

（倫理面への配慮）

遺伝子解析に関する本研究は、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会に従って実施し、インフォームドコンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言に基づいて行った。

C. 研究結果

1. 人の胎盤に発現する CYP1A1

人の胎盤では、CYP1A1 は検出されたが、その発現は低く、検出できない個体もあった。また、蓄積するダイオキシン類との相関性は得られなかった。マイクロアレイなどについては、現在解析中である。

2. 人生活圏の複合汚染下でのバイオマーカー

人生活圏に密着して棲息するドブネズミからは高濃度の残留性有機汚染物質が検出された。特に、ドブネズミの肝臓におけるダイオキシン類は、1300～21,000pg-TEQ/g(lipid)の範囲で蓄積してした。非汚染域の対照用としたラットは16～23pg-TEQ/g(lipid)と低かった。有機塩素系農薬は、その殆どを DDT が占めた。

また、今回の分析により、ドブネズミの肝臓では新規 POPs であるポリ臭素化ジフェニルエーテルの濃度が高いことが分かった。

3. 複合汚染下でのバイオマーカー

肝臓に発現する遺伝子群では、CYP 分子種は棲息域によって以下のような発現レベルの違いを示した。下記の表に、マイクロアレイに搭載されている遺伝子で有意に変化があったもののうち肝臓での異物代謝酵素の遺伝子発現の変動を示した。表内の()の数字は実験室ラットと比較した発現量比を示した。また、表において“—”は実験室ラ

ットの発現量と比較して有意に変化がなかったが、参考までに記載した。

		Landfill	Tokyo	Osaka
CYP1	CYP1A1	↑(×3.7)	↑(×26.0)	↑(×17.1)
	CYP1A2	↑(×2.1)	↑(×1.9)	↑(×1.6)
CYP2	CYP2A1	-	-	-
	CYP2A3	-	-	-
	CYP2B15	↓(×0.1)	↓(×0.3)	↓(×0.1)
	CYP2E1	-	-	-
CYP3	CYP3A	-	↓(×0.8)	↓(×0.4)
CYP4	CYP4F	↓(×0.3)	↓(×0.2)	↓(×0.4)
CYP7	CYP7B1	↑(×19.7)	-	-
CYP8	CYP8B1	↑(×3.2)	-	-

上の表に示すように、多くの CYP 分子種の中でも、汚染亢進域で唯一共通して発現増加を示したのは CYP1A1 および CYP1A2 のみであった。

一方、重金属や活性酸素種などによって発現が上昇するいわゆるストレスタンパク質の遺伝子群は、複合汚染下のラットにおいて、酸化ストレスなどで発現が上昇する熱ショックタンパク質(HSP)やヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)に増加が見られた。抗酸化酵素(スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、カタラーゼ(Catalase)、グルタチオンパーオ

		Landfill	Tokyo	Osaka
HSP	HSP60	—	—	—
	HSP70	↑(×1.6)	↓(×0.7)	↑(×1.6)
	HSP90	↑(×1.3)	↓(×0.7)	—
HO-1		↑(×3.7)	↑(×3.2)	↑(×8.0)
metallothionein	MT-1	↑(×3.0)	↑(×3.5)	↑(×3.7)
	MT-2	↑(×5.7)	↑(×7.5)	↑(×8.6)
NQO1		↑(×3.2)	↑(×3.0)	↑(×3.5)
SOD		—	—	—
Catalase		—	—	—
GPx		—	—	—

キシダーゼ(GPx) 以外はいずれも発現が上昇していることが明らかとなった。

D. 考察

今回、胎盤における CYP1A1 の発現は非常に低かった。通常、胎盤では、CYP11 や CYP19 の発現が認められるが、CYP 発現量は胎児の肝臓に比べてさらに低い。さらに、dexamethasone や PCN の妊娠ラットへの

投与では、胎盤における CYP3A1 発現は低く、この CYP に関しては胎盤では誘導能がほとんどないことが分かっている。また smoking による CYP2B サブファミリーの誘導も、ラットおよびヒトの胎盤においては認められていない。CYP 以外のバイオマーカーとして、smoking などによって発現する遺伝子がどのように変動するのか、そのプロファイルは現在解析中である。

一方、人の複合汚染のモデル動物を用いた今回の結果では、環境化学物質に曝露されている野生ドブネズミ個体の全ての試料において CYP1A1 や、これらの P450 分子種と同じく AhR で発現調節される NQO1 の発現増加が確認され、これらの遺伝子の発現の増加がダイオキシンなど汚染物質への曝露によるものであることが示唆された。また、本研究では、CYP1A サブファミリーの他、NQO1 や、さらに、活性酸素や重金属への曝露によって発現が上昇する HO-1 や metallothionein の発現も増加し、人の生活圏において、重金属への曝露による可能性が考えられた。

E. 結論

人の胎盤においても CYP1A1 の発現は非常に低い。また、複合汚染下では肝臓における遺伝子プロファイルの分析は環境汚染を反映していることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nahla A.G. Ahmed Refat, Zein Shaban Ibrahim, Gihan Gamal Moustafa, Kentaro Q Sakamoto, Mayumi Ishizuka, and Shoichi Fujita.

The Induction of Cytochrome P450 1A1 by Sudan Dyes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* (in press)

2) Sasaki N, Sakai N, Ikenaka Y, Kamiya T, Heewon M, Sakamoto K, Ishizuka M, Fujita S. Antibiotic Furazolidone Induces CYP1A But Not CYP2E1 Subfamily in Rat Liver. *The Journal of Veterinary Medical Science* (in press)

3) Moustafa GG, Ibrahim ZS, Hashimoto Y, Alkelch AM, Sakamoto KQ, Ishizuka M, Fujita S. Testicular toxicity of profenofos in matured male rats. *Arch Toxicol.* 81(12):875-81(2007)

4) Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Di-(2-ethylhexyl)phthalate suppresses tamoxifen-induced apoptosis in GH3 pituitary cells. *Arch. Toxicol.* 81:27-33 (2007)

5) Ban S, Kondo T, Ishizuka M, Sasaki S, Konishi K, Washino N, Fujita S, Kishi R. Using Microarray Analysis to Evaluate Genetic Polymorphisms Involved in the Metabolism of Environmental Chemicals. *Fukuoka Acta Medica* 89; 208-214 (2007).

6) Ishizuka M, Nagai S, Sakamoto KQ, Fujita S. Plasma pharmacokinetics and CYP3A12-dependent metabolism of c-kit inhibitor imatinib in dogs. *Xenobiotica.* May;37(5):503-13(2007).

2. 学会発表

- 1) Fujita S, Sakamoto M, Ishizuka M. Environmental impact of persistent toxic substances on wildlife 第13回毒性評価国際シンポジウム（2007）
- 2) N. Sakai, K. Q Sakamoto, M. Ishizuka, S. Fujita Mechanism of low expression of CYP2D2 mRNA in Dark Agouti rats International Congress of Toxicology（2007）
- 3) Mayumi ISHIZUKA Environmental impact of toxic substances on wildlife 韓国毒性学会（2007）
- 4) 川合佑典、石塚真由美、山本秀明、坂本健太郎、藤田正一 野生動物の CYP1A サブファミリーの種差とキャラクターライゼーション 第34回日本トキシコロジー学会学術年会（2007）
- 5) 田中和之、谷川 力、石塚真由美、坂本健太郎、藤田正一 ワルファリン耐性ドブネズミ及びクマネズミにおける新規耐性機構の解明 第34回日本トキシコロジー学会学術年会（2007）
- 6) Sobhy Wageh、石塚真由美、Zein Shaban Ibrahim、坂本健太郎、藤田正一 Characterization of cytochrome P450 1A in Ungulates 第144回日本獣医学会（2007）
- 7) 田中和之、谷川 力、石塚真由美、坂本健太郎、藤田正一 青森由来ワルファリン耐性ドブネズミにおける耐性機構の解明 第143回日本獣医学会（2007）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

新生児に対するフタル酸エステルの曝露に関する検討

分担研究者 水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科 生殖発達医学講座産科・生殖医学分野教授

要旨

【目的】

フタル酸エステル（主にフタル酸ジ-2-エチルヘキシル（DEHP））は、塩化ビニル樹脂（PVC）を中心としたプラスチックに柔軟性を与える可塑剤である。近年、医療器具より溶出したフタル酸エステルが人体に影響をおよぼす可能性が指摘されている。今回我々は、新生児に対するフタル酸エステルの曝露を評価するため後方視的検討を行った。

【対象】

2001年から2005年の5年間に当院NICUに入院した児のうち、妊娠35週未満で出生し、出生時から生後1か月まで栄養チューブを必要とした62名を対象とした。

【方法】

塩化ビニル製栄養チューブを使用していた2003年4月以前の児A群：39名、それ以降のPVCフリーの栄養チューブを使用していた児B群：23名に分け、臍帯血、生後1か月の凍結保存血清を用い、GC-MSによりDEHPの代謝産物であるフタル酸モノ-2-エチルヘキシル（MEHP）濃度を測定した。Mann-WhitneyのU検定、Fisherの直接法を用いてA群とB群間でMEHP濃度、臨床的背景を比較した。また線形回帰解析を用いて生年月日とMEHP濃度の関係、Wilcoxonの符合付順位検定を用いて臍帯血と生後1か月のMEHP濃度の関係を検討した。最後に多因子解析を用いて生後1か月MEHP濃度に影響する因子の選択を行った。p<0.05を有意とした。

【まとめ】

1. 検査した全ての児においてMEHPが検出された。2. 臍帯血MEHP濃度は経年的に低下していた。3. B群で経産婦の割合が有意に高かったが、初産婦と経産婦との間で臍帯血MEHP濃度に差はなかった。4. 臍帯血MEHP濃度に比べ生後1か月MEHP濃度は高かった。（0.012 vs 0.135 μ g/ml）（中央値）5. 母乳栄養児では、非母乳栄養児にくらべ生後1か月MEHP濃度が高かったが、2群間で母乳栄養児の割合に差はなかった。6. 塩化ビニル製の栄養チューブを使用していた児は、PVCフリーチューブを使用していた児に比べ生後1か月MEHP濃度が高値であった。（0.185 vs 0.079 μ g/ml）7. 多因子解析の結果、生後1か月MEHP濃度に影響する因子として、栄養チューブの種類が選択された。

【研究協力者】

長 和俊、小西祥平

北海道大学病院周産母子センター

岸 玲子

北海道大学大学院医学系研究科公衆衛生学

那須民江、伊藤由起

名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学

A. 研究目的

フタル酸エステルは、主に塩化ビニル樹脂（PVC：ポリビニルクロライド）を中心としたプラスチックの柔軟性を与える可塑剤として使用されており、その柔軟性、透明性、熱接着性など多くの優れた特性を持つため、様々なものに使用されている。用途として電線被覆材、壁紙、玩具、家具などの他、医療

器具では点滴や輸血用のバック、経鼻栄養チューブなどに使用されている。しかし、近年そのフタル酸エステルの人体への曝露による影響が懸念されている。曝露経路としては、移行、揮散、溶出により人体に曝露し、栄養チューブに関しては、熱を加える、チューブ内に脂質や血液を通すなどの条件によりフタル酸エステルがチューブ内に溶出すると報告されている。新生児領域では、経口哺乳ができない新生児に栄養チューブを使用するが、そこへ温めた母乳あるいは人工乳を注入することによりフタル酸エステルが溶出し、新生児に曝露する可能性が示唆される。

日本では、フタル酸エステルが含まれる医療用具の使用についての指導・規制が、2002年に厚生労働省より出された。そのため当院NICUでは、2003年4月を境に塩化ビニル製の栄養チューブからPVCフリーの栄養チューブに変更した。そこで今回我々は、PVCフリーの栄養チューブ使用前後で、新生児に対するフタル酸エステルの曝露量を後方視的に検討した。

B. 対象

2001年から2005年までの5年間に当院NICUに入院した児1613名のうち、妊娠35週未満で出生した265名を対象に、出生時から生後1ヵ月まで持続的に経鼻あるいは経口より栄養チューブを必要とした児62名で検討した。なお生後1ヵ月までに輸血を行った児および消化管手術を行った児は除外した。

C. 研究方法

2003年4月以前に塩化ビニル製の栄養チューブを使用していた児をA群（n=39）、それ以降PVCフリーの栄養チューブを使用していた児をB群（n=23）に分け、臍帯血および生後1か月の凍結保存血清を用いて、フ

タル酸ジエチルヘキシル（DEHP）の代謝物であるフタル酸モノ 2 エチルヘキシル（MEHP）濃度を測定し比較検討した。

検査は名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学のご協力で、GC-MS6890/5973N（Agilent technologies社製）を用いた。測定条件は以下の通りであった。

HP-5MS 5%phenyl methyl siloxane キャピラリーカラム（長さ 30m×内径 0.25mm×膜厚 0.25 μ m）キャリアーガス：高純度ヘリウム、初期流量 1ml/分、注入 1min-split、カラム温度 80 $^{\circ}$ C 2分→20 $^{\circ}$ C/分→260 $^{\circ}$ C 5分、注入口 Split ratio 50:1、スプリットレス、SIM mode

検体は血清 60 μ l を用い、酢酸エチルによる抽出およびシリル化誘導を行い GC/MS にて特定のイオンのみを拾う SIM モードで測定した。内部標準液として MEHP を重水素置換体したものを用いた。

（倫理面への配慮）

本研究は北海道大学大学院医学研究科の倫理委員会にて承認を得た。

D. 統計学的方法

A,B の 2 群間比較、および母乳と MEHP 濃度の関係の検討には Mann-Whitney の U 検定を用いた。また線形回帰解析を用いて生年月日と MEHP 濃度の関係を検討し、Wilcoxon の符合付順位和検定を用いて臍帯血と生後1か月の MEHP 濃度の関係を検討した。生後1か月の MEHP 濃度に影響する因子は、重回帰解析を行い検討した。なお、 $p<0.05$ を有意とした。

E. 結果

臨床的背景では、妊娠週数、出生体重等で A 群、B 群間に有意差を認めなかったが、唯

一母体の分娩既往において、B群で経産婦が多く有意差を認めた。（表1-1、表1-2）

MEHP濃度の比較では、臍帯血および生後1か月で、A群がB群に比べ高く有意差を認めた。（表2）

臍帯血のMEHP濃度の経年的変化を、縦軸にMEHP濃度、横軸に生年月日を取り検討した。結果、臍帯血および生後1か月のMEHP濃度で、有意な経年的減少を認めた。しかしA群、B群に分け、同様に回帰解析を行った結果、有意な減少は認めなかった。（図1-1、図1-2）

臍帯血と生後1か月のMEHP濃度の関係を検討した結果、臍帯血に比べ生後1か月のMEHP濃度は高く、有意差を認めた。（図2-1）また、A群、B群に分け同様に検定を行い、両群とも有意差を認めたが、明らかにA群はB群に比べ生後1か月のMEHP濃度が高く検出された。（図2-2）

最後にA、B群に関係なく、生後1か月のMEHP濃度と母乳栄養との関係性を評価した。結果、人工栄養に比べ母乳を使用していた児では、MEHP濃度は高く有意差を認めた。（図3）

以上の結果をもとに、生後1か月のMEHP濃度に影響する因子を評価するため重回帰解析を行った。結果、塩化ビニル製チューブの使用の有無のみが、MEHP濃度に影響を与える因子として抽出された。

F. 考案

今回の結果を整理し、その結果から考えられることを以下にまとめた。

1. 検査した全ての児においてMEHPが検出された。

児は胎児期から出生後少なくとも生後1か月の間、フタル酸エステルに曝露されていることになる。つまり、胎児期は経胎盤的に、

出生後は環境因子によりフタル酸エステルに曝露され続けていると考えられる。

2. 臍帯血および生後1か月のMEHP濃度は、A群がB群に比べ高かった。

2群間で経産の有無に有意差を認めた以外に臨床的背景に差を認めなかった。臍帯血における両群間の差は次の経年的変化を反映しているものと考えられた。

3. 臍帯血および生後1か月のMEHP濃度で、有意な経年的減少を認めた。

臍帯血に関しては、環境中のフタル酸エステルによる母体への曝露が経年的に減少している可能性が挙げられる。

生後1か月のMEHP濃度に関しては、何らかの環境因子の変化により、出生後のフタル酸エステル曝露が、減少したのと考えられる。今回の研究を行った5年間でのNICUの環境変化として、栄養チューブをPVCフリーチューブに変更したことがあり、原因として考えられた。すなわち、A群がB群に比べMEHP濃度が高いことを反映した結果と考えられた。

4. 母乳を使用している児のほうが有意に生後1か月のMEHP濃度は高値であった。

母体へのフタル酸エステルの曝露が、母乳を介して児に移行したと考えられる。文献でも、母乳あるいは人工ミルクからフタル酸が検出されているとの報告がある。人工ミルクより母乳で高いということは、母体へのフタル酸エステル曝露が多かったことが示唆される。

5. 臍帯血のMEHP濃度に比べ生後1か月のMEHP濃度は高値であった。

A群、B群とも環境因子や医療器具、栄養

からの曝露が考えられるが、塩化ビニル製の栄養チューブを使用していた A 群は、PVC フリーチューブを使用していた B 群に比べ生後 1 か月の MEHP 濃度が高値であったこと、また多因子解析の結果、生後 1 か月の MEHP 濃度に影響する因子として、栄養チューブの種類が選択されたことより、塩化ビニル製の栄養チューブからフタル酸エステルが溶出し、新生児に曝露していたと考えられる。

今回の結果より、栄養チューブを PVC フリーに変更することにより新生児へのフタル酸エステルの曝露がなくなるわけではないが、暴露量を減らすことが証明された。現在もフタル酸エステル含有の栄養チューブを新生児に使用している施設はあるが、児の将来のことを懸念するのであれば、PVC フリーチューブに変更すべきではないのだろうか。

現在使用されている PVC フリーチューブは、塩化ビニル性ではなくポリブタジエンやポリエチレンなどを材質としている。また non-DEHP チューブは塩化ビニル製であるが、可塑剤は DEHP を使用せず、主に TOTM（トリメット酸トリ-2-エチルヘキシル）が使用されている。このように代替品を用いることにより新生児に対し過量のフタル酸エステル曝露を回避することが可能であると考えられる。

G. 健康危険情報

特になし

H. 研究発表

- 1) 第 43 回 日本周産期・新生児医学会学術集会 平成 19 年 7 月 8 日

I. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

母親の機能性カテコール-Oメチル転移酵素遺伝子多型と胎児発育遅延

分担研究者 岸 玲子 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野

分担研究者 佐田 文宏 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野

研究要旨

子宮内胎児発育遅延（IUGR）の細胞・分子レベルの病態生理学的過程の多くは不明である。カテコール-Oメチル転移酵素（COMT）は、メチル基を転移することにより、カテコールエストロゲンを不活化する。COMT遺伝子には、158番目のコドンのバリン（Val）がメチオニン（Met）に置換する一塩基多型があり、機能変化を伴うことが知られており、この多型と胎児の成長との間に関連があるかを明らかにするため、本研究を行った。

2001～2005年に北海道大学病院で単胎児を出産し、本研究に参加することに同意の得られた女性412名を対象とした。対象者の末梢血白血球よりDNAを抽出し、allelic discrimination assayによってCOMT遺伝子Val158Met多型の遺伝子型を判定した。この多型と低出生体重（LBW, 2,500g未満）とIUGR（10パーセントイル未満/−1.5標準偏差（SD）未満）との関連をロジスティック回帰分析により解析し、出生体重との関連を重回帰分析により解析した。

低活性アリル（COMT-L）をホモ接合（Met/Met）に持つ女性のLBWに対するオッズ比（OR）は、2.98、95%信頼区間（CI）は1.10-8.11、IUGRに対するORは、2.63/2.57、95%CIは1.14-6.05/0.96-6.88であり、出生体重とも負の関連傾向がみられた。

COMT遺伝子の低活性アリルは、IUGRを引き起こす重要な要因と推測された。

【研究協力者】

鈴木佳奈、西條泰明、

北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野

水上 尚典、山田秀人

北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座産科・生殖医学分野

山田 俊

北海道大学病院周産母子センター

児期の非顕性の神経発達の遅延、成人期の生活習慣病、メタボリックシンドロームとの関連も報告されている（1）。

IUGRの細胞・分子レベルの病態生理学的過程の多くは不明である。異物代謝酵素遺伝子のCYP1A1遺伝子変異型、GSTT1遺伝子欠損型は、出生時体重に母親の喫煙との交互作用を及ぼし、低出生体重のリスクを上昇させ（2）、インスリン様増殖因子1型遺伝子（IGF-I）のプロモーター領域のマイクロサテライト多型の変異型は、低出生体重との関連が報告されている（3）。筆者らは、ステロイド代謝酵素CYP17遺伝子野生型は、IUGRのリスクを上昇させることを報告した（4）。

カテコール-Oメチル転移酵素（COMT）は、メチル基を転移することにより、カテコールエストロゲンを不活化する（5）。COMT遺伝子には、158

A. 研究目的

子宮内胎児発育遅延（IUGR）は、妊娠初期には、主に遺伝的にコントロールされているが、中～後期にかけては、母親の環境要因に大きな影響を受け、総じて、遺伝素因と環境要因との交互作用によって発生すると考えられている。IUGRは、周産期疾患と密接な関連があり、小

番目のコドンのバリン (Val) がメチオニン (Met) に置換する一塩基多型があり、変異型 Met アリルは、野生型 Val に比べ、3～4倍活性が低下することが知られている (6)。COMT 遺伝子機能性 Val158Met 多型と胎児の成長との間に関連があるかを明らかにするため、本研究を行った。

B. 研究方法

2001～2005年に北海道大学病院で単胎児を出産し、本研究に参加することに同意の得られた女性412名を対象とした (Table 1)。なお、自己免疫疾患、抗リン脂質症候群、先天性血栓傾向の既往のある者、妊娠糖尿病発症者、先天異常児出産者は除外した。対象者の末梢血白血球よりDNAを抽出し、allelic discrimination assayによってCOMT遺伝子Val158Met多型の遺伝子型を判定した。この多型と低出生体重 (LBW, 2,500g未満) とIUGR (10パーセントイル未満/−1.5標準偏差 (SD) 未満) との関連をロジスティック回帰分析により解析し、出生体重との関連を重回帰分析により解析した。統計解析には、ウィンドウズ版SPSS ver.13を用いた。

(倫理面への配慮)

疫学調査は北海道大学大学院医学研究科医学の倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会の倫理規定に従って実施し、インフォームドコンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「疫学研究に関する倫理指針」に基づいて行っている。研究への参加は自由意志により、自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮し、対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払っている。

C. 研究結果

低活性アリル (COMT-L) をホモ接合 (Met/Met) に持つ女性のLBWに対するオッズ比 (OR) は、2.98、95%信頼区間 (CI) は

1.10-8.11、IUGRに対するORは、2.63/2.57、95%CIは1.14-6.05/0.96-6.88であり、出生体重とも負の関連傾向がみられた (Tables 2, 3)。

D. 考察

妊婦のカテコールエストロゲンの血清濃度および尿中排出量は、妊娠開始とともに増加し、妊娠後期にプラトーに達することが知られている (7)。カテコールエストロゲンは非常に不安定な化合物で、酸化ストレスを生じる。LBWは酸化ストレスと関連があることが報告されている (8)。本研究より、COMT-Lをホモ接合に持つ妊婦では、カテコールエストロゲンを効率よく不活化できないため、IUGRが引き起こされることが示唆された。今後、このようなIUGRに感受性のある妊婦に対しては、ビタミンC、Eなどの抗酸化物質を投与することによって、LBW/IUGRを予防できないか検討することが必要である。

E. 結論

COMT遺伝子の低活性アリルは、IUGRを引き起こす重要な要因と推測された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1.論文発表

(1) Sata F, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Yamada T, Minakami H, Kishia R. Functional Maternal Catechol-O-methyltransferase polymorphism and fetal growth restriction, submitted

2.学会発表

(1) 佐田文宏, 鈴木佳奈, 西條泰明, 山田 俊, 山田秀人, 水上尚典, 岸 玲子: 母親の機能性カテコール-O-メチル転移酵素遺伝子

多型と児の出生体重, 第16回日本疫学会学術総会, 名古屋, 平成18年1月23-24日.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
該当なし

I. 参考文献

- (1) Luo ZC, Fraser WD, Julien P, Deal CL, Audibert F, Smith GN, Xiong X, Walker M. Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: Programming by oxidative stress? *Med Hypotheses* 2006; **66**:38-44.
- (2) Wang X, Zuckerman B, Pearson C, Kaufman G, Chen C, Wang G, Niu T, Wise PH, Bauchner H, Xu X. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA* 2002; **287**:195-202.
- (3) Vaessen N, Janssen JA, Heutink P, Hofman A, Lamberts SW, Oostra BA, Pols HA, van Duijn CM. Association between genetic variation in the gene for insulin-like growth factor-I and low birthweight. *Lancet* 2002; **359**:1036-1037.
- (4) Yamada H, Sata F, Kato EH, Saijo Y, Kataoka S, Morikawa M, Shimada S, Yamada T, Kishi R, Minakami H. A polymorphism in the CYP17 gene and intrauterine fetal growth restriction. *Mol Hum Reprod* 2004; **10**:49-53.
- (5) Yager JD, Liehr JG. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; **36**:203-232.
- (6) Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 1996; **6**:243-250.
- (7) Berg FD, Kuss E. Serum concentration and urinary excretion of "classical" estrogens, catecholestrogens and 2-methoxyestrogens in normal human pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 1992; **251**:17-27.
- (8) Scholl TO, Stein TP. Oxidant damage to DNA and pregnancy outcome. *J Matern Fetal Med* 2001; **10**:182-185.

Table 1 Characteristics of 412 mothers by infant birth weight

	Infant birth weight < 2,500 g (N = 103)		Infant birth weight ≥ 2,500 g (N = 309)		P value*
	Number	%	Number	%	
Age					
≤ 29 years	32	31.1	113	36.6	0.40
30–39 years	66	64.1	175	56.6	
≥ 40 years	5	4.9	21	6.8	
COMT genotype (Val158Met)					
Val/Val	46	44.7	145	46.9	0.03
Val/Met	40	38.8	140	45.3	
Met/Met	17	16.5	24	7.8	
Parity					
0	56	54.4	165	53.4	0.86
≥ 1	47	45.6	144	46.6	
Gestational age					
< 37 weeks	63	61.2	11	3.6	< 0.01
≥ 37 weeks	40	38.8	298	96.4	
Infant gender					
Male	47	45.6	177	57.3	0.04
Female	56	54.4	132	42.7	

*chi-square test

Table 2 Adjusted associations of maternal *COMT* Val158Met polymorphism with infant birth weight

	Logistic Regression*			Multiple Linear Regression*		
	Low Birth Weight (LBW)			Birth Weight, g		
	Number	LBW (%)	OR (95% CI) P value	B (SE)	β	P value
Val/Val	191	46 (24.1)	1.00	(reference)		
Val/Met	180	40 (22.2)	0.78 (0.40-1.56) 0.49	21.4 (38.0)	0.017	0.57
Met/Met	41	17 (41.5)	2.98 (1.10-8.11) 0.03	-111.9 (62.2)	-0.054	0.07

*Adjusted for maternal age, parity, gestational age and infant gender

Table 3 Adjusted associations of maternal *COMT* Val158Met polymorphism with IUGR using two different definitions (birth weight <10th percentile or < mean - 1.5 SD)

	Birth weight < 10th percentile			Birth weight < mean - 1.5 SD		
	IUGR (%)			IUGR (%)		
	Number	IUGR (%)	OR* (95% CI) P value	IUGR (%)	OR* (95% CI)	P value
Val/Val	191	27 (14.1)	1.00	17 (8.9)	1.00	
Val/Met	180	22 (12.2)	0.81 (0.43-1.53) 0.52	15 (8.3)	0.94 (0.44-1.99)	0.86
Met/Met	41	11 (26.8)	2.63 (1.14-6.05) 0.02	7 (17.1)	2.57 (0.96-6.88)	0.06

*Unconditional logistic regression analysis adjusted for maternal age, parity and infant gender

早産，低出生体重，子宮内発育遅延と IL-1A，IL-1B 遺伝子多型との関連

分担研究者 岸 玲子 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野
分担研究者 佐田 文宏 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野

研究要旨

早産や低出生体重は新生児疾患と関連する予防医学上重要な問題である。早産には免疫系の関与が大きく，早期陣痛の発来には，IL-1をはじめとするいくつかの炎症性サイトカインが関与していると考えられている。本研究では，母親の IL1A A114S(G340T)，IL1B -511C/T 遺伝子多型を解析し，早産，低出生体重，子宮内発育遅延との関連を調べた。単胎児を出産した母親 452 名を対象とし，末梢血白血球より DNA を抽出し，allelic discrimination assay によって IL1A A114S，及び IL1B -511C/T の遺伝子型を判定した。これらの多型と早産(PTB)，及び低出生体重(LBW)と子宮内発育遅延(IUGR)との関連をロジスティック回帰分析により解析した。IL1A A114S の多型については G/T，T/T 型のオッズ比が PTB との関連で 2.67，2.49，LBW との関連で 2.23，2.36 と，それぞれ上昇した。また，T/T 型のみ IUGR との関連で 2.88(10 パーセントイル)，4.55(-1.5SD)と，オッズ比が上昇した。IL1B -511C/T は PTB，LBW，IUGR とともにオッズ比の上昇は見られなかった。本研究の結果，IL1A A114S 遺伝子多型と早産，低出生体重，子宮内発育遅延との関連が示唆された。

【研究協力者】

西條泰明，戸屋真吾，鈴木佳奈
北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野
山田秀人
北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座産科・生殖医学分野
山田 俊
北海道大学病院周産母子センター

一塩基多型があり，活性，発現量が変化する可能性が考えられ，それに伴い，早産のリスクが変化することが予想される。

本研究では，母親の IL1A A114S，IL1B -511C/T 遺伝子多型を解析することにより，早産との関連を明らかにすることを目的とした。また，同時に低出生時体重，子宮内発育遅延との関連についても調べた。

B. 研究方法

2001～2005 年に北海道大学病院にて単胎児を出産し，本研究に同意の得られた 18～44 歳の女性の内，抗リン脂質抗体症候群，自己免疫疾患，先天性血栓性素因（プロテイン C,S 欠損症），妊娠糖尿病と糖尿病，奇形を除いた 452 名を対象とした。対象者の末梢血白血球より DNA を抽出し，allelic discrimination assay によって IL1A A114S，及び IL1B -511C/T の遺伝子型を判定した。これらの多型と早産

A. 研究目的

早産は週産期において予防医学上重要な問題であり，新生児のおよそ 10%が早産児であり，そのうちの 70-80%が新生児疾患と関連する(1)。

早産には免疫系の関与が大きく，原因の一つは早期陣痛の発来であり，IL-1をはじめとするいくつかの炎症性サイトカインが関与している(2)。

IL1A は A114S(G340T)，IL1B は -511C/T の

(PTB), 低出生体重(LBW), 子宮内発育遅延(IUGR)との関連をロジスティック回帰分析により解析した(SPSS ver 12.0J を使用).

PTB は在胎週数 37 週未満, LBW は出生体重 2500g 未満とし, IUGR は 10 パーセンタイル未満と, 平均体重-1.5SD 未満の二通りの定義について解析した.

(倫理面への配慮)

本研究は, 参加病院または代表研究機関の倫理委員会にて, 全て承認されている. 本研究のデータ保管は, 個人情報管理者を置き, 厳格な管理が行われ, 調査結果の公表に際しては, 個人名を公表したり, 個人を特定できる形にはせず, 妊婦のプライバシーは厳重に保護されている.

C. 研究結果

表 1 に基本的属性を示した. それぞれ早産との関連について, カイ二乗検定を行った. 出生体重($P<0.01$), IL1A A114S ($P=0.02$)が有意な結果となった.

表 2 では IL1AA114S, IL1B C-511T と PTB, LBW, IUGR についてロジスティック回帰分析を行った(年齢, 出産歴, 出産児の性別で調整).

IL1AA114S は G/T, T/T 型において, PTB(2.67, 2.49), LBW(2.23, 2.36)のオッズ比が上昇した. また, T/T 型のみ IUGR 2.88(10 パーセンタイル), 4.55(-1.5SD)のオッズ比が上昇した.

IL1B -511 は PTB, LBW, IUGR ともに有意な結果は得られなかった.

D. 考察

IL1A A114S については T アリルをホモまたはヘテロとして持つ場合, PTB, LBW のオッズ比がそれぞれ有意に上昇した.

この結果から, IL1A が 114S アリルを持つ場合, IL1A の活性または発現量が上昇し, 妊

娠時の早期陣痛の発生の可能性が高まり, 早産のリスク上昇に繋がったと考えられる. PTB リスクの増加に伴い, LBW も増加したと考えられ, T アリルとの関連が見られた. IUGR との関連については, T/T 型の場合のみ有意となった. G/T 型の場合には有意差はないので, G アリルをホモまたはヘテロとして持っていれば, IUGR のリスク増加を避けられると考えられる.

IL1B については, 先行研究において IL1B+3953 の多型と早産の関連について有意な相関が見出された報告がある(3). 本研究では IL1B-511 の遺伝子多型と PTB との有意差は見られなかった. この結果から, IL1B -511 アリルの変化だけでは, 早期陣痛発生に影響を与えるほどの発現量増加には繋がらないと考えられる. 培養細胞を用いた先行研究でも, -511T アリルは-511C に比べ, わずかに発現量が増加しただけであった(4).

E. 結論

先行研究では IL1A, IL1B と早産との関連については, いくつかの報告があるが, IL1A A114S または IL1B -511C/T の多型と早産の関連についての報告はなかった. 本研究では初めて IL1AA114S 多型と早産との関連が示唆され, また同時に, 低出生体重と子宮内発育遅延との関連についても有意差が見られた. 特に IL1A と IUGR との関連についてはほとんど報告されていないので, 今後詳細に検討する必要がある.

【参考文献】

- (1) Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N. Engl. J. Med.* 2000;342:1500-07.
- (2) Romero R, Brody DT, Oyarzun E, Mazor M, Wu YK, Hobbins JC, Durum SK. Infection and labor. III. Interleukin-1: a signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;160:1117-23

(3) Genc MR, Gerber S, Nesin M, Witkin SS.

Polymorphism in the interleukin-1 gene complex and spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2002 ;187:157-63.

(4) Santtila S, Savinainen K, Hurme M.

Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro. *Scand J Immunol.* 1998;47:195-8

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Shingo Toya, Fumihiko Sata, Kana Suzuki, Yasuaki Saijo, Takashi Yamada, Hideto Yamada, Hisanori Minakami, Reiko Kishi. Association of preterm birth, low birth weight and intrauterine growth restriction with IL1A A114S (G340T) and IL1B -511 polymorphisms. (submitted)

2. 学会発表

- (1) 戸屋真吾, 佐田文宏, 鈴木佳奈, 西條泰明, 山田 俊, 山田秀人, 水上尚典, 岸 玲子, 早産, 低出生体重とインターロイキン-1 遺伝子多型との関連, 第 76 回日本衛生学会 (2006.3.25-28)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

表 1. 基本的属性

	case(N=77)		control(N=375)		Pvalue*
	n	%	n	%	
年齢					
≤ 29	22	28.6	134	35.7	0.40
30-39	51	66.2	217	57.9	
≥ 40	4	5.2	24	6.4	
出生児の性別					
男	35	45.5	212	56.5	0.08
女	42	54.5	163	43.5	
出産歴					
無し	46	59.7	196	52.3	0.23
有り	31	40.3	179	47.7	
出生体重					
<2500g	66	85.7%	46	12.3%	<0.01
≥2500g	11	14.3%	329	87.7%	
<i>IL1A</i> A114S 遺伝子型					
G/G	51	68.0%	312	85.2%	0.02
G/T	18	24.0%	40	10.9%	
T/T	6	8.0%	14	3.8%	
<i>IL1B</i> -511 遺伝子型					
C/C	22	28.9%	97	26.6%	0.27
C/T	31	40.8%	183	50.3%	
T/T	23	30.3%	84	23.1%	

* カイ二乗検定

表 2. IL1AA114S, IL1B-511 の多型と 早産, 低出生時体重, 子宮内発育遅延との関連
(年齢, 出産歴, 出産児の性別で調整)

IL1A A114S

	N (合計)	PTB			LBW		
		n (%)	OR (95%CI)	P value	n (%)	OR (95%CI)	P value
G/G	363	51 (14.0)	1.00		82 (22.6)	1.00	
G/T	58	18 (31.0)	2.67 (1.42-5.04)	<0.01	24 (41.4)	2.23 (1.23-4.02)	0.01
T/T	20	6 (30.0)	2.49 (0.91-6.83)	0.08	8 (40.0)	2.36 (0.93-6.03)	0.07
G/T+T/T	78	24 (30.8)	2.62 (1.48-4.64)	0.01	32 (41.0)	2.26 (1.34-3.82)	0.02

	N (合計)	出生体重 < 10 パーセントイル			出生体重 < -1.5 SD		
		n (%)	OR (95%CI)	P value	n (%)	OR (95%CI)	P value
G/G	363	51 (14.0)	1.00		34 (9.3)	1.00	
G/T	58	9 (15.5)	1.19 (0.55-2.60)	0.67	4 (6.9)	0.74 (0.25-2.20)	0.59
T/T	20	6 (30.0)	2.88 (1.03-8.04)	0.04	6 (30.0)	4.55(1.61-12.91)	0.04
G/T+T/T	78	15 (19.2)	1.56 (0.81-2.98)	0.18	10 (12.8)	1.48 (0.69-3.18)	0.31

IL1B-511

	N (合計)	PTB			LBW		
		n (%)	OR (95%CI)	P value	n (%)	OR (95%CI)	P value
C/C	119	22 (18.5)	1.00		30 (25.2)	1.00	
C/T	214	31 (14.5)	0.73 (0.40-1.34)	0.31	50 (23.4)	0.83 (0.49-1.42)	0.50
T/T	107	23 (21.5)	1.14 (0.59-2.21)	0.70	37 (34.6)	1.45 (0.80-2.60)	0.22
G/T+T/T	321	54 (16.8)	0.86 (0.50-1.49)	0.59	87 (27.1)	1.02 (0.62-1.66)	0.95

	N (合計)	出生体重 < 10 パーセントイル			出生体重 < -1.5 SD		
		n (%)	OR (95%CI)	P value	n (%)	OR (95%CI)	P value
C/C	119	19 (16.0)	1.00		10 (8.4)	1.00	
C/T	214	27 (12.6)	0.74 (0.39-1.40)	0.35	21 (9.8)	1.19 (0.54-2.63)	0.67
T/T	107	18 (16.8)	1.04 (0.51-2.13)	0.92	12 (11.2)	1.44 (0.59-3.53)	0.42
G/T+T/T	321	45 (14.0)	0.83 (0.46-1.50)	0.54	33 (10.3)	1.28 (0.61-2.71)	0.52

習慣流産リスクと妊娠関連血漿蛋白A遺伝子多型

分担研究者 岸 玲子 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野

分担研究者 佐田 文宏 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野

研究要旨

妊娠初期に妊娠関連血漿蛋白A（PAPPA）の血清濃度が低いと胎児発育遅延や流産のリスクが高まることが報告されている。PAPPA 遺伝子にはアミノ酸置換(Ser1224Tyr)の C3671A 多型が知られているが、この多型と習慣流産との関連を検討した報告はない。本研究では、この PAPPA 遺伝子多型と習慣流産との関連をあきらかにすることを目的とした。北海道大学病院産科の不育症外来を受診した女性（n=215）を症例、産後外来を受診した健常経産婦（n=420）を対象とし、症例対照研究を行った。インフォームドコンセントを経て、採血を行い、白血球から DNA を抽出し、PAPPA 遺伝子 C3671A 多型を、リアルタイム PCR 法で解析し、習慣流産との関連を調べた。3671C アリルを持つ女性は習慣流産のリスクが高まる傾向がみられ、特に、少なくとも1回、妊娠9週以降に流産を経験するリスクは有意に上昇した(AA型に対するAC型のOR, 1.54; 95% CI, 0.95-2.49; CC型のOR, 2.83; 95% CI, 1.00-8.05; Ptrend, 0.02)。PAPPA 遺伝子 C3671A 多型は、ある種の習慣流産と関連があることが示唆された。今後、胎児の成長と関連があるインスリン様増殖因子を含めて検討が必要である。

【研究協力者】

西條泰明、鈴木佳奈

北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野

山田秀人、敦賀律子

北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座産科・生殖医学分野

A. 研究目的

妊婦の妊娠関連血漿蛋白A（PAPP-A）濃度は、妊娠経過とともに上昇する（1）。妊娠初期に血清 PAPP-A 濃度が低いと胎児発育遅延（IUGR）や流産のリスクが高まることが報告されている（2, 3）。PAPPA 遺伝子にはアミノ酸置換(Ser1224Tyr)の C3671A 多型が知られているが、この多型と習慣流産との関連を検討した報告はない。本研究では、この PAPPA 遺伝子多型と習慣流産との関連をあきらかにす

ることを目的とした。

B. 研究方法

北海道大学病院産科の不育症外来を受診した女性（n=215）を症例、産後外来を受診した健常経産婦（n=420）を対象とし、症例対照研究を行った（Table 1）。インフォームドコンセントを経て、採血を行い、白血球から DNA を抽出し、PAPPA 遺伝子 C3671A 多型を、リアルタイム PCR 法で解析し、習慣流産との関連をロジスティック回帰分析で解析した。統計解析には、ウィンドウズ版 SPSS ver.13 を用いた。

（倫理面への配慮）

疫学調査は北海道大学大学院医学研究科医の倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会の倫理規定に従って実施し、インフォームドコ

ンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「疫学研究に関する倫理指針」に基づいて行っている。研究への参加は自由意志により、自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮し、対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払っている。

C. 研究結果

3671C アリルを持つ女性は習慣流産のリスクが高まる傾向がみられた(AA型に対するAC型のOR, 1.17; 95% CI, 0.82-1.68; CC型のOR, 2.06; 95% CI, 0.87-4.90; *P*trend, 0.10) (Table 2)。特に、少なくとも1回、妊娠9週以降に流産を経験するリスクは有意に上昇した(AA型に対するAC型のOR, 1.54; 95% CI, 0.95-2.49; CC型のOR, 2.83; 95% CI, 1.00-8.05; *P*trend, 0.02) (Table 3)。

D. 考察

妊娠初期～中期にかけて、妊婦の血清PAPP-A濃度が低値を示す場合は、流産のリスクが上昇する(2-6)。血清PAPP-A濃度は、胎児が生存している時に流産を予知する最も鋭敏な指標であると報告されている(7)。最近、妊娠初期における母親の血清PAPP-A濃度の低値とIUGRとの関連も報告されている(2, 8-10)。

血清PAPP-A濃度が低値になると、胎盤や胎児の発達初期にインスリン様増殖因子2型(IGF-II)の取り込みが抑制される(11)。栄養膜や脱落膜のPAPP-Aに存在するPAPP-Aは、インスリン様増殖因子結合蛋白(IGFBP)の分解酵素であることが同定された(12)。このように、PAPP-AはIGFと密接に関連し、胎児の成長に大きな影響を及ぼすと考えられている。

PAPPA遺伝子にはアミノ酸置換(Ser1224Tyr)のC3671A多型があることが報告されている(13)。しかし、この多型の酵素活性や発現との関連は知られていない。本研究

により、ある種の習慣流産との関連が示唆されたので、今後、さらに胎児の成長に及ぼす影響を、IGFを含めて検討することが必要であると考えられる。

E. 結論

PAPPA遺伝子C3671A多型は、ある種の習慣流産と関連があることが示唆された。今後、胎児の成長と関連があるIGFを含めて検討が必要である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Suzuki K, Sata F, Yamada H, Saijo Y, Tsuruga N, Minakami H, Kishi R. Pregnancy-associated plasma protein-A polymorphism and the risk of recurrent pregnancy loss, submitted

2. 学会発表

- (1) 鈴木佳奈、佐田文宏、西條泰明、敦賀律子、山田秀人、水上尚典、岸玲子：「習慣流産リスクと妊娠関連血漿蛋白A遺伝子多型」、第75回日本衛生学会総会、新潟(2005.3.27-30)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

該当なし

I. 参考文献

- (1) Westergaard, J.G., Teisner, B., Grudzinskas, J.G., 1983. Serum PAPP-A in normal pregnancy: relationship to foetal and maternal characteristics. Arch. Gynecol., 233, 211-215

- (2) Kwik, M., Morris, J., 2003. Association between first trimester maternal serum pregnancy associated plasma protein-A and adverse pregnancy outcome. *Aust. NZ J. Obstet. Gynaecol.* 43, 438-442.
- (3) Goetzl, L., Krantz, D., Simpson, J.L., Silver, R.K., Zachary, J.M., Pergament, E., Platt, L.D., Mahoney, M.J., Wapner, R.J., 2004. Pregnancy-associated plasma protein A, free beta-hCG, nuchal translucency, and risk of pregnancy loss. *Obstet. Gynecol.*, 104, 30-36.
- (4) Westergaard, J.G., Sinosich, M.J., Bugge, M., Madsen, L.T., Teisner, B., Grudzinskas, J.G., 1983. Pregnancy-associated plasma protein A in the prediction of early pregnancy failure. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 145, 67-69.
- (5) Yaron, Y., Heifetz, S., Ochshorn, Y., Lehavi, O., Orr-Urtreger, A., 2002. Decreased first trimester PAPP-A is a predictor of adverse pregnancy outcome. *Prenat. Diagn.* 22, 778-782.
- (6) Santolaya-Forgas, J., De Leon, J.A., Cullen Hopkins, R., Castracane, V.D., Kauffman, R.P., Sifuentes, G.A., 2004. Low pregnancy-associated plasma protein-A at 10(+1) to 14(+6) weeks of gestation and a possible mechanism leading to miscarriage. *Fetal Diagn. Ther.* 19, 456-461.
- (7) Westergaard, J.G., Teisner, B., Sinosich, M.J., Madsen, L.T., Grudzinskas, J.G., 1985. Does ultrasound examination render biochemical tests obsolete in the prediction of early pregnancy failure? *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 92, 77-83.
- (8) Smith, G.C., Stenhouse, E.J., Crossley, J.A., Aitken, D.A., Cameron, A.D., Connor, J.M., 2002. Early-pregnancy origins of low birth weight. *Nature* 417, 916.
- (9) Smith, G.C., Stenhouse, E.J., Crossley, J.A., Aitken, D.A., Cameron, A.D., Connor, J.M., 2002. Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein a and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87,1762-1767.
- (10) Bersinger, N.A., Odegard, R.A., 2004. Second- and third-trimester serum levels of placental proteins in preeclampsia and small-for-gestational age pregnancies. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 83, 37-45.
- (11) Santolaya-Forgas, J., De Leon, J.A., Cullen Hopkins, R., Castracane, V.D., Kauffman, R.P., Sifuentes, G.A., 2004. Low pregnancy-associated plasma protein-A at 10(+1) to 14(+6) weeks of gestation and a possible mechanism leading to miscarriage. *Fetal Diagn. Ther.* 19, 456-461.
- (12) Giudice, L.C., Conover, C.A., Bale, L., Faessen, G.H., Ilg, K., Sun, I., Imani, B., Suen, L.F., Irwin, J.C., Christiansen, M., Overgaard, M.T., Oxvig, C., 2002. Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblasts and endometrial stroma: evidence for paracrine regulation of IGF-II bioavailability in the placental bed during human implantation. *J. Clin.*