

Title	ヒト骨肉腫由来骨型アルカリホスファターゼの精製
Author(s)	増原, 建作
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35999">https://hdl.handle.net/11094/35999</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	ます 増	はら 原	けん 建	さく 作
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8131	号	
学位授与の日付	昭和63年3月25日			
学位授与の要件	医学研究科外科系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	ヒト骨肉腫由来骨型アルカリホスファターゼの精製			
論文審査委員	(主査) 教授	小野 啓郎		
	(副査) 教授	坂本 幸哉	教授	森 武貞

### 論文内容の要旨

#### [目 的]

1923年Robisonらにより、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性と骨疾患との関連が示唆されて以来、ヒトALPに関する研究が進められたが、骨・肝臓・腎臓・小腸・胎盤の各組織に由来するALPアイソザイムの構造上の類似性のため各アイソザイムの定量法は確立されていない。例えばヒト骨型ALPは、骨肉腫やPaget病などのある種の骨疾患で高い活性を示し、臨床診断上重要な指標である。

本研究で我々は骨型ALP定量法を確立する第一段階としてヒト骨肉腫を材料として骨型ALPの精製を試みた。

#### [方法ならびに成績]

##### 1. ALPの精製

12才女子の大腿骨々肉腫の生検材料をBalb/cヌードマウスに移植し、以後6年間継代・維持している骨肉腫を実験材料とした。ALP活性の検定は、室温(22°C)にて4mM p-nitrophenyl phosphateを含む基質液0.5mlに0.01mlの(稀釈) sampleを加えて410nmの吸光を測定することにより、1分間に遊離されるp-nitrophenol量( $\mu$ mole)をもって表わした。以下の精製の全過程は4°Cにて行った。①n-ブタノール抽出、②硫酸分画(33%~71% v/v)、③ハイドロキシアパタイト(Bio Gel-HT)クロマトグラフィー; 段階的濃度勾配(0.01M, 0.5Mリン塩酸)による溶出、④イオン交換(DEAE Sepharose CL-6B)クロマトグラフィー: 直線的濃的勾配(OM~0.4M塩化ナトリウム)による溶出、⑤ゲル濾化(Sephacryl S-400)、⑥再ゲル濾化(Sephacryl S-400)、⑥から得られた活性分画はそのピークが280nmにおける吸光のピークと一致し、これを最終精製分画とした。比活性は

starting material に対し約900倍に精製され、1520 U/mg の値を示した。この値は、報告されているヒト他組織由来（肝臓・腎臓・小腸・胎盤）の精製ALPと同程度であった。最終精製分画は、ディスク電気泳動上単一のバンドを呈し、ALP活性染色で陽性であった。サブユニットの分子量はSDSポリアクリルアミド電気泳動上、約8万であった。

## 2. 精製ALPの組織特異性の検索

ヒト骨型ALPのスタンダードとしてPaget病疾患血清（1620 IU/l）を、またヒト肝型ALPのスタンダードとして胆管炎患者血清（1420 IU/l）を用いた。

### ① 熱耐性

精製ALP、骨型および肝型ALPスタンダードを56°Cで30分間加温し、5分間隔でALP活性を測定した。その結果精製ALPは骨型ALPスタンダードと同様の熱耐性曲線を示し、肝型ALPスタンダードと区別された。さらに65°C4分間の熱処理により完全に失活したことにより精製ALPは近年報告されている腫瘍関連型ALPとも区別された。

### ② 薄層電気泳動

精製ALP、骨型および肝型ALPスタンダードの電気泳動上の易動度をポリアクリルアミド薄層電気泳動により検定した。その結果精製ALPの易動度は骨型ALPのそれに一致し、肝型ALPとは区別された。

### ③ アミノ酸による酵素阻害テスト

精製ALPに対するL-フェニルアラニン（5 mM）、L-ホモアルギニン（5 mM）の影響を検索したところ、精製ALPはL-フェニルアラニン抵抗性、L-ホモアルギニン感受性を示し、小腸型ALP、胎盤型ALPとは区別された。

### [総括]

ブタノール抽出、硫酸分画、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾化（Sephacryl S-400）を用いてヒト骨肉腫より、骨型ALPを高度精製した。

## 論文の審査結果の要旨

本研究はヒト由来の骨性アルカリホスファターゼの精製法の確立を行い、さらにその臨床的応用を目的としたものである。従来骨性アルカリホスファターゼの高度精製は報告されておらずその意味で意義深い。さらに近年開発されたモノクローナル抗体作製技術を応用することによりヒト骨性アルカリホスファターゼを特異的に認識しうる抗体を作製できる可能性があり、これを用いて将来血清中または組織内での同酵素の検定が可能となれば、特に骨疾患の早期診断や鑑別診断として有力な方法となることが期待できる。従って本研究は博士論文に値するものである。