

レクチン処理による骨性アルカリフォスファターゼ  
(ALP III) の分離定量法

奈良県立医科大学泌尿器科学教室

窪 田 一 男

QUANTITATIVE ANALYSIS OF SERUM BONE ALP (ALP III) IN  
AFFINITY ELECTROPHORESIS AND THE PRECIPITATION  
METHOD CONTAINING LECTIN

KAZUO KUBOTA

*Department of Urology, Nara Medical University*

Received March 31, 1989

*Summary:* For decades, ALP had been interpreted as a marker enzyme of metabolic bone diseases and an isoenzyme specific for the osteoblast been widely known as ALP III, too.

Moreover, current tremendous advances in dialysis technology project an impact for the clinical significance of ALP III, because of the advent of a new characteristic clinical entity formed renal osteodystrophy (ROD) which had been one of the inevitable complications in long term hemodialysis patients.

So far, however, many conventional methods failed to separate clearly ALP III from the liver specific ALP (ALP II) and present determination of ALP III by no means satisfied the clinical demand due to the lack of a direct quantitative method.

On the other hand, lectin method, reported originally in 1984 by Rosalki, proved it to be possible to measure ALP III directly as well as quantitatively. So, the author performed this study to confirm more precisely several conditions of procedure of the lectin method, using established osteoblastic cell line ROS 17/2 as a marker, as well as the availability of its clinical application, and obtained the following results; 1) The optimum concentration of Wheat-Germ lectin binded fully to ALP III was 139  $\mu\text{mol/ml}$  in distilled water. 2) The concentration of Triton X-100 preventing biliary ALP from ALP-lectin complex was 20%. 3) ALP III activity incubated with lectin overnight at 4°C after incubation for 30 min. at 37°C was higher (mean  $\pm$  S.D, 24.0  $\pm$  15.2%) than that incubated with lectin for 30 min. at 37°C. 4) ALP III was clearly separated from the liver fraction using affinity electrophoresis on polyacrylamide gel disc and isoelectric focusing on agarose gel. 5) ALP III activity in precipitate showed good correlation ( $r=0.998$ ) with the differential between total ALP activity and ALP II activity in supernate.

**Index Terms**

Wheat-Germ lectin, affinity electrophoresis, bone ALP isoenzyme, liver ALP isoenzyme

緒 言

1923年 Robison<sup>1)</sup> が成長しつつある骨組織にアルカリホスファターゼ (ALP) を発見して以来、骨疾患における ALP の意義、とくに骨芽細胞に豊富に存在することから骨形成との密接な関係は知られていた<sup>2)3)</sup>が、骨芽細胞中の ALP 活性が副甲状腺ホルモンによっても変動すること<sup>4)5)</sup>や、骨芽細胞が破骨細胞活性の誘導に一役を担っていることが確認されてきている<sup>6)</sup>。さらに、最近では骨形成はもとより骨吸収にも骨芽細胞が本質的な役割を有していると考えられ<sup>7)</sup>、代謝性骨疾患における重要なマーカーとして ALP が再認識されている<sup>8)~10)</sup>。

代謝性骨疾患は従来は一部の先天性疾患ならびに副甲状腺機能亢進症、サルコイドーシス、骨軟化症および悪性腫瘍の骨転移などの限られた臨床例を包括するにすぎなかったが、透析療法の確立に伴って慢性腎不全に必発の合併症として、臨床上無視できない重要な疾患となっている。なかでも、他の代謝性骨疾患と異なり腎性骨異栄養症 (renal osteodystrophy, 以下 ROD と略す) での骨病変<sup>11)12)</sup>は、骨軟化症、骨粗鬆症、線維性骨炎および inactive bone などの各病変が重複かつ、変動するためその臨床像の把握に骨性アイソザイムである ALP III が key parameter として極めて重要な検査項目となっている。

1962年 Hodson et al.<sup>13)</sup> により ALP のアイソザイムの存在が示唆されて以来、臨床診断への応用が一般化されたが、未だ半定量的表示にすぎず、満足できる数量表示法は確立されていない。ことに従来より熱処理法<sup>14)</sup>および電気泳動法<sup>15)</sup>のいずれにおいても骨性アイソザイムと肝性アイソザイムの分離は不十分であった。

1985年 Rosalki et al.<sup>16)</sup> は Lectin の一種の Wheat Germ Lectin<sup>17)</sup> との反応性を利用して、ほぼ選択的に ALP III を Lectin 反応分画に回収しうることを報告しているが、本法は視覚的判定を必要とせず、また日常の臨床検査操作のみで測定可能であり、従来の ALP アイソザイムに関する報告の中で最も臨床応用可能な方法であると考えられ、教室の金子<sup>18)</sup>は本法を用いて ALP III を測定し、慢性血液透析症例の骨変化と ALP III が相関することを確認し、長期血液透析患者で最も重大な合併症である ROD における副甲状腺摘出術の基準値を設定しているが、レクチン分画における ALP III から非骨性 ALP の除去が未だ不十分であった。そこで本研究では、1) ALP III を最大限に Lectin 分画へ収納する条件、および 2) Lectin 分画から非骨性 ALP を可能な限り除去する条件の二点を明らかにするとともに、

Rosalki et al.<sup>16)</sup> の原法を更に改良し、ALP III に対する特異性を高め、本法の有用性を確認した。

実験材料と方法

1. 試料

a) ヒト血清

対象症例は維持透析患者、男性14例、女性9例、計23例、年齢は30歳~72歳、平均49.3±19.3歳であり、対照症例として承諾の得られたボランティアによる健康成人、男性4例、女性3例、計7例、年齢は24歳~38歳、平均30.6±5.0歳で試料血清は透析前に、対照例については早朝空腹時に採血した。維持透析患者の透析期間は、12~156カ月、平均39.2±27.4カ月であり、原疾患は、慢性糸球体腎炎18例、糖尿病4例、不明1例であった。

b) ROS 17/2 培養濾液<sup>19)</sup>

骨性 ALP のマーカー資料としてラット骨肉腫由来の細胞株である ROS 17/2 細胞 (ROS) の培養濾液を用いた。なお、ROS は京都大学核医学放射線科山本逸雄先生の御好意により提供していただいた。

2. 骨性 ALP (ALP III) の分離定量法 (Fig. 1)

ALP III に親和性をもつ Wheat germ lectin (Sigma Chemical Co. 以下 WGA と略す) を用いた Rosalki et al.<sup>16)</sup> の原法に若干の修正を加え以下の方法にて ALP III を分離し活性値を測定した。

(1) 前処理

文献的に指摘されている胆汁性 ALP (ALP VII)<sup>16)</sup> のレクチン分画への混入を防ぐため、界面活性剤である Triton X-100 による前処置を行った。試料血清 50 μl に 20% Triton X-100 (Rchm & Haas Co.) 5 μl を加え、37°C、30分間 incubation した。

(2) Lectin 処理

前処理した試料血清に Lectin として WGA を 50 μl (139 μmol/ml in distilled water) 添加し Lectin 処理した後、37°C で 30分間 incubation し、さらに 4°C で over night した。

(3) 遠心分離

2000 G、15分間遠心分離 (セントリザルト, SM 13249E 使用) 後、上清をピペットで吸い取り、上清と沈澱物を分離した。

(4) Resuspend

試験管壁に付着した上清を充分に綿棒にて除去し、沈澱物を蒸留水にて洗浄後、35 mmol/ml Sodium dodecyl Sulfate (和光純薬、大阪以下 SDS と略す) 100 μl を加えて白い沈澱物が透明になるまで混和した。



3-indolyl phosphate, p-toruidine salt の基質液にて 37°C で1時間反応させ、充分染色後7%酢酸で脱色、固定した。レクチン親和性ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動はゲル作成時に WGA をゲル管1本あたり 5 $\mu$ l のレクチンを添加しゲル化した。以後の操作はポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動と同様にゲル管に試料血清を 20-50 $\mu$ l 重層し、通電後、染色し脱色、固定した。

b) 等電点電気泳動法

酒井ら<sup>20)</sup>の方法に準じ ALP アイソザイムの分析を等電点電気泳動法により行った。支持体として ISOLAB 社アガロースゲル (80 $\times$ 90 $\times$ 1 mm, pH 3~10) を用い、10 W, 50分間電気泳動後、10 mM P-toluidinum 5-Bromo-3-indor ilphosphate (2M propanediol 緩衝液, pH 10.2) を用い、37°C で60-90分間検出反応を行った。

結 果

1. ALP III 分離定量法各段階での操作条件の確認

a) 添加レクチン濃度

ALP III を結合するのに充分な Lectin 濃度を決定するために試料血清に添加する WGA の添加濃度を検討した。WGA 添加濃度として 92.7  $\mu$ mol/ml, 111.0  $\mu$ mol/ml (WGA 4g/L), 139  $\mu$ mol/ml (WGA 5g/L) の3種類について ROS (骨芽細胞) 培養液を 2000 G, 10分間遠沈 (セントリザルト, SM 13249E 使用) 後の6倍濃縮液に添加後、それぞれの上清および沈澱物の ALP 活性値を Lectin precipitation procedure (Fig. 1) にて測定し、ALP III の回収率を検討した。Table 1 に示すように WGA 添加濃度が 139  $\mu$ mol/ml のときに ROS 培養濃縮液 (6倍濃縮液の総 ALP 活性値は 19.4 KAU) の沈澱物の ALP 活性値は 19.3 KAU とほぼ100%の回収が得られたが、WGA 添加濃度が 92.7  $\mu$ mol/ml, 111  $\mu$ mol/ml のときにはそれぞれ79.4%, 84.5%の回収率であった。すなわち、ALP III との結合には WGA 添加濃

Table 1. ALP activity of concentrated ROS medium added with Lectin

Lectin conc. ( $\mu$ mol/ml)	ROS*		Withdrawal rate (%)
	Supernate	Precipitate	
139.0	0.1	19.3	99.5
111.0	1.7	16.4	84.5
92.7	3.2	15.4	79.4

Concentrated ROS medium\*: ALP activity is 19.4 KAU (KAU)

Table 2. ALP activity incubated with Lectin

Sample No.		Incubation time		(%)*
		30 min. (A)	Overnight at 4°C after incubation for 30 min. at 37°C (B)	
1	Sup.*	—	—	
	Ppt.*	5.8	7.3	(25.9)
2	Sup.	—	—	
	Ppt.	6.5	7.8	(20.0)
3	Sup.	—	—	
	Ppt.	4.3	5.3	(23.3)
4	Sup.	—	—	
	Ppt.	6.0	8.8	(46.7)
5	Sup.	—	—	
	Ppt.	4.5	5.8	(28.9)
6	Sup.	—	—	
	Ppt.	2.8	4.5	(60.7)
7	Sup.	—	—	
	Ppt.	49.3	50.0	(1.4)
8	Sup.	3.7	3.3	
	Ppt.	1.2	1.6	(33.3)
9	Sup.	12.0	10.8	
	Ppt.	4.5	5.3	(17.8)
10	Sup.	4.8	1.8	
	Ppt.	22.2	24.4	(9.9)
11	Sup.	3.3	2.4	
	Ppt.	8.5	9.9	(16.5)
12	Sup.	4.5	3.9	
	Ppt.	2.1	2.5	(19.0)
13	Sup.	3.5	2.8	
	Ppt.	8.9	9.9	(11.2)
14	Sup.	2.5	2.2	
	Ppt.	10.4	12.6	(21.1)

Sup.\* : supernate (KAU)

Ppt.\* : precipitate

( )\* : indicate % variation (B-A/A)

度 139  $\mu\text{mol/ml}$  が必要濃度であることが確認された。

b) レクチンとの反応時間

ALP III の回収率を確認するため WGA との反応時間につき検討した。Lectin precipitation procedure (Fig. 1) での incubation time を 37°C で30分間 incubation および 37°C で30分間 incubation 後、4°C で over night の2つの反応条件を設定し上清および沈澱物のそれぞれの ALP 活性値の変化を検討した。Table 2 に示すように WGA 添加後 37°C, 30分間 incubation し、さらに over night することにより、WGA 添加後 37°C, 30分間 incubation 後よりも ALP III 活性値は1.4%から60.7%, 平均24.0+15.2%高くなった。

c) Triton X-100 の添加濃度

最初に、Triton X-100 の添加による総 ALP 活性値測定の影響をみるため4種類の Triton X-100 濃度 0%, 2%, 8%, 20%で慢性透析患者のうち骨変化の著明な ALP III 優位の症例 (Sample No. 1-4) および慢性透析患者のうち骨変化はほとんど認められないが肝機能障害の強い ALP II 優位の症例 (Sample No. 5-7) について血清 50  $\mu\text{l}$  にたいし Triton X-100 をそれぞれ 5  $\mu\text{l}$  混和し、ALP 活性値の変化を検討した。Table 3 に示すように Sample No. 1-3 において各濃度の Triton X-100 添加による総 ALP 活性値測定値への影響はみられなかった。次に、Lectin precipitation procedure (Fig. 1) でのレクチン分画および非レクチン分画の ALP 活性値への影響を検討した結果、Table 4 に示すように慢性透析患者のうち骨変化の著明な Sample No. 1-4 では Triton X-100 添加による ALP 活性値の変動は上清分画でも沈澱分画でもほとんど認められなかった。一方、慢性透析患者のうち骨変化はほとんど認められないが肝機能障害の強い Sample No. 5-7 では沈澱分画の ALP 活性値は 8% Triton X-100 添加では Triton X-100 非添加に比し、6.8%~25.0%の活性低下がみられ、20%の Triton X-100 添加では Sample No. 5 においては25%の活性低下がみられた。これに対し、上清分画の ALP 活性値は 8% Triton X-100 添加では Triton X-100 非添加に比し、7.4%~14.5%の活性上昇がみられ、20%の Triton X-100 添加では Sample No. 5 においては35.2%の活性上昇がみられた。すなわち、肝性 ALP 優位の試料では Triton X-100 添加により、上清分画の ALP 活性の減少分とはほぼ同等分、沈澱分画の ALP 活性の上昇が確認された。さらに、胆汁性 ALP の残存をポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動にて確認した。添加 Triton X-100 濃度 2%までは原点位 (ディスク左端) に胆汁性 ALP に相当する泳動帯が認められたが Fig. 3 から明ら

Table 3. ALP activity added Triton X-100

Sample No.	Triton X-100 concentration (%)			
	0	2	8	20
1	9.5	9.6	9.5	9.6
2	27.0	26.8	26.8	27.3
3	16.4	16.6	16.5	16.8

(KAU)

Table 4. ALP activity added with various concentration of Triton X-100

Sample No.		Triton X-100 concentration (%)			
		0	2	8	20
1	Sup.*	1.3	1.4	—	1.3
	Ppt.*	16.6	16.8	—	17.0
2	Sup.	2.6	2.9	3.1	2.8
	Ppt.	37.6	36.5	37.0	37.5
3	Sup.	3.2	3.2	—	2.9
	Ppt.	20.2	20.2	—	20.2
4	Sup.	4.8	6.5	—	6.1
	Ppt.	102.4	106.6	—	106.8
5	Sup.	5.4	6.2	5.9	7.3
	Ppt.	4.4	3.8	4.1	3.3
6	Sup.	56.7	61.3	64.9	—
	Ppt.	29.0	25.4	22.6	—
7	Sup.	39.3	40.1	43.9	—
	Ppt.	8.6	8.6	6.6	—

Sup.\*: supernate  
Ppt.\*: precipitate (KAU)

かなように20%の Triton X-100 の添加にて原点位に位置する胆汁性の ALP 泳動帯が認められなくなった。すなわち、ALP-Lectin 結合に関して ALP III 優位の症例では Triton X-100 による前処理の必要性はないが、ALP VII 優位の症例では Triton X-100 による前処理をしないと ALP VII が沈澱画分に少なからず混入してしまうため Triton X-100 による前処理は必要であり、その Triton X-100 添加濃度は Rosalki らが示した 2% では充分ではなく20%が必要濃度と考えられた。

d) SDS による沈澱物の溶解操作

Table 5. Effect of SDS on the activity of total ALP

Sample No.	SDS* concentration (mmol/L in saline)				
	0	8.8	17.5	35	70
1	12.7	12.7	12.7	12.6	12.7
2	35.5	35.8	35.6	N. D*	35.6
3	7.6	7.7	7.7	7.6	7.6
4	10.6	10.7	10.7	10.7	N. D
5	11.4	11.5	11.1	11.3	11.5

(KAU)

SDS\*: sodium dodecyl sulfate  
N.D. : not done

WGA との複合体を形成した沈澱分画を可溶化するために用いる SDS について検討を加えた。SDS が ALP 活性値測定への反応系に及ぼす影響を確認するため試料に SDS の 8.8, 17.5, 35.0 および 70.0 mmol/L in 154 mmol/L NaCl の 4 種類の濃度を試料にそれぞれ等量添加し 2 倍希釈したのち ALP 活性値の変化を検討した。Table 5 に示すように Sample No. 1-5 において SDS 添加により ALP 活性値にほとんど変化は認められず SDS 添加は ALP 測定への反応系に影響を及ぼさないことが確認された。

2. 電気泳動法

a) ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動およびレクチン親和性ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動

i) ROS 培養濃液

ROS 培養濃縮液 (6 倍濃縮液) の従来のポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動 (Fig. 4-(1)) およびレクチン親和性電気泳動 (Fig. 4-(2)) に示すように ROS 培養濃縮液 (6 倍濃縮液) に WGA を添加することにより ALP III の泳動帯の易動度はポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動によるものに比べやや遅れた。また、新たな泳動帯の出現は認められなかった。

ii) 骨 ALP 優位の検体

慢性透析患者のうち骨変化の著明な症例において、その血清を従来のポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動を行ったところ、ALP III と ALP II は相接して  $\alpha$ ~ $\beta$  globulin 位に泳動された (Fig. 5-(1))。次に、同症例のレクチン親和性ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動では、ALP III の移動度が減じ ALP II の泳動帯と明瞭に分離された (Fig. 5-(2))。さらに、Lectin precipi-

itation procedure (Fig. 1) の方法により得られた同症例の上清にたいしポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動を行ったところ ALP III の泳動帯はほとんど認められず、ALP II の部位にのみ泳動帯が認められた (Fig. 5-(3))。すなわち、ALP III は従来の電気泳動に比べ、lectin を添加することにより、ALP II と明確に分離した泳動帯として示された。

iii) 肝性 ALP 優位の検体

慢性透析患者のうち骨変化はほとんど認められないが肝機能障害の強い症例について従来のポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動 (Fig. 6-(1))、およびレクチン親和性ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動を行った (Fig. 6-(2))。Fig. 6-(2) に示すように、ALP III の泳動帯はほとんど認められず、さらに、Lectin precipitation procedure (Fig. 1) の方法により得られた同症例の上清にたいしポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動を行ったところ ALP II の部位に集中した泳動帯が認められるのみであった (Fig. 6-(3))。すなわち、慢性透析患者のうち骨変化の著明な症例、および慢性透析患者のうち骨変化はほとんど認められないが肝機能障害の強い症例のそれぞれの血清 ALP に対し、レクチン親和性ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動を行うことにより、ALP II と ALP III とを明確に分離し得ることが示された。

b) 等電点電気泳動法

慢性透析患者のうち骨変化の著明な症例、および慢性透析患者のうち骨変化はほとんど認められないが肝機能障害の強い症例について、それぞれの血清をアガロースゲル等電点電気泳動を行った。骨変化の著明な症例におけるアガロースゲル等電点電気泳動においては、酒井らの報告と同様に pI 3.8-4.2 の位置に肝性 ALP の出現が認められ、等電点 pI=4.3 に 2~3 本の ALP III の活性帯が確認された (Fig. 7-(1))。さらに、Lectin precipitation procedure (Fig. 1) 後の上清分画では、ALP III の泳動帯はほとんど認められなかった (Fig. 7-(2))。

同様に慢性透析患者のうち肝機能障害の強い症例についてアガロースゲル等電点電気泳動を行った。等電点 pI=3.8~4.2 に肝性 ALP の泳動帯が確認され (Fig. 7-(3))、さらに、Lectin precipitation procedure (Fig. 1) の方法により得られた同症例の上清にたいしアガロースゲル等電点電気泳動では、(Fig. 7-(4)) に示すように ALP III の泳動帯はほとんど認められなかった。すなわち、慢性透析患者のうち骨変化の著明な症例、および慢性透析患者のうち骨変化はほとんど認められないが肝機能障害の強い症例のそれぞれの血清に対し、アガロースゲル

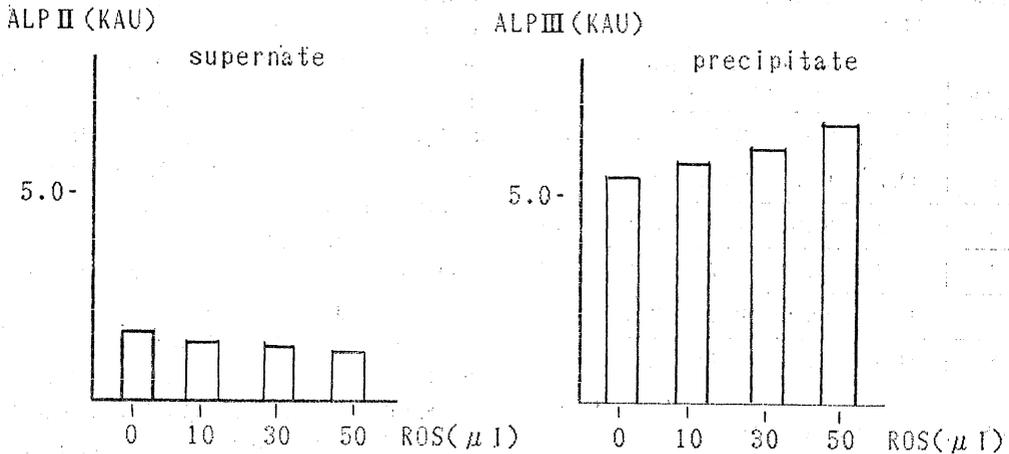


Fig. 8. Adding test with ROS medium.

等電点電気泳動においても WGA と ALP III はほぼ特異的に結合することが確認された。

3. ROS 添加実験

ALP III のマーカー試料として用いた ROS 培養濾液添加による ALP III 活性値の増加を確認するため、ALP 活性値を 5.4 KAU に調整した慢性透析患者の血清 100 μl, 90 μl, 70 μl および 50 μl に ALP 活性値が 5.4 KAU の ROS 培養濾液を 0 μl, 10 μl, 30 μl および 50 μl をそれぞれ添加し 100 μl とした後、Lectin precipitation procedure (Fig. 1) の方法により得られた上清および沈澱物の ALP 活性を測定した。Fig. 8 に示すように、ROS 培養濾液を 0 μl, 10 μl, 30 μl および 50 μl 添加したときの沈澱分画の ALP 活性値は 1.4 KAU, 1.35 KAU, 1.34 KAU および 1.26 KAU と ROS 培養濾液の添加量が増加するにしたがって希釈による低下がみられ、一方、上清分画の ALP 活性値はそれぞれ 5.4 KAU, 5.68 KAU, 6.18 KAU および 6.75 KAU と ROS 培養濾液の添加量にほぼ比例した活性上昇を認めた。すなわち、骨性 ALP である ROS 培養濾液は WGA と特異的に結合し、レクチン分画に回収されることが示された。

4. 臨床検体での測定結果 (Table 6)

a) 維持透析患者血清 (Sample No.1-23)

Table 6 に示すように、総 ALP 活性値は 5.4 KAU から 76.9 KAU で平均  $21.1 \pm 19.0$  KAU, ALP III 活性値は 2.6 KAU から 69.6 KAU で平均  $17.9 \pm 17.9$  KAU であった。健康成人である対照症例に比べ総 ALP 活性値は約 5 倍、ALP III 活性値は約 6 倍の高値を示した。総 ALP 活性値が正常範囲 (3~10 KAU) を

上回ったのは 23 例中 15 例、65.2% であった。15 例の内訳は、腎性骨症が 4 例、肝障害が 4 例 (肝硬変の 1 例および肝炎の 3 例) および ROD が 3 例であったが、臨床的に骨病変あるいは肝障害の認められない症例が 4 例あった。ROD の 3 例中 2 例 (Sample No. 1, 2), 腎性骨症の 4 例中 2 例 (Sample No. 7, 8) および臨床的に骨病変あるいは肝障害の認められない 4 症例中 3 例 (Sample No. 12, 20, 21) は骨性 ALP 活性が肝性 ALP 活性の 4 倍以上を示した。肝硬変を合併する Sample No. 14 では明らかに肝性 ALP の上昇が認められた。また、総 ALP 活性が正常範囲内の症例は 8 例、34.8% であり、ROD を合併する 3 例および腎性骨症、非外傷性骨折、アルミニウム骨症、肝障害、臨床的に骨病変あるいは肝障害の認められない症例の各 1 例であった。

b) 正常ヒト血清 (Sample No. 24~30)

健康成人である対照症例 7 例では、総 ALP 活性はいずれも正常範囲内であり、総 ALP 活性値は 3.0 KAU から 7.2 KAU で平均  $4.4 \pm 1.5$  KAU, ALP III 活性値は 1.8 KAU から 5.2 KAU で平均  $2.9 \pm 1.2$  KAU であった。また、肝性 ALP 活性と骨性 ALP 活性の比率は 1:3 と骨性 ALP の割合が高くなった。

また、正常ヒト血清 7 例および血液透析患者 23 例、計 30 例において Lectin 分画を洗浄後、さらに SDS で溶解するという煩雑な操作を避けるために、総 ALP 活性 - Supernatant 活性 = ALP III 活性が成立するかどうかを試みたが、総 ALP 活性 - Supernatant 活性は ALP III 活性と有意に正の相関が認められた。(相関係数  $r = 0.998$ ,  $P < 0.01$ ) (Fig. 9)

Table 6. ALP activity

Sample No.	Total	Sup.*	Ppt.*	Total-Sup.
1	41.7	2.7	37.0	39.0
2	34.0	5.0	28.2	29.0
3	21.3	4.2	16.4	17.1
4	8.7	4.2	3.0	4.5
5	6.7	3.8	3.2	2.9
6	5.4	1.3	3.6	4.1
7	76.9	5.7	69.6	71.2
8	47.8	4.6	42.4	43.2
9	16.2	7.6	8.6	8.6
10	13.0	1.1	9.0	11.0
11	5.4	1.3	3.6	4.1
12	8.0	2.5	6.0	5.5
13	5.8	2.7	2.6	3.1
14	60.8	45.4	17.8	15.4
15	20.0	2.0	16.8	17.9
16	16.4	6.1	9.0	10.3
17	13.4	1.7	10.0	11.7
18	7.0	1.9	4.2	5.1
19	25.0	1.9	21.8	23.1
20	18.3	1.5	15.0	16.8
21	13.8	2.3	9.8	11.5
22	11.6	7.6	8.6	8.6
23	7.7	2.1	4.8	5.6
24	3.6	0.7	2.4	2.6
25	3.5	0.7	2.4	2.8
26	3.7	1.3	2.2	2.4
27	7.2	1.3	5.2	5.9
28	3.0	0.9	1.8	2.1
29	5.4	1.3	3.6	4.1
30	4.3	0.9	3.0	3.6

(KAU)

Sample No. 1-23: patients on maintenance hemodialysis

Sample No. 24-30: normal adults

Sup.\*: supernate

Ppt.\*: precipitate

考 案

血清 ALP アイソザイムは臓器非特異性のもつ臨床上の重要性から、肝、腎、骨、小腸、胎盤の各 ALP について分離精製、鑑別方法が多数報告されてきた<sup>22)~29)</sup>。このうち肝、腎、骨の ALP は臓器非特異性 ALP と称されるごとく、通常の電気泳動では満足できる分離が得られなかった。ALP は多くの他の生体蛋白と同じく糖鎖を有した糖蛋白であるが、肝、腎、骨、特に血中で問題となる肝性 ALP と骨性 ALP の分離が従来困難であった原因は、それぞれの蛋白部分の分子構造上に差がなく、糖鎖部分の分子構造にのみ差異が存在するためであると考えられていた<sup>30)</sup>。1986年 Weiss et al.<sup>31)</sup> は肝および骨 ALP のアミノ酸配列を固定し、両者の蛋白部分が同一構造であることを立証した。電気泳動では蛋白の荷電状態により泳動位置が決まるため、肝性および骨性アイソザイムは  $\alpha$ - $\beta$  グロブリン位にほぼ同じく移動し、明確な分離は得られない。糖蛋白中の糖鎖は一般に生体内における蛋白分解酵素からの防御や、細胞膜などの結合部位として意義があると考えられている<sup>32)</sup>。肝性 ALP および骨性 ALP の耐熱性の差異<sup>33)</sup> もこの糖鎖構造の差に基づいた現象と解釈される。1983年 Bucher et al.<sup>24)</sup> は糖鎖をノイラミダーゼ処理することにより、従来分離困難であった ALP II と ALP III をセルロースアセテート膜による電気泳動にて分離できることを報告した。ALP III が ALP II に比しシアル酸含有量が多いため、ノイラミダーゼ処理をすることにより ALP III の負の荷電 (シアル酸) が ALP II より多く減じる結果として ALP II がより速く陽性へ移動し、両者の分離が明瞭になることを示したが、泳動条件による影響も大きいというにノイラミダーゼの力価も安定性に乏しく、最終判定が視覚判定に依存しており、定量化の方法としては一般化していない。

一方、1960年以來 PHA に代表される種々のレクチン<sup>34)</sup> が報告され、糖鎖と極めて親和性が高く、また糖鎖とレクチンとの反応形式に一定の特異性があることが確認され<sup>35)</sup>、様々な生体物質の分野にレクチンの応用が広まった<sup>36)37)</sup>。今日医学分野で用いられているレクチンは Con A, PWM, PHA などがあり、これらのレクチンは糖鎖と結合することにより細胞凝集、リンパ球の幼若化、細胞機能亢進、細胞障害などを引き起こすことが確認されている。

肝性 ALP は Con A と結合性が強いことが知られていた<sup>27)</sup> が、1984年 Rosalki et al.<sup>16)</sup> は ALP III が WGA とほぼ特異的に反応することを利用し、ALP II と ALP

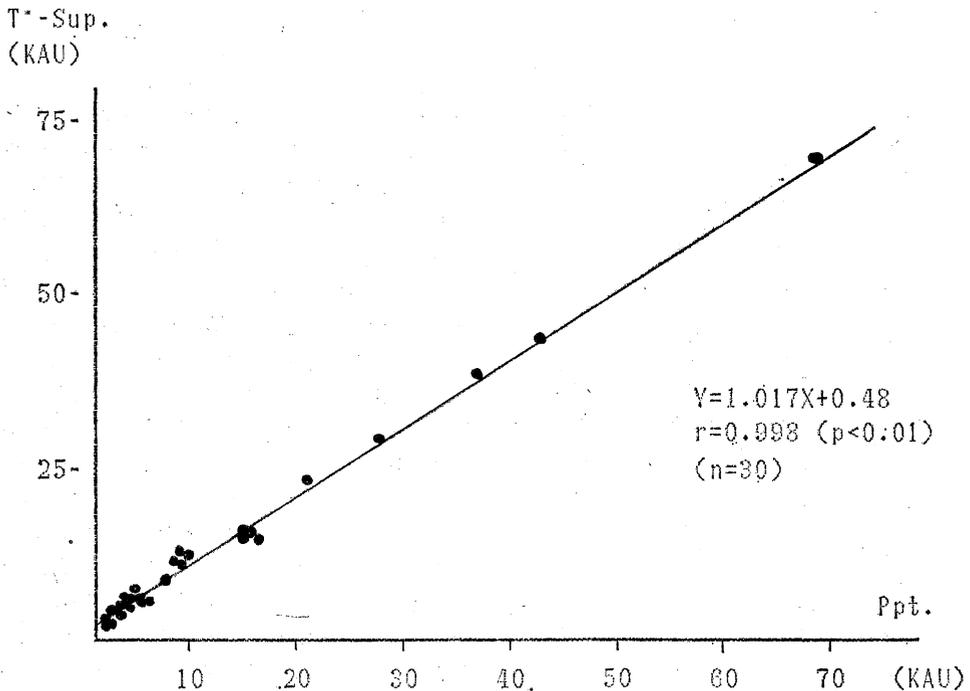


Fig. 9. Correlations between the ALP activity in Ppt and that by subtracting the activity in Sup. from total ALP activity.

T\* : Total ALP activity  
 Ppt\* : Precipitate  
 Sup.\* : Supernate

IIIを分離定量可能なことを報告した。その後、Onica<sup>38)</sup>、菰田<sup>39)</sup>、桑名<sup>40)</sup>などにより追試確認された。ALP蛋白質部分の解析は1977年 Hirano et al.<sup>41)</sup>により立証され、既にそのモノクローナル抗体<sup>42)</sup>、C-DNA<sup>31)43)</sup>等の開発がなされているが、糖鎖部分に関する報告は少ない<sup>30)32)</sup>。しかしながら Rosalki et al.<sup>16)</sup>の報告は先に述べた Lectin と糖鎖の反応様式から骨 ALP は混成型糖鎖構造を有し、反面 ALP II は複合型に近い糖鎖構造を有すると考えられる。Rosalki et al.<sup>16)</sup>ら報告の中で Lectin 分画に胆汁性 ALP が混入することを示唆し、Triton X-100 を試料血清に添加することにより胆汁性 ALP が Lectin と結合するのを防ぎ、さらに胆汁性 ALP の混入は、2% Triton X-100 による処理にて防げると報告しているが、本研究ではその濃度に若干の問題があることを確認した。胆汁性 ALP は従来の電気泳動においては、肝癌などにみられる Ultra-fast 型 ALP と同じく  $\alpha$ -globulin 位に泳動し、Lectin 親和性電気泳動においては原点にとどまることが報告されている<sup>44)</sup>ので、今回著者はこの原点にとどまる ALP を解消するのに要する Triton X-100 の濃度を検討した。その結果、Table 4

に示されたごとく 2% Triton X-100 添加では ALP VII 位優の試料では12.4~30.3%程レクチン分画に混入し、完全に混入を防ぐには 20% Triton X-100 処理を必要とし、さらに、Fig. 3 に示すようにポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動にも確認した。また Triton X-100 添加による ALP 測定値への影響では0~1.9%程度上昇が 2% Triton X-100 でも 20% Triton X-100 でもみられたにすぎずその影響は臨床は無視しうる程度のものと言える。

一般に Lectin と糖鎖の結合は N もしくは O-グリコシド結合であるが、非酵素的反応であるためレクチン濃度およびレクチンとの反応時間とに左右されると考えられる。レクチン濃度に関しては Rosalki et al.<sup>16)</sup>の報告と同じく 139  $\mu\text{mol/ml}$  が至適濃度であることが確認された。一方、レクチンと試料との反応時間に関しては Rosalki et al.<sup>16)</sup>の原法より24時間放置することにより更に ALP III との結合が平均 24.0 $\pm$ 15.2% 増すことが確認された。

本法での特異性の確認に本研究で用いた ROS 17/2 は Rodan et al.<sup>19)</sup>の報告以来 1) PTH 2) Vit. D

3) コラーゲン産生 4)  $\gamma$ -gla 蛋白などの骨芽細胞としての化学的特性を示すことから、今日広く骨芽細胞の増産細胞モデルとして MC3T3-E1 細胞<sup>45)</sup>とともに認められているものである。本研究で示された Table 1 の結果ならびに Fig. 4, Fig. 8 の結果は Lectin 分画には特異的に ROS 細胞濾液中の ALP は収納することを示し、間接的に本法での ALP III 分離定量の特異性が立証されたものと言える。さらに等電点電気泳動による結果も同じく本法の特異性を支持している。ALP の等電点電気泳動に関しては酒井ら<sup>24)</sup>は等電点  $pI=3.8\sim 4.2$  に ALP II, 等電点  $pI=4.3$  に ALP III の泳動帯が認められると報告しており Fig. 6 の結果もほぼ一致した結果であった。

最後に肝性 ALP と骨性 ALP の比率に関しては、これまで耐熱性での報告<sup>46)47)</sup>では肝:骨=1:1, また桑名ら<sup>40)</sup>ははじめレクチン親和電気泳動法による測定では 3:7~4:6 と報告がなされているが、著者の測定結果でも Table 6 のごとく 1:3 と骨優位の結果であった。

以上のごとく、本研究で著者は Rosalki et al.<sup>16)</sup>の方法に比較的簡単な修正を加えることにより、臨床的に満足しうる特異性をもって ALP III の分離定量が行えることを確認した。Lectin によるアイツザイム分離は最近 Novel  $\gamma$ -GTP<sup>48)</sup>でも確認されているが本法は操作が比較的簡便であり、また特殊な器具も必要とせず、さらに自動定量が可能であり広く臨床応用しうるものと考えられる。

代謝性骨疾患、ことに慢性腎不全に合併する骨病変は、複雑多様な背景のもとに混在して発症するのみならず、経過とともに病態も変化するため、ことに生化学的パラメーターでの病像の把握は重要である。一方、丸山<sup>49)</sup>をはじめ諸家により ROD の早期診断における ALP III の有用性が報告されている<sup>50)</sup>が、最近金子<sup>18)</sup>も本法を用いて ALP III の定量化を行い、骨特異蛋白として注目されている bone gla 蛋白および骨線変化と ALP III 活性とがよく相関することを臨床的に確認している。透析患者での長期生存による合併症の多様性のため、従来透析患者の ALP の変動はほとんど骨性と考えられていたのに対し、近年では肝性 ALP や小腸性 ALP 上昇例の頻度も無視できなくなっており<sup>51)</sup>本法による ALP III の定量は慢性腎不全に合併する骨病変の病態追跡に価値ある情報を提供するものといえる。

## 結 論

骨性 ALP を分離定量化するために Rosalki et al. の方法に準じ、さらに簡単な修正を加えることにより骨性

ALP を最大限にレクチン分画へ収納する条件およびレクチン分画から非骨性 ALP を可能な限り除去する条件の二点を明らかにするため、正常ヒト血清 7例, ROS 培養濾液および維持透析患者 23例を対象として、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、レクチン親和性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法および等電点電気泳動法を用い、その有用性につき検討した。ALP III は Rosalki et al. の原法に若干の修正を加え定量化した。

1) 骨性 ALP の分離定量のためレクチンとして Rosalki et al. の原法に準じ WGA を用いた。

2) WGA の至適濃度は Rosalki et al. の原法と同じく  $139\ \mu\text{mol/ml}$  であることを確認した。

3) 胆汁性 ALP のレクチン分画への混入を防ぐには 20% の Triton X-100 の濃度が必要であることを確認した。

4) 試料とレクチンとの反応時間は Rosalki et al. の原法より 24時間放置することにより更にレクチンと ALP III との結合が平均  $24.0\pm 15.2\%$  増すことが確認された。

5) ポリアクリルアミドゲル電気泳動法およびレクチン親和性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により ALP III の分離定量を確認するとともに等電点電気泳動法的にも本法の特異性を確認した。

6) 正常ヒト血清における肝性 ALP と骨性 ALP の比率に関しては、1:3 と骨優位の結果であった。

7) 沈澱分画の骨性 ALP 活性値は総 ALP 活性値と上清分画の肝性 ALP 活性値との差と極めて高い相関 ( $R=0.998$ ) を示し、骨性 ALP 活性測定には臨床的により簡便な間接的測定がより有用であるとおもわれた。

以上、本研究で著者は Rosalki et al. の方法に比較的簡単な修正を加えることにより、臨床的に満足しうる特異性をもって ALP III の分離定量が行えることを確認した。

稿を終るにあたり、終始御懇篤な御指導、御校閲を賜った恩師岡島英五郎教授に深謝するとともに、御校閲ならびに御助言を賜った生化学教室神谷知彌教授、第 1 内科学教室石川兵衛教授に感謝の意を呈します。なお本研究の遂行にあたり終始御協力いただいた本宮善恢講師、丸山良夫講師ならびに人工透析室金子佳照講師をはじめ教室の諸兄に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Robison, R.: XXXIII The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem.*

- J. 17: 286-293, 1923.
- 2) **Burstone, M.S.:** Histochemical observations on enzymatic processes in bones and teeth. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 85: 431-444, 1960.
  - 3) **Vase, G. and Jacques, P.:** Studies on bone enzymes. Distribution of acid hydrolases, alkaline phenylphosphata, cytochrome oxidase and catalase in subcellular fraction of bone tissue homogenates. *Biochem. J.* 97: 389-392, 1965.
  - 4) **Luben, R.A., Wong, G.L. and Cohn, D.V.:** Biochemical characterization with parathormone and calcitonin of isolated bone cells. Provisional identification of osteoclasts and osteoblasts. *Endocrinology* 99: 526-534, 1976.
  - 5) **Malluche, H.H., Ritz, E., Kutschera, J., Krause, G., Werner, E., Gati, A., Seiffert, U. and Lange, H.P.:** Calcium metabolism and impaired mineralization in various stages of renal insufficiency. In *vitamine D and problems related to uremic bone disease*. Wolter de Gruyter, Berlin, New York, p. 513-522, 1975.
  - 6) **Rodan, G.A. and Martin, T.J.:** Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption-A hypothesis. *Calcif. Tissue Int.* 33: 349-351, 1981.
  - 7) **McSheehy, P.M.J. and Chambers, T.J.:** Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factor that stimulates osteoblastic bone resorption. *Endocrinology* 119: 1654-1659, 1986.
  - 8) **Kanis, J.A., Russel, R.G.G., Cundy, T., Earnshaw, M., Woods, C.G., Smith, R. and Heynen, G.:** An evaluation of  $1\alpha$ -hydroxy-and  $1,25$ -Dihydroxyvitamin  $D_3$  in the treatment of renal bone disease. *Contr. Nephrol.* 18: 12-28, 1980.
  - 9) **Malluche, H.H., Faugere, M.C., Fanti, P. and Price, P.A.:** Plasma levels of bone Gla-protein reflect bone formation inpatients on chronic maintenance dialysis. *Kidney Int.* 26: 869-874, 1984.
  - 10) 三浦義昭, 石山 剛, 長尾政之助, 殿熙 安, 北岡正雄, 大原一彦, 荒川正昭, 高橋栄明, 笠井隆一: 血液透析患者の血清 bone Gla-protein: 骨代謝の指標としての意義について. *透析会誌.* 21: 861-870, 1988.
  - 11) **Eastwood, J.B., Bordier, P.J. and Wardener, H.E.:** Some biochemical, histological, radiological and clinical features of renal osteodystrophy. *Kidney Int.* 4: 128-140, 1973.
  - 12) 大野丞二, 吉田政彦, 角原 孝, 湊口孝美, 森 富茂: 7. Ca, P 代謝異常. 維持透析. 日本臨牀社, 大阪, p. 125-147, 1981.
  - 13) **Hodson, A.W., Latner, A.L. and Raine, L.:** Isoenzymes of alkaline phosphatase. *Clin. Chim. Acta* 7: 255-261, 1962.
  - 14) **Neale, F.C., Clubb, J.S., Hotchkis, D. and Posen, S.:** Heat stability of human placental alkaline phosphatase. *J. Clin. Path.* 18: 359-363, 1965.
  - 15) 飯野四郎, 鈴木 宏, 織田敏次: 血清アルカリホスファターゼ (ALP) とそのアイソエンザイム. 日本臨牀 (春季増刊号), 38: 870-878, 1980.
  - 16) **Rosalki, S.B. and Foo, A.Y.:** Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. *Clin. Chem.* 30: 1182-1186, 1984.
  - 17) **Nagata, Y. and Burger, M.M.:** Wheat Germ Agglutinin. *J. Biol. Chem.* 249: 3116-3122, 1974.
  - 18) 金子佳昭: 慢性血液透析患者における腎性骨異常栄養症に対するオステオカルシンおよび骨性 AL-P アイソザイムの検討. *奈医誌.* 38: 1085-1098, 1987.
  - 19) **Majeska, R.J., Rodan, S.B. and Rodan, G.A.:** Parathyroid hormone-responsive clonal cell lines from rat osteosarcoma. *Endocrinology* 107: 1494-1505, 1980.
  - 20) 長 裕子: ポリアクリルアミドディスク電気泳動法. 電気泳動法のすべて. 医歯薬出版, 東京, p. 59-64, 1981.
  - 21) 酒井 澄, 森田繁樹, 久保野勝男, 川尻恵子, 今井利夫, 荒川康行, 桜林郁之介: アガロースゲル等電点電気泳動法による血清アルカリフォスファターゼアイソザイムの分析(II)一肝疾患患者血清を中心として. *臨床病理* p. 226, 1987.
  - 22) **Robinson, J.C. and Pierce, J.E.:** Differential action of neuraminidase on human serum alkaline phosphatases. *Nature* 204: 472-473, 1964.
  - 23) **Ghosh, N.K. and Fishman, W.H.:** On the mechanism of inhibition of intestinal alkaline phosphatase by L-phenylalanine. *J. Bio. Chem.* 241: 2516-2522, 1966.
  - 24) **Latner, A.L., Parsons, M.E. and Skillen, A.W.:**

- Isoelectric focusing of human liver alkaline phosphatase. *Biochem. J.* **118**: 299-302, 1970.
- 25) **Greene, P.J.** and **Sussman, H.H.**: Structural-comparison of ectopic and normal placental alkaline phosphatase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **70**: 2936-2940, 1973.
- 26) **Luduena, M.A.** and **Sussman, H.H.**: Characterization of KB cell alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* **251**: 2620-2628, 1976.
- 27) **Trepanier, J.M., Seargeant, L.E.** and **Stinson, R.A.**: Affinity purification and some molecular properties of human liver alkaline phosphatase. *Biochem. J.* **155**: 653-660, 1976.
- 28) **Lehmann, F.G.**: Human alkaline phosphatases. Evidence of three isoenzymes (placental, intestinal and liver-bone-kidney-type) by lectin-binding affinity and immunological specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **616**: 41-59, 1980.
- 29) **Koyama, I.**: Sugar-chain heterogeneity of human alkaline phosphatases. differences between normal and tumour-associated isozymes. *J. Chromatogr.* **413**: 65-78, 1987.
- 30) **小山岩雄, 菰田二一**: レクチンアフィニティクロマトグラフィーの有用性. *医学のあゆみ* **142**: 453-456, 1987.
- 31) **Weiss, M.J., Henthorn, P.S., Lafferty, M.A., Slaughter, C., Raducha, M.** and **Harris, H.**: Isolation and characterization of a cDNA Encoding: A human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Natl. Acad. Sci.* **83**: 7182-7186, 1986.
- 32) **Kobota, A.**: *Biology of carbohydrate* (Ginsburg, V. and Robins, P., eds.), vol. 2, John Wiley & Sons, N.Y. p. 87-161, 1984.
- 33) **PetitClerc, C.**: Quantitation fractionation of alkaline isoenzymes according to their thermostability. *Clin. Chem.* **22**: 42-48, 1976.
- 34) **Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T.** and **Sharon, N.**: What should be called a lectin? *Nature* **285**: 66, 1980.
- 35) **Cummings, R.D.** and **Kornfeld, S.**: Fractionation of asparagine-linked oligosaccharides by serial lectin-agarose affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* **257**: 11235-11240, 1982.
- 36) **竹田和久**: レクチン親和電気泳動の糖鎖病変研究への応用. *臨床病理 (臨時増刊)*: 140-148, 1988.
- 37) **米沢 傑, 佐藤栄一**: レクチン組織化学およびその応用. *病理と臨床* **6**: 34-41, 1988.
- 38) **Onica, D., Sundblad, L.** and **Waldenlind, L.**: Affinity electrophoresis of human serum alkaline phosphatase isoenzymes in agarose gel containing lectin. *Clinica. Chimica. Acta* **155**: 285-294, 1986.
- 39) **菰田二一, 小山岩雄, 荒井京子, 根岸良克, 三浦雅一, 松崎広子, 実方和宏, 松田武栄**: Lectin affinity electrophoresis によるヒト AL-P アイソザイムの多型性. *医学のあゆみ* **136**: 765-766, 1986.
- 40) **桑名友実, 杉田 収, 尾形 稔**: レクチン親和電気泳動法による血清アルカリホスファターゼ (ALP) アイソザイムの分画と意義. *臨床病理* **35**: 1264-1268, 1987.
- 41) **Hirano, K., Sugiura, M., Miki, K., Iino, S., Suzuki, H.** and **Oda, T.**: Characterization of Tissue-specific isozyme of alkaline phosphatase from human placenta and intestine. *Chem. Pharm. Bull.* **25**: 2524-2529, 1977.
- 42) **Hirano, K., Domar, U.M., Yamamoto, H., Brehmer-Andersson, E.E., Wahren, B.E.** and **Stigbrand, T.I.**: Levels of alkaline phosphatase isozymes in human seminoma tissue. *Cancer Res.* **47**: 2543-2546, 1987.
- 43) **Kam, W., Clauser, E., Kim, Y.S., Kan, Y.W.** and **Rutter, W.J.**: Cloning, sequencing, and chromosomal localization of human term placental alkaline phosphatase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 8715-8719, 1985.
- 44) **菰田二一, 小山岩雄, 荒井京子, 根岸良克, 三浦雅一, 松田武栄**: Lectin affinity 電気泳動法による腫瘍産生ヒト ALP の性質. *医学のあゆみ* **138**: 785-786, 1986.
- 45) **Sudo, H., Kodama, H., Amagai, Y., Yamamoto, S.** and **Kasai, S.**: In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.* **96**: 191-198, 1983.
- 46) **Whitaker, K.B., Whitby, L.G.** and **Moss, D.W.**: Activities of bone and liver alkaline phosphatases in serum health and disease. *Clin. Chim. Acta* **80**: 209-220, 1977.
- 47) **Hitz, J., Digle, G.** and **Petitclerc, C.**: Automated quantification of bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes of human serum. *Clin. Chim. Acta*

- 107: 203-210, 1980.
- 48) **Köttgen, E., Reutter, W. and Gerok, W.:** Two different gamma-glutamyltransferases during development of liver and small intestine. a fetal (sialo-) and an adult (asialo-) glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72**: 61-66, 1976.
- 49) 丸山良夫: 長期血液透析患者における骨疾患に関する生化学的研究. *奈医誌*. **34**: 435-450, 1983.
- 50) **Siede, W.H., Seiffert, U.B., Bundschuh, F.B., Malluche, H.H. and Schoeppe, W.:** Alkaline phosphatase bone isoenzyme activity in serum in various degrees of micromorphometrically assessed renal osteopathy. *Clin. Nephrol.* **13**: 277-281, 1980.
- 51) **Štěpán, J. and Pilařová, T.:** Serum-alkaline-phosphatase during maintenance haemodialysis. *Lancet* **1**: 1188-1189, 1975.

#### Explanation of figures

Fig. 3. Polyacrylamide disc electrophoresis of ALP isoenzymes in maintenance hemodialysis patient with liver disease. ▼ shows the point of origin.

biliary ALP is disappeared at starting point by adding with 20% Triton X-100

Fig. 4. Polyacrylamide disc electrophoresis and lectin affinity disc electrophoresis of ROS medium. ▼ shows the point of origin.

(1) Polyacrylamide disc electrophoresis of ROS medium.

(2) Lectin affinity disc electrophoresis of ROS medium.

Fig. 5. Polyacrylamide disc electrophoresis and lectin affinity disc electrophoresis of ALP isoenzymes in maintenance hemodialysis patient with bone disease. ▼ shows the point of origin.

(1) Polyacrylamide disc electrophoresis: ALP II and ALP III are not separated.

(2) Lectin affinity disc electrophoresis: ALP III is clearly showed.

(3) Polyacrylamide disc electrophoresis of supernate obtained from lectin precipitation procedure: ALP II is clearly showed and ALP III is not clear.

Fig. 6. Polyacrylamide disc electrophoresis and lectin affinity disc electrophoresis of ALP isoenzymes in maintenance hemodialysis patient with liver disease. ▼ shows the point of origin.

(1) Polyacrylamide disc electrophoresis lectin: ALP II and ALP III are not separated.

(2) Lectin affinity disc electrophoresis: ALP II is clearly showed because of liver disease, but ALP III is not clear.

(3) Polyacrylamide disc electrophoresis of supernate obtained from lectin precipitation procedure: ALP II is clearly showed.

Fig. 7. Isoelectric focusing of ALP isoenzymes in maintenance hemodialysis patient.

(1) Isoelectric focusing of ALP isoenzymes in patient with bone disease.

(2) Isoelectric focusing of supernate obtained from patient with bone disease.

(3) Isoelectric focusing of ALP isoenzymes in patient with liver disease.

(4) Isoelectric focusing of supernate obtained from patient with liver disease.

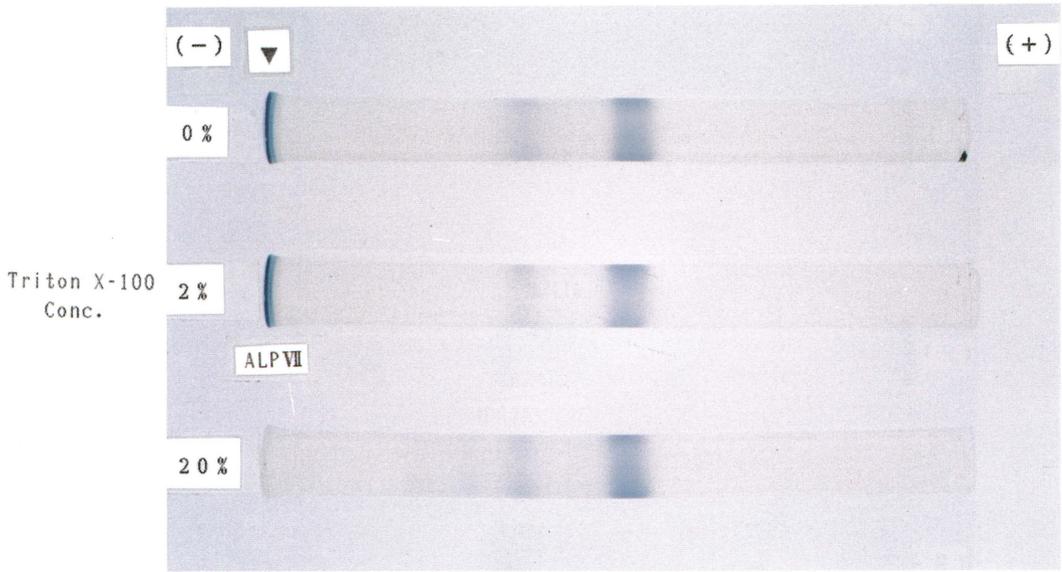


Fig. 3.

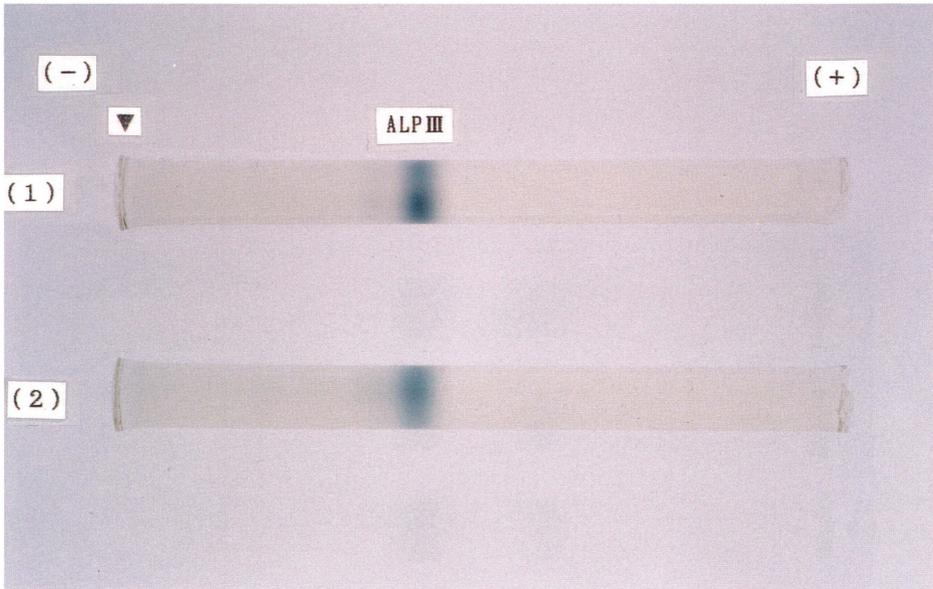


Fig. 4.

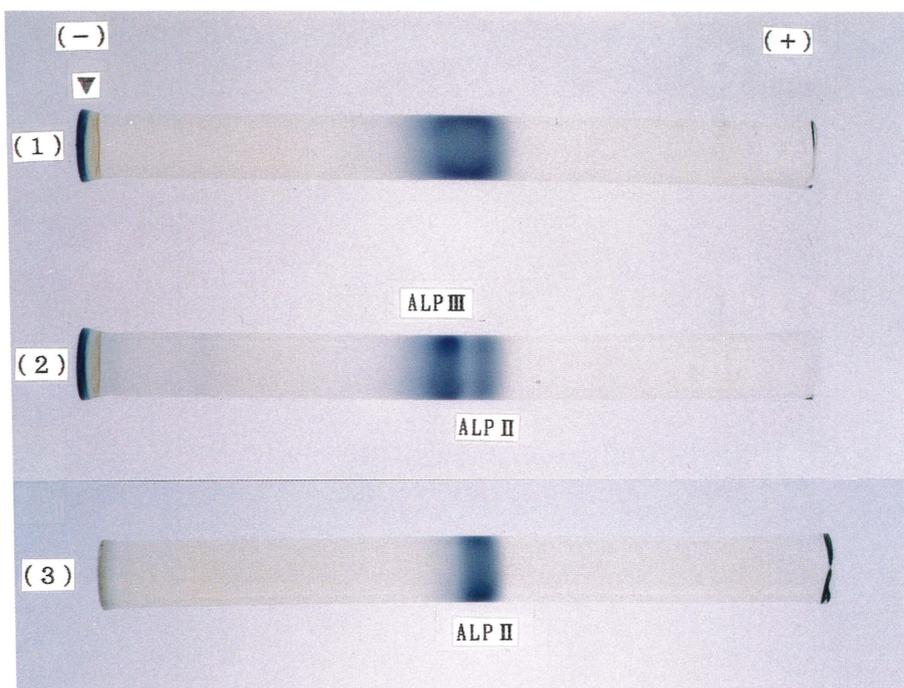


Fig. 5.

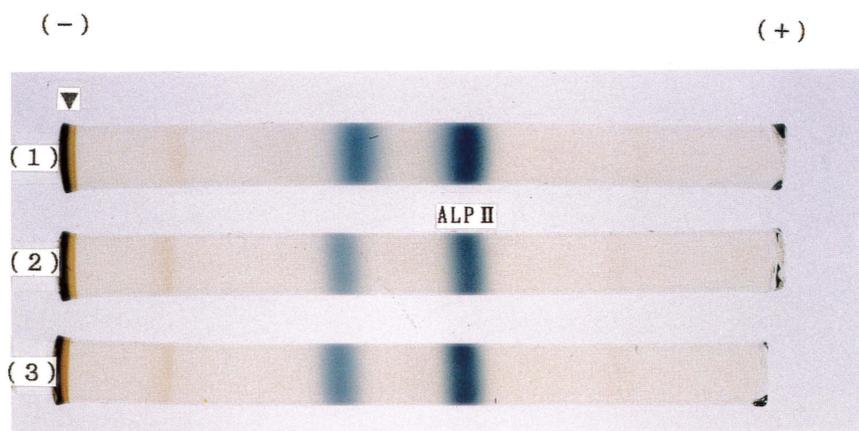


Fig. 6.

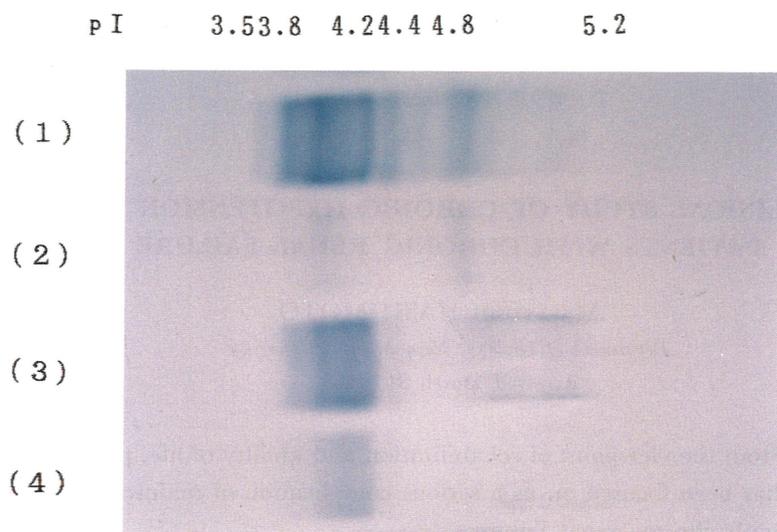


Fig. 7.