

相異한 線量의 紫外線을 照射한 브로일러 병아리에 있어서 肝臟 25-Hydroxyvitamin D₃ 含量의 經時的 變化

蔣潤煥 · 姜燕錫* · 呂永壽** · 金剛秀*** · 曹仁鎬 · 襄恩慶

慶北大學校 農科大學

(1992. 11. 5 접수)

Time Course Variation of Liver 25-Hydroxyvitamin D₃ Content in Broiler Chicks Exposed to UVB Light with Different Dose

Y.H. Chiang, H.S. Kang*, Y.S. Yeoh**, K.S. Kim***, I.H. Cho and E.K. Bae

College of Agriculture, Kyungpook National University

(Received November 5, 1992)

SUMMARY

This research was carried out to determine the 25-Hydroxyvitamin D₃[25(OH)D₃] content in liver of broiler Hubbard chicks fed vitamin VD-deficient diet for 31 days in a subdued light room and exposed to UVB light (maximum intensity at 297nm) with dose of 0.204 or 0.408 mJ/cm²(30 or 60 min irradiation). The lipid in liver collected at 0~138 hr after irradiation was extracted by chloroform-methanol(2:1, v/v) and 25(OH)D₃ fraction was separated by Sep-Pak silica cartridge. The 25(OH)D₃ concentration was measured by normal phase HPLC. The negative control chicks presented 25(OH)D₃ 17.5 ng/g liver. When 0.204mJ/cm² was treated to whole body of chicks, the 25(OH)D₃ level was increased to 37.8 ng/g at 12 hr after irradiation, the peak concentration, 40.5 ng/g was appeared at the time of 86 hr, and decreasing trend was shown thereafter until 138 hr, the final time in this study. When 0.408 mJ/cm² was applied, the 25(OH)D₃ content was 36.7 ng/g liver at 12 hr, 61.4 ng/g(maximum value) was appeared at 42 hr, and 39.5 ng/g at 138 hr. The increased absolute amounts in liver 25(OH)D₃ were 23 and 43.9 ng/g as chicks were exposed to UVB light with dose of 0.204 and 0.408 mJ/cm², respectively. Consequently, it was found that when double dose of UVB light was irradiated to the chicks, their liver samples produced nearly double 25(OH)D₃ at 42 hr after exposure, and the peak value was presented earlier by 24 hr than that in the low dose treatment.

Key word: dose, UVB irradiation, chick, liver, 25-hydroxyvitamin D₃, time course

“이 論文은 1991年度 敎育부 지원 學術진흥재단의 자유공모(지방 대학 육성)과제 學術연구 조성비에 의하여 연구되었음”

* (주)보락기술연구소(Technical Research Institute, Bolak Co.)

** 축협중앙회사료연구소(Feed Research Institute, Libestock Cooperatives Federation)

*** 해태유업주식회사(Haitai Dairy Co.)

Corresponding author : Yun H. Chiang, College of Agr., Kyungpook National University, Buk-ku, Taegu, 702-701, Korea

I. 緒 論

動物의 皮膚中에는 많은 量의 7-dehydrocholesterol(7-DHC)이 準備되어 있으며, 이는 紫外線(UV)의 照射를 받았을 때 previtamin D₃(PreD₃)로 異性化되고, 이는 또 體溫에 依하여 vitamin D₃(VD₃)로 轉換되며, VD₃는 血液으로 移送되고(Holick 等, 1984; Ray 等, 1986; Smith 等, 1987), 肝臟으로 가서 25-hydroxyvitamin D₃[25(OH)D₃]로 代謝되며(Okano 等, 1984; Takada 等, 1981; Davie 等, 1980; Holick, 1981; Adams, 1982; Webb 等, 1989; Hidioglou, 1989), 이는 腎臟으로 가서 1, 25-dihydroxyvitamin D₃[1,25(OH)₂D₃]로 代謝되고(Fox, 1988; Lawson 等, 1971; Holick 等, 1988), 이 hormone이 各 組織으로 가서 骨格의 畸形防止(Lawson 等, 1971; Engstrom 等, 1986; Vieth 等, 1987; Francis 等, 1987), 皮膚疾患治療(Smith 等, 1987; Holick, 1988, 1989; Holick 等, 1988), 異狀細胞의 抗增殖(Hosomi, 1983; MacLaughlin 等, 1985; Smith 等, 1986; Morimoto 等, 1986; Holick 等, 1987), 糖尿病 豫防 및 기타 여러가지 hormone 分泌에 關與한다고 알려졌다(Bouillon 等, 1988; Colas 等, 1988).

Haussler와 Rasmussen(1972)은 병아리의 血漿, 肝臟, 腎臟 및 骨格中 VD₃, 25(OH)D₃ 및 1,25(OH)₂D₃ 含量을 測定하였다. Takeuchi 等(1987)은 HPLC로 魚類의 肝에서 VD₃ 및 그 代謝物質을 分離하고 이들 含量을 測定하였다. Pask-Hughes와 Calam(1982)는 HPLC를 利用하여 대구 肝油中의 VD₃ 含量을 測定하는 方法을 提示하였으며, Okano 等(1978)은 UV 照射時에 非照射時보다 VD-缺乏症의 Ca 運搬力이 多少 높았으며, 肝臟과 血清內 25(OH)D₃ 含量이 各各 22.7ng/g, 37.2ng/ml이었다고 報告하였다.

Kobayachi 等(1979)은 VD-缺乏症에 UV를 照射하여 血液과 肝에서 25(OH)D₃가 生成됨을 確認하였다. Parviainen 等(1984)은 cartridge와 HPLC를 利用하여 牛乳中의 25(OH)D₃를 定量하였다.

Chaudhary와 Care(1985)는 緬羊에게 365nm의

紫外線을 50cm거리에서 33週間 照射한 結果 血液中의 VD₃는 多少 增加하였으나 25(OH)D₃의 增減은 크게 影響을 받지 않았다고 發表하였다. Takeuchi 等(1986)은 順相 및 逆相 HPLC를 利用하여 여러가지 魚類의 各 組織別 VD₃, 25(OH)D₃ 含量을 測定하는 方法을 提示하였으며 肝臟中 25(OH)D₃ 濃도가 10ng/g이었다고 發表하였다. Takeuchi 等(1987)은 22種의 魚類에서 VD₃는 모두 測定되었으나, 25(OH)D₃는 7種에서만 測定되었다고 報告하였다.

따라서 本 研究에서는 VD-缺乏 브로일러 병아리에 UVB를 相異한 線量으로 照射하여 肝臟內 25(OH)D₃를, 아직 試圖된 바 없는 經時的 測定을 通하여 VD₃의 代謝에 미치는 影響을 究明코자 하였다.

II. 材料 및 方法

肉用 Hubbard 系 1日齡 병아리를 VD-缺乏飼料(A.O.A.C, 1984)로 31日間 飼育하였으며 同 飼料는 粉碎 옥수수 58%, 밀가루 25%, 配-處理 카제인 12%, 酵母(窒素 7%) 2%, 磷酸 3칼슘 2%, 食鹽 1%, MnSO₄ · 5H₂O 0.22%로 配合되었고, 이는 水分 10.07%, 粗蛋白質 18.84%, 粗脂肪 2.34%, 可溶無窒素物 64.31%, 粗纖維 0.30%, 粗灰分 4.14%, Ca 0.94%, P 0.71% 含有하고 있었다. 병아리들은 窓門에 검은 비닐 2枚를 附着하여 室內 照明을 5lux로 한 肉 鷄舍에서 管理하였다.

31日齡 병아리를 36首씩 특수 제작한 cage에 넣고 297nm의 UVB light box(National Biological Corp., N.Y., Model Panosol II)를 15cm 거리에서 30分(1,800秒) 또는 60分間 照射하였다. 이때의 照射線量을 Research Radiometer(International Light, Inc., N.Y., Model IL-1700)로 測定하였던 바, 0.204 또는 0.408mJ/cm²이었다. UVB 照射 直後(0時間), 6, 12, 18, 30, 42, 66, 90 또는 138時間 지난後, 每回 4首의 병아리를 屠殺하여 肝臟을 採取하였다.

肝臟試料는 CHCl₃:MeOH(2:1, v/v)로 脂質을 抽出하고, 이를 Sep-Pak silica cartridge에 부은後, 90% ethyl acetate/hexane으로 25(OH)D₃ 分劃을 받고, 順相 HPLC로 25(OH)D₃ 含量을 分析하였다.

對照區로서 10首를 利用하였는데, 그 中 5首는 UVB를 照射하지 않은 병아리의 肝臟中 25(OH)D₃ 含量을 測定하기 위하여, 나머지 5首는 25(OH)D₃ 回收試驗을 위하여 使用되었다. 한편, 1ppm의 25(OH)D₃ 標準溶液을 만들고 이의 0~100 μ l(0~100ng)를 HPLC에 注入하여 chromatogram의 높이에 따르는 標準曲線을 그렸다.

本 研究의 HPLC는 Waters Inc.의 Model M-204 이었으며 이에는 Alltech Associates Inc.의 Econosphere silica 5 μ guard column(10 \times 4.6mm)과 μ porasil main column(250 \times 4.6mm), Waters Inc.의 U6K injector, M-6000A pump, UV 254nm 고정 M 440 detector 및 M 730 Date Module recorder가 부착되어 있었다.

그리고 HPLC의 使用條件은 AUFS:0.02, chart 속도 0.5: cm/min, 流速: 2 ml/min, solvent: MeOH(1):isopropanol(2):hexane(100)(v/v/v) 이었다. 各 試料로부터 얻은 chromatogram으로부터 25(OH)D₃의 높이를 얻고 標準曲線에 따라 25(OH)D₃ 含量을 求하였으며 HPLC에 注入한 比率와 回收率을 補正하여 肝臟 1g中의 25(OH)D₃ 含量을 計算하였다.

III. 結果 및 考察

1. 30分 照射後 25-hydroxyvitamin D₃ 含量 變化

肝臟 脂質에서 分離한 25(OH)D₃를 HPLC에 注入하여 分析한 chromatogram은 Fig. 1과 같이 나타났다. UVB 30分 照射의 前에도 17.5ng/g의 25(OH)D₃가 含有되어 있었으며 照射後 66時間帶에는 40.5ng/g으로 나타나 여러 經過時間中 가장 높은 含量을 보였으나, 138時間 後에도 相當히 높은 水準을 維持하였다. 各 時間에 따르는 25(OH)D₃의 含量은 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 照射前의 17.5ng/g에서 12時間의 작은 peak 37.8ng/g으로 增加하였다가 18시간의 最低值 25.66ng/g으로 減少된 後(그러나 照射前의 含量보다는 높음), 30時間(29.26ng/g), 42時間(29.33ng/g)을 거쳐 66時間의 最高值 40.5ng/g까지 上昇하였다가 다시 下降하여 90時間에 28.3ng/g을 보였으며, 138時間帶에서는 다시 增加하여

40 ng/g의 높은 값을 나타내었다.

조그만 peak들이 여러個 나타난 것이 注目되는데 VD-缺乏狀態에 있었기 때문에 UVB 30分 照射로서는 25(OH)D₃를 크게 增加시키지 못하고 體內 需要를 充當하기에 汲汲하였다는 것을 보여준다. 병아리 뿐만 아니라 다른 動物에 있어서도 UV照射 또는 VD₃ 經口 投與 後 經時的으로 肝臟中의 25(OH)D₃를 調査한 研究가 없기 때문에 本 研究 結果와 直接 比較할 수 없는 것이 遺憾이다.

Okano 等(1978)은 VD-缺乏 흰쥐에게 85 μ W/cm²/min의 線量으로 280~310nm UV를 照射하여 肝臟中의 25(OH)D₃를 分析하였던바, 22.7ng/g의 높은 값을 보였으며 UV를 照射하지 않은 對照區의 肝臟에서는 25(OH)D₃가 測定되지 않았다고 하였으므로 本 研究의 最大值(40.5ng/g)와 對照區(17.5ng/g)의 水準보다 낮게 나타났으나 經時的으로 測定하지 않았으므로 積極的인 比較가 될 수 없었다.

또 한편 Takeuchi 等(1986)은 몇가지 魚類의 肝臟中 25(OH)D₃ 含量을 調査하였는데 칠성장어는 10ng/g, 날개다랑어에서 139ng/g, 가다랑어 0ng/g으로서 本 研究의 VD-缺乏 병아리 對照區의 肝臟中 25(OH)D₃보다 칠성장어는 낮게, 날개다랑어는 매우 높게, 가다랑어는 매우 낮게 나타났으며, 여기에서도 經時的인 研究가 이루어지지 않았다. Takeuchi 等(1987)은 繼續된 研究에서 여러 魚種의 肝臟中 25(OH)D₃를 分析한 結果 칠성장어는 9 \pm 5ng/g, 은연어는 10 \pm 2ng/g, 콩치는 35 \pm 17ng/g, 방어는 196 \pm 117ng/g, 날개다랑어는 207 \pm 54ng/g, 참치는 65 \pm 18ng/g을 나타내어 魚種間 差異가 相當히 크게 나타났다고 하였는데 本 研究 最大值보다 낮게, 낮게, 비슷하게, 매우 높게, 약간 높게 各各 나타났다.

Holmes 等(1982)은 2~2.5kg의 뉴질랜드 흰토끼에게 2週日間 體重 kg당 10,000 IU의 VD₃를 給與한 뒤, 肝臟에서 58.7 \pm 23.5ng/g의 25(OH)D₃를 測定하였다고 하였으므로 本 研究의 最大值 40.5ng/g보다 약간 높은 數值이다. Gascon-Barre 等(1979)은 VD-缺乏 飼料를 먹인 쥐를 實驗에 供試하여 3.7週 동안 每週 3回 [¹⁴C]VD₃를 給與한 後 肝臟에서 6ng/g의 25(OH)D₃가 測定되었다고 하므로 이는 本 研究의

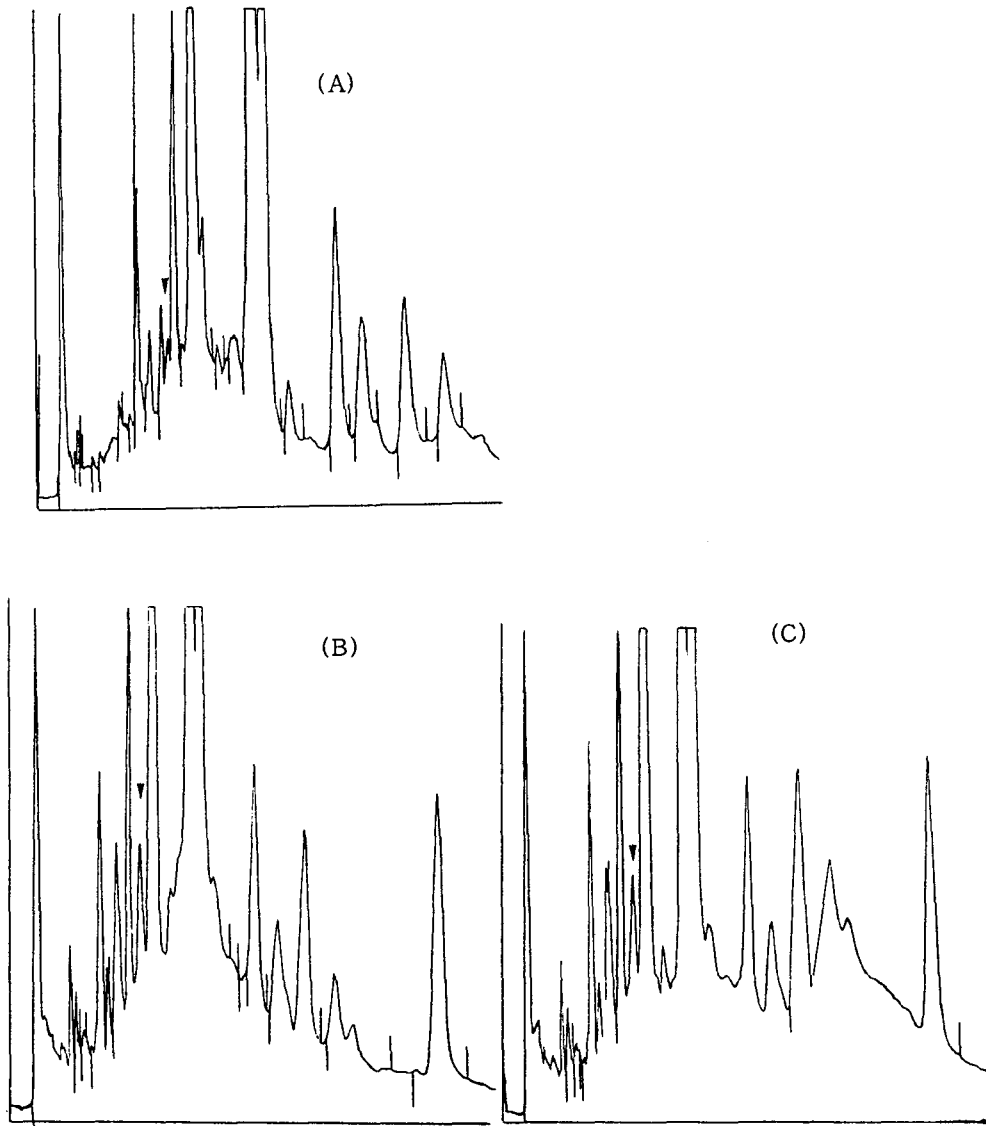


Fig. 1. Representative elution profiles of 25-hydroxyvitamin D₃ in lipid extract of 31 days old broiler chicks liver fed vitamin D-deficient diet from normal phase HPLC before (A), 66hr (B) and 138 hr (C) after exposure to UVB light with dose of 0.204 mJ/cm². Concentrations of 25-hydroxyvitamin D₃ before (A), 66hr (B) and 138hr (C) after irradiation were 17.5, 40.5 and 40 ng/ml, respectively.

VD-缺乏飼料로 31일간 飼育한 broiler 병아리에 UV를 30分間 照射한 後 66時間帶에 나타난 40.5 ng/g보다 매우 낮은 水準이다. Rabinowitz 等(1988)은 17日

間 每 3日마다 0, 4 및 16 μ g의 [³H]VD₃를 給與한 結果, 병아리의 肝臟中 25(OH)D₃가 各各 0, 2 및 4 ng/g을 나타내었다고 하므로 本 研究의 最大値보다

모두 낮게 나타났다.

2. 60分照射後 25-hydroxyvitamin D₃의 含量變化

採取한 肝臟中의 25(OH)D₃含量을 分析하여 Fig. 2와 같은 graph를 얻었다. UVB 照射 後 12時間帶에 작은 peak, 18時間帶에 最低值, 그 後 42時間까지 增加되어 最高值를 나타내었으며 66時間帶에는 다시 26.78 ng/g까지 減少되었다가 그 後 다시 上昇, 90時間에는 42.16 ng/g, 138時間에는 39.5 ng/g을 보였다. 3個의 peak를 띄우는 것은 30分 照射時와 같으나, 가운데의 最高值가 30分 照射時 보다 18時間 빨리 나타났고 peak높이로 60分 照射時에 훨씬 더 높게 나타났다. 30分 照射時에는 UVB 照射前의 17.5 ng/g보다 23 ng/g 더 높았으나 60分 照射時에는 43.9 ng/g 더 增加되었으므로 그 增加量에 있어서 60分 照射時에는 30分 照射時의 191%로서 거의 2배에 해당한다.

Okano 等(1978)이 VD-缺乏 흰쥐에게 UV를 照射한 結果 肝臟中의 25(OH)D₃ 含量이 22.7 ng/g이었다고 하므로 本 研究 結果보다 相當히 낮으며 絕對增

加量에 있어서도 本 연구의 43.9 ng/g의 1/2 水準에도 미치지 못한다. 그리고 30分 照射時에도 마찬가지로 UVB照射를 받지 않은 對照區의 肝臟中에 25(OH)D₃가 17.5 ng/g 들어 있다는 것은 注目되는 일인데 AOAC(1984)가 제시한 VD-缺乏飼料로는 VD₃를 完全히 缺乏시키지 못한다는 것을 알려준다.

Okano 等(1978)은 흰쥐를 VD-缺乏飼料(Ca 0.47%; P 0.3%)로 6週間, 그 後 역시 VD-缺乏飼料이 되 Ca 0.02%, P 0.3%인 飼料로 2週間 飼育한 後에 供試하였다고 하므로 本 研究와의 差異는 그들은 前期에 本 研究보다 낮은 Ca와 P, 後期에 Ca이 거의 없는 飼料를 給與하였다는 事實이다. 本 研究에서는 31日間 繼續 Ca 0.94%, P 0.71%의 飼料를 給與하였다.

Takeuchi 等(1986)은 칠성장어의 肝臟에는 25(OH)D₃가 10 ng/g이, 날개다랑어는 139 ng/g이 含有되어 있었다고 하므로 前者는 本 研究 42時間 經過時의 61.4 ng/g의 1/6에 지나지 않으나 後者는 2倍以上의 많은 25(OH)D₃를 含有하고 있었다 또한 Takeuchi 等(1987)의 報告에 依하면 은연어의 肝臟

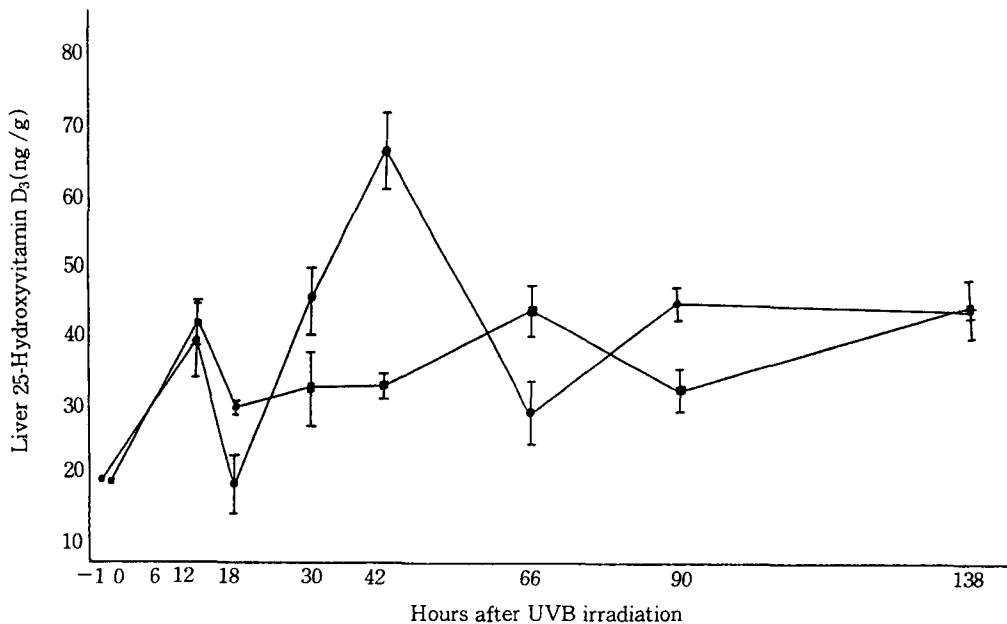


Fig. 2. Liver concentration of 25-Hydroxyvitamin D₃ in 31 days old broiler chicks fed vitamin D-deficient diet according to the time after UVB irradiation with the dose of 0.204 mJ/cm² (●) or 0.408 mJ/cm² (■). Values are expressed as the mean ± SEM.

중에는 10 ± 2 , 뱀장어는 35 ± 7 , 방어는 196 ± 114 , 날개다랑어는 207 ± 54 , 참치는 65 ± 18 ng/g을 보였고 하였고므로 본 연구의 最高值 61.4 ng/g에 比하여 낮게, 낮게, 낮게, 높게, 높게, 비슷하게 각각 나타났다.

Holmes 等(1982)은 2~2.5kg의 뉴질랜드 흰토끼에게 2週日間 體重 kg當 10,000 IU의 VD_3 를 給與한 뒤, 肝臟에서 58.7 ± 23.5 ng/g의 $25(OH)D_3$ 를 測定하였다고 하므로 본 연구의 最高值 61.4 ng/g보다 약간 높은 數值이다. Gascon-Barre 等(1979)는 VD -缺乏 飼料를 먹인 쥐를 實驗에 供試하여 3.7週동안 每週 3回 [^{14}C] VD_3 를 給與한 後 肝臟에서 6 ng/g의 $25(OH)D_3$ 가 測定되었다고 하므로 이는 본 연구의 VD -缺乏 飼料로 31일간 飼育한 broiler 병아리에 UVB를 60分間 照射하여 나타난 最高值 61.4 ng/g보다 매우 낮은 水準이다. Rabinowitz 等(1988)은 17日間, 每 3日마다 0, 4 및 $16 \mu g$ 의 [3H] VD_3 를 給與한 結果, 병아리의 肝臟中 $25(OH)D_3$ 가 各各 0, 2 및 4 ng/g을 나타내었다고 하므로 본 연구의 最高值 보다 모두 매우 낮게 나타났다.

3. 25-hydroxyvitamin D_3 同定

HPLC에서 얻어진 $25(OH)D_3$ fraction을 methanol(HPLC 等級)溶液에 일정량을 녹인 後, UV 흡수 spectrophotometer를 利用 UV 흡수 spectrum을 求한 結果, Fig. 3과 같이 나타났다. 265nm에서 最高值, 227nm에서 最低值를 보였으며, 이는 Lawson 等(1971), Blunt 等(1968), Jones(1978), Okano 等(1984)의 結果와 동일하며 동시에 肝臟에서 分離한 物質이 $25(OH)D_3$ 임이 밝혀졌다.

IV. 摘要

本 연구는 無窓弱燈의 鷄舍에서 vitamin D-缺乏 飼料로 31日間 飼育한 肉用 Hubbard系 병아리의 全身에 UVB를 0.204 또는 0.408 mJ/cm²(照射時間 30分 또는 60分) 照射하고 經時的으로 肝臟內 25-hydroxyvitamin D_3 [$25(OH)D_3$] 含量을 測定코자 實施되었다. 먼저 脂質을 抽出하고 Sep-Pak silica cartridge에 依하여 $25(OH)D_3$ 를 分離한 다음, 順相 HPLC에 依하여 $25(OH)D_3$ 含量을 分析하였다. UVB를 照射하지 않은 對照區 병아리의 肝臟中 $25(OH)D_3$ 濃度는 平均 17.5 ng/g이었으며 0.204 mJ/cm² 處理後 12時間帶의 濃度는 37.8 ng/g이었

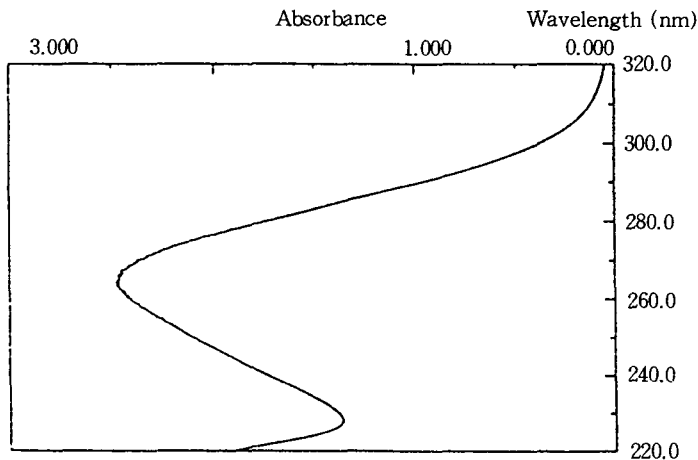


Fig. 3. Ultraviolet absorption spectrum of 25-hydroxyvitamin D_3 isolated from broiler chicks liver. The spectrum was measured by UV-Visible Spectrophotometer(Jasco, International Co., Ltd. Model-7800)

고 66시간대에 40.50 ng/g의 最高値를 보였다. 그 後 肝臟의 25(OH)D₃ 含量이 減少되었다. 0.408 mJ/cm² 照射時에는 12시간대에 36.7 ng/g이었고 42시간대에 61.4 ng/g의 最高値를 나타내었다. 그 後 減少되어 138시간대에 39.50 ng/g을 보였다. UVB 照射로 增加된 絶對量은 0.204 mJ/cm²때 23 ng/g, 0.408 mJ/cm²때 43.9 ng/g(191%)으로서 照射線量을 2배로 하였을 때 肝臟中 25(OH)D₃의 生成量은 約 2배였다. 그리고 照射線量을 2배로 하니가 肝臟中 25(OH)D₃의 最高値가 24時間 더 빨리 나타나는 傾向을 보였다.

V. 引用文獻

1. A.O.A.C. 1984. Vitamin D₃ in poultry feed supplements chick bioassay. Official Methods of Analysis. A.O.A.C. Washington, D. C. p. 876.
2. Adams, J. S., T.L. Clemens, J.A. Parrish and M.F. Holick. 1982. Vitamin D synthesis and metabolism after ultraviolet irradiation of normal and vitamin D-deficient subjects. N. Engl. J. Med. 306:722-725.
3. Blunt, J.W., H.F. DeLuca and H.K. Schnoes. 1968. 25-Hydrocholecalciferol: a biologically active metabolite of vitamin D. J. Biochem. 7 (10):3317-3322.
4. Bouillon, R., J. Verhaeghe, B.L. Myomba, W. J. Visser, H.V. Baelen and M. Thomasset. 1988. Interaction between vitamin D, insulin and diabetes mellitus. in Norman, A.W., K. Schaefer, H.-G. Grigoleit and D. V. Herrath (editor). 1988. Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology(Proceedings of the seventh workshop on vitamin-D). pp. 875-884.
5. Chaudhary, M.S. and A.D. Care. 1985. Production of vitamin D₃ in sheep in response to artificial ultraviolet light exposure. in Norman, A.W., K. Schaefer, H.-G. Grigoleit and D.V. Herrath(editor). 1985. Vitamin D: Chemical, Biological and Clinical Update (Proceedings of sixth workshop on vitamin D). pp. 711-12.
6. Colas, C., M. Garabenian, A. Fontbonne, H. Guillozo, N. Desplanque, G. Slama and G. Tchobroutsky. 1988. Increase insulin response to glucagon following UVB irradiation in healthy adults. in Norman, A.W., K. Schaefer, H.-G. Grigoleit and D.V. Herrath (editor). 1988. Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology(Proceeds of seventh workshop on vitamin D). pp. 893-894.
7. Davie, M. and D.E.M. Lawson. 1980. Assesment of plasma 25-hydroxy VD response to ultraviolet irradiation over a controlled area in young and elderly subjects. J. Clinica. Sci. 58:235-242.
8. Engstrom, G. W. and E. T. Littledike. 1986. Vitamin D metabolism in the pig. J. Swine in biochemical research. 2:1091-1112.
9. Fox, J. 1988. Measurement of production rate and metabolic clearance rate of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in conscious rats using a simplif-idprimed-infusion technique. in Norman, A.W., K. Schaefer, H.-G. Grigoleit and D.V. Herrath(editer). 1988. Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology(Proceedings of the seventh workshop on vitamin D). pp. 128-131.
10. Francis, R.M. and M. Peacock. 1987. Local action of oral 1,25-dihydroxycholecalciferol on calcium absorption in osteoporosis. Am J. Clin. Nutr. 46:315-318.
11. Gascon-Barré, M., B. Hollis and S. Mah, 1979. Effective liver 25-hydroxylation of vitamin D under chronic ethanol administration in the rat. in Norman, A.W., K. Schaefer, D. V. Herrath, H.-G. Grigoleit, J. W. Coburn,

- H.F. DeLuca, E. B. Mawer and T. Suda. 1979. Vitamin D: basic research and its clinical application(Proceedings of the fourth workshop on vitamin D, Berlin, West Germany, February, 1979). Walter de Gruyter, Berlin, N.Y. pp. 479-482.
12. Haussler, M. R. and H. Rasmussen. 1972. The metabolism of vitamin D₃ in the chick. *J. Biological Chem.* 247(8):2328-2335.
 13. Hidiroglou, M. 1989. Providing vitamin D to confined sheep by oral supplementation vs. ultraviolet irradiation. *J. Anim. Sci.* 67(3):794-802.
 14. Holick, M.F. 1981. The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: a unique photoendocrine system. *J. Invest. Dermatol* 76:51-58.
 15. Holick, M. F. 1984. The photobiology of vitamin D₃ in man. In: vitamin D, Kumar, R. [ed]. vitamin D. p. 197-216.
 16. Holick, M. F., E. Smith and S. Pincus, 1987. Skin as the site of vitamin D synthesis and target tissue for 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Arch. Dermatol.* 123:1677-1683.
 17. Holick, M. F. 1988. Vitamin D and the skin: site of synthesis, target tissue and new therapeutic approach for psoriasis. in Norman, A. W., K. Schaefer, H.-G. Grigoleit and D.V. Herrath(editor). 1988. Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology(Proceedings of the seventh workshop on vitamin D.) pp. 925-934.
 18. Holick, M.F., E.L. Smith and S. Pincus. 1988. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is an effective therapeutic agent for the treatment of psoriasis vulgaris and erythroderma psoriasis. in Norman, A.W., K. Schaefer, H.-G. Grigoleit and D.V. Herrath(editor). 1988. Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology(Proceedings of the seventh workshop on vitamin D). pp. 1007-1008.
 19. Holick, M.F. 1989. Will 1,25-dihydroxyvitamin D₃, MC 903, and their analogues herald a new pharmacologic era for the treatment of psoriasis? *Arch. Dermatol.* 125:1692-1697.
 20. Holmes, R.P. 1882. Tissue infiltration of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D during hypervitaminosis D. in Norman, A.W., K. Schaefer, H.-G. Grigoleit and D.V. Herrath (editor). 1982. Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Endocrinology of Calcium Metabolism. pp. 567-569.
 21. Hosomi, J., J. Hosoi, E. Abe, T. Suda and T. Kuroki. 1983. Regulation of terminal differentiation of cultured mouse epidermal cells by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *J. of Endocrinology.* 3:1950-1957.
 22. Jones, G. 1978. Assay of vitamin D₂ and D₃, and 25-hydroxyvitamin D₂ and D₃ in human plasma by HPLC. *J. Clin. Chem.* 24(2):287-298.
 23. Kobayashi, T., T. Okano, K. Mizuno, N. Matsuyama, N. Nobuhara, K. Takada and T. Takao, 1979. Identification of *in vivo* generated previtamin D₃, vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ in the vitamin D-deficient rats irradiated by ultraviolet light. in Norman, A.W., K. Schaefer, D.V. Herrath, H.-G. Grigoleit, J. W. Coburn, H.F. DeLuca, E. B. Mawer and T. Suda. 1979. Vitamin D: basic research and its clinical application(Proceedings of the fourth workshop on vitamin D, Berlin, West Germany, February, 1979). Walter de Gruyter, Berlin, N.Y. pp. 159-162.
 24. Lawson, D.E.M., D.R. Fraser, E. Kodicek, H.R. Horris and D. H. Williams. 1971. Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism. *Nature.* 23:228-230.
 25. MacLaughlin, J.A., W.Gange, D. Taylor, E. Smith and M. F. Holick. 1985. Cultured

- psoriatic fibroblasts from involved and uninvolved sites have a partial but not absolute resistance to the proliferation-inhibition activity of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:5409-5412.
26. Morimoto, S., T. Onishi, S. Imanaka, H. Yukawa, T. Kozuka, Y. Kitano, K. Yoshikawa and Y. Kumahara. 1986. Topical administration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ for psoriasis: report of five cases. Calcif. Tissue Int. 38:119-122.
 27. Okano, T., K. Mizuno and T. Kobayashi. 1978. Identification and determination of 25-hydroxyvitamin D₃ in the blood and liver of vitamin D-deficient rats irradiated with ultraviolet light. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 24:511-518.
 28. Okano, T., S. Masuda, S. Kusunose, M. Komatsu and T. Kobayashi. 1984. A rapid method for purification of 25-hydroxyvitamin D₂ from rabbit plasma by recycle high-performance liquid chromatography. J. of Chromatography. 294:460-465.
 29. Parviainen, M. T., T. Koskinen, M. Ala-Houhala and J. K. Visakorpi. 1984. A method for routine estimation of vitamin D activity in human and bovine milk. Acta. Vitaminol. Enzymol. 6(3):211-219.
 30. Pask-Hughes, R.A. and D. H. Calam. 1982. Determination of vitamin D₃ in cod-liver oil by HPLC. J. Chromatography. 246:95-104.
 31. Rabinowitz, L., J.M. Pettifor and F.P. Ross. 1988. The effect of vitamin D status of vitamin D metabolism in chicks. in Norman, A. W., K. Schaefer, H.-G. Grigoleit and D.V. Herrath(editor). 1982. Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Endocrinology of Calcium Metabolism. pp. 135-136.
 32. Ray, R., S.A. Holick, N. Hanafin and M.F. Holick. 1986. Photoaffinity labeling of the rat plasma vitamin D binding protein with [26, 27-³H]-25-hydroxyvitamin D₃ 3β-[N-(4 azoide-2-nitrophenyl) glycinate]. Biochem. J. 25:4729-4733.
 33. Smith, E.L., N.C. Walworth and M.F. Holick. 1986. Effect of 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ on the morphologic and biochemical differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free conditions. J. Invest. Dermatol. 86:709-714.
 34. Smith, E. L., S. H. Pincus, L. Donovan and M. F. Holick. 1987. A novel approach for the evaluation and treatment of psoriasis. J. Am. Acad. Dermatol. 19:516-528.
 35. Takada, K., A. Takashima and Y. Shimoi. 1981. A study of the photobiogenesis of cholecalciferol *in vivo* and the constraint on its 25-hydroxylation in rat. J. Steroid Biochem 14:1461-1367.
 36. Takeuchi, A., T. Okano, M. Sayamoto, S. Sawamura, T. Kobayashi, M. Motosugi and T. Yamakawa. 1986. Tissue distribution of 5-dehydrocholesterol, vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ in several species of fishers. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 32:13-22.
 37. Takeuchi, A., T. Okano, M. Torii, Y. Hatanaka and T. Kobayashi. 1987. Comparative studies on the contents of vitamin D₃, 25-hydroxyvitamin D₃ and 7-dehydrocholesterol in fish liver. Comp. Biochem. Physiol. 88B(2):569-573.
 38. Vieth, R., D. Fraser and S.W. Kooh. 1987. Low dietary calcium reduces 25-hydroxycholecalciferol in plasma of rats. J. Nutr. 117:914-918.
 39. Webb, A.R., B.R. Decosta and M.F. Holick. 1989. Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D₃ by causing its photodegradation. J. Clin. Endocrinol. Metab. 68:882-887.