

《ノート》

平衡透析法を用いた血中遊離サイロキシン濃度測定 ラジオイムノアッセイキットの検討

Studies on Free Thyroxine Measurement by Equilibrium
Dialysis Radioimmunoassay Kit

飯田 泰啓* 高坂 唯子* 小林香津子* 富田 恵子*
日高 昭斉* 竹内 亮* 勝島 慎二* 御前 隆*
笠木 寛治* 小西 淳二*

Yasuhiro IIDA, Tadaki KOUSAKA, Katsuko KOBAYASHI, Keiko TOMIDA,
Akinari HIDAKA, Ryou TAKEUCHI, Shinji KATSUSHIMA,
Takashi MISAKI, Kanji KASAGI and Junji KONISHI

Department of Radiology and Nuclear Medicine, Kyoto University School of Medicine

I. はじめに

血中甲状腺ホルモンの大部分は血清蛋白と結合して存在し、ごく一部の遊離甲状腺ホルモンが末梢での代謝に関与すると考えられている。とりわけ T₄ 結合グロブリン (TBG) を主とする血中のホルモン結合蛋白の変動や結合阻害物質の存在する場合には、この遊離甲状腺ホルモンの測定が甲状腺機能の評価に重要であることが知られている。

従来、遊離甲状腺ホルモンの測定法として、平衡透析法¹⁻³⁾、限外濾過法⁴⁾、ゲル濾過法^{5,6)}などが用いられ、また近年に至ってラジオイムノアッセイ (RIA) による測定法が種々開発されている⁷⁻¹¹⁾。

平衡透析法は血中のホルモン結合蛋白の変動、結合阻害物質の存在などがある場合にも、遊離サイロキシン (Free T₄) が正確に測定できる標準の方法である。今回著者は、キット化により操作

の簡便となった平衡透析法を用いる Free T₄ RIA キットを試用する機会を得、その基礎的検討を行うとともに臨床的有用性について検討した。

II. 測定原理

本法は Free T₄ 測定の標準法である平衡透析法に RIA による T₄ の測定を組み合わせたものである^{12,13)}。すなわち検体血清を希釈することなく平衡透析を行い、T₄ 結合蛋白、蛋白結合 T₄ と Free T₄ を分離した後、その外液中の Free T₄ を固相化抗体を用いる RIA にて直接測定する方法である¹⁴⁾。再利用可能でユニークな平衡透析用のセルの開発により平衡透析が簡便となったこと、透析外液中の微量の Free T₄ の測定を可能とする高感度の固相化 T₄ RIA の開発が特徴である。

III. 測定方法

測定方法の概要を Fig. 1 に示した。平衡透析は再利用が可能なキットに添付されている透析セルを用いて行う。これは透析外液を入れる透析パイ

Key words: Free Thyroxine, Equilibrium dialysis, Radioimmunoassay.

* 京都大学医学部放射線核医学科

受付: 3年3月20日

最終稿受付: 3年7月2日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 54 (☎ 606)

京都大学医学部放射線核医学科

飯田 泰 啓

アルに分子量 12,000 から 14,000 のカットオフ値の透析膜を有するメンブランシリンダーが装着できるようにになっている。

1. 透析操作

1) 透析緩衝液 2.4 ml を透析バイアルの中にピペティングし、メンブランシリンダーをバイアルの中に装着する。

2) 検体血清 200 μ l をシリンダー内にピペティングする。

3) 37°C で 16-18 時間インキュベーションする。

2. RIA 操作

1) 抗 T₄ 抗体固相チューブに透析外液 800 μ l を加える。

2) 抗体チューブに ¹²⁵I-T₄ 溶液を 50 μ l 添加する。

3) 37°C で 3 時間インキュベーションする。

4) 反応終了後、反応液を吸引除去する。さらに 2 ml の洗浄液で 2 回抗体チューブを洗浄する。

5) 抗体チューブの放射能を測定する。

6) 標準 T₄ について得られた放射能より B/B₀ を縦軸に、対応する Free T₄ 濃度を横軸にプロットして標準曲線を作成し、検体の B/B₀ から T₄ 値を読み取る。

IV. 実験方法および対象

本測定法に対する基礎的検討として透析時間、透析検体量の影響、透析検体の希釈の影響、T₄ 測定 RIA インキュベーション温度および時間の

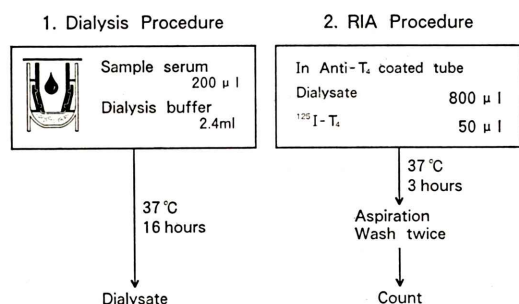


Fig. 1 Assay protocol of free T₄ RIA by equilibrium dialysis.

影響、希釈試験、回収率、交差反応と最小検出感度、再現性、アルブミン添加の影響を検討した。

臨床的有用性については健常者 28 例、甲状腺機能亢進症 42 例、甲状腺機能低下症 19 例、肝硬変症 5 例、慢性腎不全 9 例、健常妊婦 31 例、TBG 減少症 2 例、抗 T₄ 抗体を有する患者 5 例の計 141 例の血中 FT₄ を測定し、甲状腺機能との関連を検討した。またこのうち 42 例についてスパック T₄ RIA キット (第一ラジオアイソトープ研究所) を用いて測定した総 T₄ 濃度とトリオソルブ-S (ダイナボット社) による T₃ 摂取率測定値を乗じて FT₄ Index (FT₄ I) を求め、本測定法による FT₄ 値との相関を検討した。さらに 67 症例では、アマシャム社のアマレックス-M FT₄ RIA キットによる FT₄ 測定値と比較した。

V. 結果

1. 基礎的検討の成績

1) 透析時間の検討

透析時間および温度を変化させて測定値におよぼす影響を検討した。4, 25°C では FT₄ 測定値は低値を示したが、生理的温度である 37°C では 16 時間以降 48 時間までほぼ一定の FT₄ 値を示した (Fig. 2)。

2) 透析検体量の検討

FT₄ 濃度が低値、正常値および高値の 3 血清について透析血清量を 100 より 800 μ l まで変化さ

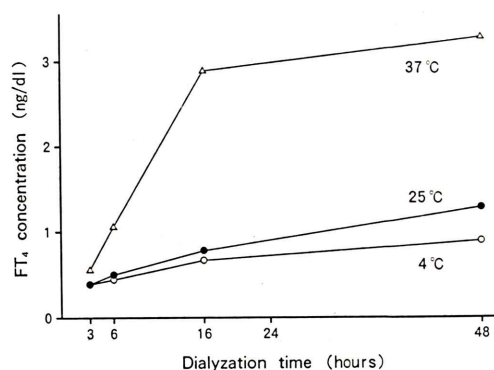


Fig. 2 Effect of dialysis time and temperature on free T₄ concentration.

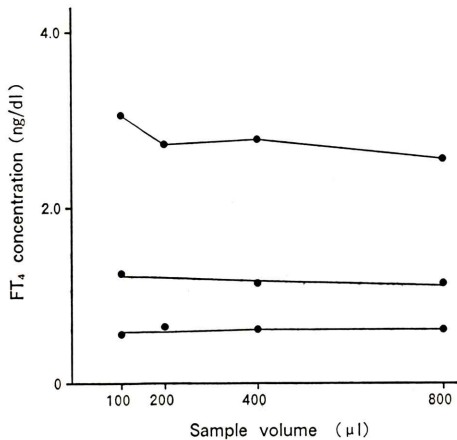


Fig. 3 Effect of sample serum volume on free T₄ concentration.

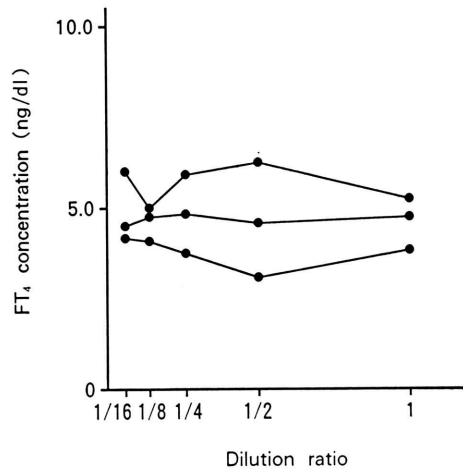


Fig. 4 Effect of dilution of sample serum on free T₄ concentration.

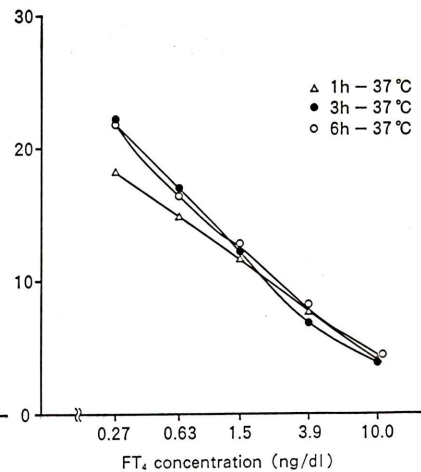
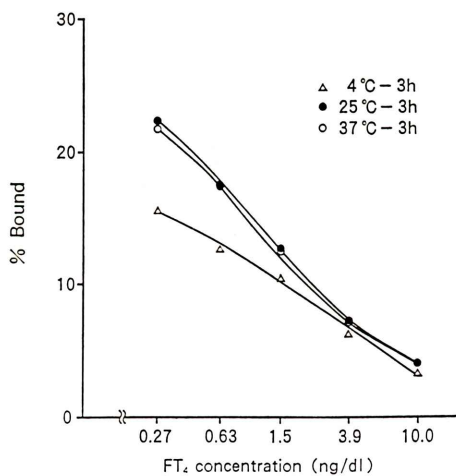


Fig. 5 Effect of incubation temperature and time of dialysate free T₄ RIA on the standard curve.

せて測定値におよぼす影響を検討した (Fig. 3). 検体量が 100 μl では FT₄ 値が高値の血清で軽度の測定値の上昇を認めたが, それ以外のいずれの血清量でもほぼ一定の値を示した.

3) 透析検体の希釈の影響

血清を T₄ ゼロ標準液で 16 倍まで希釈して平衡透析を行い, その結果を Fig. 4 に示した. いずれの検体も 16 倍までの希釈内で, FT₄ 測定値は最大 23.6% の変動にとどまった.

4) 透析外液中の FT₄ 測定用 RIA のインキュベーション温度

インキュベーション時間を 3 時間として, インキュベーション温度を 4°C, 25°C および 37°C と変化させたときの標準曲線の変化を Fig. 5 に示した. 4°C では標準曲線の勾配が緩やかであり, 25°C および規定の 37°C で感度のよい標準曲線が得られた.

5) 透析外液中の FT₄ 測定用 RIA のインキュベーション時間

インキュベーション温度を 37°C とし、インキュベーション時間を 1 時間、3 時間、6 時間とした時の標準曲線の変化を Fig. 5 に示した。1 時間では結合パーセントが低かったが、3 時間、6 時間では結合パーセントは充分で、その低下率も良好であり、規定の 3 時間で感度のよい標準曲線が得られた。

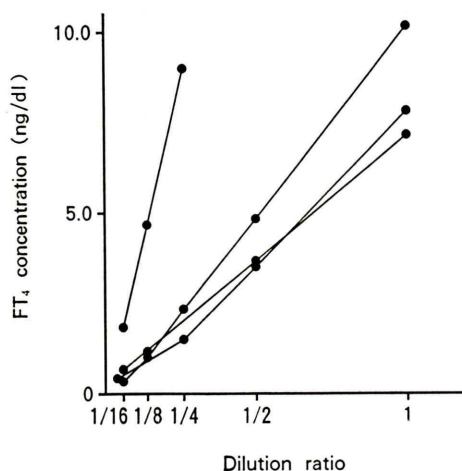


Fig. 6 Effect of dilution of dialysate on free T₄ concentration.

6) 透析外液の希釈試験

種々の FT₄ 濃度の血清より得た透析外液を T₄ ゼロ標準液で 16 倍まで希釈した結果を Fig. 6 に示した。いずれの検体においても良好な希釈直線性が得られた。

7) 透析外液中の FT₄ 測定用 RIA の回収試験

4 種の濃度の透析外液に T₄ 標準液の 2 倍希釈液を順次等量混合して求めた回収試験の成績を Table 1 に示した。回収率は 73.3 から 134.7% であり、その平均回収率は 92.9±17.6% であった。

8) 透析外液中の FT₄ 測定用 RIA の交差反応

アッセイ系に T₄ ゼロ標準液に溶解した L-T₃ (1~10,000 ng/dl), MIT, DIT (100~10,000 ng/dl) を添加して標識 T₄ の結合に及ぼす影響を検討した。特異結合の 50% 抑制を示す濃度より交差反応を計算すると、L-T₃ とは 2.2%, MIT, DIT とは 0.01% 以下の交差反応しかなかった。またアマレックス-M FT₄ の測定系で L-T₄ (100~100,000 ng/dl) を測定し、本キットで測定した場合と比較した結果、本キットに使用されている抗体は特異結合の 50% 抑制を示す濃度で約 2,800 倍高感度であった (Fig. 7)。

また、FT₄ ゼロ濃度の標準液との有意差検定より求めた FT₄ 濃度の最小検出感度は 0.125 ng/dl であった ($p < 0.05$, $n = 6$, Student's t-test)。

Table 1 Recovery test

	Added T ₄ concentration				
	0.00	0.30	0.75	2.10	5.00
Measured	0.60	0.82	1.61	3.03	5.48
Recovered		0.22	1.01	2.43	4.88
%Recovery		73.3	134.7	115.7	97.6
Measured	0.88	1.13	1.43	2.76	5.55
Recovered		0.25	0.55	1.88	4.67
%Recovery		83.3	73.3	89.5	93.4
Measured	2.46	2.73	3.31	4.03	6.78
Recovered		0.27	0.85	1.57	4.32
%Recovery		90.0	113.3	74.8	86.4
Measured	3.64	3.89	4.25	5.39	9.25
Recovered		0.25	0.61	1.75	5.61
%Recovery		83.3	81.3	83.3	112.2

Mean±SD 92.9±17.6

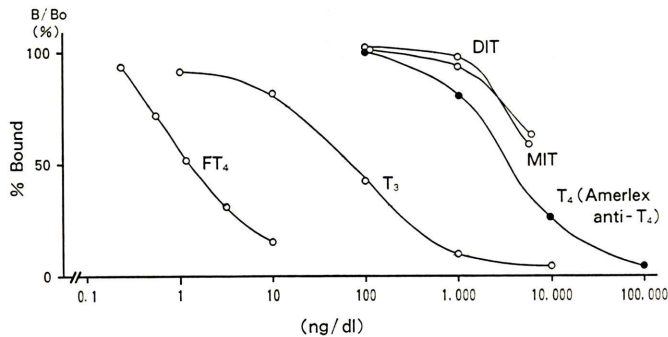


Fig. 7 Sensitivity of dialysate free T₄ RIA and cross-activity. ●: Dose-inhibition curve in Amerlex-M FT₄ RIA system.

Table 2 Reproducibility

	Intra-assay		Inter-assay	
	1	2	1	2
1	1.31	2.75	1.01	2.87
2	1.29	2.72	1.47	3.20
3	1.22	2.69	1.46	2.90
4	1.35	2.87	1.57	3.55
5	1.52	2.85	1.48	2.67
6	1.54	2.80	1.33	2.75
7	1.41	2.77	1.33	2.23
8	1.39	2.53	—	—
9	1.54	2.69	—	—
10	1.39	2.64	—	—
N	10	10	7	7
Mean	1.40	2.73	1.38	2.88
SD	0.11	0.10	0.18	0.42
CV (%)	7.9	3.7	13.0	14.6

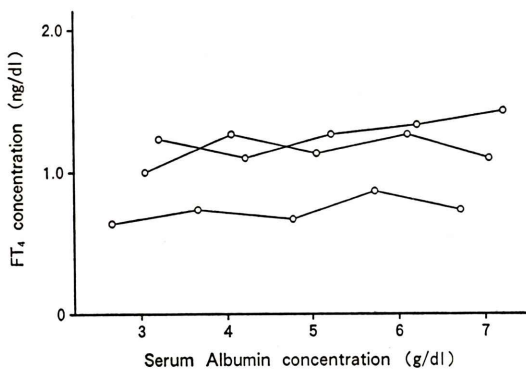


Fig. 8 Effect of serum albumin addition on serum free T₄ concentration.

9) 再現性

濃度の異なる2種の血清について同一アッセイ内で10回、異なったアッセイで7回、それぞれ測定を繰り返したときの再現性をTable 2に示した。同一アッセイ内での変動係数は3.7, 7.9%であり、異なるアッセイでの変動係数は13.0, 14.6%であった。

10) アルブミン添加の影響

血清アルブミン濃度が低値の血清に精製ヒト血清アルブミン (Sigma, A8763) を1~4 g/dl 添加して平衡透析を行い FT₄ 濃度を測定した。血清アルブミンの添加によっても血清測定値に有意の変動はなかった (Fig. 8)。

2. 臨床的検討の成績

1) 健常者および各種疾患患者における FT₄ 測定成績

臨床例における FT₄ 濃度の測定成績を Fig. 9 に示した。健常者の FT₄ 濃度は 0.97 から 1.76 ng/dl に分布し、平均濃度は 1.35±0.22 (SD) ng/dl であった。正常域として平均±2 SD をとると 0.91~1.79 ng/dl であった。

甲状腺機能亢進症 42 例では 2.26~11.2 ng/dl 以上に分布し全例が高値を示した。一方、甲状腺機能低下症 19 例では 0.23~0.90 ng/dl に分布し全例が低値を示し、いずれも正常域との重なりは認められなかった。

肝硬変症では 0.64~1.10 ng/dl に分布し、正常

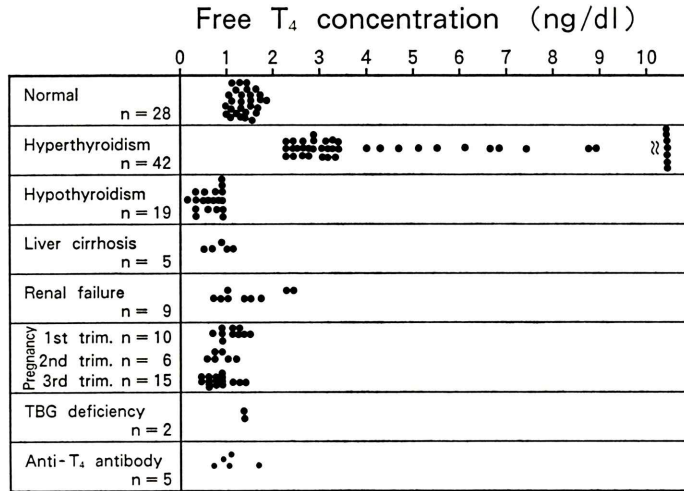


Fig. 9 Serum free T₄ concentration in various physiological and pathological conditions.

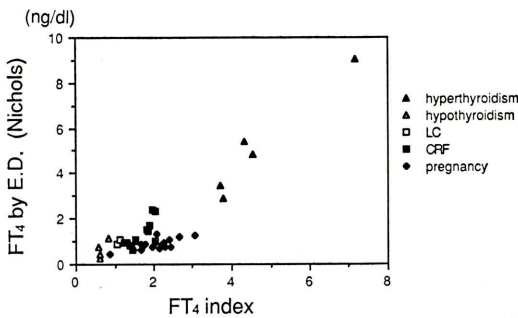


Fig. 10 Correlation between free thyroxine index and free T₄ concentration measured by equilibrium dialysis RIA kit.

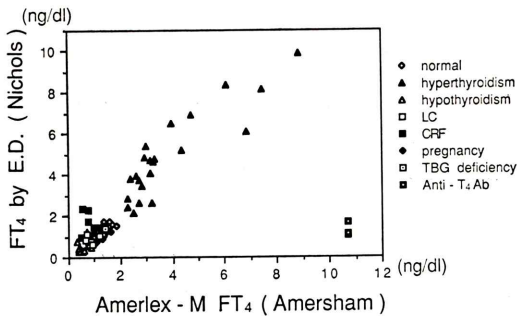


Fig. 11 Correlation between free T₄ concentration by Amerlex RIA kit and that by equilibrium dialysis RIA kit.

域からやや低値域であった。慢性腎不全の9例では 0.81~2.38 ng/dl とわずかな低値域より高値域と広い範囲に分布した。

妊婦では 0.42~1.37 ng/dl に分布し正常域から低値域に分布した。妊娠第2期, 第3期では第1期よりも有意に FT₄ 値は低値であった (p<0.05, p<0.01)。

TBG 減少症の2症例では, 1.36 ng/dl, 1.40 ng/dl と正常域であった。

抗 T₄ 抗体を有する5症例では, 4例が正常範囲に分布し, 1例がやや低値を示した。

2) FT₄ I との関係

42例の患者について総 T₄ 濃度および T₃ 摂取率を測定して FT₄ I を算出し, FT₄ 値と FT₄ I との関係を Fig. 10 に示した。両者の間には r=0.897 と有意の正の相関が認められた (p<0.001)。しかし妊婦症例では, FT₄ I が高値を示す傾向が認められた。

3) アマレックス-M FT₄ 測定キットによる測定値との比較

アマレックス-M FT₄ 測定キットを用いて測定した114例において両者の FT₄ 測定値を比較検討した。Fig. 11 に示したように, 抗 T₄ 抗体を有する症例では, アマレックス-M FT₄ キットで高

値となり両者に解離が認められた。しかし、これらの症例をのぞくと両者の間には $r=0.946$ と有意の正の相関が認められた ($p<0.001$)。しかし、回帰直線は $Y=1.218X-0.137$ となり、本キットによる測定値はアマレックス-M FT₄ による測定値と比べごく低値域では低い値を示すが、正常域以上においては高い値となる傾向が認められた。

VI. 考 察

血中の FT₄ はきわめて微量で、大量の蛋白結合型 T₄ と平衡関係を保って存在している。近年に至って FT₄ の RIA 法による直接測定法が種々開発されている⁷⁻¹¹⁾。しかし、アッセイ系内に直接または間接に高親和性の抗 T₄ 抗体が共存しているため、血清結合蛋白より T₄ が遊離する、すなわち FT₄ と結合蛋白の生理的な平衡関係が乱されるという問題があった。そのため常に生理的な遊離ホルモンが測定できていないのかという疑問が残った。

平衡透析法は血中のホルモン結合蛋白の変動、結合阻害物質の存在などがある場合にも、FT₄ を正確に測定できる標準法として確立された方法である¹⁻³⁾。本キットで用いられているのは、Jiang^ら¹²⁾、Yeo^ら¹³⁾ によって開発された方法で、平衡透析を行い、その外液中の T₄ を RIA によって測定する方法である。従来より平衡透析操作は手技が煩雑とされてきたが、本キットでは独自の透析セルの開発によって、平衡透析操作が簡便化されている。また高感度の T₄ RIA の開発により、FT₄ 測定の標準法である平衡透析法をキット化することを可能にしている¹⁴⁾。

測定法に関する基礎的検討では、まず透析時間、温度の検討をした。4、25°C では FT₄ 測定値が低値を示したが、これは T₄ と結合蛋白の可逆平衡が、生理的温度である 37°C とは異なっていることを示すものである。37°C での透析では、16 時間以上ではほぼ一定の FT₄ 測定値を示した。このことは、透析条件は 37°C で 16 時間以上であれば十分であることを示し、従来の平衡透析法の条件とも一致するものである¹⁻³⁾。

異なる検体血清量または検体血清を希釈した FT₄ 測定値はほぼ一定であった。このことは、本キットで測定された FT₄ 値が血中 T₄ と血中結合蛋白間の質量作用の法則に従ったものであることを示している。標識 T₄ を用いる Sterling^ら¹⁾ の方法では検体の希釈で %FT₄ 値の低下が報告されている^{15,16)}。われわれのデータはこれらと異なり、FT₄ 値の低下をほとんど認めなかった。その理由は明らかではないが、本キットでは直接に透析外液中の FT₄ 値の測定を行っているため、%FT₄ 値を求めるときのような遊離の放射性ヨード混入の影響を避け得ることや、希釈液のイオン濃度などの条件が異なることによるものと推察できる。

透析された遊離 T₄ 濃度を測定する RIA の検討で、インキュベーション温度および時間については、4°C および 1 時間の反応では結合パーセントが低かったが、25°C、37°C および 3 時間、6 時間では標準曲線にほとんど差はなく、キット規定の 37°C、3 時間の反応で十分であった。

この RIA の希釈試験は満足するものであったが、回収試験はばらつきが大きかった。この理由は、透析外液中のごく微量の FT₄ 濃度を測定する RIA 系であるためと考えられた。

交差試験で RIA に用いられている抗 T₄ 抗体は、T₃ との間に 2.2% の交差反応性が認められたが、健常者において FT₃ 濃度は FT₄ 濃度の約 13% に相当し¹⁷⁾、臨床には問題にならないと考えられた。抗 T₄ 抗体と検体血清が同一アッセイ系に共存するアマレックス-M FT₄ キットで用いられている抗 T₄ 抗体に比し、本キットに使用されている抗体は約 2,800 倍高感度で、このことが平衡透析外液中の微量の T₄ を測定する RIA を可能にしたと考えられた。最小検出感度も良好で、再現性ではやや変動係数が大きかったが、これは主として透析操作による影響と考えられた。

ヒト血清アルブミンを検体血清に添加しても FT₄ 測定値にはほとんど影響がなかった。このことは、このキットが血清アルブミン濃度に左右されない測定法であることを示す成績である。

そこで臨床例について FT₄ 値を測定し、その妥

当性について検討した。

健常者における FT₄ 濃度は 1.35 ± 0.22 (SD) ng/dl で、正常域は 0.91~1.79 ng/dl であった。同一の健常者 28 例の血清についてアマレックス-M FT₄ キットで求めた FT₄ 濃度は 1.36 ± 0.18 ng/dl で正常域は 1.01~1.72 ng/dl であったことから、ほぼ妥当な正常域を示すと考えられる。

甲状腺機能亢進症では全例が高値を示し、甲状腺機能低下症では全例が低値で、いずれも健常者との重なりは全くみられなかった。

肝硬変症では正常から低値域に分布した。肝硬変では T₄ から T₃ への conversion の低下、TBG 結合阻害物質の存在などにより、%free T₄ の増加があるため、FT₄ が上昇していると報告されている^{18,19)}。この成績は、われわれの結果と一致しないが、おそらく肝硬変の程度の相違によるものと考えられる。

腎不全では FT₄ は正常から低下傾向を示すと報告されている^{17,20)}。われわれの成績では比較的高値の 2 例を除いてこれと同様の分布を示した。しかし腎不全では、種々の代謝産物の蓄積により T₄ 結合を阻害することが考えられ、その程度によって、FT₄ 値が高値を取りうると思われる。

健常妊婦においては、FT₄ が妊娠中正常レベルを保っていると考えられてきたが²¹⁾、妊娠後期には、わずかであるが FT₄ が低下していることを支持する成績もある²²⁾。本キットでも同様の成績であった。このことは、妊娠の後期には FT₄ そのものが低下していることを支持する成績である。

肝硬変症、腎不全、健常妊婦での FT₄ 低下が甲状腺機能低下症を意味するかを確かめるために血中 TSH 濃度の測定を行ったが、いずれの症例も TSH 濃度は正常域内に分布し、甲状腺機能は正常と考えられた。また FT₄ 値と TSH 濃度との間にも有意の相関はなかった。

TBG 減少症ではいずれの症例も FT₄ 測定値は正常域にあり、遊離ホルモンを正確に測定できていると考えられた。

抗 T₄ 抗体を有する症例では、1 例を除き正常範囲内に分布した。FT₄ が正常域にある症例の血

清 TSH は正常域であり、FT₄ 値が低値であった症例の TSH 濃度は軽度上昇していた。したがって、抗 T₄ 抗体を有する症例においても、遊離ホルモンを正確に測定できていると考えられた。これらの 5 症例の FT₄ を、アマレックス FT₄ キットを用いて測定した場合には、いずれも 10.7 ng/dl 以上の高値を示していた。

T₄ と T₃ 摂取率より求めた FT₄I と FT₄ 値とは有意の相関があったが、妊娠症例では解離が認められた。その原因としては、FT₄I では T₃ 摂取率測定レンジの制約のため、TBG 増加の補正が十分にできないためと考えられる。

アマレックス FT₄ キットを用いて測定した値との比較では、前述の抗 FT₄ 抗体を有する症例で解離する以外は良好な正の相関関係があった。

VII. 結 論

キット化により操作の簡便となった平衡透析法を用いる Free T₄ RIA キットを試用し、その基礎的、臨床的検討を行い、以下の成績を得た。

1) 平衡透析は規定の 37°C で 16 時間以上で十分で、透析検体量、透析検体の希釈の検討より、本キットで質量作用の法則に従った FT₄ 値が測定できていると考えられた。

2) 透析外液中の T₄ 測定用 RIA のインキュベーション温度、時間の検討で、規定の 37°C、3 時間で良好な標準曲線が得られた。この RIA の希釈試験は満足すべきものであったが、回収試験はややばらつきが大きかった。抗体の特異性、最小検出感度は良好であった。

3) 検体血清にアルブミンを添加しても、FT₄ 測定値にはほとんど変化はなく、血清アルブミン濃度に影響をうけにくい測定法と考えられた。再現性ではやや変動係数が大きかった。

4) 健常者の FT₄ 値は 1.35 ± 0.22 (SD) ng/dl で、甲状腺機能亢進症患者、甲状腺機能低下症患者における測定値との重なりは全く認められなかった。

5) 肝硬変症では正常域からやや低値域に、慢性腎不全ではわずかな低値域より高値域に分布した。妊婦では正常域から低値域に分布し、妊娠第

2期, 第3期では有意に低値であった。TBG減少症では正常域であった。抗T₄抗体を有する症例では, 正常範囲およびやや低値を示した。

6) 本キットによるFT₄測定値は, T₄とT₃摂取率より求めたFT₄I値およびアマレックス-M FT₄キットを用いて測定したFT₄値との間に良好な正の相関関係を示した。

おわりに本キットを提供していただいた日本メジフィジックス株式会社に深謝いたします。

文 献

- 1) Sterling K, Brenner MA: Free thyroxine in human serum: Simplified measurement with the aid of magnesium precipitation. *J Clin Invest* **45**: 153-163, 1966
- 2) Oppenheimer JH, Squef R, Surks MI, et al: Binding of thyroxine by serum proteins evaluated by equilibrium dialysis and electrophoretic techniques. Alterations in nonthyroidal illness. *J Clin Invest* **42**: 1769-1782, 1963
- 3) Ingbar SH, Braverman LE, Dawber NA, et al: A new method for measuring the free thyroid hormone in human serum and an analysis of the factors that influence its concentration. *J Clin Invest* **44**: 1679-1689, 1965
- 4) Schussler GC, Plager JE: Effect of preliminary purification of ¹³¹I-thyroxine on the determination of free thyroxine in serum. *J Clin Endocr* **27**: 242-250, 1967
- 5) Lee ND, Henry RJ, Golub OJ: Determination of the free thyroxine content of serum. *J Clin Endocr* **24**: 486-495, 1964
- 6) McDonald LJ, Robin NI, Siegel L: Free thyroxine in serum as estimated by polyacrylamide gel filtration. *Clin Chem* **24**: 652-656, 1978
- 7) 池窪勝治, 高坂唯子, 飯田泰啓, 他: Free T₄ RIA kit (Corning) による血中遊離サイロキシン濃度の測定について。ホルモンと臨床 **28**: 109-114, 1980
- 8) 小西淳二, 高坂唯子, 飯田泰啓, 他: 固相法 radioimmunoassay による血中遊離サイロキシン測定の基礎的検討と臨床応用。核医学 **17**: 963-970, 1980
- 9) 中川 毅, 信田憲行, 松村 要, 他: Radioimmunoassay による血中遊離型サイロキシンの測定—Gamma Coat Free T₄ Kitによる検討—。核医学 **18**: 385-400, 1981
- 10) 笠木寛治, 小西淳二, 高坂唯子, 他: 透析膜マイクロカプセルを用いた血中遊離サイロキシン濃度測定法について。核医学 **18**: 973-983, 1981
- 11) 小西淳二, 高坂唯子, 飯田泰啓, 他: Radioimmunoassay による血中遊離サイロキシン濃度の測定—Amerlex FT₄ RIA kitの検討—。核医学 **19**: 115-124, 1982
- 12) Jiang N, Tue KA: Determination of free thyroxine in serum by radioimmunoassay. *Clin Chem* **23**: 1679-1683, 1977
- 13) Yeo PPB, Lewis M, Evered DC: Radioimmunoassay of free thyroid hormone concentrations in the investigation of thyroid disease. *Clin Endocr* **6**: 159-165, 1977
- 14) Nelson JC, Tomei RT: Direct determination of free thyroxine undiluted serum by equilibrium dialysis/radioimmunoassay. *Clin Chem* **34**: 1737-1744, 1988
- 15) Uchimura H, Nagataki S, Tatuchi T, et al: Measurements of free thyroxine: comparison of per cent free thyroxine in diluted and undiluted sera. *J Clin Endocrinol Metab* **42**: 561-566, 1976
- 16) Spaulding SW, Gregerman RI: Free thyroxine in serum by equilibrium dialysis: effect of dilution, specific ions and inhibitors of binding. *J Clin Endocrinol Metab* **34**: 974-982, 1972
- 17) Chopra IJ, Chopra V, Smith SR, et al: Reciprocal changes in serum concentrations of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T₃) and 3,3',5'-triiodothyronine (T₃) in systemic illness. *J Clin Endocrinol Metab* **41**: 1043-1049, 1975
- 18) Inada M, Sterling K: Thyroxine turnover and transport in Laennec's cirrhosis of the liver. *J Clin Invest* **46**: 1275-1282, 1967
- 19) Chopra IJ, Solomon DH, Chopra U, et al: Alterations in circulating thyroid hormones and thyrotropin in hepatic cirrhosis: Evidence for euthyroidism despite subnormal serum triiodothyronine. *J Clin Endocrinol Metab* **39**: 501-511, 1974
- 20) Wasser SJ, Buckingham BA, Kershner AJ, et al: Thyroid function in children with chronic renal failure. *Nephron* **19**: 236-241, 1977
- 21) Refetoff S, Ochi Y, Selenkow HA, et al: Neonatal hypothyroidism and goiter in one infant of each of two sets of twins due to maternal therapy with antithyroid drugs. *J Pediatr* **85**: 240-244, 1974
- 22) Weeke J, Dybkjaer L, Granlie K, et al: A longitudinal study of serum TSH, and total and free iodothyronines during normal pregnancy. *Acta Endocrinol* **101**: 531-537, 1982