

分担研究報告書

分担研究課題

母子手帳情報を用いた母娘の世代間研究

研究分担者 坂本なほ子 国立成育医療センター研究所成育疫学研究室長

研究要旨

妊娠時の健康状態と約 20～45 年後の女性の長期健康予後との関連を明らかにするため、平成 15 年から平成 17 年にかけて妊娠中に旧国立成育医療センター産科を受診し出産した妊婦のうち出生コホート研究（成育コホート）に参加し、平成 23 年 1 月末までに 5 歳児健診を受けた児の母親とその母親（児の祖母）について母子手帳から得られた情報を解析した。その結果、妊婦期に高血圧であった者（祖母）は現在も高血圧を持病としていた。また、妊婦期の収縮期血圧レベルが高い者は、低い者と比べて高血圧を持病とするオッズ比が 4.9、慢性疾患（糖尿病/高血圧/高脂血症/心疾患/脳血管関連）を持病とするオッズ比が 3.9 と高いことが明らかとなった。

研究協力者

荒田尚子（国立成育医療研究センター 母性医療診療部 代謝内分泌内科）

村島温子（国立成育医療研究センター 母性医療診療部 部長）

羊利敏（国立成育医療研究センター 成育疫学研究室）

A. 研究目的

妊娠というイベントは女性にとって、人生の負荷試験の時期と考えられる。妊娠中に妊娠高血圧症候群や子癇前症、妊娠糖尿病、早産、胎盤機能不全を合併すると将来において女性自身が高血圧、糖尿病を合併しやすく、延いては心血管疾患を発症しやすいことが海外では明らかにされつつある。一方、我が国では、これらを合併した女性の多くが産後放置され、加齢に伴い高血圧症、糖尿病、脂質代謝異常症を発症し、さらには心疾患や脳血管障害に発展していることが日常診療で経験されているが、実態は明らかにされていない。

妊娠を起点とした女性のリプロダクション・サイクルの環境と、その後の妊娠中から成人期・老年期の健康問題との関連性を明らかにすることは、女性の健康支援と次世代の健全育成とを効率よく行うために重要と考えられる。

そこで、当センターで妊娠・分娩管理された妊婦の母親を対象に、妊婦出生時の母子健康手帳のデータを用いて、妊娠中の血圧、蛋白尿、分娩週数、出生時児の体格、体重変化などの妊娠時の情報と約 20～45 年後の女性の長期健康予後との関連を明らかにする。同時に、妊婦の妊娠時情報を合わせて解析し、母娘の世代間での関連性も明らかにする。

B. 研究方法

1. 対象

平成 15 年から平成 17 年にかけて妊娠中に旧国立成育医療センター産科を受診し出産した妊婦のうち出生コホート研究（成育コホート）に参加し、平成 23 年 1 月末までに 5 歳児健診を受けた児の母親とその母親。

2. 資料

母親については電子カルテ情報、母親の母親（兄の祖母）については成育コホートデータと祖母が母親を妊娠していた際の母子手帳情報。なお、妊娠中の高血圧を「20週以降に収縮血圧 140mmHg または拡張期血圧 90mmHg 以上」と定義した。蛋白尿については、陰性とそれ以外に区別している。

C. 研究結果

1. 記述統計

5歳児検診参加者中、748名から母子手帳情報の提供があった。表1に祖母と母親がそれぞれ妊娠していた時の情報をまとめた。平成23年1月31日時点で、祖母の平均年齢は68.0歳、母親の平均年齢は39.9歳である。

表1 妊婦期の健康状態

	祖母 Mean (SD)	母親 Mean (SD)
分娩時年齢 (yr)	28.2 (3.6)	34.0 (3.9)
在胎週数 (w)	39.4 (1.9)	38.7 (1.8)
児の出生体重 (g)	3161 (398)	2958 (434)
児の出生身長 (cm)	49.7 (1.9)	48.3 (2.3)
SBP (mm Hg)*	114.1 (9.1)	110.1 (11.0)
DBP (mm Hg)*	65.0 (7.6)	66.2 (7.6)
蛋白尿陰性率(%)#	62.3 %	38 %

* n=223 #=209

成育コホートデータから、祖母の現在の持病を集計した（表2）。祖母本人から得られた情報でなく、母親から得た情報であるため、過小評価となっている可能性が高い。なお、複数の持病をもっている祖母もいた。

表2 現在の祖母の持病 (n=748)

	度数	%
糖尿病	40	5.3
高血圧	126	16.8
高脂血症	29	3.9
心疾患	27	3.6
脳血管関連	21	2.8

2. 祖母における妊婦期の健康と現在の健康

現在の祖母の持病と祖母妊娠期の高血圧および蛋白尿との関連を調べた。

妊娠中に高血圧であった祖母2名は現在も高血圧（100%）であり、妊娠中は正常であった210名の祖母のうち34名（16.2%）が現在は高血圧であった（ $p<0.05$ ）。他の持病との関係は見られなかった。蛋白尿陰性率は62.3%であり、現在の持病との関連は見られなかった。

次に、妊婦期の収縮期血圧と拡張期血圧によって対象者を4群化した基礎特性を表3、表4に示す。出産（祖母）時年齢、在胎（母親）週数、児（母親）の出生体重・身長に群間差は見られなかった。

次に、妊婦期の血圧レベルと現在の持病の関連を調べた。出産時年齢と現在の年齢を調整したところ、収縮期血圧レベルと高血圧および慢性疾患（糖尿病/高血圧/高脂血症/心疾患/脳血管関連）との関連が見られた（表5、表6）しかしながら、拡張期血圧レベルとの関連は見られなかった。

蛋白尿に関しても、陰性(-)から陽性(++)までの4レベルで検討を行ったが、現在の持病との関連は見られなかった。

表3 祖母妊婦期の収縮期血圧レベルと基礎特徴(n=212)

	Q1	Q2	Q3	Q4
SBP	91.6-108	108-114.1	114.1-120.3	120.3-141.5
n	55	55	49	53
出産時年齢	28.71±3.4	27.6±3.0	28.1±4.5	27.6±3.4
現在の年齢 (祖母)	68.3±5.7	67.2±4.3	67.3±6.2	66.5±4.6
現在の年齢 (母親)	39.5±4.7	39.5±3.4	39.4±4.1	39.0±3.7
SBP	103±3.7	110.9±1.7	117.2±1.8	125.9±5.3
DBP	60.2±6.8	62.9±6.3	65.8±6.2	71.3±6.6
在胎週数	39.2±2.4	39.5±1.8	39.4±1.8	39.5±1.4
出生時体重	3198.6±329.4	3209±439.7	3121.1±422.2	3127.8±346.1
出生時身長	50.01.7	50.0±2.1	49.2±1.8	49.6±2.0
出生時胸囲	32.9±1.8	32.8±1.5	32.6±1.5	32.4±1.3
出生時頭囲	33.4±1.3	33.6±2.1	33.1±1.4	32.9±1.3
糖尿病	0 (0)	2 (22.2)	3 (33.3)	4 (44.4)
高血圧	6 (16.7)	10 (27.8)	6 (16.7)	14 (38.9)
高脂血症	2 (20.0)	3 (30.0)	3 (30.0)	2 (20.0)
心疾患	0 (0)	3 (42.9)	2 (28.6)	2 (28.6)
脳血管関連	1 (25.0)	1 (25.0)	0 (0)	2 (50.0)
慢性疾患 [#]	8 (15.4)	17 (32.7)	10 (19.2)	17 (32.7)

#糖尿病/高血圧/高脂血症/心疾患/脳血管関連

表4 祖母妊婦期の拡張期血圧レベルと基礎特徴(n=212)

	Q1	Q2	Q3	Q4
SBP	44-59.8	59.8-65.0	65.0-70.1	70.1-87.5
n	49	56	53	54
出産時年齢	28.1±3.8	27.4 ±3.2	28.8±3.8	27.6±3.5
現在の年齢 (祖母)	67.3±6.4	66.4±4.6	68.2±5.2	67.4±4.6
現在の年齢 (母親)	39.1 ±4.3	39.3±4.3	39.3±3.8	39.8±3.5
SBP	107.7±6.8	111.4±7.6	115.5±7.4	121.4±8.4
DBP	54.8±3.7	62.3±1.5	67.4±1.5	74.6±3.6
在胎週数	39.7±1.3	39.2±2.7	39.2±1.5	39.7±1.2
出生時体重	3132.5±331.4	3186.9±458.8	3138.4±381.0	3200.9±363.2
出生時身長	49.5±1.7	50.0±2.2	49.8±2.0	49.7±1.6
出生時胸囲	32.5±1.4	32.9±1.7	32.7±1.6	32.7±1.6
出生時頭囲	33.2±1.3	33.3±1.4	33.2±1.4	34.2±2.1
糖尿病	1 (11.1)	2 (22.2)	4 (44.4)	2 (22.2)
高血圧	9 (25.0)	7 (19.4)	8 (22.2)	12 (33.3)
高脂血症	3 (30.0)	2 (20.0)	1 (10.0)	4 (40.0)
心疾患	1 (14.3)	2 (28.6)	0 (0)	4 (57.1)
脳血管関連	2 (50.0)	0 (0)	1 (25.0)	1 (25.0)
慢性疾患 [#]	12 (23.1)	12 (23.1)	11 (21.2)	17 (32.7)

#糖尿病/高血圧/高脂血症/心疾患/脳血管関連

表5 妊婦期の収縮期血圧レベルと高血圧

	OR	95% CI
Q1	1	
Q2	1.84	0.49 - 6.98
Q3	2.01	0.52 - 7.94
Q4*	4.87	1.38 - 17.22

*p<0.05

表6 妊婦期の収縮期血圧レベルと慢性疾患

	OR	95% CI
Q1	1	
Q2	2.65	0.87 - 8.03
Q3	2.49	0.78 - 7.96
Q4*	3.91	1.29 - 11.90

*p<0.05

3. 世代間での関連性

妊婦期の高血圧について、祖母と母親のそれぞれの妊婦期の関連を調べたが、祖母について情報が得られる母親全員(n=209)の血圧が正常であったため、関連は見られなかった。蛋白尿についても有意な関連は見られなかった。

次に、祖母の現在の持病と母親の妊婦期の高血圧と蛋白尿の関係を調べた(表7、表8)。祖母が高脂血症である母親は、妊婦期に蛋白尿がある(-/+、+、++、+++)
割合が高かった(p<0.05)。

表7 母親の妊婦期高血圧と祖母の持病 (n=743)

祖母の持病	母親高血圧	
	正常 (%)	高血圧(%)
糖尿病	39 (5)	1 (20)

高血圧	124 (17)	2 (40)
高脂血症	29 (4)	0 (0)
心疾患	26 (4)	1 (20)
脳血管関連	20 (3)	0 (0)
慢性疾患 [#]	189(26)	2(40)

表8 母親の妊婦期蛋白尿と祖母の持病 (n=743)

祖母の持病	母親蛋白尿	
	陰性 (%)	非陰性(%)
糖尿病	17 (6)	23 (5)
高血圧	42 (15)	83 (18)
高脂血症*	5 (2)	24 (5)
心疾患	10 (4)	17 (4)
脳血管関連	5 (2)	15 (3)
慢性疾患 [#]	63 (22)	127 (28)

*p<0.05

D. 考察

本研究では、妊娠期間中の健康状態と約20~45年後の女性の長期健康予後との関連を明らかにするため、母子手帳情報を利用した。748名から母子手帳情報の提供があり、出生時体重や身長に記載はほとんどの手帳にあるものの、妊婦の血圧や蛋白尿については1/3弱しかなかった。

平成18年国民健康・栄養調査¹⁾では、60~69歳女性における「糖尿病が強く疑われる人」の比率は12.8%、「高血圧症有病者」の比率は57.6%、「脂質異常症が疑われる人」の比率は22.8%と報告されている。これと比較すると、本調査の結果は、糖尿病5.3%、高血圧16.8%、高脂血症3.9%と非常に低率であることが分かる。

最も頻度が高かった高血圧については、妊婦期の収縮期血圧レベルと現在の持病の間に統計学的に有意な関連が見られ、収縮期血圧レベルが高い者は、低い者と比べてオッズ比が4.9倍であることが明らかとなった。他の疾患についても、サンプルサイズを大きくし、再度解析を試みたい。

世代間の関連として、BOSHI Study²⁾では「祖父母の高血圧と妊娠中の高血圧に関連」が見られたが、本研究では見られなかった。しかしながら、祖母の高脂血症と母親の妊婦期の蛋白尿に関連が見られた。前述したように、祖母の現在の持病が低率であるため、サンプルサイズを大きくし、再検討の必要がある。

参考資料

- 1) <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/04/h0430-2a.html> 平成18年国民健康・栄養調査
- 2) 今井潤. 産後長期予後に関する研究. 平成21年度厚生労働科学研究費補助金(循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業)報告書. 女性における生活習慣病戦略の確立. 2010: 9-17

E. 結論

本研究により、妊婦期の血圧レベルと約20~45年後の女性の長期健康予後との関連が示唆された。現在5歳児の母親を継続して追跡調査し、よりエビデンスレベルの高い研究結果として提示したい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Jwa SC, Arata N, Sakamoto N, Watanabe N, Aoki H, Kurauchi-Mito A, Dongmei Q, Oyha Y, Ichihara A, Kitagawa M. Prediction of pregnancy induced hypertension by a shift of blood pressure class according to the JSH 2009 guidelines. submitting.

2. 学会発表

- ・ Dongmei Qiu, Naoko Sakamoto, Naoko Arata, Yukihiro Oya : Maternal characteristics in relation to low birth weight infants in a Japanese cohort study. Scotland, 2011.1.
- ・ 三戸麻子、荒田尚子、村島温子、青木宏明、左勝則、渡邊典芳、佐合治彦、坂本なほ子、市原淳弘、大矢幸弘、北川道弘。「成育コホート研究を用いた妊娠高血圧症候群合併女性の産後5年時の血圧予後」第21回腎と妊娠研究会 埼玉大宮ソニックシティ 2011年3月5日:32
- ・ 邱冬梅、坂本なほ子、荒田尚子、池谷美樹、大矢幸弘。「低体重児出生と妊娠後期栄養との関連に関するコホート研究」第21回日本疫学会学術総会 札幌 2011年1月21日 Supplement to J Epidemiol 2011;21(1):158
- ・ 邱冬梅、坂本なほ子、相澤志優、大矢幸弘。「妊娠中の栄養摂取状況と新生児出生体重との関連」第69回日本公衆衛生学会総会 東京 2010年10月27日 日本公衆衛生誌 2010. 第57巻 第10号特別付録; 327.21-22

成育コホート研究を用いた妊娠中のイベントと女性の生活習慣病リスクに関する研究
- 妊娠高血圧症候群合併女性の産後 5 年時の予後 -

研究分担者 荒田尚子 国立成育医療研究センター母性医療診療部代謝内分泌内科 医長

研究要旨

出生後 5 年の追跡調査を施行中である大規模出生コホートを用い、妊娠中のイベントとの一つである妊娠高血圧症候群と、その後の女性の生活習慣病との関連を明らかにした。出生コホート研究に参加・追跡中である児のうち 5 歳児健診を受ける児の母親で研究参加の同意を得られた 2010 年 8 月までの検診受診者 433 名のうち、検診時に妊娠中、授乳中、妊娠前から高血圧既往のあった例を除いた 403 例を対象とし、産後 5 年後の健診を行った。その結果、分娩後 5 年時ですでに妊娠高血圧症候群発症群は高血圧有病率が 16.7%、すなわち 6 人に 1 人の頻度と高率にみとめ、妊娠高血圧症候群非発症群に比較して高血圧の頻度は約 6.4 倍であったことから、妊娠高血圧症候群既往者は産後に血圧が正常化しても前高血圧段階としての経過観察および指導が必要と考えられた。女性の生活習慣病対策として、男性の特定検診と対称的に、妊娠時の妊娠高血圧症候群の既往などに焦点をあてることも重要と考えられた。

研究協力者:

坂本なほ子(同センター研究所成育社会医学
研究部成育疫学研究室 室長)

村島温子(同センター母性医療診療部 部
長)

三戸麻子(同センター母性医療診療部代謝内
分泌内科 臨床研究員)

青木宏明(同センター周産期診療部産科 医
員)

左 勝則(同センター周産期診療部産科 医
師)

市原淳弘(慶應義塾大学医学部抗加齢内分
泌学講座 准教授)

および早産などのいわゆる“胎盤機能不全症候群”や妊娠糖尿病が出現した場合は、高血圧症、糖代謝障害、脂質代謝異常症をベースとした動脈硬化性疾患の危険性が高いことが海外で明らかにされ始めており、“妊娠”は女性において生涯の疾病の負荷試験であることが証明されつつある(Sattar N, et al., BMJ 325:157, 2002; Bellamy L, et al., BMJ 335: 974, 2007; Bellamy L, et al., Lancet 373: 1773, 2009)。我が国においては、“胎盤機能不全症候群”や妊娠糖尿病を合併した女性の多くが産後放置され、高血圧症、脂質代謝異常症や糖尿病を発症し、さらには心臓病や脳血管障害に発展していることが日常診療で経験されているが、これらの実態は明らかにされていない(加治屋昌子ら、糖尿病と妊娠 8: 109,

A. 目的及び背景

近年、妊娠高血圧症候群、胎児発育遅延

2008;穴澤園子、日本糖尿病学会編、糖尿病学の療養指導 2002. 診断と治療社、東京、109,2002;和栗雅子ら 糖尿病と妊娠 10(1): 67-72, 2010)。

現在、出生後5年の追跡調査を施行中である大規模出生コホートをを用い、妊娠中のイベントと、その後の女性の生活習慣病との関連を明らかにする。今回は、中間解析として、妊娠中のイベントの一つである妊娠高血圧症候群と、その後の生活習慣病との関連を明らかにした。

B. 対象・方法

2003年から2005年に、妊娠16週までに国立成育医療センターを受診し、妊娠・分娩管理を行った単胎妊娠女性のうち、出生コホート研究に参加・追跡中である児のうち5歳児健診を受ける児の母親で研究参加の同意を得られた女性が対象者である。今回の中間解析は2010年8月までの検診受診者433名のうち、検診時に妊娠中、授乳中、妊娠前から高血圧既往のあった例を除いた403例を対象とした(図1)。

対象者において行った健診項目は、体重および身長計測、血圧測定(自動血圧計(HEM-9000AI)による2回測定した血圧値の平均値)及び以下の検体検査である。空腹時血糖、HbA1c、グリコアルブミン、インスリン値、LDL、HDL、TG、尿微量アルブミン/g・クレアチニン値を測定した。診察室血圧測定は高血圧治療ガイドライン2009にそって行った。採血時に、最終月経日と月経周期を聴取し、採血時の月経周期状態を確認した。また、自記式生活歴質問票により、現在の病歴や家族歴を聴取した。

妊娠高血圧症候群発症群は日本妊娠高血

圧学会、2004、日本産婦人科学会、2005に従って診断し、以前より高血圧と診断されていた症例は除外した。

1 主要評価項目として、次の基準を用いた。

- ① 高血圧症の発症頻度:5分以上の安静後に座位で2回、1分以上の間隔をおいて自動血圧計を用いて測定し、その平均値により収縮期140mmHg以上または拡張期90mmHg以上のものを高血圧症と診断した。薬物治療にて治療中のものは血圧値にかかわらず高血圧発症とした。
- ② 糖尿病・耐糖能障害発症の頻度:(空腹時血糖値126mg/dl、HbA1c(JDS)6.1%以上およびすでに診断されているものを糖尿病とした。

2 副次的評価項目として下記を用いた。

- ① 脂質代謝異常の発症頻度:高中性脂肪血症か低HDLコレステロール血症とし、特定健康診査の基準である150mg/dl以上かつ/またはHDLコレステロール40mg/dl未満を脂質代謝異常とした。
- ② 正常高値血圧以上の頻度:血圧平均値が収縮期130mmHg以上または拡張期85mmHgのものおよび薬物治療にて治療中のものは血圧値にかかわらず含めた。
- ③ 糖尿病スクリーニング陽性:特定健康診査の際に用いる空腹時血糖100mg/dl以上かHbA1c(JDS)5.2%以上とした。
- ④ 糖尿病境界型:空腹時血糖110mg/dl以上で糖尿病発症を除外した。
- ⑤ 空腹時血糖、HbA1c、グリコアルブミン、インスリン値、HOMA-R、HOMA-β、LDL、HDL、TG、尿微量アルブミン/g・

クレアチニン値の平均値。

(倫理面への配慮)

成育コホート研究登録時に、妊婦本人に当出生コホート研究についてのインフォームド・コンセントを行い、妊婦本人および出生後の児のフォローアップについての同意を得、当コホート研究開始時に当院の院内倫理委員会での承認を取得した。5歳児の母親の健診についてもあらたに倫理委員会での承認を取得し、インフォームド・コンセントを行った。研究IDを用いることにより個人情報を守られる。

C. 研究結果

今回の中間解析の時点での追跡率は、単胎分娩例657例を基本とすると51.4%と予想より低率であった(図1)。解析対象者403例のうち、妊娠高血圧症候群(PIH)群は12例、妊娠高血圧症候群非発症(非PIH)群は391例であった。PIH群の内訳は妊娠高血圧7例、妊娠高血圧腎症5例、早発型1例であった。

妊娠高血圧症候群発症群と非発症群の妊娠中、産褥時の背景を表1に示す。PIH発症群においてはこれまでの検討と同様に、非発症群に比較して分娩週数が短い傾向を示し、児の出生体重は有意に低値であったが児の出生身長と出生体重のSD値には差がなかった。妊娠時の年齢、体格に差はみとめられなかった。

妊娠初期、妊娠20週、産後1ヶ月の血圧値は収縮期、拡張期、平均の血圧全てにおいてPIH群では非PIH群に比較して高値を示し、PIH群では妊娠20週付近での血圧値の生理的な低下が消失していた(表2)。

5歳児健診時の母親のBMI値は両群に差はなく、糖尿病、高血圧、高脂血症、心疾患、

脳血管障害家族歴に差はなかった(表3)。

分娩後5年時のPIH群と非PIH群の高血圧症・糖尿病・脂質代謝異常有病率を表4に示した。高血圧発症が非PIH群で2.6%であったのに対し、PIH群で16.7%と約6.4倍のリスクあったが有意差はなく、糖尿病有病率については差をみとめなかった。正常高値以上の血圧値の頻度は非PIH群で6.4%、PIH群で33.3%と約5倍のリスクであった。

特定健診で用いられている基準を用いた糖尿病スクリーニング陽性者の割合は非PIH群で7.2%、PIH群で50%とPIH群で有意に高率であった。メタボリック症候群のもう一つの構成要素である脂質代謝異常の率は2群で差がなかった。両群とも腹囲で90cm以上を認めた女性はみとめられなかった。

分娩後5年時のPIH発症群と非発症群の高血圧症・糖尿病・脂質代謝異常関連パラメータの検討では(表5)、いずれの血圧値も有意な差はみとめられなかったが、非PIH群に比較してPIH群で高い傾向をみとめた。HbA1c(JDS)値はPIH群で非PIH群に比較して有意に高値であったが、空腹時血糖、空腹時インスリン値、HOMA-R、HOMA-β値に差はなかった。脂質代謝パラメータ、微量アルブミン尿にも差はなかった。

PIH群と非PIH群の妊娠中から産後1ヶ月、産後5年の血圧値の推移を図2に示した。PIH群の血圧値は非PIH群の血圧値に比較して妊娠初期、妊娠20週、産後1ヶ月は有意に高値であり、産後5年時も有意差はなかったが高値であった。

D. 考察及び結論

分娩後5年時ですでに妊娠高血圧症候群発症群は高血圧発症が16.7%、すなわち6人

に1人の頻度と高率にみとめ、妊娠高血圧症候群非発症群に比較して高血圧の頻度は約6.4倍であったことから、妊娠高血圧症候群既往者は産後に血圧が正常化しても前高血圧段階としての経過観察および指導が必要と考えられる。また、妊娠高血圧症候群発症群は非発症群に比しヘモグロビンの糖化を示すHbA1cの軽度高値を示していた。今回、メタボリック症候群該当者はみとめなかったが、将来の女性の動脈硬化疾患のハイリスク群と考えるとよいであろう。

今回のPIH発症群は、早発型は1例のみしか含まず、重症型が少なかったことから、今後症例数の増加により詳細に動脈硬化疾患のハイリスク群の妊娠イベントによる層別化が可能になるであろう。

また、PIH群の血圧値は非PIH群の血圧値に比較して妊娠初期、妊娠20週、産後1ヶ月は有意に高値であり、生理的にみとめられる妊娠20週前後における血圧値の低下がみとめられなかった。また、産後5年時に有意差はなかったが血圧値は高値をみとめていたことから、少なくとも、PIH発症者のなかに、現在の診断基準の高血圧とまではいかないが、非PIH発症者に比較すると血圧値が常に高い症例が含まれている可能性がある。これらの女性は現在の診断基準では血圧値は正常範囲内であるが、妊娠時の負荷には代償できない血圧値である可能性があり、妊娠結果を標的とした妊娠可能年齢女性の至適血圧値を明らかにすることも必要であろう。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Jwa SC, Arata N, Sakamoto N, Watanabe N, Aoki H, Kurauchi-Mito A, Dongmei Q, Oyha

Y, Ichihara A, Kitagawa M. Prediction of pregnancy induced hypertension by a shift of blood pressure class according to the JSH 2009 guidelines. submitting.

2. 学会発表

1) 三戸麻子、荒田尚子、村島温子、青木宏明、左勝則、渡邊典芳、左合治彦、坂本なほ子、市原淳弘、大矢幸弘、北川道弘. 成育コホート研究を用いた妊娠高血圧症候群合併女性の産後5年時の血圧予後: 第21回腎と妊娠研究会、大宮、2011. 3. 5

2) Dongmei Qiu, Naoko Sakamoto, Naoko Arata, Yukihiro Oya : Maternal characteristics in relation to low birth weight infants in a Japanese cohort study. Scotland, 2011.1. 21-22

3) 邱 冬梅、坂本なほ子、荒田尚子、池谷美樹、大矢幸弘: 低体重児出生と妊娠後期栄養との関連に関するコホート研究. 第21回日本疫学会学術総会、札幌、2011.1.21-22

4) 青木宏明、渡邊典芳、左勝則、花岡正智、加藤有美、池谷美樹、小澤伸晃、荒田尚子、村島温子、左合治彦、北川道弘、名取道也、: 母体の出下時体、妊娠前母体体重、児の出生体重における関連の検討. 第46回日本周産期・新生児医学会 2010.7. 11-12

5) 池谷美樹、左勝則、宮田あかね、渡邊典芳、塚原優己、山口晃史、村島温子、久保隆彦、左合治彦、北川道弘、名取道也、荒田尚子、妊娠初期に体重が減少した妊婦の至適体重増加量についての検討—成育コホート研究より— 第46回日本周産期・新生児医学会、神戸市、2010.7. 11-12

6) 佐藤詩織、荒田尚子、八代智子、入江聖子、久野道、税所芳史、山口晃史、谷山松

雄、久保隆彦、左合治彦、村島温子:低出生
 体重で生まれた女性の妊娠中のインスリン分
 泌とインスリン感受性の検討 第26回日本糖
 尿病・妊娠学会,年次学術集会、さいたま市、
 2010.11.26-27

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

図 1 途中解析対象者

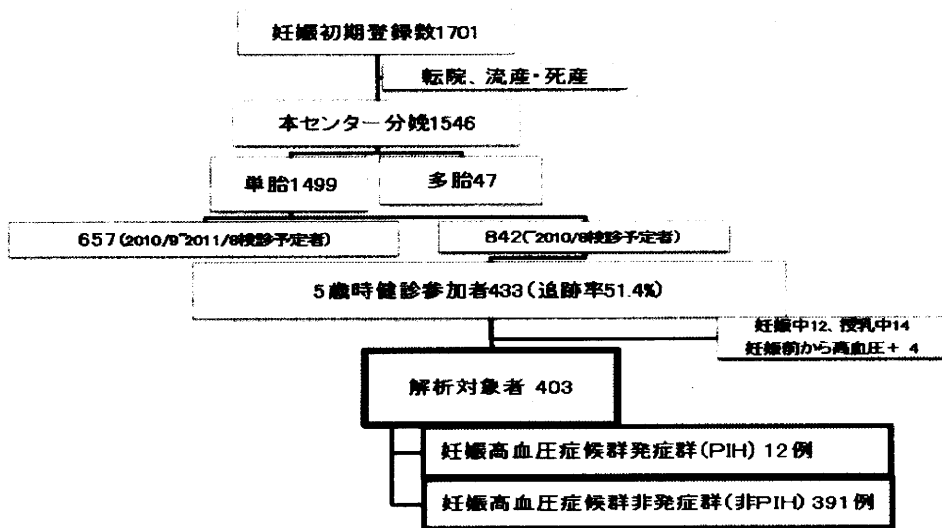


表1 妊娠高血圧症候群発症群と非発症群の妊娠中、産褥時の背景

		発症群		非発症群				
妊娠時	年齢(分娩時)(歳)	33.7	(3.9)	391	34.8	(5.1)	12	0.3176
	身長(cm)	159.4	(5.2)	391	159.0	(5.5)	12	0.7998
	妊娠前体重(kg)	51.3	(7.1)	391	51.3	(7.4)	12	0.9996
	妊娠前のBMI	20.2	(2.6)	391	20.2	(2.3)	12	0.9490
妊娠結果	分娩週数(妊娠週数)	39.1	(1.7)	391	38.1	(1.9)	12	0.0602
	早産数(妊娠37週未満)	23.0	(0.1)	391	3.0	(0.3)	12	0.1723
	児の出生体重(g)	2970.1	(406.9)	391	2727.3	(421.2)	12	0.0426
	児の出生時身長(cm)	48.3	(2.2)	391	47.3	(2.1)	12	0.1032
	児の出生体重SD値	0.03	(0.95)	391	-0.04	(0.73)	12	0.7983
	児の出生時身長SD値	-0.19	(0.93)	391	-0.19	(0.74)	12	0.9928

表2 妊娠高血圧症候群発症群と非発症群の妊娠中、産褥時の血圧値の推移

		発症群		非発症群			
収縮期血圧(mmHg)(妊娠初期)	112.2	(11.7)	267	122.3	(12.2)	10	0.0080
拡張期血圧(mmHg)(妊娠初期)	67.5	(8.1)	267	74.8	(10.4)	10	0.0089
平均血圧(mmHg)(妊娠初期)	82.4	(8.8)	267	90.5	(10.5)	10	0.0052
収縮期血圧(mmHg)(妊娠20週)	109.5	(10.3)	390	123.0	(15.0)	12	0.0087
拡張期血圧(mmHg)(妊娠20週)	66.1	(7.5)	390	74.3	(9.8)	12	0.0002
平均血圧(mmHg)(妊娠20週)	80.6	(8.1)	390	90.5	(10.5)	12	0.0000
収縮期血圧(mmHg)(産後1ヶ月)	114.8	(11.0)	371	124.0	(15.2)	12	0.0052
拡張期血圧(mmHg)(産後1ヶ月)	70.5	(7.8)	371	75.2	(7.8)	12	0.0403
平均血圧(mmHg)(産後1ヶ月)	85.2	(8.4)	371	91.5	(9.1)	12	0.0119

表3 妊娠高血圧発症群と非発症群の5歳時
検診時の年齢、体格、家族歴

	II群			I群		
年齢(5歳検診時)	38.7	(3.9)	391	39.8	(5.1)	12 0.3176
体重(kg)	52.7	(7.8)	391	53.9	(8.6)	11 0.6299
BMI	20.6	(3.1)	391	21.3	(2.7)	11 0.5000
II群 I群						
糖尿病家族歴(+)	136	(35.1%)	388	1	(8.3%)	12 0.0549
高血圧家族歴(+)	200	(51.5%)	388	9	(75.0%)	12 0.1097
高脂血症家族歴(+)	71	(18.5%)	384	2	(18.2%)	11 0.9794
心疾患家族歴(+)	116	(29.9%)	388	2	(18.2%)	11 0.4024
脳血管障害家族歴(+)	106	(27.4%)	387	5	(41.7%)	12 0.2782

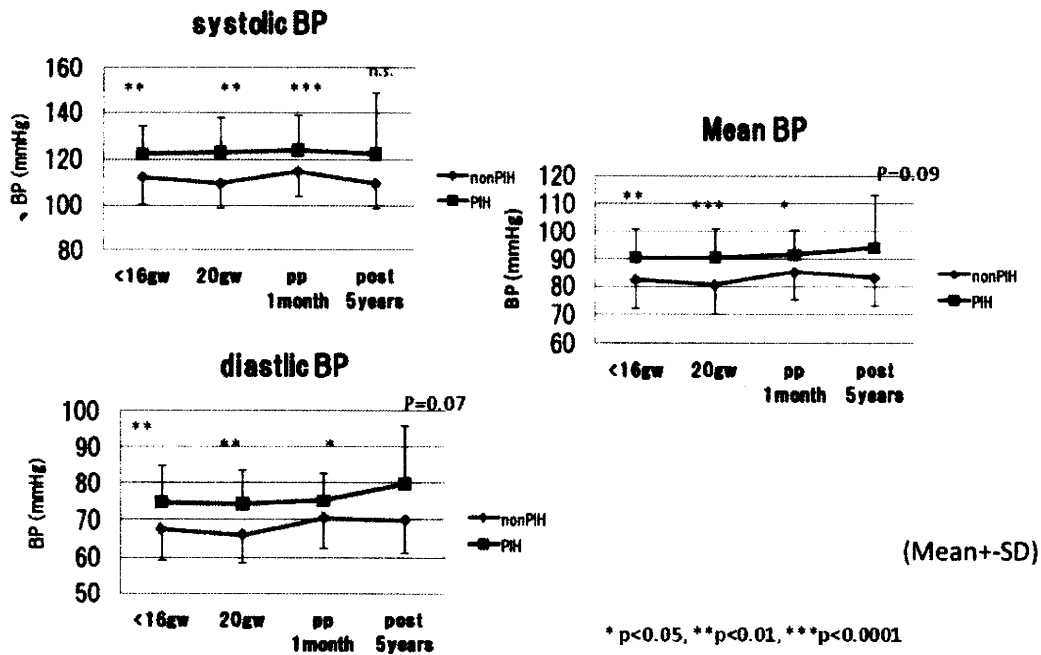
表4 分娩後5年時の妊娠高血圧症候群発症群と非発症群の高血圧
症・糖尿病・脂質代謝異常有病率

	II群			I群		
高血圧発症(治療中か140mmHg/90mmHg以上)	10	(2.6%)	389	2	(16.7%)	12 0.2365
正常高値以上(130mmHg/85mmHg以上か治療中)	25	(6.4%)	389	4	(33.3%)	12 0.0656
糖尿病発症(空腹時血糖126mg/d以上かHbA1c(DDS)6.1%以上か治療中)	3	(0.8%)	389	0	(0.0%)	12 0.7608
糖尿病スクリーニング陽性(空腹時血糖100mg/d以上かHbA1c(DDS)5.7%以上)(特定健診)	28	(7.2%)	391	6	(50.0%)	12 0.0161
糖尿病境界型(空腹時血糖110mg/d以上)(日本糖尿病学会)	1	(0.3%)	391	0	(0.0%)	12 0.8612
高TG血症か低HDL血症	10	(2.6%)	388	0	(0.0%)	12 0.5744

表5 分娩後5年時の妊娠高血圧症候群発症群と非発症群の高血圧症・糖尿病・脂質代謝異常関連パラメータ

	発症群	非発症群	p値
収縮期血圧(mmHg)	109.5 (10.5) 391	122.4 (26.4) 11	0.1389
拡張期血圧(mmHg)	69.9 (8.6) 391	79.8 (16.3) 11	0.0730
平均血圧(mmHg)	83.1 (8.8) 391	94.1 (19.4) 11	0.0907
中心血圧(mmHg)	82.5 (11.6) 388	88.5 (10.5) 11	0.0897
空腹時血糖(mg/dl)	83.0 (6.1) 389	85.0 (4.6) 12	0.2479
空腹時インスリン(μg/dl)	4.1 (2.3) 387	4.0 (2.0) 12	0.8380
HbA1c(JDS)(%)	5.0 (0.3) 389	5.2 (0.3) 12	0.0360
HOMA-R	0.9 (0.5) 387	0.8 (0.4) 12	0.9180
HOMA-β (%)	77.1 (39.6) 387	65.8 (28.6) 12	0.3272
LDLコレステロール(mg/dl)	104.0 (27.4) 389	105.2 (24.2) 12	0.8867
中性脂肪(mg/dl)	59.7 (32.2) 388	58.8 (14.2) 12	0.8429
HDLコレステロール(mg/dl)	68.8 (12.8) 389	67.8 (8.5) 12	0.7855
微量アルブミン尿(mg/g・Cr)(生理中除く)	12.2 (36.0) 295	10.3 (10.5) 10	0.6319

図2 妊娠高血圧症候群発症群と非発症群の血圧値の推移



Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版年	ページ
荒田尚子	糖尿病で治療中です。 妊娠までにどのような ことに注意すればよい でしょうか？	北川道弘、村島温子	妊婦・授乳婦のため の服薬指導Q&A	医薬ジャー ナル社	2010	82-83

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Jwa SC, <u>Arata N</u> , <u>Sakamoto N</u> , Watanabe N, Aoki H, Kurauchi-Mito A, Dongmei Q, Oyha Y, Ichihara A, <u>Kitagawa M</u> .	Prediction of pregnancy induced hypertension by a shift of blood pressure class according to the JSH 2009 guidelines.				submit ting
Farina A, Zucchini C, De Sanctis P, Morano D, <u>Sekizawa A</u> , Purwosunu Y, Okai T, Rizzo N.	Gene expression in chorionic villous samples at 11 weeks of gestation in women who develop pre-eclampsia later in pregnancy: implications for screening.	Prenat Diagn.			2011
Takahashi H, Hayashi S, Matsuoka K, <u>Kitagawa M</u> .	Placenta accrete following uterine artery embolization.	Taiwan J Obstet Gynecol.	49(2)	197-8	2010
Watanabe Y, <u>Metoki H</u> , et al. and <u>Imai Y</u> .	Accumulation of common polymorphisms is associated with development of hypertension: a 12-year follow-up from the Ohasama study.	Hypertens Res.	33	129-34	2010
Watanabe Y, <u>Metoki H</u> , et al. and <u>Imai Y</u> .	Parental longevity and offspring's home blood pressure: the Ohasama study.	<i>J Hypertens.</i>	28	272-7	2010
<u>Metoki H</u> , Ohkubo T, and <u>Imai Y</u> .	Diurnal blood pressure variation and cardiovascular prognosis in a community- based study of Ohasama, Japan.	Hypertens Res.	33	652-6	2010
Seki M, <u>Metoki H</u> , et al. and <u>Imai Y</u> .	Association of environmental tobacco smoke exposure with elevated home blood pressure in Japanese women: the Ohasama study.	<i>J Hypertens.</i>	28	1814-20	2010

発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Sekizawa A</u> , Purwosunu Y, Farina A, Shimizu H, Nakamura M, Wibowo N, Rizzo N, Okai T.	Prediction of pre-eclampsia by an analysis of placenta-derived cellular mRNA in the blood of pregnant women at 15-20 weeks of gestation.	BJOG.	117(5)	557-64	2010
Farina A, Zucchini C, <u>Sekizawa A</u> , Purwosunu Y, de Sanctis P, Santarsiero G, Rizzo N, Morano D, Okai T.	Performance of messenger RNAs circulating in maternal blood in the prediction of preeclampsia at 10-14 weeks.	Am J Obstet Gynecol.	203(6)	575.e1-7	2010
Yamazawa K, Akabayashi K, Kagami M, Sato T, Saito S, <u>Horikawa</u> R, Hizuka N, Ogata T.	Parthenogenetic chimaerism/mosaicism with a Silver-Russell syndrome-like phenotype.	Med Genet		Epub ahead of print	2010
Sato Y, Warabisako E, Yokokawa H, Harada S, Tsuda M, <u>Horikawa R</u> , Kurokawa Y, Okada T, Ishizuka N, Kobayashi Y, Kishi M, Takahashi T, Kasahara Y, Imazeki N, Senoo A, Inoue S.	High cardiovascular risk factors among obese children in an urban area of Japan.	Obesity Research & Clinical Practice	4	e333-337	2010
<u>目時弘仁</u> 、 <u>八重樫伸</u> <u>生</u> 、 <u>今井潤</u> 。	家庭血圧測定とその有用性	産婦人科治療	102(1)	82-87	2011
<u>荒田尚子</u>	胎生期環境と生活習慣病 出生体重の低い母親の 妊娠糖能病発症リスク	医学のあゆみ	235(8)	822-826	2010
<u>堀川玲子</u>	小児期から始まる生活習慣病-実態と予後	環境ホルモン 学会 NewsLetter	12(4)		2010

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Prediction of pre-eclampsia by an analysis of placenta-derived cellular mRNA in the blood of pregnant women at 15–20 weeks of gestation

A Sekizawa,^a Y Purwosunu,^{a,b} A Farina,^{a,c} H Shimizu,^a M Nakamura,^a N Wibowo,^b N Rizzo,^c T Okai^a

^a Department of Obstetrics and Gynecology, Showa University School of Medicine, Tokyo, Japan ^b Department of Obstetrics and Gynecology, University of Indonesia, Cipto Mangunkusumo National Hospital, Jakarta, Indonesia ^c Department of Histology and Embryology, Division of Prenatal Medicine, University of Bologna, Bologna, Italy

Correspondence: Dr A Sekizawa, Department of Obstetrics and Gynecology, Showa University School of Medicine, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8666, Japan. Email sekizawa@med.showa-u.ac.jp

Accepted 14 December 2009. Published Online 29 January 2010.

Objective A panel of cellular mRNA markers was used to predict the occurrence of pre-eclampsia in pregnant women at 15–20 weeks of gestation.

Design Prospective cohort study.

Setting The Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Indonesia, Cipto Mangunkusumo National Hospital, Indonesia.

Sample Peripheral blood samples from asymptomatic pregnant women.

Methods Among 660 women, 62 developed pre-eclampsia at later gestation (pre-eclampsia group) and each case was matched with five controls. Therefore, the RNA expression levels in the cellular component of maternal blood in 62 women with pre-eclampsia were compared with those in 310 controls.

Main outcome measures The cellular RNA expression levels of genes related to angiogenesis and oxidative stress were compared

between pre-eclampsia and control groups. A receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyse the sensitivity of each available marker. A logistic regression analysis was performed to calculate the odds for each woman to be classified as a case.

Results The univariate ROC analysis identified soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1) and endoglin (ENG) as the markers with the highest sensitivity. The best multivariate model was obtained by combining Flt-1, ENG, placental growth factor (PlGF) and parity. The relative ROC curve yielded a sensitivity of 66% at a 10% 1 – specificity rate with an area under the curve of 0.884 ($P < 0.001$).

Conclusion A panel of cellular mRNA markers in maternal blood can predict the development of pre-eclampsia long before clinical onset.

Keywords Cellular RNA, endoglin, prediction, pre-eclampsia, vascular endothelial growth factor receptor-1.

Please cite this paper as: Sekizawa A, Purwosunu Y, Farina A, Shimizu H, Nakamura M, Wibowo N, Rizzo N, Okai T. Prediction of pre-eclampsia by an analysis of placenta-derived cellular mRNA in the blood of pregnant women at 15–20 weeks of gestation. BJOG 2010; DOI: 10.1111/j.1471-0528.2010.02491.x.

Introduction

Despite advances in perinatal care, pre-eclampsia (PE) is the most common cause of maternal and perinatal mortality and morbidity worldwide.¹ Recently, anti-angiogenic factors, such as soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) and soluble endoglin (sENG), which are both produced in the placenta, have been shown to play important roles in the pathogenesis of PE.^{2–5}

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a pro-angiogenic factor and causes vasodilatation through the

production of nitric oxide and prostacyclin.^{6–8} As Flt-1 combines with VEGF and placental growth factor (PlGF), and the serum level of soluble Flt-1 increases in pregnant women who develop PE,³ free PlGF and free VEGF in maternal serum decline prior to the development of PE.⁴ Another anti-angiogenic factor is endoglin (ENG), which regulates the endothelial nitric oxide synthase activity and local vascular tone.⁹ Venkatesha *et al.*⁵ have reported that the placenta is a major source of soluble ENG during pregnancy, and that ENG is up-regulated in the pre-eclamptic placenta, releasing soluble ENG into the

maternal circulation, which correlates with the severity of PE.

Although the molecular mechanism regulating the production of Flt-1 and ENG in the placenta is unknown, it has been suggested that hypoxia or oxidative stress of trophoblasts is associated with the production of these factors. Li *et al.*¹⁰ reported the up-regulation of Flt-1 to be associated with increased oxidative stress as a consequence of hypoxia in placental trophoblasts. Haem oxygenase-1 (HO-1) is known to have antioxidant, anti-inflammatory and cytoprotective functions. HO-1 is an oxygen sensor and its expression is inducible under hypoxic conditions.¹¹ Although low HO-1 levels in the placenta result in an abortion,¹² the up-regulation of HO-1 by adenoviral administration works protectively during pregnancy.¹³ Furthermore, PE is associated with diminished placental HO-1 levels.¹⁴ Moreover, the adenoviral overexpression of HO-1 inhibits soluble ENG release in placental villous explants, whilst also inhibiting Flt-1 production in endothelial cells.¹⁵

Therefore, anti-angiogenic and anti-oxidative factors are considered to play a crucial role in the pathogenesis of PE. These placental alterations in women who develop PE in later gestation are thought to begin during the first trimester, when extravillous trophoblasts remodel into the endothelial cells of the spiral arteries. The *in vivo* alteration of gene expression has been observed in the first-trimester trophoblasts from pregnant women destined to develop PE later, confirming this hypothesis.¹⁶ In this study, tissue samples of villous trophoblasts at the time of fetal karyotype analysis were collected prospectively through chorionic villous sampling (CVS), and the mRNA expression of these genes was assessed. The results revealed that the expression levels of Flt-1, ENG, VEGF and transforming growth factor- β 1 (TGF β 1) were significantly higher in the CVS tissues from pregnant women who later developed PE, whereas the levels of PlGF, HO-1 and superoxide dismutase (SOD) were lower.¹⁶ These findings suggest that the genes associated with angiogenesis and reduced anti-oxidant stress play crucial roles in the pathogenesis of PE, and that the measurement of the expression of these factors in maternal blood may enable the prediction of the onset of PE.

Fetal/placental RNA circulates in the maternal plasma and has enabled the development of several promising approaches for the noninvasive evaluation of placental function.^{17,18} Subsequently, cell-free RNA concentrations of VEGF, Flt-1 and ENG were assessed in the plasma of women with and without PE.¹⁹ These transcripts increased in the plasma of pre-eclamptic women and correlated positively with disease severity. An additional study of postpartum samples found the mRNA transcripts to decrease rapidly after delivery, thus suggesting that the majority of the transcripts were derived from the placenta/fetus.¹⁹ To

demonstrate the possibility of the prediction of PE by cell-free RNA, the expression of seven genes, including Flt-1, ENG and VEGF, was assessed in the plasma of pregnant women between 15 and 20 weeks of gestation. It was found that this panel allowed an 84% prediction rate for PE with a 5% false positive rate at 15–20 weeks of gestation by means of a discriminant analysis model. This finding indicates that the analysis of cell-free RNA is a highly promising method for the evaluation of alterations in placental function.²⁰

The expression of placenta-specific genes, such as human placental lactogen (hPL) and human chorionic gonadotrophin (hCG), has also been shown to be detectable in the cellular component of maternal blood, and the mRNA concentrations of hPL and hCG correlate with the protein assay.¹⁷ Furthermore, the cellular mRNA concentration is approximately ten times greater than that of maternal plasma RNA.¹⁷ These findings indicate that some trophoblasts and placental debris circulate in the blood of normal pregnant women, and that the analysis of the cellular component of maternal blood may be more suitable than maternal plasma analysis for the evaluation of alterations in placental function. Therefore, because the gene expression of anti-angiogenic factors and anti-oxidant enzymes is associated with the pathogenesis of PE, the cellular RNA expression in the blood from asymptomatic pregnant women during the early second trimester was analysed to compare the mRNA levels with the clinical outcomes.

Materials and methods

Subjects

This investigation was performed as part of a series together with previously reported studies.^{19–22} The investigation was designed as a prospective cohort study in early pregnant women (gestational weeks 15–20) who visited the Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Indonesia, Cipto Mangunkusumo National Hospital, Indonesia from mid-2005 to 2006. Singleton pregnant women without any pre-existing medical diseases at screening or antenatal complications at the time of blood drawing were invited to participate in the cohort. The pregnancies were dated by ultrasound, which was performed during the first trimester. All women provided informed consent to participate in the study, which was approved by the Research Ethics Committee of both the University of Indonesia and Showa University.

Of the 683 women enrolled, 23 with incomplete information on outcome, whose pregnancy ended before 20 weeks or who experienced stillbirth were excluded. Among the remaining 660 women, 62 developed PE. Each case was matched with five controls of the same gestational age at the time of blood testing (within 1 week and ranging

from 15 to 20 weeks), maternal weight and fetal gender. Therefore, 62 women who developed PE and 310 controls with a normal course of pregnancy were enrolled in the study. In the control group, women with fetal growth restriction (below -1.5 SD) based on the Japanese fetal growth curve (<http://www.jsom.or.jp/committee/diagnostic/diagnostic>) were excluded. No special management or treatment other than antenatal care was provided before the clinical signs of PE presented. If abnormalities of blood pressure and/or proteinuria were found, women were recommended to admit themselves to hospital.

Mild and severe PE and haemolysis, elevated liver enzymes and low platelets (HELLP) syndrome was defined as described previously.^{22,23} In brief, PE was defined as gestational hypertension (systolic pressure of ≥ 140 mmHg or diastolic blood pressure of ≥ 90 mmHg on two or more occasions after gestational week 20) with proteinuria (≥ 0.3 g/day). Severe PE was defined by the presence of one or more of the following: (i) severe gestational hypertension (systolic pressure of ≥ 160 mmHg or diastolic blood pressure of ≥ 110 mmHg on two or more occasions after gestational week 20); or (ii) severe proteinuria (≥ 5 g protein in a 24-hour urine specimen or ≥ 3 g in two random urine samples collected ≥ 4 hours apart).

Processing of blood samples

Peripheral blood samples (2.5 ml) were collected in PAXgene blood RNA tubes (PreAnalytic, Hombrechtikon, Switzerland) and kept at room temperature for 3 hours, and then stored at -20°C until transport to Japan at -20°C . Molecular analysis was performed at the Department of Obstetrics and Gynecology, Showa University School of Medicine, Tokyo, Japan. RNA extraction was performed according to protocols described elsewhere.²⁴ In brief, cellular component samples were centrifuged twice at 4000 g for 10 minutes at room temperature in order to remove the entire supernatant and any mRNA present in residual plasma. The pellet was then washed, resuspended and incubated in optimised buffer solution containing proteinase K to digest protein. A second round of centrifugation was performed to remove any residual cell debris, and the resulting supernatant was transferred to a fresh microcentrifuge tube. Thereafter, 100% ethanol was added to the supernatant to adjust the binding conditions, and the resultant lysate was then applied to a PAXgene spin column (PreAnalytiX; PreAnalytic), resulting in selective binding of RNA to the silica-gel membrane of the spin column. After the column had been washed three times, pure RNA was eluted in 80 μl of RNase-free water.

Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Reverse transcription of mRNA was performed using an Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Real-time

quantitative PCR was then performed using a QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen). RT-PCR was performed according to the manufacturer's instructions. cDNA products were amplified by real-time quantitative PCR according to the manufacturer's instructions (QuantiTect Probe PCR kit, Qiagen) using a 2- μl aliquot of cDNA and the kit's components in a reaction volume of 20 μl . TaqMan PCR analyses for VEGF, Flt-1, ENG, PlGF, TGF β 1, P-selectin, placenta specific-1 (PLAC1), HO-1 and SOD were performed using predeveloped and commercially available primers and probe sets (Cat # Hs00900054_m1 for VEGF, Cat # Hs01052936_m1 for Flt-1, Cat # Hs00923997_g1 for ENG, Cat # Hs00182176_m1 for PlGF, Cat # Hs0000171257_m1 for TGF β 1, Cat # Hs00174583_m1 for P-selectin, TaqMan Probes for PLAC1 gene have been described previously,²¹ Cat # Hs00157965_m1 for HO-1 and Cat# Hs00166575_m1 for SOD; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The thermal cycling protocol used for PCR was as follows: initial denaturation at 95°C for 15 minutes, 40 cycles of denaturation at 94°C for 15 seconds and annealing at 60°C for 1 minute. Initially, each PCR assay was confirmed to be specific to mRNA and not to genomic DNA. Amplification data were collected and analysed with an ABI Prism 7900T Sequence Detector (Applied Biosystems). Each sample was analysed in duplicate, and multiple negative water blanks were included in every analysis. Quantification of gene expression was performed by investigators blind to the outcome of the pregnancy. The amounts of mRNA samples were expressed in term of copies per millilitre by the method reported elsewhere.²²

Statistical analysis

The distributions of the demographic characteristics and logarithmic mRNA concentrations were analysed after conversion to multiples of the median (MoMs). MoMs were also adjusted for the body mass index (BMI). Median values were stratified retrospectively according to the severity of PE and the development of HELLP syndrome. The non-parametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test) and Dunn *post hoc* test were used for comparisons among and between groups. The sensitivity and 1 - specificity rate (false positive rate) were calculated for each available marker using a univariate receiver operating characteristic (ROC) curve. A multivariate analysis was performed using logistic regression to calculate the odds for each woman for classification as a case. The logistic output was adjusted for the incidence of PE in the general population (2%) by calculation of the sampling fraction, as described by Collett.²⁵ Finally, a ROC curve for the calculation of multivariate sensitivity was built using, as the test variable, the calculated odds for PE by a logistic regression analysis for each woman in the series.