2－Hydroxyestriolの特異的Radioimmunoassayの開発および正常妊婦血中濃度の測定

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 堀川, 裕弘
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7784

金沢大学十全医学会誌　第94巻　第2号　329－342　(1985)

2－Hydroxyestriol の特異的 Radioimmunoassay の開発および正常妊婦血中濃度の測定

金沢大学医学部内科学第三講座（主任：松田　保教授）
堀　川　裕　弘

(昭和60年2月14日受付)

特異的で感度の良い 2-hydroxyestriol (2-OHE_3) のラジオイムノアッセイ（RIA）を開発し，正常妊婦血漿中における 2-OHE_3濃度を測定した．血漿中 2-OHE_3は 10 人の正常妊婦で妊娠の経過を追って測定し，同時にエストロン (E_1)，エストラジオール (E_2)，エストリオール (E_3) も測定した．2-OHE_3-6-(O-carboxymethyl) oxime-bovine serum albumin を抗原として 2-OHE_3に特異的な抗体を作製した．2-OHE_3は血漿から酢酸エチルで抽出し，Sephadex LH-20 カラムを用い，ベンゼン：メタノール (89：11，アスコルビン酸飽和）にて溶出分離した．RIA は 0.05%のアスコルビン酸を含む緩衝液を使用し，8,000 cpm の [^{3}H]2-OHE_3と 5,000 倍に希釈した抗血清を用い，標識抗原の結合型と遊離型の分離には dextran coated charcoal を用いた．標準曲線は log-logit のグラフ上で 10 pg から 1,000 pg の範囲で直線性を示した．このアッセイの感度は 10 pg でアッセイ間の変動係数は 13.2%であった．確度はプールした血漿に既知の量の 2-OHE_3を添加して測定した．全回収率の平均は 114.3±12.8%であった．2-OHE_3の血漿中濃度は男子では 25.4±2.7 pg/ml (n = 4)，非妊婦では 24.4±3.7 pg/ml (n = 5) であり，妊婦においては，妊娠前期では 48.2±18.0 pg/ml (n = 8)，中期では 81.0±32.8 pg/ml (n =38)，後期では 158.3±66.1 pg/ml (n =52) であった．2-OHE_3は妊娠 15 週頃から次第に増加し，30 週以後急激な増加を示した．E_1, E_2, E_3は妊娠中期より後期にかけて次第に増加したが E_3においては 30 週以後その増加は著明であった．E_1, E_2および E_3の 2-OHE_3に対する比は妊娠の進行とともに増加した．このように妊娠の経過において 2-OHE_3の増加率が低いことは 2-OHE_3の代謝がきわめて速い事によると考えられる．本研究は 2-OHE_3の血漿中濃度を RIA で測定した最初の報告である．最近の研究によればカテコールエストロゲンはプライマリー　エストロゲンの単なる代謝産物ではなく，それ自身に強力な生物学的および内分泌学的活性を有することが示唆されている．したがってカテコールエストロゲンの RIA はこの独特なエストロゲン代謝産物の生理的役割を明らかにする上で重要な方法になると思われる．

Key words　radioimmunoassay, 2-hydroxyestriol, catecholestrogen, estrogen, pregnancy

エストロゲンの A 環の 2 または 4 位が水酸化されたカテコールエストロゲンはプライマリーエストロゲンであるエストロン (E_1)，エストラジオール (E_2)，エストリオール (E_3) の主要代謝産物である事は，Gallagher や Fishman らのグループにより明らかにされていたが[1)~4)]，その生理的意義については必ずしも明らかではなかった．しかし，近年カテコールエストロゲンがカテコールアミンの主要代謝酵素である catechol-O-methyltransferase (COMT) および tyrosine hydroxylase の強力な抑制物質であること[5)~9)]，プロスタグランディン (PG) の合成を促進し代謝を抑制すること[10)11)]，ゴナドトロピンおよびプロラクチン

Abbreviations : BSA, bovine serum albumin ; DCC, dextran coated charcoal ; E_1, estrone ; E_2, estradiol ; E_3, estriol ; MCR, metabolic clearance rate ; 2-OHE_1, 2-hydroxyestrone ; 2-OHE_2, 2-hydroxyestradiol ; 2-OHE_3, 2-hydroxyestriol ; PBS, phosphate buffer with saline ; PG, prostaglandin ; RIA, radioimmunoassay ; S.A., specific activity.

刺激と抑制機序に関与すること[12)~19)]を示唆する報告が相次ぎ，カテコールエストロゲンの生理的意義が注目されるようになった．この意味でカテコールエストロゲンの正確な血中，尿中，組織内レベルを知ることはきわめて重要な問題であり，近年その一つの方法として血中および尿中 2-hydroxyestrone (2-OHE_1), 2-hydroxyestradiol (2-OHE_2) の特異的で感度の良いラジオイムノアッセイ（RIA）が報告された[20)~25)]．

一方プライマリー エストロゲンである E_1, E_2, E_3は妊娠時にはその経過とともに著増し，末期には尿中のE_1, E_2は非妊娠黄体期の 100 倍，E_3は 1,000 倍にも達する．特にE_3は一般にはE_1, E_2の代謝産物であるが，妊娠時には主に胎児－胎盤系で生成され，母体血中に移行し尿中に排泄される．したがってE_3の生成と排泄にいたるまでの系は「胎児・胎盤ユニット」を構成要素とする妊娠状態そのものであり，臨床的にはE_3の尿中濃度は胎児－胎盤－母体機能の総合的指標となっている．

本研究では，E_3より生成されるカテコールエストロゲンである 2-hydroxyestriol (2-OHE_3) の特異的で感度の良い RIA を開発し，この方法で正常妊婦血中濃度を測定し，同一検体においてプライマリー エストロゲンであるE_1, E_2, E_3を同時測定し比較検討を行ったので報告する．

対象および方法

I．対　象

血圧，検尿など理学的，一般臨床検査に異常のないことを確認した 20－40 歳の正常男子，黄体期女子および正常妊婦を対象とし，午前 8 時から 10 時の間に肘静脈より，EDTA, アスコルビン酸加真空採血管に採血，直ちに冷水中で冷却後冷却遠心した．血漿は測定まで－20°Cに凍結保存した．

II．各種エストロゲンの測定方法

1．溶媒，試薬

溶媒はすべて和光純薬社製を用い，エタノール，エチルエーテルは特級を，ベンゼン，メタノール，酢酸エチルはクロマトグラフ用をそのまま使用した．アスコルビン酸，charcoal (Norit A) は和光純薬，dextran および bovine-γ-globulin は生化学工業，Sephadex LH-20 は Pharmacia 社より購入し，そのまま純化せずに使用した．E_1, E_2, E_3の純品は Sigma 社より購入し純化せず使用した．2-OHE_3は Stubenrauch ら[26)]の方法にて次のように合成した．まずE_3の 2 位をニトロ化し，ニトロ基を還元化ののちオルソアミノフェノールに相当する部分を逆酸化法によりオルソジオキシベンゼンに変換し，その部分を還元化することにより 2-OHE_3を合成し，薄層クロマトグラフィーにて精製した．

[2,4,6,7-^{3}H]E_1 (specific activity, S.A., 88.5 Ci/mM), [2,4,6,7-^{3}H]E_2 (S.A., 110.0 Ci/mM), [2,4,6,7-^{3}H]E_3 (S.A., 90.0 Ci/mM) は New England Nuclear 社より購入した．[6,7-^{3}H]2-OHE_3は Jellinck ら[27)]の方法に従い，[6,7-^{3}H]E_3 (S.A., 58.0 Ci/mM, New England Nuclear 社) より合成した．すなわち[^{3}H]E_3を NADH 存在下に 0.1 M Tris-HCl 緩衝液中で mushroom tyrosinase (Sigma 社) と反応させて合成し，Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにて精製した．

アスコルビン酸緩衝液（pH 7.4）は Kono ら[23)]の方法で，0.01 M 燐酸緩衝液（pH 7.4, phosphate buffer with saline, PBS）は Nishina ら[28)]の方法で調製した．RIA の標識抗原の結合型と遊離型の分離には dextran coated charcoal (DCC) 懸濁液を攪拌しながら使用したが，2-OHE_3ではアスコルビン酸緩衝液に，またE_1, E_2, E_3では PBS に，それぞれ charcoal 0.625%, dextran 0.0625%の割合で加えたものを用いた．

2．各種エストロゲンに対する抗血清

1）2-OHE_3 に対する抗血清

抗 2-OHE_3 血清はすでに報告[29)]したように，2-OHE_3-6-(O-carboxymethyl) oxime-bovine serum albumin(BSA) conjugateを家兎に免疫して得られたもので RIA にはアスコルビン酸緩衝液で 5,000 倍に希釈して使用した．

2）E_1, E_2, E_3に対する抗血清

抗E_1, E_2, E_3血清は Steraroids 社より購入したE_1, E_2, E_3-6-(O-carboxymethyl) oxime-BSA conjugate を家兎に反復免疫して作製した．この血清を凍結乾燥して保存し，RIA にはE_1は 0.27 mg, E_2は 0.17 mg, E_3は 0.25 mg を 100 ml の PBS に溶解して使用した．

3．各種エストロゲンの抽出

1）2-OHE_3の抽出

2-OHE_3の抽出には 2 ml の血漿を用い，回収率測定用 [^{3}H]2-OHE_3を 600 cpm 加え，15 ml の酢酸エチルで抽出した．抽出液は 45°C以下の水浴中，窒素気流下にて乾固した．

2）E_1, E_2, E_3の抽出

E_1, E_2, E_3の抽出には血漿 0.1－0.5 ml を用い，回収率測定用 [^{3}H]E_1, [^{3}H]E_2, [^{3}H]E_3をそれぞれ 1.000 cpm 加え，エチルエーテル 6 ml で 2 回抽出し，50°C以下の水浴中で窒素気流下に乾固した．

4．各種エストロゲンのカラム クロマトグラフィー

1）2-OHE_3のカラム クロマトグラフィー

2-OHE_3の抽出分離の概略は図 1 に示したように，分

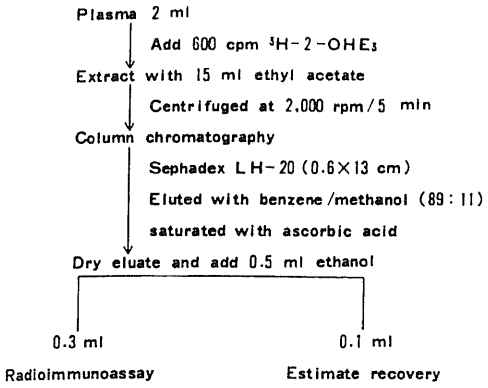

Fig. 1. Extraction and purification of 2-OHE$_3$ from plasma.

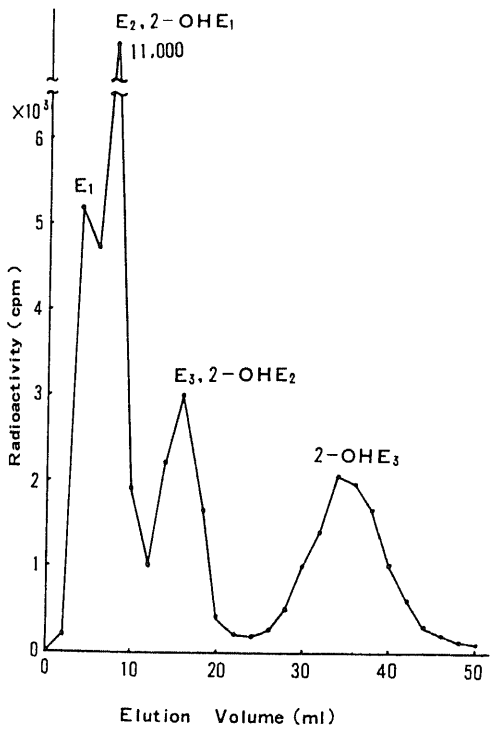

Fig. 2. Elution pattern of [^{3}H]steroids. [^{3}H]E$_1$, [^{3}H]E$_2$, [^{3}H]E$_3$, [^{3}H]2-OHE$_1$, [^{3}H]2-OHE$_2$ and [^{3}H]2-OHE$_3$ were applied to Sephadex LH-20 column (0.6×13 cm) and eluted with benzene/methanol (89 : 11, saturated with ascorbic acid).

離にはSephadex LH-20カラム クロマトグラフィーを使用した．Sephadex LH-20はベンゼン：メタノール(89：11)で一昼夜膨潤させた後，内径0.6 cmのカラムに高さ13 cmまで充塡した．溶出溶媒はアスコルビン酸飽和ベンゼン：メタノール (89：11) を使用し，カラムは使用前に溶出溶媒にて充分に洗浄した．そして抽出乾固した試料を0.2 mlの溶出溶媒に溶解，カラムにのせ，栓を開いて吸着させた．同様の操作を2回繰り返した後，溶出溶媒で溶出した．溶出曲線は図2に示したが，2-OHE$_3$は他の近縁ステロイドから完全に分離され2-OHE$_3$分画として28－42 mlを使用した．2-OHE$_3$分画は乾固後0.5 mlのエタノールを加え溶解，0.1 mlを回収率測定用に，0.3 mlをRIAに使用した．

2）E$_1$, E$_2$, E$_3$のカラム クロマトグラフィー

E$_1$, E$_2$, E$_3$の抽出分離の概略は図3に示した．Sephadex LH-20を溶出溶媒であるベンゼン：メタノール（9：1）で一昼夜膨潤させた後，内径0.8 cmのカラムに高さ10 cmまで充塡し，2-OHE$_3$と同様の操作にてE$_1$, E$_2$, E$_3$を溶出分離した．溶出曲線は図4に示した．E$_1$, E$_2$, E$_3$の分画としてそれぞれ4－8 ml, 10－15 ml, 25－35 mlを使用した．各分画は乾固後0.7 mlのエタノールを加え溶解，0.1 mlを回収率測定用に，RIAには妊娠前期は0.3 ml，中期は0.2 ml，後期は0.1 mlを使用した．

5．各種エストロゲンのRIA

RIAの概略は図5に示したように，緩衝液として2-OHE$_3$測定にはアスコルビン酸緩衝液を，E$_1$, E$_2$, E$_3$測定にはPBSを用いた以外はすべて同様の方法で行った．試料あるいは各濃度の非標識ステロイド0.1 mlに約8,000 cpmの [^{3}H]steroid 0.1 mlと0.5 mlの希釈

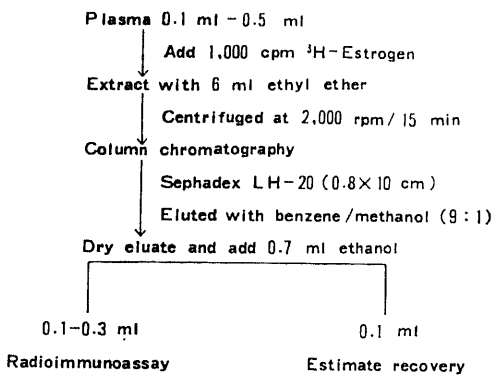

Fig. 3. Extraction and purification of E$_1$, E$_2$ and E$_3$ from plasma.

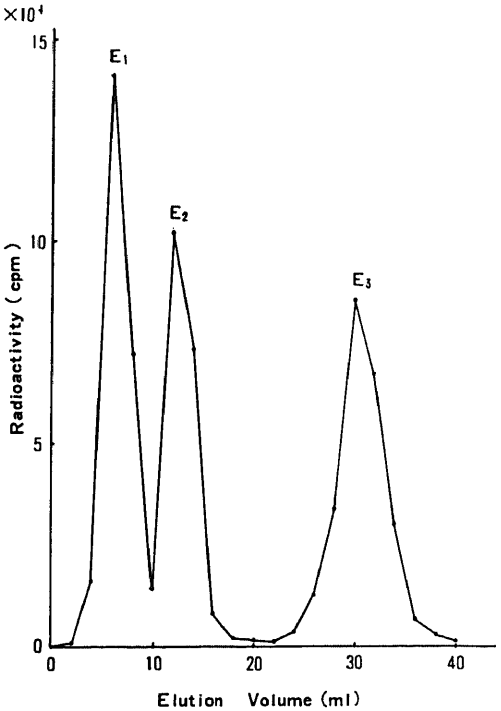

Fig. 4. Elution pattern of [^{3}H]estrogens. [^{3}H]E_1, [^{3}H]E_2 and [^{3}H]E_3 were applied to a Sephadex LH-20 column (0.8×10 cm) and eluted with benzene/methanol (9 : 1).

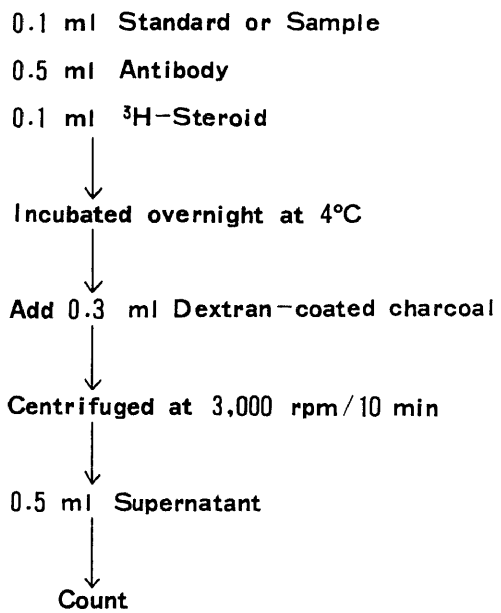

Fig. 5. Scheme for E_1, E_2, E_3 and 2-OHE_3 radioimmunoassays.

抗血清を加えて混和，4°Cで一夜反応させた後氷冷しながらDCC懸濁液0.3 mlを加え攪拌後10分間静置し，3,000 rpmで10分間冷却遠心した．上清0.5 mlを液体シンチレーション用ミニバイアルに移し，液体シンチレーション液0.6 mlを加えて攪拌後放射能を測定した．

成　　績

I．各種エストロゲンの測定方法の検討

1．2-OHE_3の測定方法の検討

1）2-OHE_3のSephadex LH-20カラム　クロマトグラフィーによる分離

2-OHE_3の近縁ステロイドからの分離を検討するため[^{3}H]E_1, [^{3}H]E_2, [^{3}H]E_3, [^{3}H]2-OHE_1, [^{3}H]2-OHE_2, [^{3}H]2-OHE_3それぞれ約10,000 cpmを混合し，Sephadex LH-20カラム　クロマトグラフィーによる分離をみた．溶出パターンは図2に示すように，2-OHE_3は他の近縁ステロイドとは溶出速度の違いで分離することができた．2-OHE_3の血漿からの抽出よりカラムによる分離までの操作による回収率は52.2%より84.4%の範囲で平均66.4±6.2%（n＝107）であった．

2）抗2-OHE_3血清の特異性

抗2-OHE_3血清の特異性について検討するため各種ステロイドおよびカテコールアミンに対する交叉率を測定し，すでに報告[29]した．2-OHE_3との結合を100%とすると，2-OHE_2 2.4%，2-methoxyestriol 4.4%，E_3 4.3%，4-hydroxyestriol 3.1%と若干高い交叉率を示したが，他の近縁ステロイド化合物との交叉率は1%以下であった．C_{19}-steroidおよびC_{21}-steroid，カテコールアミンとは全く交叉を示さなかった．

3）2-OHE_3のRIAにおける標準曲線

2-OHE_3のRIAにおいて非標識抗原を0とした時，8,000 cpmの標識抗原との結合が50%である抗血清の希釈度は5,000倍であった．同希釈度の抗血清を用いて作製した標準曲線を図6に示した．非標識の抗原を0とした時の標識抗原の結合型の計数をB_0，一定量の非標識抗原を加えた時の標識抗原の結合型の計数をB，標識抗原の非特異結合の計数をNとする．この時，B-N/B_0-Nのパーセントをlogit変換し縦軸に，2-OHE_3の量をpg単位でlog変換し横軸にとりグラフにあらわすと，10 pgから1,000 pgの範囲で直線性を示し，この範囲で定量可能であった．

4）2-OHE_3のRIAにおけるplasma blank値

健常成人女子より得た血漿をcharcoal処理してsteroid free plasmaを作製し，plasma blankを測定した．本測定法による全操作のplasma blank値は10

回の測定ですべて 20 pg/ml 以下であった.

5）2-OHE$_3$の RIA の確度

健常成人男子血漿に 20, 50, 100, 200 pg/ml の 2-OHE$_3$を加えて全測定操作を行い，本測定法の確度を検討した. 結果は図 7 に示すように, 回収率は 114.3±12.8%と良好であった.

6）2-OHE$_3$の RIA の精度

本測定法の精度の検討はほぼ 50, 100, 200 pg/ml の濃度の血漿を各々 4 回測定することにより行った. それぞれの濃度におけるアッセイ間の変動係数は 10.5%, 20.7%, 8.5%であった.

2．E_1, E_2, E_3の測定方法の検討

1）E_1, E_2, E_3の Sephadex LH-20 カラム　クロマトグラフィーによる分離

E_1, E_2, E_3の分離を検討するため [^{3}H]E_1, [^{3}H]E_2, [^{3}H]E_3それぞれ約 200,000 cpm を混合し，Sephadex LH-20 カラム　クロマトグラフィーによる分離をみた. 溶出パターンは図 4 に示すように，E_1, E_2, E_3は溶出速度の違いで分離することができた. E_1, E_2, E_3の血漿からの抽出よりカラムによる分離までの操作による回収率は，E_1 は 94.5±8.9%，E_2 は 92.5±7.6%，E_3 は 81.2±7.9%と良好であった.

2）抗 E_1, E_2, E_3 血清の特異性

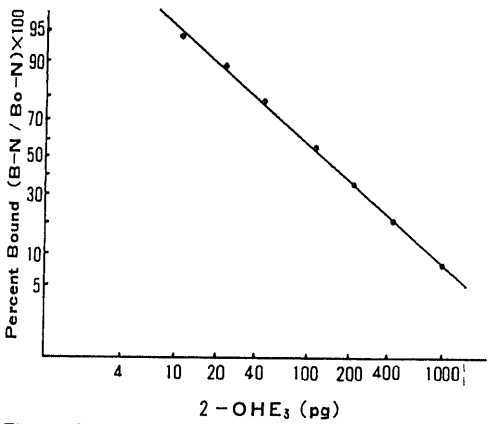

Fig. 6. Standard curve for 2-OHE$_3$ on a log-logit transformation. B_0, radioactivity (cpm) of bound [^{3}H]2-OHE$_3$ when cold 2-OHE$_3$ was not added; B, radioactivity (cpm) of bound [^{3}H]2-OHE$_3$ when various amounts of 2-OHE$_3$ were added; N, radioactivity (cpm) of non specific bound [^{3}H]2-OHE$_3$.

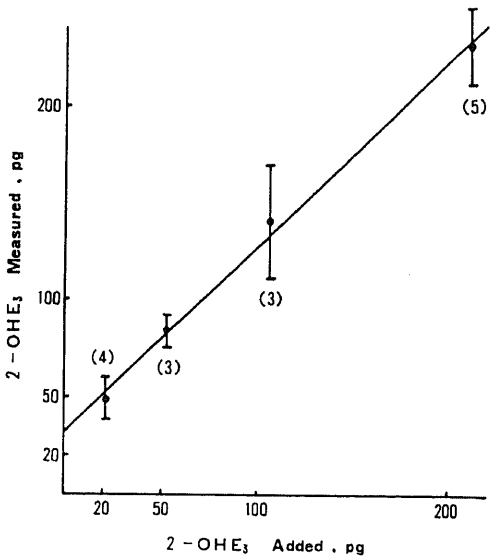

Fig. 7. Values measured when various amounts of 2-OHE$_3$ were added to the pooled plasma of adult men. Each point indicates mean±S.D. The number of determination is shown in parentheses. Slope of regression line is 0.96 with a intercept of 32.6 pg/ml.

Table 1. Plasma concentration of 2-OHE$_3$

	2-OHE$_3$ (pg/ml) Range (Mean±S.D.)	
Men	21.2 − 28.7 (25.4 ± 2.7)	(n = 4)
Non pregnant women	20.1 − 29.8 (24.4 ± 3.7)	(n = 5)
Pregnant women		
1st trimester	24.0 − 71.0 (48.2 ± 18.0)	(n = 8)
2nd trimester	26.0 − 147.0 (81.0 ± 32.8)	(n =38)
3rd trimester	66.1 − 310.0 (158.3 ± 66.1)	(n =52)

抗 E_1血清の E_2, E_3との交叉率はそれぞれ 2.4%, 0.1%以下，抗 E_2血清は E_1, E_3とそれぞれ 0.9%, 0.2%，抗 E_3血清は E_1, E_2とそれぞれ 0.1%以下，0.2%の交叉率であった．また C_{19}-および C_{21}-steroid との交叉率はすべて 0.1%以下であり，Wright ら[30]の報告と同様にきわめて高い特異性を示した．

3）E_1, E_2, E_3の RIA の標準曲線および Blank 値

すべて 2-OHE_3の RIA と同様に検討した．標準曲線は 4 pg より 1,000 pg の範囲で直線性を示し，この範囲で定量可能であった．Blank 値は 4 pg/ml 以下であった．

4）E_1, E_2, E_3の RIA の確度と精度

確度を検討するため行った回収率は E_1, E_2, E_3それぞれ 98.6±3.3%，101.3±5.6%，98.1±6.2%と良好であった．アッセイ内の変動係数およびアッセイ間の変動係数はそれぞれ，E_1は 5.0%と 8.9%，E_2は 6.9%と 11.3%，E_3は 8.0%と 13.5%であった．

II．血漿中の各種エストロゲンの定量

1．男子および非妊婦の 2-OHE_3の定量

健常男子および非妊婦の血漿中 2-OHE_3値は表 1 に示すように男子では 21.2－28.7 pg/ml で平均 25.4±2.7 pg/ml（n＝4），女子黄体期では 20.1－29.8 pg/ml で平均 24.4±3.7 pg/ml（n＝5）であった．

2．妊娠の経過における 2-OHE_3および E_1, E_2, E_3の定量

血漿中 2-OHE_3を妊娠の経過でみると表 1 に示すように妊娠初期では 24.0－71.0 pg/ml で平均 48.2±18.0 pg/ml（n＝8），中期では 26.0－147.0 pg/ml で平均 81.0±32.8 pg/ml（n＝38），後期では 66.1－310.0 pg/ml で平均 158.3±66.1 pg/ml（n＝52）と妊娠の経過とともに増加した．

個々の妊婦について妊娠の経過を追って測定した E_1, E_2, E_3および 2-OHE_3値を図 8，9，10，11 に示した．E_1, E_2, E_3値はともに 15 週頃より次第に増加し，さらに E_3値は 30 週前後より著増する傾向を示したが，この結果は Cohen ら[31]，De hertogh ら[32]の報告と同様であった．一方，2-OHE_3は 15 週頃より徐々に増加し，E_3と同様 30 週以降著増する傾向を示した．妊娠各期における E_1, E_2, E_3の 2-OHE_3に対する比を表 2 に，個々の妊婦において妊娠の経過を追ってみた E_3/2-OHE_3比を図 12 に示したが，いずれも妊娠の進行と共に上昇し 2-OHE_3の増加率が E_1, E_2, E_3の増加率よりも小さいという結果であった．

考　　察

カテコールエストロゲンは芳香 A 環の C-2 あるい

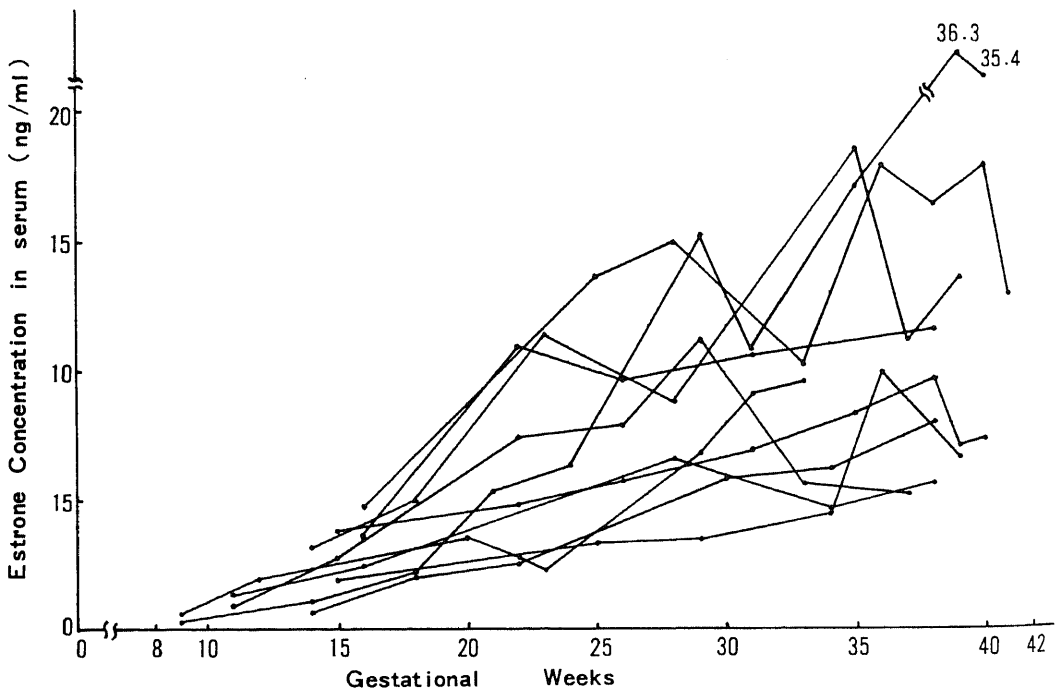

Fig. 8. Values for E_1 in 10 pregnant women throughout pregnancy.

はC-4位の水酸基がきわめて不安定で，容易に酸化されることから，そのRIAはきわめて困難でYoshizawaら[33]により，2-OHE$_1$のRIAが報告されたが一般化されなかった．ところが最近抗原としてのsteroid-protein conjugateの合成，試料の採取，抽出，分離操作や緩衝液にカテコールエストロゲンの安定化剤として抗酸化剤，アスコルビン酸が使用されるようになり[20]，そのRIAがかなり正確にできるようになった．

カテコールエストロゲンは主として肝臓に存在する2-および4-hydroxylaseにより生合成され，そのほか脳，胎盤，腎，筋肉でも合成される[34)~37)]．なかでも2-OHE$_1$が最も多く，また生理的意義の検討も2-OHE$_1$および2-OHE$_2$が主であったことから，血中非抱合型カテコールエストロゲンのRIAは2-OHE$_1$，2-OHE$_2$を中心に開発されてきた．

従来報告されている2-OHE$_1$[20)~23)]および2-OHE$_2$[24)25)]のRIAでは抗原として2-OHE$_1$-17-(O-carboxymethyl) oxime-BSAまたは2-OHE$_2$-17-hemisuccinyl-BSAを使用して抗血清を作製していることから，芳香A環のC-2, C-3位に水酸基を有するカテコールエストロゲンに特異的に反応するが，D環の認識は悪く，抗2-OHE$_1$血清は2-OHE$_2$，2-OHE$_3$と20－100%ときわめて高い交叉率を示した．すでにプライマリー エストロゲンであるE$_1$, E$_2$, E$_3$では6位のBSA-conjugateを抗原として作製した抗血清が，それぞれ

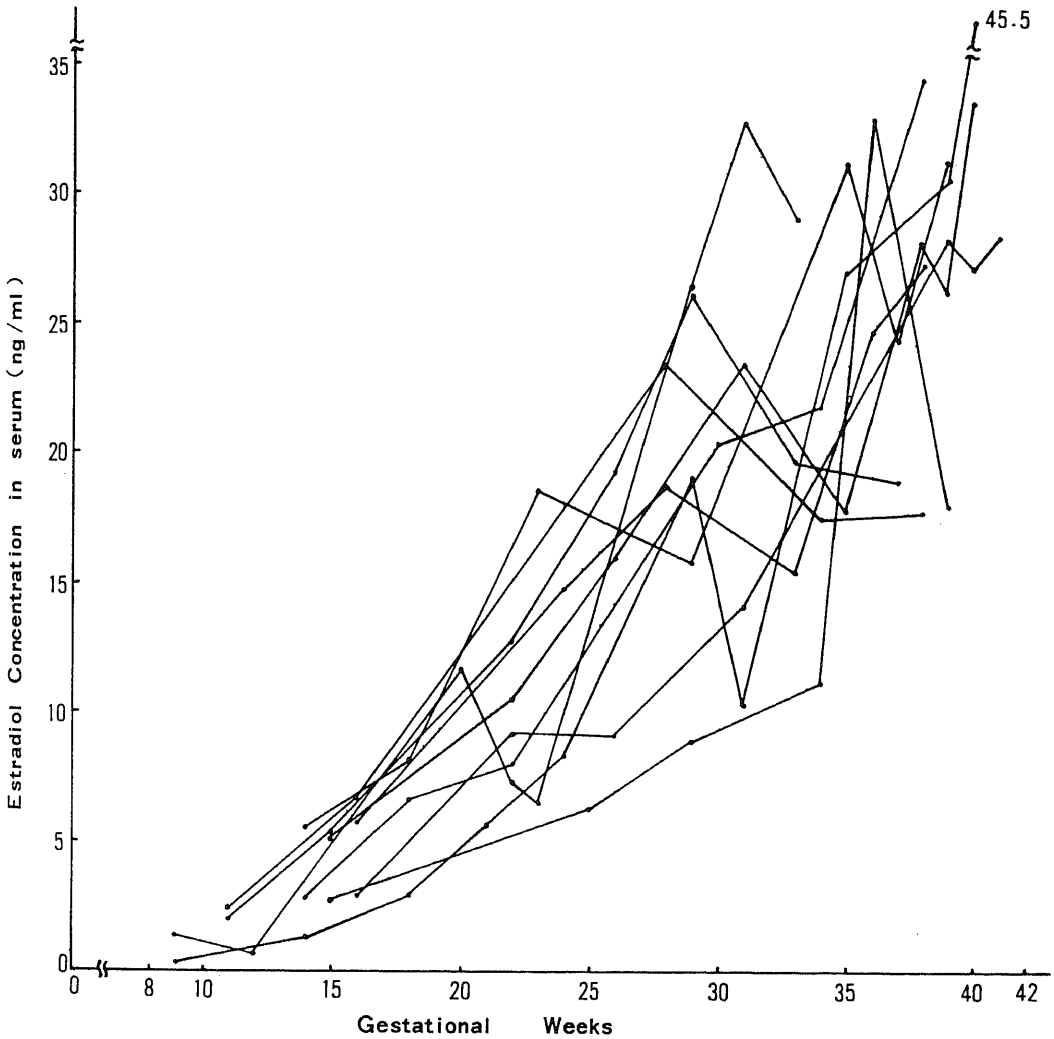

Fig. 9. Values for E$_2$ in 10 pregnant women throughout pregnancy.

のエストロゲンに対してきわめて高い特異性を示すことが報告[30)38)]されており，著者の使用した抗 E_1, E_2, E_3 血清も同様にきわめて特異性の高い抗血清であった．この点に着目して Fujii ら[39)]は最近 2-OHE_1，2-OHE_2 の抗原として 2-OHE_1- および 2-OHE_2-6-(O-carboxymethyl) oxime-BSA の合成を報告している．本研究の 2-OHE_3の RIA に用いた抗血清も同様に 2-OHE_3-6-(O-carboxymethyl)oxime-BSA を抗原として作製したものであり，2-methoxyestriol, E_3, 4-hydroxyestriol, 2-OHE_2と 2－4％の交叉を示す以外，その他のステロイドおよびカテコールアミンとの交叉は 1％以下と低く，2-OHE_3にきわめて特異性の高い抗血清であった．抗 2-OHE_3血清の E_3との交叉は 4.3％とごくわずかであるが，妊婦における E_3血中濃度はきわめて高く，2-OHE_3測定に影響を与えることが予想されるため，前処理として E_3など近縁ステロイドとの分離を行った後，2-OHE_3の RIA を行った．

Sephadex LH-20 は Celite とともにステロイドの精製，分離に最も繁用されているが，カテコールエストロゲンの分離には Chattoraj ら[21)]により尿中 2-OHE_1と 2-OHE_2の，Cecchini ら[22)]，Kono ら[23)]により血漿 2-OHE_1と 2-OHE_2の分離に使用されている．Kono ら[23)]は従来報告されていた 2-OHE_1値が 2-OHE_1の metabolic clearance rate (MCR) から推定される値よりも高いことより，血中の他のステロイドまたは非特異的な反応阻害物質の RIA への影響を指摘し，Sephadex LH-20 カラム クロマトグラフィーなどによる試料の純化を強調している．著者は Kono ら[23)]と同サイズのカラムにメタノールを若干増やした溶出溶媒を用いることにより，E_3および近縁ステロイドと 2-OHE_3を完全に分離するとともに，良好な回収率を得ることができた．Blank 値も従来の報告とほぼ同一レベルであり，添加回収実験，再現性も良好な満足すべき 2-OHE_3の RIA を確立できた．

ところで RIA によるヒト血漿カテコールエストロゲンの測定は，Yoshizawa ら[33)]により血漿非抱合型 2-OHE_1の RIA がはじめて報告された後 7 年間まったく報告されなかったが，最近 Ball ら[20)]，Cecchini ら[22)]，

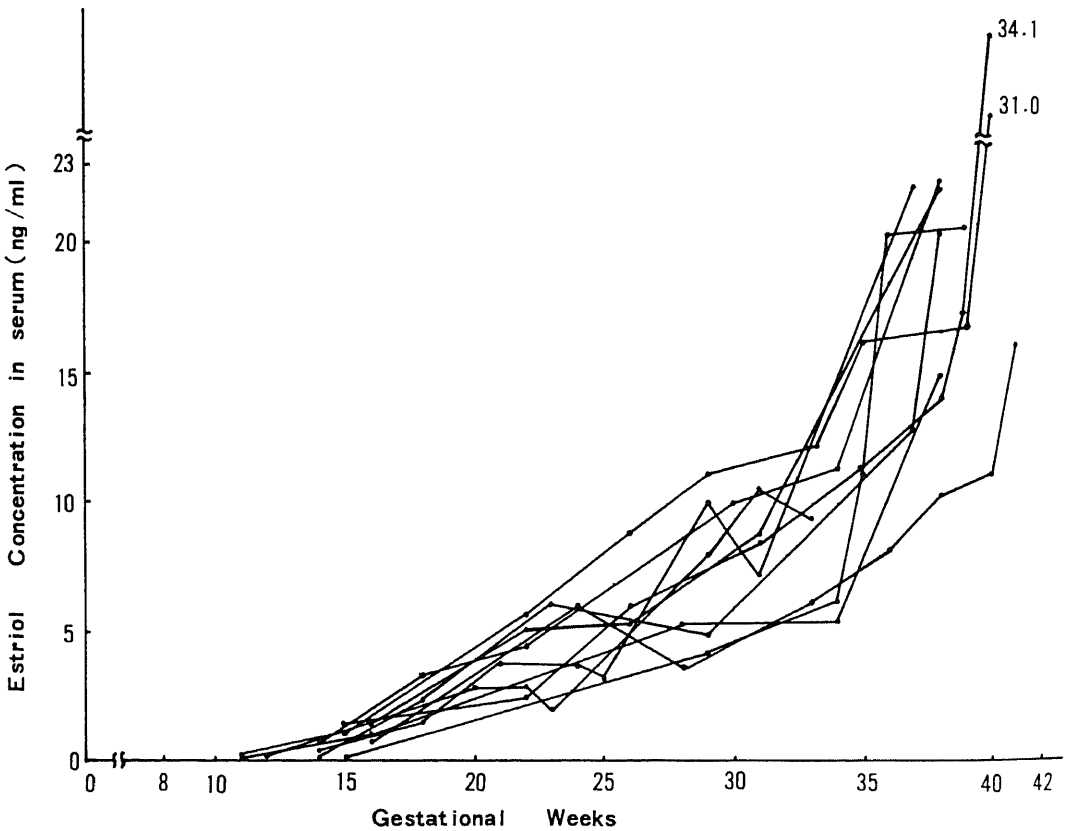

Fig. 10. Values for E_3 in 10 pregnant women throughout pregnancy.

Kono ら[23], Berg ら[24]により相ついで報告された．2-OHE$_1$の測定値については，Yoshizawa ら，Berg らは比較的高い値を，Kono らは低い値を，Ball らは前2者の中間の値を報告し，今だ一定の見解は得られていない．また RIA による血中非抱合型 2-OHE$_2$値は Kono ら[25]により妊娠後期を除いてすべて 10 pg/ml 以下，妊娠後期でも 15±9 pg/ml の低い値を報告している．また Kishida ら[40]も妊娠前・中・後期でそれぞれ 8.1±1.3 pg/ml, 11.8±2.7 pg/ml, 24.9±7.5 pg/ml と Kono らの報告よりも高いが，2-OHE$_1$に比較してかなり低い値を報告している．ヒト血漿非抱合型 2-OHE$_3$ の RIA に関する報告は著者の調べ得た範囲ではみられず，本研究が最初の報告である．成人男子および非妊婦の 2-OHE$_3$値は 25.4±2.7 pg/ml および 24.4±3.7 pg/ml とプライマリー エストロゲンである E_3の 7－30 pg/ml[41)~43)]とほぼ同じ血中レベルであった．また 2-OHE$_1$との比較では Kono ら[23]と Ball ら[20]の報告の中間の値であり，Kono ら[25], Kishida ら[40]の 2-OHE$_2$値より高値を示した．例数が少なく更に多数例での検討が必要であるが 2-OHE$_1$, 2-OHE$_2$, 2-OHE$_3$ともに男子および非妊婦の血中濃度は 20 pg/ml あるいはそれ以下という低濃度であり，正確な血中濃度測定のためには，さらに特異性および感度の高い RIA 法の開発が必要と思われる．

妊婦における 2-OHE$_3$値は妊娠の経過と共に増加し，妊娠各時期の 2-OHE$_3$血中レベルは 2-OHE$_1$とほぼ同じ血中レベルを示した．個々の妊婦での経時的検討では血中 2-OHE$_3$ およびプライマリー エストロゲンである E_1, E_2, E_3値は妊娠の経過とともに増加するが個体差が大きく，特に妊娠後期に著明となることから，各ステロイドの比較検討には個々の例で，かつ同一検体での測定が必要と考えられた．著者は個々の妊婦にて同一検体で 2-OHE$_3$と E_1, E_2, E_3を測定し，妊娠の経過を追って E_1, E_2, E_3と 2-OHE$_3$の比を検討した．E_3/2-OHE$_3$比は妊娠の進行とともに全例で上昇し，E_1/2-OHE$_3$, E_2/2-OHE$_3$比も同様であった．桑原ら[44]は同じ

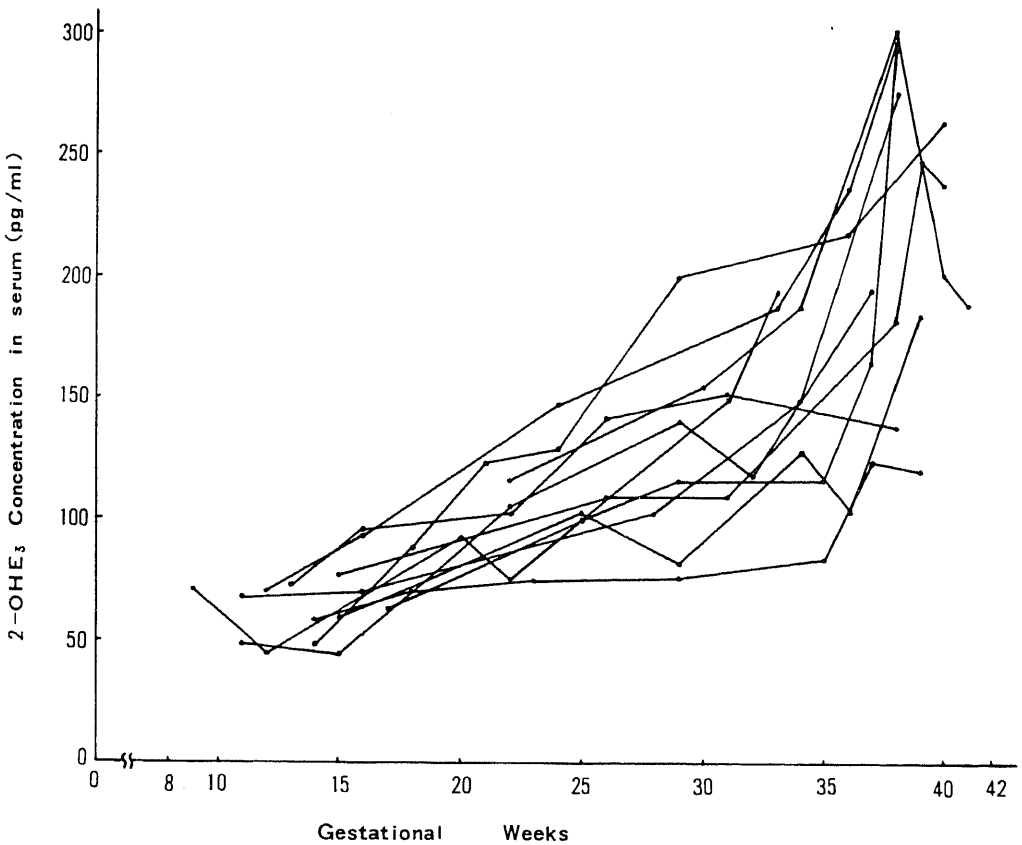

Fig. 11. Values for 2-OHE$_3$ in 10 pregnant women throughout pregnancy.

く個々の妊婦で E_1, E_2 と 2-OHE_1, 2-OHE_2 を経時的に測定し，E_1/2-OHE_1, E_2/2-OHE_2 比が上昇することを報告している．したがってカテコールエストロゲンの妊婦における血中濃度は妊娠の進行につれてプライマリー エストロゲンとともに増加するが，プライマリー エストロゲンに比べその増加率は小さいと考えられる．Merriam ら[45], Kono ら[25]は 2-OHE_1, 2-OHE_2 の半減期はそれぞれ 7 分，11.2 分と非常に短かく MCR は E_1, E_2, E_3 の約 100 倍と非常に大きいことを報告している．また Dunn ら[46]は妊婦，非妊婦共に 2-OHE_1, 2-OHE_2 のテストステロン結合グロブリン，アルブミンとの結合率は E_1, E_2 より低く，従って血中では蛋白非結合の遊離型が多いことをみている．一方 Ball ら[47], Adlercreutz ら[48][49]は妊婦尿中グルクロン酸および硫酸抱合型 2-OHE_1 および C-2 位がメチルエステルになった 2-methoxyestrone の排泄量は非妊婦の 20～100 倍にも増加することを報告している．これらの事実はカテコールエストロゲンが血中できわめて

Table 2. Ratios of E_1, E_2 and E_3 to 2-OHE_3 in serum of normal pregnant women

	E_1/2-OHE_3 Range (Mean±S.D.)	E_2/2-OHE_3 Range (Mean±S.D.)	E_3/2-OHE_3 Range (Mean±S.D.)
1st trimester	3.3−43.4 19.0±13.8 (n=5)	3.6−41.6 23.3±13.7 (n=5)	1.5−4.6 3.4±1.4 (n=3)
2nd trimester	21.6−151.6 52.6±29.5 (n=26)	23.2−247.3 89.4±53.6 (n=26)	7.9−81.1 30.5±18.0 (n=26)
3rd trimester	20.7−223.7 66.4±40.0 (n=34)	64.8−373.2 148.5±69.0 (n=34)	32.6−195.6 81.8±40.5 (n=34)

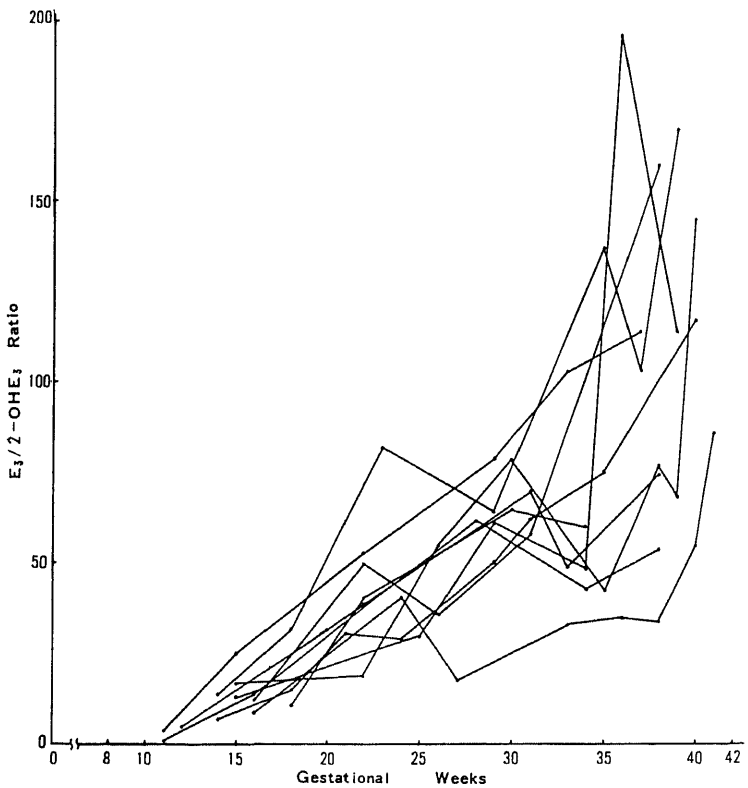

Fig. 12. Ratios of E_3 to 2-OHE_3 in 10 pregnant women throughout pregnancy.

速くメチル化または抱合をうけて排泄されることを示しており，プライマリー　エストロゲンに比較してカテコールエストロゲンの血中濃度増加率が小さくなる主因と考えられた．

妊婦における E_3は非妊婦と異なり，その多くが胎児副腎で多量に合成される dehydroepiandrosterone sulfate より胎盤で合成され母体血中へ移行している．またカテコールエストロゲンの主要な産生臓器は肝臓とされているが胎盤もかなりの 2-hydroxylase 活性を有している[35]．妊娠時の胎盤でのアンドロゲン→エストロゲンすなわち芳香化の増大と相まって胎盤での 2-OHE$_3$を含めたカテコールエストロゲンの産生は妊婦血中カテコールエストロゲン濃度上昇のかなりの部分をしめ，局所での濃度はより高いと想像される．しかしカテコールエストロゲン特に 2-OHE$_1$や 2-OHE$_2$ の子宮筋細胞質リセプターに対する親和性はプライマリー　エストロゲンである E_2のそれに比して極めて弱く[50][51]，プライマリー　エストロゲンとの血中濃度の比較から考えてもカテコールエストロゲンが妊娠子宮の子宮刺激作用に重要な役を果しているとは思われない．一方子宮を含めた生殖系にいわゆるアラキドン酸カスケードのすべての酵素が含まれ，多数の PG 関連物質が産生され受精卵の着床から分娩にいたる妊娠のあらゆる過程に重要な役割を果たしていることが知られている．子宮における PG 増加の主要因子はエストロゲンであるが[52]，エストロゲンの PG 産生促進はいわゆる古典的エストロゲン受容体機構を介しないという報告[53][54]がある．興味あることにラット子宮においてもヒト子宮においても 2-OHE$_2$は子宮および血管収縮性の $PGF_{2\alpha}$ をふやし，反対に拡張性の 6-keto-$PGF_{1\alpha}$（PGI_2の安定代謝産物）を減じ，その作用は E_2 より強いといわれ[10]，PG 産生におよぼす作用の本態はエストロゲンではなくカテコールエストロゲンであり，しかもエストロゲン受容体を介さないレベルで，たとえばそのカテコール構造から想像されるように各種 PG 合成過程に必要な peroxidase に対する水素供給体として PG 産生に重要な役割を果していることが考えられる．このように妊娠末期に急増する 2-OHE$_3$ を含めた 2-hydroxylated estrogen が血管収縮，子宮収縮や分娩発来に局所ホルモンとして重要な役割を演じていることが十分予想され，妊娠の継続，妊娠中毒症や分娩発来機序との関与につき，より詳細な検討が期待される．

結　　論

カテコールエストロゲンの生理作用を解明する上で，血中濃度の測定は重要な意義をもつと思われる．そこで血漿中 2-OHE$_3$の特異的 RIA を開発し，妊婦の血中濃度を測定した．同時にプライマリー　エストロゲンである E_1, E_2, E_3 を RIA で測定し，2-OHE$_3$との比較検討を行い，以下の成績を得た．

1．試料の純化法として Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーを用いたが，回収率，分離能ともに良好であった．

2．抗 2-OHE$_3$血清の交叉反応は 2-methoxyestriol, E_3, 4-hydroxyestriol, 2-OHE$_2$と 2.4−4.4%であったが他のステロイドとは 1%以下であった．

3．本法での測定感度は 10 pg, steroid free plasma で測定した blank 値は 20 pg/ml 以下であった．

4．本法の精度としてのアッセイ間の変動係数は 8.5%, 10.5%, 20.7%であり，確度としての全回収率は 114.3±12.8%であった．

5．血漿中 2-OHE$_3$値は健常男子で 25.4±2.7 pg/ml（n＝4），非妊婦で 24.4±3.7 pg/ml（n＝5）であった．妊婦では妊娠前期 48.2±18.0 pg/ml（n＝8），中期で 81.0±32.8 pg/ml（n＝38），後期で 158.3±66.1 pg/ml（n＝52）であった．

6．個々の妊婦につき経過を追って 2-OHE$_3$, E_1, E_2, E_3を同時に測定し，E_1/2-OHE$_3$, E_2/2-OHE$_3$, E_3/2-OHE$_3$比を検討した．いずれも妊娠の進行とともに上昇し，プライマリー　エストロゲンの増加率に比較して，2-OHE$_3$の増加率が小さいことが明らかになった．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御校閲を賜わりました松田保教授，服部絢一名誉教授に心より感謝いたします．終始直接御指導いただきました現福井医科大学第三内科宮保進教授，岸田繁講師に深甚の謝意を表します．御協力，御援助いただいた北陸大学薬学部藤井洋一助教授に感謝します．

なお本論文の要旨は第 57 回日本内分泌学会総会（昭和 59 年度，東京）において発表した．

文　　献

1）**Kraychy, S. & Gallagher, T. F.**: 2-Methoxyestrone, a new metabolite of estradiol-17 β in man. J. Biol. Chem., **229**, 519-526 (1957).

2）**Fishman, J. & Gallagher, T. F.**: 2-Methoxyestriol: A new metabolite of estradiol in man. Arch. Biochem. Biophys., **77**, 511-513 (1958).

3）**Fishman, J., Cox, R. I. & Gallagher, T. F.**: 2-Hydroxyestrone: A new metabolite of estradiol in man. Arch. Biochem. Biophys., **90**, 318-319 (1960).

4）**Fishman, J.**: Role of 2-hydroxyestrone in estrogen metabolism. J. Clin. Endocrinol. Metab., **23**, 207-210 (1963).

5) **Ball, P., Knuppen, R., Haupt, M. & Breuer, H.**: Interactions between estrogens and catechol amines. III. Studies on the methylation of catechol estrogens, catechol amines and other catechols by the catechol-O-methyltransferase of human liver. J. Clin. Endocrinol. Metab., **34**, 736-746 (1972).

6) **Breuer, H. & Köster, G.**: Interaction between oestrogens and neurotransmitters at the hypophysial-hypothalamic level. J. Steroid Biochem., **5**, 961-967 (1974).

7) **Lloyd, T. & Weisz, J.**: Direct inhibition of tyrosine hydroxylase activity by catechol estrogens. J. Biol. Chem., **253**, 4841-4843 (1978).

8) **Merriam, G. R., MacLusky, N. J., Johonson, L. A. & Naftolin, F.**: 2-hydroxyestradiol-17α and 4-hydroxyestradiol-17α, catechol estrogen analogs with reduced estrogen receptor affinty. Steroids, **36**, 13-20 (1980).

9) **Foreman, M. M. & Porter, J. C.**: Effects of catechol estrogens and catecholamines on hypothalamic and corpus striatal tyrosine hydroxylase activity. J. Neurochem., **34**, 1175-1183 (1980).

10) **Kelly, R. W. & Abel, M. H.**: Catechol oestrogens stimulate and direct prostaglandin synthesis. Prostaglandins, **20**, 613-626 (1980).

11) **Kelly, R. W. & Abel, M. H.**: A comparison of the effects of 4-catechol oestrogens and 2-pyrogallol oestrogens on prostaglandin synthesis by the rat and human uterus. J. Steroid Biochem., **14**, 787-791 (1981).

12) **Naftolin, F., Morishita, H., Davies, I. J., Todd, R., Ryan, K. J. & Fishman, J.**: 2-hydroxyestrone induced rise in serum luteinizing hormone in the immature male rat. Biochem. Biophys. Res. Commun., **64**, 905-910 (1975).

13) **Jellinck, P. H., Krey, L., Davis, P. G., Kamel, F., Luine, V., Parsons, B., Roy, E. J., & McEwen, B. S.**: Central and peripheral action of estradiol and catecholestrogens administered at low concentration by constant infusion. Endocrinology, **108**, 1848-1854 (1981).

14) **Ball, P., Emons, G., Klingebiel, T., Grühn, K. M. & Knuppen, R.**: Effects of catecholestrogens on luteinizing hormone levels in long term ovariectomized adult rats. Endocrinology, **109**, 1037-1039 (1981).

15) **Adashi, E. Y., Rakoff, J., Divers, W., Fishman, J. & Yen, S. S. C.**: The effect of acutely administered 2-hydroxyestrone on the release of gonadotropins and prolactin before and after estrogen priming in hypogonadal women. Life Sci., **25**, 2051-2055 (1979).

16) **Schinfeld, J. S., Tulchinsky, D., Schiff, I. & Fishman, J.**: Suppression of prolactin and gonadotropin secretion in post-menopausal women by 2-hydroxyestrone. J. Clin. Endocrinol. Metab., **50**, 408-410 (1980).

17) **Fishman, J. & Tulchinsky, D.**: Suppression of prolactin secretion in normal young women by 2-hydroxyestrone. Science, **210**, 73-74 (1980).

18) **Merriam, G. R., Kono, S., Keiser, H. R., Loriaux, D. L. & Lipsett, M. B.**: Effects of catechol estrogen infusions upon gonadotropin and prolactin concentrations in men. J. Clin. Endocrinol. Metab., **53**, 784-789 (1981).

19) **Miyabo, S., Kishida, S., Sugiyama, T., Hashimoto, T., Fujii, Y. & Teranishi, M.**: Effects of 2-hydroxyoestradiol and 4-hydroxyoestradiol on gonadotrophin and prolactin secretion in women. Acta Endocrinol., **105**, 1-5 (1984).

20) **Ball, P., Emons, G., Haupt, O., Hoppen, H. O. & Knuppen, R.**: Radioimmunoassay of 2-hydroxyestrone. Steroids, **31**, 249-258 (1978).

21) **Chattoraj, S. C., Fanous, A. S., Cecchini, D. & Lowe, E. W.**: A radioimmunoassay method for urinary catechol estrogens. Steroids, **31**, 375-391 (1978).

22) **Cecchini, D., Chattoraj, S. C., Fanous, A. S., Nowroozi, K. & Edelin, K.**: Radioimmunoassay of 2-hydroxyestrone in human and rat plasma. Endocrinology, **106A**, 255 (1980).

23) **Kono, S., Brandon, D., Merriam, G. R., Loriaux, D. L. & Lipsett, M. B.**: Low plasma levels of 2-hydroxyestrone are consistent with its rapid metabolic clearance. Steroids, **36**, 463-472 (1980).

24) **Berg, D., Thaler, F. & Kuss, E.**: Concentrations of 2-hydroxyestrogens in human sera measured by a heterologous immunoassay with an ^{125}I-labelled ligand. Acta Endocrinol., **100**, 154-160 (1982).

25) **Kono, S, Merriam, G. R., Brandon, D. D., Loriaux, D. L. & Lipsett, M. B.**: Radioimmunoassay and metabolism of the catechol

estrogen 2-hydroxyestradiol. J. Clin. Endocrinol. Metab., **54**, 150-154 (1982).

26) **Stubenrauch, G. & Knuppen, R.**: Convenient large scale preparation of catechol estrogens. Steroids, **28**, 733-741 (1976).

27) **Jellinck, P. H. & Brown, B. J.**: A simple enzymatic method for the synthesis of 2-hydroxy [4-^{14}C] estradiol. Steroids, **17**, 133-140 (1971).

28) **Nishina, T,. Tsuji, A. & Fukushima, D. K.**: Site of conjugation of bovine serum alubumin to corticosteroid hormones and specificity of antibodies. Steroids, **24**, 861-874 (1974).

29) **Fujii, Y., Teranishi, M., Mizukami, M., Ukari, H., Yamazaki, M., Horikawa, Y., Kishida, S. & Miyabo, S.**: Preparation and antigenic properties of 2-hydroxyestriol-bovine serum alubumin conjugate. Horm. Metab. Res., **16**, 268-269 (1984).

30) **Wright, K., Collins, D. C. & Preedy, J. R. K.**: Comparative specificity of antisera raised against estrone, estradiol-17β and estriol using 6-O-carboxymethyloxime bovine serum albumin derivatives. Steroids, **21**, 755-769 (1973).

31) **Cohen, M. & Cohen, H.**: A radioimmunoassay for plasma uncojugated estrogens in normal pregnancy. Amer. J. Obstet. Gynecol., **118**, 200-209 (1974).

32) **De Hertogh, R., Thomas, K., Bietlot, Y., Vanderheyden, I. & Ferin, J.**: Plasma levels of unconjugated estrone, estradiol and estriol and of HCS throughout pregnancy in normal women. J. Clin. Endocrinol. Metab., **40**, 93-101 (1975).

33) **Yoshizawa, I. & Fishman, J.**: Radioimmunoassay of 2-hydroxyestrone in human plasma. J. Clin. Endocrinol. Metab., **32**, 3-6 (1971).

34) **King, R. J. B.**: Oestriol metabolism by rat- and rabbit-liver slices. Isolation of 2-methoxyestriol and 2-hydroxyestriol. Biochem. J., **79**, 355-361 (1961).

35) **Fishman, J. & Dixon, D.**: 2-Hydroxylation of estradiol by human placental microsomes. Biochemistry, **6**, 1683-1687 (1967).

36) **Fishman, J. & Norton, B.**: Catechol estrogen formation in the central nervous system of the rat. Endocrinology, **96**, 1054-1059 (1975).

37) **Ball, P. & Knuppen, R.**: Formation of 2- and 4-hydroxyestrogens by brain pituitary, and liver of the human fetus. J. Clin. Endocrinol. Metab., **47**, 732-737 (1978).

38) **Exley, D., Johnson, M. W. & Dean, P. D. G.**: Antisera highly specific for 17-oestradiol. Steroids, **18**, 605-620 (1971).

39) **Fujii, Y., Teranishi, M., Ukari,H., Yamazaki, M. & Miyabo, S.**: Synthesis of new haptens for radioimmunoassay of 2- and 4-hydroxyestradiol. Chem. Parm. Bull., **31**, 1082-1085 (1983).

40) **Kishida, S., Sugiyama, T. Nakamura, T., Miyabo, S. & Fujii, Y.**: Radioimmunoassay of 2-hydroxyestrone and 2-hydroxyestradiol in human plasma. p230 7th Asia & oceania congress of endocrinology, abstracts, 1982.

41) **Wu, C. H. & Lundy, L. E.**: Radioimmunoassay of plasma estrogens. Steroids, **18**, 91-111 (1971).

42) **Rotti, K., Stevens, J., Watson, D. & Longcope, C.**: Estriol concentrations in plasma of normal, non-pregnant women. Steroids, **25**, 807-816 (1975).

43) **Flood, C., Pratt, J. H. & Longcope, C.**: The metabolic clearance and blood production rates of estriol in normal, non-pregnant women. J. Clin. Endocrinol. Metab., **42**, 1-8 (1976).

44) **桑原正樹・宮保　進・岸田　繁・杉山達郎・藤井洋一**：妊婦血中 catechol estrogen の RIA. 日産婦誌, **35**, 1314-1315 (1983).

45) **Merriam, G. R., Brandon, D. D., Kono, S., Davis, S. E., Loriaux, D. L. & Lipsett, M. B.**: Rapid metabolic clearance of the catechol estrogen 2-hydroxyestrone. J. Clin. Endocrinol. Metab., **51**, 1211-1213 (1980).

46) **Dunn, J. F., Merriam, G. R., Eil, C., Kono, S., Loriaux, D. L. & Nisula, B. C.**: Testosterone-estradiol binding globulin binds to 2-methoxyestradiol with greater affinity than to testosterone. J. Clin. Endocrinol. Metab., **51**, 404-406 (1980).

47) **Ball, P., Reu, G., Schwab, J. & Knuppen, R.**: Radioimmunoassay of 2-hydroxyestrone and 2-methoxyestrone in human urine. Steroids, **33**, 563-576 (1979).

48) **Adlercreutz, H. & Hunneman, D. H.**: Quantitation of up to 12 estrogens in 1-50 μl of pregnancy urine. J. Steroid Biochem., **4**, 233-237 (1973).

49) **Adlercreutz, H., Tikkanen, M. J. & Hunne-**

man, D. H.: Mass fragmentographic determination of eleven estrogens in the body fluids of pregnant and nonpregnant subjects. J. Steroid Biochem., **5**, 211-217 (1974).

50) Martucci, C. & Fishman, J.: Uterine estrogen recepter binding of catecholestrogens and estetrol (1, 3, 5, (10) estratriene-3, 15α, 16α, 17β-tetrol). Steroids, **27**, 325-333 (1976).

51) Martucci, C. P. & Fishman, J.: Impact of continuously administered catechol estrogens on uterine growth and luteinizing hormone secretion. Endocrinology, **105**, 1288-1292 (1979).

52) Ramwell, P. W., Leovey, E, M, K. & Sinteros, A. L.: Regulation of the arachidonic acid cascade. Biol. Reprod., **16**, 70-87 (1977).

53) Castracane, V. D. & Jordan, V. C.: Considerations into the mechanism of estrogen-stimulated uterine prostaglandin synthesis. Prostaglandins, **12**, 243-251 (1976).

54) Horton, E. W. & Poyser, N. L.: Uterine luteolytic hormone: A physiological role for prostaglandin $F_{2\alpha}$. Physiol. Rev., **56**, 595-651 (1976).

Development of Radioimmunoassay for 2-Hydroxyestriol and Determination of the Plasma Concentration in Pregnant Women

Yasuhiro Horikawa, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **94**, 329–342 (1985).

key words: radioimmunoassay, 2-hydroxyestriol, catecholestrogen, estrogen, pregnancy

Abstract

A sensitive and specific radioimmunoassay (RIA) for 2-hydroxyestriol (2-OHE_3) was developed, and the plasma levels in normal pregnant women were measured. The plasma levels of 2-OHE_3 together with classical estrogens-estrone (E_1), estradiol (E_2) and estriol (E_3), were followed serially in ten women throughout pregnancy. An antiserum raised against 2-OHE_3-6-(0-carboxymethyl) oxime-bovine serum albumin was highly specific to 2-OHE_3. Plasma samples for RIA of 2 OHE_3 were extracted with ehyl acetate and chromatographed on Sephadex LH-20 column in benzene-methanol (89:11, saturated with ascorbic acid). RIA of 2-OHE_3 was carried out in buffer containing 0.05% ascorbic acid using 8,000 cpm of ^{3}H-2-OHE_3 and the antiserum diluted to 1:5,000. Free and bound steroids were separeted using dextran-coated charcoal. The standard curve was linear between 10 and 1,000 pg on a log-logit plot. The sensitivity of the assay was 10 pg, and the between-assay coefficients of variation was 13.2%. Accouracy was determined by the addition of known amounts to pooled plasma. The mean overall recovery was 114.3±12.8%. The plasma concentrations of 2-OHE_3 were 25.4±2.7 pg/ml (n=4) in men and 24.4±3.7 pg/ml (n=5) in cycling women. During pregnancy, the plasma levels of 2-OHE_3 were 48.2±18.0 pg/ml (n=8) in the first trimester, 81.0±32.8 pg/ml (n=38) in the second trimester and 158.3±66.1 pg/ml (n=52) in the third trimester. 2-OHE_3 increased gradually after the 15th week of gestation, and rose steeply after the 30th week. The plasma levels of E_1, E_2 and E_3 increased gradually during the second and third trimesters, and the rise of E_3 was particularly evident after the 30th week. The ratios of E_1, E_2 and E_3 to 2-OHE_3 increased towards the end of gestation. This relatively low rate of increase of 2-OHE_3 during pregnancy may result from an extremely rapid metabolic clearance rate of this catecholestrogen. The present paper reports for the first time the measurement of plasma 2-OHE_3 concentration by RIA. Recent evidence suggests that catecholestrogens are not simply inactive metabolites of primary estrogens but possess their own potent biological and endocrine activities. Therefore, the RIA of catechoestrogens will contribute to the elucidation of a physiological role of the unique estrogen metabolites.