

原 著

## ヘパリンカラムによる血清由来の 酒石酸抵抗性酸ホスファターゼの分析

—骨吸収マーカー破骨細胞由来酒石酸抵抗性酸ホスファターゼをモニターする新しい方法—

獨協医科大学 生化学

清水 左門 五十嵐吉彦

**要 旨** この実験の目的は破骨細胞から分泌される酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase, TRACP) 5b を特異的に定量する方法を進展させることである。ヘパリンカラムに吸着させた 1ml の人血清は NaCl の塩濃度勾配をかけることにより 3 つの TRACP 活性に分かれた。最後のピークは ATPase 活性を持ち、TRACP 5b と電気泳動位置が一致した。その TRACP 5b はおもに破骨細胞から分泌されたものと考えられている。このピークの高さは、骨形成期に最高値を示した後は、年齢の増加とともに減少した。なお、腎透析患者では血清 TRACP 5b は明らかに上昇した。二番目のピークは TRACP 5a であった。

**Key Words** : 骨代謝, 破骨細胞, ヘパリンカラム, TRACP, TrATPase

### 緒 言

人血清には赤血球、リソゾーム、前立腺、マクロファージ由来の 4 種類の酸ホスファターゼのアイソザイムが存在する<sup>1)</sup>。赤血球、血小板<sup>2)</sup>やマクロファージ由来の酸ホスファターゼは右旋性酒石酸の阻害に対して抵抗性である。マクロファージ由来の酸ホスファターゼである酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase, TRACP) は破骨細胞のマーカーであり、骨吸収と密接な関連があると考えられている<sup>3)</sup>。マクロファージ由来の TRACP はフッ素イオンによって阻害される<sup>4, 5)</sup>が、赤血球や血小板由来の酸ホスファターゼは阻害されない。

破骨細胞中の TRACP の生理学的な機能は完全には明らかにされていない<sup>6~8)</sup>。TRACP 遺伝子ノックアウトマウスにおいては軽度の大理石病を示したに過ぎなかった<sup>9)</sup>。高濃度の血中 TRACP は高い骨形成の活性と関係がある<sup>10, 11)</sup>。例えば、Paget 病<sup>12)</sup>、透析患者<sup>13)</sup>、原発性

上皮小体機能亢進症<sup>14)</sup>、骨吸収が起こっている癌転移患者<sup>15)</sup>や多発性骨髄腫<sup>16)</sup>において血清中の TRACP 濃度が上昇すると報告されている。ごく稀に、TRACP 濃度が高いトランスジェニックマウスにおいて骨の再吸収が増加して骨粗鬆症になるという報告もあった<sup>17)</sup>。

TRACP のアイソエンザイムは長い間電気泳動法、CM-セファロース・カラムクロマトグラフィーや、等電点電気泳動法によって分析されてきた<sup>18)</sup>。TRACP は酸性のアクリルアミドゲルによる電気泳動上の挙動によって名前が付けられた<sup>19)</sup>。バンド 5 は電気泳動によりさらにバンド 5a, 5b に分けられた<sup>20)</sup>。TRACP 5b は破骨細胞から分泌され、TRACP 5a はこれとは別の細胞から分泌されていると考えられている<sup>21)</sup>。これらの分析法では TRACP 活性を分析するのに 250 から 300 ml と非常に多量の血清を要するので、前述の病気やほかの骨代謝疾患の診断には応用できないと思われる。

人血清中 TRACP 5b の分析は最近では二つの方法が知られている。Nakanishi ら<sup>22)</sup>は TRACP 5a の阻害剤を用いて TRACP 5b の活性を分析する方法を考案した。Halleen ら<sup>23)</sup>は特異的なモノクローナル抗体を使用して、5b を分析する新しい方法を報告した。しかし、彼らの抗体では 5a と 5b を完全に分離することはできなかった。一方、血清のタンパク質は糖タンパク質が多く、こ

平成 15 年 7 月 18 日受付, 平成 15 年 10 月 27 日受理

別刷請求先: 清水左門

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880

獨協医科大学 生化学

れまではコンカナバリンAカラムが精製に用いられていた。そこで本研究では試料を出来る限り少なくする試みを行った。この2点から赤血球由来のTRACPやTRACP5aからTRACP5bを分離して分析するためにはヘパリンカラムも有効である可能性があると考えられたので、これを使用したところ良い結果が得られたので報告する。

## 材料と方法

### 1. サンプル

全ての血液サンプルはヘパリンを加えずに採取した。臍帯血から取られた血清は $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。全ての血液サンプルは対象者にインフォームドコンセントを行ってから採取した。5から11才の小児(平均年齢7.4才)の血清は少量だったので $-80^{\circ}\text{C}$ で保存し、カラムに入れる直前にこれらの血清をプールしてカラム平衡緩衝液で透析した後、分析した。健康な成人のボランティアから得られた血清は個別に採取後、直ちに透析して分析した。

### 2. カラム

ヘパリンカラム Amersham Pharmacia Biotech 社の HiTRAP Heparin (5 ml あるいは 1 ml) を Biologic HR システム (Bio-Rad) に装着して  $4^{\circ}\text{C}$  で分析に用いた。検体は 5 ml でも 1 ml でも同じ結果が得られたので、多くの場合 1 ml 血清を用いた。血清は 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.1 M NaCl で透析し、ろ過した後 5 ml ヘパリンカラムに流速 0.5 ml/min で加えた。1 ml ヘパリンカラムでは流速 0.1 ml/min によりサンプルの展開を行った。カラムは 72 倍量の緩衝液で洗い、0.1 - 1.05 M NaCl の塩濃度勾配で溶出した。

### 3. 酵素活性測定

TRACP の活性測定には比色法を用いた<sup>10)</sup>。最終的な酵素反応は基質 p-ニトロフェニルホスフェート (p-NPP) 50 mM, 酒石酸 40 mM, 100 mM のクエン酸緩衝液 (pH 5.5), 45 mM のフッ素イオン存在または非存在下で行った。ここでフッ素イオン抵抗性の活性を酒石酸フッ素イオン抵抗性酸ホスファターゼ (tartrate fluoride-resistant acid phosphatase, TFRACP) とした。50  $\mu\text{l}$  の血清分画と 50  $\mu\text{l}$  の反応溶液を  $37^{\circ}\text{C}$  で一時間反応させ、50  $\mu\text{l}$  の 0.1 M NaOH で反応を止めた。溶液の吸光度は 415 nm, レファレンスは 492 nm で MTP-32 マイクロプレートリーダー (Corona Electric, Japan) を用いて測定した。ブランクとしては、酵素溶液を加える直前に 0.1 M NaOH を加え、サンプルと同様に反応させた。酒

石酸抵抗性 ATP アーゼ (TrATPase) 活性の測定は Ek-Rylander ら<sup>25)</sup> の方法により測定した。

### 4. 電気泳動

未変性 (native) の酸ホスファターゼを酸アクリルアミドディスクゲルで電気泳動して分析した。分析ゲルは 375 mM 酢酸カリウム緩衝液 (pH 3.9) に 7.5% アクリルアミド (アクリルアミド-ビスアクリルアミド 30 : 0.8 (g/100 ml)) と 0.14% 硫酸アンモニウムと 0.5% (v/v) N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) を重合化させたものを使用した。1 ml の溶液をガラスチューブ (70  $\times$  5 mm I.D.) に入れた。サンプルゲルは 2.5% アクリルアミド (アクリルアミド-ビスアクリルアミド 10 : 2.5 (g) / 100 ml) を 250 mM 酢酸カリウム緩衝液 (pH 4.5) に入れたものを使用した。ゲルは同量の蒸留水で希釈して、リボフラビン (0.5 mg/100 ml) と 0.058% TEMED を光によって重合させたものをゲル上に 5 mm のせた。100  $\mu\text{l}$  のサンプルを同量の 50% グリセロールを含んだ 4.5% 牛血清アルブミン (BSA) と混合した。この溶液をゲル上に載せた。電気泳動は 35 mM  $\beta$ -アラニンの存在下に、pH 4.0,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 mA で 2 時間行った。

酒石酸抵抗性 ATP アーゼ (TrATPase) 活性の測定は EK-Rylander ら<sup>25)</sup> の方法により測定した。

## 結果

臍帯血血清を塩濃度勾配 (0.1 M から 1.05 M NaCl) により溶出したところ未吸着のピークと 3 つの TRACP 活性を認めた (Fig. 1)。血清蛋白は 280 nm で測定したところ、二つのピークに分かれた。一つは未吸着のピークで全 UV 吸収の 95% 以上であった。もう一つのピークは 5% 以下であり、その 1 番目の TRACP 活性のピーク I と一致した (データ示さず)。検体量を徐々に減らしたところ、1 ml に減量してもピークの分離は完全になされることが確かめられた (Fig. 1)。現在ではほとんどの分析で 1 ml の血清を用いて分析している。

TRACP 活性の最後のピークは TRACP ピークのなかで 1 番高いピーク III であった。TFRACP の活性は未吸着のピークとピーク I に各々認められた。しかし TRACP と TFRACP のピークは必ずしも同じ場所に出現せず、最初の吸着ピーク (ピーク I) のフラクションにおいてフッ素イオンで阻害される分画と阻害されない分画があった。特にこのピークの後半のフラクションはフッ素イオンにより強く阻害された。そして TFRACP のピーク I は TRACP のピークより少し遅れて溶出された。

溶血させた血液 (ヘム濃度 15  $\mu\text{M}$ <sup>26)</sup>) を混入させた血



Fig. 1 (A) Separation of TRACPs by heparin column (5 ml) chromatography. The bound TRACPs were eluted with a NaCl linear gradient from 0.1M to 1.05 M (square) and fractionated 2.5 ml each. The activity of eluted TRACPs was assayed with (circle) and without (triangle) 45 mM of sodium fluoride. (B) Separation of TRACPs by heparin column (1ml) chromatography. Every fraction was 200  $\mu$ l.

清のTRACPとTFRACPの溶出パターンはまったく異な  
って、TFRACPにおいて二つの大きなピークが現れた  
(Fig. 2). 一つは未吸着のピークで、もう一方はヘパリン  
カラムに吸着したピーク I であった。フッ素イオン非  
存在下において、二つ目のピーク (ピーク II) と三つ目  
のピーク (ピーク III) は溶血した血液の混入によって増  
加しなかった。フッ素イオン添加によって、ピーク II と  
III はほぼ完全に消失した。このように、赤血球由来の  
TRACP はヘパリンカラムにより未吸着部位とピーク I  
に溶出されるということが示された。溶血した血液を透

析し、ヘパリンカラムにより分析した時、TRACPの活  
性は未吸着のピークにのみ溶出され、ピーク I, II, III  
にはほとんど現れなかった (データ示さず)。未吸着の  
フラクションを再クロマトグラフィーしても同じ未吸着  
部分に溶出されただけで、本来溶出フラクションに出る  
はずのTRACPのピーク (ピーク I, II, III) は認めら  
れなかった。これらの結果より、未吸着のピークはカラム  
の吸着能力を超えたために生じたものではないと考え  
られる。

臍帯血、小児および成人血清の典型的なTRACP溶出

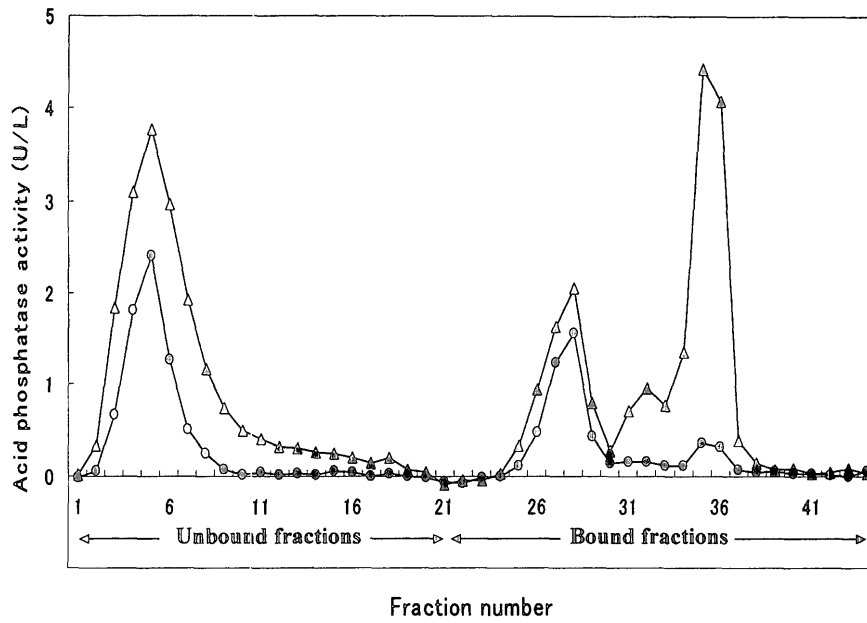


Fig. 2 The elution profile of the cord serum containing hemolysate. The activity of TRACPs was assayed with (circle) and without (triangle) 45 mM sodium fluoride.

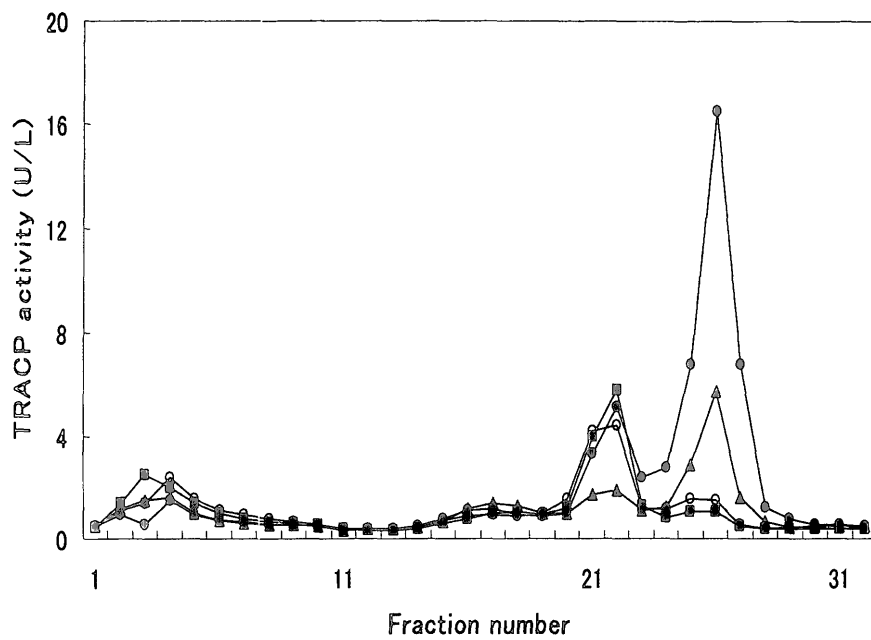


Fig. 3 The elution profiles of the cord, child and adult serum on heparin column. An 8-ml volume of each serum was applied to the heparin column. Unbound TRACPs were fractionated 5 ml each from fractions 1 to 10. After washing the column, TRACPs were fractionated 2.5 ml each from fractions 11 to 34. Filled circle, triangle, square and open circle show children (average age was 7.4 years), cord serum, male (age was 40 years), and male (age was 52 years), respectively.

パターンを示す (Fig. 3). 一人の小児からはヘパリンカラムによる TRACP 活性の分析に必要な充分量の血清が採取できなかったため、2人の男児、3人の女児 (平均年齢7.4歳) の血清をプールして分析した。クロマトグラフィーによる分析の結果、小児からの血清のピークⅢは臍帯血清のピークよりも2.5倍も高いことが明らかとなり、以前の結果と一致した<sup>27, 28)</sup>。対照的に成人血清の溶出パターンにおいて、ピークⅢの高さは臍帯血の約3分の1であった。2から8 mlの臍帯血をヘパリンカラムにかけた時、溶出されたフラクションの酵素活性はカラムに入れられた血清の量に比例した。この結果はサンプルの体積が我々の使用しているカラムの吸着能力を越えてはいないことを示すものである。

TRACP 活性の安定性を評価するために、透析した臍帯血清を0.2 μmのフィルターでろ過して4℃で保存してからヘパリンカラムによって4, 21, 38日後に分析した。各溶出パターンはほぼ同様の結果を示した (データ示さず)。TRACPは時間経過に伴って失活しやすいと信じられている<sup>29)</sup>が、この前処理法を使用すれば時間の経過による TRACP 活性への影響はごく少ないと考えられた。

NaClによって溶出された各3つのピークは遠心限外ろ過装置を使用して濃縮した。各フラクションの適当量をポリアクリルアミドゲルにより非変性電気泳動を行った。TRACPはパラローズアニリンによりカップリング染色をした。結果はピークⅠとⅢはLamら<sup>20)</sup>らによって名づけられたTRACP5bと、ピークⅡはTRACP5aと一致していた (Fig. 4)。

これら3種類の臍帯血TRACPの至適pHを調べたところ、ピークⅠとⅡの至適pHはpH 5.5であり、ピークⅢはpH 6.0であった (Fig. 5)。このようにピークⅡとピークⅢのTRACPの至適pHには相違が認められた。

腎透析患者 [慢性腎不全の女性4名、平均年齢45.2歳、平均透析年数24年 (1名は透析年数不明)] 血清の溶出パターンにおいてピークⅡよりピークⅢの活性が高値になり、ピークⅢにおいて健常成人より著しく高値になる傾向が見られた (Fig. 6)。

臍帯血に5 mMのEDTA<sup>6)</sup>を加えて調べたところ、加えなかったときよりも未吸着のピークとピークⅠが低下し、ピークⅡが上昇し、ピークⅢは軽度上昇した (Fig. 7)。この方法は分析をやすくしたが、分画を長く放置するとTRACP活性を失うことがわかった。フッ素イオンを入れて測ったところピークⅡとⅢはそれらの活性がほぼ消失した。

臍帯血血清の酒石酸抵抗性ATPase (TrATPase) 活性をピークⅡ、ピークⅢのいくつかの分画を測定したとこ

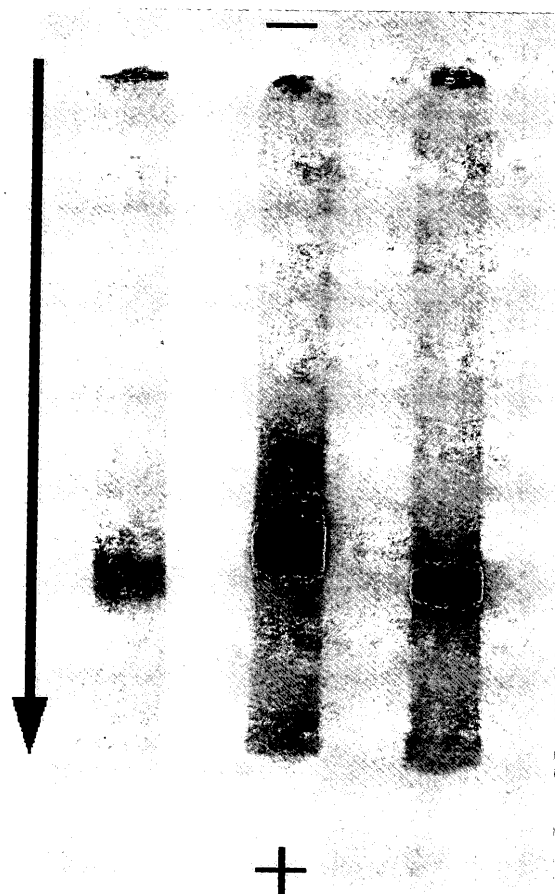


Fig. 4 Electrophoretic analysis of cord serum TRACP separated on the heparin column. The left lane corresponds to peak I of the heparin column chromatography. The center lane corresponds to peak II and the right lane to peak III.

ろ、TRACP活性のピークⅡ、ピークⅢと同じ位置にピークが出現した (Fig. 8)。

## 考 察

この10年来、血清中の総TRACP活性は骨吸収マーカーとして考えられてきた<sup>28, 30)</sup>。しかし血清中の総TRACP活性は骨、赤血球および血小板由来の酵素活性が混在したものであり骨のTRACPを反映してはいない。またTRACP5aは毛様細胞以外では検出されていない<sup>31)</sup>。Halleenら<sup>32)</sup>は人間の骨から、分子量32,000、至適pH 5.7のシアル酸を含まないTRACP5bを精製した。Lamらは、TRACP5aはシアル酸化されているが、TRACP5bはされていない<sup>21)</sup>ことを示している。以上の結果よりTRACP5bは骨組織由来であることが強く示唆される。

血清中の総TRACP活性の代わりにTRACP5b活性を測定することは骨吸収の状態をより正確に反映すると予

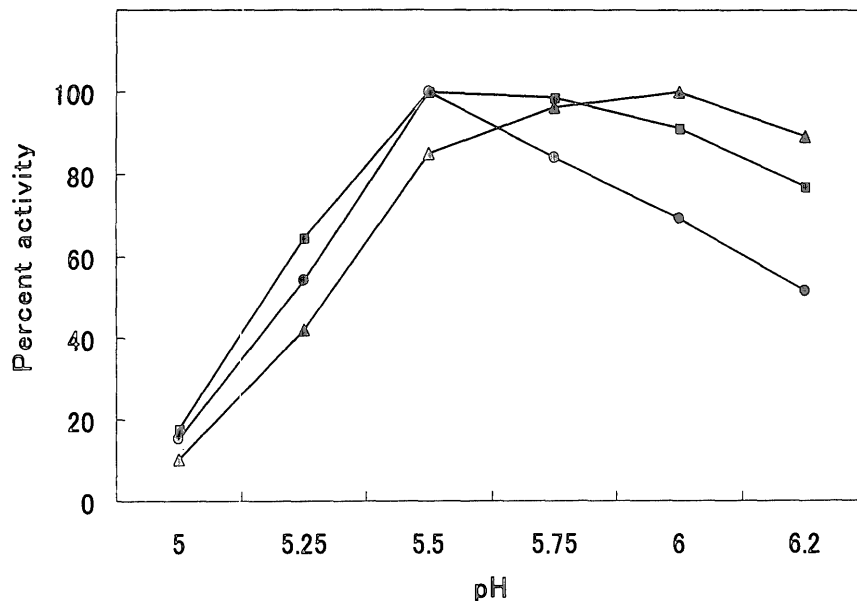


Fig. 5 The effect of pH on acid phosphatase activity. The enzymes in the cord serum separated on the heparin column were assayed at different pH values of 100 mM citrate buffer as mentioned in experimental. The each top peak fraction [peak I (square), peak II (circle), peak III (triangle)] separated was analyzed for its activity. (The maximum of each activity was shown as 100%.)

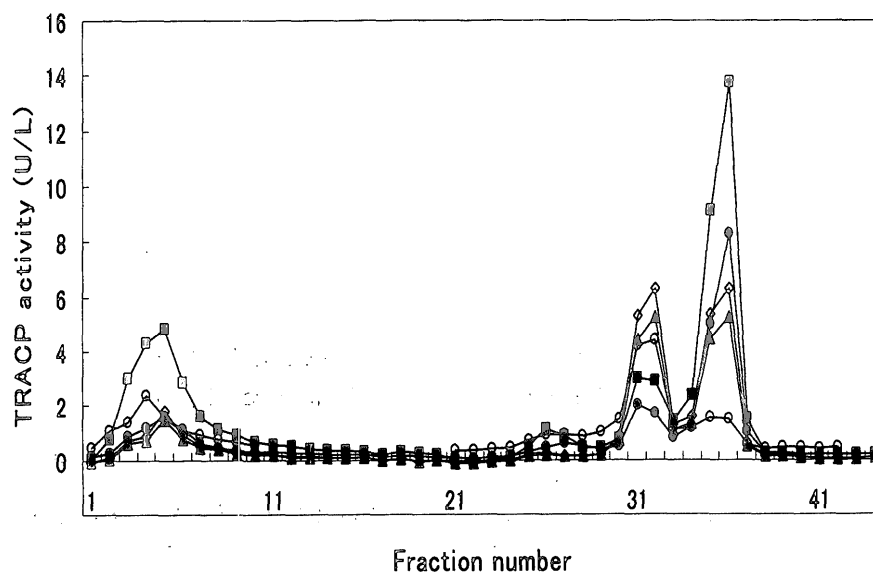


Fig. 6 TRACP activity in the sera from patients undergoing hemodialysis. The figure shows the elution profiles on heparin column of hemodialysis sera [4 females, age was 28 years of age (diamond), 45 years (filled circle), 49 years (square) and 59 years (triangle) and normal adult (age was 51 years) serum (open circle)].

想される。骨のリモデリングが活発な若年者においてピークⅢは高く、年配者では低い。Fig. 3において小児血清のピークⅢはピークⅡより高いことを示している。このように我々が開発したヘパリンカラム法では厳密にTRACP5bとTRACP5aを分離することができる。しか

も1 mlという比較的少量の血清で分離できるという利点がある。TRACPのピークⅡは臍帯血を除いて小児と成人においてほぼ一定であった。総TRACP活性は小児においてのみ骨吸収マーカーとして用いることが出来た<sup>27, 33)</sup>。なぜなら小児血清においては総TRACP活性中

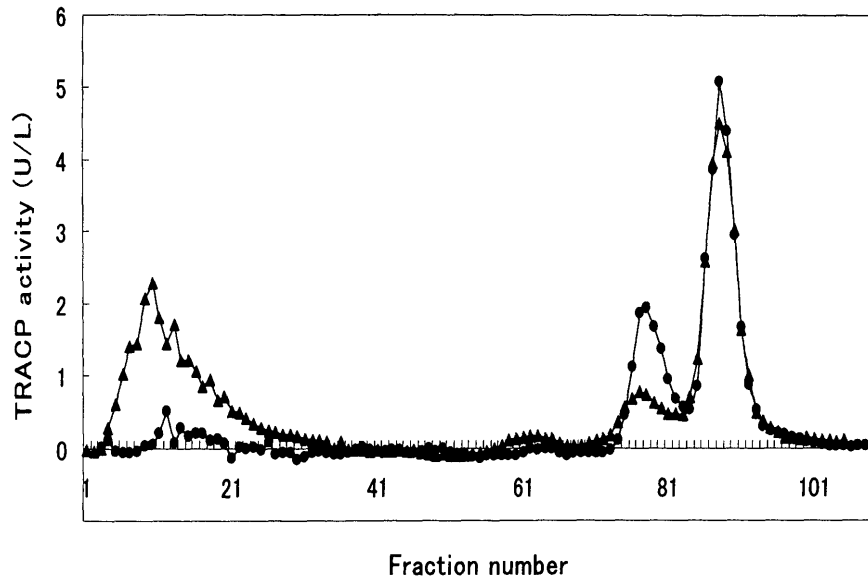


Fig. 7 The elution profiles of cord serum on 1ml of heparin column. The activity of TRACPs was assayed with (circle) or without (triangle) 5 mM EDTA. Every fraction was 200  $\mu$ l.

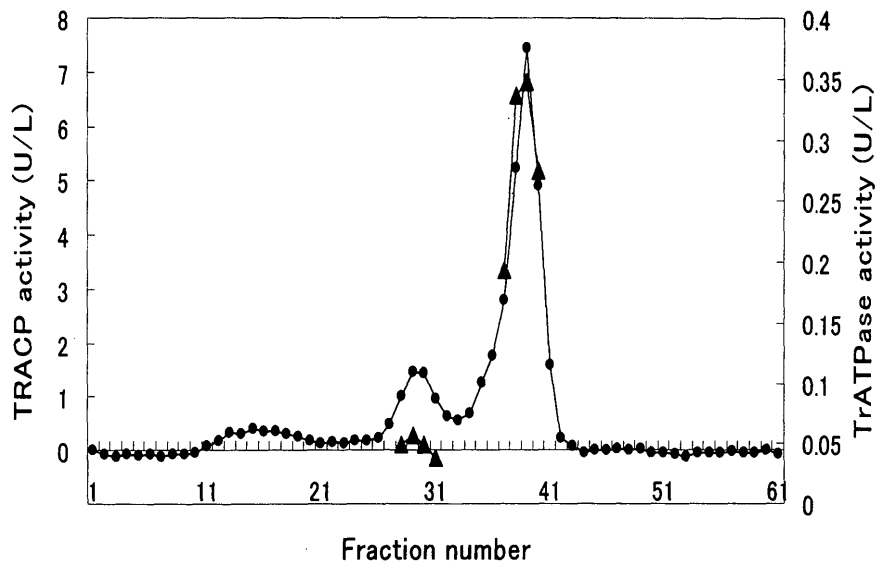


Fig. 8 The elution profiles of cord serum on heparin column. Circles and triangles show TRACP activity and tartrate resistant ATPase activity, respectively.

のTRACP5bの割合が高く、成人血清においては割合が低いので、成人血清の総TRACP活性は骨吸収を反映しているとは言えないからである。このことが骨吸収の評価のためにTRACP5bを正確に測定しなくてはならない理由である。

Nakanishiら<sup>22)</sup>は、TRACP5b活性をクロマトグラフィーで分離せずにヘパリン存在下にpH 6.6で特異的に測定できると報告した。TRACP5bと総TRACP

(TFRACPを除く)とは良い相関を示した。しかしながら、TRACP5bと比較して総TRACPは10 U/L以上の活性を含んでいるにもかかわらず、彼らは未吸着のTRACPを無視した。ヘパリンカラムにおいて未吸着のフラクションは3つのタイプの酸ホスファターゼが存在する可能性がある。酒石酸感受性酸ホスファターゼ; TRACPそしてTFRACPである。TFRACPはTRACPと比較して1:5と非常に少ない。酸ホスファターゼと

TRACPとはほぼ同等の比率である。このことにより未吸着のピークは赤血球由来のTRACPだけでなく、ほかのTRACPも含んでいる可能性がある。溶血による必然的な結果として総TRACPは増加する。我々のヘパリンカラム法による分析ではFig. 2で示したように溶血により影響されない。

TRACP活性の評価においてヘパリンを加えられた血清は適していないということを我々の結果が示している。なぜならヘパリンはTRACPに結合して部分的にTRACP活性を阻害するからである。TRACP5bのヘパリンカラムへの吸着はpH 7.2においてTRACP5aより強く、TRACP5b活性はヘパリン（最終濃度25 U/ml）によって約10%阻害される。我々の実験ではp-NPP (pH 5.5) をTRACPの基質として使用した。Nakanishiら<sup>22)</sup>は2, 6-ジクロロ-4-アセチルフェニルホスフェート (pH 6.6) を基質として使用した。我々の結果とNakanishiら<sup>22)</sup>の結果のヘパリンによるTRACPへの影響が異なった事は、異なる基質および異なるpHによって分析したためであろうと解釈できる。

Halleenら<sup>23)</sup>はTRACP5aと5bに反応するモノクローナル抗体O1Aを作製した。TRACP5bの活性の至適pHはpH 6.1に近いが、TRACP5aの至適pHは5.0でpH 6.1の5分の1以下の活性しか示さなかった。したがって彼らが行ったO1A抗体に一度TRACPを結合させてTRACP活性を測定する分析法はpH 6.1におけるTRACP5aと5bを同時に測定したに過ぎない。我々の実験では、年配者の血清中のTRACP5aは通常TRACP5bよりも高い (Fig. 6)。TRACP5aがTRACP5bよりも3倍以上高いということは稀ではない。年配者の血清においてMab O1A法では実際のTRACP5bレベルよりも過大に評価されるであろう。抗TRACP5b抗体はELISA法によるTRACP分析に有用であるが、現在のところ特異的な抗体は作製に成功していない<sup>23, 30, 34)</sup>。我々のピークⅢTRACPを利用する方法は他の方法よりも骨の代謝回転を評価するために有用であろう。ただし、肺胞細胞由来のマクロファージにはTRACP5b活性が含まれているので、それが混在する時は評価が困難になる。

TRACP遺伝子はヒト染色体上に1箇所しか存在しないことが知られている<sup>35)</sup>。TRACP遺伝子のAlternative splicingもしくはpost-transcriptional modificationはTRACP RNA<sup>36)</sup>発現の中から酵素タンパク質<sup>37)</sup>の翻訳後に起こる。TRACP5bは主に骨から由来するものと考えられているがTRACP5aの由来はよく分かっていない<sup>34)</sup>。溶出されたフラクションのピークⅠがTRACP5bの一部であろうということは非変性酸アクリルアミド電気泳動によって示された。しかしながら、マクロファ

ージ由来TRACPのピークの位置は高い塩濃度によって溶出する赤血球由来のTRACPと一致しない。最初のTRACPピークは最低二つの異なる酵素（一つはフッ素イオン感受性、一方は酒石酸抵抗性酵素）によって構成されている。

今回我々の実験でTRACP5a, 5bはヘパリンカラムクロマトグラフィーにより、各々ピークⅡ, Ⅲにはっきり分離できることを示した。この方法はTRACP5a, 5bの精製に有用であろう。

Figure 5に示したように至適pHにおいてピークⅡTRACP (pH 5.5) はピークⅢTRACP (pH 6.0) と少し異なる。ピークⅡTRACPとピークⅢTRACPの至適pHは各々人血清TRACP5a, 5bの至適pHとほぼ一致している<sup>20)</sup>。TRACP5酸ホスファターゼは通常CM-セファロースを使用して分離される。この方法は小児血清における骨吸収は評価できるが、成人血清では利用できない。なぜなら、CM-セファロースへのTRACP吸着は非常に強く少量の成人血清TRACPは樹脂に付着し、溶出されないからである。

Halleenらは、血清にEDTAを加えカラムクロマトグラフィーを行うと、高分子のTRACPが減少すると言っている<sup>34)</sup>。今回の我々の実験でも未吸着ピークが大きく減少し、彼らの結果と一致した。このことはEDTAが主に血球や血小板のTRACPやTFRACPを阻害することを示している。骨には高い特異性をもったTRACPとTrATPaseがあると知られてきた<sup>25)</sup>。今回我々がTrATPase活性を測定したところ、TRACP活性と同じ位置にピークが出現したことによりTRACPにはTrATPase活性があるということを確認した。

通常、成人血清においてはTRACP5aピークと比してTRACP5bピークの方が低値であるが、腎透析患者血清においてはTRACP5bピークのほうが高値になっていた。このことから透析によるCa<sup>2+</sup>低下により破骨細胞の活性が高まったことが強く示唆される。われわれの方法で患者の血清中TRACPをモニターすることによって骨代謝の状態を判断できる可能性を見出した。

## 文 献

- 1) Moss DW, Raymond FD, Wile DB, et al : Clinical and biological aspects of acid phosphatase. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **32** : 431-467, 1995.
- 2) Modder CP. : Investigations on acid phosphatase activity in human plasma and serum. *Clin Chim Acta*, **43** : 205-214, 1973.
- 3) Moonga BS, Moss DW, Patchell A, et al : Intracellular regulation of enzyme secretion from rat osteoclasts and



- evidence for a functional role in bone resorption. *J Physiol*, **429** : 29-45, 1990.
- 4) Vincent JB, Crowder MW, and Averill BA. : Spectroscopic and kinetics studies of a high-salt-stabilized form of the purple acid phosphatase from bovine spleen. *Biochemistry*, **30** : 3025-3034, 1991.
  - 5) Nakanishi M, Yoh K, Uchida K, et al : Improved method for measuring tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum. *Clin Chem*, **44** : 221-225, 1998.
  - 6) Halleen JM, Kaija H, Stepan JJ, et al : Studies on the protein tyrosine phosphatase activity of tartrate-resistant acid phosphatase. *Arch Biochem Biophys*, **352** : 97-102, 1998.
  - 7) Vincent JB and Averill BA. : An enzyme with a double identity : purple acid phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase. *FASEB J*, **4** : 3009-3014, 1990.
  - 8) Halleen JM, Raisanen S, Salo JJ, et al : Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem*, **274** : 22907-22910, 1999.
  - 9) Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, et al : Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development*, **122** : 3151-3162, 1996.
  - 10) Lau KH, Onishi T, Wergedal JE, et al : Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum : potential use to assess bone resorption. *Clin Chem*, **33** : 458-462, 1987.
  - 11) Chamberlain P, Compston J, Cox TM, et al : Generation and characterization of monoclonal antibodies to human type-5 tartrate-resistant acid phosphatase : development of a specific immunoassay of the isoenzyme in serum. *Clin Chem*, **41** : 1495-1499, 1995.
  - 12) Torres R, de la Piedra C and Rapado A. : Clinical usefulness of serum tartrate-resistant acid phosphatase in Paget's disease of bone : correlation with other biochemical markers of bone remodelling. *Calcif Tissue Int*, **49** : 14-16, 1991.
  - 13) Stepan JJ, Lachmanova J, Strakova M, et al : Serum osteocalcin, bone alkaline phosphatase isoenzyme and plasma tartrate resistant acid phosphatase in patients on chronic maintenance hemodialysis. *Bone Miner*, **3** : 177-183, 1987.
  - 14) Stepan JJ, Silinkova-Malkova E, Havranek T, et al : Relationship of plasma tartrate resistant acid phosphatase to the bone isoenzyme of serum alkaline phosphatase in hyperparathyroidism. *Clin Chim Acta*, **133** : 189-200, 1983.
  - 15) Lam KW, Dannaher C, Letchford S, et al : Tartrate-resistant acid phosphatase in serum of cancer patients. *Clin Chem*, **30** : 457-459, 1984.
  - 16) Stepan JJ, Neuwirtova R, Pacovsky V, et al : Biochemical assessment of bone disease in multiple myeloma. *Clin Chim Acta*, **142** : 203-209, 1984.
  - 17) Angel NZ, Walsh N, Forwood MR, et al : Transgenic mice overexpressing tartrate-resistant acid phosphatase exhibit an increased rate of bone turnover. *J Bone Miner Res*, **15** : 103-110, 2000.
  - 18) Igarashi Y, Lee MY, and Matsuzaki S. : Acid phosphatases as markers of bone metabolism. *J Chromatogr B*, **781** : 345-358, 2002.
  - 19) Li CY, Yam LT and Lam KW. : Acid phosphatase isoenzyme in human leukocytes in normal and pathologic conditions. *J Histochem Cytochem*, **18** : 473-481, 1970.
  - 20) Lam WK, Eastlund DT, Li CY, et al : Biochemical properties of tartrate-resistant acid phosphatase in serum of adults and children. *Clin Chem*, **24** : 1105-1108, 1978.
  - 21) Lam KW, Li CY, Yam LT, et al : Comparison of the tartrate-resistant acid phosphatase in Gaucher's disease and leukemic reticuloendotheliosis. *Clin Biochem*, **14** : 177-181, 1981.
  - 22) Nakanishi M, Yoh K, Miura T, et al : Development of a kinetic assay for band 5b tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum. *Clin Chem*, **46** : 469-473, 2000.
  - 23) Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, et al : Tartrate-resistant acid phosphatase 5 b : a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res*, **15** : 1337-1345, 2000.
  - 24) Lee MY, Lottsfeldt JL and Fevold KL. : Identification and characterization of osteoclast progenitors by clonal analysis of hematopoietic cells. *Blood*, **80** : 1710-1716, 1992.
  - 25) Ek-Rylander B, Marks SC Jr, Hammarstrom LE, et al : Osteoclastic acid ATPase : biochemical and histochemical studies of the osteopetrotic mutations in the rat. *Bone Miner*, **5** : 309-321, 1989.
  - 26) Igarashi Y, Kimura K, Kajita A. et al : Analysis of oxygen equilibria of the giant hemoglobin from the earthworm *Eisenia foetida* using the Adair model. *J Biochem (Tokyo)* **109** : 256-261, 1991.
  - 27) 西野治身, 堀井裕子, 田中朋子, 他 : 思春期児童の骨

- ターンオーバーに関する縦断的研究.副題 身体発育および第二性徴の影響. 日本公衆衛生学雑誌, 46 : 47 - 60, 1999.
- 28) Schiele F, Artur Y, Floc'h AY, et al : Total, tartrate-resistant, and tartrate-inhibited acid phosphatases in serum : biological variations and reference limits. Clin Chem, 34 : 685 - 690, 1988.
- 29) Calvo MS, Eyre DR and Gundberg CM. : Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. Endocr Rev, 17 : 333 - 368, 1996.
- 30) Nakanishi M, Yoh K, Uchida K, et al : Clinical usefulness of serum tartrate-resistant fluoride-sensitive acid phosphatase activity in evaluating bone turnover. J Bone Miner Metab, 17 : 125 - 130, 1999.
- 31) Lam KW and Desnick RJ. : Related Articles, Links Biochemical properties of the tartrate-resistant acid phosphatase activity in Gaucher disease. Prog Clin Biol Res., 95 : 267 - 278, 1982.
- 32) Halleen J, Hentunen TA, Hellman J, et al : Tartrate-resistant acid phosphatase from human bone : purification and development of an immunoassay. J Bone Miner Res, 11 : 1444 - 1452, 1996.
- 33) Chen J, Yam LT, Janckila AJ, et al : Significance of "high" acid phosphatase activity in the serum of normal children. Clin Chem, 25 : 719 - 722, 1979.
- 34) Halleen JM, Hentunen TA, Karp M, et al : Characterization of serum tartrate-resistant acid phosphatase and development of a direct two-site immunoassay. J Bone Miner Res, 13 : 683 - 687, 1998.
- 35) Drexler HG and Gignac SM. : Characterization and expression of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in hematopoietic cells. Leukemia, 8 : 359 - 368, 1994.
- 36) Ling P and Roberts RM. : Uteroferrin and intracellular tartrate-resistant acid phosphatases are the products of the same gene. J Biol Chem, 268 : 6896 - 6902, 1993.
- 37) Hayman AR, Dryden AJ, Chambers TJ, et al : Tartrate-resistant acid phosphatase from human osteoclastomas is translated as a single polypeptide. Biochem J, 277 : 631 - 634, 1991.

**Analysis of Tartrate-resistant acid Phosphatase (TRACP) in Human Serum Using Heparin Column. :  
Novel Analytical Method of TRACP from the Osteoclast as a Bone Resorption Marker in Serum**

Samon Shimizu and Yoshihiko Igarashi

*Department of Biochemistry, Dokkyo University School of Medicine, Mibu, Tochigi, 321 - 0293 Japan*

**Background and Aim :** Mature osteoclasts are multinucleated giant cells that possess high levels of tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP). The objective of our present study is to develop a column chromatographic method that separates isoforms of TRACP5a and 5b in human serum. TRACP5b is considered to be derived from the osteoclast. Since no simple chromatographic method of measuring osteoclast-specific TRACP has been established, attempts were made to measure specifically TRACP isozymes in human serum using a heparin column.

**Methods :** The serum was dialyzed against 20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 7.2. After filtration, the sample was applied to a heparin column. The column was eluted with a linear gradient of sodium chloride from 0.1 to 1.05 M. TRACP activity was assayed with a colorimetric method. The final substrate concentration of p-nitrophenyl phosphate in the assay medium was 50 mM. The activity was measured in the presence of 40 mM sodium (+) tartrate with or without 45 mM

sodium fluoride in 100mM citrate buffer, pH 5.5.

**Results and Conclusion :** Heparin column-bound TRACP in a human serum was clearly divided into three peaks when eluted with a linear gradient of sodium chloride. The last peak (peak III) corresponded to TRACP5b which was first named according to its electrophoretic mobility by Lau et al and was considered to be secreted mainly from the osteoclast. The second peak (peak II) was found to be TRACP5a. Acid polyacrylamide gel electrophoresis showed that both peaks I and III corresponded to TRACP5b and the peak II to TRACP5a. Our method was not affected by hemolysis. In the sera of patients undergoing hemodialysis, the activity of TRACP5b was increased markedly. Our chromatographic method to separate TRACP5b can be useful to evaluate bone resorption.

**Key Words :** bone metabolism, osteoclast, heparin column, TRACP, TrATPase