディカル・センター，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２２１５，ボストン，ブルックリン・アヴェニュー　３３０
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ビタミンD欠乏症に関連するアッセイおよび治療方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象におけるバイオアベイラブルビタミンＤのレベル及び遊離ビタミンＤのレベルを判定する方法であって、
対象から得られた血液試料について、ＶＤＢＰ（ビタミンＤ結合タンパク質）ポリペプチド、アルブミンポリペプチド、および総ビタミンＤのレベルを判定するためのアッセイを行うステップ、
バイオアベイラブルビタミンＤのレベルを計算するステップであって、バイオアベイラブルビタミンＤのレベルが、
$=(K_{alb}*[Alb]+1)*[遊離ビタミンD]$
であるステップ、及び
遊離ビタミンＤのレベルを計算するステップであって、遊離ビタミンＤのレベルが、
$=\{-\{K_{DBP}\cdot[総DBP]-K_{DBP}\cdot[総ビタミンD]+K_{alb}\cdot[Alb]+1\}+\sqrt{\{(K_{DBP}\cdot[総DBP]-K_{DBP}\cdot[総ビタミンD]+K_{alb}\cdot[Alb]+1)^2+4\cdot(K_{DBP}\cdot K_{alb}\cdot[Alb]+K_{DBP})\cdot([総ビタミンD])\}\}\div(2\cdot\{K_{DBP}\cdot K_{alb}\cdot[Alb]+K_{DBP}\})$
であるステップ
を含む、方法。
【請求項２】
健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤの平均値の２５％を下回るバイオ

アベイラブルビタミンＤのレベルは、前記対象がビタミンＤ欠乏症を有することを示す、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記ビタミンＤは、
２５－ヒドロキシビタミンＤおよび１，２５－ジヒドロキシビタミンＤからなる群から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記ＶＤＢＰポリペプチドまたはアルブミンポリペプチドのレベルの前記判定は、酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、染料結合免疫吸着法、免疫濁度法、免疫比濁法、染料に基づく測光分析法、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、放射免疫分析法（ＲＩＡ）、放射免疫測量法、免疫蛍光測定法、および質量分析法からなる群から選択される方法の使用を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記総ビタミンＤレベルを判定するためのアッセイは、
放射免疫測定法、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法、酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、および高圧液体クロマトグラフィーからなる群から選択される方法の使用を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
ビタミンＤの欠乏は、
骨密度の低下、骨塩量の低下、骨折、骨吸収、くる病、嚢胞性線維性骨炎、骨性線維形成不全症、骨硬化症、骨粗鬆症、骨軟化症、副甲状腺ホルモンレベルの上昇、副甲状腺過形成、二次性副甲状腺機能亢進症、低カルシウム血症、感染症、癌、乾癬、心血管疾患、腎性骨ジストロフィー、腎疾患、末期腎疾患、慢性腎臓疾患、慢性腎臓疾患に伴う骨ミネラル代謝異常、骨外性石灰化、肥満症、アレルギー、喘息、多発性硬化症、筋力低下、リウマチ性関節炎、および糖尿病からなる群から選択される症状の危険性の増加を示す、請求項２に記載の方法。
【請求項７】
バイオアベイラブルビタミンＤのレベル及び遊離ビタミンＤのレベルは、プロセッサによって計算されるものである、請求項１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ビタミンＤ欠乏症に関するアッセイおよび治療方法を対象とする。

関連出願の相互参照
【０００２】
本出願は、２０１１年１月７日に出願された、米国特許仮出願第６１／４３０，６４３号の利益を主張し、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

連邦政府の支援
【０００３】
本発明は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｒｅｓｏｕｒｃｅｓによって授与された認可番号Ｍ０１－（ＲＲ－０１０６６）－Ｈａｒｖａｒｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ ａｎｄ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ ＣｅｎｔｅｒおよびＮａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈによって授与された認可番号Ｋ２３ １Ｋ２３ＤＫ０８１６７７のもとに、連邦政府の支援によってなされた。米国政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】
【０００４】

ビタミンD欠乏症（現在の測定では、２０～３０ｎｇ／ｍＬ未満の総血清２５（ＯＨ）Ｄとして種々に定義される）は、その他の点では健康な個人にすら広く蔓延している。ビタミンD欠乏症は全世界で１０億を超える人々に報告されており、現在では、世界中で最も一般的な無症候病状のうちの１つとして認識されている。１７世紀から重度のビタミンD欠乏症の兆候として認識されているくる病以外にも[35]、ビタミンD欠損症（一般的には、１０～２５ｎｇ／ｍＬ未満の総血清２５［ＯＨ］Ｄとして定義される）[21,34,36]は、当時以来、骨粗鬆症、癌、感染性疾患、ＣＶＤ疾患、アレルギー、喘息、多発性硬化症、筋力低下、リウマチ性関節炎、および糖尿病の危険性の増加と関連付けられている。低ビタミンDは、栄養源からの摂取量の不足、（皮膚のＵＶ－Ｂ放射による）合成の不足、脂肪症、年齢、身体的活動、または他の疾患関連因子、例えば、糖尿病、肥満手術、脂肪吸収不全症候群、および腎臓疾患から生じ得る[14,37,38]。３０以上の日焼け防止指数（ＳＰＦ）の日焼け止め剤の使用は、皮膚がビタミンDを生成する能力を９９％減少させ、したがって、この世界的流行の一因となっている。

【０００５】

１つの最近の研究により、ビタミンD欠乏症は、地域在住の６５歳を上回る男性の７２％に見られ、肥満か、高緯度在住か、または屋外での活動にほとんど参加しない男性の最大８６％に見られることが発見された[17]。ビタミンD欠損症は、それほど一般的ではないが、地域在住の高齢者の２６％～５４％および入院患者の５７％に発症すると推測される[17,36,40]。高齢者に認められる問題であるが、日照の多い天候の居住者を含む、多様な地理的位置に住むあらゆる年代の人々もまた、影響を受けやすい[41]。北東部の都市環境で、屋外に接することが限定された若齢成人の研究は、１８～２９歳の学生および医師の３２％が、冬の終わりにビタミンDが欠損していたことを報告した[42]。糖尿病、リウマチ性関節炎、腎疾患を含む疾患、ならびに肥満、入院中、妊娠中、新生児の個人においては、高度に欠損したこのホルモンのレベルが一般的である[40,43-45]。ビタミンD補給についての現在の推奨は、主に不十分である[17,46,47]。Ｈｏｌｉｃｋによると[46]、２５（ＯＨ）Ｄが、治療推奨の基礎として使用される、米国で最も整ったホルモンアッセイである。しかしながら、アッセイの結果、ならびにビタミンD欠乏の程度を定義するための２５（ＯＨ）Ｄのカットオフレベルは、著しい変動を受ける。低ビタミンDと関連する可能性のある疾病の有疾率および幅を考慮すると、ビタミンDの状態のより良好な理解を得て、ビタミンD欠乏症の管理を導くことは、公衆衛生の優先事項である。Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（ＩＯＭ）は、そのアッセイの変動および欠乏症／欠損症を定義するカットオフに関する合意の欠如が、適切なビタミンDの食事摂取量に関する混乱をもたらしていることを認識している[33]。ＩＯＭはまた、腎臓および組織損傷の危険性のため、過剰摂取に対して警告を行っており、この分野におけるより的を絞った研究を促している。重要なことに、ビタミンD状態を判定するために使用する方法は、多様な集団全体にわたり、臨床的に意義があり適応可能なものである必要がある。

【発明の概要】

【０００６】

対象から得られた血液試料中の遊離ビタミンDおよび／またはバイオアベイラブルビタミンDのレベルを判定することに関する方法、アッセイ、治療方法、およびシステムを本明細書に記載する。

【０００７】

一態様において、本発明は、ａ）対象から得られた血液試料を分析して、ＶＤＢＰ（ビタミンD結合タンパク質）ポリペプチド、アルブミンポリペプチド、および総ビタミンDのレベルを決定することを含み、バイオアベイラブルビタミンDのレベルは、

$$=(K_{alb} * [Alb] + 1) * [\text{遊離ビタミンD}]$$

であり、遊離ビタミンDのレベルは、

$$=\{-\{K_{DBP} \cdot [\text{総DBP}] - K_{DBP} \cdot [\text{総ビタミンD}] + K_{alb}$$

・［Ａｌｂ］＋１｝＋√｛（K_{DBP}・［総ＤＢＰ］－K_{DBP}・［総ビタミンＤ］＋K_{alb}・［Ａｌｂ］＋１）^{2}＋４・（K_{DBP}・K_{alb}・［Ａｌｂ］＋K_{DBP}）・（［総ビタミンＤ］）｝｝÷（２・｛K_{DBP}・K_{alb}・［Ａｌｂ］＋K_{DBP}｝）
である、アッセイに関する。

【０００８】
いくつかの実施形態において、健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤの平均値の２５％を下回るバイオアベイラブルビタミンＤのレベルは、対象がビタミンＤ欠乏症を有することを示し得る。いくつかの実施形態において、ビタミンＤは、２５－ヒドロキシビタミンＤおよび１，２５－ジヒドロキシビタミンＤからなる群から選択することができる。

【０００９】
いくつかの実施形態において、ＶＤＢＰポリペプチドまたはアルブミンポリペプチドのレベルの判定は、酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、染料結合免疫吸着法、免疫濁度法、免疫比濁法、染料に基づく測光分析法、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、放射免疫分析法（ＲＩＡ）、放射免疫測量法、免疫蛍光測定法、および質量分析法からなる群から選択される方法の使用を含むことができる。

【００１０】
いくつかの実施形態において、総ビタミンＤレベルの判定は、放射免疫測定法、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法、酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、および高圧液体クロマトグラフィーからなる群から選択される方法の使用を含むことができる。

【００１１】
いくつかの実施形態において、ビタミンＤの欠乏は、骨密度の低下、骨塩量の低下、骨折、骨吸収、くる病、嚢胞性線維性骨炎、骨性線維形成不全症、骨硬化症、骨粗鬆症、骨軟化症、副甲状腺ホルモンレベルの上昇、副甲状腺過形成、二次性副甲状腺機能亢進症、低カルシウム血症、感染症、癌、乾癬、心血管疾患、腎性骨ジストロフィー、腎疾患、末期腎疾患、慢性腎臓疾患、慢性腎臓疾患に伴う骨ミネラル代謝異常、骨外性石灰化、肥満症、アレルギー、喘息、多発性硬化症、筋力低下、リウマチ性関節炎、および糖尿病からなる群から選択される症状の危険性の増加を示し得る。

【００１２】
いくつかの実施形態において、本発明は、ビタミンＤ欠乏症を有すると判定された対象に、ビタミンＤ欠乏症の治療を施すステップをさらに含むことができる。いくつかの実施形態において、治療は、カルシトリオール、ジヒドロタキステロール、ドキセルカルシフェロール、パリカルシトール、コレカルシフェロール、およびエルゴカルシフェロールからなる群から選択される化合物を投与することを含むことができる。

【００１３】
別の態様において、本発明は、対象から得られた血液試料を分析して、ＶＤＢＰポリペプチド、アルブミンポリペプチド、および総ビタミンＤのレベルを判定することを含み、遊離ビタミンＤのレベルは、
＝｛－｛K_{DBP}・［総ＤＢＰ］－K_{DBP}・［総ビタミンＤ］＋K_{alb}・［Ａｌｂ］＋１｝＋√｛（K_{DBP}・［総ＤＢＰ］－K_{DBP}・［総ビタミンＤ］＋K_{alb}・［Ａｌｂ］＋１）^{2}＋４・（K_{DBP}・K_{alb}・［Ａｌｂ］＋K_{DBP}）・（［総ビタミンＤ］）｝｝÷（２・｛K_{DBP}・K_{alb}・［Ａｌｂ］＋K_{DBP}｝）
である、アッセイに関する。

【００１４】
いくつかの実施形態において、健常対象集団における遊離ビタミンＤの平均値の２５％を下回る遊離ビタミンＤのレベルは、対象がビタミンＤ欠乏症を有することを示し得る。いくつかの実施形態において、ビタミンＤは、２５－ヒドロキシビタミンＤおよび１，２

５－ジヒドロキシビタミンＤからなる群から選択することができる。
【００１５】
いくつかの実施形態において、ＶＤＢＰポリペプチドまたはアルブミンポリペプチドのレベルの判定は、酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、染料結合免疫吸着法、免疫濁度法、免疫比濁法、染料に基づく測光分析法、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、放射免疫分析法（ＲＩＡ）、放射免疫測量法、免疫蛍光測定法、および質量分析法からなる群から選択される方法の使用を含むことができる。
【００１６】
いくつかの実施形態において、総ビタミンＤレベルの判定は、放射免疫測定法、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法、酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、および高圧液体クロマトグラフィーからなる群から選択される方法の使用を含むことができる。
【００１７】
いくつかの実施形態において、ビタミンＤの欠乏は、骨密度の低下、骨塩量の低下、骨折、骨吸収、くる病、嚢胞性線維性骨炎、骨性線維形成不全症、骨硬化症、骨粗鬆症、骨軟化症、副甲状腺ホルモンレベルの上昇、副甲状腺過形成、二次性副甲状腺機能亢進症、低カルシウム血症、感染症、癌、乾癬、心血管疾患、腎性骨ジストロフィー、腎疾患、末期腎疾患、慢性腎臓疾患、慢性腎臓疾患に伴う骨ミネラル代謝異常、骨外性石灰化、肥満症、アレルギー、喘息、多発性硬化症、筋力低下、リウマチ性関節炎、および糖尿病からなる群から選択される症状の危険性の増加を示し得る。
【００１８】
いくつかの実施形態において、本発明は、ビタミンＤ欠乏症を有すると判定された対象に、ビタミンＤ欠乏症の治療を施すステップをさらに含んでもよい。いくつかの実施形態において、治療は、カルシトリオール、ジヒドロタキステロール、ドキセルカルシフェロール、パリカルシトール、コレカルシフェロール、およびエルゴカルシフェロールからなる群から選択される化合物を投与することを含むことができる。
【００１９】
別の態様において、本発明は、対象におけるビタミンＤ欠乏症を治療するための方法であって、対象から得られた血液試料中のＶＤＢＰポリペプチド、アルブミンポリペプチド、および総ビタミンＤのレベルを検出することであって、バイオアベイラブルビタミンＤのレベルは、

$$＝（K_{alb}＊［Alb］＋1）＊［遊離ビタミンD］$$

であり、遊離ビタミンＤのレベルは、

$$＝\{－\{K_{DBP}・［総DBP］－K_{DBP}・［総ビタミンD］＋K_{alb}・［Alb］＋1\}＋\sqrt{\{（K_{DBP}・［総DBP］－K_{DBP}・［総ビタミンD］＋K_{alb}・［Alb］＋1）^{2}＋4・（K_{DBP}・K_{alb}・［Alb］＋K_{DBP}）・（［総ビタミンD］）\}\}}÷（2・\{K_{DBP}・K_{alb}・［Alb］＋K_{DBP}\}）$$

であることと、バイオアベイラブルビタミンＤのレベルが、健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤの平均値の２５％を下回る場合に、対象にビタミンＤ欠乏症の治療を施すことと、を含む、方法に関する。
【００２０】
いくつかの実施形態において、ビタミンＤは、２５－ヒドロキシビタミンＤおよび１，２５－ジヒドロキシビタミンＤからなる群から選択することができる。
【００２１】
いくつかの実施形態において、ＶＤＢＰポリペプチドまたはアルブミンポリペプチドのレベルの判定は、酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、染料結合免疫吸着法、免疫濁度法、免疫比濁法、染料に基づく測光分析法、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、放射免疫分析法（ＲＩＡ）、放射免疫測量

法、免疫蛍光測定法、および質量分析法からなる群から選択される方法の使用を含むことができる。

【００２２】

いくつかの実施形態において、総ビタミンＤレベルの判定は、放射免疫測定法、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法、酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、および高圧液体クロマトグラフィーからなる群から選択される方法の使用を含むことができる。

【００２３】

いくつかの実施形態において、ビタミンＤの欠乏は、骨密度の低下、骨塩量の低下、骨折、骨吸収、くる病、嚢胞性線維性骨炎、骨性線維形成不全症、骨硬化症、骨粗鬆症、骨軟化症、副甲状腺ホルモンレベルの上昇、副甲状腺過形成、二次性副甲状腺機能亢進症、低カルシウム血症、感染症、癌、乾癬、心血管疾患、腎性骨ジストロフィー、腎疾患、末期腎疾患、慢性腎臓疾患、慢性腎臓疾患に伴う骨ミネラル代謝異常、骨外性石灰化、肥満症、アレルギー、喘息、多発性硬化症、筋力低下、リウマチ性関節炎、および糖尿病からなる群から選択される症状の危険性の増加を示し得る。

【００２４】

いくつかの実施形態において、治療は、カルシトリオール、ジヒドロタキステロール、ドキセルカルシフェロール、パリカルシトール、コレカルシフェロール、およびエルゴカルシフェロールからなる群から選択される化合物を投与することを含むことができる。

【００２５】

別の態様において、本発明は、対象におけるビタミンＤ欠乏症を治療するための方法であって、対象から得られた血液試料中のＶＤＢＰポリペプチド、アルブミンポリペプチド、および総ビタミンＤのレベルを検出することであって、遊離ビタミンＤのレベルは、

$$= \{ - \{ K_{DBP} \cdot [\text{総DBP}] - K_{DBP} \cdot [\text{総ビタミンD}] + K_{alb} \cdot [\text{Alb}] + 1 \} + \sqrt{ \{ (K_{DBP} \cdot [\text{総DBP}] - K_{DBP} \cdot [\text{総ビタミンD}] + K_{alb} \cdot [\text{Alb}] + 1)^2 + 4 \cdot (K_{DBP} \cdot K_{alb} \cdot [\text{Alb}] + K_{DBP}) \cdot ([\text{総ビタミンD}]) \} \} \div (2 \cdot \{ K_{DBP} \cdot K_{alb} \cdot [\text{Alb}] + K_{DBP} \})$$

であることと、遊離ビタミンＤのレベルが、健常対象集団における遊離ビタミンＤの平均値の２５％を下回る場合に、対象にビタミンＤ欠乏症の治療を施すことと、を含む、方法に関する。

【００２６】

いくつかの実施形態において、ビタミンＤは、２５－ヒドロキシビタミンＤおよび１，２５－ジヒドロキシビタミンＤからなる群から選択することができる。

【００２７】

いくつかの実施形態において、ＶＤＢＰポリペプチドまたはアルブミンポリペプチドのレベルの判定は、酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、染料結合免疫吸着法、免疫濁度法、免疫比濁法、染料に基づく測光分析法、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、放射免疫分析法（ＲＩＡ）、放射免疫測量法、免疫蛍光測定法、および質量分析法からなる群から選択される方法の使用を含むことができる。

【００２８】

いくつかの実施形態において、総ビタミンＤレベルの判定は、放射免疫測定法、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法、酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、および高圧液体クロマトグラフィーからなる群から選択される方法の使用を含むことができる。

【００２９】

いくつかの実施形態において、ビタミンＤの欠乏は、骨密度の低下、骨塩量の低下、骨折、骨吸収、くる病、嚢胞性線維性骨炎、骨性線維形成不全症、骨硬化症、骨粗鬆症、骨軟化症、副甲状腺ホルモンレベルの上昇、副甲状腺過形成、二次性副甲状腺機能亢進症、

低カルシウム血症、感染症、癌、乾癬、心血管疾患、腎性骨ジストロフィー、腎疾患、末期腎疾患、慢性腎臓疾患、慢性腎臓疾患に伴う骨ミネラル代謝異常、骨外性石灰化、肥満症、アレルギー、喘息、多発性硬化症、筋力低下、リウマチ性関節炎、および糖尿病からなる群から選択される症状の危険性の増加を示し得る。

【００３０】

いくつかの実施形態において、治療は、カルシトリオール、ジヒドロタキステロール、ドキセルカルシフェロール、パリカルシトール、コレカルシフェロール、およびエルゴカルシフェロールからなる群から選択される化合物を投与することを含むことができる。

【００３１】

別の態様において、本発明は、少なくとも１つの対象から得られた少なくとも１つの血液試料からデータを取得するためのシステムであって、少なくとも１つの血液試料を受け取り、少なくとも１つの血液試料に少なくとも１つの分析を行って、試料中のバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルを判定するように構成される、判定モジュールと、前記判定モジュールから出力されたデータを記憶するように構成される、記憶デバイスと、部分的に、前記判定モジュールから出力されたデータに基づいて、内容を表示するための表示モジュールと、を備え、内容は、バイオアベイラブルまたは遊離ビタミンＤのレベルを示す信号を含む、システムに関する。

【００３２】

いくつかの実施形態において、システムは、試験試料中に存在すると判定されたＶＤＢＰポリペプチド、アルブミンポリペプチド、および総ビタミンＤのうちの１つ以上のレベルの値を入力する手段をさらに備える。いくつかの実施形態において、前記表示モジュール上に表示される内容は、バイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルが、健常対象集団のバイオアベイラブルビタミンＤの平均値の２５％を下回ることが判定された場合に、対象のビタミンＤ欠乏症の可能性の増加を示す信号をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記表示モジュールに表示される内容は、対象がビタミンＤ欠乏症の治療を受けることを推奨されることを示す信号をさらに含む。

【００３３】

いくつかの実施形態において、健常対象集団における遊離ビタミンＤおよび／またはバイオアベイラブルビタミンＤの平均値の２５％を下回る遊離ビタミンＤおよび／またはバイオアベイラブルビタミンＤのレベルは、対象がビタミンＤ欠乏症を有することを示し得る。いくつかの実施形態において、ビタミンＤは、２５－ヒドロキシビタミンＤおよび１，２５－ジヒドロキシビタミンＤからなる群から選択することができる。

【００３４】

いくつかの実施形態において、ＶＤＢＰポリペプチドまたはアルブミンポリペプチドのレベルの判定は、酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、染料結合免疫吸着法、免疫濁度法、免疫比濁法、染料に基づく測光分析法、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、放射免疫分析法（ＲＩＡ）、放射免疫測量法、免疫蛍光測定法、および質量分析法からなる群から選択される方法の使用を含むことができる。

【００３５】

いくつかの実施形態において、総ビタミンＤレベルの判定は、放射免疫測定法、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法、酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、および高圧液体クロマトグラフィーからなる群から選択される方法の使用を含むことができる。

【００３６】

いくつかの実施形態において、ビタミンＤの欠乏は、骨密度の低下、骨塩量の低下、骨折、骨吸収、くる病、嚢胞性線維性骨炎、骨性線維形成不全症、骨硬化症、骨粗鬆症、骨軟化症、副甲状腺ホルモンレベルの上昇、副甲状腺過形成、二次性副甲状腺機能亢進症、低カルシウム血症、感染症、癌、乾癬、心血管疾患、腎性骨ジストロフィー、腎疾患、末期腎疾患、慢性腎臓疾患、慢性腎臓疾患に伴う骨ミネラル代謝異常、骨外性石灰化、肥満

症、アレルギー、喘息、多発性硬化症、筋力低下、リウマチ性関節炎、および糖尿病からなる群から選択される症状の危険性の増加を示し得る。

【００３７】

いくつかの実施形態において、本発明は、ビタミンＤ欠乏症を有すると判定された対象に、ビタミンＤ欠乏症の治療を施すステップをさらに含んでもよい。いくつかの実施形態において、治療は、カルシトリオール、ジヒドロタキステロール、ドキセルカルシフェロール、パリカルシトール、コレカルシフェロール、およびエルゴカルシフェロールからなる群から選択される化合物を投与することを含むことができる。

【００３８】

別の態様において、本発明は、対象から得られた血液試料を分析して、遊離ビタミンＤまたはバイオアベイラブルビタミンＤのレベルを判定することであって、健常対象集団における遊離ビタミンＤまたはバイオアベイラブルビタミンＤの平均値の２５％を下回る遊離ビタミンＤまたはバイオアベイラブルビタミンＤのレベルは、対象がビタミンＤ欠乏症を有することを示すことと、ビタミンＤ欠乏症を有すると判定された対象にビタミンＤ欠乏症の治療を施すことと、を含む、治療方法に関する。

【００３９】

いくつかの実施形態において、ビタミンＤは、２５－ヒドロキシビタミンＤおよび１，２５－ジヒドロキシビタミンＤからなる群から選択することができる。

【００４０】

いくつかの実施形態において、遊離および／またはビタミンＤのレベルの判定は、免疫測定法、抗体捕捉による二段階免疫測定法、固定化抗体および競合的検出による一段階免疫測定法、固定化競合物質および標識抗体による一段階免疫測定法、蛍光偏光免疫測定法、示差沈降法（免疫沈降法、親和性沈降法）、免疫除去法、および親和性結合クロマトグラフィーからなる群から選択される方法、ならびに放射免疫測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、染料結合免疫吸着法、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法、および高圧液体クロマトグラフィーからなる群から選択される方法の使用を含むことができる。

【００４１】

いくつかの実施形態において、ビタミンＤの欠乏は、骨密度の低下、骨塩量の低下、骨折、骨吸収、くる病、嚢胞性線維性骨炎、骨性線維形成不全症、骨硬化症、骨粗鬆症、骨軟化症、副甲状腺ホルモンレベルの上昇、副甲状腺過形成、二次性副甲状腺機能亢進症、低カルシウム血症、感染症、癌、乾癬、心血管疾患、腎性骨ジストロフィー、腎疾患、末期腎疾患、慢性腎臓疾患、慢性腎臓疾患に伴う骨ミネラル代謝異常、骨外性石灰化、肥満症、アレルギー、喘息、多発性硬化症、筋力低下、リウマチ性関節炎、および糖尿病からなる群から選択される症状の危険性の増加を示し得る。

【００４２】

いくつかの実施形態において、治療は、カルシトリオール、ジヒドロタキステロール、ドキセルカルシフェロール、パリカルシトール、コレカルシフェロール、およびエルゴカルシフェロールからなる群から選択される化合物を投与することを含むことができる。

【００４３】

別の態様において、本発明は、対象から得られた血液試料を分析して、遊離ビタミンＤおよびアルブミンポリペプチドのレベルを判定することを含み、バイオアベイラブルビタミンＤのレベルは、

$$= (K_{alb} * [Alb] + 1) * [\text{遊離ビタミンＤ}]$$

である、アッセイに関する。

【００４４】

いくつかの実施形態において、健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤの平均値の２５％を下回るバイオアベイラブルビタミンＤのレベルは、対象がビタミンＤ欠乏症を有することを示し得る。いくつかの実施形態において、ビタミンＤは、２５－ヒド

ロキシビタミンＤおよび１，２５－ジヒドロキシビタミンＤからなる群から選択することができる。

【００４５】

いくつかの実施形態において、アルブミンポリペプチドのレベルの判定は、酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、染料結合免疫吸着法、免疫濁度法、免疫比濁法、染料に基づく測光分析法、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、放射免疫分析法（ＲＩＡ）、放射免疫測量法、免疫蛍光測定法、および質量分析法からなる群から選択される方法の使用を含むことができる。

【００４６】

いくつかの実施形態において、遊離および／またはビタミンＤのレベルの判定は、免疫測定法、抗体捕捉による二段階免疫測定法、固定化抗体および競合的検出による一段階免疫測定法、固定化競合物質および標識抗体による一段階免疫測定法、蛍光偏光免疫測定法、示差沈降法（免疫沈降法、親和性沈降法）、免疫除去法、および親和性結合クロマトグラフィーからなる群から選択される方法、ならびに放射免疫測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、染料結合免疫吸着法、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法、および高圧液体クロマトグラフィーからなる群から選択される方法の使用を含むことができる。

【００４７】

いくつかの実施形態において、ビタミンＤの欠乏は、骨密度の低下、骨塩量の低下、骨折、骨吸収、くる病、嚢胞性線維性骨炎、骨性線維形成不全症、骨硬化症、骨粗鬆症、骨軟化症、副甲状腺ホルモンレベルの上昇、副甲状腺過形成、二次性副甲状腺機能亢進症、低カルシウム血症、感染症、癌、乾癬、心血管疾患、腎性骨ジストロフィー、腎疾患、末期腎疾患、慢性腎臓疾患、慢性腎臓疾患に伴う骨ミネラル代謝異常、骨外性石灰化、肥満症、アレルギー、喘息、多発性硬化症、筋力低下、リウマチ性関節炎、および糖尿病からなる群から選択される症状の危険性の増加を示し得る。

【００４８】

いくつかの実施形態において、本発明は、ビタミンＤ欠乏症を有すると判定された対象に、ビタミンＤ欠乏症の治療を施すステップをさらに含んでもよい。いくつかの実施形態において、治療は、カルシトリオール、ジヒドロタキステロール、ドキセルカルシフェロール、パリカルシトール、コレカルシフェロール、およびエルゴカルシフェロールからなる群から選択される化合物を投与することを含むことができる。

【図面の簡単な説明】

【００４９】

【図１－１】総２５－ヒドロキシビタミンＤおよび遊離の２５－ヒドロキシビタミンＤと腰椎の骨塩量との間の関係を描写する。ＤＢＰ結合の、遊離の、およびバイオアベイラブル２５－ヒドロキシビタミンＤ（２５（ＯＨ）Ｄ）のレベルは、測定した総２５（ＯＨ）ＤおよびビタミンＤ結合タンパク質（ＤＢＰ）のレベルから計算した。総２５（ＯＨ）ＤおよびＤＢＰに結合した２５（ＯＨ）Ｄは、腰椎の骨塩量（ＢＭＤ）と関連しなかった。遊離２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄは、腰椎のＢＭＤと正相関した。

【図１－２】総２５－ヒドロキシビタミンＤおよび遊離の２５－ヒドロキシビタミンＤと腰椎の骨塩量との間の関係を描写する。ＤＢＰ結合の、遊離の、およびバイオアベイラブル２５－ヒドロキシビタミンＤ（２５（ＯＨ）Ｄ）のレベルは、測定した総２５（ＯＨ）ＤおよびビタミンＤ結合タンパク質（ＤＢＰ）のレベルから計算した。総２５（ＯＨ）ＤおよびＤＢＰに結合した２５（ＯＨ）Ｄは、腰椎の骨塩量（ＢＭＤ）と関連しなかった。遊離２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄは、腰椎のＢＭＤと正相関した。

【図２】総２５（ＯＨ）Ｄまたはバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄと血清カルシウムとの間の関係を描写する。総２５（ＯＨ）Ｄレベルは、血清カルシウムレベル（アルブミン

に対して補正）との関連を示さなかったが、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄのレベルは、血清カルシウムと正関連を示した。
【図３】総２５（ＯＨ）Ｄまたはバイオアベイラブル２５（ＯＨ）ＤとＰＴＨとの間の関係を描写する。年齢、性別、人種、および１年の生存状態に対する調整後、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄは、ＰＴＨレベルと有意に逆関連したが、総２５（ＯＨ）Ｄは、ＰＴＨとの関連性を示さなかった。
【図４】実施例２の試料選択を描写する。２５（ＯＨ）Ｄおよび１，２５（ＯＨ）２Ｄは、ＡｒＭＯＲＲコホート内の症例対照研究の一部として、既に測定済みであった。同じ数の症例（透析中１年目に死亡した対象）と対照を、各人種集団から無作為に選択した。
【図５】実施例４で試験した仮説。
【図６】対象から得られた血液試料中のバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルを判定するためのアッセイを行うためのシステムの実施形態の図である。
【図７】本明細書に記載の比較モジュールの実施形態の図である。
【図８】本明細書に記載のコンピューティングシステムのためのオペレーティングシステムおよびアプリケーションの実施形態の図である。
【発明を実施するための形態】
【００５０】
本明細書に記載の本発明の態様は、現在使用されている臨床的パラメータであるビタミンＤの総血清レベルが、骨塩密度および副甲状腺ホルモンレベル等の健康の尺度と良好に相関しないという発明者らの発見に基づく、アッセイ、システム、および治療方法を含む。発明者らは、バイオアベイラブルビタミンＤおよび遊離ビタミンＤのレベルが、同じ健康の尺度とより相関性があり、したがって、対象が十分なビタミンＤのレベルを有するかどうかのより良好な指標であることを発見した。バイオアベイラブルビタミンＤおよび遊離ビタミンＤを測定するためのアッセイ、ならびに対象のビタミンＤ欠乏症の治療を行う方法を本明細書に記載する。
【００５１】
開示される方法の理解および使用に必要な材料、手順、および検討事項を以下に記載し、記載の方法およびアッセイの種々の実施形態を明示および例示する実験結果および非限定的な実施例も記載される。
定義
【００５２】
便宜のため、本明細書において、本明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲に採用される、ある特定の用語を、ここに集める。別段に示されない限り、または内容から黙示されない限り、以下の用語および語句は、下記の意味を含む。別段に明示されるか、または内容から明白でない限り、以下の用語および語句は、用語または語句が、それが属する技術分野で得られた意味を除外するものではない。本発明の範囲は、特許請求の範囲によってのみ制限されるため、定義は、特定の実施形態を説明することを助けるために提供されるものであり、特許請求される発明を制限するように意図するものではない。別段に定義されない限り、本明細書に使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する当該技術分野の当業者によって、広く理解されるものと同じ意味を有する。
【００５３】
本発明に使用される際、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」または「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」は、方法または組成物に必須であるが、依然として、必須であるかを問わない特定されていない要素を含む余地がある、組成物、方法、およびその各構成要素（複数可）に関して使用される。
【００５４】
本明細書に使用される際、「本質的に～から構成される」という用語は、所与の実施形態に必要とされる要素を指す。この用語は、その実施形態の基本的および新規または機能的な特性（複数可）に実質的に影響を及ぼさない要素の存在を許容する。
【００５５】

「～から構成される」という用語とは、本明細書に記載される組成物、方法、およびそのそれぞれの構成要素に言及し、その実施形態の説明に列挙されない全ての要素を除外する。

【００５６】

本明細書および添付の特許請求の範囲に使用される際、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、および「その（ｔｈｅ）」は、内容が明確にそうでないことを示さない限り、複数形への参照を含む。したがって、例えば、「方法（ｔｈｅ　ｍｅｔｈｏｄ）」への言及は、１つ以上の方法、ならびに／または本明細書に記載の種類および／もしくは本開示を読めば当業者には明らかとなろうステップ等を含む。同様に、「または」という語は、別段に明確に指示されない限り、「および」を含むように意図される。本明細書に記載のものに類似またはそれに相当する方法および材料を、本開示の実践または試験に使用することができるが、好適な方法および材料は、以下に記載される。略語「例えば（ｅ．ｇ．）」は、ラテン語のｅｘｅｍｐｌｉ　ｇｒａｔｉａに由来し、非限定的な実施形態を指して本明細書に使用される。したがって、略語「例えば（ｅ．ｇ．）」が、用語「例えば（ｆｏｒ　ｅｘａｍｐｌｅ）」と同義である。

【００５７】

細胞生物学および分子生物学で一般的な用語の定義は、２００６年にＭｅｒｃｋ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓによって出版された“Ｔｈｅ　Ｍｅｒｃｋ　Ｍａｎｕａｌ　ｏｆ　Ｄｉａｇｎｏｓｉｓ　ａｎｄ　Ｔｈｅｒａｐｙ”，１９ｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ（ＩＳＢＮ　０－９１１９１０－１９－０）、１９９４年にＢｌａｃｋｗｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｌｔｄ．によって出版されたＲｏｂｅｒｔ　Ｓ．Ｐｏｒｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（ｅｄｓ．），Ｔｈｅ　Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ　ｏｆ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（ＩＳＢＮ　０－６３２－０２１８２－９）、Ｔｈｅ　ＥＬＩＳＡ　ｇｕｉｄｅｂｏｏｋ（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｂｉｏｌｏｇｙ　１４９）ｂｙ　Ｃｒｏｗｔｈｅｒ　Ｊ．Ｒ．（２０００）、Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌｓ　ｏｆ　ＲＩＡ　ａｎｄ　Ｏｔｈｅｒ　Ｌｉｇａｎｄ　Ａｓｓａｙｓ　ｂｙ　Ｊｅｆｆｒｅｙ　Ｔｒａｖｉｓ，１９７９，Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｎｅｗｓｌｅｔｔｅｒｓ、２００６年にＥｌｓｅｖｉｅｒによって出版されたＩｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　ｂｙ　Ｗｅｒｎｅｒ　Ｌｕｔｔｍａｎｎに見出すことができる。分子生物学で一般的な用語の定義はまた、２００９年にＪｏｎｅｓ＆Ｂａｒｔｌｅｔｔ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇよって出版されたＢｅｎｊａｍｉｎ　Ｌｅｗｉｎ，Ｇｅｎｅｓ　Ｘ（ＩＳＢＮ－１０：０７６３７６６３２１）、１９９５年にＶＣＨ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．によって出版されたＫｅｎｄｒｅｗ　ｅｔ　ａｌ．（ｅｄｓ．），，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：ａ　Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ　Ｄｅｓｋ　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ（ＩＳＢＮ　１－５６０８１－５６９－８）、およびＣｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　２００９，Ｗｉｌｅｙ　Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｃｏｌｉｇａｎ　ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓに見出すことができる。

【００５８】

「低下する」、「減少する」、「減少した」、「減少」、「低下する」、および「阻害する」という用語は全て、概して、基準に対する統計的に有意な量の低下を意味して本明細書に使用される。しかしながら、疑問を避けるため、「減少する」、「減少」、または「低下する」、または「阻害する」とは、典型的に、基準レベルと比較して少なくとも１０％の低下を意味し、例えば、基準レベルと比較して、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、例えば、所定の実体もしくはパラメータの完全な不在を含むまでの低下、または基準レベルと比較して１０～９９％の任意の低下を含み得る。

【００５９】

「増加した」、「増加する」、または「強化する」、または「活性化する」、または「促進する」という用語は全て、概して、統計的に有意な量の増加を意味して使用され、疑問を避けるために、用語「増加した」、「増加する」、または「強化する」、または「活性化する」、または「促進する」とは、基準レベルと比較して、少なくとも１０％の増加を意味し、例えば、基準レベルと比較して、少なくとも約２０％、または少なくとも約３０％、または少なくとも約４０％、または少なくとも約５０％、または少なくとも約６０％、または少なくとも約７０％、または少なくとも約８０％、または少なくとも約９０％、または１００％を含むまでの増加、または１０～１００％の増加、あるいは、基準レベルと比較して、少なくとも約２倍、または少なくとも約３倍、または少なくとも約４倍、または少なくとも約５倍、または少なくとも約１０倍の増加、または２倍～１０倍以上の任意の増加を意味する。

【００６０】

本明細書に使用される際、「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、隣接する残基のαアミノ基とカルボキシ基との間のペプチド結合によってもう一方に結合された、一連のアミノ酸残基を指して本明細書に互換的に使用される。本明細書に互換的に使用される「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、その大きさおよび機能に関係なく、修飾されたアミノ酸（例えば、リン酸化、糖化、グリコシル化等）およびアミノ酸類似体を含む、タンパク質アミノ酸のポリマーを指す。「タンパク質」および「ポリペプチド」は、しばしば、比較的大きなポリペプチドを参照して使用され、一方で「ペプチド」という用語は、しばしば、小さなポリペプチドを参照して使用されるが、当該技術分野におけるこれらの用語の使用は、重複する。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、遺伝子産物およびそのフラグメントを指す場合、本明細書に互換的に使用される。したがって、例示的なポリペプチドまたはタンパク質には、遺伝子産物、天然のタンパク質、相同体、相同分子種、パラログ、フラグメント、ならびに前述のものの他の同等物、変異体、フラグメント、および類似体が含まれる。

【００６１】

本明細書に使用される際、「薬学的組成物」という用語は、薬学業界で広く使用されるような、薬学的に許容される担体と組み合わせた活性薬剤を指す。

【００６２】

「薬学的に許容される」という表現は、健全な医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、炎症、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を有することなく、ヒトおよび動物の組織と接触して使用するのに好適な、妥当な利益／危険性の比率に見合った、化合物、材料、組成物、および／または剤形を指して、本明細書に採用される。

【００６３】

「薬学的に許容される担体」という表現は、あらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗細菌および抗真菌剤、ならびに吸収遅延剤等を含む。薬学的活性物質に対するこのような媒体および薬剤の使用は、当該技術分野で周知である。任意の従来的な媒体または薬剤は、活性成分と不適合であるか、または対象に対して毒性である場合を除き、治療的組成物におけるその使用が企図される。補助活性成分もまた、組成物に組み込むことができる。

【００６４】

本明細書に使用される際、「対象」とは、ヒトまたは動物を意味する。通常、動物は、霊長類、齧歯類、家畜、または狩猟動物等の脊椎動物である。霊長類には、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、マカク、例えば、赤毛ザルが含まれる。齧歯類には、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギ、およびハムスターが含まれる。家畜および狩猟動物には、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、ネコ科種、例えば、家猫、イヌ科種、例えば、イヌ、キツネ、オオカミ、鳥類、例えば、ニワトリ、エミュー、オーストリッチ、および魚類、例えば、トラウト、ナマズ、およびサケが含まれる。患者または対象には、前述のいかなるものの、たとえば上述の全てのサブセットも含まれる。ある特定の実施形態において、対象は、哺乳類、例えば、霊長類、例えば、ヒトで

ある。

【００６５】

好ましくは、対象は、哺乳動物である。哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシであることができるが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳動物は、ビタミンＤ欠乏症の動物モデルを表す対象として、有利に使用することができる。さらに、本明細書に記載の方法は、家畜動物および／またはペットを治療するために使用することができる。対象は、雄性または雌性であり得る。対象は、ビタミンＤ欠乏症またはビタミンＤ欠乏症と関連する１つ以上の疾患もしくは病状であると既に診断されたか、またはそれを患うかもしくは有するとして特定されているものであり得、任意で、ビタミンＤ欠乏症またはビタミンＤ欠乏症と関連する１つ以上の疾患または病状の治療を既に受けているが、必ずしもそうとは限らない。対象はまた、ビタミンＤ欠乏症またはビタミンＤ欠乏症と関連する１つ以上の疾患もしくは病状と診断されたか、またはそれを患うとして特定されたが、ビタミンＤ欠乏症またはビタミンＤ欠乏症と関連する１つ以上の疾患もしくは病状の１つ以上の治療を受けた結果として、既知のビタミンＤ欠乏症の危険因子に改善を示すものであり得る。あるいは、対象はまた、以前にビタミンＤ欠乏症またはビタミンＤ欠乏症と関連する１つ以上の疾患もしくは病状を有するとして診断されていないものであってもよい。例えば、対象は、ビタミン欠乏症またはビタミンＤ欠乏症と関連する１つ以上の疾患もしくは病状の１つ以上の危険因子を呈するもの、あるいはビタミンＤ欠乏症の危険因子を呈さない対象であり得る。

【００６６】

実施例、または別様に示される場合以外では、本明細書に使用される成分の量または反応条件を表す全ての数は、全ての場合において「約」という用語によって修飾されるものとして理解されるべきである。割合（％）と関連して使用される際、用語「約」は、±１％を意味し得る。

【００６７】

用語「統計的に有意な」または「有意に」とは、統計的有意性を指し、概して、少なくとも２つの標準偏差（２ＳＤ）の差を意味する。

ビタミンＤ欠乏症

【００６８】

本明細書に記載の本発明の態様は、対象がビタミンＤ欠乏症を有するかどうかを判定することを目的とするアッセイ、およびこれらの病状を治療する方法を含む。本明細書に使用される際、「ビタミンＤ」とは、ビタミンＤ１、Ｄ２、Ｄ３、Ｄ４、およびその異性体または誘導体を含む、複数の形態のＤビタミンのうちの任意のものを指す。ビタミンＤの形態の非限定的な例には、植物によって生成されるビタミンＤ２（エルゴカルシフェロール）、動物によって生成されるビタミンＤ３（コレカルシフェロール）が挙げられる。ビタミンＤ２およびＤ３のいずれも、肝臓でヒドロキシル化され、それぞれ、２５（ＯＨ）Ｄ２（２５－ヒドロキシビタミンＤ２）および２５（ＯＨ）Ｄ３（２５－ヒドロキシビタミンＤ３またはカルシジオール）を形成し、これらは、集合的に２５（ＯＨ）Ｄと称することができる。２５（ＯＨ）Ｄは、体内でのビタミンＤの主要な輸送形態であり、活性ビタミンＤホルモンのプロホルモンである。主に腎臓でのさらなるヒドロキシル化によって、２５（ＯＨ）Ｄは、１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ（１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ３（カルシトリオール）および１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ２を含む）に変換される。ビタミンＤの前述の形態は全て、本明細書に使用される際、「ビタミンＤ」という用語によって包含される。いくつかの実施形態において、判定されるビタミンＤのレベルは、２５－（ＯＨ）Ｄのレベルである。いくつかの実施形態において、判定されるビタミンＤのレベルは、２５－（ＯＨ）Ｄ２のレベルである。いくつかの実施形態において、判定されるビタミンＤのレベルは、２５－（ＯＨ）Ｄ３のレベルである。いくつかの実施形態において、判定されるビタミンＤのレベルは、１，２５－（ＯＨ）$_2$Ｄのレベルである。いくつかの実施形態において、判定されるビタミンＤのレベルは、１，２５－（ＯＨ）$_2$Ｄ２のレベルである。いくつかの

実施形態において、判定されるビタミンＤのレベルは、１，２５－（ＯＨ）$_2$Ｄ３のレベルである。

【００６９】

ビタミンＤホルモンは、骨鉱化、ならびに血中カルシウムレベルおよび血中リンレベルを含む、多数の血液化学の側面に影響を及ぼす。欠乏したビタミンＤレベルによって引き起こされるか、またはそれと関連する疾患および病状は、本明細書において、「ビタミンＤ関連疾患」と称される。欠乏したビタミンＤレベルは、二次性副甲状腺機能亢進症、副甲状腺過形成、副甲状腺ホルモンレベルの上昇、低カルシウム血症、慢性腎臓疾患（ＣＫＤ）、腎疾患、末期腎疾患、慢性腎臓疾患に伴う骨ミネラル代謝異常、乾癬、骨塩量の低下、骨吸収および代謝性骨疾患、例えば、骨性線維形成不全症、嚢胞性線維性骨炎、骨軟化症、くる病、骨粗鬆症、骨硬化症、脊椎および腰部の非外傷性骨折、腎性骨ジストロフィー、ならびに骨外性石灰化と関連する。二次性副甲状腺機能亢進症（ＳＨＰＴ）は、骨代謝回転を増加させ、治療せずに放置すると、鉱化作用を損ない、骨量を低下させる可能性がある。ＳＨＰＴを有する患者は、最終的に骨軟化症につながり得る骨代謝回転の増加および骨量の低下を有する。骨軟化症は、ビタミンＤおよび食事カルシウムの両方のレベルが著しく減少した場合に生じる、骨鉱化の著しい欠陥またはその欠如である。骨組織内の正常な骨の欠損として定義される骨粗鬆症は、ビタミンＤレベルが十分な低カルシウム食または低ビタミンＤで十分な食事カルシウムのいずれかの結果として起こり得る。低血清２５（ＯＨ）Ｄは、特に、高齢者において、骨粗鬆症性骨折の危険性を増加させ、十分な用量でのビタミンＤおよびカルシウムの補給が、その危険性を減少させる。副甲状腺ホルモン系に対するビタミンＤの多数の「非古典的」生物学的効果が、その「古典的」効果を超えて、報告されている。そのような効果は、細胞の成長および分化、細胞増殖、赤血球形成、毛髪の成長、筋肉機能、血圧、線維化、レニンアンジオテンシン系を含む、免疫系および心臓血管系に関連して報告されている。ビタミンＤ欠乏症は、例えば、感染症、心血管疾患、アレルギー、喘息、肥満症、糖尿病、筋力低下、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、および癌の発症または進行に関連づけられている。

【００７０】

ビタミンＤ欠乏症は、日光への暴露不足、ビタミンＤの食事摂取の不足、または、ビタミンＤ等の脂溶性ビタミンの腸内吸収の減少をもたらす、病状もしくは肥満手術等の臨床的処置によって引き起こされ得る。ビタミンＤレベルは、従来的には、総血清２５（ＯＨ）Ｄのレベルとして測定される。総血清２５（ＯＨ）Ｄは、現在最も広く許容されているビタミンＤ状態を判定するためのアッセイであるが、結果および解釈が著しく変動するため、全集団にわたって、臨床的に意義があるものではない可能性がある。本明細書に記載の本発明の態様は、総血清ビタミンＤではなく、バイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルを測定することによって、対象がビタミンＤ欠乏症であるかどうかを判定するためのアッセイを対象とする。

【００７１】

本明細書に使用される際、「ビタミンＤ欠乏症」とは、本明細書に上述の、低いビタミンＤレベルが関係している病状または疾患のうちの１つ以上を発症する危険性の増加と関連し得る、最適ではないビタミンＤのレベルを指す。ビタミンＤ欠乏症を有する対象は、ビタミンＤ関連疾患のいずれの症状、マーカー、もしくは兆候も有さない可能性があるか、または、１つ以上のビタミンＤ関連疾患の症状、マーカー、もしくは兆候を有する場合がある。ビタミンＤ欠乏症を有する対象は、バイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤレベルが、健常対象集団で測定されたその形態のビタミンＤの平均レベルの２５％以下である対象であり得る。例えば、バイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤレベルが、健常対象集団のその形態のビタミンＤの平均レベルの２５％、または２０％または１５％または１０％または５％、またはそれを下回る対象が、欠乏したビタミンＤレベルを有する。

【００７２】

健常対象は、ビタミンＤ関連疾患または病状のいずれのマーカー、兆候、または症状も

呈さず、ビタミンＤ欠乏症を有する危険性にないものであり得る。非限定的な例として、健常対象は、例えば、成長の遅れ、脊椎、骨盤、もしくは脚の痛み、筋力低下、または脚の湾曲、脊椎の異常湾曲、肥厚した手首および足首、および／もしくは胸骨の突出等の骨格の変形を含む、くる病の兆候または症状を示さない。ビタミンＤ欠乏症の危険因子は、当該技術分野で周知であり、限定されるものではないが、ビタミンＤ強化牛乳を飲まないこと（例えば、ラクトース不耐性対象、牛乳アレルギーを有する対象、一部の菜食主義者、および母乳で育てられた乳児）；色黒の皮膚；高齢（例えば、ビタミンＤを合成する能力が減少し、外出しない可能性が高くなり得る高齢者）；慢性もしくは急性もしくは重度の疾患（アルツハイマー病を有するか、もしくは精神を患う対象を含む、対象が、屋内、院内、集中治療施設、もしくは施設および補助治療設備に留まる可能性を高める病状）；皮膚露出部を全て覆うこと（ある特定の宗教もしくは文化のメンバー等）；日焼け止め剤の常用（例えば、日焼け防止指数（ＳＰＦ）の値が８の日焼け止め剤の塗布は、ビタミンＤの生成を９５％減少させ、より高いＳＰＦ値は、ビタミンＤをさらに減少させ得る）；脂肪吸収不全を有するか、もしくはそうであると診断されていること（限定されないが、嚢胞性線維症、胆汁鬱滞性肝疾患、他の肝臓疾患、胆のう疾患、膵酵素欠損症、クローン病、炎症性腸疾患、スプルーもしくはセリアック病、または胃および／もしくは腸の部分もしくは全摘除を含む）；小腸切除を受けていること、フェニトイン、フォスフェニトイン、フェノバルビタール、カルバマゼピン、およびリファンピンを含む、ビタミンＤの異化作用を増加させる薬物の服用；コレスチラミン、コレスチポール、オルリスタット、鉱物油、および人工脂肪を含む、ビタミンＤの吸収を減少させる薬物の服用；ケトコナゾールを含む、ビタミンＤの活性化を阻害する薬物の服用；コルチコステロイドを含む、カルシウムの吸収を低下させる薬物の服用；歯周病、真性糖尿病、インスリン抵抗性症候群、内皮機能不全（体脂肪に蓄積されたビタミンＤが、あまりバイオアベイラブルではない）、心血管疾患、アテローム性動脈硬化、心不全、もしくは骨粗鬆症を有するか、またはそうであると診断されていること；肥満であること；あるいは閉経後の女性が挙げられる。

バイオアベイラブルビタミンＤ

【００７３】

本明細書に記載のアッセイおよび治療方法は、対象の血液中のバイオアベイラブルビタミンＤおよび／または遊離ビタミンＤのレベルが、骨塩量および副甲状腺ホルモンレベル等の健康の尺度に、総血清ビタミンＤのレベルが有するものよりも有意な相関を有するという発明者らの発見に基づくものである。

【００７４】

血流において、ビタミンＤは、１）ビタミンＤ結合タンパク質による結合、２）アルブミンタンパク質による結合、または３）未結合、の３つの状態のうちの１つで存在し得る。本明細書に使用される際、「ビタミンＤ結合タンパク質」、「ＶＤＢＰ」、または「ＤＢＰ」は、配列番号１、２、または３（ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ　Ｎｏ：２６３８）のいずれかのポリペプチド、ならびにその天然に存在する変異体（例えば、対立遺伝子）、相同体、および機能的誘導体を指す。ＶＤＢＰは、ビタミンＤに堅く結合し、（ヒトＶＤＢＰについては）$K_D = 0.7 \times 10^{9} M^{-1}$を有する。ＶＤＢＰに結合したビタミンＤの分画は、本明細書において「D_{VDBP}」、「D_{DBP}」、「ビタミンD_{DBP}」、または「ビタミンD_{VDBP}」と称される。本明細書に使用される際、「アルブミン」は、配列番号４、５、または６（ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ　Ｎｏ：２１３）のいずれかのポリペプチド、ならびにその天然に存在する変異体（例えば、対立遺伝子）、相同体、および機能的誘導体を指す。アルブミンは、ＶＤＢＰほど堅くビタミンＤに結合せず、（ヒトアルブミンについては）$K_D = 6 \times 10^{5} M^{-1}$を有する。アルブミンに結合したビタミンＤの分画は、本明細書において「$D_{アルブミン}$」、「D_{Alb}」、「ビタミン$D_{アルブミン}$」、または「ビタミンD_{Alb}」と称される。未結合のビタミンＤはまた、本明細書において「遊離ビタミンＤ」または「Ｄ」と称される。本明細書に使用される際、「バイオアベイラブルビタミンＤ」とは、集合的に、遊離ビタミンＤおよびアルブミンに結合し

たビタミンＤを指す。バイオアベイラブルビタミンＤは、ＶＤＢＰに結合したビタミンＤの分画を含まない。バイオアベイラブルビタミンＤは、本明細書において、互換的に「V_{Bio}」および「ビタミンD_{Bio}」と称される。

バイオアベイラブルビタミンＤのアッセイ

【００７５】

本明細書に記載の本発明の態様は、対象から得られた血液試料中のバイオアベイラブルビタミンＤおよび／または遊離ビタミンＤのレベルを判定するためのアッセイを対象とする。

【００７６】

いくつかの実施形態において、バイオアベイラブルビタミンＤおよび／または遊離ビタミンＤのレベルを判定することは、まず、対象から得られた血液試料中のＶＤＢＰポリペプチド、アルブミンポリペプチド、および総ビタミンＤのレベルを判定することによって行われる。次に、遊離ビタミンＤおよびバイオアベイラブルビタミンＤのレベルを、これらの値ならびにビタミンＤに対するＶＤＢＰおよびアルブミンの結合定数を使用して、計算することができる。ヒトタンパク質については、結合定数は、それぞれ、$0.7\times10^{9}M^{-1}$および$6\times10^{5}M^{-1}$である。

【００７７】

本明細書に使用される際、「血液試料」は、対象から得られた任意の量の血液またはその分画を指す。いくつかの実施形態において、血液試料は、全血またはその分画、例えば、血清または血漿を含み得る。いくつかの実施形態において、血液試料は、本明細書に記載のように、アッセイを行う前に、抗凝固剤または保存剤と接触させる。抗凝固剤および保存剤の非限定的な例には、ＣＰＤ、ＣＰ２Ｄ（クエン酸リン酸２デキストロース（Ｃｉｔｒａｔｅ Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ Ｄｏｕｂｌｅ Ｄｅｘｔｒｏｓｅ））、ＣＰＤＡ－１、ＣＤＰ／ＡＤＳＯＬ（登録商標）、ＣＤＰ／Ｏｐｔｉｓｏｌ（登録商標）、ＡＳ－３（Ａｄｄｉｔｉｖｅ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ ３、Ｈａｅｍｏｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｒｐ Ｂｒａｉｎｔｒｅｅ ＭＡ）、およびＳＡＧ－Ｍが挙げられる。

【００７８】

いくつかの実施形態において、血液試料は、本明細書に記載のように、アッセイにおいて使用される前に保存されてもよい。いくつかの実施形態において、血液試料は、本明細書に記載のように、アッセイに使用する前に、例えば、数分、数時間、数日、数週間、最大数か月、任意の期間、保存することができる。一実施形態において、血液試料は凍結されている。位置実施形態においては、血液試料は凍結されていない。

【００７９】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のアッセイは、全血試料で行われる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のアッセイは、血液試料の血漿分画で行われる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のアッセイは、血液試料の血清分画で行われる。

【００８０】

対象から得られた血液試料中に存在するＶＤＢＰおよび／またはアルブミンポリペプチドのレベルは、当該技術分野で既知の特異的ポリペプチドのレベルを判定するための任意の方法によって判定することができる。いくつかの実施形態において、アッセイは、自動分析装置上で行われる。本明細書に記載の方法およびアッセイに使用可能な方法の非限定的な例には、酵素結合免疫吸着測定法、染料に基づく測光分析法、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、放射免疫分析法（ＲＩＡ）、放射免疫測量法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、染料結合免疫吸着法、免疫濁度法、免疫比濁法、免疫蛍光測定法、および質量分析法が挙げられる。既知の抗原（例えば、配列番号１～６のポリペプチドによって構成されるペプチド）を用いて抗体を生成する種々の方法は、当業者に既知である（Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｈａｒｌｏｗ&Ｌａｎｅ ｅｄｓ．，１９８８）を参照されたく、これは参照によりその

全体が本明細書に組み込まれる）。特に、好適な抗体は、化学合成、細胞内免疫付与（すなわち、体内抗体技術）、または、好ましくは、組み換え発現技術によって、生成することができる。抗体を生成する方法は、さらに、当該技術分野で周知のハイブリドーマ技術を含み得る。アルブミンおよびＶＤＢＰに特異的な抗体は、市販入手可能である（例えば、それぞれ、Ｃａｔ．＃ａｂ１１２８８８およびａｂ２３４８４、Ａｂｃａｍ；Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）。

【００８１】

いくつかの実施形態において、アルブミンレベルは、自動分析装置において、染料に基づく測光分析法によって判定することができる。染料に基づく測光分析法は、市販利用可能である（例えば、Ａｌｂｕｍｉｎ　ＦＳ（商標）キット；ＤｉａＳｙｓ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｇｍｂ；Ｈｏｌｚｈｅｉｍ，ＧｅｒｍａｎｙまたはＡｌｂｕｍｉｎ試薬；Ｃａｔ＃ＯＳＲ６１０２；Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ；Ｂｒｅａ，ＣＡ）。自動化分析装置は、市販入手可能である（例えば、Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ；Ｂｒｅａ，ＣＡのＡＵ２７００またはＡＵ５４００）。特に血清アルブミンレベルの判定用に設計されたシステムもまた、市販利用可能である（例えば、Ｃａｒｅｓｉｄｅ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（商標）、Ｃａｒｅｓｉｄｅ　Ｉｎｃ．，Ｃｕｌｖｅｒ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ）。いくつかの実施形態において、アルブミンレベルのレベルは、免疫測定法、例えば、Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｕｍ　Ａｌｂｕｍｉｎ　ＥＬＩＳＡ　Ｋｉｔ（Ｃａｔ＃１１９０；Ａｌｐｈａ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ；Ｓａｎ　Ａｎｔｏｎｉｏ，ＴＸ）を使用して判定することができる。

【００８２】

いくつかの実施形態において、ＶＤＢＰレベルは、ＥＬＩＳＡによって判定することができる。ＶＤＢＰ用のＥＬＩＳＡアッセイは、市販利用可能である（例えば、Ｃａｔ＃ＤＶＤＢＰ０；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）。いくつかの実施形態において、アッセイは、Ｃａｌｉｂｒａｔｏｒ　Ｄｉｌｕｅｎｔ　ＲＤ６－１１（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｐａｒｔ　Ｎｕｍｂｅｒ　８９５４８９）で血清試料を１対２，０００に希釈した後に行う。ＥＬＩＳＡは、標識（例えば、酵素結合）した形態の抗体を使用して、抗原の濃度を検出および測定するための技術である。種々の形態のＥＬＩＳＡが存在し、それらは当業者に周知である。当該技術分野で既知のＥＬＩＳＡの標準的な技術は、“Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｄｉａｇｎｏｓｉｓ”，２ｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｒｏｓｅ　ａｎｄ　Ｂｉｇａｚｚｉ，ｅｄｓ．Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，１９８０、Ｃａｍｐｂｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ”，Ｗ．Ａ．Ｂｅｎｊａｍｉｎ，Ｉｎｃ．，１９６４、およびＯｅｌｌｅｒｉｃｈ，Ｍ．１９８４，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｃｌｉｎ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２２：８９５－９０４に記載され、これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００８３】

対象から得られた血液試料中に存在する総ビタミンＤのレベルは、当該技術分野で既知の任意の方法によって判定することができる。本明細書に記載の方法およびアッセイに使用可能な方法の非限定的な例には、放射免疫測定法、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法、酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、および高圧液体クロマトグラフィーが挙げられる。いくつかの実施形態において、試料中の総ビタミンＤのレベルは、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（ＬＣ－ＭＳ）によって判定される。いくつかの実施形態において、試料中の総ビタミンＤのレベルは、高速液体クロマトグラフィー／質量分光光度分析によって判定される。いくつかの実施形態において、試料中の総ビタミンＤのレベルは、放射免疫測定法によって判定される。いくつかの実施形態において、試料中の総ビタミンＤのレベルは、市販利用可能な放射免疫測定法（例えば、ＤｉａＳｏｒｉｎ　Ｉｎｃ，Ｓｔｉｌｌｗａｔｅｒ，ＭＮ，ＵＳＡ）を使用して判定される。いくつかの実施形態において、試料中の総ビタミンＤのレベルは、市販利用可能な免疫発光測定法（例えば、Ｃａｔ　Ｎｏ３１０６００；ＤｉａＳｏｒｉｎ　Ｉｎｃ．；Ｓｔｉｌｌｗａｔｅｒ　ＭＩＮ）を使用して判定される。対

象から得られた血液試料中の総ビタミンＤを測定する方法にはまた、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第７，７００，３６５号に記載される、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法が含まれ得る。

【００８４】

質量分析方法は、当該技術分野で周知であり、生体分子の定量化および／または特定に使用されている。いくつかの実施形態において、第１の試料および第２の試料のスペクトルからのピーク値の信号強度を比較して（例えば、視覚的、コンピュータ分析によって等）、特定の生体分子の相対量を判定することができる。Ｂｉｏｍａｒｋｅｒ Ｗｉｚａｒｄプログラム（Ｃｉｐｈｅｒｇｅｎ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．，Ｆｒｅｍｏｎｔ，Ｃａｌｉｆ．）等のソフトウェアプログラムを使用して、質量スペクトルの分析を補助することができる。

【００８５】

いくつかの実施形態において、判定される総ビタミンＤのレベルは、２５－ヒドロキシビタミンＤ（２５（ＯＨ）Ｄ）、１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ（１，２５－（ＯＨ）$_2$Ｄ）、２５（ＯＨ）Ｄ２、２５（ＯＨ）Ｄ３、１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ２、１，２５－（ＯＨ）$_2$Ｄ３、ビタミンＤ１、ビタミンＤ２、ビタミンＤ３、ビタミンＤ４、エルゴカルシフェロール、コレカルシフェロール、カルシジオール、およびカルシトリオールからなる群から選択される、１つ以上の形態のビタミンＤを含み得る。いくつかの実施形態において、判定される総ビタミンＤのレベルは、２５－ヒドロキシビタミンＤ（２５（ＯＨ）Ｄ）を含み得る。いくつかの実施形態において、判定される総ビタミンＤのレベルは、２５－ヒドロキシビタミンＤ２（２５（ＯＨ）Ｄ２）を含み得る。いくつかの実施形態において、判定される総ビタミンＤのレベルは、２５－ヒドロキシビタミンＤ３（２５（ＯＨ）Ｄ３）を含み得る。いくつかの実施形態において、判定される総ビタミンＤのレベルは、１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ（１，２５－（ＯＨ）$_2$Ｄ）を含み得る。いくつかの実施形態において、判定される総ビタミンＤのレベルは、１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ２（１，２５－（ＯＨ）$_2$Ｄ２）を含み得る。いくつかの実施形態において、判定される総ビタミンＤのレベルは、１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ３（１，２５－（ＯＨ）$_2$Ｄ３）を含み得る。

【００８６】

いくつかの実施形態において、対象から得られた血液試料中のＶＤＢＰポリペプチド、アルブミンポリペプチド、および総ビタミンＤのレベルが判定されると、遊離ビタミンＤおよび／またはバイオアベイラブルビタミンＤのレベルを判定することができる。遊離ビタミンＤのレベルは、方程式８を使用して計算することができ、その導出は、本明細書において実施例１に記載される。

遊離ビタミンＤ＝｛－｛K_{DBP}・［総ＤＢＰ］－K_{DBP}・［総ビタミンＤ］＋K_{alb}・［Ａｌｂ］＋１｝＋√｛（K_{DBP}・［総ＤＢＰ］－K_{DBP}・［総ビタミンＤ］＋K_{alb}・［Ａｌｂ］＋１）^{2}＋４・（K_{DBP}・K_{alb}・［Ａｌｂ］＋K_{DBP}）・（［総ビタミンＤ］）｝｝÷（２・｛K_{DBP}・K_{alb}・［Ａｌｂ］＋K_{DBP}｝）

（方程式８）

【００８７】

バイオアベイラブルビタミンＤのレベルは、方程式９を使用して計算することができ、その導出は、本明細書において実施例１に記載される。

バイオアベイラブルビタミンＤ＝（K_{alb}・［Ａｌｂ］＋１）・［遊離ビタミンＤ］（方程式９）

【００８８】

いくつかの実施形態において、遊離（未結合）ビタミンＤおよび／またはバイオアベイラブルビタミンＤのレベルを、直接的に判定することができる。いくつかの実施形態において、遊離ビタミンＤのレベルを直接的に判定し、それを使用して、バイオアベイラブルビタミンＤのレベルを計算することができる。いくつかの実施形態において、遊離ビタミ

ンＤのレベルおよびアルブミンポリペプチドのレベルを直接的に判定し、それを使用して、バイオアベイラブルビタミンＤのレベルを判定することができる。本明細書に使用される際、「直接的に判定する」とは、ビタミンまたはポリペプチドの第１の形態のレベルを、直接的に判定したビタミンまたはポリペプチドの第２またはさらなる形態のレベルを使用して計算するのではなく、ビタミンまたはポリペプチドの第１の形態のレベルを、ビタミンまたはポリペプチドの第１の形態のレベルを測定または検出することによって、判定することを指す。

【００８９】

遊離ビタミンＤおよび／またはバイオアベイラブルビタミンＤのレベルの直接測定は、いくつかの方法によって達成することができる。遊離ビタミンＤのレベルの直接測定のための方法の非限定的な例には、次のものが含まれる。１）ＶＤＢＰと複合化されたビタミンＤを、免疫除去法または親和性結合クロマトグラフィーを使用し、試料からＶＤＰＢを除去して、試料から除去することができる。残留ビタミンＤ（バイオアベイラブル分画）を、次に、本明細書の他の部分に記載の方法のいずれかに従って、測定することができる。２）ＶＤＢＰと複合化したビタミンＤを、沈降緩衝剤（例えば、ポリエチレングリコール、硫酸アンモニウム）あり、またはなしで、抗体（免疫沈降法）、アクチン（親和性沈降法）を用いたＶＤＢＰの示差沈降を使用して、試料から除去し、続いて、遊離ビタミンＤおよび／またはバイオアベイラブルビタミンＤからの遠心分離を行い、本明細書の他の部分に記載の方法のいずれかに従った残存ビタミンＤ分画の測定を行うことができる。３）免疫測定法もまた、使用可能である（例えば、Ｅｋｉｎｓ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ Ｉｎｖｅｓｔ．９ Ｓｕｐｐｌ ４：３－１５．１９８６を参照されたく、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。免疫測定法は、遊離検体を、ビタミンをその高親和性結合タンパク質から「奪う」ことのない低親和性抗体を使用して、測定可能であるという見解を生かしたものである。遊離ビタミンＤおよび／またはバイオアベイラブルビタミンＤは、以下および（Ｃｈｒｉｓｔｏｆｉｄｅｓ，Ｎｉｃ Ｄ．Ｔｈｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ Ｈａｎｄｂｏｏｋ，３ｒｄ Ｅｄ．Ｅｄｉｔｏｒ Ｄａｖｉｄ Ｗｉｌｄ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ｌｔｄ，２００５、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載の複数の競合的免疫測定法のアプローチを使用して、直接的に測定することができる。これらの方法は、全て、（１）抗体は、反応条件（ｐＨ、温度、緩衝液）がビタミンとその結合タンパク質との間の結合妨げない場合、遊離検体とタンパク質に結合した検体とを識別し、（２）総抗体結合能力（親和性定数Ｘ抗体濃度）は、総ビタミンＤ濃度を著しく減少させることがなく、したがって、タンパク質に結合したビタミンＤを「奪う」ことはない、という２つの原理に基づく。これは、ビタミンＤリガンドに対する比較的低い親和性（約10^{10}Ｌ／Ｍ）を有する抗体、ならびに／または、遊離およびアルブミンに結合したビタミンＤの結合を可能にするが、ＶＤＢＰに結合したビタミンＤの解離を可能にするには短すぎる、限られたアッセイ反応時間を使用して達成することができる。

【００９０】

使用できる具体的な免疫測定法の設計には、次のものが含まれる：Ａ）抗体捕捉による遊離ビタミンＤおよび／またはバイオアベイラブルビタミンＤの二段階測定、すなわち（１）固定化したビタミンＤ結合抗体による遊離ビタミンＤおよび／またはバイオアベイラブルビタミンＤの捕捉、（２）未結合ビタミンＤおよびＶＤＢＰの洗浄除去、（３）標識したビタミンＤ（もしくは、これもまた抗体に結合する標識したビタミンＤ類似体）での競合的結合による結合ビタミンＤの検出。Ｂ）固定化したビタミンＤ結合抗体、および標識したビタミンＤ（もしくは標識したビタミンＤ類似体）を使用した競合的検出による遊離ビタミンＤおよび／またはバイオアベイラブルビタミンＤの一段階測定。Ｃ）固定化したビタミンＤまたはビタミンＤ類似体、および標識したビタミンＤ結合抗体による遊離ビタミンＤおよび／またはバイオアベイラブルビタミンＤの一段階測定。試料からの遊離ビタミンＤおよび／またはバイオアベイラブルビタミンＤは、標識抗体への結合について、固定化したビタミンＤと競合する。Ｄ）蛍光偏光免疫測定法（Ｍｅｎｄｅｌ ＣＭ．Ｃｌ

ｉｎ Ｃｈｅｍ．３８（９）：１９１６－７．１９９２、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）による遊離ビタミンＤおよび／またはバイオアベイラブルビタミンＤの一段階測定。遊離ビタミンＤおよび／またはバイオアベイラブルビタミンＤと、蛍光標識したビタミンＤ類似体とが、抗体への結合について競合し、偏光した蛍光は、結合部位について競合する遊離ビタミンＤおよび／またはバイオアベイラブルビタミンＤの相対量を示す。

【００９１】

いくつかの実施形態において、遊離および／またはビタミンＤのレベルの判定は、免疫測定法、抗体捕捉による二段階免疫測定法、固定化抗体および競合的検出による一段階免疫測定法、固定化競合物質および標識抗体による一段階免疫測定法、蛍光偏光免疫測定法、示差沈降法（免疫沈降法、親和性沈降法）、免疫除去法、および親和性結合クロマトグラフィーからなる群から選択される方法、ならびに放射免疫測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、染料結合免疫吸着法、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法、および高圧液体クロマトグラフィーからなる群から選択される方法の使用を含むことができる。

【００９２】

いくつかの実施形態において、対象の血液試料中にあると判定されるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルが、健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤの平均値の２５％を下回る場合、その対象は、ビタミンＤ欠乏症を有する可能性が高い。いくつかの実施形態において、対象の血液試料中にあると判定されるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルが、健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤの平均値の２５％を下回る場合、その対象がビタミンＤ欠乏症を有することを示す。いくつかの実施形態において、対象の血液試料中にあると判定されるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルが、健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤの平均値の２５％を下回る場合、その対象は、ビタミンＤ関連疾患を有するか、またはそれを発症する可能性が増大している。いくつかの実施形態において、対象の血液試料中にあると判定されるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルが、健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤの平均値の２５％を下回る場合、その対象は、ビタミンＤ欠乏症の治療を必要とする。いくつかの実施形態において、対象の血液試料中にあると判定されるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルが、健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤの平均値の２５％を下回る場合、その対象は、ビタミンＤ欠乏症の治療を必要とする可能性がさらに高い。

【００９３】

いくつかの実施形態において、対象の血液試料中にあると判定されるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルが、健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤの平均値の２５％を上回る場合、その対象は、ビタミンＤ欠乏症の治療を受けることがない。

ビタミンＤ欠乏症の治療方法

【００９４】

本明細書に記載の本発明の態様は、対象から得られた血液試料中のバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルを検出することと、バイオアベイラブルビタミンＤのレベルが健常対象集団のバイオアベイラブルビタミンＤの平均値の２５％を下回る場合に、ビタミンＤ欠乏症の治療を施すことと、を含む、ビタミンＤ欠乏症の治療方法を対象とする。いくつかの実施形態において、対象から得られた血液試料中のＶＤＢＰポリペプチド、アルブミンポリペプチド、および総ビタミンＤのレベルを判定し、本明細書に上述のように、遊離ビタミンＤおよび／またはバイオアベイラブルビタミンＤのレベルを計算することによって、バイオアベイラブルおよび／または遊離ビタミンＤのレベルを判

定する。いくつかの実施形態において、遊離（未結合）および／またはバイオアベイラブルビタミンＤのレベルを、直接的に判定することができる。いくつかの実施形態において、遊離ビタミンＤのレベルを直接的に判定し、それを使用して、バイオアベイラブルビタミンＤのレベルを計算することができる。いくつかの実施形態において、遊離ビタミンＤのレベルおよびアルブミンポリペプチドのレベルを直接的に判定し、それを使用して、バイオアベイラブルビタミンＤのレベルを計算することができる。

【００９５】

いくつかの実施形態において、ビタミンＤ欠乏症の治療には、例えば、１つ以上の形態のビタミンＤを提供すること、ビタミンＤの活性形態の生成を刺激すること、および／またはビタミンＤの代謝を阻害することによって、対象におけるビタミンＤ、バイオアベイラブルビタミンＤ、および／または遊離ビタミンＤのレベルを増加させる化合物が含まれ得る。多数の天然に存在する形態のビタミンＤ、その誘導体、および類似体を、ビタミンＤ欠乏症の治療が必要な対象に投与することができる。いくつかの実施形態において、任意の形態のビタミンＤ、またはその誘導体もしくは類似体を、それが、天然に存在する活性ビタミンＤの１つ以上の活性を示す（例えば、腸内カルシウム吸収、血清カルシウムレベル、または骨鉱化を増加させる）か、または代謝されてそのような活性を示す化合物となる限り、使用することができる。このような化合物の非限定的な例には、アルファカルシドール、カルシフェジオール、カルシポトリエン、カルシジオール、カルシトリオール（Ｒｏｃａｌｔｒｏｌ、Ｒｏｃｈｅ）、ジヒドロタキステロール（ＤＨＴ（商標）およびＤＨＴ Ｉｎｔｅｎｓｏｌ（商標）、Ｒｏｘａｎｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）、ドキセルカルシフェロール（Ｈｅｃｔｏｒｏｌ（登録商標）、Ｇｅｎｚｙｍｅ）、パリカルシトール（Ｚｅｍｐｌａｒ（登録商標）、Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）、コレカルシフェロール（Ｄｅｌｔａ Ｄ３（商標）、Ｆｒｅｅｄａ Ｖｉｔａｍｉｎｓ Ｉｎｃ．）、ならびにエルゴカルシフェロール（Ｄｒｉｓｄｏｌ、Ｓａｎｏｆｉ）が含まれる。コレカルシフェロールおよびエルゴカルシフェロールは、栄養補助食品として入手可能である。さらなる非限定的な例には、５，６－トランス－コレカルシフェロール；５，６－トランス－エルゴカルシフェロール；フッ素化コレカルシフェロール；側鎖相同型（ｓｉｄｅ ｃｈａｉｎ ｈｏｍｏｌｏｇａｔｅｄ）コレカルシフェロール；側鎖切断型コレカルシフェロール；１９－ノルコレカルシフェロールおよびエルゴカルシフェロール；１０，１９－ジヒドロビタミンＤ化合物；２５－ヒドロキシビタミンＤ３；２５－ヒドロキシビタミンＤ２；２４，２４－ジフルオロ－２５－ヒドロキシビタミンＤ３；２４－フルオロ－２５－ヒドロキシビタミンＤ３；２６，２６，２６，２７，２７，２７ヘキサフルオロ－２５－ヒドロキシビタミンＤ３；２４－２５－ジヒドロキシビタミンＤ３；ｄ５，２６ジヒドロキシビタミンＤ３；２３，２５，２６－トリヒドロキシビタミンＤ３；２５－ヒドロキシビタミンＤ３；２５－ヒドロキシビタミンＤ３の側鎖；ノル；ジノル；トリノル；およびテトラノル類似体；２４－ホモ－１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ３；２４－ジホモ－１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ３；２４－トリホモ－１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ３；ならびに上に列挙したものの対応する１９－ノル化合物が挙げられる。

【００９６】

ビタミンＤ活性は、当該技術分野で既知のいくつかの方法によってアッセイすることができる。化合物が、ビタミンＤ活性を有するか、または対象の体内で代謝されてビタミンＤ活性を有する化合物となるかどうかを判定するためのアッセイの非限定的な例は、米国特許第５，５３２，２２９号に記載され、参照により本明細書に組み込まれる。簡単に言うと、化合物を投与し、血清カルシウムレベルを、化学比色分析または硝酸での処理および原子吸光の測定によって判定する。ビタミンＤ活性を有するか、代謝してビタミンＤ活性を有する化合物となる、化合物の投与は、血清カルシウムレベルを増加させる。ビタミンＤ活性のアッセイの他の非限定的な例には、Ｘ線吸光光度分析法（ＤＥＸＡ）または血清オステオカルシンの測定によって測定される骨塩量が含まれる（米国特許第５，９７２，９１７号を参照されたく、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【００９７】
ビタミンＤ欠乏症の治療の用量は、医師によって決定され、必要に応じて、治療の観測結果に適合するように調整することができる。治療の期間および頻度に関しては、その治療が治療的利益をもたらしているときを判定するために、熟練の臨床医が対象を監視し、用量の増加または低下、投与頻度の増加または低下、治療の中止、治療の再開、または治療レジメンに他の変更を行うかどうかを判定することは、一般的である。
【００９８】
ビタミンＤ欠乏症の治療を施すための用量範囲は、ビタミンＤ欠乏症の治療形態およびその有効性に依存し、本明細書にさらに記載されるように、ビタミンＤ欠乏症の症状、マーカー、または兆候が減少する、所望される効果をもたらすのに十分に多い量である。いくつかの実施形態において、ビタミンＤ欠乏症の症状、マーカー、または兆候には、本明細書に記載の方法に従って判定されるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルが含まれ得る。用量は、実質的な副作用を引き起こすほど多いものであってはならない。一般的に、用量は、患者の年齢、病状、性別によって異なり得、当業者によって決定することができる。用量はまた、何らかの合併症がある場合、または治療に対する対象の感受性に基づいて、個別の医師によって調整することができる。非限定的な例として、ビタミンＤの形態、またはその誘導体もしくは類似体は、典型的に、投与される化合物に応じて、１日当たり約０．１μｇ～約２ｍｇの治療的有効量で投与される。
【００９９】
いくつかの実施形態において、ビタミンＤ欠乏症の治療は、５分間、１０分間、１５分間、２０分間、または２５分間等、ある期間にわたって、行うことができる。いくつかの実施形態において、投与は、例えば、３時間、６時間、１２時間の時間単位、または毎日もしくはそれ以上等、または１か月、２か月、３か月、４か月、もしくはそれ以上の隔週（すなわち、２週間毎）等で、定期的に反復することができる。いくつかの実施形態において、複数回の投与が行われる場合、投与は、例えば、６時間、１日、２日、１週間、２週間、１か月、または２か月で、互いに間隔が空いていてもよい。
【０１００】
最初の治療レジメンの後、治療は、より低い頻度で行われてもよい。例えば、３か月間隔週で投与した後、投与は、６か月間または１年以上、１か月に１回で反復されてもよい。いくつかの実施形態において、投与は、慢性的、例えば、数週間または数か月の期間にわたり、毎日１回以上の投与であってもよい。
【０１０１】
ビタミンＤ欠乏症の治療を行うことにより、ビタミンＤ欠乏症またはビタミンＤ欠乏症に関連する疾患もしくは病状のマーカーまたは症状のレベルを、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％以上減少させることができる。本明細書に使用される際、「治療的有効量」、「有効量」、または「有効用量」という表現は、ビタミンＤ欠乏症の治療または管理に治療的利益を提供する量を指す。ビタミンＤ欠乏症は、本明細書に記載の方法に従って判定することができ、治療的有効量は、本明細書に記載の方法に従って判定されるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルに、統計的に有意な改善をもたらす量であり得る。治療的有効量の決定は、十分に当業者の能力の範囲内である。一般的に、治療的有効量は、対象の病歴、年齢、病状、および性別、ならびに対象における病状の重症度および種類、および他の薬学的活性剤の投与に応じて変化し得る。
【０１０２】
いくつかの実施形態において、投与は、本明細書に記載の方法に従って判定される、バイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルが、対象はビタミンＤ欠乏であると示さなくなるまで、反復される。
【０１０３】
いかなる特定の対象に対しても、特定の投与レジメンは、個体の必要性、およびその組

成物を投与するかまたはその投与を指示する人物の専門的な判断に従って、経時的に調整されるべきであることを理解されたい。例えば、治療薬の用量は、低用量では十分な治療的活性が得られない場合に、増加させることができる。

【０１０４】

対象のビタミンＤ欠乏症を治療する別の方法には、非限定的な例として、日光に当たること、あるいはＣＹＰ２４阻害剤（例えば、米国特許出願第１２／９３５，１３９号を参照されたい）、デントニン（ｄｅｎｔｏｎｉｎ）ペプチド（例えば、米国特許出願第１０／３６０，２０２号を参照されたい）、ＩＬ－１０もしくはＩＬ－４ポリペプチドまたはＴＮＦ－α阻害剤（例えば、米国特許出願第１０／１７０，７４６号を参照されたい）、または米国特許出願第１０／３６０，２０２号に記載のＰＨＥＸポリペプチドの投与が挙げられる。

【０１０５】

本発明の治療方法に関しては、別段の指定がない限り、ビタミンＤ欠乏症の治療を行うことを、特定の投与形態、用量、または投与頻度に限定するように意図するものではなく、本発明は、筋肉内、静脈内、腹腔内、膀胱内、関節内、局所、皮下、経口、またはビタミンＤ欠乏症の治療に適した投与を提供するのに十分な任意の他の経路を含む、全ての投与形態を検討するものである。

システム

【０１０６】

いくつかの態様において、本明細書に記載の本発明は、少なくとも１つの対象から得られた少なくとも１つの血液試料からデータを取得するためのシステム（およびコンピュータシステムを動かすためのコンピュータ可読媒体）であって、１）少なくとも１つの血液試料を受け取り、少なくとも１つの血液試料に少なくとも１つの分析を行って、試料中のバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルを判定するように構成される、判定モジュールと、２）判定モジュールから出力されたデータを記憶するように構成される記憶デバイスと、３）判定モジュールから出力されたデータに部分的に基づいて、内容を表示するための表示モジュールと、を備え、内容は、バイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルを示す信号を含む、システムを対象とする。

【０１０７】

一実施形態において、（ａ）（ｉ）少なくとも１つの血液試料を受け取り、少なくとも１つの血液試料に少なくとも１つの分析を行って、試料中のバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルを判定する（例えば、ＶＤＢＰポリペプチド、アルブミンポリペプチド、総ビタミンＤ；バイオアベイラブルビタミンＤ；および遊離ビタミンＤのうちの１つ以上のレベルを判定する）ように構成される、判定モジュールと、（ｉｉ）判定モジュールからの出力データを記憶するように構成される記憶モジュールと、（ｉｉｉ）対象から得られた血液試料中のＶＤＢＰポリペプチド、アルブミンポリペプチド、総ビタミンＤ、バイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルが、バイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルは健常対象集団のバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤの平均値の２５％を下回ることを示すかどうかを、出力データから特定するように適合される、計算モジュールと、（ｉｖ）判定モジュールから出力されたデータに部分的に基づいて、内容を表示するための表示モジュールと、を含み、内容は、バイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルを示す信号を含む、方法を実現するためのコンピュータシステムの動作を制御するように適合される、少なくとも１つのコンピュータプログラムを含む、少なくとも１つのメモリと、（ｂ）コンピュータプログラムを実行するための少なくとも１つのプロセッサと、備える、システムを本明細書に提供する（図６を参照されたい）。

【０１０８】

「コンピュータ」という用語は、構造化された入力を受け取り、規定の規則に従って、構造化入力を処理し、処理の結果を出力として生成することができる、任意の非ヒト装置

を指す。コンピュータの例には、コンピュータ、汎用コンピュータ、スーパーコンピュータ、メインフレーム、スーパーミニコンピュータ、ミニコンピュータ、ワークステーション、マイクロコンピュータ、サーバ、双方向テレビ、コンピュータと双方向テレビのハイブリッドな組み合わせ、コンピュータおよび／またはソフトウェアのエミュレーションのための特定用途向けハードウェアが挙げられる。コンピュータは、単一のプロセッサ、または並列および／または非並列で動作することができる、複数のプロセッサを有し得る。コンピュータはまた、コンピュータ間で情報を送信または受信するためのネットワークを介して互いに接続された、２つ以上のコンピュータを指す。このようなコンピュータの例には、ネットワークによって接続されたコンピュータを介して情報を処理するための分散コンピュータシステムが含まれる。

【０１０９】

「コンピュータ可読媒体」という用語は、コンピュータによってアクセス可能なデータを記憶するために使用される任意の記憶デバイス、ならびにコンピュータによるデータへのアクセスを提供するための任意の他の手段を意味し得る。記憶デバイス型のコンピュータ可読媒体の例には、磁気ハードディスク、フロッピーディスク、ＣＤ－ＲＯＭおよびＤＶＤ等の光学ディスク、磁気テープ、メモリチップが挙げられる。

【０１１０】

「コンピュータシステム」という用語は、コンピュータを有するシステムを意味し得、コンピュータは、そのコンピュータを動作させるためのソフトウェアを具現化するコンピュータ可読媒体を備える。

【０１１１】

「ソフトウェア」という用語は、本明細書において、「プログラム」と互換的に使用され、コンピュータを操作するための規定の規則を指す。ソフトウェアの例には、ソフトウェア、コードセグメント、命令、コンピュータプログラム、およびプログラムされた論理が含まれる。

【０１１２】

コンピュータ可読記憶媒体は、コンピュータによってアクセスすることができる任意の利用可能な有形媒体であり得る。コンピュータ可読記憶媒体には、コンピュータ可読命令、データ構造、プログラムモジュール、または他のデータ等の情報の記憶のための、任意の方法または技術で実現される、揮発性および不揮発性の取り外し可能または固定型の有形媒体が含まれる。コンピュータ可読記憶媒体には、限定されないが、ＲＡＭ（ランダムアクセスメモリ）、ＲＯＭ（読み出し専用メモリ）、ＥＰＲＯＭ（消去可能なプログラム可能読み出し専用メモリ）、ＥＥＰＲＯＭ（電気的に消去可能なプログラム可能読み出し専用メモリ）、フラッシュメモリ、もしくは他のメモリ技術、ＣＤ－ＲＯＭ（コンパクトディスク読み出し専用メモリ）、ＤＶＤ（デジタル多用途ディスク）、もしくは他の光学記憶媒体、磁気カセット、磁気テープ、磁気ディスク記憶装置、もしくは他の磁気記憶媒体、他の種類の揮発性および不揮発性メモリ、ならびに所望される情報を記憶することができ、前述のものの任意の好適な組み合わせを含む、コンピュータによってアクセス可能な任意の他の有形媒体が含まれる。

【０１１３】

１つ以上のコンピュータ可読媒体で具現化されるコンピュータ可読データは、例えば、コンピュータによって実行された結果として、本明細書に記載の１つ以上の機能、ならびに／またはその種々の実施形態、変化形、および組み合わせを実行するようにコンピュータに命令する、１つ以上のプログラムの一部として、命令を定義することができる。このような命令は、複数のプログラミング言語のうちの任意のもの、例えば、Ｊａｖａ、Ｊ＃、Ｖｉｓｕａｌ　Ｂａｓｉｃ、Ｃ、Ｃ＃、Ｃ＋＋、Ｆｏｒｔｒａｎ、Ｐａｓｃａｌ、Ｅｉｆｆｅｌ、Ｂａｓｉｃ、ＣＯＢＯＬ、アセンブリ言語等、またはその種々の組み合わせのうちの任意のもので記述することができる。このような命令が具現化されるコンピュータ可読媒体は、本明細書に記載のシステムもしくはコンピュータ可読記憶媒体のいずれかの構成要素のうちの１つ以上に存在し得るか、またはこのような構成要素の１つ以上にわた

って分散されてもよい。

【０１１４】

コンピュータ可読媒体は、その上に記憶された命令を、任意のコンピュータ資源に取り込んで、本明細書に論じられる本発明の態様を実現するように、移動可能であってもよい。さらに、上述のコンピュータ可読媒体上に記憶された命令は、ホストコンピュータ上で動作するアプリケーションプログラムの一部として具現化される命令に限定されないことを理解されたい。むしろ、命令は、本発明の態様を実現するためにコンピュータをプログラムするのに採用可能な任意の種類のコンピュータコード（例えば、ソフトウェアまたはマイクロコード）として具現化することができる。コンピュータ実行可能命令は、好適なコンピュータ言語または複数の言語の組み合わせで記述することができる。基本的なコンピュータ生物学の方法は、当業者に既知であり、例えば、Ｓｅｔｕｂａｌ ａｎｄ Ｍｅｉｄａｎｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｍｅｔｈｏｄｓ（ＰＷＳ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｂｏｓｔｏｎ，１９９７）、Ｓａｌｚｂｅｒｇ，Ｓｅａｒｌｅｓ，Ｋａｓｉｆ，（Ｅｄ．），Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，１９９８）、Ｒａｓｈｉｄｉ ａｎｄ Ｂｕｅｈｌｅｒ，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ Ｂａｓｉｃｓ：Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｏｎｄｏｎ，２０００）、およびＯｕｅｌｅｔｔｅ ａｎｄ Ｂｚｅｖａｎｉｓ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｆｏｒ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｇｅｎｅ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ（Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，２ｎｄ ｅｄ．，２００１）に記載されている。

【０１１５】

本発明の実施形態は、コンピュータ可読媒体上に記録されたコンピュータ実行可能命令によって定義され、実行されるとコンピュータに方法ステップを実行させる、機能モジュールを通じて説明することができる。モジュールは、明確さの目的で、機能により分別される。しかしながら、モジュール／システムは、別々のブロックのコードに対応する必要はなく、記載の機能は、種々の媒体に記憶され、種々の時点で実行される、種々のコード部分を実行することによって行われてもよいことを理解されたい。さらに、モジュールは、他の機能を実行することができ、したがって、モジュールは、任意の特定の機能または機能のセットを有することに限定されないことを理解されたい。

【０１１６】

本発明のある特定の実施形態の機能モジュールは、最低限、判定モジュール、記憶モジュール、計算モジュール、および表示モジュールを含む。機能モジュールは、１つもしくは複数のコンピュータ上で、または１つもしくは複数のコンピュータネットワークの使用によって、実行することができる。判定モジュールは、例えば、発現産物のレベルを提供するためのコンピュータ実行可能命令をコンピュータ可読形式で有する。

【０１１７】

判定モジュールは、アッセイから導かれた信号を検出し、本明細書に上述のように、ＶＤＢＰポリペプチド、アルブミンポリペプチド、バイオアベイラブルビタミンＤ、遊離ビタミンＤ、または総ビタミンＤのうちの任意のもののレベルを判定するための、任意のシステムを備え得る。いくつかの実施形態において、このようなシステムは、装置、例えば、本明細書に記載のように、ポリペプチドの定量的測定のためのＡＵ２７００（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ Ｂｒｅａ，ＣＡ）を含んでもよい。別の実施形態において、判定モジュールは、ポリペプチドの定量的測定（例えば、染料に基づく測光分析法または定量的ＥＬＩＳＡ）およびビタミンＤの測定のための質量分析システム等、異なる機能のための複数のユニットを備えてもよい。一実施形態において、判定モジュールは、本明細書の別の部分に記載の方法、例えば、アルブミンのための染料に基づく測光分析法、ＶＤＢＰポリペプチドレベルのためのＥＬＩＳＡアッセイ、またはビタミンＤレベルの判定のための質量分析法を実行するように構成されてもよい。いくつかの実施形態において、この

ようなシステムは、装置、例えばＡＵ２７００（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｂｒｅａ，ＣＡ）を含んでもよい。

【０１１８】

いくつかの実施形態において、判定システムまたはさらなるモジュールは、全血試料の処理、例えば、本明細書に記載のアッセイで使用するために、全血からの血清の分離を行うように、構成することができる。

【０１１９】

判定システムで判定された情報は、記憶モジュールによって読み出すことができる。本明細書に使用される際、「記憶モジュール」は、データまたは情報を記憶するように構成または適合される、任意の好適な計算もしくは処理装置または他のデバイスを含むことを意図する。本発明での使用に好適な電子装置の例には、独立型計算装置、ローカルエリアネットワーク（ＬＡＮ）、広域ネットワーク（ＷＡＮ）、インターネット、イントラネット、およびエクストラネットを含むデータ遠隔通信ネットワーク、ならびにローカルおよび分散コンピュータ処理システムが含まれる。記憶モジュールには、限定されないが、フロッピーディスク、ハードディスク記憶媒体、磁気テープ等の磁気記憶媒体、ＣＤ－ＲＯＭ、ＤＶＤ等の光学記憶媒体、ＲＡＭ、ＲＯＭ、ＥＰＲＯＭ、ＥＥＰＲＯＭ等の電子記憶媒体、汎用ハードディスク、および磁気／光学記憶媒体等のこれらのカテゴリのハイブリッドもまた含まれる。記憶モジュールは、例えば、試料名、アッセイされた生体分子、および前記生体分子のレベルをその上に記録するように適合または構成される。このような情報は、例えば、インターネットを介して、ディスケット上で、ＵＳＢ（ユニバーサルシリアルバス）を介して、または任意の他の好適な通信形式を介して、電子的に送信および読み出し可能なデジタル形式で提供され得る。

【０１２０】

本明細書に使用される際、「記憶される」とは、記憶モジュールに情報をエンコードするプロセスを指す。当業者であれば、既知の媒体に情報を記録し、式レベルの情報を含む結果を生成する、現在既知の方法のいずれをも、容易に採用することができる。

【０１２１】

本明細書に記載のシステムのいずれかのいくつかの実施形態において、記憶モジュールは、判定モジュールからの出力データを記憶する。さらなる実施形態において、記憶モジュールは、健常対象および／または健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベル等の基準情報を記憶する。

【０１２２】

「計算モジュール」は、バイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルを計算するための種々の利用可能なソフトウェアプログラムおよび形式を使用することができる。このようなアルゴリズムは、当該技術分野で十分に確立されている。当業者は、試料の寸法および質、ならびにデータの種類に基づいて、適正なアルゴリズムを容易に判定することができる。データ分析ツールおよび本明細書に記載の方程式を、本発明の計算モジュールに実装することができる。一実施形態において、計算モジュールは、本明細書に記載のように対象から得られた血液試料中のバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルを、健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤの平均値と比較する、比較モジュールをさらに備える（図７）。例として、対象から得られた血液試料中のバイオアベイラブルビタミンＤの値を測定する場合、比較モジュールは、出力データを、健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤの平均値と比較または照合することができる。ある特定の実施形態において、健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤの平均値を、記憶モジュールに事前に記憶させてもよい。比較または照合プロセス中に、比較モジュールは、対象から得られた血液試料中のバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルが、健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤの平均値の２５％を下回るかどうかを判定することができる。種々の実施形態において、比較モジュールは、比較目的で、既存の市販利用可能または自由に利用可能なソフトウェアを使用するよ

うに構成することができ、実行される特定のデータ比較用に最適化することができる。
【０１２３】
計算および／もしくは比較モジュール、または本発明の任意の他のモジュールは、リレーショナルデータベース管理システム、Ｗｏｒｌｄ Ｗｉｄｅ Ｗｅｂアプリケーション、およびＷｏｒｌｄ Ｗｉｄｅ Ｗｅｂサーバがその上で動作する、オペレーティングシステム（例えば、ＵＮＩＸ）を含んでもよい。Ｗｏｒｌｄ Ｗｉｄｅ Ｗｅｂアプリケーションは、データベース言語ステートメント（例えば、Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｄ Ｑｕｅｒｙ Ｌａｎｇｕａｇｅ（ＳＱＬ）ステートメント）の生成に必要な実行可能コードを含む。一般的に、実行ファイルは、埋め込まれたＳＱＬステートメントを含むことになる。さらに、Ｗｏｒｌｄ Ｗｉｄｅ Ｗｅｂアプリケーションは、サーバを含む種々のソフトウェア実体、ならびにユーザの要求にサービスするためにアクセスする必要のある種々の外部および内部データベースに対するポインタおよびアドレスを含む、構成ファイルを含み得る。構成ファイルはまた、サーバが２つ以上の別個のコンピュータにわたって分散されている時に必要であり得るように、サーバ資源の要求を、適正なハードウェアに向ける。一実施形態において、Ｗｏｒｌｄ Ｗｉｄｅ Ｗｅｂサーバは、ＴＣＰ／ＩＰプロトコルに対応する。このようなローカルネットワークは、しばしば、「イントラネット」と称される。このようなイントラネットの利点は、Ｗｏｒｌｄ Ｗｉｄｅ Ｗｅｂ上に存在するパブリックドメインのデータベース（例えば、ＧｅｎＢａｎｋまたはＳｗｉｓｓ Ｐｒｏ Ｗｏｒｌｄ Ｗｉｄｅ Ｗｅｂサイト）との容易な通信を可能にすることである。いくつかの実施形態において、ユーザは、ＷｅｂブラウザおよびＷｅｂサーバによって提供されるＨＴＭＬインターフェースを使用して、（例えば、ハイパーテキストリンクを介して）インターネットデータベース上のデータに直接アクセスすることができる（図８）。
【０１２４】
計算および／または比較モジュールは、定義済みの基準またはユーザによって定義される基準により、コンピュータ可読形式で処理することが可能なコンピュータ可読比較結果を提供し、その比較結果に部分的に基づいて、記憶し、ユーザによる要求に応じて、出力モジュール、例えば、表示モジュールを使用して出力することができる、内容を提供する。
【０１２５】
いくつかの実施形態において、表示モジュールに表示される内容は、対象から得られた血液試料中のバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルであり得る。いくつかの実施形態において、表示モジュールに表示される内容は、健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤの平均レベルと比較した、対象から得られた血液試料中のバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤの相対レベルであってもよい。いくつかの実施形態において、表示モジュールに表示される内容は、対象から得られた血液試料中のバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルが、健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤの平均値の２５％を下回るかまたは上回るかを示し得る。いくつかの実施形態において、表示モジュールに表示される内容は、対象がビタミンＤレベルの欠乏を有するかどうかを示し得る。いくつかの実施形態において、表示モジュールに表示される内容は、対象がビタミンＤ欠乏症の治療を必要とするかどうかを示すことができる。いくつかの実施形態において、表示モジュールに表示される内容は、対象のビタミンＤ関連疾患を有するかまたは発症する危険性または可能性の増加を示すことができる。いくつかの実施形態において、表示モジュールに表示される内容は、これらの危険性または可能性のうちの１つを示す数値であり得る。そのような実施形態において、可能性は、パーセンテージまたは分数で表すことができる。例えば、より高いパーセンテージまたは１に近い分数は、対象がビタミンＤ関連疾患を有する可能性がより高いことを示す。いくつかの実施形態において、表示モジュールに表示される内容は、危険性または可能性を定性的に示す、単語または表現であってもよい。例えば、「可能性が低い（ｕｎｌｉｋｅｌｙ）」という単語を使用して、ビタミンＤ関連疾患を有するかまたはそれを発症する危険性が低いことを示すことができ、

一方で「可能性が高い（ｌｉｋｅｌｙ）」という単語を使用して、ビタミンＤ関連疾患を有するかまたはそれを発症する危険性が高いことを示すことができる。

【０１２６】

本発明の一実施形態において、計算および／または比較の結果に基づく内容は、コンピュータのモニタに表示される。本発明の一実施形態において、計算および／または比較の結果に基づく内容は、印刷可能媒体を介して表示される。表示モジュールは、コンピュータ可読情報をコンピュータから受け取り、それをユーザに表示するように構成される、任意の好適なデバイスであり得る。非限定的な例には、例えば、Ｉｎｔｅｌ ＰＥＮＴＩＵＭタイプのプロセッサ、Ｍｏｔｏｒｏｌａ ＰｏｗｅｒＰＣ、Ｓｕｎ ＵｌｔｒａＳＰＡＲＣ、Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ ＰＡ－ＲＩＳＣプロセッサ、Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣａｌｉｆｏｒｎｉａのＡｄｖａｎｃｅｄ Ｍｉｃｒｏ Ｄｅｖｉｃｅｓ（ＡＭＤ）から入手可能な種々のプロセッサの任意のもの、または任意の他の種類のプロセッサに基づくもの等の汎用コンピュータ、フラットパネルディスプレイ、陰極線管等の視覚的表示デバイス、ならびに様々な種類のコンピュータプリンタが含まれる。

【０１２７】

一実施形態において、Ｗｏｒｌｄ Ｗｉｄｅ Ｗｅｂブラウザを使用して、計算／比較結果に基づく内容の表示もためのユーザインターフェースを提供する。本発明の他のモジュールはウェブブラウザインターフェースを有するように適合可能であることを理解されたい。ウェブブラウザを通じて、ユーザは、計算／比較モジュールからデータを取り出すための要求を構築することができる。したがって、ユーザは、典型的に、グラフィカルユーザインターフェースに従来的に採用される、ボタン、プルダウンメニュー、スクロールバー等のユーザインターフェース要素を、ポイントおよびクリックすることになる。

【０１２８】

いくつかの実施形態において、システムは、対象から得られた血液試料中に存在すると判定された、ＶＤＢＰポリペプチド、アルブミンポリペプチド、および総ビタミンＤのうちの１つ以上のレベルの値を入力する手段をさらに備える。非限定的な例として、アルブミンポリペプチドのレベルを、システムの判定モジュールによって判定することができ、その一方、ＶＤＢＰポリペプチドのレベルは、本明細書に記載のシステムとは別個に行われるＥＬＩＳＡアッセイによって判定することができる。ＶＤＢＰポリペプチドのレベルを判定すると、このレベル値を、システムの計算モジュールに入力し、それを使用して、対象から得られた血液試料中のバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルを判定することができる。いくつかの実施形態において、入力手段は、ユーザが計算モジュールによって許容される値を打ち込むことを可能にする、キーボードまたはタッチスクリーンを含む。

【０１２９】

本明細書に記載のシステムおよびコンピュータ可読媒体は、対象から得られた血液試料中のバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルを判定するための、本発明の単なる例示的な実施形態であり、したがって、本発明の範囲を制限するように意図するものではない。本明細書に記載のシステムおよびコンピュータ可読媒体の変形が可能であり、本発明の範囲内に含まれる。

【０１３０】

マシンのモジュール、またはコンピュータ可読媒体に使用されるものは、多数の構成をとることができる。例えば、機能は、単一のマシンに提供されてもよく、または複数のマシンにわたって分散されてもよい。

【０１３１】

本開示の実施形態の説明は、包括的であるようにも、開示された正確な形態に本開示を限定するようにも意図するものではない。本開示の特定の実施形態およびその例は、例示目的で本明細書に記載されるが、当業者には理解されるように、種々の同等な修正が本開示の範囲内で可能である。例えば、方法ステップまたは機能は、所定の順序で提示されるが、代替的な実施形態は、異なる順序で実行してもよく、または機能は、実質的に同時に

実行されてもよい。本明細書に提供される本開示の教示は、必要に応じて、他の手順または方法に適用することができる。本明細書に記載の種々の実施形態を組み合わせて、さらなる実施形態を提供することができる。必要であれば、本開示の態様を修正し、上述の参照および適用の組成物、機能、および概念を採用して、本開示のなおもさらなる実施形態を提供することができる。発明を実施するための形態を踏まえて、これらおよび他の変更を本開示に行うことができる。

【０１３２】

上述の実施形態のいずれの特定の要素も、他の実施形態の要素に組み合わせるか、またはそれと置き換えることができる。さらに、本開示のある特定の実施形態と関連する利点を、これらの実施形態との関係において記載してきたが、他の実施形態もまた、このような利点を呈し得、全ての実施形態がこのような利点を呈して本開示の範囲内に含まれるわけではない。

【０１３３】

特定される全ての特許および他の印刷物は、例えば、本発明に関連して使用され得るこのような出版物に記載される方法を、説明および開示する目的で、参照により明確に本明細書に組み込まれる。これらの出版物は、単に、本出願の出願日以前のそれらの開示を提供するものである。この点に関して、先行発明の効力または何らかの他の理由のために、このような開示に先行する権利を有さないという判定として解釈されるべきものは存在しない。これらの文書の全ての日付に関する提示または内容に関する表示は、出願者らが入手できる情報に基づくものであり、これらの文書の日付または内容の正確性に関するいかなる承認をも構成するものではない。

【０１３４】

決して制限として解釈されるものではない以下の実施例によって、本発明をさらに例示する。

【０１３５】

本発明のいくつかの実施形態は、以下の番号が付けられた段落のいずれかとして定義することができる。

１．　対象から得られた血液試料を分析して、ＶＤＢＰ（ビタミンＤ結合タンパク質）ポリペプチド、アルブミンポリペプチド、および総ビタミンＤのレベルを判定することを含み、

バイオアベイラブルビタミンＤのレベルは、

＝（K_{alb}＊［Ａｌｂ］＋１）＊［遊離ビタミンＤ］

であり、遊離ビタミンＤのレベルは、

＝｛－｛K_{DBP}・［総ＤＢＰ］－K_{DBP}・［総ビタミンＤ］＋K_{alb}・［Ａｌｂ］＋１｝＋√｛（K_{DBP}・［総ＤＢＰ］－K_{DBP}・［総ビタミンＤ］＋K_{alb}・［Ａｌｂ］＋１）^{2}＋４・（K_{DBP}・K_{alb}・［Ａｌｂ］＋K_{DBP}）・（［総ビタミンＤ］）｝｝÷（２・｛K_{DBP}・K_{alb}・［Ａｌｂ］＋K_{DBP}｝）

である、アッセイ。

２．　健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤの平均値の２５％を下回るバイオアベイラブルビタミンＤのレベルは、対象がビタミンＤ欠乏症を有することを示す、段落１に記載のアッセイ。

３．　ビタミンＤは、

２５－ヒドロキシビタミンＤおよび１，２５－ジヒドロキシビタミンＤからなる群から選択される、段落１または２のいずれかに記載のアッセイ。

４．　ＶＤＢＰポリペプチドまたはアルブミンポリペプチドのレベルの判定は、

酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、染料結合免疫吸着法、免疫濁度法、免疫比濁法、染料に基づく測光分析法、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、放射免疫分析法（ＲＩＡ）、放射免疫測量法、免疫蛍光測定法、および質量分析法からなる群から選択される方法の使用を含む、段落１

～３のいずれかに記載のアッセイ。

５．　総ビタミンＤレベルの判定は、

放射免疫測定法、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法、酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、および高圧液体クロマトグラフィーからなる群から選択される方法の使用を含む、段落１～４のいずれかに記載のアッセイ。

６．　ビタミンＤの欠乏は、

骨密度の低下、骨塩量の低下、骨折、骨吸収、くる病、嚢胞性線維性骨炎、骨性線維形成不全症、骨硬化症、骨粗鬆症、骨軟化症、副甲状腺ホルモンレベルの上昇、副甲状腺過形成、二次性副甲状腺機能亢進症、低カルシウム血症、感染症、癌、乾癬、心血管疾患、腎性骨ジストロフィー、腎疾患、末期腎疾患、慢性腎臓疾患、慢性腎臓疾患に伴う骨ミネラル代謝異常、骨外性石灰化、肥満症、アレルギー、喘息、多発性硬化症、筋力低下、リウマチ性関節炎、および糖尿病からなる群から選択される症状の危険性の増加を示す、段落１～５のいずれかに記載のアッセイ。

７．　ビタミンＤ欠乏症を有すると判定された対象に、ビタミンＤ欠乏症の治療を施すステップをさらに含む、段落１～６のいずれかに記載のアッセイ。

８．　治療は、

カルシトリオール、ジヒドロタキステロール、ドキセルカルシフェロール、パリカルシトール、コレカルシフェロール、およびエルゴカルシフェロールからなる群から選択される化合物を投与することを含む、段落１～７のいずれかに記載のアッセイ。

９．　対象から得られた血液試料を分析して、ＶＤＢＰポリペプチド、アルブミンポリペプチド、および総ビタミンＤのレベルを判定することを含み、

遊離ビタミンＤのレベルは、

$$= \{ - \{ K_{DBP} \cdot [\text{総DBP}] - K_{DBP} \cdot [\text{総ビタミンD}] + K_{alb} \cdot [\text{Alb}] + 1 \} + \sqrt{ \{ (K_{DBP} \cdot [\text{総DBP}] - K_{DBP} \cdot [\text{総ビタミンD}] + K_{alb} \cdot [\text{Alb}] + 1)^2 + 4 \cdot (K_{DBP} \cdot K_{alb} \cdot [\text{Alb}] + K_{DBP}) \cdot ([\text{総ビタミンD}]) \} \} \div (2 \cdot \{ K_{DBP} \cdot K_{alb} \cdot [\text{Alb}] + K_{DBP} \})$$

である、アッセイ。

１０．　健常対象集団における遊離ビタミンＤの平均値の２５％を下回る遊離ビタミンＤレベルは、対象がビタミンＤ欠乏症を有することを示す、段落９に記載のアッセイ。

１１．　ビタミンＤは、

２５－ヒドロキシビタミンＤおよび１，２５－ジヒドロキシビタミンＤからなる群から選択される、段落９または１０のいずれかに記載のアッセイ。

１２．　ＶＤＢＰポリペプチドまたはアルブミンポリペプチドのレベルの判定は、

酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、染料結合免疫吸着法、免疫濁度法、免疫比濁法、染料に基づく測光分析法、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、放射免疫分析法（ＲＩＡ）、放射免疫測量法、免疫蛍光測定法、および質量分析法からなる群から選択される方法の使用を含む、段落９～１１のいずれかに記載のアッセイ。

１３．　総ビタミンＤレベルの判定は、

放射免疫測定法、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法、酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、および高圧液体クロマトグラフィーからなる群から選択される方法の使用を含む、段落９～１２のいずれかに記載のアッセイ。

１４．　ビタミンＤの欠乏は、

骨密度の低下、骨塩量の低下、骨折、骨吸収、くる病、嚢胞性線維性骨炎、骨性線維形成不全症、骨硬化症、骨粗鬆症、骨軟化症、副甲状腺ホルモンレベルの上昇、副甲状腺過形成、二次性副甲状腺機能亢進症、低カルシウム血症、感染症、癌、乾癬、心

血管疾患、腎性骨ジストロフィー、腎疾患、末期腎疾患、慢性腎臓疾患、慢性腎臓疾患に伴う骨ミネラル代謝異常、骨外性石灰化、肥満症、アレルギー、喘息、多発性硬化症、筋力低下、リウマチ性関節炎、および糖尿病からなる群から選択される症状の危険性の増加を示す、段落９～１３のいずれかに記載のアッセイ。

１５．　ビタミンＤ欠乏症を有すると判定された対象に、ビタミンＤ欠乏症の治療を施すステップをさらに含む、段落９～１４のいずれかに記載のアッセイ。

１６．　治療は、

カルシトリオール、ジヒドロタキステロール、ドキセルカルシフェロール、パリカルシトール、コレカルシフェロール、およびエルゴカルシフェロールからなる群から選択される化合物を投与することを含む、段落９～１５のいずれかに記載のアッセイ。

１７．　対象におけるビタミンＤ欠乏症を治療するための方法であって、対象から得られた血液試料中のＶＤＢＰポリペプチド、アルブミンポリペプチド、および総ビタミンＤのレベルを検出することであって、

バイオアベイラブルビタミンＤのレベルは、

$=(K_{alb} * [Alb] + 1) * [\text{遊離ビタミンD}]$

であり、遊離ビタミンＤのレベルは、

$$= \{-\{K_{DBP} \cdot [\text{総DBP}] - K_{DBP} \cdot [\text{総ビタミンD}] + K_{alb} \cdot [Alb] + 1\} + \sqrt{\{(K_{DBP} \cdot [\text{総DBP}] - K_{DBP} \cdot [\text{総ビタミンD}] + K_{alb} \cdot [Alb] + 1)^2 + 4 \cdot (K_{DBP} \cdot K_{alb} \cdot [Alb] + K_{DBP}) \cdot ([\text{総ビタミンD}])\}\} \div (2 \cdot \{K_{DBP} \cdot K_{alb} \cdot [Alb] + K_{DBP}\})$$

であることと、バイオアベイラブルビタミンＤのレベルが、健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤの平均値の２５％を下回る場合に、対象にビタミンＤ欠乏症の治療を施すことと、を含む、方法。

１８．　対象におけるビタミンＤ欠乏症を治療するための方法であって、対象から得られた血液試料中のＶＤＢＰポリペプチド、アルブミンポリペプチド、および総ビタミンＤのレベルを検出することであって、

遊離ビタミンＤのレベルは、

$$= \{-\{K_{DBP} \cdot [\text{総DBP}] - K_{DBP} \cdot [\text{総ビタミンD}] + K_{alb} \cdot [Alb] + 1\} + \sqrt{\{(K_{DBP} \cdot [\text{総DBP}] - K_{DBP} \cdot [\text{総ビタミンD}] + K_{alb} \cdot [Alb] + 1)^2 + 4 \cdot (K_{DBP} \cdot K_{alb} \cdot [Alb] + K_{DBP}) \cdot ([\text{総ビタミンD}])\}\} \div (2 \cdot \{K_{DBP} \cdot K_{alb} \cdot [Alb] + K_{DBP}\})$$

であることと、遊離ビタミンＤのレベルが、健常対象集団における遊離ビタミンＤの平均値の２５％を下回る場合に、対象にビタミンＤ欠乏症の治療を施すことと、を含む、方法。

１９．　少なくとも１つの対象から得られた少なくとも１つの血液試料からデータを取得するためのシステムであって、

少なくとも１つの血液試料を受け取り、少なくとも１つの血液試料に少なくとも１つの分析を行って、試料中のバイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルを判定するように構成される、判定モジュールと、

前記判定モジュールから出力されたデータを記憶するように構成される、記憶デバイスと、

部分的に、前記判定モジュールから出力されたデータに基づいて、内容を表示するための表示モジュールと、を備え、内容は、バイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルを示す信号を含む、システム。

２０．　試験試料中に存在すると判定されたＶＤＢＰポリペプチド、アルブミンポリペプチド、および総ビタミンＤのうちの１つ以上のレベルの値を入力する手段をさらに備える、段落１９に記載のシステム。

２１．　前記表示モジュール上に表示される内容は、バイオアベイラブルビタミンＤまたは遊離ビタミンＤのレベルが、健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤ

の平均値の２５％を下回ることが判定された場合に、対象のビタミンＤ欠乏症の可能性の増加を示す信号をさらに含む、段落１９または２０のいずれかに記載のシステム。

２２．　前記表示モジュールに表示される内容は、対象がビタミンＤ欠乏症の治療を受けることを推奨されることを示す信号をさらに含む、段落１９～２１のいずれかに記載のシステム。

２３．　対象から得られた血液試料を分析して、遊離ビタミンＤまたはバイオアベイラブルビタミンＤのレベルを判定することであって、

健常対象集団における遊離ビタミンＤまたはバイオアベイラブルビタミンＤの平均値の２５％を下回る、遊離ビタミンＤまたはバイオアベイラブルビタミンＤのレベルは、対象がビタミンＤ欠乏症を有することを示すことと、

ビタミンＤ欠乏症を有すると判定された対象に、ビタミンＤ欠乏症の治療を施すことと、を含む、治療方法。

２４．　ビタミンＤは、

２５－ヒドロキシビタミンＤおよび１，２５－ジヒドロキシビタミンＤからなる群から選択される、段落２３に記載の方法。

２５．　遊離ビタミンＤまたはバイオアベイラブルビタミンＤのレベルの判定は、

免疫測定法、抗体捕捉による二段階免疫測定法、固定化抗体および競合的検出による一段階免疫測定法、固定化競合物質および標識抗体による一段階免疫測定法、蛍光偏光免疫測定法、示差沈降法（免疫沈降法、親和性沈降法）、免疫除去法、および親和性結合クロマトグラフィーからなる群から選択される方法、ならびに

放射免疫測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、染料結合免疫吸着法、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法、および高圧液体クロマトグラフィーからなる群から選択される方法の使用を含む、段落２３または２４のいずれかに記載の方法。

２６．　ビタミンＤの欠乏は、

骨密度の低下、骨塩量の低下、骨折、骨吸収、くる病、嚢胞性線維性骨炎、骨性線維形成不全症、骨硬化症、骨粗鬆症、骨軟化症、副甲状腺ホルモンレベルの上昇、副甲状腺過形成、二次性副甲状腺機能亢進症、低カルシウム血症、感染症、癌、乾癬、心血管疾患、腎性骨ジストロフィー、腎疾患、末期腎疾患、慢性腎臓疾患、慢性腎臓疾患に伴う骨ミネラル代謝異常、骨外性石灰化、肥満症、アレルギー、喘息、多発性硬化症、筋力低下、リウマチ性関節炎、および糖尿病からなる群から選択される症状の危険性の増加を示す、段落２３～２５のいずれかに記載の方法。

２７．　治療は、

カルシトリオール、ジヒドロタキステロール、ドキセルカルシフェロール、パリカルシトール、コレカルシフェロール、およびエルゴカルシフェロールからなる群から選択される化合物を投与することを含む、段落２３～２６のいずれかに記載の方法。

２８．　対象から得られた血液試料を分析して、遊離ビタミンＤおよびアルブミンポリペプチドのレベルを判定することを含み、

バイオアベイラブルビタミンＤのレベルは、

＝（K_{alb}＊［Ａｌｂ］＋１）＊［遊離ビタミンＤ］

である、アッセイ。

２９．　健常対象集団におけるバイオアベイラブルビタミンＤの平均値の２５％を下回るバイオアベイラブルビタミンＤのレベルは、対象がビタミンＤ欠乏症を有することを示す、段落２８に記載のアッセイ。

３０．　ビタミンＤは、

２５－ヒドロキシビタミンＤおよび１，２５－ジヒドロキシビタミンＤからなる群から選択される、段落２８または２９のいずれかに記載のアッセイ。

３１．　アルブミンポリペプチドのレベルの判定は、

酵素結合免疫吸着測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、

蛍光免疫吸着法、染料結合免疫吸着法、免疫濁度法、免疫比濁法、染料に基づく測光分析法、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、放射免疫分析法（ＲＩＡ）、放射免疫測量法、免疫蛍光測定法、および質量分析法からなる群から選択される方法の使用を含む、段落２８～３０のいずれかに記載のアッセイ。

３２．　遊離ビタミンＤレベルの判定は、

免疫測定法、抗体捕捉による二段階免疫測定法、固定化抗体および競合的検出による一段階免疫測定法、固定化競合物質および標識抗体による一段階免疫測定法、蛍光偏光免疫測定法、示差沈降法（免疫沈降法、親和性沈降法）、免疫除去法、および親和性結合クロマトグラフィーからなる群から選択される方法、ならびに

放射免疫測定法、化学発光免疫吸着法、電気化学発光免疫吸着法、蛍光免疫吸着法、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法、および高圧液体クロマトグラフィーからなる群から選択される方法の使用を含む、段落２８～３１のいずれかに記載のアッセイ。

３３．　ビタミンＤの欠乏は、

骨密度の低下、骨塩量の低下、骨折、骨吸収、くる病、嚢胞性線維性骨炎、骨性線維形成不全症、骨硬化症、骨粗鬆症、骨軟化症、副甲状腺ホルモンレベルの上昇、副甲状腺過形成、二次性副甲状腺機能亢進症、低カルシウム血症、感染症、癌、乾癬、心血管疾患、腎性骨ジストロフィー、腎疾患、末期腎疾患、慢性腎臓疾患、慢性腎臓疾患に伴う骨ミネラル代謝異常、骨外性石灰化、肥満症、アレルギー、喘息、多発性硬化症、筋力低下、リウマチ性関節炎、および糖尿病からなる群から選択される症状の危険性の増加を示す、段落２８～３２のいずれかに記載のアッセイ。

３４．　ビタミンＤ欠乏症を有すると判定された対象に、ビタミンＤ欠乏症の治療を施すステップをさらに含む、段落２８～３３のいずれかに記載のアッセイ。

３５．　治療は、

カルシトリオール、ジヒドロタキステロール、ドキセルカルシフェロール、パリカルシトール、コレカルシフェロール、およびエルゴカルシフェロールからなる群から選択される化合物を投与することを含む、段落２８～３４のいずれかに記載のアッセイ。

【実施例】

【０１３６】

実施例１：バイオアベイラブルビタミンＤおよび骨塩量

総循環２５－ヒドロキシビタミンＤ（２５（ＯＨ）Ｄ）レベルと骨塩量（ＢＭＤ）との間の関係を試験する研究は、入り混じった結果をもたらしている。２５（ＯＨ）Ｄの主要な担体タンパク質であるビタミンＤ結合タンパク質（ＤＢＰ）は、循環ビタミンＤの生物学的活性を変化させる可能性がある。総２５（ＯＨ）Ｄ、ＤＢＰ、および血清アルブミンのレベルから計算される遊離２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄが、総２５（ＯＨ）Ｄのレベルよりも強くＢＭＤと関連するという仮説の試験を本明細書に提示する。

【０１３７】

総２５（ＯＨ）Ｄ、ＤＢＰ、および血清アルブミンのレベルを、Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ Ａｂｎｏｒｍａｌｉｔｉｅｓ ｉｎ Ｃｏｌｌｅｇｅ－Ａｇｅｄ Ｓｔｕｄｅｎｔｓ（ＭＡＣＳ）の研究に登録された４９人の健康な若齢成人において測定した。腰椎のＢＭＤを、二重Ｘ線吸光光度分析法を使用して、全ての対象において測定した。臨床、食事、および研究室の情報もまた、この時点で収集した。遊離およびバイオアベイラブル（遊離＋アルブミン結合）２５（ＯＨ）Ｄを判定し、それらとＢＭＤとの関連性を試験した。

【０１３８】

ＢＭＤは、総２５（ＯＨ）Ｄのレベルと関連しなかった（ｒ＝０．１７２　ｐ＝０．２３６）。対照的に、遊離２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄのレベルは、ＢＭＤと正相関にあった（遊離についてはｒ＝０．４１３　ｐ＝０．００３、バイオアベイラブルについてはｒ＝０．４４１　ｐ＝０．００２）。バイオアベイラブル２５

（ＯＨ）Ｄのレベルは、年齢、性別、肥満度指数、および人種で調整した多変量回帰モデルにおいて、独立して、ＢＭＤとの関連を保った（ｐ＝０．０３）。遊離２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄは、総２５（ＯＨ）Ｄよりも強く、ＢＭＤと関連する。これらの発見は、ビタミンＤ欠損状態でのビタミンＤ補給に重要な意味を有する。

序

【０１３９】

ビタミンＤ欠乏症は、カルシウム吸収の低下および副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）レベルの上昇と関連し（１）、過剰な骨吸収につながり得る（２）。いくつかの観察研究では、より高い２５－ヒドロキシビタミンＤ（２５（ＯＨ）Ｄ）レベルは、増加した骨塩量（ＢＭＤ）および骨折の危険性の低下と関連している（３－７）。さらに、いくつかの無作為化対照試験は、ビタミンＤの補給が、骨折の危険性を減少させ、ＢＭＤを増加させることを示唆する（８－１４）。しかしながら、全ての観察研究が、２５－ヒドロキシビタミンＤ（２５（ＯＨ）Ｄ）とＢＭＤとの関係を、特に、より若齢の集団または少数派人種において、確認したわけではない（１５－１９）。さらに、いくつかの無作為化試験において、ビタミンＤ補給がＢＭＤまたは骨折の危険性に及ぼす効果は、中程度（８）、欠如（２０－２２）、または逆転（２３）であった。

【０１４０】

遊離ホルモンの仮説は、結合タンパク質から遊離したホルモンのみが、細胞に入り、生物学的作用をもたらすことを前提とする（２４）。２５（ＯＨ）Ｄおよび１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ（１，２５（ＯＨ）２Ｄ）は、ビタミンＤ結合タンパク質（８５～９０％）およびアルブミン（１０～１５％）に結合して循環し、その遊離形態にある循環ホルモンは１％未満である（２５）。マウスの場合、ビタミンＤ結合タンパク質（ＤＢＰ）は、２５（ＯＨ）Ｄの血清半減期を延長させ、ビタミンＤのレザーバーとして機能することによって、ビタミンＤ欠乏症を防ぐ（２６）。しかしながら、ＤＢＰはまた、マウスにおいて注射した１，２（ＯＨ）２Ｄの生物学的活性を制限し、インビトロで単球およびケラチノサイトへのビタミンＤの作用を阻害する（２７－２８）。ヒトにおけるビタミンＤの生物学的作用に関する循環ＤＢＰレベルの有意性は、不明である。

【０１４１】

２５（ＯＨ）Ｄの遊離分画、ならびに２５（ＯＨ）ＤのＤＢＰおよびアルブミンとの相互作用に対する結合親和性定数は、既に測定済みである（２９）。総２５（ＯＨ）Ｄ、ＤＢＰ、アルブミンの血清濃度に基づいて、遊離２５（ＯＨ）Ｄレベルの計算のための式がこのデータに基づいて作成された。遊離２５（ＯＨ）Ｄの測定値と計算値は、高く相関する（２９）。

材料および方法

【０１４２】

対象者の募集。断面研究を、大学生における代謝異常の有疾率を評価するように設計された研究である、Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ Ａｂｎｏｒｍａｌｉｔｉｅｓ ｉｎ Ｃｏｌｌｅｇｅ Ｓｔｕｄｅｎｔｓ研究（ＭＡＣＳ）に登録された健康な若齢成人のサブセットにおいて行った（３０）。対象は、ボストン地域の私立大学の健常な１８～３１歳の男女学生であった。１７０人の対象を、Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＭＩＴ）構内全体に掲示された広告を通じて、および無作為な学生集団メンバーに向けた電子メールを通じて、募集した。全ての対象者が、書面でインフォームドコンセントを提供した。この研究は、ＭＩＴ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ ｏｎ ｔｈｅ Ｕｓｅ ｏｆ Ｈｕｍａｎｓ ａｓ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｓｕｂｊｅｃｔｓによって承認された。４９人の対象者は、この分析に含むのに十分なサンプルであり、それらの特徴を、表１に示す。

【０１４３】

研究訪問。対象者に、外来患者としてＭＩＴ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｅｎｔｅｒに入る前に１２時間絶食するように指示し、血液試料の収集および種々の生理学的測定を含む、ベースライン評価を行った。構造化されたインタビューを、研究の看護師によって行い、標準的な臨床情報、１週間の運動時間（３０分単位の増加で）、および薬剤／栄養補助食品の使用を収集した。身長は、標準的な身長計（Ｈｏｌｔｏｎ Ｌｔｄ，Ｃｒｙｍｙｃｈ，Ｄｙｆｅｄ，ＵＫ）を使用して測定した。体重は、目盛り付きの体重計（ＳＥＣＡ，Ｈａｎｏｖｅｒ，Ｍａｒｙｌａｎｄ，ＵＳＡ）を使用して測定した。肥満度指数（ＢＭＩ）を、体重（ｋｇ）／［身長（ｍ）］^{2}として計算した。

【０１４４】

食事情報。対象者に、研究日の１週間前に、週末１日を含む丸４日の食物摂取を記録する、書面での食事記録を記入させた。ＭＩＴ ＣＲＣへの研究訪問の際に、登録栄養士が対象の食事記録を確認し、摂取した食物の量および源を明確にした。次に、食事摂取データを、Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｓｏｆｔｗａｒｅバージョン２００６／２００７（Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ Ｃｏｏｒｄｉｎａｔｉｎｇ Ｃｅｎｔｅｒ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｍｉｎｎｅｓｏｔａ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）用のＮｕｔｒｉｔｉｏｎ Ｄａｔａ Ｓｙｓｔｅｍを使用して分析した。

【０１４５】

骨密度の測定。対象者に、全身二重エネルギーＸ線吸光光度分析法（ＤＥＸＡ）（Ｈｏｌｏｇｉｃ ＱＤＲ－４５００Ａ；Ｈｏｌｏｇｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ）を行って、全身および局所のＢＭＤを判定した（３１）。Ｈｏｌｏｇｉｃ ｐｈａｎｔｏｍｓを使用して、装置の調整を行った。腰椎のＢＭＤを、ＢＭＤの尺度として本研究に使用した。腰椎のＢＭＤは、骨粗鬆症の診断および骨折の予測に好ましい部位である。寛骨のＢＭＤ測定値は利用可能ではなかった（３２－３３）。

【０１４６】

生化学的分析。ベースラインの血液試料を－８０℃で凍結させ、後の分析のために保存した。２５（ＯＨ）Ｄ、血清カルシウム、アルブミン、およびＰＴＨのレベルを、Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ Ｇｅｎｅｒａｌ Ｈｏｓｐｉｔａｌ（ＭＧＨ）の臨床検査室で測定した。２５（ＯＨ）Ｄ２および２５（ＯＨ）Ｄ３のレベルを、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（ＬＣ－ＭＳ）によって測定し、アッセイ間の変動係数は、２５（ＯＨ）$Ｄ_{2}$に対して９．１％および２５（ＯＨ）$Ｄ_{3}$に対して８．６％であった。総２５（ＯＨ）Ｄレベルを、２５（ＯＨ）$Ｄ_{2}$レベルと２５（ＯＨ）$Ｄ_{3}$レベルの合計として計算した。インタクトなＰＴＨを、Ｃｏｂａｓ Ｅ１６０自動化分析装置（Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）において、電気化学発光免疫測定法により測定した。インタクトなＰＴＨに対するアッセイ間の変動係数は、４．２％であった。カルシウムおよびアルブミンのレベルを、自動化分析装置において染料に基づく測光分析法によって測定した。ＤＢＰを、製造業者の説明書に従って、市販の酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ，Ｃａｔａｌｏｇ Ｎｕｍｂｅｒ ＤＶＤＢＰ０）によって、二重に測定した。アッセイは、Ｃａｌｉｂｒａｔｏｒ Ｄｉｌｕｅｎｔ ＲＤ６－１１（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ Ｐａｒｔ Ｎｕｍｂｅｒ ８９５４８９）において、血清試料を１：２，０００に希釈した後に行った。アッセイ間の変動係数は、４０μｇ／ｍｌの濃度で、８．５％であった。アッセイにより、２５～２００μｇ／ｍＬの内因性ビタミンＤ結合タンパク質を含有するヒト血清試料に添加した１００～２００μｇ／ｍＬ用量の外因性ビタミンＤ結合タンパク質の９３～１１０％を、回収した。製造業者は、ヒトアルブミン、ビタミンＤ３、またはαフェトプロテインとの有意な交差反応を報告していない。十分な血清が利用可能な患者のサブセット（Ｎ＝４５）において、総１，２５（ＯＨ）$_{2}$Ｄを、Ｍａｙｏ Ｃｌｉｎｉｃ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ，ＭＮ，ＵＳＡ）においてＬＣ－ＭＳ／ＭＳによって測定した。

【０１４７】

未結合２５（ＯＨ）Ｄの計算。遊離２５（ＯＨ）Ｄのレベルを、２つの方法を使用して

計算した。いずれの方法も、遠心限外濾過を使用して２５（ＯＨ）Ｄの遊離分画を判定する先行研究で測定された、アルブミンおよびＤＢＰと２５（ＯＨ）Ｄとの間の結合親和性定数を使用した（２９）。

【０１４８】

方法１：遊離２５（ＯＨ）Ｄのレベルを、次の方程式を使用して計算した（２９）。

【数１】

$$\text{遊離 25(OH)D} = \frac{\text{総 25(OH)D}}{1 + (6 \times 10^5 \times \text{アルブミン}) + (7 \times 10^8 \times DBP)}$$

この方程式を使用して計算した遊離２５（ＯＨ）Ｄと、遠心限外濾過によって測定した遊離２５（ＯＨ）Ｄとの間に報告された相関係数は、０．９２５であった（２９）。遊離１，２５（ＯＨ）Ｄのレベルもまた、この方法を使用して計算した（２５）。

【０１４９】

方法２：遊離、バイオアベイラブル、およびＤＢＰに結合した２５（ＯＨ）Ｄを、下記のこの実施例の付録１に記載の方程式を使用して計算した。これらの方法は、バイオアベイラブルホルモンを、遊離およびアルブミン結合の両方の分画として、すなわち、ＤＢＰ等の循環結合タンパク質に結合していない分画として定義する。

【０１５０】

いずれの計算方法も、同じ親和性結合定数を使用した。同じ総２５（ＯＨ）Ｄ、ＤＢＰ、およびアルブミンの測定値に適用すると、それらは、高く相関する遊離２５（ＯＨ）Ｄの計算値をもたらすが（スピアマンｒ＝１）、しかしながら、この方程式は、平均で１．４％高い値をもたらす（データは示されない）。この方程式はまた、遊離、バイオアベイラブル、およびＤＢＰ結合の２５（ＯＨ）Ｄの別個の計算を提供するため、方法２の手順を、次の２５（ＯＨ）Ｄレベルの分析に使用した。

【０１５１】

統計分析。対象の特徴は、別段の記載がない限り、平均±標準偏差として報告する。２５（ＯＨ）Ｄレベル、ＤＢＰレベル、ＢＭＤ、および食事カルシウム摂取レベルを含む非正規変量は、非対称分布を示し、パラメトリック統計技術の前提を満たすために、自然対数変換を行った。運動量は、１週間につき１２０分で二分した。ピアソンの相関係数を計算して、２５（ＯＨ）Ｄレベル、ＢＭＤ、および他の連続変数の間の関係を評価した。独立したサンプルのｔ検定を使用して、２５（ＯＨ）Ｄレベル、ＤＢＰレベル、およびＢＭＤを、人種、性別、運動量、および経口避妊薬の使用によって定義したサブグループ間で比較した。年齢、性別、ＢＭＩ、および人種を含む、骨密度に関連することが既に報告されている因子で調整した後、線形回帰分析を使用して、２５（ＯＨ）Ｄレベル、ＤＢＰ、およびＢＭＤの間の独立関係の存在について試験した（５，８，１２，３５－３６）。全ての分析は、ＳＴＡＴＡ　Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ（Ｃｏｌｌｅｇｅ　Ｓｔａｔｉｏｎ，ＴＸ）バージョン１１を使用して行った。両側ｐ値＜０．０５を、統計的に有意であると見なした。

【０１５２】

結果

【０１５３】

対象の特徴を表１に示す。ＤＢＰのレベルに、濃度が０．６６～１１．２μｍｏｌ／Ｌの範囲に及ぶ広範な変動があった。したがって、計算した遊離２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄのレベルは、広範に及んだ（表２）。総２５－ヒドロキシビタミンＤレベルは、ＤＢＰレベルと正相関した（ｒ＝０．３３５、ｐ＝０．０１９）。

【０１５４】

総２５（ＯＨ）Ｄレベルは、ＢＭＤと相関しなかった（ｒ＝０．１７２　ｐ＝０．２３６、図１）。同様に、ＤＢＰに結合した２５（ＯＨ）Ｄのレベルは、ＢＭＤと相関しなか

った（ｒ＝０．０７２、ｐ＝０．６２６）。対照的に、遊離２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄのレベルは、いずれも、ＢＭＤと強く相関した（遊離についてはｒ＝０．４１３　ｐ＝０．００３、バイオアベイラブルについてはｒ＝０．４４１　ｐ＝０．００２、図１）。バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄおよび遊離２５（ＯＨ）Ｄのレベルは、互いに高く相関したが（ｒ＝０．９８５、ｐ＜０．００１）、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄが総２５（ＯＨ）Ｄの大部分を占め、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄの濃度は、遊離２５（ＯＨ）Ｄと比較しておおよそ３５０倍高かった（表２）。１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄの総レベルおよび計算による遊離レベルは、ＢＭＤと相関しなかった（ｐ＞０．０５）。総１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄレベルは、遊離２５（ＯＨ）Ｄまたはバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄのレベルと関連せず（ｐ＞０．０５）、性別で調整したアルカリ性ホスファターゼも、総、遊離、またはバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄと関連しなかった（ｐ＞０．０５）。総およびバイオアベイラブルのいずれの２５（ＯＨ）Ｄレベルも、血清カルシウムまたはＰＴＨのレベルと相関しなかった（ｐ＞０．０５）。注目すべきことに、ＰＴＨレベルは、１５～５１ｎｇ／Ｌにあり（全て正常範囲内）、ＢＭＤとは関連しなかった（ｒ＝－０．０２４、ｐ＝０．８６９）。

【０１５５】

総２５（ＯＨ）ＤおよびＤＢＰのレベルのいずれも、ＢＭＩと逆相関した（総についてはｒ＝－０．３００、ｐ＝０．０３６、およびＤＢＰについてｒ＝－０．５４２、ｐ＜０．００１）。バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄは、ＢＭＩと正相関した（ｒ＝０．３０２、ｐ＝０．０３５）。しかしながら、この集団においては、ＢＭＩはＢＭＤと相関しなかった（ｒ＝０．１６０、ｐ＝０．２７１）。食事カルシウム摂取量は、総２５（ＯＨ）Ｄと相関したが（ｒ＝０．３３９、ｐ＝０．０２１）、ＤＢＰ、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ、またはＢＭＤとは相関しなかった（ｐ＞０．０５）。選択されたサブグループ間の総およびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄのレベル、ＤＢＰ、ならびにＢＭＤを、表３に示す。女性は、男性よりも高い平均総２５（ＯＨ）Ｄレベルを有したが、平均ＤＢＰレベル、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄレベル、およびＢＭＤは、男女間で差がなかった。経口避妊薬（ＯＣＰ）の使用を報告している女性は、ＯＣＰの使用を報告しなかった女性と比較して、より高い平均総２５（ＯＨ）Ｄを有したが、平均のＤＢＰおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄのレベルには、ＯＣＰ使用に基づく有意差はなかった。２５ｋｇ／ｍ^{2}以上のＢＭＩを有する対象（過体重対象）は、２５ｋｇ／ｍ^{2}未満のＢＭＩを有する対象（正常体重対象）よりも低いＤＢＰレベルを有した。週１２０分以上の運動を報告した対象は、それを行っていない対象よりも高い平均総２５（ＯＨ）Ｄレベルを有したが、平均ＤＢＰレベル、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄレベル、およびＢＭＤに、有意差は見られなかった。非白人種対象の平均ＤＢＰレベルは、白人種対象のものよりも低かった（表３）。

【０１５６】

年齢、性別、ＢＭＩ、および人種で調整した多変量モデルにおいて、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄは、独立して、ＢＭＤと関連したままであった（ｐ＝０．０３、表４）。バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄが、多変量モデルにおいて、唯一の有意なＢＭＤの予測因子であった。計算したバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄのレベルは、総２５（ＯＨ）Ｄ、アルブミン、およびＤＢＰの濃度に依存するため、アルブミンまたはＤＢＰがＢＭＤと関連するかどうかを別個に評価した。ＤＢＰのレベルは、ＢＭＤと逆相関し（ｒ＝－０．２９６、ｐ＝０．０３９）、一方で血清アルブミンは、ＢＭＤとの関連性を示さなかった（ｒ＝０．１５６、ｐ＝０．２８５）。多変量線形回帰モデルにおいて、総２５（ＯＨ）Ｄは、ＤＢＰレベルで調整した後にのみ、ＢＭＤの有意な予測因子となった（Ｂ＝０．０８９、ｐ＝０．０４０）。アルブミンは、ＤＢＰおよび総２５（ＯＨ）Ｄを含む多変量モデルでは、ＢＭＤと関連しなかった（ｐ＝０．１５０）。

考察

【０１５７】

２５（ＯＨ）ＤおよびＢＭＤの循環レベル間の関係に関する矛盾した報告を考慮して、総２５（ＯＨ）Ｄ、ＤＢＰ、およびアルブミンの血清レベルを、若齢の健常成人群において測定し、遊離２５（ＯＨ）Ｄ、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ、総２５（ＯＨ）Ｄ、およびＢＭＤの間の関係を評価した。限定するように意図するものではないが、本明細書に記載の結果は、遊離ホルモンの仮説と一致しており、循環ＤＢＰが、ヒトにおいてビタミンＤの生物学的作用の阻害因子であることを示唆する。遊離ビタミンおよびバイオアベイラブルビタミンのレベルとＢＭＤとの間の類似する関連性は、アルブミンへの結合は、ＤＢＰへの結合とは異なり、２５（ＯＨ）Ｄの作用を阻害しないことを暗示する。これらの結果は、ＤＢＰに関する先行の基礎および臨床研究と一致する。

【０１５８】

本明細書に記載の結果は、ＤＢＰが、他の血清ホルモン担体タンパク質に類似の挙動を取り、広範な臨床用途を有するという仮説を裏付ける。甲状腺ホルモン結合グロブリンおよび性ホルモン結合グロブリンのように、ＤＢＰは、血清の担体およびレザーバーとして機能し、ビタミンＤの循環半減期を延長させながら、同時に、標的組織に対して、その直接のバイオアベイラビリティを調節している可能性がある（２４）。尿細管細胞において説明されるメガリン媒介性エンドサイトーシスとは対照的に、本結果は、２５（ＯＨ）Ｄが、これらの他のステロイドホルモンと同様に、細胞膜全体にわたる拡散によって、いくつかの標的細胞への経路を獲得することを暗示する（２４）。したがって、ホルモンの活性および充足は、総血清レベルではなく、バイオアベイラブルビタミンの量が反映され得る。現在のところ、ビタミンＤ欠乏症の臨床試験は、２５（ＯＨ）Ｄの総血清濃度に基づいている（２）。しかしながら、本明細書に記載のデータは、総血清ビタミンＤの濃度は、ビタミンＤ充足度の最良の尺度ではない可能性があることを示唆する。例えば、高いＤＢＰレベルを有する患者は、２５（ＯＨ）Ｄが十分であるように見える可能性があるが、実際にはバイオアベイラブルビタミンが欠損している可能性がある。逆に、低いＤＢＰレベルを有する患者では、総２５（ＯＨ）Ｄは低くなるが、これらの患者は、実際には十分なバイオアベイラブルビタミンを有する場合がある。低い総２５（ＯＨ）Ｄのレベルにもかかわらず、肥満および非白人種対象におけるバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄレベルの維持は、循環ＤＢＰにおける変動が、いくつかの先行研究（５，１５－１６，３５，４４－４５）において見られた、黒人種および過体重の患者における低い２５（ＯＨ）Ｄレベルと高いＢＭＤの明らかな矛盾を説明する可能性をもたらす。

【０１５９】

本明細書に記載の結果は、総２５（ＯＨ）ＤレベルをＢＭＤと関連付けるいくつかの先行研究とは対照的であるが、このような関係を見出すことができなかった他の研究と一致する（４～５，１５～１８）。これらの先行研究では、ＤＢＰレベルは測定されていない。注目すべきことに、総２５（ＯＨ）Ｄおよび遊離／バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄのレベルには関連しており、試料サイズがより大きければ、総２５（ＯＨ）ＤとＢＭＤとの間の弱い関係性を検出することができた可能性がある。この関係を見出した先行研究は、概して、２００を上回る試料サイズを有し、２５（ＯＨ）ＤとＢＭＤとの間の相関係数が報告されたとき、それらは、０．２未満であった（４～５，１６，１９）。

【０１６０】

１，２５（ＯＨ）$_2$ＤレベルとＢＭＤとの間の関係は見出されなかった。１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄは、ビタミンＤの活性形態であると考えられているが、多くの組織は、１－αヒドロキシラーゼを発現し、循環２５（ＯＨ）Ｄを、局所でその活性形態に変換することができる可能性がある（４６）。循環２５（ＯＨ）Ｄレベルは、概して、全体的なビタミンＤの保存を、より良好に反映するものと考えられる（２）。本明細書に記載の結果は、これと一致して、総循環の総または遊離１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄレベルが、ビタミンＤ活性の優れた尺度ではないことを示唆する。これは、甲状腺ホルモン作用の測定のための一般に認められたモデルと類似しており、遊離Ｔ４レベルは、Ｔ３がホルモンの活性形態であるにもかかわらず、循環遊離Ｔ３レベルよりも優れた甲状腺ホルモン作用の尺度である（４７）。

【０１６１】
ビタミンＤ、ＤＢＰ、およびアルブミンの標準化された免疫測定法を、標準的な計算方法と組み合わせて使用することにより、本明細書に記載のアプローチが、さらなる確信をもって、他の臨床研究室で採用されることを可能にするであろう。
【０１６２】
ＤＢＰレベルの分布はこれらの対象間で広範にわたり、ＤＢＰが、いずれも低い２５（ＯＨ）Ｄレベルと関連している、高ＢＭＩおよび黒人種の両方と逆関連することを観察した。制限されることを望むものではないが、１つの可能な説明としては、２５（ＯＨ）Ｄは、それ自体が、ＤＢＰの生成を調節し得ることである。ＤＢＰレベルを下げることにより、総レベルが低い状況で、より高いＤＢＰ分画がバイオアベイラブルとなることが可能となるであろう。人種、ＢＭＩ、およびＤＢＰレベルの間に観察された関連性の他の可能な説明としては、遺伝的要因および脂肪組織による循環ＤＢＰの取り込みが挙げられる。
【０１６３】
ＤＢＰが、ヒトにおいて２５（ＯＨ）ＤとＢＭＤとの間の関係を変化させる根拠を本明細書に記載する。これらのデータは、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄのレベルが、最低限骨代謝に関して、総２５（ＯＨ）Ｄレベルよりも優れたビタミンＤの尺度であることを示唆する。したがって、総２５（ＯＨ）Ｄレベルをビタミン Ｄ充足度の尺度として使用することによって、個人が、ビタミンＤ充足または欠乏として誤分類され得る可能性がある。これは、血清２５（ＯＨ）Ｄ濃度とＢＭＤとの間の関係についての先行研究の矛盾する結果を説明することができる。どの個人が実際にビタミンＤが不足しているかを判定することで、今後のビタミンＤ補給介入が、最も有益となる個人を標的とすることを可能にすることができる。さらに、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄレベルの使用は、ビタミンＤと、骨折（７）、感染症（４９）、癌（５０）、および心血管疾患（５１）を含む広範囲の結果との間の関係の本質を、さらに解明し得る。

付録。計算による遊離およびバイオアベイラブル２５－ヒドロキシビタミンＤの導出。
【０１６４】
定義

Ｄ＝２５－ヒドロキシビタミンＤ（カルシジオール）、Ｄ２およびＤ３の両方の合計
Ａｌｂ＝アルブミン
ＤＢＰ＝ビタミンＤ結合タンパク質、群特異成分またはＧｃとしても既知
［D_{Alb}］＝アルブミンに結合したビタミンＤの濃度
［D_{DBP}］＝ＤＢＰに結合したビタミンＤの濃度
［Ｄ］＝遊離（未結合）Ｄの濃度
［総］＝総２５ＯＨ－Ｄの濃度＝［D_{DBP}］＋［D_{Alb}］＋［Ｄ］
［Ｂｉｏ］＝バイオアベイラブルＤの濃度（バイオアベイラブル＝遊離およびアルブミンに結合したビタミンの合計）＝［Ｄ］＋［D_{Alb}］

K_{alb}＝ビタミンＤとアルブミンの間の親和性定数＝$6\times10^{5}M^{-1}$
K_{DBP}＝ビタミンＤとＤＢＰとの間の親和性定数＝$0.7\times10^{9}M^{-1}$

【０１６５】
方程式

総２５（ＯＨ）－ビタミンＤ
［総］＝ｇ／ｍｏｌ単位での２５（ＯＨ）－ビタミンＤの濃度÷４００．５ｇ／モル
［総］＝［Ｄ］＋［ＤＡｌｂ］＋［ＤＤＢＰ］　　のとき
ゆえに　　［ＤＤＢＰ］＝［総］－［ＤＡｌｂ］－［Ｄ］　　（方程式１）

アルブミン

［Ａｌｂ］＝ｇ／Ｌ単位での血清アルブミン濃度÷６６，４３０ｇ／モル
［Ｄ］＋［Ａｌｂ］⇔［ＤＡｌｂ］
アルブミン結合定数Ｋａｌｂ＝［ＤＡｌｂ］÷（［Ｄ］×［Ａｌｂ］）
したがって［ＤＡｌｂ］＝Ｋａｌｂ×［Ａｌｂ］×［Ｄ］　　（方程式２）
　　（注：この例における［Ａｌｂ］は、遊離のビタミン未結合アルブミンの濃度を意味する。しかしながら、アルブミンとビタミンＤとの間の低い親和性を考慮すると、総アルブミンと未結合アルブミンの濃度は、事実上等しい（［総アルブミン］　［Ａｌｂ］）。結果として、［Ａｌｂ］は、総血清アルブミンの測定値から正確に推定することができる。）

ＤＢＰ

［総ＤＢＰ］＝ｇ／Ｌ単位での血清ＤＢＰの濃度÷５８，０００ｇ／モル
［ＤＢＰ］＝遊離未結合ＤＢＰであり、かつ［ＤＤＢＰ］＝ビタミンに結合したＤＢＰ
［Ｄ］＋［ＤＢＰ］⇔［ＤＤＢＰ］のとき
ＤＢＰ結合定数ＫＤＢＰ＝［ＤＤＢＰ］÷（［ＤＢＰ］×［Ｄ］）であり、
したがって［Ｄ］＝［ＤＤＢＰ］÷ＫＤＢＰ÷［ＤＢＰ］　　（方程式３）
［総ＤＢＰ］＝結合および未結合ＤＢＰの合計＝［ＤＢＰ］＋［ＤＤＢＰ］であるため、
したがって［ＤＢＰ］＝［総ＤＢＰ］－［ＤＤＢＰ］　　（方程式４）
遊離２５（ＯＨ）－ビタミンＤの値を求める
方程式３および４から、
［Ｄ］＝［ＤＤＢＰ］÷ＫＤＢＰ÷（［総ＤＢＰ］－［ＤＤＢＰ］）であることがわかり（方程式５）
方程式１を方程式２に代入すると、
［ＤＤＢＰ］＝［総］－（Ｋａｌｂ×［Ａｌｂ］＋１）×［Ｄ］であることがわかり（方程式６）
方程式６を方程式５に代入することにより、
［Ｄ］＝｛［総］－（Ｋａｌｂ×［Ａｌｂ］＋１）×［Ｄ］｝÷ＫＤＢＰ÷（［総ＤＢＰ］－｛［総］－（Ｋａｌｂ×［Ａｌｂ］＋１）×［Ｄ］｝）が得られる。
【０１６６】
　方程式は、ここでは、既知の定数（ＫＤＢＰおよびＫａｌｂ）、測定した値（［総ＤＢＰ］、［Ａｌｂ］、および［総］）、ならびに遊離ビタミンＤ［Ｄ］の従属変数に限定される。積を伝搬し、いくつかの並べ替えの後、これをさらに簡略化して、二次多項式の形式に適合させることができる。
　　ａｘ２＋ｂｘ＋ｃ＝０
　　式中、ｘ＝［Ｄ］＝遊離２５（ＯＨ）－ビタミンＤの濃度
　　ａ＝ＫＤＢＰ×Ｋａｌｂ×［Ａｌｂ］＋ＫＤＢＰ
ｂ＝ＫＤＢＰ×［総ＤＢＰ］－ＫＤＢＰ×［総］＋Ｋａｌｂ×［Ａｌｂ］＋１
ｃ＝－［総］

この多項式は、二次方程式
［Ｄ］＝［－ｂ＋√ｂ２－４ａｃ］÷２ａ
を使用して、［Ｄ］の値を求めることができる。
　　遊離２５（ＯＨ）－ビタミンＤの値を求めた後、次いで、方程式２を使用して、バイオアベイラブル（ＤＢＰに結合していないビタミン）の濃度を計算することができる。

　　［Ｂｉｏ］＝［Ｄ］＋［ＤＡｌｂ］＝（Ｋａｌｂ×［Ａｌｂ］＋１）×［Ｄ］
（方程式７）

【０１６７】
例となる計算
総２５（ＯＨ）－ビタミンＤ＝［総］＝４０ｎｇ／ｍＬ＝１．０×１０$^{-7}$ｍｏｌ／Ｌ
総血清ＤＢＰ＝［総ＤＢＰ］＝２５０ｕｇ／ｍＬ＝４．３×１０$^{-6}$ｍｏｌ／Ｌ
総血清アルブミン＝［Ａｌｂ］＝４．３ｇ／ｄＬ＝６．４×１０$^{-4}$ｍｏｌ／Ｌ
K_{alb}＝６×１０^{5}Ｍ$^{-1}$
K_{DBP}＝７．０×１０^{8}Ｍ$^{-1}$
ａ＝２．７×１０^{11}
ｂ＝３３２５
ｃ＝－１×１０$^{-7}$
計算された遊離２５（ＯＨ）Ｄの濃度＝３．０１×１０$^{-11}$ｍｏｌ／Ｌ＝１２．１ｐｇ／ｍＬ
計算されたバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄの濃度＝１．０９×１０$^{-8}$ｍｏｌ／Ｌ＝４．６ｎｇ／ｍＬ

【０１６８】
参考文献
1. Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT, Vamvakas EC, Dick IM, Prince RL, Finkelstein JS 1998 Hypovitaminosis D in medical inpatients. NEngl J Med 338(12):777-83.
2. Holick MF 2007 Vitamin D deficiency. N Engl J Med 357(3):266-81.
3. Bischoff-Ferrari HA, Zhang Y, Kiel DP, Felson DT 2005 Positive association between serum 25-hydroxyvitamin D level and bone density in osteoarthritis. Arthritis Rheum 53(6):821-6.
4. Valimaki VV, Alfthan H, Lehmuskallio E, Loyttyniemi E, Sahi T, Stenman UH, Suominen H, Valimaki MJ 2004 Vitamin D status as a determinant of peak bone mass in young Finnish men. J Clin Endocrinol Metab 89(1):76-80.
5. Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Orav EJ, Dawson-Hughes B 2004 Positive association between 25-hydroxy vitamin D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. Am J Med 116(9):634-9.
6. Stone K, Bauer DC, Black DM, Sklarin P, Ensrud KE, Cummings SR 1998 Hormonal predictors of bone loss in elderly women: a prospective study. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. J Bone Miner Res 13(7):1167-74.
7. Cauley JA, Lacroix AZ, Wu L, Horwitz M, Danielson ME, Bauer DC, Lee JS, Jackson RD, Robbins JA, Wu C, Stanczyk FZ, LeBoff MS, Wactawski-Wende J, Sarto G, Ockene J, Cummings SR 2008 Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk for hip fractures. Ann Intern Med 149(4):242-50.
8. Jackson RD, LaCroix AZ, Gass M, Wallace RB, Robbins J, Lewis CE, Bassford T, Beresford SA, Black HR, Blanchette P, Bonds DE, Brunner RL, Brzyski RG, Caan B, Cauley JA, Chlebowski RT, Cummings SR, Granek I, Hays J, Heiss G, Hendrix SL, Howard BV, Hsia J, Hubbell FA, Johnson KC, Judd H, Kotchen JM, Kuller LH, Langer RD, Lasser NL, Limacher MC, Ludlam S, Manson JE, Margolis KL, McGowan J, Ockene JK, O'Sullivan MJ, Phillips L, Prentice RL, Sarto GE, Stefanick ML, Van Horn L, Wactawski-Wende J, Whitlock E, Anderson GL, Assaf AR, Barad D 2006 Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. N Engl J Med 354(7):669-83.
9. Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, Dallal GE, Falconer G, Green CL 1995 Rates of bone loss in postmenopausal women randomly assigned to one of two dosages of vitamin D. Am J Clin Nutr 61(5):1140-5.
10. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, Giovannucci E, Dietrich T, Dawson-

Hughes B 2005 Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. JAMA 293(18):2257-64.
11. Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, Dallal GE 1997 Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. N Engl J Med 337(10):670-6.
12. Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F, Brun J, Crouzet B, Arnaud S, Delmas PD, Meunier PJ 1992 Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. N Engl J Med 327(23):1637-42.
13. Ooms ME, Roos JC, Bezemer PD, van der Vijgh WJ, Bouter LM, Lips P 1995 Prevention of bone loss by vitamin D supplementation in elderly women: a randomized double-blind trial. J Clin Endocrinol Metab 80(4):1052-8.
14. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, Stuck AE, Staehelin HB, Orav EJ, Thoma A, Kiel DP, Henschkowski J 2009 Prevention of nonvertebral fractures with oral vitamin D and dose dependency: a meta-analysis of randomized controlled trials. Arch Intern Med 169(6):551-61.
15. Kremer R, Campbell PP, Reinhardt T, Gilsanz V 2009 Vitamin D status and its relationship to body fat, final height, and peak bone mass in young women. J Clin Endocrinol Metab 94(1):67-73.
16. Hannan MT, Litman HJ, Araujo AB, McLennan CE, McLean RR, McKinlay JB, Chen TC, Holick MF 2008 Serum 25-hydroxyvitamin D and bone mineral density in a racially and ethnically diverse group of men. J Clin Endocrinol Metab 93(1):40-6.
17. Sherman SS, Tobin JD, Hollis BW, Gundberg CM, Roy TA, Plato CC 1992 Biochemical parameters associated with low bone density in healthy men and women. J Bone Miner Res 7(10):1123-30.
18. Gerdhem P, Ringsberg KA, Obrant KJ, Akesson K 2005 Association between 25-hydroxy vitamin D levels, physical activity, muscle strength and fractures in the prospective population-based OPRA Study of Elderly Women. Osteoporos Int 16(11):1425-31.
19. Gutierrez OM, Farwell WR, Kermah D, Taylor EN 2010 Racial differences in the relationship between vitamin D, bone mineral density, and parathyroid hormone in the National Health and Nutrition Examination Survey. Osteoporos Int.
20. Grant AM, Avenell A, Campbell MK, McDonald AM, MacLennan GS, McPherson GC, Anderson FH, Cooper C, Francis RM, Donaldson C, Gillespie WJ, Robinson CM, Torgerson DJ, Wallace WA 2005 Oral vitamin D3 and calcium for secondary prevention of low-trauma fractures in elderly people (Randomised Evaluation of Calcium Or vitamin D, RECORD): a randomised placebo-controlled trial. Lancet 365(9471):1621-8.
21. Porthouse J, Cockayne S, King C, Saxon L, Steele E, Aspray T, Baverstock M, Birks Y, Dumville J, Francis R, Iglesias C, Puffer S, Sutcliffe A, Watt I, Torgerson DJ 2005 Randomised controlled trial of calcium and supplementation with cholecalciferol (vitamin D3) for prevention of fractures in primary care. BMJ 330(7498):1003.
22. Aloia JF, Talwar SA, Pollack S, Yeh J 2005 A randomized controlled trial of vitamin D3 supplementation in African American women. Arch Intern Med 165(14):1618-23.
23. Sanders KM, Stuart AL, Williamson EJ, Simpson JA, Kotowicz MA, Young D, Nicholson GC 2010 Annual high-dose oral vitamin D and falls and fractures in older women: a randomized controlled trial. JAMA 303(18):1815-22.
24. Mendel CM 1989 The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. Endocr Rev 10(3):232-74.
25. Bikle DD, Siiteri PK, Ryzen E, Haddad JG 1985 Serum protein binding of 1,25-

dihydroxyvitamin D: a reevaluation by direct measurement of free metabolite leve ls. J Clin Endocrinol Metab 61(5):969-75.
26. Safadi FF, Thornton P, Magiera H, Hollis BW, Gentile M, Haddad JG, Liebhaber SA, Cooke NE 1999 Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. J Clin Invest 103(2):239-51.
27. Chun RF, Lauridsen AL, Suon L, Zella LA, Pike JW, Modlin RL, Martineau AR, W ilkinson RJ, Adams J, Hewison M 2010 Vitamin D-binding protein directs monocyte responses to 25-hydroxy- and 1,25-dihydroxyvitamin D. J Clin Endocrinol Metab 95 (7):3368-76.
28. Bikle DD, Gee E 1989 Free, and not total, 1,25-dihydroxyvitamin D regulates 25-hydroxyvitamin D metabolism by keratinocytes. Endocrinology 124(2):649-54.
29. Bikle DD, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, Haddad JG 1986 Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albu min and the vitamin D-binding protein. J Clin Endocrinol Metab 63(4):954-9.
30. Shaham O, Wei R, Wang TJ, Ricciardi C, Lewis GD, Vasan RS, Carr SA, Thadhani R, Gerszten RE, Mootha VK 2008 Metabolic profiling of the human response to a g lucose challenge reveals distinct axes of insulin sensitivity. Mol Syst Biol 4:2 14.
31. Mazess RB, Barden HS, Bisek JP, Hanson J 1990 Dual-energy x-ray absorptiomet ry for total-body and regional bone-mineral and soft-tissue composition. Am J Cl in Nutr 51(6):1106-12.
32. Marshall D, Johnell O, Wedel H 1996 Meta-analysis of how well measures of bo ne mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. BMJ 312(7041):1 254-9.
33. Hans D, Downs RW, Jr., Duboeuf F, Greenspan S, Jankowski LG, Kiebzak GM, Pet ak SM 2006 Skeletal sites for osteoporosis diagnosis: the 2005 ISCD Official Pos itions. J Clin Densitom 9(1):15-21.
34. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM 1999 A critical evaluation of simple met hods for the estimation of free testosterone in serum. J Clin Endocrinol Metab 8 4(10):3666-72.
35. Liel Y, Edwards J, Shary J, Spicer KM, Gordon L, Bell NH 1988 The effects of race and body habitus on bone mineral density of the radius, hip, and spine in premenopausal women. J Clin Endocrinol Metab 66(6):1247-50.
36. Halioua L, Anderson JJ 1989 Lifetime calcium intake and physical activity ha bits: independent and combined effects on the radial bone of healthy premenopaus al Caucasian women. Am J Clin Nutr 49(3):534-41.
37. Schneider GB, Benis KA, Flay NW, Ireland RA, Popoff SN 1995 Effects of vitam in D binding protein-macrophage activating factor (DBP-MAF) infusion on bone res orption in two osteopetrotic mutations. Bone 16(6):657-62.
38. Fang Y, van Meurs JB, Arp P, van Leeuwen JP, Hofman A, Pols HA, Uitterlinden AG 2009 Vitamin D binding protein genotype and osteoporosis. Calcif Tissue Int 85(2):85-93.
39. Sinotte M, Diorio C, Berube S, Pollak M, Brisson J 2009 Genetic polymorphism s of the vitamin D binding protein and plasma concentrations of 25-hydroxyvitami n D in premenopausal women. Am J Clin Nutr 89(2):634-40.
40. Engelman CD, Fingerlin TE, Langefeld CD, Hicks PJ, Rich SS, Wagenknecht LE, Bowden DW, Norris JM 2008 Genetic and environmental determinants of 25-hydroxyvi tamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in Hispanic and African Americans. J Clin Endocrinol Metab 93(9):3381-8.
41. Al-oanzi ZH, Tuck SP, Raj N, Harrop JS, Summers GD, Cook DB, Francis RM, Dat

ta HK 2006 Assessment of vitamin D status in male osteoporosis. Clin Chem 52(2): 248-54.
42. Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP, Brot C, Heickendorff L, Mosekilde L, Nexo E 2005 Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): a cross-sectional study on 595 early postmenopausal women. Calcif Tissue Int 77(1):15-22.
43. Al-oanzi ZH, Tuck SP, Mastana SS, Summers GD, Cook DB, Francis RM, Datta HK 2008 Vitamin D-binding protein gene microsatellite polymorphism influences BMD and risk of fractures in men. Osteoporos Int 19(7):951-60.
44. Snijder MB, van Dam RM, Visser M, Deeg DJ, Dekker JM, Bouter LM, Seidell JC, Lips P 2005 Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population-based study in older men and women. J Clin Endocrinol Metab 90(7):4119-23.
45. Cauley JA, Lui LY, Ensrud KE, Zmuda JM, Stone KL, Hochberg MC, Cummings SR 2005 Bone mineral density and the risk of incident nonspinal fractures in black and white women. JAMA 293(17):2102-8.
46. van Driel M, Koedam M, Buurman CJ, Hewison M, Chiba H, Uitterlinden AG, Pols HA, van Leeuwen JP 2006 Evidence for auto/paracrine actions of vitamin D in bone: 1alphahydroxylase expression and activity in human bone cells. FASEB J 20(13):2417-9.
47. Brent GA 1994 The molecular basis of thyroid hormone action. N Engl J Med 331(13):847-53.
48. van Hoof HJ, Swinkels LM, Ross HA, Sweep CG, Benraad TJ 1998 Determination of non-protein-bound plasma 1,25-dihydroxyvitamin D by symmetric (rate) dialysis. Anal Biochem 258(2):176-83.
49. Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA, Jr. 2009 Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Arch Intern Med 169(4):384-90.
50. Wactawski-Wende J, Kotchen JM, Anderson GL, Assaf AR, Brunner RL, O'Sullivan MJ, Margolis KL, Ockene JK, Phillips L, Pottern L, Prentice RL, Robbins J, Rohan TE, Sarto GE, Sharma S, Stefanick ML, Van Horn L, Wallace RB, Whitlock E, Bassford T, Beresford SA, Black HR, Bonds DE, Brzyski RG, Caan B, Chlebowski RT, Cochrane B, Garland C, Gass M, Hays J, Heiss G, Hendrix SL, Howard BV, Hsia J, Hubbell FA, Jackson RD, Johnson KC, Judd H, Kooperberg CL, Kuller LH, LaCroix AZ, Lane DS, Langer RD, Lasser NL, Lewis CE, Limacher MC, Manson JE 2006 Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of colorectal cancer. N Engl J Med 354(7):684-96.
51. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Wolf M, Vasan RS 2008 Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. Circulation 117(4):503-11.

実施例２：バイオアベイラブルビタミンＤおよび鉱質代謝

【０１６９】

先行研究は、末期腎疾患（ＥＳＲＤ）において、２５－ヒドロキシビタミンＤ（２５（ＯＨ）Ｄ）レベルと鉱質代謝の間の関連性に関して、矛盾する結果をもたらしている。ビタミンＤ結合タンパク質（ＤＢＰ）に結合していないビタミンＤ分画であるバイオアベイラブルビタミンＤが、総レベルよりも強く、鉱質代謝の測定値と関連するという仮説を試験する実験を、本明細書に記載する。２５（ＯＨ）Ｄおよび１，２５－ジヒドロキシビタ

ミンＤ（１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ）のレベルが既に測定済みである８９人の患者を、新規の米国透析患者のコホートから特定した。保存した血清試料を使用してＤＢＰを測定し、事前に検証した式を使用してバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄおよび１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄを判定し、鉱質代謝の測定値および人口統計的要因との関連性を試験した。バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄのいずれも、血清カルシウムと相関したが（それぞれ、ｒ＝０．２６、ｐ＝０．０１およびｒ＝０．２３、ｐ＝０．０２）、この関連性は、総２５（ＯＨ）Ｄ（ｒ＝０．０１、ｐ＝０．９２）および総１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ（ｒ＝０．０８、ｐ＝０．４４）のいずれにも見られなかった。ＤＢＰおよび総２５（ＯＨ）Ｄには人種差が観察されたが、バイオアベイラブルビタミンＤには観察されなかった。一変量および多変量の回帰分析において、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄは、副甲状腺ホルモンレベルと関連した（それぞれ、ｐ＝０．００７およびｐ＝０．０２）。したがって、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄのレベルは、血液透析を受ける患者において、総２５（ＯＨ）Ｄレベルよりも強く、鉱質代謝の測定値と相関する。

【０１７０】

慢性腎臓疾患に伴う骨ミネラル代謝異常（ＣＫＤ－ＭＢＤ）は、最も認識されているＣＫＤの代謝性合併症の１つである。個人の末期腎疾患（ＥＳＲＤ）が進行するにつれて、低下する腎臓１ａ－ヒドロキシラーゼ活性が、２５－ヒドロキシビタミンＤ（２５（ＯＨ）Ｄ）の活性な１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ（１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ）への変換の低下をもたらす。これらの代謝性変化は、ＣＫＤ－ＭＢＤの特徴である低カルシウム血症および二次性副甲状腺機能亢進症を促進すると見られている。１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄは、生物学的に活性な部分と考えられているが、ビタミンＤの大部分は、２５（ＯＨ）Ｄとして循環する（１）。低い２５（ＯＨ）Ｄレベルは、ＥＳＲＤに一般的であり、透析を導入する患者の７９％は、２５（ＯＨ）Ｄレベルが３０ｎｇ／ｍｌを下回り、この閾値を下回る血清レベルは、黒人種のＥＳＲＤ患者において極めて一般的である（２）。

【０１７１】

遊離ホルモンの仮説は、タンパク質に結合したホルモンが比較的不活性であり、一方で結合タンパク質から遊離したものが、拘束されることなく生物学的活性を発揮することを示唆する（３）。いくつかのホルモン（例えば、テストステロン）については、アルブミンへの結合が、特異的結合タンパク質に対するものよりも大幅に弱い。したがって、アルブミンに結合したホルモンは、しばしば、遊離分画とともに分類され、「バイオアベイラブル」分画と称される。循環２５（ＯＨ）Ｄおよび１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄの大部分（８５～９０％）は、ビタミンＤ結合タンパク質（ＤＢＰ）に堅く結合し、少量（１０～１５％）が、アルブミンに緩く結合している。循環ビタミンＤの１％未満が、遊離の未結合形態で存在する（４，５）。ＥＳＲＤにおけるビタミンＤと鉱質代謝のマーカー（例えば、ＰＴＨおよびカルシウム）との間の関係が、ＤＢＰおよびアルブミンの使用によって強化され、バイオアベイラブルビタミンＤのレベルを判定するという仮説を試験する実験を、本明細書に記載する。他のコホートにおいて観察されたパターンを考慮して、さらに、黒人種の透析患者に典型的に観察される低い２５（ＯＨ）Ｄのレベルが、この群においては、バイオアベイラブルビタミンＤのレベルと必ずしも関連するわけではないという仮説を立てた（６，７）。

結果

【０１７２】

典型的な米国の血液透析集団のものに類似する、この研究に含まれた９４人の対象のベースラインの特徴を、表５に要約する。含まれた対象はいずれも、透析開始前に、活性化したビタミンＤ、エルゴカルシフェロール、またはコレカルシフェロールでの治療を受けたという記録はなかった。

【０１７３】

鉱質代謝およびビタミンＤ。慢性血液透析開始の１４日以内に測定した、ベースライン

補正したカルシウムレベルは、２５（ＯＨ）Ｄ（ｒ＝０．０１、Ｐ＝０．９２）または１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ（ｒ＝０．０８、Ｐ＝０．４４）のいずれの総レベルとも関連しなかった。対照的に、カルシウムレベルは、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ（ｒ＝０．２６、ｐ＝０．０１）およびバイオアベイラブル１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ（ｒ＝０．２３、ｐ＝０．０２）と、正相関した。これらの関係を、図２にプロットする。最も高いバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄを有する単一の個人は、４つの標準偏差にわたって両方のレベルが平均を上回り、観察した関係に関して異常値であると考えた。この単一のデータ点の影響を試験するために、感度分析を、この個体を除外して分析を反復することによって行った。カルシウムとバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ（ｒ＝０．３０、ｐ＝０．００３）およびバイオアベイラブル１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ（ｒ＝０．２７、ｐ＝０．００８）との関係は、いずれもある程度強化された。

【０１７４】

リンレベルは、２５（ＯＨ）Ｄ（ｒ＝０．１４、Ｐ＝０．１９）または１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ（ｒ＝－０．０１、Ｐ＝０．９４）のいずれの総レベルとも関連性を示さなかった。同様に、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ（ｒ＝－０．１０．Ｐ＝０．３２）もバイオアベイラブル１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ（ｒ＝－０．１６、Ｐ＝０．１２）もいずれも、リンレベルと有意に関連しなかった。

【０１７５】

アルカリ性ホスファターゼは、２５（ＯＨ）Ｄまたは１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄの総またはバイオアベイラブルのいずれの形態とも関連しなかった（全比較についてｐ＞０．０５）。

【０１７６】

ＰＴＨと、全４つのビタミンＤ形態との間の関係を、一変量および多変量の回帰モデルにおいて、試験した。一変量モデルにおいては、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）ＤのみがＰＴＨと関連し、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄにおける各対数増加に対して、ＰＴＨに－０．３５の対数低下を有した（ｐ＝０．０１）。年齢、性別、人種、および１年での生存状態で制御を行った多変量モデルにおいて、この関係は、変化しないままであった（β＝－０．３２、ｐ＝０．０２）。カルシウム、リン、およびバイオアベイラブル１，２５（ＯＨ）２Ｄのレベルを追加した第３のモデルは、類似の結果を示した（表７）。カルシウムの結果にあるように、未調整および調整済みのいずれの係数も、単一の異常値を除外した場合に、強まった（未調整：β＝－０．４０、ｐ＝０．００３、調整済み：β＝－０．３６、ｐ＝０．０１）。対照的に、総２５（ＯＨ）ＤとＰＴＨとの間に有意な関連性はなかった（図３）。

【０１７７】

患者因子およびビタミンＤ。より高齢の個体は、より高い総２５（ＯＨ）Ｄレベル（ｒ＝０．３１、Ｐ＝０．００３）およびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ（ｒ＝０．２１、ｐ＝０．０４）を有した。総１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄもバイオアベイラブル１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄも、年齢と関連性がなかった。女性は、より低い総２５（ＯＨ）Ｄレベルと関連していた（平均の中央値：２２．０ｎｇ／ｄｌ、女性の場合：１８．０ｎｇ／ｄｌ、ｐ＝０．０３）。女性は、総１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄならびにバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄおよび１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄレベルの中央値が数値的に低かったが、これらの差はいずれも、統計的に有意なものではなかった。

【０１７８】

黒人種の個体は、低い総２５（ＯＨ）Ｄレベルを有したが（中央値：１５．２対２３．２ｎｇ／ｍｌ、ｐ＜０．００１）、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄレベルは低くなかった（中央値：３．８対２．８ｎｇ／ｍｌ、ｐ＝０．２１）。これらの２つのビタミンＤ形態の間の人種差における対比は、主に、黒人種におけるより低いＤＢＰレベルによってもたらされる。この差は、１年間の透析で生存した個人、またはこの時間枠で死亡したもののみを試験した場合でさえも、維持された（表６）。ＰＴＨのレベルに、人種による有

意差はなかった（中央値：２０１ｐｇ／ｍｌ［黒人種］に対して１６８ｐｇ／ｍｌ［白人種］、ｐ＝０．４７）。総１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄレベルもバイオアベイラブル１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄも、人種による差はなかった（それぞれ、ｐ＝０．０７および０．４９）。注目すべきことに、最高血圧もしくは最低血圧、糖尿病、またはＢＭＩに、人種差は認められなかった。

【０１７９】

本研究は、具体的に、最高血圧および最低血圧、ＢＭＩ、ならびに糖尿病性腎症または糖尿病の生存または診断が、ビタミンＤの任意の形態と関連するかどうかを特定するために行われたものではなかった（データは示されない）。

【０１８０】

感度分析。感度分析を行って、尿毒症が、ＤＢＰと２５（ＯＨ）Ｄまたは１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄとの結合親和性を変化させ得る可能性について特定した。もともとＢｉｋｌｅら（４，５）によって判定されたものよりも２５％低いＤＢＰ結合係数で、２５（ＯＨ）Ｄ（ｒ＝０．２６、ｐ＝０．０１）および１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ（ｒ＝０．２２、ｐ＝０．０３）のいずれのバイオアベイラブル測定値も、補正したカルシウムとの関連性を維持した。類似の結果が、２５％高い係数で観察された（バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ：ｒ＝０．２７、ｐ＝０．００９、バイオアベイラブル１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ（ｒ＝０．２４、ｐ＝０．０２））。バイオアベイラブル２５（ＯＨ）ＤとＰＴＨとの関連性は、いずれの場合でも統計的有意性を維持し、関連係数は、一変量または多変量分析のいずれにおいても、１２％未満で変化した。

考察

【０１８１】

新規透析患者の回顧的コホートを使用して、鉱質代謝（血清カルシウムおよびＰＴＨを含む）の測定値と、ビタミンＤの総およびバイオアベイラブルの両方のレベルとの間の関係を調査した。バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄは、いずれもＥＳＲＤにおける鉱質代謝の十分に確立した尺度である、補正した血清カルシウムレベルおよびＰＴＨの両方と関連するが、総２５（ＯＨ）Ｄは、このような関連を全く呈さないことを示す結果を本明細書に記載する。このデータは本明細書の他の部分に記載の以前の発見を踏まえており、２つの異なるコホートからの分析は、アルブミンおよびＤＢＰへのビタミンＤの結合を考慮した、バイオアベイラブルビタミンＤ測定値が、ビタミンＤ状態の現在の標準的な尺度である総レベルよりも、生物学的結果と関係するという仮説を、ここで裏付ける。

【０１８２】

いくつかのインビトロ研究は、ＤＢＰとの結合は、複数の標的細胞においてビタミンＤ活性を制限することを示唆する（８，９）。ＤＢＰ欠損マウスの研究は、これらの動物が、野生型マウスと比較して、著しく減少した半減期とともに、著しく減少した２５（ＯＨ）Ｄおよび１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄのレベルを呈することを示している（１０）。それらの低いビタミン濃度にもかかわらず、これらのマウスは、安定した食事ビタミンＤ源を提供された場合、それらは、野生型対照と比較して、血清カルシウム、リン、アルカリ性ホスファターゼ、およびＰＴＨに差を示さない。これらの研究は、少なくともいくつかの生物学的作用について、遊離ホルモンの仮説のビタミンＤ生理学への適用を支持する。これらの発見にもかかわらず、メガリンを発現する細胞におけるタンパク質に結合したホルモンの取り込みは、いくつかのプロセスにとっては重要であると考えられ、そのため本明細書に記載の発見に内在する生物学は、直接的な見かけよりも、さらに複雑であり、さらなる調査を必要とする（１１，１２）。

【０１８３】

黒人種の患者は、実施例１に示されるデータのようにオーバーサンプリングし、この実施例に記載されるデータによって裏付けられる観察である、黒人種が白人種よりも低いＤＢＰレベルを有することを示唆した。既に報告されたように、発明者および他の研究者は、黒人種が、より低い総２５（ＯＨ）Ｄレベルと関連することを観察した（２，１３）。

これらの２つの並行する人種差（白人種と対比して、黒人種における低い総２５（ＯＨ）Ｄおよび低いＤＢＰ）から予測できるように、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄのレベルは、本明細書に記載のように、類似する。

【０１８４】

人種群間で類似するバイオアベイラブルＤレベル、およびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）ＤとＰＴＨとの間の関連にもかかわらず、黒人種の患者は、それらの対応白人種よりも数値的に高いＰＴＨレベルを有した。この差は、本明細書に使用したサンプルにおいては統計的に有意ではなかったが、このコホートからのより大規模なサンプルにより、黒人種個体において有意に高いＰＴＨレベルを確認した（１４）。バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄは、人種による差はなかったが、ＰＴＨとは逆関連し、ＰＴＨにおける人種差は、主に、２５（ＯＨ）Ｄにおける差によってもたらされるのではないことを示唆した。実際に、黒人種におけるＰＴＨのレベルは、２５（ＯＨ）Ｄ充足の状態でさえも、白人種のものよりも高いことが発見されている（１３）。

【０１８５】

いくつかの研究は、進行したＣＫＤおよびＥＳＲＤにおける低い２５（ＯＨ）Ｄレベルの代謝結果を評価するように試みたが、矛盾する結果をもたらした。２５（ＯＨ）Ｄレベルを増加させることが可能な栄養性ビタミンＤの形態であるエルゴカルシフェロールは、ステージ３のＣＫＤにおいて副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）レベルに影響を及ぼすが、ステージ４では及ぼさないと見られる（１５，１６）。さらに、ＥＳＲＤにおいて２５（ＯＨ）ＤレベルとＰＴＨとの間に有意な関連性を示した研究もあるが（１７－１９）、示さなかったものもある（２０，２１）。２５（ＯＨ）Ｄと血清カルシウムとの間の関連性は、同様に入り混じっていた（２，１７，２２）。

【０１８６】

この矛盾するデータは、豊富な２５（ＯＨ）Ｄ（例えば、コレカルシフェロールまたはエルゴカルシフェロール等のビタミンＤの栄養性形態で）が、ＥＲＳＤを有する患者の管理に果たす役割についての混乱をもたらしたという結論をもたらす（２３，２４）。ビタミンＤ欠乏症の役割を研究し、充足によって利益を得る可能性が高い患者を特定するためには、生物学的に関連するビタミンＤ状態の尺度を有することが非常に重要である。特に、本明細書に記載の実験は、総またはバイオアベイラブル１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄと、関連する鉱質代謝の測定値との間に有意な関連性を見出すことができず、活性ホルモンの循環血清レベルが、ビタミンＤ状態の尺度として有用でないという全体的な総意を反映した（１）。

【０１８７】

生存率とビタミンＤ状態との間の関係は見出されなかったが、このサンプルは、重度のビタミンＤ欠乏症（典型的に定義されるレベルは＜１０ｎｇ／ｍｌ）が、死亡率の増加と関連することを見出した先行研究よりも、この関係を検出する能力が著しく低かった（１９，２５，２６）。

【０１８８】

２００４年または２００５年に透析を導入したこの分析の個人は全て、活性化したビタミンＤでの治療を透析導入前に受けていなかった。

【０１８９】

ＰＴＨは、透析患者の代謝性骨疾患のプロキシとして広く使用されるが、骨疾患との関連性は不完全である（２７）。骨生検ならびに骨密度および構造の非侵襲的測定は、この研究においては利用不可能であり、今後の分析の潜在的な目標である。本明細書の実施例１に記載のように、健常集団におけるバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄと骨密度と間の関係（６）が示されているが、鉱質代謝における既知の変化を考慮すると、この関係がＥＳＲＤにまで及ぶかについては不確かである。ＥＳＲＤおよび／または透析、ならびにＤＢＰもしくは他のタンパク質における遺伝的変異を伴う代謝性変化は、２５（ＯＨ）ＤのＤＢＰへの結合に影響を及ぼす可能性がある。感度分析は、これらの因子が、この研究の基本的発見に影響を及ぼす可能性が高いことを示さなかったが、結合および未結合の分画

を直接測定する研究は、本明細書に使用される初期推定値および方程式を改善し得る。最後に、この研究の測定した２５（ＯＨ）Ｄレベルは、２４，２５（ＯＨ）$_2$Ｄのレベルに影響された。２５（ＯＨ）Ｄ、２４，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ、および１，２４，２５（ＯＨ）$_3$Ｄを区別することが可能なアッセイを用いた本明細書に記載の発見を確認することにより、これらの生物学的関係をさらに解明することができる。

【０１９０】

この研究は、総ビタミンＤレベルではなく、バイオアベイラブルビタミンＤのレベルが、鉱質代謝に対するその作用に関して、より関連性のあるビタミンＤ状態の尺度であり得るという概念を裏付けるさらなる根拠を提供する。鉱質代謝は、ビタミンＤの作用の従来的な焦点であったが、最近のデータは、その作用が、特に、免疫応答（２８）、高血圧（２９）、およびインスリン感受性（３０）への影響を伴って、より広範であり得ることを示唆する。

方法

【０１９１】

Ａｃｃｅｌｅｒａｔｅｄ Ｍｏｒｔａｌｉｔｙ ｏｎ Ｒｅｎａｌ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＡｒＭＯＲＲ）は、Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｃａｒｅ，Ｎｏｒｔｈ Ａｍｅｒｉｃａ（ＦＭＣ）によって運営される、米国の１，０５６の透析センターのうちの１つにおいて、２００４年７月１日から２００５年７月３０日に腎代替法を開始した新規慢性血液透析患者（ｎ＝１０，０４４）の全国代表的な前向きコホート研究である（３１）。ＡｒＭＯＲＲのデータセットは、併在する病状、研究室結果、ならびに血清および血漿試料を含む、広範囲の人口統計および臨床データを含む。臨床データを、前向きに収集し、診療時に実務者によって中央データベースに一様に入力した。Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓに到着した全ての臨床データは、厳格なデータ品質保証および品質管理（ＱＡ／ＱＣ）の監査を受ける。臨床診療のために収集した血液試料を、中央研究室に送り、処理した（Ｓｐｅｃｔｒａ Ｅａｓｔ，Ｒｏｃｋｌａｎｄ，ＮＪ，ＵＳＡ）。定期的な臨床試験用に処理した後、残存試料を、氷上で、ＡｒＭＯＲＲの調査員に送付し、そこで試料をアリコートに分け、液体窒素中で保存した。この研究は、Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ Ｒｅｖｉｅｗ Ｂｏａｒｄ ｏｆ ｔｈｅ Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ Ｇｅｎｅｒａｌ Ｈｏｓｐｉｔａｌによって承認されており、そのためインフォームドコンセントの要件が免除され、その倫理基準およびヘルシンキ宣言に従って行われた。

【０１９２】

研究集団。２００４年７月１日から２００５年６月３０日までに、１０，０４４人の新規血液透析患者を、ＡｒＭＯＲＲに前向きで登録した。症例対照研究の一部として２５（ＯＨ）Ｄおよび１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄのレベルが既に測定された対象者を特定した（１９）。健常集団での以前の結果に基づいて、最小の試料サイズを８０人の対象者に設定した。人種比較に十分な検出力を確保するために、おおよそ同じ数の黒人種（ｎ＝２４）および白人種（ｎ＝２３）の患者を対照から無作為に選択し、同じ数の人種適合症例を選択した。したがって、合計の試料サイズは、ｎ＝９４であった。ベースライン研究室値を、透析導入の１４日以内に収集した試料から測定した。

【０１９３】

アッセイ。総２５（ＯＨ）Ｄおよび１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄは、市販利用可能な放射免疫測定法（ＤｉａＳｏｒｉｎ Ｉｎｃ，Ｓｔｉｌｌｗａｔｅｒ，ＭＮ，ＵＳＡ）を使用して、解凍した試料から二重に事前測定した。２５（ＯＨ）Ｄに対するアッセイ間の変動係数（ＣＶ）は、＜３０ｎｇ／ｍｌのレベルで＜３％であり、１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄについては、＜３２．５ｐｇ／ｍｌのレベルで＜６．５％であった。インタクトなＰＴＨ（１－８４）を、集中研究室によってＮｉｃｈｏｌｓ Ａｄｖａｎｔａｇｅ Ｂｉｏｉｎｔａｃｔ－ＰＴＨアッセイを使用して測定した。

【０１９４】

ＤＢＰを、製造業者の説明書に従って、市販の酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）

（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ，Ｃａｔａｌｏｇ　Ｎｕｍｂｅｒ　ＤＶＤＢＰ０）によって、解凍した血清試料において二重に測定した。アッセイは、血清試料をＣａｌｉｂｒａｔｏｒ　Ｄｉｌｕｅｎｔ　ＲＤ６－１１（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｐａｒｔ　Ｎｕｍｂｅｒ　８９５４８９）で１：２，０００に希釈した後に、実行した。アッセイ間のＣＶは、４０μｇ／ｍｌの濃度で８．５％であった。アッセイにより、２５～２００μｇ／ｍＬの内因性ＤＢＰを含有するヒト血清試料に添加した１００～２００μｇ／ｍＬ用量の外因性ＤＢＰの９３～１１０％を回収した。黒人種患者または肥満患者において、外因性ＤＢＰの回収に差はなかった。製造業者は、ヒトアルブミンまたはビタミンＤ３との有意な交差反応を報告していない。ＤＢＰレベルは、透析の１年目以内に死亡した５人の黒人種患者において、検出限度を下回った。これらの個体は、最低検出可能レベルと等しいＤＢＰ値に割り当てた（１２．３μｇ／ｄｌ）。

【０１９５】

バイオアベイラブルビタミンＤの計算。平衡透析および遠心限外濾過透析は、複数の調査員によって、遊離ビタミンＤレベルを間接的に測定するために既に使用されており、ＤＢＰおよびアルブミンに対する２５（ＯＨ）Ｄおよび１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄの結合親和性定数の推定を可能にしている（４，５，３２）。これらの研究において、遊離２５（ＯＨ）Ｄの計算によるレベル、および遠心限外濾過によって測定したレベルは、高く相関していた（ｒ＝０．９２５）（５）。バイオアベイラブルビタミンＤおよび遊離ビタミンＤは、本明細書の実施例１に記載のように計算した。

【０１９６】

バイオアベイラブル１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄのレベルを、遠心限外濾過透析によって事前に導出した親和性定数を使用して、同じアプローチを用いて判定した（４）。これらの親和性定数は、健常および肝硬変の両方の個体においては、既に検証済みであったが（４，５）、血液透析患者においては直接的に評価されていなかった。したがって、主な発見の感度分析は、以前に測定した値よりも２５％高いか、または２５％低い２５（ＯＨ）Ｄおよび１，２５（ＯＨ）$_2$ＤのＤＢＰ結合係数を使用して行った。

【０１９７】

統計分析。分析の前に、ビタミンＤおよびカルシウムの両方に対する結合タンパク質としてのアルブミンの役割を考慮し、血清カルシウムレベルを、次の方程式を使用して補正した：補正カルシウム＝総カルシウム＋０．８＊（４－アルブミン）（３４）。スピアマンの相関分析を行って線形関連を評価した。ビタミンＤレベルの群比較を、ウイルコクソンの順位和検定を使用して行った。バイオアベイラブルビタミンＤとＰＴＨとの間の多変数の関連性を試験するために、両方の変数（非正規分布のため）を、自然対数変換し、多変量線形回帰を使用して分析した。全ての分析は、ＳＴＡＴＡ　Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ（Ｃｏｌｌｅｇｅ　Ｓｔａｔｉｏｎ，ＴＸ）バージョン１１を使用して行った。

【０１９８】

参考文献

1. Holick MF. Vitamin D deficiency. N Engl J Med. 2007 Jul. 19;357(3):266-281.
2. Bhan I, Burnett-Bowie S-AM, Ye J, Tonelli M, Thadhani R. Clinical measures identify vitamin D deficiency in dialysis. Clin J Am Soc Nephrol. 2010 Mar.;5(3):460-467.
3. Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. Endocr Rev. 1989 Aug.;10(3):232-274.
4. Bikle DD, Siiteri PK, Ryzen E, Haddad J, Gee E. Serum Protein Binding of 1,25-Dihydroxyvitamin D: A Reevaluation by Direct Measurement of Free Metabolite Levels. J Clin Endocrinol Metab. 1985 Nov. 1;61(5):969-975.
5. Bikle DD, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, Haddad JG. Assessment of the Free Fraction of 25-Hydroxyvitamin D in Serum and Its Regulation by Albumin and the Vitamin D-Binding Protein. J Clin Endocrinol Metab. 1986 Oct. 1;63(4):954

-959.
6. Powe CE, Ricciardi C, Berg AH, Erdenesanaa D, Collerone G, Ankers E, et al. Vitamin D-binding protein modifies the vitamin D-bone mineral density relationship. J Bone Miner Res. 2011 Jul.;26(7):1609-1616.
7. Powe CE, Seely EW, Rana S, Bhan I, Ecker JL, Karumanchi SA, et al. First trimester vitamin D, vitamin D binding protein, and subsequent preeclampsia. Hypertension. 2010 Oct.;56(4):758-763.
8. Chun RF, Lauridsen AL, Suon L, Zella LA, Pike JW, Modlin RL, et al. Vitamin D-binding protein directs monocyte responses to 25-hydroxy- and 1,25-dihydroxyvitamin D. J Clin Endocrinol Metab. 2010 Jul.;95(7):3368-3376.
9. Bikle DD, Gee E. Free, and not total, 1,25-dihydroxyvitamin D regulates 25-hydroxyvitamin D metabolism by keratinocytes. Endocrinology. 1989 Feb.;124(2):649-654.
10. Safadi FF, Thornton P, Magiera H, Hollis BW, Gentile M, Haddad JG, et al. Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. J Clin Invest. 1999 Jan.;103(2):239-251.
11. Hammes A, Andreassen TK, Spoelgen R, Raila J, Hubner N, Schulz H, et al. Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. Cell. 2005 Sep. 9;122(5):751-762.
12. Lundgren S, Carling T, Hjalm G, Juhlin C, Rastad J, Pihlgren U, et al. Tissue distribution of human gp330/megalin, a putative Ca(2+)-sensing protein.J. Histochem. Cytochem. 1997 Mar.;45(3):383-392.
13. Gutierrez OM, Farwell WR, Kermah D, Taylor EN. Racial differences in the relationship between vitamin D, bone mineral density, and parathyroid hormone in the National Health and Nutrition Examination Survey. Osteoporosis Int. 2011 Jun.;22(6):1745-1753.
14. Wolf M, Betancourt J, Chang Y, Shah A, Teng M, Tamez H, et al. Impact of Activated Vitamin D and Race on Survival among Hemodialysis Patients. J Am Soc Nephrol. 2008 Apr. 9;19(7):1379-1388.
15. Zisman AL, Hristova M, Ho LT, Sprague SM. Impact of Ergocalciferol Treatment of Vitamin D Deficiency on Serum Parathyroid Hormone Concentrations in Chronic Kidney Disease. Am J Nephrol. 2007;27(1):36-43.
16. Al-Aly Z, Qazi RA, Gonzalez EA, Zeringue A, Martin KJ. Changes in serum 25-hydroxyvitamin D and plasma intact PTH levels following treatment with ergocalciferol in patients with CKD. Am J Kidney Dis. 2007 Jul. 1;50(1):59-68.
17. Jean G, Charra B, Chazot C. Vitamin D Deficiency and Associated Factors in Hemodialysis Patients. J Ren Nutr. 2008 Sep.;18(5):395-399.
18. Ravani P, Malberti F, Tripepi G, Pecchini P, Cutrupi S, Pizzini P, et al. Vitamin D levels and patient outcome in chronic kidney disease. Kidney Int. 2009 Jan. 1;75(1):88-95.
19. Wolf M, Shah A, Gutierrez O, Ankers E, Monroy M, Tamez H, et al. Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients.Kidney Int. 2007 Oct. 1;72(8):1004-1013.
20. Gonzalez EA, Sachdeva A, Oliver DA, Martin KJ. Vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease. A single center observational study. Am J Nephrol. 2004 Aug.;24(5):503-510.
21. London GM, Guerin AP, Verbeke FH, Pannier B, Boutouyrie P, Marchais SJ, et al. Mineral metabolism and arterial functions in end-stage renal disease: potential role of 25-hydroxyvitamin D deficiency. J Am Soc Nephrol. 2007 Feb.1;18(2):613-620.

22. London GM, Marty C, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F, de Vernejoul M-C. Arterial calcifications and bone histomorphometry in end-stage renal disease. J Am Soc Nephrol. 2004 Jul. 1;15(7):1943-1951.
23. Nigwekar SU, Bhan I, Thadhani R. Nutritional vitamin D in dialysis patients: what to D-iscern? Nephrology Dialysis Transplantation. 2011 Mar.;26(3):764-766.
24. Bhan I, Hewison M, Thadhani R. Dietary vitamin D intake in advanced CKD/ESRD. Semin Dial. 2010 Jun.;23(4):407-410.
25. Drechsler C, Pilz S, Obermayer-Pietsch B, Verduijn M, Tomaschitz A, Krane V, et al. Vitamin D deficiency is associated with sudden cardiac death, combined cardiovascular events, and mortality in haemodialysis patients. Eur Heart J. 2010 Sep.;31(18):2253-2261.
26. Drechsler C, Verduijn M, Pilz S, Dekker FW, Krediet RT, Ritz E, et al. Vitamin D status and clinical outcomes in incident dialysis patients: results from the NECOSAD study. Nephrol Dial Transplant. 2011 Mar.;26(3):1024-1032.
27. Ott SM. Review article: Bone density in patients with chronic kidney disease stages 4-5. Nephrology. 2009 Jun.;14(4):395-403.
28. Bhan I, Camargo CA, Wenger J, Ricciardi C, Ye J, Borregaard N, et al. Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and human cathelicidin in healthy adults. J Allergy Clin Immunol. 2011 May;127(5):1302-4.e1.
29. Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willett WC, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. Hypertension. 2007 May;49(5):1063-1069.
30. Chonchol M, Scragg R. 25-Hydroxyvitamin D, insulin resistance, and kidney function in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Kidney Int. 2007 Jan. 1;71(2):134-139.
31. Gombart AF, Bhan I, Borregaard N, Tamez H, Camargo CA, Koeffler HP, et al. Low plasma level of cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18) predicts increased infectious disease mortality in patients undergoing hemodialysis. Clin.Infect. Dis. 2009 Feb. 15;48(4):418-424.
32. van Hoof HJ, Swinkels LM, Ross HA, Sweep CG, Benraad TJ. Determination of non-protein-bound plasma 1,25-dihydroxyvitamin D by symmetric (rate) dialysis. Anal. Biochem. 1998 May 1;258(2):176-183.
33. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. J Clin Endocrinol Metab. 1999 Oct.;84(10):3666-3672.
34. Correcting the calcium. Br Med J. 1977 Mar. 5;1(6061):598.

実施例３：妊娠中の女性におけるバイオアベイラブルビタミンＤ

【０１９９】

ＭＯＭＳコホートに登録された妊娠中の女性における試験的研究を行い、ＶＤＢＰが、第１三半期の２５（ＯＨ）Ｄレベルと、その後の子癇前症または妊娠性糖尿病の発症との間の関係を変化させるかどうかを判定した。妊娠中の女性の試料サイズは小さかったが、総２５（ＯＨ）Ｄレベルは、白人非ヒスパニック人種（３２．１［２６．３～３６．６］ｎｇ／ｍＬ、ｎ＝１２７、全ての比較に対してＰ＜０．０３）と比較して、黒人種（１８．８［１０．８～２４．２］ｎｇ／ｍＬ、ｎ＝９）、ヒスパニック人種（２１．４［１６．７～２７．７］ｎｇ／ｍＬ　ｎ＝６１）、およびアジア人種（２２．５［１４．８～２９．７］ｎｇ／ｍｌ、ｎ＝８）の中で有意に低かった。ＶＤＢＰレベルは、黒人種（９７．２［７３．６～３６１．２］μｇ／ｍｌ）において、白人種（５０４［３３８－７００］μｇ／ｍｌ、Ｐ＜０．００１）と比較して有意に低かった。バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄレベルは、白人種および黒人種の対象において類似であった。

実施例４：バイオアベイラブルビタミンＤおよび人種変動性

【０２００】

黒人種の個人は、一貫して低い２５－ヒドロキシビタミンＤ（２５［ＯＨ）Ｄ］レベルを有し[１５－１９]、ビタミンＤの充足関連の不良転帰の危険性が特に高い[１５]。逆説的に言うと、黒人種は、白人種よりもＢＭＤが高く、骨粗鬆症の危険性が低い[２０]。２５（ＯＨ）Ｄは、現在ビタミンＤ状態の評価に最も好適であると考えられているマーカーであるが[２，２１]、研究は、黒人種および他の少数人種においては、白人種と比較して弱い２５（ＯＨ）ＤとＢＭＤとの関係を示した[１８，１９，２２，２３]。重要なことに、黒人種におけるＢＭＤ－ビタミンＤの関係は、明確性が要求され[１８～２０]、臨床的に関連するビタミンＤ欠乏症を定義する方法、ビタミンＤ状態の測定における人種の影響、疾患の転帰に良い影響を与えるためにビタミンＤの補給を必要とする人物（およびその量）を確実に特定する方法についての問題は、未解決のままである[２，１５]。

【０２０１】

本明細書に記載の研究は、ビタミンＤが欠損している人物を再定義し、診断ならびに予防および治療のための戦略の効果を有意に改善する可能性を有する。バイオアベイラブルビタミンＤに関する遊離ホルモンの仮説をもたらす仮説は、Ｈｅａｌｔｈｙ Ａｇｉｎｇ ｉｎ Ｎｅｉｇｈｂｏｒｈｏｏｄｓ ｏｆ Ｄｉｖｅｒｓｉｔｙ ａｃｒｏｓｓ ｔｈｅ Ｌｉｆｅ Ｓｐａｎ（ＨＡＮＤＬＳ）の研究に登録された黒人種および白人種の対象の大規模なコホートを使用して調査することが可能である。種々の集団（健常志願者、末期腎疾患（ＥＳＲＤ）を有する個体、妊娠中の女性）において、本明細書の実施例１、２、および３に記載の研究により、ＶＤＢＰ、総２５（ＯＨ）Ｄを測定し、遊離２５（ＯＨ）Ｄを計算した。これらの結果は、２５（ＯＨ）Ｄレベルが、ＶＤＢＰレベルと直接相関し、遊離２５（ＯＨ）Ｄレベルと逆相関することを示す。データはまた、ＶＤＢＰレベルにおける実質的な人種差を明らかにする。黒人種は、白人種よりも２５～６０％低いＶＤＢＰレベルを有したが、一方で遊離２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄのレベルは類似であった。健常成人において、非ＶＤＢＰ結合２５（ＯＨ）Ｄレベルは、ＢＭＤと強く関連したが、総２５（ＯＨ）ＤレベルおよびＰＴＨは関連しなかった[２３]。ＥＳＲＤを有する患者において、人種で調整した後、ＶＤＢＰおよび遊離２５（ＯＨ）Ｄの両方がＰＴＨと関連した（しかしながら、総２５（ＯＨ）Ｄは関連しなかった）[３１]。未結合および総２５（ＯＨ）ＤとＢＭＤとの間のこれらの相関性（またはその欠如）、ならびにＶＤＢＰレベルにおける人種差は、ＶＤＢＰがＢＭＤと２５（ＯＨ）Ｄとの間の関係を変化させるという仮説をもたらした[２３]。総２５（ＯＨ）Ｄは、生理学的に関連するビタミンＤ状態を、特に、ＢＭＤに関しては、忠実に反映することができ得ず、全人種における２５（ＯＨ）Ｄの臨床的関連に疑問を呈する[３３]。

【０２０２】

ＶＤＢＰレベルは、黒人種におけるＢＭＤ－ビタミンＤの矛盾を説明する、これまでに認識されていない関連性であり得る。ＨＡＮＤＬＳに登録された黒人種および白人種対象から保存した血液試料を使用して（ｎ約２，２００）、次の仮説を試験した。１．黒人種は、より低いＶＤＢＰレベルおよび総２５（ＯＨ）Ｄレベルを有するが、遊離２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄのレベルは、白人種と類似である。２．遊離２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄレベルは、黒人種および白人種において、独立してＢＭＤと関連し、逆および線形でＰＴＨレベルと関連し、これらの関連性は、総２５（ＯＨ）ＤとＢＭＤのものよりも強力である。

【０２０３】

目標１：黒人種と白人種において、ＶＤＢＰ、総およびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ、ならびにＰＴＨのレベルを判定すること。

目標２：黒人種と白人種において、総２５（ＯＨ）Ｄと比較して、ＢＭＤ、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ、およびＰＴＨの間の関連性を試験すること。

【０２０４】

本明細書に記載の研究は、（１）十分に確立されたホルモン生物学の機序を適用し、（２）バイオアベイラブル／遊離２５（ＯＨ）Ｄが、総２５（ＯＨ）Ｄよりも強く結果と関連することを示し、（３）ビタミンＤ欠乏症を再定義することになる今後の臨床試験計画を促進することができ、（４）人種に基づいて診断および治療を個別化して限られた医療資源の治療および費用効率を改善することを目的とし、（５）ビタミンＤが欠損している人物、治療が必要な人物、および治療を避けることができる人物に関する、臨床的判断に対する現在の公衆衛生のパラダイムに疑問を呈する。

【０２０５】

２５（ＯＨ）Ｄ欠乏症は、黒人種においては、白人種よりもさらに一般的である。２５（ＯＨ）Ｄの観点からビタミンＤの欠損を定義する現在のカットオフに従うと、おおよそ米国のアフリカ系アメリカ人の５０％は、慢性的または季節的のいずれかで危険性がある[48]。ビタミンＤ状態における、黒人種と白人種との間の人種的格差は、不十分な食事摂取または皮膚色素沈着のため日光によるビタミンＤの変換の低下から生じ得る[16]。Ｈｏｌｉｃｋ[48]は、ボストンでは、６５歳超の黒人種の男女の８４％が、通常はビタミンＤレベルが最高である夏の終わりに、ビタミンＤが欠損していたことを報告した。欠損は、ラクトース不耐性による不十分な牛乳の摂取、色素沈着による皮膚でのビタミンＤ３合成の低下、および皮膚色素沈着を最小限に抑えるため日光暴露の回避を含む、複数の要因によるものであった[48]。１９８８年～１９９４年のＮａｔｉｏｎａｌ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ Ｅｘａｍｉｎａｔｉｏｎ Ｓｕｒｖｅｙ（ＮＨＡＮＥＳ）ＩＩＩによると、黒人女性の４２％（１５～４９歳）が、白人種の４％と比較して、冬の終わりにビタミンＤが欠損していた[49]。異なる季節に測定して２５（ＯＨ）Ｄの血清中の濃度は、黒人種において、白人種よりも、全季節を通じて実質的に低いレベル（体重およびビタミンＤ摂取で調整）、および夏の数か月間の少ない季節的増加を示した[50]。これらの人種差は、より最近のＮＨＡＮＥＳ２００１年～２００６年のデータにおいて強まっている[22，51]。表９は、黒人種と白人種におけるビタミンＤレベルを報告する、いくつかの代表的な研究を要約する。ほとんどの研究において、人種間の相違は、１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄレベルには及ばず、概して、黒人種と白人種で類似である[50，52]。

【０２０６】

本明細書の実施例２に記載のように、ＡｒＭＯＲＲ（あらゆるビタミンＤ補充前の透析導入時点におけるＥＳＲＤ患者を含む、Ａｃｃｅｌｅｒａｔｅｄ Ｍｏｒｔａｌｉｔｙ ｉｎ Ｒｅｎａｌ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ）は、平均の２５（ＯＨ）Ｄレベルが、白人種（ｎ＝６５３）においては２３．２±１３．７（標準偏差）ｎｇ／ｍＬであり、黒人種（ｎ＝３７２）においては１６．９±１０．９であったことを示した（Ｐ＜０．０５）。類似の結果が、ＡｒＭＯＲＲから無作為に選択した人種適合試料から得られ、総２５（ＯＨ）Ｄは、白人種（ｎ＝２３）で２７．３±１５．３ｎｇ／ｍＬであり、黒人種（ｎ＝２４）で１６．４±１０．１であった（Ｐ＝０．００４）[31]。（１）ビタミンＤ欠乏症の発症は、一貫して白人種よりも黒人種で高く、（２）欠乏症を定義するために使用される総２５（ＯＨ）Ｄカットオフレベルの範囲が広範であり、（３）鉱質マーカーを有する２５（ＯＨ）ＤとＢＭＤとの間の相関性が欠けているとすると[23，40]、診断および治療に対する総２５（ＯＨ）Ｄへの継続した依存の公衆衛生的意義は広範である。ビタミンＤ欠損状態の診断および補給に使用されるマーカーは、人種的に多様な集団に適正なものでなくてはならない。実施例２に記載のデータに基づいて、総２５（ＯＨ）Ｄが、全ての人種に均一に適用可能ではないという仮説を立てる。ビタミンＤ欠乏症の定義は、再考する必要がある。

【０２０７】

異なる人種間におけるビタミンＤ状態の理解を改善することは、広範に有意な治療的および公衆衛生的意義を有することが期待される。具体的には、ビタミンＤ生物学に関する知識を向上させることにより、ビタミンＤ補充に対するＩＯＭの公衆衛生的位置づけを、ビタミンＤの目標値を判定する際に、人種およびＶＤＢＰレベルを考慮するように改善することができる。

【０２０８】
発明者らは、高齢の入院患者のＰＴＨにおいて、ＰＴＨと総２５（ＯＨ）Ｄとの間の曲線関係を既に報告している[４０]。ＰＴＨは、総２５（ＯＨ）Ｄレベル＜１５ｎｇ／ｍＬに逆相関していた。類似の逆相関が、新規透析患者の大規模（ｎ＝８２５）コホートに観察された[４３]。より高い総２５（ＯＨ）Ｄレベル（≧１５ｎｇ／ｍＬ）では、ＰＴＨとの相関は、それほど明確ではなかった[４０]。実施例１に記載のように、平均の総２５（ＯＨ）Ｄレベルが２５．７±１１．１ｎｇ／ｍＬ（６４．２±２７．７ｎｍｏｌ／Ｌ）であった若齢の健常対象では、ＰＴＨは、総、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ、またはＢＭＤと相関しなかった。これは、遊離またはバイオアベイラブル２５（ＯＨ）ＤレベルとＢＭＤとの間の関連性が、ビタミンＤ状態が比較的正常である個体において、ＰＴＨを介して媒介されるものではないことを示唆する。しかしながら、比較的小規模な健常対象の試料サイズのため、これらの相関性は、明白ではない可能性がある。実施例２は、人種で調整した後に、遊離２５（ＯＨ）ＤはＰＴＨと相関する（しかし、総２５［ＯＨ］Ｄは相関しない）ことを示す。

【０２０９】
大規模なＨＡＮＤＬＳデータセット（ｎ約２，２００）を使用して、ＰＴＨが、遊離またはバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄと、総２５（ＯＨ）Ｄよりも良好に線形相関することを示すかどうかを判定することができる。さらに、これらの変数間に人種差が存在するかどうかという問題を検討することができる。ＨＡＮＤＬＳコホートにおける経時変化について、ベースラインのＢＭＤ測定値を有する対象を経過観察することにより、異なる人種群におけるＢＭＤの変化を最良に予測するビタミンＤの尺度を特定することができる。

【０２１０】
黒人種が、ビタミンＤのレベルは他の人種よりも低いながらも、ＢＭＤが高いのは何故か？２５（ＯＨ）Ｄレベルが低いにもかかわらず、黒人種は、白人種よりもＢＭＤが高く[１９，２０]、骨粗鬆症性骨折の危険性が低い[２０，５８，５９]。ビタミンＤ以外の要因一因となっている可能性はあるが、黒人種は、２５（ＯＨ）Ｄが低い場合でさえも、骨格を保護する適応反応を有するという仮説が立てられている１６。副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）活性に対する骨格の耐性および活性ビタミンＤ（１，２５ジヒドロキシビタミンＤ［１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ］）の有益な骨格作用を促進する骨温存適応が、この矛盾を説明するために提示されている[１６]。例えば、中程度に低い２５（ＯＨ）Ｄは、腎臓内でＰＴＨの刺激による１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄの合成を誘発することができる[６０，６１]。ＮＨＡＮＥＳ２００３年～２００６年からのデータを使用して、Ｇｕｔｉｅｒｒｅｚと同僚らは[２２]、白人種およびメキシコ系アメリカ人種においては、血清２５（ＯＨ）Ｄおよびカルシウムの摂取によりＢＭＤが低下したが（ｐ＜０．０１）、黒人種では低下しなかった（ｐ＝０．２）ことを観察した[２２]。２５（ＯＨ）Ｄ、ＢＭＤ、およびＰＴＨの間の関係が、人種によって異なることを提示した。他の研究もまた、黒人種における２５（ＯＨ）ＤとＢＭＤとの間の関係が、白人種よりも弱いか、または存在しないことを示している[１８，１９]。

【０２１１】
黒人種では、非黒人種よりも高いＰＴＨレベルが報告されている[２２，３１]。より低いＰＴＨは、尿中カルシウム損失を最小限に抑え、１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ活性を増加させるための適応である、低い２５（ＯＨ）Ｄと関連する可能性がある。しかしながら、ＰＴＨレベルにおける人種差は、総２５（ＯＨ）Ｄが高い場合ですら存在し[２２]、２５（ＯＨ）ＤによるＰＴＨの抑制は、黒人種においては、非黒人種と比べてより低い閾値で生じ得る[２２，６２]。したがって、ＢＭＤと総２５（ＯＨ）Ｄレベルとの間の人種差に加えて、ＰＴＨならびに遊離２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄと総２５（ＯＨ）Ｄとの関係もまた、人種によって異なり得る。ＶＤＢＰの仮説が、これらの関係を説明するか、またはさらなる理解を助けるであろうことを、本明細書に提示する。

【０２１２】

ＶＤＢＰ、２５（ＯＨ）Ｄ、およびＢＭＤの関係は、ヒトにおいて明確に確立されていないが、動物研究は、ＶＤＢＰが、ビタミンＤ代謝のバイオアベイラビリティ、活性化、および末端器官の反応性の割合を調節することに果たす役割[66]、ならびに黒人種におけるＢＭＤ－２５（ＯＨ）Ｄの矛盾に果たす役割を示唆する。すなわち、総２５（ＯＨ）Ｄレベルが低いにもかかわらず、黒人種における遊離２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄのレベルは、遊離ホルモンの仮説によって説明されるように、比較的低いＶＤＢＰ濃度の結果として、実際には、正常または正常よりも高い場合すらある。逆に、色素沈着の少ない皮膚は、環境からのビタミンＤの捕捉がより容易であり、高いＶＤＢＰレベルは、バイオアベイラブルビタミンＤを調節するための適応であり得る。遺伝的データはＨＡＮＤＬＳにおいて収集し、表現型の判定はＨＡＮＤＬＳ調査員によって行い、結果を査読済みの専門誌で公表した[67，68]。

【０２１３】

ヒトにおけるビタミンＤの生物学的活性に関する循環ＶＤＢＰレベルの有意性は、はっきりしていない[2，18，19，21，22，24～26，30]。ビタミンＤのバイオアベイラビリティに影響を及ぼすいくつかの性質は、脂溶性アンドロゲンホルモンのテストステロン（Ｔ）のものに類似である。循環中、総Ｔは、６０％が性ホルモン結合グロブリン（ＳＨＢＧ）に結合しているが、３８％はアルブミンに結合し、２％が遊離Ｔとして利用可能である[75]。非ＳＨＢＧ結合Ｔおよび遊離Ｔは、循環Ｔの生物学的に活性な成分である（バイオＴ）[76]。バイオＴの計算に使用される方法は、総Ｔ、アルブミン、ＳＨＢＧの測定値、およびそれらの結合定数を、３部結合の数学モデルへ含む。強い相関性が、測定したバイオＴと計算したバイオＴの間に存在する[77]。類似の方法を使用して、遊離およびバイオアベイラブルビタミンＤの濃度を、本明細書の実施例１およびその他の部分に記載のように、測定した親和性定数をＶＤＢＰおよびアルブミンに使用して計算した。計算した遊離Ｄの値は、Ｂｉｋｌｅらによって検証されたように、遊離Ｄの測定値と高く相関し[38，70]、循環遊離ビタミンＤ濃度の推定に使用することができる。

【０２１４】

ビタミンＤの種々の循環形態に関する研究は、ビタミンＤが，８５～９０％はＶＤＢＰに結合し、１０～５％はアルブミンに結合し、１％のみが遊離して循環していることを示した[70]。ビタミンＤの大部分がＶＤＢＰに結合していることを考慮すると、ＶＤＢＰがビタミンＤの生理学に果たす役割とは何であるか？複数の動物モデルは、ＶＤＢＰが、ビタミンＤの高親和性血清レザーバーとして重要であることを示した。ＶＤＢＰが欠損した動物は、ビタミンのための高親和性血清担体を全く有さず、この結果として、それらの血清ビタミン濃度が著しく低下し、高親和性担体がないため、それらは尿中にビタミンＤを急速に排出する。同時に、これらの事象は、ビタミンＤが低い食事を摂らせた場合、マウスにビタミンＤ欠乏症を急速に発症させる[66]。これらの動物は、食事ビタミンが欠けていると急速にビタミン欠乏症を発症する傾向にあるが、食事ビタミンＤが豊富な場合、動物はカルシウム恒常性を維持することができ、ビタミン欠乏症を患う様子はない。

【０２１５】

対照的に、ＶＤＢＰを発現するが糸球体限外濾過液からのＶＤＢＰの腎臓再吸収に必要な受容体を欠いている動物は、なおもさらに劇的な表現型を呈する。多量のＶＤＢＰ（およびアルブミン）が糸球体によって濾過される[72，78]。濾過されたＶＤＢＰおよびアルブミンは、通常、近位尿細管で回収されるが、メガリン／キュビリンに媒介されるエンドサイトーシスによるものである。メガリンがない場合、ビタミンＤは、ＶＤＢＰによって尿へ隔離され、ビタミンが豊富な食事を提供した場合でさえも、急速かつ完全なビタミン欠乏症をもたらし、カルシウム恒常性および骨疾患に重度の異常を発生させる[72]。

【０２１６】

これらの動物モデルから得られた結論は、ＶＤＢＰおよびそのエンドサイトーシス受容体が、血清レザーバーとして作用し、尿中への排出を阻止するための機序を提供するモデルを裏付ける。組織培養物および動物モデルの研究に基づくと、ＶＤＢＰが２５（ＯＨ）Ｄのその標的組織への細胞内送達に関与するかどうかは不確かである。２５（ＯＨ）Ｄに

対する細胞外ＶＤＢＰの高い親和性は、自発的解離および細胞内への拡散を阻止し得る。組織培養物での実験は、ビタミンＤ応答性の骨芽細胞または単球をビタミンＤで処置する場合、培地へのＶＤＢＰの追加が、実際に２５（ＯＨ）Ｄのエンドサイトーシスおよび細胞内シグナル伝達を阻害することを示した[７３，７４]。さらに、ＶＤＢＰ欠損マウスは、非常に低い血清ビタミン濃度を有するが、それらの食事中に十分なビタミンＤを提供した場合、それらは、カルシウム恒常性に問題を有することはなく、それらは、組織中に正常な量の１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄを蓄積する[７３]。

【０２１７】

これらの生化学、組織培養物、および動物モデルの研究は、ともに、ＶＤＢＰは、無意識の尿中への排出を阻止し、血清ビタミンレベルを維持し、食間に安定したビタミンＤ濃度を維持するが、それが、２５（ＯＨ）Ｄの細胞内送達またはそれの活性な１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄへの変換に必要ではないことを示唆する。ＶＤＢＰが、２５（ＯＨ）Ｄの細胞内送達に絶対的には必要ないとすると、アルブミンに結合した２５（ＯＨ）Ｄが、２番目に豊富な循環ビタミン形態であるため、腎臓および他の標的組織の近位尿細管へのビタミンＤ送達の別の経路を考慮する必要があり、それは、アルブミンに結合したビタミンＤのエンドサイトーシス送達である。アルブミンおよびＶＤＢＰは、同じタンパク質ファミリーに属し、それらはいずれも、メガリンおよびキュビリンをそれらのエンドサイトーシス受容体として共有する。ビタミンＤ送達およびその作用の最も重要な標的は、近位曲尿細管（ＰＣＴ）の上皮である。最近の証拠から、予想外にも、大量のアルブミンおよびＶＤＢＰが、糸球体基底膜を通じて濾過され、その後、近位尿細管で再吸収されることが明らかとなった[７９，８０]。ＰＣＴにおいて、アルブミンは、キュビリンに媒介されるエンドサイトーシスによって再吸収され[７９]、ＶＤＢＰは、メガリン結合によって取り込まれる（キュビリンもまた関与し得るが）[７２，７８]。メガリンおよびキュビリンは、同じ受容体複合体の一部であり、したがって、アルブミンおよびＶＤＢＰは、非常によく似たエンドサイトーシス経路を共有する。これらのタンパク質（およびそれらに結合した任意のビタミン）がいずれも、これほど大量に腎臓上皮に送達されるという事実は、いずれか１つが、細胞内ビタミン送達のビヒクルである得ることを示唆する。しかしながら、これらのタンパク質が取り込まれた時点で、アルブミンは、ＶＤＢＰと比較して低いその２５（ＯＨ）Ｄ親和性を考慮すると、拡散性２５（ＯＨ）Ｄの主要供給源であり得る。取り込まれたアルブミンの多くは、実際には、腎臓上皮を通じて輸送され、トランスサイトーシスによって循環に戻ることが、最近示された[８１]。アルブミンとＶＤＢＰ、およびそれらの共有エンドサイトーシス受容体の間の構造的および進化的な類似を考慮して、ＶＤＢＰもまた、トランスサイトーシスに関与するという仮説を立てる。

【０２１８】

上述の腎臓上皮細胞を通じたアルブミン（および場合によってはＶＤＢＰ）のトランスサイトーシスは、したがって、これらの細胞を、アルブミン流動の推定量に基づくと、細胞に毒性であろう量をリソソームで分解しなければならないという負担から解放する。トランスサイトーシスもまた、調節可能なビタミンＤの効率的な細胞内送達に理想的な自己分泌の機序を提供するため、この最近の発見は、メガリンを発現する標的組織におけるビタミンＤのバイオアベイラビリティに重要である。アルブミンが細胞を通過する際、それは、自発的解離を通じて２５（ＯＨ）Ｄを放出し、細胞内ＶＤＢＰ、ＣＹＰ２７Ｂ１　ヒドロキシラーゼ、およびＶＤＲ受容体に、近接するビタミンＤの供給源を提供する。対照的に、ＶＤＢＰは、尿細管上皮を通過する際、その結合したビタミンの多くを放出するべきではないが、尿からの２５（ＯＨ）Ｄの回収およびその循環への返却を確実にするであろう。

【０２１９】

ビタミンＤ生理学のこの代替モデルを考慮すると、総血清ビタミンＤの大部分がＶＤＢＰに結合しているため、およびＶＤＢＰに結合したビタミンはビタミン保管のための不活性な血清レザーバーとなるするので、総２５（ＯＨ）Ｄの測定値が総体内蓄積を示し得るとはいえ、総２５（ＯＨ）Ｄの血清濃度は、ビタミンの生物活性または欠乏症を反映する

とは限らない。非ＶＤＢＰ結合バイオアベイラブルビタミンＤは、一方で、より忠実なビタミンＤの充足度の指標であり得る。このモデルは、本明細書に上述の臨床研究の結果と一致しており、白人種と黒人種の対照間の２５（ＯＨ）Ｄの差およびＢＭＤにおける差を説明することが可能なモデルを提供する。

【０２２０】

骨粗鬆症を有する男性を、骨粗鬆を有しない男性と比較すると、Ａｌ－ｏａｎｚｉと同僚らは[24]、総２５（ＯＨ）Ｄ$_3$レベルは両群で類似であったが、骨粗鬆症を有さないものと対比して、それを有する男性では、ＶＤＢＰレベルが有意に高く（Ｐ＜０．００１）、計算した遊離２５（ＯＨ）Ｄ３および１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄ３は、有意に低かった（ｐ＜０．００００１）ことを発見した[24]。総２５（ＯＨ）Ｄ３レベルは、ビタミンＤ状態のおおまかな推定値のみを提供するのに対して、遊離ホルモンの測定値は、より生物学的に適切な情報を提供する。本明細書の実施例１（若齢健常成人、ｎ＝４９）に記載のように、ＢＭＤは、総２５（ＯＨ）Ｄと十分に相関しないが、その遊離２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄは、より一層強くＢＭＤと関連する。研究コホートにおけるＶＤＢＰ濃度の広い変動にもかかわらず、平均ＶＤＢＰレベルは、非白人種において、白人種対象と比較して有意に低かった（それぞれ、２．８７±２．０４、４．９４±２．４３、Ｐ＜０．００１）。本明細書の実施例２に示されるように、無作為に選択した人種適合ＥＳＲＤ患者の群は、ＶＤＢＰはまた、ＥＳＲＤにおいてビタミンＤ活性を媒介し得ることを示唆した。低いＶＤＢＰレベルは、白人種と対比して黒人種において見られた。血清カルシウムは、遊離２５（ＯＨ）Ｄおよび１，２５（ＯＨ）$_2$Ｄと相関したが、総２５［ＯＨ］Ｄとは相関せず、遊離２５（ＯＨ）ＤおよびＶＤＢＰレベルは、ＰＴＨと有意に関連したが、総２５［ＯＨ］Ｄは関連しなかった。本明細書の実施例３に記載のように、妊娠中の女性における研究もまた、白人種と対比して、黒人種においてより低いＶＤＢＰおよび総２５（ＯＨ）Ｄのレベルを明らかにしたが、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄは、人種にかかわらず類似していた。

【０２２１】

本明細書に記載のデータに基づいて、ＶＤＢＰが、ＢＭＤと２５（ＯＨ）Ｄとの関係を変化させると仮定する。より具体的には、非白人種における低下したＶＤＢＰの濃度は、本明細書および他の部分に一貫して報告されている、より低い総２５（ＯＨ）Ｄの平均濃度を説明し得る。より低いＶＤＢＰレベルのため、バイオアベイラブルビタミンＤは、正常であるか、またはさらに増加することになり、おそらく、白人種と比較して、黒人種において明らかに減少した骨粗鬆症の危険性を説明する。

【０２２２】

本明細書に記載の本発明は、１．他のステロイドホルモン研究（例えば、テストステロンおよび甲状腺ホルモン）において十分に確立されたホルモン生理学の機序を適用して、ビタミンＤの生物学的作用を説明し、２．数十年間臨床医を悩ませている複雑な問題を解決し、３．ビタミンＤ欠乏症が、低下したバイオアベイラブルビタミンＤのレベルによって再定義される、今後の臨床試験計画に影響を与える可能性が高く、４．長期にわたり、ビタミンＤ状態を判定するための代表的な基準とされてきた２５［ＯＨ］Ｄアッセイの適用性を進化させて、異なる人種における結果の混乱した不一致を解決し、ビタミンＤ状態に続く新規の代替法（遊離／バイオアベイラブルビタミンＤ）を提示し、５．診断および治療を、少なくとも人種および性別に基づいて個別化して、限られた医療リソースの治療的および費用効果を改善するべきであるという、現代の原理を推進する、革新的な仮説およびアプローチを組み込む。

【０２２３】

ＨＡＮＤＬＳ対象における仮説の試験。以下に記載される仮説を、ＨＡＮＤＬＳに登録された、ベースラインのＢＭＤ測定値を有する黒人種および白人種対照からの保管した血清試料中の総２５（ＯＨ）ＤおよびＶＤＢＰレベルを測定することによって、調査することができる（図５）３３。１．黒人種は、ＶＤＢＰレベルおよび総２５（ＯＨ）Ｄのレベルは低いが、遊離２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄのレベルは、

白人種と類似である。２．遊離２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄのレベルは、独立して、黒人種および白人種においてＢＭＤと関連し、ＰＴＨレベルと逆および線形で関連し、その関連性は、総２５（ＯＨ）ＤとＢＭＤのものよりも強力である。

【０２２４】

遊離およびバイオアベイラブルビタミンＤのレベルは、以下に示されるように、総２５（ＯＨ）Ｄ、ＶＤＢＰ、および血清アルブミンの測定値から計算することができる[３８，７０，７６]。データは、黒人種と白人種の対象において、ＢＭＤと遊離２５（ＯＨ）Ｄおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄとの間の関連性の存在、ならびに遊離および２５（ＯＨ）ＤとＰＴＨとの間の関連性について多変量分析を使用して、試験する。骨粗鬆症歴、年齢、性別、閉経前状態、喫煙およびアルコールの使用、経口でのビタミンＤおよびカルシウムの摂取、ビスホスフォネートの使用、運動、ならびに肥満度指数等の共変量で調整を行ってもよい。

【０２２５】

ＨＡＮＤＬＳ研究。ＨＡＮＤＬＳ研究は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎ ｏｆ Ａｇｉｎｇ Ｉｎｔｒａｍｕｒａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｐｒｏｇｒａｍ（ＮＩＡＩＲＰ）の一部として、行われている。２０年間の縦断的研究として計画され、ＨＡＮＤＬＳは、少数人種および貧困集団における加齢および健康の格差についての仮説を、多様な人種的、民族的、および経済的な群において、加齢と関連する病状の割合および危険性における差を評価することによって、試験するように設計される。社会経済的地位が高い、および低い、３，７２２人の黒人種および白人種の参加者の固定コホートからの身体的、遺伝的、生物学的、人口統計的、および精神生理学的パラメータに対するデータを収集した。

【０２２６】

研究されている集団。ＨＡＮＤＬＳの参加者は、年齢が３０～６４歳である地域在住の黒人種および白人種成人の固定コホートである。ＨＡＮＤＬＳにおける参加者は、ボルチモア市およびサウスボルチモアの地理的地域を含む、１２の所定の区域（隣接する人口調査標準地域群）から採用されている。集団は、年齢（３０～６４で５歳刻みの７つの集団）、性別、人種、および貧困状態によって指数化した社会経済的地位の４方向の要因交差を含む。

【０２２７】

利用可能な変数。ＨＡＮＤＬＳデータベースには、黒人種および白人種の参加者の世帯訪問調査から得られた、それらの健康状態、医療サービスの利用、心理社会的要因、栄養摂取、地域特性、および人口動態についての情報が含まれる。さらに、移動医学研究車両を、３年毎に配備し、同じ参加者からの、病歴および健康診断、食事の記録、認識評価、精神生理学評価に関して、心拍変動、動脈の厚さ、頸動脈超音波検査、筋肉強度および骨密度の測定、ならびに研究室での測定値（血液化学、血液学、酸化的ストレスの生体指標、および遺伝学研究のための生体材料）を含むデータを（約２０年にわたり）収集した。

【０２２８】

総２５（ＯＨ）Ｄ、ＶＤＢＰ、アルブミン、ＰＴＨの血清レベルを試験することが可能であり、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄを、ベースラインのＢＭＤ測定値（約２２００）を有する全ＨＡＮＤＬＳ対象において、計算する。ＶＤＢＰレベル、総２５（ＯＨ）Ｄ、およびＰＴＨレベルの間の関連性について、試験することができる。ベースライン評価に加えて、５回の３年毎の経過観察評価を、約２０年にわたるＨＡＮＤＬＳの一部として収集している。ＢＭＤおよび関連する結果（すなわち、骨粗鬆症、骨折）の探索的評価について、３年目で少なくとも１回の経過観察測定（および資金提供期間中で可能な限り多く）。

【０２２９】

利用可能な血液。おおよそ２，２００人のＨＡＮＤＬＳの参加者は、ベースラインのＢＭＤ測定値および保存血清試料を有する。経過観察のＢＭＤデータおよび３年目に収集さ

れた血液試料（および、財源が許す場合、可能であれば６年目のもの）を入手して、ＢＭＤおよび関連結果と、総、バイオアベイラブル、および遊離２５（ＯＨ）Ｄとの間の関連性を、時間とともに評価することができる。

【０２３０】

分析技術。ベースラインならびに３年目および６年目（実現可能な場合）に収集したＨＡＮＤＬＳの保管庫からの保存血清試料を使用することができる。総２５（ＯＨ）Ｄレベルは、高速液体クロマトグラフィー／質量分光光度分析によって測定することができる。アルブミンは、標準的な自動化プラットフォームで測定することができる。ＶＤＢＰは、本明細書の実施例１に記載のように、市販利用可能なＥＬＩＳＡ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）によって測定することができる。このアッセイについてのアッセイ間ＣＶおよびアッセイ内ＣＶは、それぞれ５．７％および７．４％である。

【０２３１】

計算した遊離２５（ＯＨ）Ｄの推定値を検証し、これらの方法が、黒人種および白人種の両方の対象に有効であるかどうかを試験するために、遊離２５（ＯＨ）Ｄを、前述のように、試料のサブセット（ｎ＝２００）において直接測定することができる[82]。血液試料の採取日が捕捉されるため、季節を、共変量としてビタミンＤ測定値のモデル化に含めることができる。

【０２３２】

ＰＴＨのアッセイは、電気化学発光免疫測定法「ＥＣＬＩＡ」を使用して、Ｃｏｂａｓ　Ｅ６０１分析装置（Ｒｏｃｈｅ　ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）において行うことができる。インタクトなＰＴＨを判定するためのアッセイは、ビオチニル化したモノクローナル抗体が、Ｎ末端フラグメント（１～３７）と反応し、ルテニウム複合体で標識化したモノクローナル抗体が、Ｃ末端フラグメント（３８～８４）と反応する、サンドイッチ試験の原理を採用する。試験は、３００μＬのＥＤＴＡ血漿を使用して行うことができ、これは、血清よりも安定した結果をもたらす。

【０２３３】

検出力の計算。黒人種と白人種の対象において、ＶＤＢＰ、総およびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ、ならびにＰＴＨのレベルを判定すること。検出力は、総２５（ＯＨ）Ｄ（対象となる一次変数）について、両側ｔ検定の黒人種と白人種の対象の差がα＝０．０５であると想定して、計算した。異なる人種群間でこの尺度を探索した先行研究はないが、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄは、総２５（ＯＨ）Ｄから導出され、対象となる二次変数であり、これは、信頼性のあるプロキシを成し得る。加重平均および標準偏差を、ＨＡＮＤＬＳ集団（比較的健康な集団、主に中年層）に予測されるものと類似の臨床的および人口統計的特徴を有する、合計で１４，４０２人の白人と７，７９０人の黒人から構成される、５つの報文から導出した[18，19，83－85]。これらの研究から、予測される平均および標準偏差を、白人種および黒人種間の総２５（ＯＨ）Ｄについて導出した（それぞれ、２８．０７±３．７１ｎｇ／ｍＬおよび１７．８８±１２．２８ｎｇ／ｍＬ）。ほぼ2，２００人のＨＡＮＤＬＳ対象の試料サイズは、無効測定値および欠測データの可能性があっても、０．８の検出力を有する目的の一次および二次変数を検出するのに適正であると予測できる（利用可能な観測の＜５％での推定値）。

【０２３４】

黒人種と白人種の対象において、総２５（ＯＨ）Ｄと比較して、ＢＭＤ、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ、およびＰＴＨの間の関連性について試験すること。全身ＢＭＤについての推定値を得るために、人種で層化した４０人の対象の無作為サンプルを、全身ＢＭＤおよび総２５（ＯＨ）Ｄの欠測がない全利用可能なＨＡＮＤＬＳ対象から選択した。検出力を、α＝０．０５で両側ｐ値を仮定して計算した。予備分析に基づいて、総２５（ＯＨ）Ｄと全身ＢＭＤの間に、白人種ではｒ＝０．２９、黒人種ではｒ＝０．２４が得られた。バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄと全身ＢＭＤとの間の相関が、約３０％高いと仮定して、ＭＡＣＳ研究の発見に基づくと２３、これらの変数間の線形関係は、白人種ではｒ＝０．３８、黒人種ではｒ＝０．３１であると推定することができる。これらの推定

値に基づいて、多重線形回帰分析について、白人種と黒人種で減少したR^2（それぞれ、R^2＝０．１４およびR^2＝０．１０）が、計算された。ほぼ２，２００人のＨＡＮＤＬＳ対象の試料サイズは、無効測定値および欠測データの可能性があっても、０．８の検出力を有する目的の一次および二次変数を検出するのに適正である（利用可能な観測の＜５％での推定値）。

【０２３５】

統計分析

【０２３６】

ＶＤＢＰ、総、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ、およびＰＴＨのレベルの予備試験には、観測範囲を通した値の妥当性の評価が含まれる。中心傾向および分散の測定値を記録することができる。ＶＤＢＰ、総、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ、およびＰＴＨレベルの初期試験は、高く右側に歪んだ分布を示したため、これらの変数は、いずれもサンプル全体に対するものである、分位点－分位点プロットおよびシャピロウイルク検定による試験等の視覚化技術の使用を通じて、正規性を評価し、人種によって層化することができる。ＶＤＢＰ、総、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ、およびＰＴＨレベルが、正規分布していることが見出された場合、黒人種と白人種の対象間の平均レベルを、２標本ｔ検定の使用を通じて比較することができる。それ以外の場合、黒人種と白人種の対象間の分布を、ウイルコクソンの順位和検定等の非パラメトリック統計の使用を通じて比較することになる。＜０．０５の両側ｐ値は、統計的に有意であると見なす。

【０２３７】

ＢＭＤは、値の妥当性について事前に試験することができ、中心傾向および分散の測定値を記録する。ＢＭＤの分布は、視覚化を通じて、および形式統計的検定を通じての両方で調査することができる。探索的データ分析を、散布図の使用を通じて行って、ＢＭＤ、総２５（ＯＨ）Ｄ、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ、およびＰＴＨの間の関係を調査することができる。変数間に線形関係が見出された場合、ピアソンの積率相関係数またはスピアマンの順位相関係数（異常値の場合）を使用して、ＢＭＤ、総２５（ＯＨ）Ｄ、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ、およびＰＴＨの間の関係を試験することができる。バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ、総２５（ＯＨ）Ｄ、ならびにＰＴＨおよびＢＭＤの間に見出された関係の強さに基づいて、多変数の線形回帰モデルを構築して、骨粗鬆症歴、年齢、性別、閉経前状態、喫煙およびアルコールの使用、経口でのビタミンＤおよびカルシウム摂取、バイオホスフォネートの使用、運動、肥満度指数を含む、他の共変量で調整したＢＭＤに対する、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ、総２５（ＯＨ）Ｄ、およびＰＴＨの独立した関連性を判定することができる。季節性は、データ収集月で制御することによって、全モデルにおいて探索し、季節性が見出された場合、周期的回帰曲線を、このモデルに含むことができる。

【０２３８】

共変量と、ＢＭＤ、ビタミンＤレベル、およびＰＴＨとの間の関係を、独立標本ｔ検定（バイナリ共変量について）および単純な線形回帰（連続共変量について）の使用を通じて、ならびに箱ひげ図および散布図マトリックスを含む、視覚化技術を通じて、探索することができる。予測変数は、Ｌｅａｓｔ Ａｎｇｌｅ Ｒｅｇｒｅｓｓｉｏｎ（ＬＡＲ）[86]またはＬｅａｓｔ Ａｂｓｏｌｕｔｅ Ｓｈｒｉｎｋａｇｅ ａｎｄ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｏｐｅｒａｔｏｒ（ＬＡＳＳＯ）[87]が、いずれも従来的な段階的変数選択方法よりも信頼性が高いことが証明されているため、これらの使用を通じて選択することができる。本仮説の中心であるか、または２５（ＯＨ）Ｄ、総２５（ＯＨ）Ｄ、およびＰＴＨと、ＢＭＤとに臨床的に関連することが先行文献に示されている共変量は、選択に関係なく、本モデルに残すことができる。モデルの評価は、種々の手順を通じて行うことができる。共線形性は、共変量および分散拡大因子（ＶＩＦ）の間の相関を通じて評価することができる。残差を、標準化した残差プロットを使用して試験することができ、正規性は、シャピロウイルク検定によって試験することができる。構成要素に加えて、残差プロットは、本モデルにおける他の予測因子の作用を制御した、連続予測因子間のＢＭＤとの線

形性を調査する手段を提供することになる。ＬＯＥＳＳ曲線と回帰直線との重なり度を使用して、予測因子の線形性を評価することができる。影響力の大きいデータ点の診断法は、クックの距離（Ｄ）を通じて特定することができ、（Ｄｉ＞４／ｎ）を有する観測は、影響力があると考えられる。ジャックナイフ法を使用して、影響力のある観測値を有するモデルと有さないモデルを比較することができ、個体の観測値に起因するエラーの割合を記録することが可能である。クックの距離は高いが、生物学的に妥当である値は、最終モデルに含むことを考慮してもよい。モデルの最終候補は、Ａｋａｉｋｅ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ　Ｃｒｉｔｅｒｉｏｎ（ＡＩＣ）の値、ならびに調整済みのR^2値について比較することができる。

【０２３９】

全ての共変量間の相互作用の包含および形式試験を、人種および社会経済的地位の間の相互作用に特別な注意を払って、層化されていない多変数モデルに組み込むことができる。有意でない相互作用項は、最終モデルから除外してもよい。有意な相互作用項は、Ｔｒｅｌｌｉｓグラフを使用して視覚的に調査することができ、共変量とＢＭＤとの間の関連性は、相互作用予測因子のレベルに従って、解釈することができる。多変数モデルは、人種によって層化して実行ことができ、人種を含む相互作用項を除外した類似の方法で分析する。

【０２４０】

ＣＶＤは、２５（ＯＨ）Ｄ状態と関連づけられているため、探索的分析を、利用可能なデータを使用して行って、ベースラインで、バイオアベイラブル、総２５（ＯＨ）Ｄ、およびＰＴＨと、頸動脈内膜中膜厚および血圧とのあらゆる関係を検出することができる。

【０２４１】

参考文献（実施例４および背景技術の部分について）

1. Cauley JA, Lacroix AZ, Wu L, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk for hip fractures. Ann Intern Med 2008;149:242-50.
2. Judd SE, Tangpricha V. Vitamin D deficiency and risk for cardiovascular disease. Am J Med Sci 2009;338:40-4.
3. Martins D, Wolf M, Pan D, et al. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Arch Intern Med 2007;167:1159-65.
4. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. Circulation 2008;117:503-11.
5. Zittermann A, Schleithoff SS, Tenderich G, Berthold HK, Korfer R, Stehle P. Low vitamin D status: a contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure? J Am Coll Cardiol 2003;41:105-12.
6. Ooms ME, Roos JC, Bezemer PD, van der Vijgh WJ, Bouter LM, Lips P. Prevention of bone loss by vitamin D supplementation in elderly women: a randomized double-blind trial. J Clin Endocrinol Metab 1995;80:1052-8.
7. Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, Dallal GE. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. N Engl J Med 1997;337:670-6.
8. Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, Dallal GE, Falconer G, Green CL. Rates of bone loss in postmenopausal women randomly assigned to one of two dosages of vitamin D. Am J Clin Nutr 1995;61:1140-5.
9. Jackson RD, LaCroix AZ, Gass M, et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. N Engl J Med 2006;354:669-83.
10. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, Giovannucci E, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. JAMA 2005;293:2257-64.

11. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, et al. Prevention of nonvertebral fractures with oral vitamin D and dose dependency: a meta-analysis of randomized controlled trials. Arch Intern Med 2009;169:551-61.
12. Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F, et al. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. N Engl J Med 1992;327:1637-42.
13. Wang L, Manson JE, Song Y, Sesso HD. Systematic review: Vitamin D and calcium supplementation in prevention of cardiovascular events. Ann Intern Med 2010;152:315-23.
14. Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. Arch Intern Med 2007;167:1730-7.
15. Fiscella K, Franks P. Vitamin D, race, and cardiovascular mortality: findings from a national US sample. Ann Fam Med 2010;8:11-8.
16. Harris SS. Vitamin D and African Americans. J Nutr 2006;136:1126-9.
17. Orwoll E, Nielson CM, Marshall LM, et al. Vitamin D deficiency in older men. J Clin Endocrinol Metab 2009;94:1214-22.
18. Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Orav EJ, Dawson-Hughes B. Positive association between 25-hydroxyvitamin D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. Am J Med 2004;116:634-9.
19. Hannan MT, Litman HJ, Araujo AB, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and bone mineral density in a racially and ethnically diverse group of men. J Clin Endocrinol Metab 2008;93:40-6.
20. Cauley JA, Lui LY, Ensrud KE, et al. Bone mineral density and the risk of incident nonspinal fractures in black and white women. JAMA 2005;293:2102-8.
21. Thacher TD, Clarke BL. Vitamin D insufficiency. Mayo Clin Proc 2011;86:50-60.
22. Gutierrez OM, Farwell WR, Kermah D, Taylor EN. Racial differences in the relationship between vitamin D, bone mineral density, and parathyroid hormone in the National Health and Nutrition Examination Survey. Osteoporos Int 2010;E-Pub ahead of print.
23. Powe CE, Ricciardi C, Berg AH, et al. Vitamin D-binding protein modifies the vitamin D-bone mineral density relationship. J Bone Miner Res 2011;26:1609-16.
24. Al-oanzi ZH, Tuck SP, Raj N, et al. Assessment of vitamin D status in male osteoporosis. Clin Chem 2006;52:248-54.
25. Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP, et al. Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): a cross-sectional study on 595 early postmenopausal women. Calcif Tissue Int 2005;77:15-22.
26. Sinotte M, Diorio C, Berube S, Pollak M, Brisson J. Genetic polymorphisms of the vitamin D binding protein and plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D in premenopausal women. Am J Clin Nutr 2009;89:634-40.
27. Constans J, Hazout S, Garruto RM, Gajdusek DC, Spees EK. Population distribution of the human vitamin D binding protein: anthropological considerations. Am J Phys Anthropol 1985;68:107-22.
28. Fang Y, van Meurs JB, Arp P, et al. Vitamin D binding protein genotype and osteoporosis. Calcif Tissue Int 2009;85:85-93.
29. Papiha SS, Allcroft LC, Kanan RM, Francis RM, Datta HK. Vitamin D binding protein gene in male osteoporosis: association of plasma DBP and bone mineral density with (TAAA)(n)-Alu polymorphism in DBP. Calcif Tissue Int 1999;65:262-6.
30. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. Lancet 2010;376:180-8.

31. Powe CE KS, Pham JL, Ye J, Ankers ED, Ricciardi CE, Thadhani R, Bhan I. Vitamin D Binding Protein Modifies Relationship between Vitamin D and Calcium in Dialysis. . In: American Society of Nephrology Annual Meeting;. Denver, CO.; Nov 2010.
32. Powe CE. Vitamin D Binding Protein as a Modifier of Vitamin D Activity in Humans [MD Honors]. Cambridge: Harvard; 2011.
33. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. In: http://www.iom.edu/~/media/Files/Report%20Files/2010/Dietary-Reference-Intakes-for-Calcium-and-Vitamin-D/Vitamin%20D%20and%20Calcium%202010%20Report%20Brief.pdf, ed.; November 2010:1-4.
34. Holick MF. Vitamin D deficiency. N Engl J Med 2007;357:266-81.
35. O'Riordan JL. Rickets in the 17th Century. Journal of Bone and Mineral Research 2006;21:1506-10.
36. Gloth FM, 3rd, Gundberg CM, Hollis BW, Haddad JG, Jr., Tobin JD. Vitamin D deficiency in homebound elderly persons. Jama 1995;274:1683-6.
37. Compher CW, Badellino KO, Boullata JI. Vitamin D and the bariatric surgical patient: a review. Obes Surg 2008;18:220-4.
38. Bikle DD, Siiteri PK, Ryzen E, Haddad JG. Serum protein binding of 1,25-dihydroxyvitamin D: a reevaluation by direct measurement of free metabolite levels. J Clin Endocrinol Metab 1985;61:969-75.
39. Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. J Clin Endocrinol Metab 1987;64:1165-8.
40. Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, et al. Hypovitaminosis D in medical inpatients. N Engl J Med 1998;338:777-83.
41. Hamilton SA, McNeil R, Hollis BW, et al. Profound Vitamin D Deficiency in a Diverse Group of Women during Pregnancy Living in a Sun-Rich Environment at Latitude 32 degrees N. Int J Endocrinol 2010;2010:917428.
42. Tangpricha V, Pearce EN, Chen TC, Holick MF. Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. Am J Med 2002;112:659-62.
43. Wolf M, Shah A, Gutierrez O, et al. Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. Kidney Int 2007;72:1004-13.
44. Merewood A, Mehta SD, Grossman X, et al. Widespread vitamin D deficiency in urban Massachusetts newborns and their mothers. Pediatrics 2010;125:640-7.
45. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. Am J Clin Nutr 2000;72:690-3.
46. Holick MF. MrOs is D-ficient. J Clin Endocrinol Metab 2009;94:1092-3.
47. Vieth R, Bischoff-Ferrari H, Boucher BJ, et al. The urgent need to recommend an intake of vitamin D that is effective. Am J Clin Nutr 2007;85:649-50.
48. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr 2004;80:1678S-88S.
49. Nesby-O'Dell S, Scanlon KS, Cogswell ME, et al. Hypovitaminosis D prevalence and determinants among African American and white women of reproductive age: third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. Am J Clin Nutr 2002;76:187-92.
50. Harris SS, Dawson-Hughes B. Seasonal changes in plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations of young American black and white women. Am J Clin Nutr 1998;67:1232-6.
51. Diaz VA, Mainous AG, 3rd, Carek PJ, Wessell AM, Everett CJ. The association of vitamin D deficiency and insufficiency with diabetic nephropathy: implication

s for health disparities. J Am Board Fam Med 2009;22:521-7.
52. Matsuoka LY, Wortsman J, Chen TC, Holick MF. Compensation for the interracial variance in the cutaneous synthesis of vitamin D. J Lab Clin Med 1995;126:452-7.
53. Wolf M, Betancourt J, Chang Y, et al. Impact of activated vitamin D and race on survival among hemodialysis patients. J Am Soc Nephrol 2008;19:1379-88.
54. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. Am J Clin Nutr 2006;84:18-28.
55. Parfitt AM. Osteomalacia and related disorders In: Avioli LV, Krane, S.M., ed. Metabolic bone disease. 3rd ed. San Diego, CA: Academic Press; 1998:327-86.
56. Sahota O. Osteoporosis and the role of vitamin D and calcium-vitamin D deficiency, vitamin D insufficiency and vitamin D sufficiency. Age Ageing 2000;29:301-4.
57. Morris HA, Anderson PH. Autocrine and paracrine actions of vitamin D. Clin Biochem Rev 2010;31:129-38.
58. Karagas MR, Lu-Yao GL, Barrett JA, Beach ML, Baron JA. Heterogeneity of hip fracture: age, race, sex, and geographic patterns of femoral neck and trochanteric fractures among the US elderly. Am J Epidemiol 1996;143:677-82.
59. Barrett JA, Baron JA, Karagas MR, Beach ML. Fracture risk in the U.S. Medicare population. J Clin Epidemiol 1999;52:243-9.
60. Breslau NA. Normal and abnormal regulation of 1,25-(OH)2D synthesis. Am J Med Sci 1988;296:417-25.
61. Need AG, Horowitz M, Morris HA, Nordin BC. Vitamin D status: effects on parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D in postmenopausal women. Am J Clin Nutr 2000;71:1577-81.
62. Aloia JF, Chen DG, Chen H. The 25(OH)D/PTH threshold in black women. J Clin Endocrinol Metab 2010;95:5069-73.
63. Braun A, Bichlmaier R, Cleve H. Molecular analysis of the gene for the human vitamin-D-binding protein (group-specific component): allelic differences of the common genetic GC types. Hum Genet 1992;89:401-6.
64. Al-oanzi ZH, Tuck SP, Mastana SS, et al. Vitamin D-binding protein gene microsatellite polymorphism influences BMD and risk of fractures in men. Osteoporos Int 2008;19:951-60.
65. Anderson LN, Cotterchio M, Cole DE, Knight JA. Vitamin D-Related Genetic Variants, Interactions with Vitamin D Exposure and Breast Cancer Risk among Caucasian Women in Ontario. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2011.
66. Safadi FF, Thornton P, Magiera H, et al. Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. J Clin Invest 1999;103:239-51.
67. Noren Hooten N, Abdelmohsen K, Gorospe M, Ejiogu N, Zonderman AB, Evans MK. microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. PLoS One 2010;5:e10724.
68. Smith JG, Magnani JW, Palmer C, et al. Genome-Wide Association Studies of the PR Interval in African Americans. PLoS Genet 2011;7:EPub: e1001304.
69. Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. Endocr Rev 1989;10:232-74.
70. Bikle DD, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, Haddad JG. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. J Clin Endocrinol Metab 1986;63:954-9.

71. Arnaud J, Constans J. Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP). Hum Genet 1993;92:183-8.
72. Leheste JR, Melsen F, Wellner M, et al. Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. FASEB J 2003;17:247-9.
73. Zella LA, Shevde NK, Hollis BW, Cooke NE, Pike JW. Vitamin D-binding protein influences total circulating levels of 1,25-dihydroxyvitamin D3 but does not directly modulate the bioactive levels of the hormone in vivo. Endocrinology 2008;149:3656-67.
74. Chun RF, Lauridsen AL, Suon L, et al. Vitamin D-binding protein directs monocyte responses to 25-hydroxy- and 1,25-dihydroxyvitamin D. J Clin Endocrinol Metab 2010;95:3368-76.
75. Braunstein GD. In: Basic & Clinical Endocrinology. 5th ed. Stamford, Conn: Appleton & Lange; 1997:422-452.
76. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. J Clin Endocrinol Metab 1999;84:3666-72.
77. Emadi-Konjin P, Bain J, Bromberg IL. Evaluation of an algorithm for calculation of serum "bioavailable"testosterone (BAT). Clin Biochem 2003;36:591-6.
78. Nykjaer A, Fyfe JC, Kozyraki R, et al. Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH) vitamin D(3). Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:13895-900.
79. Amsellem S, Gburek J, Hamard G, et al. Cubilin is essential for albmin reabsorption in the renal proximal tubule. J Am Soc Nephrol 2010;21:1859-67.
80. Russo LM, Sandoval RM, McKee M, et al. The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states. Kidney Int 2007;71:504-13.
81. Russo D, Corrao S, Miranda I, et al. Progression of coronary artery calcification in predialysis patients. Am J Nephrol 2007;27:152-8.
82. van Hoof HJ, Swinkels LM, Ross HA, Sweep CG, Benraad TJ. Determination of non-protein-bound plasma 1,25-dihydroxyvitamin D by symmetric (rate) dialysis. Anal Biochem 1998;258:176-83.
83. Gutierrez OM, Farwell WR, Kermah D, Taylor EN. Racial differences in the relationship between vitamin D, bone mineral density, and parathyroid hormone in the National Health and Nutrition Examination Survey. Osteoporos Int 2011;22:1745-53.
84. Reis JP, Michos ED, von Muhlen D, Miller ER, 3rd. Differences in vitamin D status as a possible contributor to the racial disparity in peripheral arterial disease. Am J Clin Nutr 2008;88:1469-77.
85. Cauley JA, Danielson ME, Boudreau R, et al. Serum 25 hydroxyvitamin (OH)D and clinical fracture risk in a multiethnic Cohort of women: The Women's health initiative (WHI). J Bone Miner Res 2011.
86. Efron B, Hastie T, Johnstone I, Tibshirani R. Least angle regression. Ann Stat 2004;32:407-99.
87. Tibrishani R. Regression shrinkage and section via the lasso. J Royal Stat Soc 1996;58:267-88.
88. Wolf M, Sandler L, Munoz K, Hsu K, Ecker JL, Thadhani R. First trimester insulin resistance and subsequent preeclampsia: a prospective study. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:1563-8.

表１　研究集団の特徴（ｎ＝４９）。データは、カテゴリ変数に対するｎ（％）および

連続変数に対する平均±標準偏差として表す。

【表１】

	平均±標準偏差 n (%)
年齢 (歳)	23.5 ± 3.4
肥満度指数 (kg/m^2)	22.43 ± 2.96
性別	
男性	27 (55.1%)
女性	22 (44.9%)
人種	
白人種	31 (63.3%)
非白人種	18 (36.7%)
運動量	
週120分超	21 (42.9%)
週120分以下	26 (53.1%)
不明	2 (4.1%)
ビタミンD結合タンパク質 (umol/L)	4.19 ± 2.49
アルブミン (g/L)	42.47 ± 3.94
血清カルシウム (mmol/L)	2.30 ± 0.19
副甲状腺ホルモン (ng/L)	29.86 ± 8.25
食事カルシウム摂取量 (mg/日)	925.85 ± 421.76
腰椎の骨塩量 (g/cm^2)	1.05 ± 0.14

表２　ビタミンＤの血清レベル。総２５（ＯＨ）Ｄレベルを、アルブミンおよびビタミンＤ結合タンパク質（ＤＢＰ）とともに、測定した。ＤＢＰ結合、アルブミン結合、遊離、ならびにバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄ（遊離およびアルブミン結合）を計算した。

【表２】

	平均±標準偏差
総25(OH)D (nmol/L)	64.23 ± 27.70
DBPに結合した25(OH)D (nmol/L)	54.66 ± 26.32
アルブミンに結合した25(OH)D (nmol/L)	9.55 ± 6.72
遊離25(OH)D (pmol/L)	25.37 ± 18.52
バイオアベイラブル25(OH)D (nmol/L)	9.58 ± 6.74

表３　選択したサブグループにおける骨塩量、ＤＢＰレベル、および２５（ＯＨ）Ｄレベル。値は、平均±標準偏差として報告する。ＤＢＰ＝ビタミンＤ結合タンパク質。ＢＭＤ＝塩量。ＯＣＰ＝経口避妊薬。群は、総２５（ＯＨ）Ｄ、ＤＢＰ、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄレベル、およびＢＭＤの自然対数変換後に、ｔ検定を使用して比較した。

【表３】

	n	総25(OH)D (nmol/L)	総DBP (μmol/L)	バイオアベイラブル25(OH)D (nmol/L)	腰椎BMD (g/cm^2)
性別					
男性	27	52.79 ± 19.31	3.90 ± 2.09	8.36 ± 5.36	1.04 = 0.14
女性	22	78.28 ± 30.28	4.53 ± 2.92	11.08 ± 8.01	1.07 = 0.13
p値		<0.001	0.493	0.113	0.371
OCPの使用(女性のみ)					
使用	7	107.33 ± 27.87	6.27 ± 3.76	12.83 ± 11.64	1.06 = 0.21
不使用		64.73 ± 20.59	3.71 ± 2.12	10.26 ± 5.98	1.07 = 0.08
p値		<0.001	0.152	0.841	0.646
肥満度指数					
25 kg/m^2未満	39	66.0 = 26.9	4.63 ± 2.49	8.59 ± 5.28	1.04 = 0.12
25 kg/m^2以上	10	57.2 = 25.0	2.42 ± 1.61	13.43 ± 10.19	1.09 = 0.19
p値		0.284	0.003	0.073	0.438
運動					
120 分/週以上	21	73.33 ± 26.11	4.14 ± 2.56	11.76 ± 8.35	1.09 = 0.13
120 分/週未満	26	58.66 ± 27.97	4.20 ± 2.58	8.19 ± 4.85	1.03 = 0.13
p値		0.038	0.863	0.089	0.165
人種					
白人種	31	68.84 ± 28.65	4.94 ± 2.43	7.84 ± 3.92	1.03 = 0.10
非白人種	18	56.30 ± 24.76	2.87 ± 2.04	12.56 ± 9.29	1.08 = 0.18
p値		0.138	<0.001	0.065	0.346

表４　バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄにより、骨塩量（ＢＭＤ）を予測する。バイオアベイラブル２５（ＯＨ）ＤおよびＢＭＤを、分析前に自然対数変換した。係数（Ｂ）は、ｌｎバイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄにおける各単位増加に対するｌｎＢＭＤにおける平均単位増加を表す。Ｐ値は、潜在的交絡因子を制御した後の、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）ＤとＢＭＤとの間の関係の統計的有意性である。したがって、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）ＤとＢＭＤとの関係は、潜在的交絡因子で調整した後、有意なままである。

【表４】

モデル	B	P値	調整済みR^2
バイオアベイラブル25(OH)D	**0.092**	**0.002**	0.177
バイオアベイラブル25(OH)D、年齢、性別、人種、およびBMI	**0.072**	**0.029**	0.180

表５　集団の特徴（ｎ＝９４）

【表５】

	中央値(IQR)またはn(%)
年齢、歳	65 (50-74)
男性	55 (59%)
黒人種	48 (51%)
少なくとも1年の透析を生存	47 (50%)
肥満度指数	25 (22-30)
最高血圧、mm Hg	140 (123-153)
最低血圧、mm Hg	73 (61-81)
総25(OH)D、ng/ml	20 (13-28)
総$1,25(OH)_2D$、ng/ml	9.5 (5-16)
副甲状腺ホルモン、pg/ml	190 (96-307)
補正カルシウム、mg/dl	8.9 (8.5-9.4)
リン、mg/dl	4.2 (3-5.5)
アルカリ性ホスファターゼ、mg/dl	82 (66-112.5)
アルブミン、g/dl	3.4 (3.0-3.8)
ビタミンD結合タンパク質、μg/ml	158 (69-217)
バイオアベイラブル25(OH)D、ng/ml	3.4 (2.2-5.0)
バイオアベイラブル$1,25(OH)_2D$、pg/ml	2.2 (1.1-3.8)

表６　人種およびビタミンＤレベル。黒人種の個体は、それらの白人種の対応する個体と比較すると、総２５（ＯＨ）Ｄレベルは低いが、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄレベルは低くない。生存者は、血液透析の導入後、少なくとも１年間生存した患者であり、非生存者は、この年のうちに死亡したものである。全ての値は群の中央値を表す。

【表６】

	黒人種	白人種	p
総25(OH)D (ng/ml)	15.1	23.1	<0.001
バイオアベイラブル25(OH)D (ng/ml)	3.8	2.8	0.21
総1,25(OH)$_2$D (pg/ml)	8	11.5	0.07
バイオアベイラブル1.25((DH)$_2$D (pg/ml)	2.2	2.2	0.48
DBP (μg/ml)	75	189	<0.001
生存者: DBP (μg/ml)	88	195	0.004
非生存者: DBP (μg/ml)	58	183	<0.001
PTH (pg/ml)	201	168	0.47

表７　ＰＴＨおよびバイオアベイラブル２５（ＯＨ）ビタミンＤ。一変量および多変量の分析において、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）ビタミンＤレベルは、一貫して、ＰＴＨと関連していた（対応するｐ値を示す）。ＰＴＨおよびバイオアベイラブルビタミンＤレベルは、分析の前に対数変換済みであり、したがって、β＝－０．３６は、バイオアベイラブル２５（ＯＨ）Ｄにおける２５％の増加が、ＰＴＨにおける７．７％の低下と関連することを示唆する（（１．２５$^{-0.36}$－１）＊１００＝－７．７）。

【表７】

	β	p
バイオアベイラブル25(OH)D 単独	-0.36	0.007
年齢、性別、人種を追加した多変量モデル	-0.33	0.02
上の変数に1年での生存状態を追加した多変量モデル	-0.32	0.02
上の変数にカルシウム、リン、バイオアベイラブルバイオアベイラブル1,25(OH)$_2$Dを追加した多変量モデル	-0.39	0.02

表８　バイオアベイラブルビタミンＤレベルの計算

［総ビタミンＤ］＝総測定ビタミンＤ濃度（２５－ＯＨまたは１，２５－（ＯＨ）$_2$のいずれかのビタミンＤ）

［Ａｌｂ］＝測定アルブミン濃度

［総ＤＢＰ］＝測定ビタミンＤ結合タンパク質濃度

［D_{Alb}］＝アルブミンに結合したビタミンＤの濃度

［D_{DBP}］＝ＤＢＰに結合したビタミンＤの濃度

［$D_{遊離}$］＝遊離（未結合）Ｄの濃度

［$D_{バイオアベイラブル}$］＝バイオアベイラブルＤの濃度＝［$D_{遊離}$］＋［D_{Alb}］

K_{alb}＝ビタミンＤとアルブミンの間の親和性定数＝６×１０^{5}Ｍ$^{-1}$（２５－ＯＨＤについて）または５．４×１０^{4}Ｍ$^{-1}$（１，２５－（ＯＨ）$_2$Ｄについて）

K_{DBP}＝ビタミンＤとＤＢＰとの間の親和性定数＝７×１０^{8}Ｍ$^{-1}$（２５－ＯＨ　Ｄについて）または３．７×１０^{7}Ｍ$^{-1}$（１，２５－（ＯＨ）$_2$Ｄについて）

【表８】

番号	方程式
1	$[D_{DBP}] = [総ビタミンD] - [D_{Alb}] - [D_{遊離}]$
2	$[D_{Alb}] = K_{alb} \cdot [Alb] \cdot [D_{遊離}]$
3	$[D_{遊離}] = [D_{DBP}] \div K_{DBP} \div [DBP_{遊離}]$
4	$[DBP_{遊離}] = [総DBP] - [D_{DBP}]$
方程式3および4から	
5	$[D_{遊離}] = [D_{DBP}] \div K_{DBP} \div ([総DBP] - [D_{DBP}])$
方程式1および2から	
6	$[D_{DBP}] = [総ビタミンD] - (K_{alb} \cdot [Alb] - 1) \cdot [D_{遊離}]$
7	$[D_{遊離}] = \{[総ビタミンD] - (K_{alb} \cdot [Alb] + 1) \cdot [D_{遊離}]\} \div K_{DBP} \div ([総DBP] - \{[総ビタミンD] - (K_{alb} \cdot [Alb] + 1) \cdot [D_{遊離}]\})$
これを簡略化して、二次多項式$(ax^2 - bx - c = 0)$に適合させる、式中、$x=[D_{遊離}]$： $a = K_{DBP} \cdot K_{alb} \cdot [Alb] - K_{DBP}$ $b = K_{DBP} \cdot [総DBP] - K_{DBP} \cdot [総ビタミンD] + K_{alb} \cdot [Alb] + 1$ $c = -[総ビタミンD]$	
8	$[D_{遊離}] = [-b+\sqrt{}b2-4ac] \div 2a$
9	$[D_{バイオアベイラブル}] = [D_{遊離}] - [D_{Alb}] = (K_{alb} \cdot [Alb] + 1) \cdot [D_{遊離}]$

表９　現在の定義に基づいた黒人種と白人種における２５（ＯＨ）Ｄ欠乏症の比較

【表９】

集団	年齢 (歳)	25(OH)D欠損 % 黒人種	白人種	25(OH)D カットオフレベル	参照
NHANES 2001年～2006年	>45 (82-85%)	80	40	<20 ng/mL	Diaz[51]
高齢男性 (MrOS)	>65	65 22	23 2	<20 ng/mL <10 ng/mL	Orwall[17]
血液透析患者 (ArMORR)	63±15	31	12	<10 ng/mL	Wolf[43]
BACH/Bone Surveyの男性	30-79	44	11	<21 ng/mL	Hannan[19]

ＮＨＡＮＥＳ＝Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ Ｅｘａｍｉｎａｔｉｏｎ Ｓｕｒｖｅｙ、ＭｒＯＳ＝Ｏｓｔｅｏｐａｒａｔｉｃ Ｆｒａｃｔｕｒｅｓ ｉｎ Ｍｅｎ Ｓｔｕｄｙ、ＡｒＭＯＲＲ＝Ａｃｃｅｌｅｒａｔｅｄ Ｍｏｒｔａｌｉｔｙ ｏｎ Ｒｅｎａｌ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、ＢＡＣＨ＝Ｂｏｓｔｏｎ Ａｒｅａ Ｃｏｍｍｕｎｉｔｙ Ｈｅａｌｔｈ

配列一覧

配列番号：０１　ヒトＶＤＢＰアイソフォーム１、変異体１　ＮＣＢＩ Ｒｅｆ：ＮＰ＿０００５７４

【化１】

```
  1 mkrvlvllla vafghalerg rdyeknkvck efshlgkedf tslslvlysr kfpsgtfeqv
 61 sqlvkevvsl teaccaegad pdcydtrtsa lsakscesns pfpvhpgtae cctkeglerk
121 lcmaalkhqp qefptyvept ndeiceafrk dpkeyanqfm weystnygqa plsllvsytk
181 sylsmvgscc tsasptvcfl kerlqlkhls llttlsnrvc sqyaaygekk srlsnlikla
241 qkvptadled vlplaeditn ilskccesas edcmakelpe htvklcdnls tknskfedcc
301 qektamdvfv ctyfmpaaql pelpdvelpt nkdvcdpgnt kvmdkytfel srrthlpevf
361 lskvleptlk slgeccdved sttcfnakgp llkkelssfi dkgqelcady sentfteykk
421 klaerlkakl pdatptelak lvnkhsdfas nccsinsppl ycdseidael knil
```

配列番号：０２　ヒトＶＤＢＰアイソフォーム１、変異体２　ＮＣＢＩ　Ｒｅｆ：ＮＰ＿００１１９１２３５

【化２】

```
  1 mkrvlvllla vafghalerg rdyeknkvck efshlgkedf tslslvlysr kfpsgtfeqv
 61 sqlvkevvsl teaccaegad pdcydtrtsa lsakscesns pfpvhpgtae cctkeglerk
121 lcmaalkhqp qefptyvept ndeiceafrk dpkeyanqfm weystnygqa plsllvsytk
181 sylsmvgscc tsasptvcfl kerlqlkhls llttlsnrvc sqyaaygekk srlsnlikla
241 qkvptadled vlplaeditn ilskccesas edcmakelpe htvklcdnls tknskfedcc
301 qektamdvfv ctyfmpaaql pelpdvelpt nkdvcdpgnt kvmdkytfel srrthlpevf
361 lskvleptlk slgeccdved sttcfnakgp llkkelssfi dkgqelcady sentfteykk
421 klaerlkakl pdatptelak lvnkhsdfas nccsinsppl ycdseidael knil
```

配列番号：０３　ヒトＶＤＢＰアイソフォーム２　ＮＣＢＩ　Ｒｅｆ：ＮＰ＿００１１９１２３６

【化３】

```
  1 mlwswseerg gaarlsgrkm krvlvlllav afghalergr dyeknkvcke fshlgkedft
 61 slslvlysrk fpsgtfeqvs qlvkevvslt eaccaegadp dcydtrtsal sakscesnsp
121 fpvhpgtaec ctkeglerkl cmaalkhqpq efptyveptn deiceafrkd pkeyanqfmw
181 eystnygqap lsllvsytks ylsmvgscct sasptvcflk erlqlkhlsl lttlsnrvcs
241 qyaaygekks rlsnliklaq kvptadledv lplaeditni lskccesase dcmakelpeh
301 tvklcdnlst knskfedccq ektamdvfvc tyfmpaaqlp elpdvelptn kdvcdpgntk
361 vmdkytfels rrthlpevfl skvleptlks lgeccdveds ttcfnakgpl lkkelssfid
421 kgqelcadys entfteykkk laerlkaklp datptelakl vnkhsdfasn ccsinspply
481 cdseidaelk nil
```

配列番号：０４　ヒトプレプロアルブミン　ＮＣＢＩ　Ｒｅｆ：ＮＰ＿０００４６８

【化４】

```
1 mkwvtfisll flfssaysrg vfrrdahkse vahrfkdlge enfkalvlia faqylqqcpf
  61 edhvklvnev tefaktcvad esaencdksl htlfgdklct vatlretyge madccakqep
 121 ernecflqhk ddnpnlprlv rpevdvmcta fhdneetflk kylyeiarrh pyfyapellf
 181 fakrykaaft eccqaadkaa cllpkldelr degkassakq rlkcaslqkf gerafkawav
 241 arlsqrfpka efaevsklvt dltkvhtecc hgdllecadd radlakyice nqdsissklk
 301 eccekpllek shciaevend empadlpsla adfveskdvc knyaeakdvf lgmflyeyar
 361 rhpdysvvll lrlaktyett lekccaaadp hecyakvfde fkplveepqn likqncelfe
 421 qlgeykfqna llvrytkkvp qvstptlvev srnlgkvgsk cckhpeakrm pcaedylsvv
 481 lnqlcvlhek tpvsdrvtkc cteslvnrrp cfsalevdet yvpkefnaet ftfhadictl
 541 sekerqikkq talvelvkhk pkatkeqlka vmddfaafve kcckaddket cfaeegkklv
 601 aasqaalgl
```

配列番号：０５　　ヒトプロアルブミン

【化５】

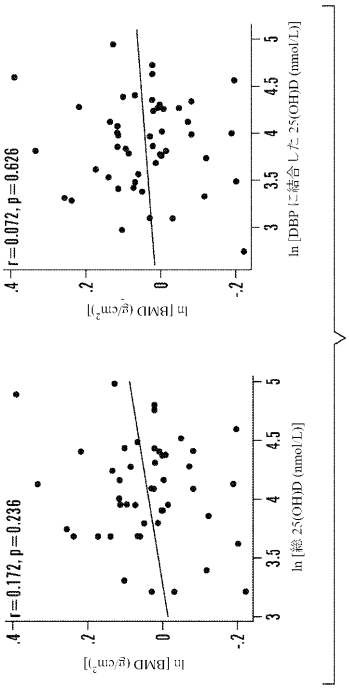
```
 rg vfrrdahkse vahrfkdlge enfkalvlia faqylqqcpf
edhvklvnev tefaktcvad esaencdksl htlfgdklct vatlretyge madccakqep
ernecflqhk ddnpnlprlv rpevdvmcta fhdneetflk kylyeiarrh pyfyapellf
fakrykaaft eccqaadkaa cllpkldelr degkassakq rlkcaslqkf gerafkawav
arlsqrfpka efaevsklvt dltkvhtecc hgdllecadd radlakyice nqdsissklk
eccekpllek shciaevend empadlpsla adfveskdvc knyaeakdvf lgmflyeyar
rhpdysvvll lrlaktyett lekccaaadp hecyakvfde fkplveepqn likqncelfe
qlgeykfqna llvrytkkvp qvstptlvev srnlgkvgsk cckhpeakrm pcaedylsvv
lnqlcvlhek tpvsdrvtkc cteslvnrrp cfsalevdet yvpkefnaet ftfhadictl
sekerqikkq talvelvkhk pkatkeqlka vmddfaafve kcckaddket cfaeegkklv
aasqaalgl
```

配列番号：０６　　ヒトアルブミン

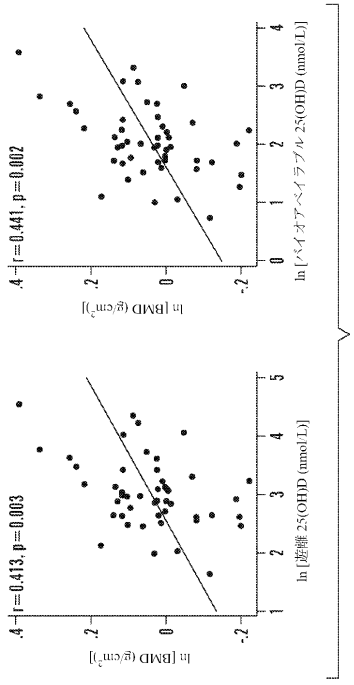
【化６】

```
dahkse vahrfkdlge enfkalvlia faqylqqcpf
edhvklvnev tefaktcvad esaencdksl htlfgdklct vatlretyge madccakqep
ernecflqhk ddnpnlprlv rpevdvmcta fhdneetflk kylyeiarrh pyfyapellf
fakrykaaft eccqaadkaa cllpkldelr degkassakq rlkcaslqkf gerafkawav
arlsqrfpka efaevsklvt dltkvhtecc hgdllecadd radlakyice nqdsissklk
eccekpllek shciaevend empadlpsla adfveskdvc knyaeakdvf lgmflyeyar
rhpdysvvll lrlaktyett lekccaaadp hecyakvfde fkplveepqn likqncelfe
qlgeykfqna llvrytkkvp qvstptlvev srnlgkvgsk cckhpeakrm pcaedylsvv
lnqlcvlhek tpvsdrvtkc cteslvnrrp cfsalevdet yvpkefnaet ftfhadictl
sekerqikkq talvelvkhk pkatkeqlka vmddfaafve kcckaddket cfaeegkklv
aasqaalgl
```

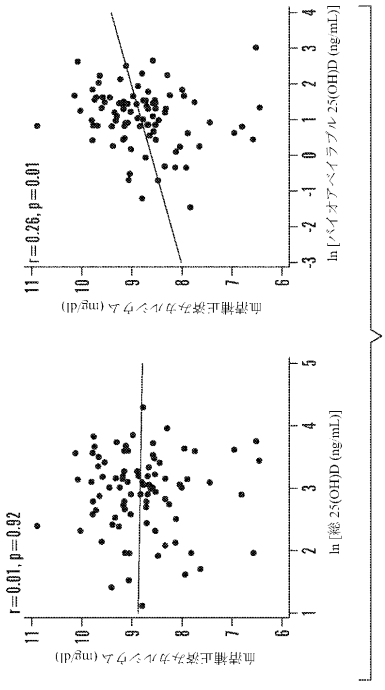
【図１－１】


r=0.072, p=0.626
ln [BMD (g/cm²)]
ln [DBP に結合した 25(OH)D (nmol/L)]
r=0.172, p=0.236
ln [BMD (g/cm²)]
ln [総 25(OH)D (nmol/L)]

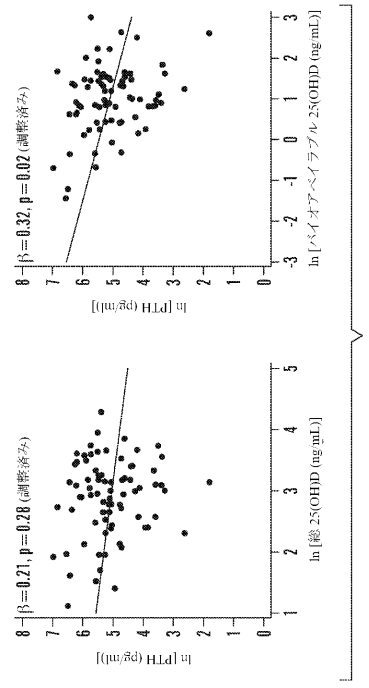
【図１－２】


r=0.441, p=0.002
ln [BMD (g/cm²)]
ln [バイオアベイラブル 25(OH)D (nmol/L)]
r=0.413, p=0.003
ln [BMD (g/cm²)]
ln [遊離 25(OH)D (nmol/L)]

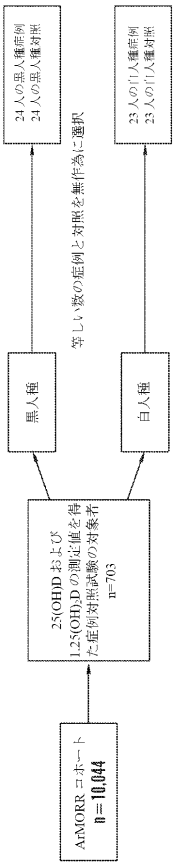
【図２】


r=0.01, p=0.92
血清補正済カルシウム (mg/dl)
ln [総 25(OH)D (ng/mL)]
r=0.26, p=0.01
血清補正済カルシウム (mg/dl)
ln [バイオアベイラブル 25(OH)D (ng/mL)]

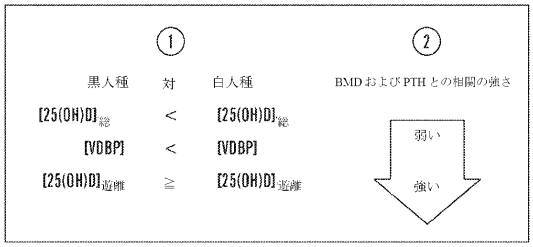
【図３】


β=0.21, p=0.28 (a調整済み)
ln [PTH (pg/ml)]
ln [総 25(OH)D (ng/mL)]
β=0.32, p=0.02 (a調整済み)
ln [PTH (pg/ml)]
ln [バイオアベイラブル 25(OH)D (ng/mL)]

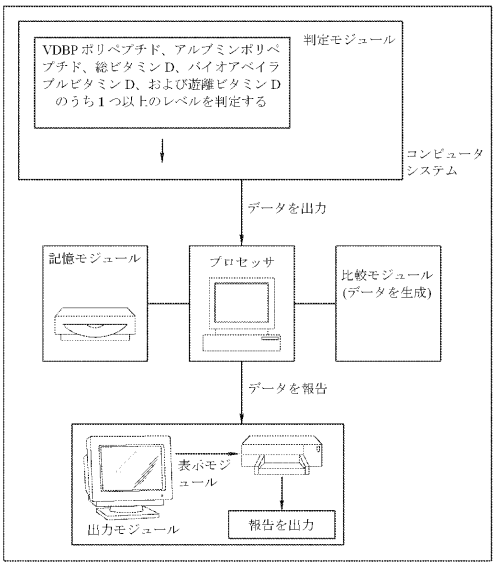
【図４】


24人の黒人種症例
24人の黒人種対照
23人の白人種症例
23人の白人種対照
等しい数の症例と対照を無作為に選択
黒人種
白人種
25(OH)DおよびD
1,25(OH)2Dの測定値を得
た症例対照試験の対象者
n=703
ArMORR コホート
n＝10,044

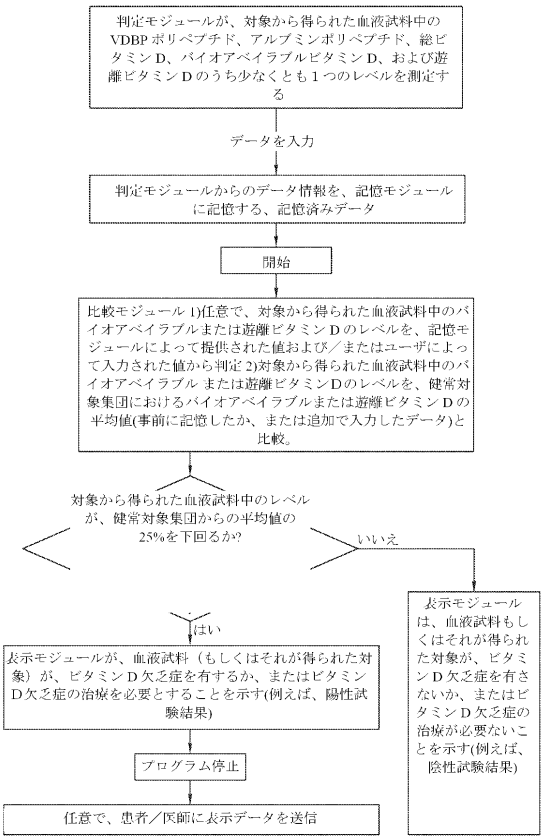
【図５】


①
②
黒人種
対
白人種
BMDおよびPTHとの相関の強さ
[25(OH)D]総
＜
[25(OH)D]総
[VDBP]
＜
[VDBP]
[25(OH)D]遊離
≒
[25(OH)D]遊離
弱い
強い

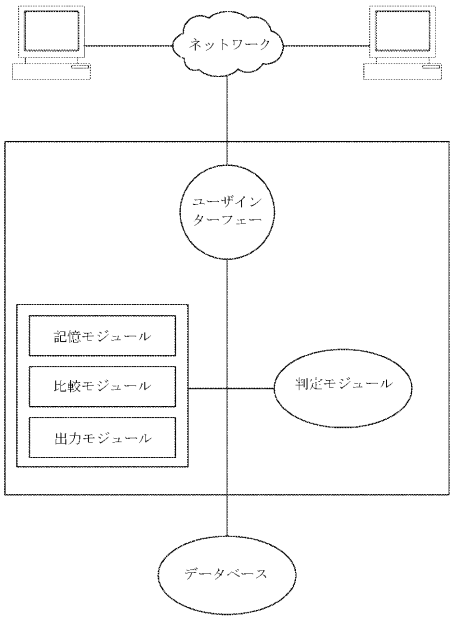
【図６】


VDBPポリペプチド、アルブミンポリペプチド、総ビタミンD、バイオアベイラブルビタミンD、および遊離ビタミンDのうち1つ以上のレベルを判定する
判定モジュール
コンピュータシステム
データを出力
記憶モジュール
プロセッサ
比較モジュール
(データを生成)
データを報告
表示モジュール
出力モジュール
報告を出力

【図７】


判定モジュールが、対象から得られた血液試料中のVDBPポリペプチド、アルブミンポリペプチド、総ビタミンD、バイオアベイラブルビタミンD、および遊離ビタミンDのうち少なくとも１つのレベルを測定する
データを入力
判定モジュールからのデータ情報を、記憶モジュールに記憶する、記憶済みデータ
開始
比較モジュール 1)任意で、対象から得られた血液試料中のバイオアベイラブルまたは遊離ビタミンDのレベルを、記憶モジュールによって提供された値および／またはユーザによって入力された値から判定 2)対象から得られた血液試料中のバイオアベイラブル または遊離ビタミンDのレベルを、健常対象集団におけるバイオアベイラブルまたは遊離ビタミンDの平均値(事前に記憶したか、または追加で入力したデータ)と比較。
対象から得られた血液試料中のレベルが、健常対象集団からの平均値の25%を下回るか?
いいえ
はい
表示モジュールが、血液試料（もしくはそれが得られた対象）が、ビタミンD欠乏症を有するか、またはビタミンD欠乏症の治療を必要とすることを示す(例えば、陽性試験結果)
プログラム停止
任意で、患者／医師に表示データを送信
表示モジュールは、血液試料もしくはそれが得られた対象が、ビタミンD欠乏症を有さないか、またはビタミンD欠乏症の治療が必要ないことを示す(例えば、陰性試験結果)

【図８】


ネットワーク
ユーザインターフェー
記憶モジュール
比較モジュール
出力モジュール
判定モジュール
データベース

【配列表】
0005918784000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
G01N	***30/88***	***(2006.01)***	G01N	33/543	581A
G01N	***27/62***	***(2006.01)***	G01N	33/543	541B
A61K	***31/592***	***(2006.01)***	G01N	30/72	C
A61K	***31/593***	***(2006.01)***	G01N	30/88	J
			G01N	30/88	E
			G01N	27/62	V
			G01N	27/62	X
			A61K	31/592	
			A61K	31/593	

(74)代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁
(72)発明者 タッダニ, ラビ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１１４, ボストン, バイロン ストリート １１
(72)発明者 カルマンチ, エス. アナンス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３２, ウエスト ロックスベリー, ワシントン ストリート ５２８１
(72)発明者 バーグ, アンダーズ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３１, ボストン, ガーンジー ストリート ユニット １ １８
(72)発明者 バーン, イシル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２４６５, ウエスト ニュートン, ボナッド ロード ６４

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特表２０１０－５１８３６９（ＪＰ, Ａ）
国際公開第２００８／０９２９１７（WO, Ａ１）
特開２００２－０１４０９５（ＪＰ, Ａ）
特表２００９－５１０４１５（ＪＰ, Ａ）
国際公開第２００７／０３９１９４（WO, Ａ１）
特表２００４－５１５７６３（ＪＰ, Ａ）
米国特許出願公開第２００４／０１３２１０４（ＵＳ, Ａ１）
国際公開第２０１４／１７９７３７（WO, Ａ２）
Assessment of the Free Fraction of 25-Hydoroxyvitamin D in Serum and Its Regulation by Albumin and the Vitamin D-Binding Protein, JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, １９８６年, Vol.63, Page.954-959
Vitamin D-Binding Protein Modifies the Vitamin D-Bone Mineral Density Relationship, Journal of Bone and Mineral Research, ２０１１年, Vol.26, No.7, Page.1609-1616

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ ３３／８２
Ａ６１Ｋ ３１／５９２
Ａ６１Ｋ ３１／５９３
Ｇ０１Ｎ ２７／６２
Ｇ０１Ｎ ３０／７２
Ｇ０１Ｎ ３０／８８

G01N 33/53
G01N 33/543
G01N 33/68
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	与维生素D缺乏有关的分析和治疗方法		
公开(公告)号	JP5918784B2	公开(公告)日	2016-05-18
申请号	JP2013548558	申请日	2012-01-06
[标]申请(专利权)人(译)	总医院集团		
申请(专利权)人(译)	总医院集团 贝斯以色列女执事医疗中心有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	总医院集团 贝斯以色列女执事医疗中心有限公司		
[标]发明人	タッダニラビ カルマンチエスアナンス バーグアンダーズ バーンイシル		
发明人	タッダニ,ラビ カルマンチ,エス.アナンス バーグ,アンダーズ バーン,イシル		
IPC分类号	G01N33/82 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/543 G01N30/72 G01N30/88 G01N27/62 A61K31/592 A61K31/593		
CPC分类号	A61K31/592 A61K31/593 G01N33/82 C12Q1/6883 C12Q2600/112 C12Q2600/156 G01N2333/765		
FI分类号	G01N33/82 G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/543.545.A G01N33/543.575 G01N33/543.581.A G01N33/543.541.B G01N30/72.C G01N30/88.J G01N30/88.E G01N27/62.V G01N27/62.X A61K31/592 A61K31/593		
代理人(译)	小林 浩 铃木康仁		
审查员(译)	三木隆		
优先权	61/430643 2011-01-07 US		
其他公开文献	JP2014506332A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文描述了涉及测定受试者血液样品中生物可利用或游离维生素D水平的测定法。对于生物可利用的或游离的维生素D确定的值表明受试者是否患有不足量的维生素D.本文还描述了维生素D不足的治疗方法。

(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5918784号
(P5918784)
(45)発行日　平成28年5月18日(2016.5.18)　(24)登録日　平成28年4月15日(2016.4.15)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/82	(2006.01)	G01N	33/82	
G01N 33/68	(2006.01)	G01N	33/68	
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	33/543	５４５Ａ
G01N 30/72	(2006.01)	G01N	33/543	５７５

請求項の数 7　(全 78 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-548558(P2013-548558)
(86)(22)出願日　平成24年1月6日(2012.1.6)
(65)公表番号　特表2014-506332(P2014-506332A)
(43)公表日　平成26年3月13日(2014.3.13)
(86)国際出願番号　PCT/US2012/020407
(87)国際公開番号　WO2012/094550
(87)国際公開日　平成24年7月12日(2012.7.12)
審査請求日　平成27年1月5日(2015.1.5)
(31)優先権主張番号　61/430,643
(32)優先日　平成23年1月7日(2011.1.7)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　592017633
ザ　ジェネラル　ホスピタル　コーポレイション
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　ボストン　フルーツ　ストリート　５５
(73)特許権者　301033259
ベス・イスラエル・ディーコネス・メディカル・センター，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２２１５，ボストン，ブルックリン・アヴェニュー　３３０
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ビタミンD欠乏症に関連するアッセイおよび治療方法