

日本産科婦人科学会雑誌 ACTA OBST GYNAEC JPN Vol. 48, No. 1, pp. 17-24, 1996 (平8, 1月)

Pregnancy-Associated Plasma Protein A (PAPP-A) の分離抽出

東京医科大学産科婦人科学教室

鈴木 良知 高田 淳子 井坂 恵一 高山 雅臣

ロンドン大学ロンドン・ホスピタル・メディカル・カレッジ産婦人科学教室

J.G. グルジンスカス

Isolation and Purification of Pregnancy-Associated Plasma Protein A

Yoshichika SUZUKI, Junko TAKADA, Keiichi ISAKA and Masaomi TAKAYAMA

Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Medical College, Tokyo

J.G. GRUDZINSKAS

Department of Obstetrics and Gynaecology, London Hospital Medical College, London

概要 我々は、ゲル濾過クロマトグラフィー・Heparin-Sepharose アフィニティークロマトグラフィー・DEAE-Sephacel クロマトグラフィーを用い、新たに開発した3段階クロマトグラフィー法によって、Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPP-A) を分離抽出した。最初に正常妊娠末期母体血清30ml 中の血清蛋白質をゲル濾過クロマトグラフィーによって分子量に従い分離した。ラジオイムノアッセイ (RIA) 法により、PAPP-A は高分子領域分画中に検出され、母体血清中総 PAPP-A 量の91%がゲル濾過クロマトグラフィーにより溶出回収された。次にこの PAPP-A 含有分画を Heparin-Sepharose アフィニティークロマトグラフィーを用い、それぞれ NaCl 0.15M, 0.30M 及び 0.60M 含有の 0.05M トリス緩衝液にて順次分離溶出した。NaCl 0.60M 緩衝液によりカラムに添加した総 PAPP-A 量の93% が回収された。さらにこの PAPP-A 含有分画を DEAE-Sephacel クロマトグラフィーを用い、それぞれ 0.15M, 0.30M 及び 0.45M NaCl 含有酢酸緩衝液 (pH 5.5) により順次分離溶出した。0.30M 緩衝液によりカラムに添加した総 PAPP-A 量の91%が回収された。最後に PAPP-A 含有分画を脱塩した後10倍に濃縮し、3.8 IU (1.7mg) の PAPP-A を得た。本法により母体血清中総蛋白量の99%が除去され、総 PAPP-A 量の74%が回収された。分離抽出操作の前後で総蛋白量に対する総 PAPP-A 量の比 (mIU : PAPP-A/mg : Protein) は526倍となり、純度 (mg : PAPP-A/mg : Protein) は68.4%となつた。精製された蛋白質は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) にて、200kDa 上の単一なバンドとして観察され、また Western blotting 法により、分離抽出された主な蛋白質が PAPP-A であることが示された。また交叉免疫電気泳動法及び Tandem 交叉免疫電気泳動法により、今回我々が分離抽出した PAPP-A は以前より使用してきた Teisner et al. による PAPP-A と免疫学的に相同であることが示された。今回新たな方法を用いて分離抽出された PAPP-A は純度が高いため、今後より鋭敏で簡便な測定系の開発と、標準品として広く利用されることが期待できると同時に、PAPP-A の生体内での生物学的役割を明らかにするための、基礎的研究に利用されると考えられる。

Synopsis We tried to purify pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) from normal term maternal serum in this study by means of a three step chromatographic procedure. At first 30ml of maternal serum samples were applied to a column for sieve chromatography and eluted according to molecular weight. PAPP-A was detected in the high molecular weight fraction area by radioimmunoassay for PAPP-A, and 91% of the total amount of PAPP-A in the maternal samples was recovered. Secondary PAPP-A containing fractions were applied to a Heparin-Sepharose column and eluted by a stepwise increase in NaCl 0.15, 0.30 and 0.60 M in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.8. Ninety-three percent of PAPP-A in applied samples was recovered under the 0.6 M NaCl condition. Thirdly the pooled fractions which contained PAPP-A after Heparin-Sepharose affinity chromatography were applied to DEAE-Sephacel Chromatography and eluted by a stepwise increase in NaCl

0.15, 0.30 and 0.45 M in 0.01 M acetate buffer, pH 5.5. Ninety-one percent of PAPP-A in applied samples was recovered under the 0.3 M NaCl condition. Finally PAPP-A containing fractions were concentrated 10 times and 3.8 IU (1.7mg) of PAPP-A was isolated. The purification schedule removed approximately 99% of total protein in the maternal serum while 74% of PAPP-A was recovered. The purification factor (fold), which was calculated as the increase in specific activity (mIU : PAPP-A/mg : protein) in comparison with the starting value in the maternal serum, was 526. And the purity (mg : PAPP-A/mg : protein) of the final product was 68.4%.

Analysis of the final purified material by SDS-PAGE showed a single band of 200kDa, and western blot analysis showed that the main purified protein was PAPP-A. The immunological identity of the PAPP-A purified in this study to the PAPP-A donated by Teisner et al., was recognized by crossed immunoelectrophoresis and tandem crossed immunoelectrophoresis. We hope that the new PAPP-A purified in this study can be utilized for the development of a sensitive and convenient assay for PAPP-A and its standard material, and also for basic study to clarify the biological function of PAPP-A in the human body.

Key words: Pregnancy-associated plasma protein A • Isolation • Purification

緒 言

Pregnancy-Associated Plasma Protein A (PAPP-A) は1974年 Lin et al.¹⁾によってヒト妊娠血清中より分離抽出された高分子量糖蛋白質である。PAPP-A はそれ自身に特徴的な分子量200 kDa のサブユニット 2 個とその各々に分子量 50~90kDa の Proform of eosinophil major basic protein (pro MBP) が結合したヘテロテトラマーであり、等電点は4.4~4.6、電気泳動で α_2 グロブリン分画を示し、19%の糖質を含有するヘパリン結合蛋白質であることが知られている^{1)~3)}。1994年に PAPP-A モノマーの1,547のアミノ酸配列が明らかにされたが³⁾その生物学的活性についてはいまだ不明な点が多い。母体血清中 PAPP-A 濃度は妊娠週数と共に上昇し、妊娠39週には50mg/l とピークに達する。妊娠期間中の PAPP-A の主な産生・分泌の場は胎盤絨毛の syncytiotrophoblast であることが、免疫組織学的に確認されている⁴⁾。また非妊娠においてもその卵胞液中及び卵管粘膜内に、さらに男子精漿中にもその存在が確認されている⁵⁾⁶⁾。今日までに母体血清中 PAPP-A 濃度の測定が、子宮外妊娠・自然流産などの妊娠初期の異常の診断に有効であるとの多くの報告がなされている⁷⁾が、ごく最近妊娠初期母体血清中の低 PAPP-A 濃度が染色体異常妊娠、特にダウン症候群と関連している、との報告が相次ぎ新たに脚光を浴びるようになっ

た^{8)~10)}。これまでに PAPP-A はラジオイムノアッセイ (RIA) 法を用いて測定されてきたが、より有効な測定系の開発が期待されると同時に、その生物学的活性が明らかにされることが望まれている。本研究では 3 種類のクロマトグラフィーを組み合わせることにより新たに PAPP-A を分離精製した。

研究材料と方法

1. 研究材料

妊娠38週~40週の正常妊娠 6 名よりインフォームドコンセントを得たうえで採取された母体血清 30ml を試料として用いた。

2. 研究方法

(1) PAPP-A の精製

【ゲル濾過クロマトグラフィー】

Degaussed Ultrogel ACA 34 (L' Industrie Biologique Francaise, France) を 5.0 × 100cm のカラム (Pharmacia, Australia) に 0.15M NaCl 含有 0.05M トリス緩衝液 (pH 7.8) を用い、流出速度 60ml/h にて充填した。Total bed volume (Vt) は 1.5l, Void volume (VO) は 0.6l であった。妊娠血清 30ml をカラムに添加し、溶出した各々 10ml 分画中の蛋白量を UV 法 (absorption : 280nm) 及び抗ヒト血清抗体を用いたロケット免疫電気泳動法にて評価した。一方 PAPP-A 量は既存の RIA 法¹¹⁾にて測定し、PAPP-A の含まれる高分子量域の分画 300ml を回収した。

1996年1月

鈴木他

19

[Heparin-Sepharose アフィニティーコロマトグラフィー]

Heparin-Sepharose (CL-6B, Pharmacia, Sweden) を0.15M NaCl 含有0.02M トリス緩衝液 (pH 7.2) にて, 2.6×25cm のカラムに充填した。同じ緩衝液を用い流出速度35ml/h にてカラムの洗浄及び平衡化を行った後, サイズクロマトグラフィーにて分離された PAPP-A 含有分画300 ml をカラムに添加した。カラム中のヘパリン結合蛋白はそれぞれ0.15M, 0.30M, 0.60M 及び0.90M NaCl 含有0.02M トリス緩衝液 (pH 7.2) により順次溶出された。溶出された各々2ml 分画中の蛋白量をUV 法及び融合ロケット免疫電気泳動法にて, PAPP-A 量をRIA 法にて測定し, PAPP-A の含まれる分画20ml を回収した。

[DEAE-Sephacel クロマトグラフィー]

DEAE-Sephacel (Pharmacia, Sweden) を, 0.01M トリス緩衝液 (pH 7.2) にて, 2.6×30cm のカラムに充填した。カラムの洗浄・平衡化の後, Heparin-Sepharose アフィニティーコロマトグラフィーにて得られた PAPP-A 含有分画20ml を10倍に希釈して得られた全量200ml をカラムに添加した。0.15M, 0.30M 及び0.45M NaCl 含有酢酸緩衝液 (pH 5.5) を用い, 流出速度42ml/h にて順次蛋白を溶出した。溶出された各々2ml の分画中の蛋白量及びPAPP-A 量を測定した。

[脱塩・濃縮]

DEAE-Sephacel クロマトグラフィーにより回収された PAPP-A 含有分画20ml を透析法により脱塩した後, 遠心分離式濃縮器 (Centriprep 100, Amicon, USA) にて10倍に濃縮した。

(2) 免疫電気泳動法

ロケット免疫電気泳動法及び交叉免疫電気泳動法は共に厚さ1.5mm の1%アガロースゲルを作成し, 0.02M トリス・バービタル緩衝液 (pH 8.6) の泳動緩衝液を用いて行われた。泳動後のゲルはプレス・乾燥された後クマシー・ブリリアントブルーにて染色した。

[ロケット免疫電気泳動法]

ゲル中の抗ヒト血清抗体 (Dako Immunoglobulins, Denmark) の希釈度は1:50, 抗 α_2 -マ

クログロブリン抗体 (Chemicon International, Inc., USA), 抗アンチトロンビンIII(AT III) 抗体 (Chemicon International, Inc., USA) 及び抗PAPP-A 抗体 (Dako Immunoglobulins, Denmark) の希釈度は1:100とした。泳動は2.5V/cm の電圧にて18時間行った。

[交叉免疫電気泳動法]

1次元の泳動は10V/cm の電圧にて40分, さらにゲル中の抗PAPP-A 抗体の希釈度を1:100とした2次元の泳動は, 2.5V/cm の電圧にて18時間行った。

(3) ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

10%のゲルを用い, 各段階のクロマトグラフィーにより溶出された試料を泳動した。

(4) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)

8%のゲルを使用し, 泳動は Laemmli et al. の方法を用いた。分離抽出された PAPP-A 5 μ l を非還元及び1% Mercaptoethanol による還元下にて泳動した。

(5) Western blotting 法

SDS-PAGE 後, セミドライ・プロッティング法によりニトロセルロース膜に転写された蛋白質を, 100倍希釈の抗PAPP-A 抗体により免疫染色した。

結果

5,120mIU の PAPP-A を含有する妊娠末期母体血清30ml のゲル濾過クロマトグラフィーによる溶出経過を図1に示す。PAPP-A は高分子領域 (分画 No. 64~No. 95) に溶出が観察され, 総PAPP-A 量の91% (4,650mIU) が回収された。Heparin-Sepharose アフィニティーコロマトグラフィーの溶出結果を図2に示す。0.60M NaCl 含有トリス緩衝液にて, このカラムに添加された総PAPP-A 量の93% (4,310mIU) が回収されたが, ヘパリン結合性を示さない蛋白質の大部分は0.15M NaCl 含有トリス緩衝液にて溶出除去された。DEAE-Sephacel クロマトグラフィーによる溶出経過を図3に示す。このカラムに添加した総PAPP-A 量の91% (3,920mIU) が0.30M NaCl 含有酢酸緩衝液 (pH 5.5) により溶出回収された。

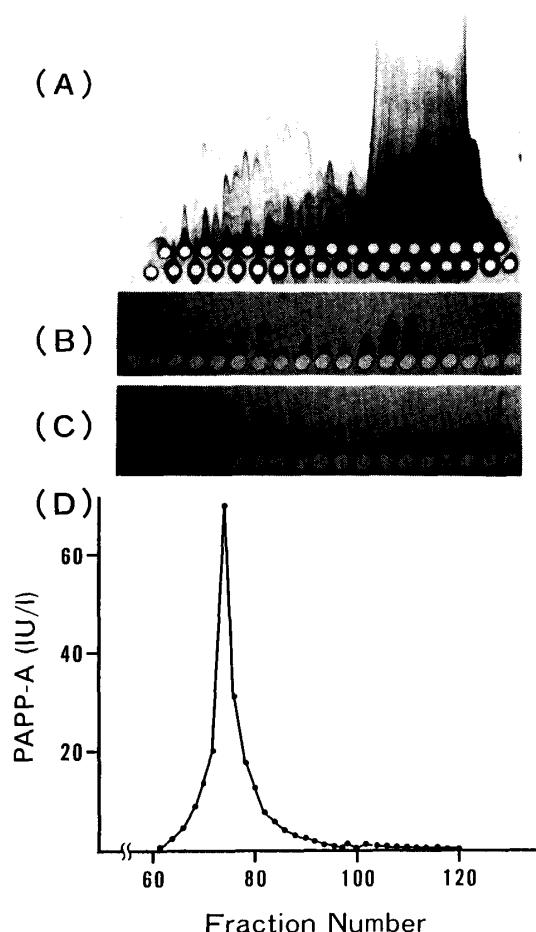


図1 ゲル濾過クロマトグラフィーによる妊娠末期母体血清中蛋白質の分離。総蛋白質(A), アンチトロンビンⅢ(B), α_2 -マクログロブリン(C)の分離溶出をロケット免疫電気泳動法により, またPAPP-Aの溶出経過をRIA法(D)により示した。

このPAPP-A含有分画20mlは透析法により脱塩された後, 遠心分離式濃縮器にて10倍に濃縮され, 3,800mIU (1.7mg) のPAPP-A (2ml) が分離抽出・精製された。本法により母体血清中総蛋白量の99%が除去され, 総PAPP-A量の74%が回収されたことになり, 分離抽出操作の前後で総蛋白量に対する総PAPP-A量の比 (mIU: PAPP-A/

表1 Pregnancy-Associated Plasma Protein A (PAPP-A)の精製

	容積 (ml)	全蛋白質量 (mg)	全活性 (mIU)	比活性 (mIU/mg)	精製倍率
妊娠末期母体血清	30	1,770	5,120	2.89	1.0
ゲル濾過クロマトグラフィー	300	150	4,650	31.0	10.7
Heparin-Sepharose アフィニティーコロマトグラフィー	20	22.4	4,310	192.4	66.6
DEAE-Sepharose クロマトグラフィー	20	8.9	3,920	440.4	152.4
Centriprep 100による濃縮	2	2.5	3,800	1,520	526.0

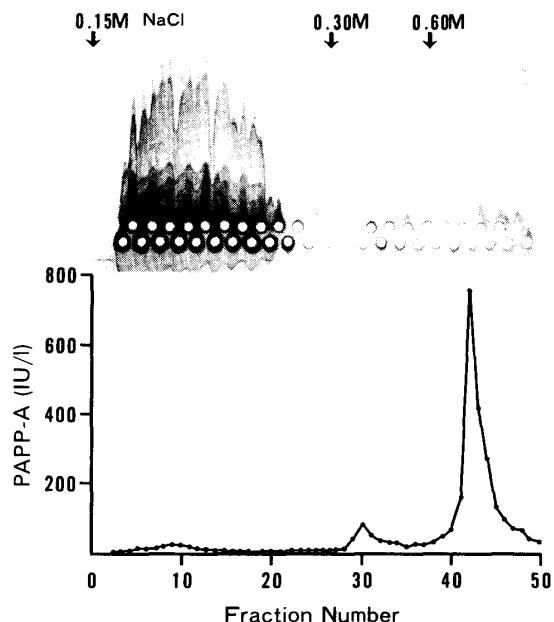


図2 Heparin-SepharoseアフィニティーコロマトグラフィーによるPAPP-Aの分離。総蛋白質はロケット免疫電気泳動法にて, またPAPP-AはRIA法にて示した。

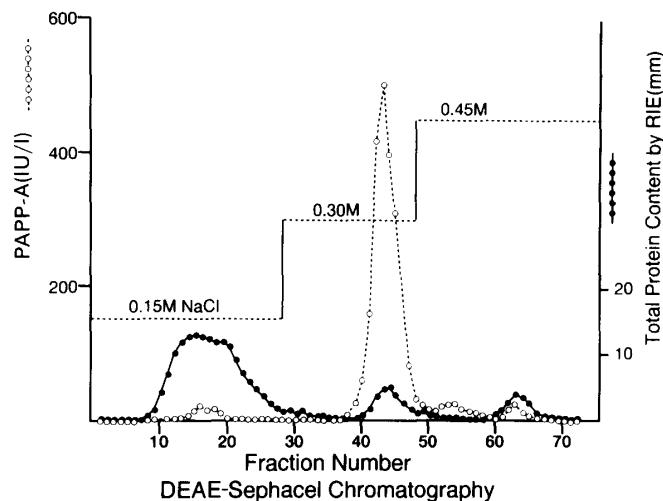


図3 DEAE-SepharoseクロマトグラフィーによるPAPP-Aの分離。総蛋白質はロケット免疫電気泳動法によるロケットの長さにより, またPAPP-AはRIA法にて測定した。

1996年1月

鈴木他

21

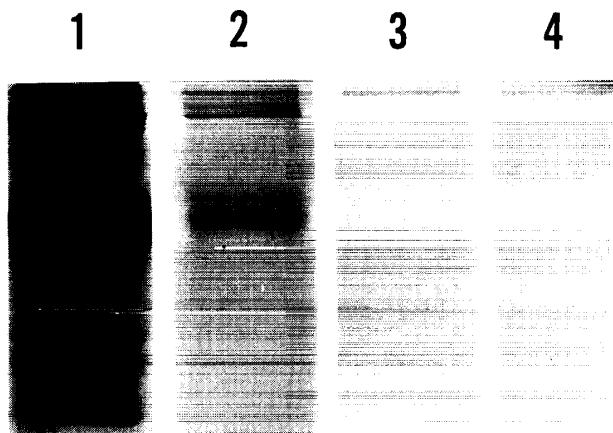


図4 3種類のクロマトグラフィーによるPAPP-A分離過程のポリアクリルアミドゲル電気泳動法による評価。1:妊娠末期母体血清, 2:ゲル濾過クロマトグラフィー後, 3:Heparin-Sepharoseクロマトグラフィー後, 4:DEAE-Sephadexクロマトグラフィー後。

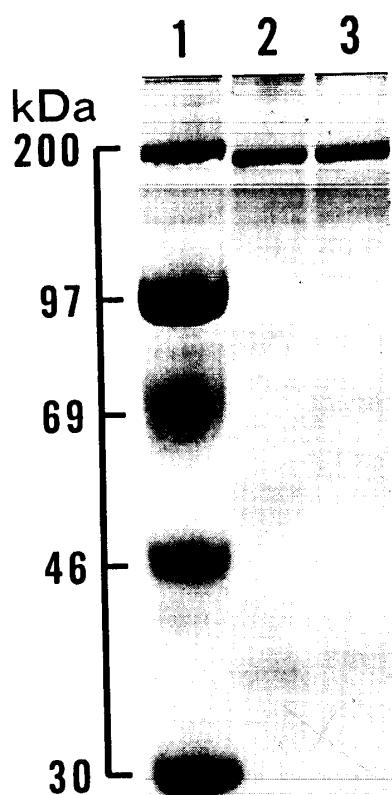


図5 精製された蛋白質の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法。1:Marker Protein, 2:非還元下(5μl), 3:還元下(5μl)。

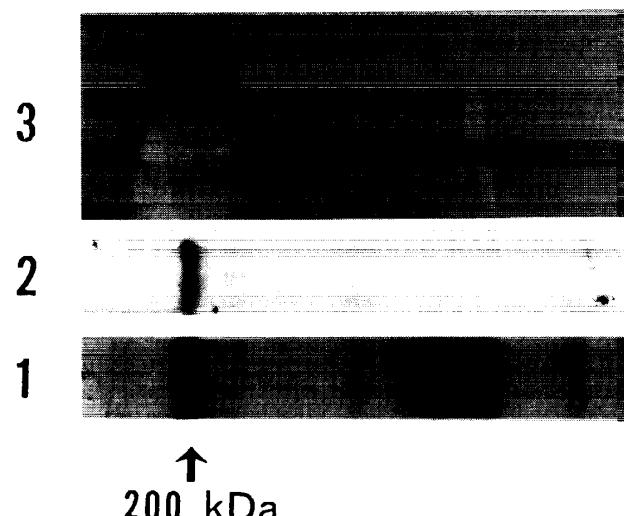


図6 精製された蛋白質の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(1)後のWestern blotting法(2)およびロケット免疫電気泳動法(3)。

mg: Protein) は526倍となった(表1)。分離抽出の各段階で得られた溶出液をサンプルとしたポリアクリルアミドゲル電気泳動を図4に示す。DEAE-Sephadexクロマトグラフィー後には、ほぼ単一なバンドが観察された。精製された蛋白質の SDS-PAGE(図5)及びWestern blotting法・ロケット免疫電気泳動法(図6)により、分子量200kDa上に単一なバンドとロケットが確認された。交叉免疫電気泳動法(図7a)により、Teisner et al. によるPAPP-A(A)と今回我々が精製したPAPP-A(B)とを比較したところ、相同な蛋白移動を示す形状が得られ、またTandem交叉免疫電気泳動法(図7b)にて両者間に免疫学的相同性が認められた。

考 察

これまでに多くの研究者によってPAPP-Aの分離抽出法が開発されてきたが²⁾¹²⁾¹³⁾、我々は新たにDEAE-Sephadexクロマトグラフィーを用いることによりPAPP-Aを分離抽出した。PAPP-Aの抽出の過程でPAPP-Aと生化学的特徴が類似する α_2 -マクログロブリンとヘパリン結合蛋白質であるAT IIIを分別すべき蛋白質のモチーフとして用いた。まず最初にゲル濾過クロマトグラフィーにより血清蛋白を高分子量なものから低分子量のものへ順次溶出した。ここではPAPP-Aが

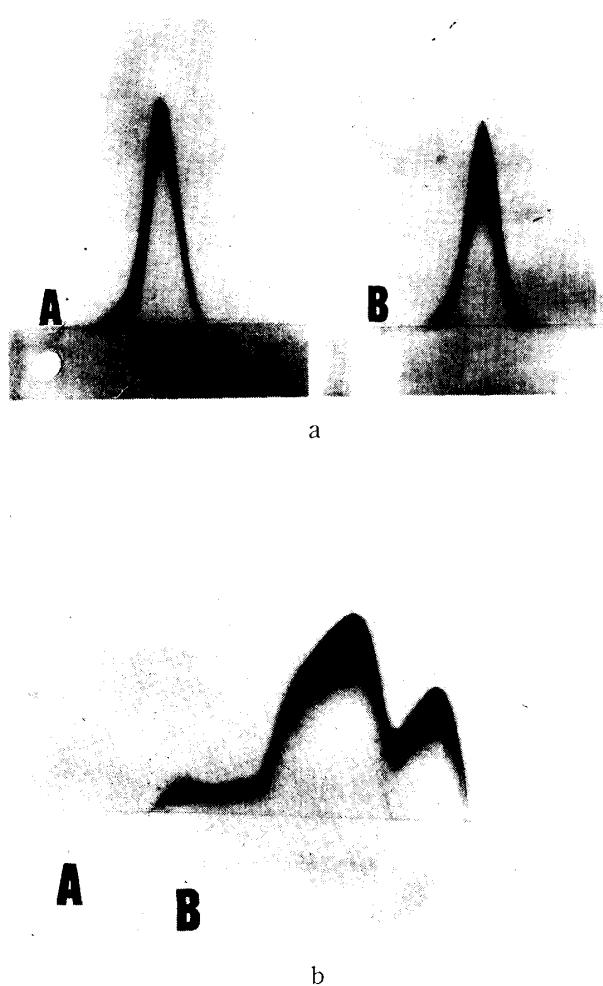


図7 a: 交叉免疫電気泳動法。(A) Teisner et al. より提供された PAPP-A: 10 μ l. (B) 我々が精製した PAPP-A: 4 μ l. b: Tandem 交叉免疫電気泳動法。(A) Teisner et al. より提供された PAPP-A: 9 μ l. (B) 我々が精製した PAPP-A: 3 μ l.

200kDa 以上の高分子量蛋白質であることから、ゲルは Ultrogel AcA 34を用い、添加された血清試料30ml がカラム容積 (Vt: 1.5l) の 2 %となるように充填した。 α_2 -マクログロブリンは PAPP-A と同様に高分子領域に溶出したが、血清中の主要な蛋白であるアルブミン及び AT III はより低分子領域に溶出した(図1)。次にゲル濾過クロマトグラフィーにより溶出された PAPP-A を含む高分子領域分画を Heparin-Sepharose アフィニティーコロマトグラフィーに添加した(図2)。その試料中 PAPP-A の93%が0.60M NaCl 含有トリス緩衝液により溶出回収されたが、 α_2 -マクログロブリンのようにヘパリン結合性を示さない大部分の蛋白質は0.15M NaCl 含有緩衝液にて溶出し

た。さらに AT III は Teisner et al. の報告¹⁴⁾と同じく 0.90M NaCl 含有緩衝液にて溶出した。イオン交換クロマトグラフィーによる PAPP-A の分離は、その等電点が4.4~4.6である¹⁾²⁾ことを利用し、pH 5.5の0.15M NaCl 含有酢酸緩衝液にて試料中の PAPP-A を DEAE イオン交換体に吸着させ、Cl イオン濃度を変化させることにより行った。PAPP-A は 0.30M NaCl 含有酢酸緩衝液(pH 5.5) において、試料中 PAPP-A の91%が回収された(図3)。一方 α_2 -マクログロブリンはその等電点が5.2であり、pH 5.5の緩衝液中ではより安定化しているため、より高濃度の NaCl 下にて溶出されると考えられる。最終的に脱塩後濃縮された精製品の総蛋白量(mg)に対する総 PAPP-A 量(IU) の比は、母体血清中におけるその比の526倍(精製倍率)を示した。また Bohn et al. によって定義された PAPP-A 量100mIU=45 μ g¹⁵⁾より、抽出した PAPP-A の純度 (mg : PAPP-A/mg : Protein) は68.4%であり、妊娠末期母体血清30ml より 1.7mg の PAPP-A が精製された。今回我々が新たに開発した PAPP-A の精製法は、一度の精製操作において、これまでの諸家らの報告よりもより多量で高純度の PAPP-A を抽出するのに成功した。

我々が精製した蛋白質の SDS-PAGE(図5)及び Western blotting 法・ロケット免疫電気泳動法(図6)にて、その200kDa 上の蛋白質が PAPP-A の単一のバンドであることが確認され、また免疫電気泳動法により Teisner et al. による PAPP-A と我々が精製した PAPP-A とは免疫学的に相同であることが示された(図7)。我々が精製した PAPP-A と Teisner et al. の PAPP-A をクロラミン-T 法を用いヨウ素化し、共に RIA 法の抗体希釈曲線を作成したところ、最大結合率において、我々の PAPP-A では95%、Teisner et al. の PAPP-A では86%と差が認められたが、これは我々の PAPP-A がより高純度であることを意味すると同時に、より精度の高い有効な RIA 法の確立が可能であることを意味する。

PAPP-A の生体内動態は以前より多くの研究者により、免疫組織学的手法や RIA 法による体液

1996年1月

鈴木他

23

中・組織中濃度測定により明らかにされてきた。特に妊娠期間を通じて胎盤の syncytiotrophoblast より生成・分泌されており、母体血中 PAPP-A 濃度はその他の多くの妊娠関連蛋白質 (human placental lactogen(hPL), pregnancy-specific β 1 glycoprotein (SP1), placental protein 5 (PP5), PP10, PP19, PP21, fetal antigen 1(FA1) など) と同様に妊娠週数と共に上昇し、妊娠末期には 50 mg/l に達するため、PAPP-A が胎児発育の指標の一つとして有用であるという報告が多い。特に、Grudzinskas et al. のグループは、妊娠初期において、超音波断層検査にて胎児心拍確認後胎児死亡に至る症例、子宮外妊娠症例などの異常妊娠において母体血清中 PAPP-A 濃度が有意に低値を示すことを報告している⁷⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。さらに最近ダウン症候群合併妊娠において妊娠初期母体血清中 PAPP-A 濃度が有意に低値を示すという報告が相次ぎ、PAPP-A がダウン症候群スクリーニングの有効なマーカーであることが明らかとなってきた⁹⁾¹⁰⁾。近年の出生数の減少、さらに高齢妊娠の増加に伴い、胎児の異常、特にダウン症候群などの染色体異常児の検査・診断の重要性が増大してきており、米国を初めとする先進国では妊娠中期に母体血清中の human chorionic gonadotrophin (hCG), alpha feto-protein (AFP) 及び非結合型エストリオール (uE3) を測定する triple marker test が繁用されるようになってきている¹⁸⁾。一方 PAPP-A のダウン症候群診断の有用性は妊娠 10 週～13 週の妊娠初期に認められ、PAPP-A 単独測定にて偽陽性発生率 5 % でダウン症候群検出率が 60% に達し、さらにダウン症候群で高値を示すことが知られている free β -hCG と PAPP-A の double marker test では検出率が 85% に上昇するとの報告¹⁹⁾があり、早期診断、検出率からみても、より優れたスクリーニング法であり、今後繁用されるようになると思われる。PAPP-A の生物学的活性はいまだ明らかにされていないが、PAPP-A は多くのメタロプロテネースと同様に Zn²⁺ を含んでおり何らかの酵素活性をもっていることを示唆する報告がみられる³⁾。また免疫抑制作用、顆粒球エラスター・インヒビターとしての役割を指

摘する報告²⁰⁾²¹⁾もみられ母児間の接点である胎盤において重要な役割を演じていることが示唆される。さらに PAPP-A は卵胞液中、男子精液中(精子)にも存在し、排卵・受精・着床というヒト発生のごく初期において、生体内で何らかの作用を発現しているようである。

今後我々の精製した PAPP-A は、より有効な測定系の開発に利用され、広く臨床応用されることが期待できると同時に、PAPP-A の生体内での生物学的活性を明らかにするために、基礎的研究にも利用できると考えられる。

文 献

1. Lin TM, Halbert SP, Kiefer D, Spellacy WN, Gall S. Characterisation of four pregnancy-associated plasma proteins. *Am J Obstet Gynecol* 1974; 118: 223-236
2. Bischof P. Purification and characterisation of pregnancy-associated plasma protein A(PAPP-A). *Arch Gynaek* 1979; 227: 315-326
3. Torsten K, Claus O, Ole S, Niels PHM, Lars SJ. Amino acid sequence of human pregnancy-associated plasma protein-A derived from cloned cDNA. *Biochemistry* 1994; 33: 1592-1598
4. Lin TM, Halbert SP. Placental localization of human pregnancy-associated plasma proteins. *Science* 1976; 193: 1249-1252
5. Sinosich MJ, Porter R, Sloss P, Bonafacio MD, Saunder DM. Pregnancy-associated plasma protein A in human ovarian follicular fluid. *J Clin Endocr Metab* 1984; 58: 500-504
6. Bischof P, Martin-Du-Pan R, Lauber K, Girard JP, Herrmann WL, Sizonenko PC. Human seminal plasma contains a protein which shares physicochemical, immunochemical and immunosuppressive properties with pregnancy-associated plasma protein A. *J Clin Endocr Metab* 1983; 56: 359-362
7. Grudzinskas JG, Westergaard JG, Teisner B. Pregnancy-associated plasma protein A in normal and abnormal pregnancy. In: Bichof, Klopfer, eds. *Protein of the Placenta*. 5th Int Congr on Placental Proteins, Annecy 1984; 184-197
8. Wald NJ, Stone R, Cuckle HS, Grudzinskas JG, Barkai G, Brambati B, Teisner B, Fuhrmann W. First trimester concentrations of pregnancy-associated plasma protein A and placental protein 14 in Down's syndrome. *Br Med J* 1992; 305: 28

9. Brambati B, Macintosh MCM, Teisner B, Maguiness S, Shrimanker K, Lanzani A, Bonacchi I, Tului L, Chard T, Grudzinskas JG. Low maternal serum level of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) in the first trimester in association with abnormal fetal karyotype. *Br J Obstet Gynecol* 1993; 100: 323-326
10. Bersinger NA, Brizot ML, Johnson A, Snijders RJM, Abbott J, Schneider H, Nicolaides KH. First trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein A and pregnancy-specific β 1-glycoprotein in fetal trisomies. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101: 970-974
11. Sinosich MJ, Teisner B, Folkersen J, Saunders DM, Grudzinskas JG. Radioimmunoassay for pregnancy associated plasma protein A. *Clin Chem* 1982; 28: 50-53
12. Folkersen J, Grudzinskas JG, Hindersson P, Teisner B, Westergaard G. Purification of pregnancy-associated plasma protein-A by a two step affinity chromatographic procedure. *Placenta* 1981; 2: 11-18
13. Davey MW, Teisner B, Sinosich M, Grudzinskas JG. Interaction between heparin and human pregnancy-associated plasma protein A(PAPP-A): A simple purification procedure. *Analytical Biochemistry* 1983; 131: 18-24
14. Teisner B, Davey MW, Grudzinskas JG. Interaction between heparin and plasma proteins analysed by crossed immunoelectrophoresis and affinity chromatography. *Clinica Chemica Acta* 1983; 127: 413-417
15. Bohn H, Grudzinskas JG, Rosen S, Seppala M, Tatarinov YS, Chard T, Klopper A, Schultz-Larsen P, Sizaret P, Teisner B. Reference preparation for assay of some pregnancy and cancer associated proteins. *Lancet* 1980; 2: 796
16. Westergaard JG, Sinosich MJ, Bugge M, Madsen LT, Teisner B, Grudzinskas JG. Pregnancy-associated plasma protein A in the prediction of early pregnancy failure. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 145: 67-69
17. Sinosich MJ, Ferrier A, Teisner B, Porter R, Westergaard JG, Saunders DM, Grudzinskas JG. Circulating pregnancy-associated plasma protein A and its tissue concentrations in tubal ectopic gestation. *Clin Reprod Fertil* 1985; 3: 311-317
18. Palomaki GE, Knight GJ, McCarthy J, Haddow JE, Eckfeldt JH. Maternal serum screening for fetal Down syndrome in the United States: A 1992 survey. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 1558-1562
19. Brambati B, Tului L, Bonacchi I, Suzuki Y, Shrimanker K, Grudzinskas JG. Biochemical screening for Down's syndrome in the first trimester. In: Grudzinskas JG, Chard T, Chapman M, Cuckle H, eds. *Screening for Down's Syndrome*. Cambridge: Cambridge University Press, 1994; 285-294
20. Martin-Du-Pan RC, Bischof P, Bourrit B, Lauber K, Girard JP, Herrmann WL. Immunosuppressive activity of seminal plasma and pregnancy-associated plasma protein-A(PAPP-A) in men. *Arch Androl* 1983; 10: 185-188
21. Sinosich MJ, Davey MW, Ghosh P, Grudzinskas JG. Specific inhibition of human granulocyte elastase by human pregnancy-associated plasma protein-A. *Biochem Int* 1982; 5: 777-786

(No. 7688 平7・9・11受付)