

骨肉腫におけるアルカリフォスファターゼの 意義に関する基礎的研究

新潟大学医学部整形外科学教室 (主任: 高橋栄明教授)

新潟大学医学部第一病理学教室 (主任: 渡辺英伸教授)

堀田 哲夫

Basic Study on Alkaline Phosphatase Produced
by Human Osteosarcoma Cells

Tetuo HOTTA

*Department of Orthopedic Surgery,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Hideaki TAKAHASHI)
First Department of Pathology,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Hidenobu WATANABE)*

The exact significance of alkaline phosphatase (ALP) in osteosarcomas is not fully elucidated still now. This basic study was performed to evaluate the validity of ALP as a tumor marker, using three cultured human osteosarcoma cell lines, NOS-1, NOS-2 and KSU, which were derived from conventional osteoblastic type osteosarcoma. The NOS-1 cell line had always the highest activity of ALP, while the KSU cell line had no detectable activity. Both NOS-1 and NOS-2 cells produced ordinary bone-type ALP, but did not produced any tumor-specific variants. The levels of ALP secreted NOS-1 or NOS-2 cells in media were closely related to the cell number. Moreover, the serum levels in nude mice bearing NOS-1 or NOS-2 cells also were closely related to the tumor weight. These data indicate that ALP is useful as a marker in the serum to monitor therapeutic effect for the patients with ALP-producing osteosarcoma. However, it was proved that an antineoplastic agent, methotrexate, temporarily stimulated osteosarcoma cells to produce ALP. Messenger RNA of bone type ALP was always reflected in the ALP activity in

Reprint requests to: Tetuo HOTTA,
Department of Orthopedic Surgery,
Niigata University School of Medicine,
Asahimachi-dori 1, Niigata City,
951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部整形外科学教室
堀田 哲夫

osteosarcoma cells.

Key words: alkaline phosphatase, osteosarcoma, cell culture, tumor marker

アルカリフォスファターゼ, 骨肉腫, 細胞培養, 腫瘍マーカー

はじめに

アルカリフォスファターゼ (Alkaline phosphatase, ALP) は古くから骨形成, 特に石灰化機構に必須の蛋白と考えられており¹⁾, 骨芽細胞によって産生されることが知られている²⁾. 腫瘍細胞が直接骨あるいは類骨を作る悪性腫瘍と定義される骨肉腫³⁾の患者血清中には, しばしば ALP の上昇が見られ, 一般に ALP 高値例に比べて予後が不良であると言われている⁴⁾⁻⁶⁾. ところが, 比較すれば少数例ではあるが, 必ずしも前述のような臨床経過をたどらない例, つまり, ALP 低値でも予後不良の例があったり, また ALP の上昇そのものを伴わない骨肉腫症例さえある. ALP が骨肉腫細胞にとってどのような意味があるのか, また血清 ALP の測定が患者の管理にどのような意義を有するのか, まだ確立された理論はない.

そこで著者は, 定型的骨形成型骨肉腫より樹立され, 異なる ALP 活性を示す3種のヒト骨肉腫細胞株を材料とし, 培養系及びヌードマウス移植系を用いて, 実験的に ALP の腫瘍マーカーとしての可能性について追究した. その結果, ALP は腫瘍マーカーの一つとして採用できる基礎的要件は備えていることを確認したので報告する.

I. 材料と方法

1. 培養細胞

ヒト骨形成型骨肉腫に由来する NOS-1⁷⁾, NOS-2⁷⁾, KSU⁷⁾⁸⁾の3種の培養細胞株を用いた(表1). NOS-1 と NOS-2 とは RPMI-1640 (日本製薬) に, KSU は

DM-170 (極東製薬) に各々10%の割合で牛胎児血清 (M.A. Bioproducts, USA) と 200 μ g/ml の硫酸カナマイシン (明治製薬) を加えたものを培養液とし, 37 $^{\circ}$ C, 湿度 100%, 5%炭酸ガス含有空気の条件下で静置培養した.

2. ALS 活性の酵素細胞化学

ALP 活性の光顕的観察は Burstone⁹⁾ のアゾ色素法にて行い, 電顕的観察は Mayahara ら¹⁰⁾ のクエン酸鉛法にて行った.

3. ALP の分析

ALP の抽出: 培養細胞は $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 個を 0.9% NaCl/0.2 M Tris-HCl 緩衝液で2回洗浄後 -80° C で凍結保存しておいたものを用いた. 培養細胞及び対照とした肝, 十二指腸, 後期胎盤組織を凍結融解後, 40% (v/v) n-butanol で処理, 更に超音波破碎を行なったものを冷却遠心 (10,000 rpm, 20分) し, 下層の透明層を 0.9% NaCl/0.1 mM MgCl₂/10 mM Tris-HCl 緩衝液に対し12時間透析したものを ALP 抽出液とした.

ALP 活性の測定: ALP 活性の測定は, King-Armstrong 法の Kind-King 変法にて行った.

耐熱試験: Posen ら¹¹⁾ の方法に準じ, 試料に 50 mM となるように MgCl₂ を加えたものを 65 $^{\circ}$ C 10分間熱処理し, ALP 活性を測定した.

アミノ酸阻害試験: Watanabe and Fishman¹²⁾ の方法に準じ, L-Phenylalanine, L-Homoarginine, L-Leucine (以上ナカライテスク) を 0.1 mM, 1 mM, 10 mM, 100 mM の濃度で試料に加え, 37 $^{\circ}$ C で15分間反応させた後 ALP 活性を測定した.

表1 母腫瘍の臨床的要点

Cell line	Patient's age (yrs) and sex	Tumor location and histology	Preoperative level of serum ALP (IU/l)	Follow up
NOS-1	16, M	Lt. proximal tibia Osteoblastic type	25,000	Died, 6 months after surgery
NOS-2	11, M	Rt. distal femur Osteoblastic type	500	NED ^{a)} , for 2 years
KSU	15, M	Lt. proximal tibia Osteoblastic type	82	Died, 1 year after surgery

a) NED: no evidence of disease.

電気泳動：1%アガロースゲルを用い、50Vで2時間泳動後、5-Brom-3-indolylphosphate p-toluidine salt (和光純薬) で発色させた。

4. 細胞増殖と ALP 活性

細胞を 2×10^5 個、60 mm 径のプラスチックディッシュにまき、2日毎に細胞数と、培養上清中の ALP 活性及び細胞抽出液の ALP 活性を測定した。予備実験により ALP の総活性値には n-buthanol 処理の有無はほとんど影響しなかったため、本実験以降細胞内 ALP 活性の測定は、凍結融解及び超音波処理によって抽出したものを用いた。実験はすべて duplicate で行い、NOS-1 と KSU では2回、NOS-2 では3回の平均を求めた。

5. 移植腫瘍

5～6週令の BALB/c (nu/nu) 系雌ヌードマウス(日本クレア)の背部皮下に約 1×10^7 の細胞を移植し、腫瘍が所定の大きさに達したところでマウスを屠殺、摘出した腫瘍の重量とマウス血清中の ALP 活性を測定した。

6. DNA 及び RNA の解析

DNA レベルでの肝・腎・骨 (L/K/B) 型 ALP 遺伝子の有無を調べるために、培養細胞より高分子 DNA を抽出し¹³⁾、制限酵素 EcoRI, BamHI あるいは Hind III で切断後、Southern blot hybridization¹⁴⁾ を行った。正常対照として胎盤抽出 DNA を用いた。次に L/K/B 型 ALP の mRNA の発現を見るために Guanidium-CsCl 法により培養細胞より RNA を抽出し、total RNA を用いて Northern blot hybridization¹⁵⁾ を行った。

JCRB より分与された L/K/B 型 ALP の cDNA¹⁶⁾ は、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP (Amersham, U.K.) を用いマルチプライム法¹⁷⁾ により標識した。ヒト β -actin のオリゴヌクレオチドプローブ (Clontech, USA) は $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (Amersham) を用いて 5' 末端標識した¹³⁾。

7. ALP の誘導実験

予備実験で得た活性型 Vitamin D₃ である 1,25-dihydroxyvitamine D₃ (1,25(OH)₂D₃) の効果が最も顕著に現れる条件、すなわち指数増殖期中期、1%牛胎児血清、薬剤作用後24時間での判定という条件により、高張処理 (NaCl, 40 mM), sodium butyrate (NaBT, 1 mM) (ナカライテクス), N⁶, O^{2'}-dibutyryl adenosine 3': 5' cyclicmonophosphoric acid (dbcAMP, 1 mM) (Sigma), 1,25(OH)₂D₃ (10^{-7} M) (Hoffman-RaRoche, Switzerland), IGF-I (1 ng/ml, 10 ng/ml)

(Collaborative Res., USA) が NOS-1 の ALP 活性に与える影響を検討した。NOS-1 は、約2か月かけて1%牛胎児血清でも安定した増殖を示すようになったものを用いた。次いで KSU については1%と10%の牛胎児血清を含む DM-170 培養液でおのおの同様の実験を行った。

8. 抗腫瘍剤 Methotrexate 処理

骨肉腫の治療に最も良く用いられる methotrexate (MTX) (Lederle, USA) が NOS-1 の ALP 活性に与える影響を検討した。

細胞 5×10^5 個を 60 mm 径プラスチックディッシュにまき、4日間培養後 MTX で12時間処理し、その後血清を含まない培養液で2回洗浄した。抗腫瘍剤作用後4、6日目の細胞数と細胞内及び培養上清中の ALP 活性を測定し、無処理群と比較した。MTX 濃度は 5 $\mu\text{g/ml}$ と 50 $\mu\text{g/ml}$ とし、3回の実験の平均を求めた。

II. 結 果

1. ALP 活性の有無と局在

光顕上 NOS-1 は ALP 強陽性、NOS-2 は中等度陽性を示したが、KUS では ALP 陽性細胞は全く認められなかった(図1)。陽性部位は電顕的に細胞膜と細胞外へ遊離した matrix vesicle 様構造であった(図2)。

2. ALP の分析

耐熱試験及びアミノ阻害試験の結果を表2に示す。NOS-1 と NOS-2 の ALP は肝より抽出した ALP 同様、熱処理によって完全に失活し、耐熱性を示す胎盤型 ALP とは区別された。またアミノ酸阻害試験でも NOS-1 と NOS-2 から抽出した ALP は肝の ALP 同様 L-Homoarginine により濃度依存性に活性が阻害されたが、L-Phenylalanine による阻害は軽度であった。1%アガロースゲル電気泳動では NOS-1 と NOS-2 の ALP は腎型 ALP と肝型 ALP の間に泳動された。

以上の結果は、NOS-1 と NOS-2 が産生する ALP がいずれも通常の骨型と同じものであることを示す。

3. 細胞増殖と ALP 活性

NOS-1 では、培養上清中の ALP は、指数増殖期前期は比較的低値であったが、指数増殖期後期より急激な増加を示した。一方細胞内の ALP は、定常期になるまで直線的に増加した(図3)。

NOS-2 でも培養上清中の ALP は、細胞数の増加に伴って増加したが、その値は比較的低くピーク時の比較では NOS-1 の約1/3であった。さらに細胞内 ALP は NOS-1 の場合とは異なり培養の時相による変動は

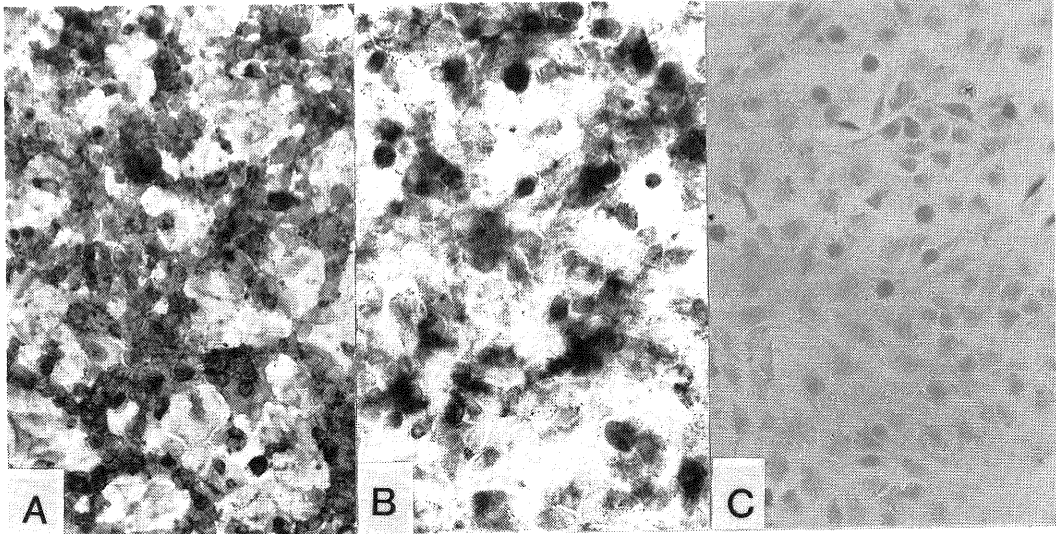


図1 培養細胞のALP 光顕組織化学

ALP 活性は、NOS-1 細胞 (A) に最も強く、NOS-2 細胞 (B) にも認められるが、KSU 細胞 (C) では全く認められない。(アゾ色素 Fast Red TR 塩, メチルグリーン後染色, $\times 170$)

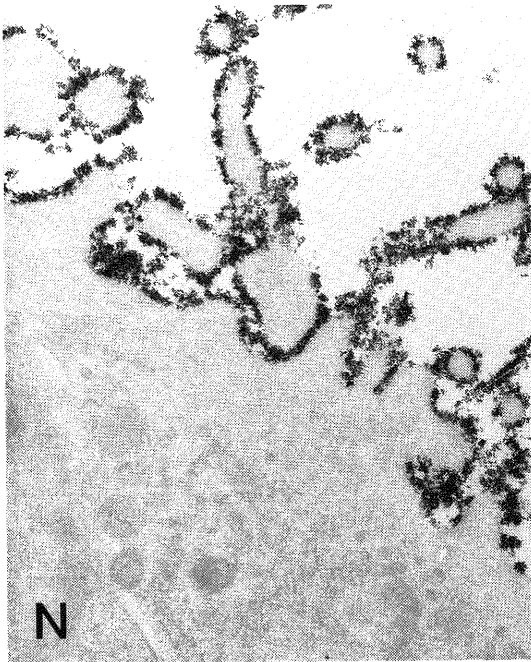


図2 NOS-1 細胞のALP 電顕組織化学

ALP 活性は、核膜周囲腔, rER 等細胞内小器官には認められず、細胞膜に至って初めて認められ。細胞突起がちぎれ、さらに細片化してゆく matrix vesicle 様構造にも活性は認められる。

N : 細胞核 ($\times 23,000$)

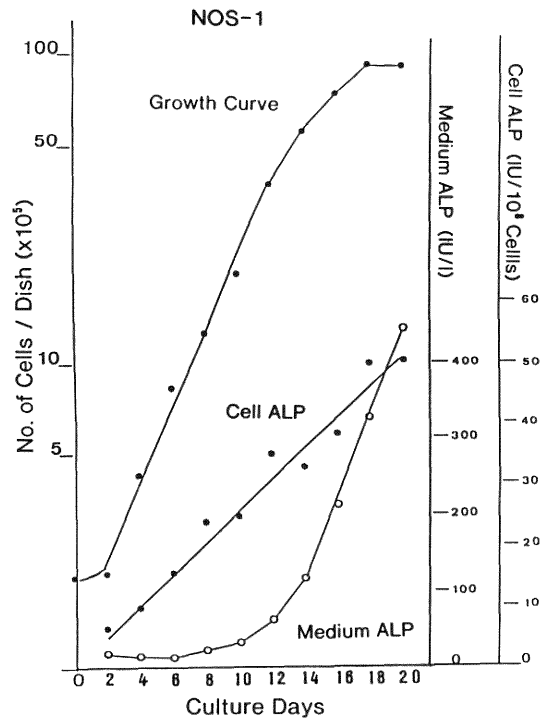


図3 NOS-1 細胞の増殖とALP 活性

表 2 培養骨肉腫細胞より抽出した ALP の酵素化学的性質

	% of activity ^{a)}				
	NOS-1	NOS-2	Liver	Term placenta	Duodenum
I. Heat stability test 65°C, 10 min	3.1	1.4	3.6	116.6	57.7
II. Amino acid inhibition test					
L-Homoarginine (100 mM)	15.2	14.3	17.4	86.7	76.7
L-Phenylalanine (100 mM)	81.5	79.2	79.8	19.9	17.1
L-Leucine (100 mM)	60.8	60.5	65.5	62.5	29.0

a) 処理群の酵素活性を無処理群の酵素活性に対する百分率で示した。

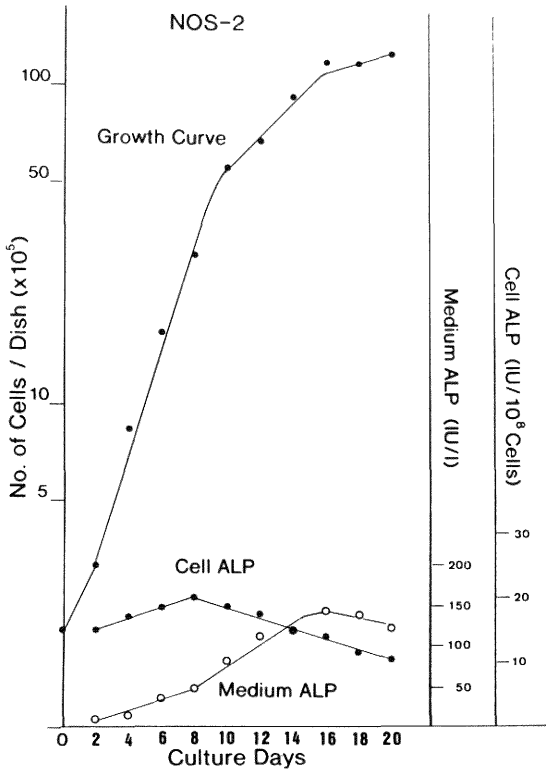


図 4 NOS-2 細胞の増殖と ALP 活性

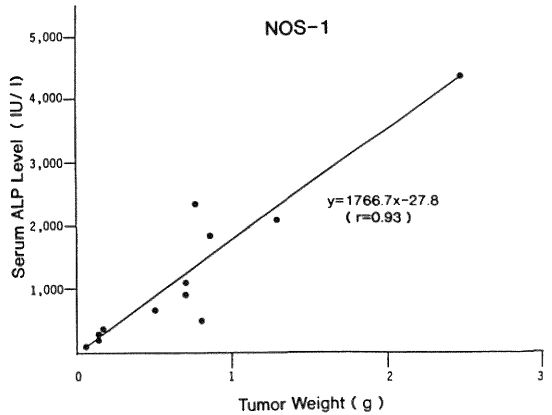


図 5 担 NOS-1 腫瘍スードマウス血清中の ALP

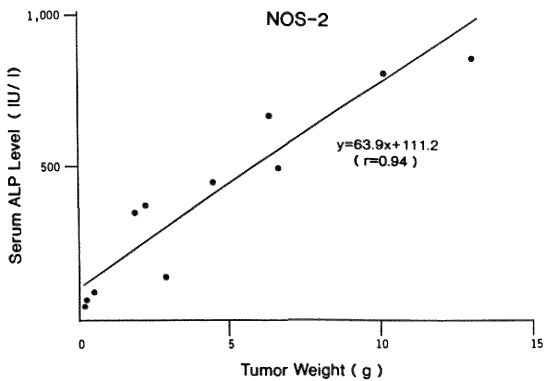


図 6 担 NOS-2 腫瘍スードマウス血清中の ALP

少なく、むしろ指数増殖期後期には低下傾向を示した(図4)。KSUでは、増殖のいずれの時期においても培養上清中、細胞内ともALPは全く検出されなかった。

4. 担腫瘍ヌードマウス血清中のALP

NOS-1を移植されたマウスの方がNOS-2を移植されたマウスより血清ALP値は高かったが、両者とも腫瘍重量と血清ALP値とは密な正の相関を示した(図5,6)。

5. DNA及びRNAの解析

Southern blot hybridizationにて、NOS-1、NOS-

2、KSUのすべてに正常対照同様L/K/B型の遺伝子を認めた。しかし、Northern blot hybridizationでは、NOS-1とNOS-2にはALPのmRNAの発現が見られたが、KSUには検出できなかった(図7)。

6. ALPの誘導

NOS-1でALPを誘導できた1,25(OH)₂D₃のみならず、使用した他のどの薬剤でもKSUにはALPを

表3 骨肉腫細胞のALP活性に対する各種薬剤の影響

Agents	% of ALP in cells ^{a)}	
	NOS-1	KSU
NaCl (40 mM)	121	N.D. ^{b)}
NaBT (1 mM)	71	N.D.
dbcAMP (1 mM)	102	N.D.
1,25(OH) ₂ D ₃ (10 ⁻⁷ M)	148	N.D.
IGF-1 (10 ng/ml)	113	N.D.

- a) 薬剤処理後24時間の細胞内ALP活性を無処理群の細胞内ALP活性に対する百分率で示した。
- b) N.D.: not detected (ALPそのものが検出できなかった)。

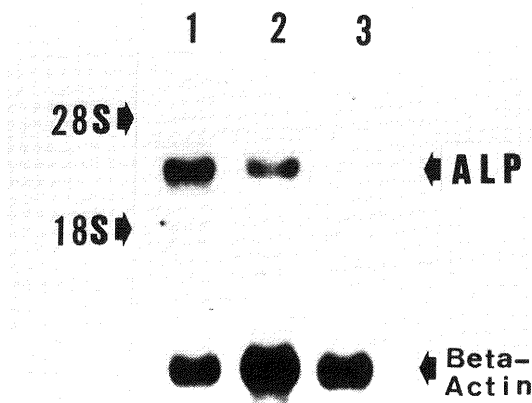


図7 骨肉腫細胞におけるL/K/B型ALPのmRNAの発現
Northern blot分析。Lane 1: NOS-1, Lane 2: NOS-2, Lane 3: KSU

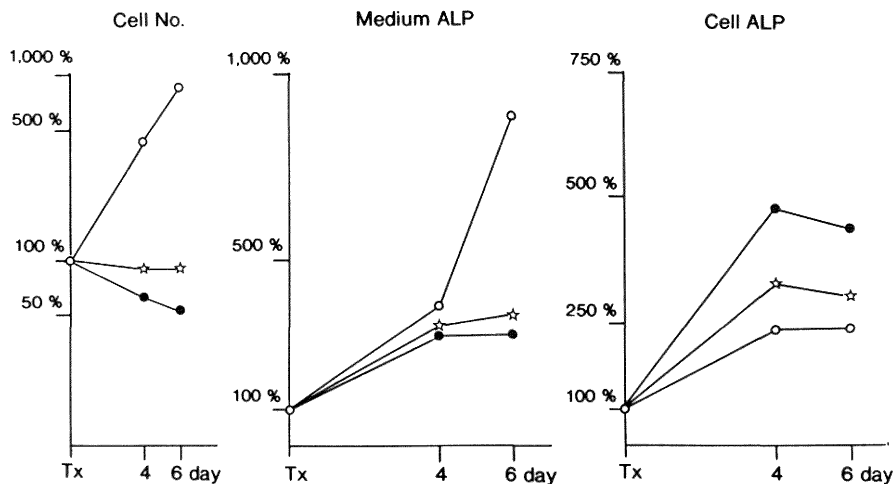


図8 抗腫瘍剤MTXによるNOS-1の細胞増殖及びALP活性の変化
○—○: 無処理対照群, ☆—☆: 5 µg/ml MTX 処理群,
●—●: 50 µg/ml MTX 処理群

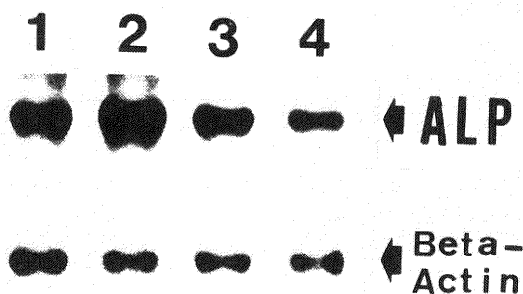


図9 MTX 処理後の L/K/B 型 ALP の mRNA の変化

Northern blot 分析. Lane 1: MTX 処理後12時間, Lane 2: 処理後24時間, Lane 3: 処理後48時間, Lane 4: 無処理対照

ALP mRNA は, 24時間で明らかな増量を示し, 48時間後には既に減少している.

誘導させることはできなかった(表3).

7. 抗腫瘍剤 MTX による ALP 活性及び発現の変化

MTX 5 μ g/ml でも 50 μ g/ml でも, NOS-1 の増殖は無処理群に比較して著しく抑制された. 一方培養上清中の ALP 活性は, 細胞数が減少しているにもかかわらず, 4日目までは無処理群とほぼ同等であった. さらに細胞内 ALP 活性は, 無処理群より処理群においてむしろ上昇していた(図8). また, L/K/B 型 ALP の mRNA も, MTX 処理後一時的にその発現を増していた(図9).

III. 考 察

ALP はアルカリ性の条件下でリン酸モノエステルを加水分解する酵素であり, 種々の臓器でその存在が認められている. また, 血清中の ALP が疾患に伴って変化する例も多数知られており, 臨床検査の中でも重要な位置を占める¹⁸⁾. ALP の生理学的意義については, Fraser によって報告された低フォスファターゼ症が骨形成障害を伴うという事実¹⁹⁾ や, その後の研究から, 骨代謝, 特に石灰化機構との関連性が高いと考えられている²⁰⁾. In vitro の実験においても, ALP 活性の高さが骨芽細胞の形質発現や分化度を反映する, すなわち骨形成能の指標と考えられている²¹⁾⁻²³⁾. 一般に骨芽細胞由来の悪性腫瘍と考えられている骨肉腫においても, ALP は古くから注目され, 腫瘍マーカーとして用いら

れてきた²⁴⁾. しかしながら, 骨肉腫の約半数において血清 ALP の上昇が認められないこと²⁵⁾, 骨肉腫に特異的な ALP variant が確認されていないことなどから, 腫瘍マーカーとしての ALP の評価は必ずしも高くはなかった. 今回実験に用いた骨肉腫細胞が産生する ALP も通常の骨型 ALP であり, 腫瘍に特異的と考えられる ALP は検出されなかった. しかし, ALP 産生骨肉腫細胞株においては, 培養上清中の ALP 値は腫瘍の生細胞数と, ノードマウス血清中の ALP 値は腫瘍の重量と, それぞれ密に関連することが今回の実験で判明した. このことは, 症例間で血清 ALP 値を比較することには問題があるにしても, ALP 産生骨肉腫患者個々では, 治療効果や再発, 転移のモニタリングとして血清 ALP 値が重要な腫瘍マーカーとなりえる可能性を示唆している. 血清 ALP 値を腫瘍マーカーとして, 臨床的に実際に応用するときには, なお幾つかの設定すべき条件があると思われるが, 今後この基礎成績をもとにそれらを明らかにしていきたい.

胎盤型 ALP を除いては, 一般に ALP は抗原性が低いため, これまで実用的なラジオイムノアッセイやエンザイムイムノアッセイのシステムが開発されてこなかった. したがって ALP は, 酵素蛋白そのものの量を測定するのではなく, 酵素活性を測定するという方法がとられてきた. この方法の弱点は, 酵素活性が十分でない蛋白が産生されるのか, あるいは蛋白そのものの産生が少ないのかと言う違いを識別できないことにある. ALP 無産生の骨肉腫細胞においても, 骨芽細胞の腫瘍化に伴って ALP の産生そのものが欠如するようになるのか, 蛋白合成過程に異常を生じ, 酵素活性を示さない蛋白しか作れなくなるのかこれがこれまで分からなかった. 今回の研究結果からは, ALP 無産生骨肉腫細胞には ALP の mRNA が検出されない, つまり, ALP の産生そのものが無いことが示された. 一方, DNA レベルでは, 無産生株にその異常がないことから ALP の無産生は遺伝子の転写調節因子の異常によって起きたことになる. しかし, 他の骨肉腫細胞²⁶⁾⁻²⁹⁾ 同様 NOS-1 にも ALP を誘導する 1,25(OH)₂D₃ をもってしても, また他の種類の細胞において ALP を誘導することが知られている hyperosmolarity³⁰⁾³¹⁾, NaBt³¹⁾³²⁾, dbc AMP³¹⁾³³⁾ などをもってしても, 無産生株 KSU に ALP を誘導することはできなかった. このことは ALP の発現調節機構が単純ではないことを意味する.

さて, ALP 産生骨肉腫においては, ALP は腫瘍マーカーとして採用できることを前に論じた. しかし MTX

を用いた基礎実験では、細胞数の減少に一致して ALP の総活性も減少するのではなく、培養上清中に検出される ALP の活性は、むしろ一時的に増加することが分かった。この現象は、抗腫瘍剤による細胞破壊のために逸脱した ALP が培養上清中に増えてくるためだけでなく、細胞中の ALP 活性も高まっていること、MTX 処理後一時的に ALP の mRNA の量も増えていることなどから、ALP 蛋白の産生促進が主因であると考えられる。MTX が絨毛癌の耐熱性 ALP の活性を誘導することが既に報告されているが³⁴⁾、そのことも今回の場合と同じ理由によって起こるとすれば、異なる遺伝子支配を受ける 2 種の ALP の発現が同一の要素によって影響を受けていることになる。しかし MTX によってさえ、無産生株 KSU が ALP 産生に転ずることはなく、無産生の原因の詳細を解く鍵も未知のままである。今回の成績は、血清 ALP を用いて臨床的に MTX の効果を判定するときには、投与終了後少なくとも数日以上の間隔を置いて実施すべきであることを示している。

ALP 活性は、電顕的に細胞内小器官には検出されず、細胞膜に至って初めて検出された。さらに細胞突起からちぎれて細片化してゆく matrix vesicle 様構造にも認められた。この所見は、全く同じ方法で検索された他の種類の細胞においては細胞内小器官から活性が検出される³¹⁾ ことと明らかに異なる。骨肉腫細胞における ALP の存在意義は、それが細胞表面から細胞外にあること、つまり細胞外分泌蛋白として重要であることが示唆される。一方、既報⁷⁾のごとく、ヌードマウス移植腫瘍においては、NOS-1 のみ骨を作り、NOS-2 では類骨は見られるが骨形成はなく、KSU では類骨形成も僅かである。この差異を最も良く説明しえる in vitro での特徴は各細胞の細胞外膠原線維形成能の差であった。NOS-2 が NOS-1 の約 1/3 の ALP 活性を有するにもかかわらず全く骨形成を示さないことは、ALP 活性と骨形成能とが完全に平行な関係にあるわけではないことを意味する。正常骨組織においては、骨芽細胞によって産生される ALP は matrix vesicle 中に蓄積され、細胞外に放出される。この ALP は、おそらくは無機燐の輸送に関わり、石灰化の初期過程において重要な役割を演じると考えられている²⁰⁾。培養細胞においても matrix vesicle に対応する構造が作られ、それが最も顕著な NOS-1 でヌードマウス移植腫瘍の骨形成能が高い。しかしながら、in vitro で多量の ALP を産生するのみならず豊富な細胞外膠原線維をも作り出し、さらに osteocalcin (bone γ -carboxyglutamic acid containing

protein: BGP) をも産生しうるこの NOS-1 でさえ、その in vitro で骨化巢を作りえないということは、骨化にはこれらの蛋白以外に何か必要不可欠な他の物質があることを示唆する。この物質が同定された時に初めて骨化における ALP の役割の全貌が明らかになると思われる。

IV. 結 語

1. ヒト骨肉腫培養細胞株、NOS-1、NOS-2 が産生する ALP は、通常の骨型 ALP であり、骨肉腫に特異的とみなしうる variant は見い出せなかった。
2. 骨肉腫患者において、異なる症例間で血清 ALP を単純に比較することはできないが、ALP 産生骨肉腫を持つ患者の個々の症例においては血清 ALP は腫瘍の大きさや腫瘍細胞数を反映し、臨床的モニタリングのマーカーとなりえることが基礎的に示された。さらに、骨肉腫の治療に頻用される MTX が、一時的に骨肉腫細胞の ALP 産生を高めることを証明した。
3. ALP 活性を認めない骨肉腫細胞は、活性を欠く異常蛋白の産生や遺伝子そのものの欠損によって起るのではなく、ALP 遺伝子の発現機構の異常によって起こり、蛋白そのものの産生がないことが示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました新潟大学医学部整形外科教室高橋栄明教授ならびに第一病理学教室渡辺英伸教授に深謝致します。また、骨腫瘍に対する学問的興味を目覚めさせて下さった田島達也整形外科教室名誉教授、附属病院手術部斎藤英彦助教授、核酸分析に御助言賜った脳研究所神経病理部門熊西敏郎教授に御礼申し上げます。そして、本研究において終始直接御指導、御教示いただいた第一病理学教室本山梯一助教授に心より謝意を表します。さらに KSU 細胞を分与して下さいました、東京大学医科学研究所関口守正教授と東京慈恵会医科大学浅沼和生博士に感謝致します。最後に、種々御協力いただいた第一病理学教室の技術員の方々に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Robison, R.: The possible significance of hexophosphoric esters in ossification, *Biochem. J.*, 17: 286~293, 1923.
- 2) Jee, W.S.S.: The skeletal tissue. in Weiss, L.

- ed. Cell and tissue biology. A text book of histology, 6th ed. Urban and Schwarzenberg Pub., Baltimore, 1988: 211~254.
- 3) **Dahlin, D.C.**: Bone tumors, 4th ed., Thomas, Springfield, Illinois, 1986.
 - 4) **Mckenna, R., Schwinn, C., Soonk, K. and Higinbotham, N.**: Sarcomata of the osteogenic series (osteosarcoma, fibrosarcoma, chondrosarcoma, parosteal osteogenic sarcoma, and sarcomata arising in abnormal bone, J. Bone Joint Surg., 48: 1~25, 1966.
 - 5) **Levine A.M. and Rosenberg, S.A.**: Alkaline phosphatase levels in osteosarcoma tissue are related to prognosis, Cancer, 44: 2291~2293, 1979.
 - 6) **Yoshikawa, H., Takaoka, K., Hamada, H. and Ono, K.**: Clinical significance of bone morphogenetic activity in osteosarcoma: A study of 20 cases, Cancer, 56: 1682~1687, 1985.
 - 7) **Hotta, T., Motoyama, T. and Watanabe, H.**: Three human osteosarcoma cell lines exhibiting different phenotypic expressions, Acta Pathol. Jpn., 42: (in press).
 - 8) **浅沼和生**: ヒト骨肉腫の異種移植と細胞培養—マウス可移植性株及び培養細胞株(NY株, KSU株)について— 関東整災誌, 17: 441~449, 1986.
 - 9) **Burstone, M.S.**: Histological comparison of naphthol AS-phosphates for the demonstration of phosphatases, J. Natl. Cancer Inst., 20: 601~615, 1958.
 - 10) **Mayahara, H., Hirano, H., Saito, T. and Ogawa, K.**: The new lead citrate method for the urtracytochemical demonstration of activity of non-specific alkaline phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolase), Histochemie, 11: 88~96, 1967.
 - 11) **Posen, S., Neale, F.C. and Clubb, J.S.**: Heat inactivation in the study of human alkaline phosphatases, Ann. Int. Med., 62: 1234~1243, 1965.
 - 12) **Watanabe, K. and Fishman, W.H.**: Application of the stereospecific inhibitor L-phenylalanine to the enzymorphology of intestinal alkaline phosphatase, J. Histochem. Cytochem., 12: 252~260, 1964.
 - 13) **村松正實**, 編: ラボマニュアル遺伝子工学, 丸善, 東京: 1990.
 - 14) **Southern, E.M.**: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J. Mol. Biol., 98: 503~517, 1975.
 - 15) **Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.**: Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.
 - 16) **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, Proc. Natl. Acad. Sci., 83: 7182~7186, 1986.
 - 17) **Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.**: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, Anal. Biochem., 132: 6~13, 1983.
 - 18) **真角昭吾**: Alkaline phosphatase と isozyme. 整形外科, 7: 649~661, 1977.
 - 19) **Fraser, D.**: Hypophosphatasia, Am. J. Med., 22: 730~746, 1957.
 - 20) **Posner, A.S.**: Bone and mineralization process. In Peck W.A., ed. Bone and Mineral Research, Vol. 5. Elsevier Sci Pub, Amsterdam, 1987: 65~116.
 - 21) **Majeska, R.J. and Rodan, G.A.**: The effect of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on alkaline phosphatase in osteoblastic osteosarcoma cells, J. Biol. Chem., 257: 3362~3365, 1982.
 - 22) **Caplan, A.I., Syftestad, G. and OSdoby, P.**: The development of embryonic bone and cartilage in tissue culture, Clin. Orthop., 174: 243~263, 1983.
 - 23) **Rodan, G.A. and Rodan, S.B.**: Expression of the osteoblastic phenotype. In Peck, W., A. ed. Bone and Mineral Research, Vol. 2, Elsevier Sci Pub, Amsterdam, 1983: 244~285.
 - 24) **Woodard, H.Q. and Higinbotham, N.L.**: The correlation between serum phosphatase and roentgenographic type in bone disease, Am. J. Cancer, 31: 221~237, 1937.

- 25) **Ohno, T., Abe, M., Tateishi, A., Kako, K., Miki, H., Sekine, K., Ueyama, H., Hasegawa, O. and Obara, K.:** Osteogenic sarcoma. A study of one hundred and thirty cases, *J. Bone Joint Surg.*, **57-A**: 397~405, 1975.
- 26) **Mulkins, M.A., Manolagas, S.C., Deftos, L.J. and Sussman, H.H.:** 1,25-dihydroxyvitamine D₃ increases bone alkaline phosphatase levels in human osteogenic sarcoma cells, *J. Biol. Chem.*, **258**: 6219~6225, 1983.
- 27) **Kyeyune, Nyombi, E., Williamlau, K.H., Baylink, D.J. and Strong, D.D.:** Stimulation of cellular alkaline phosphatase activity and its messenger RNA level in a human osteosarcoma cell line by 1,25-dihydroxyvitamine D₃, *Arch. Biochem. Biophys.*, **275**: 363~370, 1989.
- 28) **Franceschi, R.T. and Young, J.:** Regulation of alkaline phosphatase by 1,25-dihydroxyvitamine D₃ and ascorbic acid in bone-derived cells, *J. Bone Min. Res.*, **5**: 1157~1166, 1990.
- 29) **Kawai, A.:** A newly established human osteosarcoma cell line with osteoblastic properties, *Clin. Orthop.*, **259**: 256~267, 1990.
- 30) **Fishman, W.H. and Singer, R.M.:** Placental alkaline phosphatase: Regulation of expression in cancer cells, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **259**: 261~272, 1975.
- 31) **Aizawa, K., Motoyama, T. and Watanabe, H.:** Placental alkaline phosphatase-like isoenzymes produced by human gastric cancer cells, *Acta Pathol. Jpn.*, **39**: 630~637, 1989.
- 32) **Cho, J.Y.:** Regulation of the induction of alkaline phosphatase in choriocarcinoma cells by sodium butyrate. *In Vitro*, **15**: 789~795, 1979.
- 33) **Griffin, M.J., Price, G.H., Bazzell, K.L., Cox, R.P. and Ghosh, N.K.:** A study of adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate, sodium butyrate and cortisol as inducers of Hela alkaline phosphatase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**: 619~623, 1974.
- 34) **Speeg, Jr. K.V., Azizkhan, J.C. and Stromberg, K.:** The stimulation by methotrexate of human chorionic gonadotropin and placental alkaline phosphatases in cultured choriocarcinoma cells, *Cancer Res.*, **36**: 4570~4576, 1976.

(平成4年2月29日受付)