

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

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: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7784

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-OHE₃) 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-OHE₃濃度を測定した。血漿中 2-OHE₃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 (E₁)、エストラジオール (E₂)、エストリオール (E₃) も測定した。2-OHE₃-6-(O-carboxymethyl) oxime-bovine serum albumin を抗原として 2-OHE₃ に特異的な抗体を作製した。2-OHE₃ 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כולビン酸飽和) にて溶出分離した。RIA は 0.05% のアスכולビン酸を含む緩衝液を使用し、8,000 cpm の [³H]2-OHE₃ 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-OHE₃ 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-OHE₃ 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-OHE₃ 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。E₁, E₂, E₃ は妊娠中期より後期にかけて次第に増加したが E₃ においては 30 週以後その増加は著明であった。E₁, E₂ および E₃ の 2-OHE₃ 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-OHE₃ の増加率が低いことは 2-OHE₃ 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-OHE₃ 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 (E₁)、エストラジオール (E₂)、エストリオール (E₃) 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^{3)~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; E₁, estrone; E₂, estradiol; E₃, estriol; MCR, metabolic clearance rate; 2-OHE₁, 2-hydroxyestrone; 2-OHE₂, 2-hydroxyestradiol; 2-OHE₃, 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-OHE₁), 2-hydroxyestradiol (2-OHE₂) 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 E₁, E₂, E₃ は妊娠時にはその経過とともに著増し、末期には尿中の E₁, E₂ は非妊娠黄体期の 100 倍, E₃ は 1,000 倍にも達する。特に E₃ は一般には E₁, E₂ 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 E₃ 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、臨時的には E₃ 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、E₃ より生成されるカテコールエストロゲンである 2-hydroxyestriol (2-OHE₃) 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 E₁, E₂, E₃ 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。E₁, E₂, E₃ の純品は Sigma 社より購入し純化せず使用した。2-OHE₃ は Stubenrauch ら²⁶⁾の方法にて次のように合成した。まず E₃ の 2 位をニトロ化し、ニトロ基を還元化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-

OHE₃ を合成し、薄層クロマトグラフィーにて精製した。

[2,4,6,7-³H]E₁ (specific activity, S.A., 88.5 Ci/mM), [2,4,6,7-³H]E₂ (S.A., 110.0 Ci/mM), [2,4,6,7-³H]E₃ (S.A., 90.0 Ci/mM) は New England Nuclear 社より購入した。[6,7-³H]2-OHE₃ は Jellinck ら²⁷⁾の方法に従い、[6,7-³H]E₃ (S.A., 58.0 Ci/mM, New England Nuclear 社) より合成した。すなわち [³H]E₃ 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²⁸⁾の方法で、0.01 M 磷酸緩衝液 (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-OHE₃ ではアスコルビン酸緩衝液に、また E₁, E₂, E₃ 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-OHE₃ に対する抗血清

抗 2-OHE₃ 血清はすでに報告²⁹⁾したように、2-OHE₃-6-(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) E₁, E₂, E₃ に対する抗血清

抗 E₁, E₂, E₃ 血清は Steraroids 社より購入した E₁, E₂, E₃-6-(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 E₁ は 0.27 mg, E₂ は 0.17 mg, E₃ 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-OHE₃ の抽出

2-OHE₃ の抽出には 2 ml の血漿を用い、回収率測定用 [³H]2-OHE₃ 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) E₁, E₂, E₃ の抽出

E₁, E₂, E₃ の抽出には血漿 0.1-0.5 ml を用い、回収率測定用 [³H]E₁, [³H]E₂, [³H]E₃ 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て乾固した。

4. 各種エストロゲンのカラム クロマトグラフィー

1) 2-OHE₃ のカラム クロマトグラフィー

2-OHE₃ の抽出分離の概略は図 1 に示したように、分

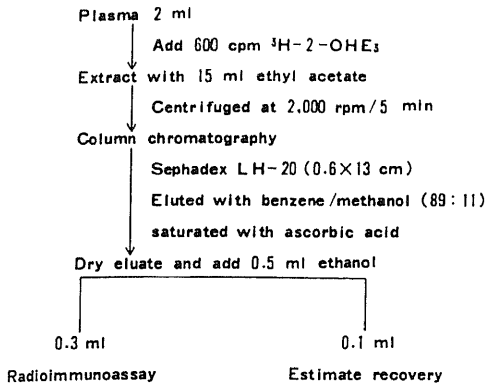


Fig. 1. Extraction and purification of 2-OHE₃ from plasma.

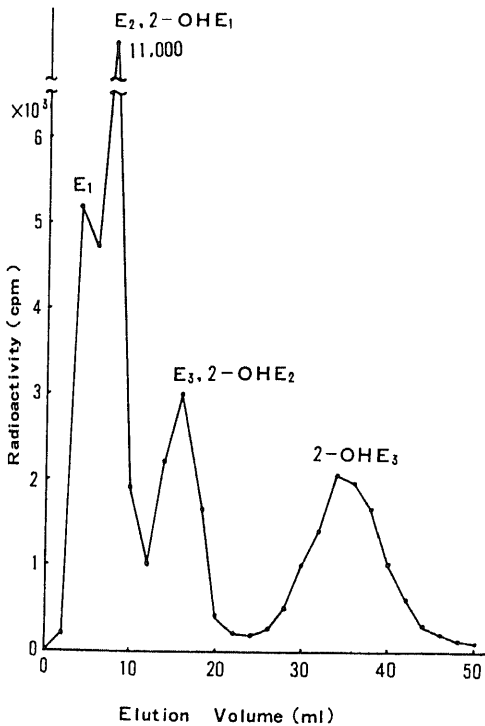


Fig. 2. Elution pattern of [³H]steroids. [³H]E₁, [³H]E₂, [³H]E₃, [³H]2-OHE₁, [³H]2-OHE₂ and [³H]2-OHE₃ were applied to Sephadex LH-20 column (0.6×13 cm) and eluted with benzene/methanol (89:11, saturated with ascorbic acid).

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 まで充填した。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十分に洗浄した。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、括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-OHE₃ は他の近縁ステロイドから完全に分離され 2-OHE₃ 分画として 28-42 ml を使用した。2-OHE₃ 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) E₁, E₂, E₃ のカラム クロマトグラフィー

E₁, E₂, E₃ 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 まで充填し、2-OHE₃ と同様の操作にて E₁, E₂, E₃ を溶出分離した。溶出曲線は図 4 に示した。E₁, E₂, E₃ 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-OHE₃ 測定にはアスコルビン酸緩衝液を、E₁, E₂, E₃ 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 [³H]steroid 0.1 ml と 0.5 ml の希釈

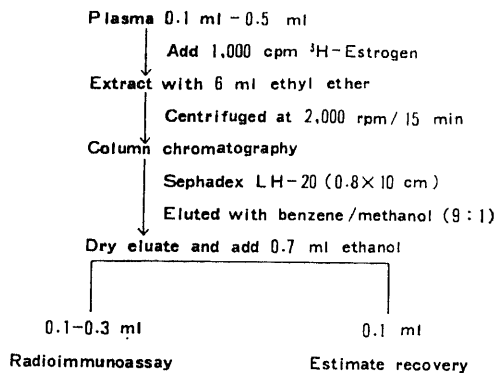


Fig. 3. Extraction and purification of E₁, E₂ and E₃ from plasma.

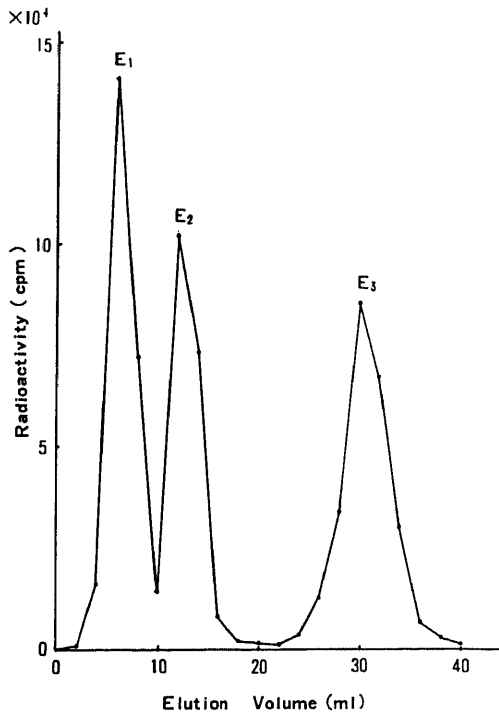


Fig. 4. Elution pattern of [^3H]estrogens. [^3H]E₁, [^3H]E₂ and [^3H]E₃ were applied to a Sephadex LH-20 column (0.8×10 cm) and eluted with benzene/methanol (9:1).

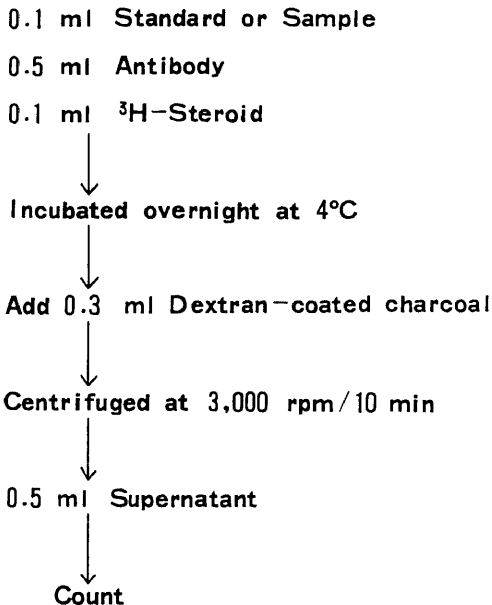


Fig. 5. Scheme for E₁, E₂, E₃ and 2-OHE₃ radio-immunoassays.

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-OHE₃の測定方法の検討

1) 2-OHE₃の Sephadex LH-20 カラム クロマトグラフィーによる分離

2-OHE₃の近縁ステロイドからの分離を検討するため [^3H]E₁, [^3H]E₂, [^3H]E₃, [^3H]2-OHE₁, [^3H]2-OHE₂, [^3H]2-OHE₃ 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-OHE₃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-OHE₃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-OHE₃血清の特異性

抗 2-OHE₃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-OHE₃との結合を 100% とすると、2-OHE₂ 2.4%、2-methoxyestriol 4.4%、E₃ 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。C₁₉-steroid および C₂₁-steroid、カテコールアミンとは全く交叉を示さなかった。

3) 2-OHE₃の RIA における標準曲線

2-OHE₃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 B₀、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/B₀-N のパーセントを logit 変換し縦軸に、2-OHE₃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-OHE₃の RIA における plasma blank 値

健康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-OHE₃ の RIA の確度

健康成人男子血漿に 20, 50, 100, 200 pg/ml の 2-OHE₃ 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-OHE₃ 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. E₁, E₂, E₃ の測定方法の検討

1) E₁, E₂, E₃ の Sephadex LH-20 カラム クロマト

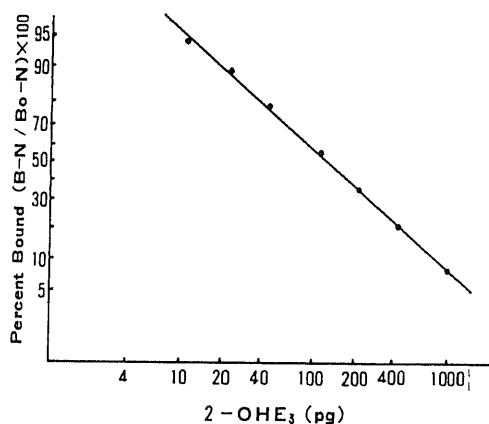


Fig. 6. Standard curve for 2-OHE₃ on a log-logit transformation. B₀, radioactivity (cpm) of bound [³H]2-OHE₃ when cold 2-OHE₃ was not added; B, radioactivity (cpm) of bound [³H]2-OHE₃ when various amounts of 2-OHE₃ were added; N, radioactivity (cpm) of non specific bound [³H]2-OHE₃.

グラフィーによる分離

E₁, E₂, E₃ の分離を検討するため [³H]E₁, [³H]E₂, [³H]E₃ 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, E₁, E₂, E₃ は溶出速度の違いで分離することができた。E₁, E₂, E₃ 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, E₁ は 94.5 ± 8.9%, E₂ は 92.5 ± 7.6%, E₃ は 81.2 ± 7.9% と良好であった。

2) 抗 E₁, E₂, E₃ 血清の特異性

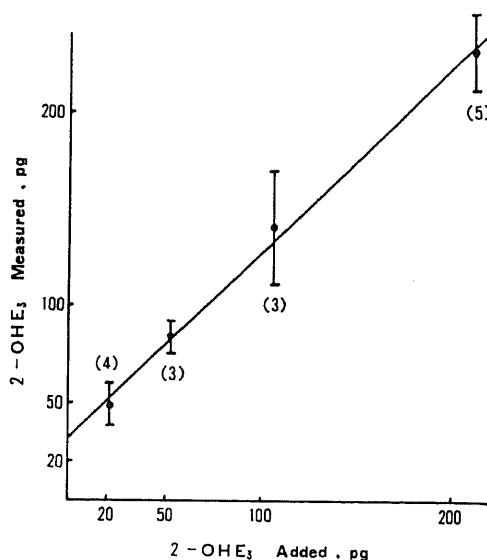


Fig. 7. Values measured when various amounts of 2-OHE₃ were added to the pooled plasma of adult men. Each point indicates mean ± S.D. The number of determination is shown in parentheses. Slope of regression line is 0.96 with a intercept of 32.6 pg/ml.

Table 1. Plasma concentration of 2-OHE₃

	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-OHE₃ 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-OHE₃ の定量

健常男子および非妊婦の血漿中 2-OHE₃ 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-OHE₃ および E_1 , E_2 , E_3 の定量

血漿中 2-OHE₃ 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-OHE₃ 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-OHE₃ 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-OHE₃ 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-OHE₃ 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-OHE₃ 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 あるいは

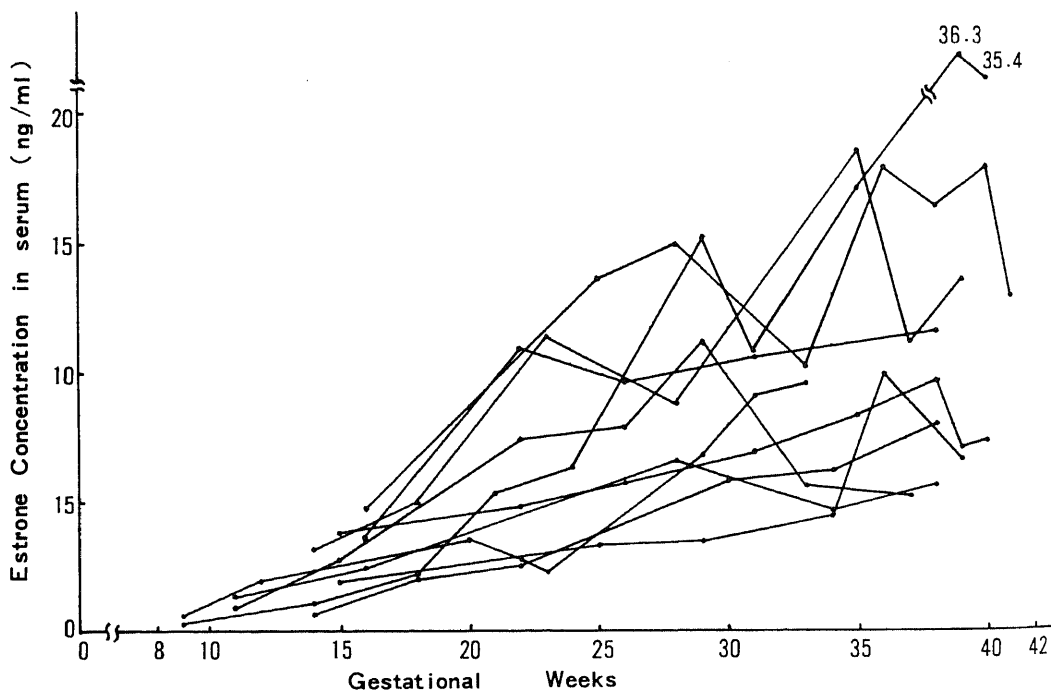


Fig. 8. Values for E_1 in 10 pregnant women throughout pregnancy.

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-OHE₁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-OHE₁が最も多く、また生理的意義の検討も2-OHE₁お

よび2-OHE₂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-OHE₁、2-OHE₂を中心に開発されてきた。

従来報告されている2-OHE₁^{20)~23)}および2-OHE₂²⁴⁾²⁵⁾のRIAでは抗原として2-OHE₁-17-(O-carboxymethyl)oxime-BSA または2-OHE₂-17-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-OHE₁血清は2-OHE₂、2-OHE₃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E₁、E₂、E₃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

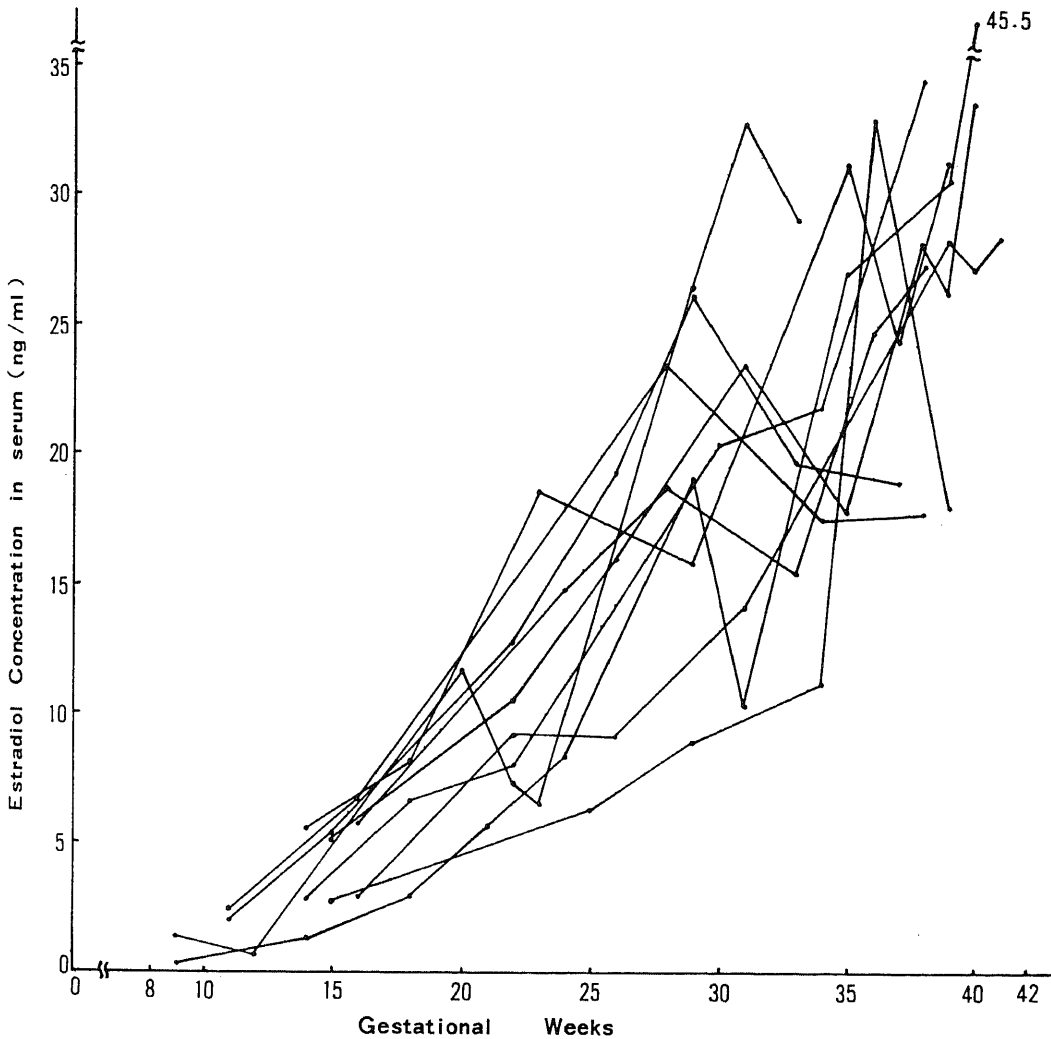


Fig. 9. Values for E₂ in 10 pregnant women throughout pregnancy.

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-OHE₁, 2-OHE₂ の抗原として 2-OHE₁- および 2-OHE₂-6-(O-carboxymethyl) oxime-BSA の合成を報告している。本研究の 2-OHE₃ の RIA に用いた抗血清も同様に 2-OHE₃-6-(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-OHE₂ 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-OHE₃ にきわめて特異性の高い抗血清であった。抗 2-OHE₃ 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-OHE₃ 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-OHE₃ 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 Chatteraj ら²¹⁾により尿中 2-OHE₁ と 2-OHE₂ の、Cecchini ら²²⁾, Kono ら²³⁾により血漿 2-OHE₁ と 2-OHE₂ 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-OHE₁ 値が 2-OHE₁ 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-OHE₃ 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-OHE₃ 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-OHE₁ 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⁾,

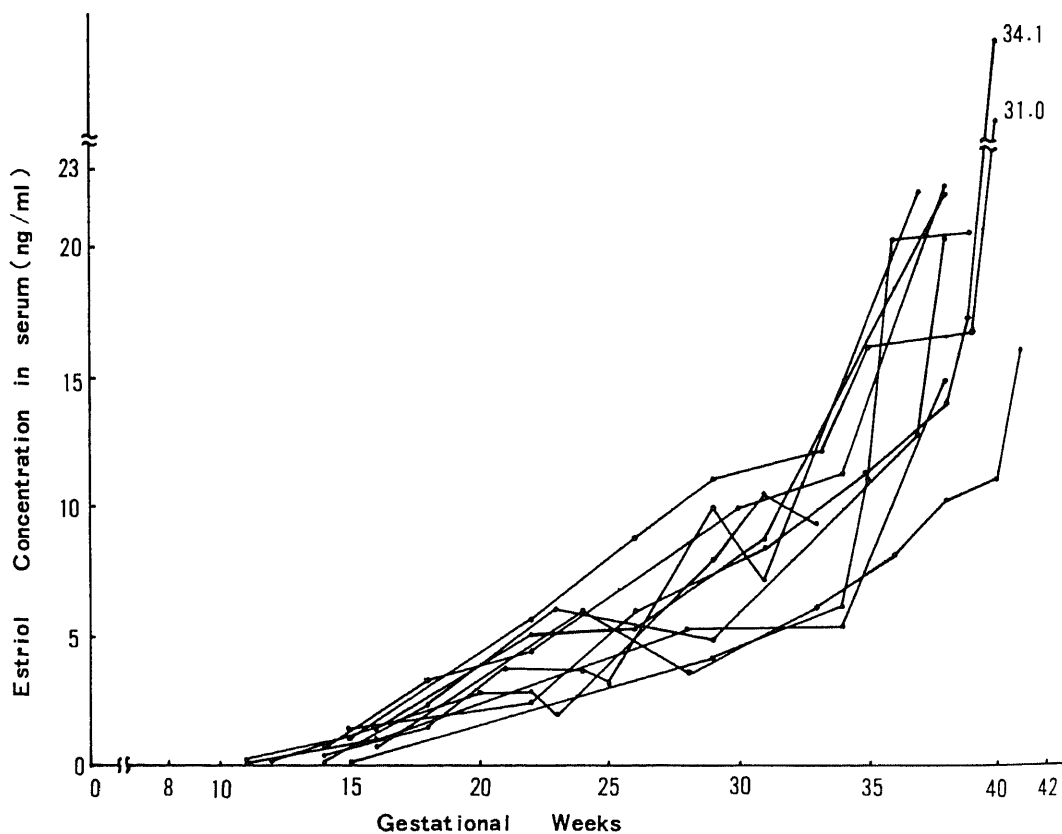


Fig. 10. Values for E_3 in 10 pregnant women throughout pregnancy.

Kono ら²³⁾, Berg ら²⁴⁾により相ついで報告された。2-OHE₁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 らは前二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-OHE₂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-OHE₁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-OHE₃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-OHE₃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 E₃の 7-30 pg/ml⁴¹⁾⁻⁴³⁾とほぼ同じ血中レベルであった。また 2-OHE₁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-

OHE₂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-OHE₁, 2-OHE₂, 2-OHE₃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-OHE₃値は妊娠の経過と共に増加し、妊娠各時期の 2-OHE₃血中レベルは 2-OHE₁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-OHE₃およびプライマリー エストロゲンである E₁, E₂, E₃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-OHE₃と E₁, E₂, E₃を測定し、妊娠の経過を追って E₁, E₂, E₃と 2-OHE₃の比を検討した。E₃/2-OHE₃比は妊娠の進行とともに全例で上昇し、E₁/2-OHE₃, E₂/2-OHE₃比も同様であった。桑原ら⁴⁴⁾は同じ

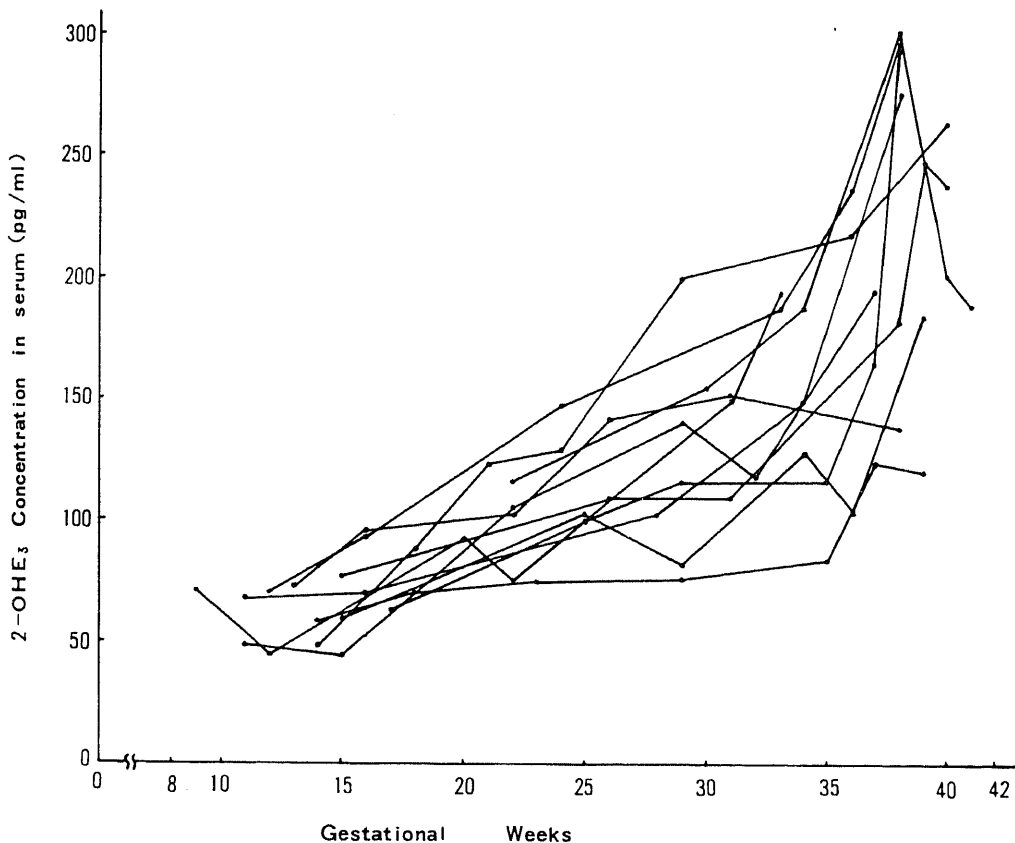


Fig. 11. Values for 2-OHE₃ in 10 pregnant women throughout pregnancy.

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

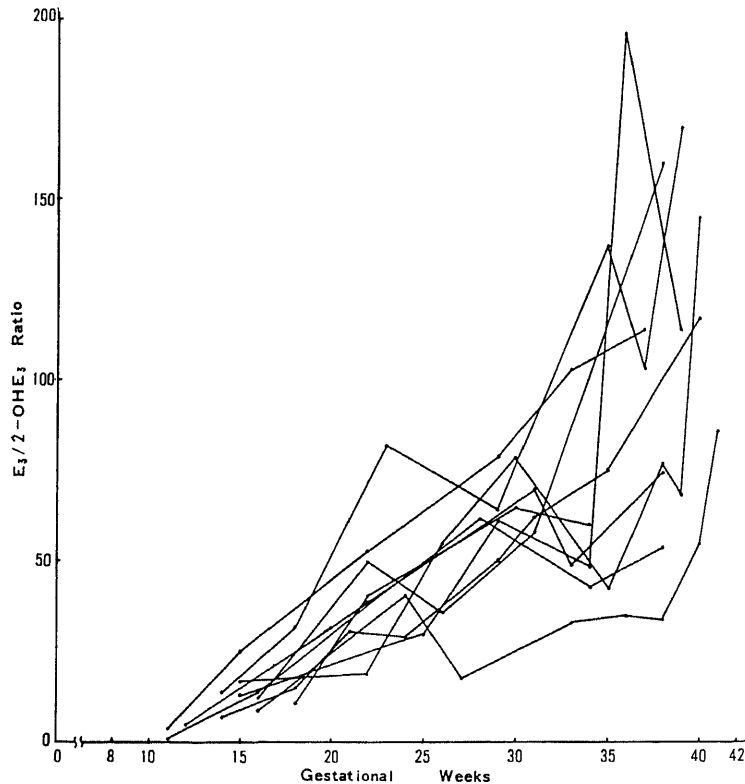


Fig. 12. Ratios of E_3 to $2-OHE_3$ in 10 pregnant women throughout pregnancy.

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 E₃ 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-OHE₃ 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-OHE₁ や 2-OHE₂ 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 E₂ 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-OHE₂ は子宮および血管収縮性の PGF_{2α} をふやし、反対に拡張性の 6-keto-PGF_{1α} (PGI₂ の安定代謝産物) を減じ、その作用は E₂ 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-OHE₃ 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-OHE₃ 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 E₁, E₂, E₃ を RIA で測定し、2-OHE₃ 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-OHE₃ 血清の交叉反応は 2-methoxy-estriol, E₃, 4-hydroxyestriol, 2-OHE₂ 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-OHE₃ 値は健康男子で 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-OHE₃, E₁, E₂, E₃ を同時に測定し、E₁/2-OHE₃, E₂/2-OHE₃, E₃/2-OHE₃ 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-OHE₃ 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., Johnson, L. A. & Naftolin, F.:** 2-hydroxyestradiol-17 α and 4-hydroxyestradiol-17 α , catechol estrogen analogs with reduced estrogen receptor affinity. *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., Grünh, 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., Nowrozi, 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 ¹²⁵I-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 [⁴⁻¹⁴C] estradiol. *Steroids*, **17**, 133-140 (1971).
- 28) **Nishina, T., Tsuji, A. & Fukushima, D. K.**: Site of conjugation of bovine serum albumin 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 albumin 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-17 β and estriol using 6-O-carboxymethyl oxime bovine serum albumin derivatives. *Steroids*, **21**, 755-769 (1973).
- 31) **Cohen, M. & Cohen, H.**: A radioimmunoassay for plasma unconjugated 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. Pharm. 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 μ l 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 receptor binding of catecholestrogens and estrol (1, 3, 5, (10) estratriene-3, 15 α , 16 α , 17 β -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 α} . *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-OHE₃) was developed, and the plasma levels in normal pregnant women were measured. The plasma levels of 2-OHE₃ together with classical estrogens-estrone (E₁), estradiol (E₂) and estriol (E₃), were followed serially in ten women throughout pregnancy. An antiserum raised against 2-OHE₃-6-(0-carboxymethyl)oxime-bovine serum albumin was highly specific to 2-OHE₃. Plasma samples for RIA of 2 OHE₃ were extracted with ethyl acetate and chromatographed on Sephadex LH-20 column in benzene-methanol (89:11, saturated with ascorbic acid). RIA of 2-OHE₃ was carried out in buffer containing 0.05% ascorbic acid using 8,000 cpm of ³H-2-OHE₃ and the antiserum diluted to 1:5,000. Free and bound steroids were separated 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%. Accuracy 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-OHE₃ 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-OHE₃ 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-OHE₃ increased gradually after the 15th week of gestation, and rose steeply after the 30th week. The plasma levels of E₁, E₂ and E₃ increased gradually during the second and third trimesters, and the rise of E₃ was particularly evident after the 30th week. The ratios of E₁, E₂ and E₃ to 2-OHE₃ increased towards the end of gestation. This relatively low rate of increase of 2-OHE₃ 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-OHE₃ 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 catecholestrogens will contribute to the elucidation of a physiological role of the unique estrogen metabolites.