

《ノート》

GammaCoat Free T₄ RIA キットによる血清 free T₄ の測定

— 平衡透析法との比較 —

Radioimmunoassay for Free Thyroxine in Serum by GammaCoat
Free T₄ Radioimmunoassay Kit Compaired with Equilibrium Dialysis Method

吉田 克己* 桜田 俊郎* 貴田岡博史* 深沢 洋*
海瀬 信子* 海瀬 和郎* 山本 莎子* 斎藤慎太郎*

Katsumi YOSHIDA*, Toshiro SAKURADA*, Hirofumi KITAOKA*,
Hiroshi FUKAZAWA*, Nobuko KAISE*, Kazuo KAISE*, Makiko YAMAMOTO*
and Shintaro SAITO*

*The Second Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine, Sendai

I. 緒 言

遊離サイロキシン (free T₄) 濃度は甲状腺の機能状態を最もよく反映する指標の一つと考えられている。その測定は通常平衡透析法^{1,2)}、限外濾過法³⁾ないしゲル濾過法⁴⁾などにより行なわれているが、これらでは多くの検体を同時に処理するためには手技が煩雑であり、ルーチンの検査法として広く行なわれるにはいたっていない。このたびわれわれは、血清 free T₄ 濃度を簡便かつ短時間に測定するキット (Travenol 社製, GammaCoat free T₄ radioimmunoassay (RIA) kit) を試用する機会を得たので、若干の基礎的検討を行なうとともに、従来の平衡透析法と比較し、その臨床的有用性について検討した。

II. 測定原理および方法

free T₄ の測定原理は、抗体でコートされた試験管内で行なわれる RIA で、T₄ 結合蛋白と結合

* 東北大学医学部第2内科

受付: 54年8月2日

最終稿受付: 54年11月5日

別刷請求先: 仙台市星陵町1-1 (番号980)

東北大学医学部附属病院第2内科

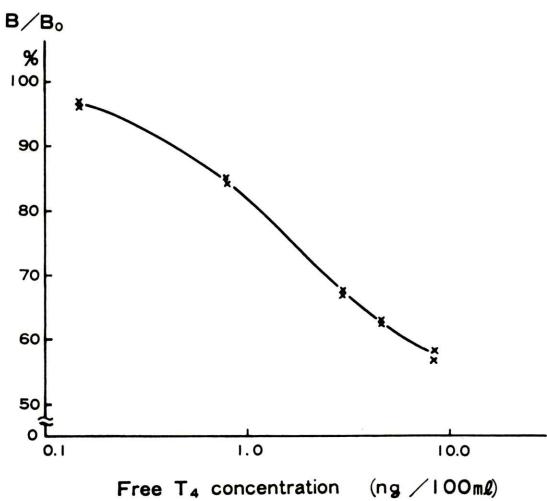
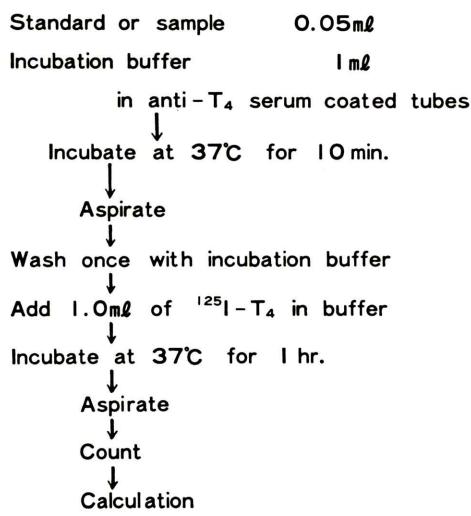
吉田 克己

している T₄ は抗体と結合しないので、これを吸引により除去し、抗体に結合した free T₄ を、その後に加えた ¹²⁵I-T₄ と競合させて、標準曲線から血中の未知の free T₄ 濃度を測定するものである。

測定方法はキットに示された方法に従い、以下のように行なった (Fig. 1).

- (1) 標準血清あるいは被験血清の各 50 μ l を抗体試験管に加える。
- (2) 37°C に加温した incubation buffer (50mM Tris buffered saline, pH 8.5) を 1 ml ずつ加えて振盪混和する。
- (3) 37°C の温浴中で 10 分間 incubate する。これを第 1 incubation とする。
- (4) 反応液を吸引除去する。
- (5) 37°C の incubation buffer を 1 ml ずつ加え、振盪混和した後、反応液を吸引除去する。
- (6) ¹²⁵I-T₄ を 1 ml ずつ加え、振盪混和する。
- (7) 37°C の温浴中で 60 分間 incubate する。これを第 2 incubation とする。
- (8) 反応液を吸引除去する。
- (9) 抗体試験管の放射能を測定する。

Key words: Free Thyroxine, Radioimmunoassay, Equilibrium dialysis

Fig. 2 Standard curve of free T₄ RIA

(10) 標準血清について得られた count より標準曲線を作製し、被験血清の free T₄ 値を求める。

平衡透析法による % free T₄ の測定は、従来の方法^{5,6)}に従い、内壁をシリコンでコートされた 50mL の tube 中に、0.15M の Potassium phosphate buffer, pH 7.4, 6 mL を透析膜外に、buffer で 1 : 40 に稀釀した被験血清および tracer 量のダイナボット社製 ¹²⁵I-T₄ を透析膜内に入れ、37°C の温浴中で20時間 incubate する。その後透析内液および外液を 1 mL ずつ試験管にとり、それにプールした正常ヒト血清 0.3mL を加えて混和したのち、20% の冷 trichloro acetic acid (TCA) 1.3 mL を加えて 3,000 rpm で 10 分間遠心し、その沈渣を 5% の TCA で 3 回洗浄し、radioactivity を well type の scintillation counter で測定して、次式に従い²⁾ % free T₄ を求めた。

$$\% \text{ free T}_4 = \frac{10 \times \text{Out}}{4 \times \text{In} + 6 \times \text{Out}} \times \frac{1}{D}$$

In: 透析内液 (1 mL) の radioactivity

Out: 透析外液 (1 mL) の radioactivity

D: dilution factor; 100

なお、血清 total T₄ はダイナボット社製 RIA キットで、血清 TBG はヘキスト社製 RIA キットで測定した。

III. 対象

東北大学病院第 2 内科を受診した患者の中で、甲状腺疾患のないもの (Euthyroid) 51 例、甲状腺機能亢進症 (Hyperthyroid) 29 例、甲状腺機能低下症 (Hypothyroid) 12 例、TBG 減少症 6 例、および産婦人科受診中の正常妊娠 (Pregnant) 7 例を対象とした。

IV. 結果

1. 基礎的検討の成績

1) 標準曲線 Fig. 2 に本 assay の標準曲線を示す。free T₄ 濃度が 0 の標準血清の結合型放射能 (B₀) を 100% とした場合、8.3 ng/100mL の標準血清の結合型放射能 (B) はその 57% であった。

2) incubation 時間 Fig. 3 に甲状腺機能亢進症患者、甲状腺機能正常者、甲状腺機能低下症患者および TBG 減少症患者の 4 種類の血清について、第 1 incubation 時間を 5, 10, 30 および 60 分とした時の抗体試験管に結合する ¹²⁵I-T₄ の変動を示す。bound % は甲状腺機能正常者および TBG 減少症とともに、最初の 5~10 分の間に急激に減少し、その後は漸減した。一方、甲状腺機能亢進症および低下症では、bound % はほとんど第 1 incubation 時間の影響をうけなかった。同様に、

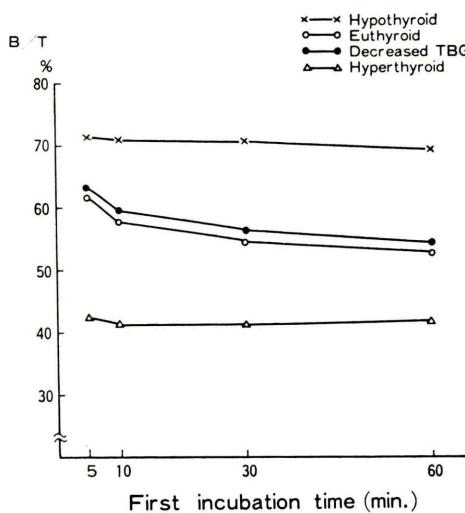


Fig. 3 Influence of first incubation time

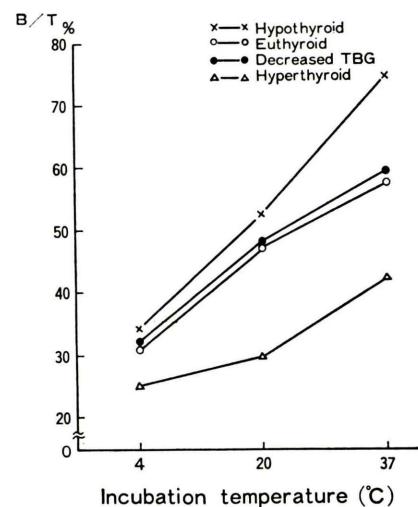


Fig. 5 Influence of incubation temperature

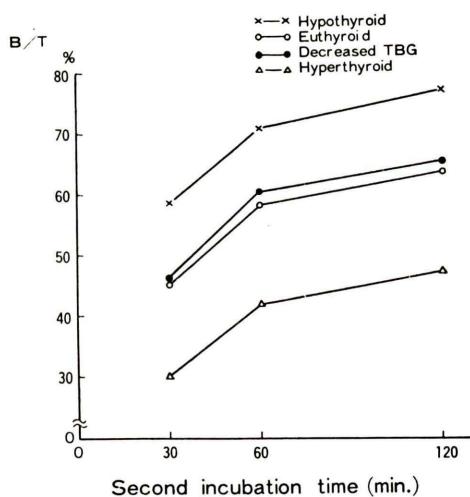
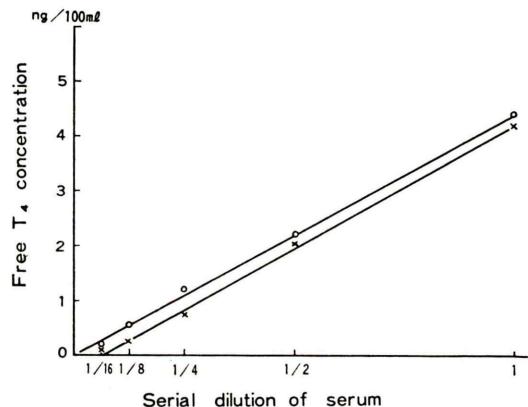


Fig. 4 Influence of second incubation time

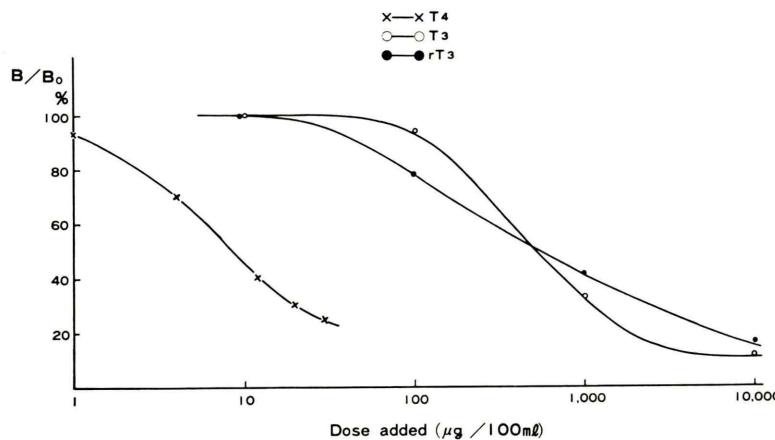
4種の血清について、第2 incubation時間を、30, 60および120分とした時のbound %の変動をFig. 4に示す。いずれの血清においても、bound %は30~60分の間で急激に増加し、その後は漸増した。

従って、第1および第2 incubationの時間はそれぞれ規定の10分および60分以上であれば十分と思われるが、再現性のよいassayのためには、incubation時間を厳密に一定にする必要があると考えられた。

Fig. 6 Influence of dilution of serum on free T₄ concentration

3) incubation 温度 同様に、4種の血清について、第1および第2 incubationの温度を4°C, 室温および37°Cとした時のbound %の変動をFig. 5に示す。いずれの血清においても、bound %は incubation 温度の上昇とともに増加したが、規定の37°C以外では、甲状腺機能正常者と低下症との間の差が不十分であった。

4) 稀釀曲線 2例の甲状腺機能亢進症患者より得られた血清を、free T₄濃度が0の標準血清で、それぞれ1/2, 1/4, 1/8および1/16に稀釀して求めた稀釀曲線をFig. 6に示す。free T₄濃度が

Fig. 7 Cross reaction of T_3 and rT_3 with anti- T_4 antibody.

0の標準血清のTBG濃度は $19.9\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、TBG濃度が $15.2\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の1例では測定値は理論値とほぼ一致し、稀釈曲線はほぼ0点に向かう直線上にplotされたが、TBG濃度が $13.1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の1例では、測定値は理論値よりも低値であった。

5) 交叉反応 試験管にコートされた抗体の特異性について検討するため、free T_4 濃度が0の標準血清に、 T_3 およびreverse T_3 をそれぞれ $10\sim10,000\text{ }\mu\text{g}/100\text{ml}$ 添加して、これらの $^{125}\text{I-T}_4$ の結合に及ぼす影響を調べた(Fig. 7)。50%抑制の値でみると、 T_3 およびreverse T_3 との交叉反応はそれぞれ1.1%および1.6%であった。

6) 精度および再現性 free T_4 濃度が低値、正常値および高値の3血清について、同一assayで8回ないし10回測定を行なった際(intraassay variability)の平均値および標準偏差は、それぞれ $0.51\pm0.042\text{ ng}/100\text{ml}$ 、 $0.86\pm0.058\text{ ng}/100\text{ml}$ および $4.06\pm0.287\text{ ng}/100\text{ml}$ で、変動係数はそれぞれ8.2%、6.7%および7.1%であった(Table 1)。また、同様に3種の血清について、異なったassayでの測定を5回くり返して行なった際(interassay variation)の平均値および標準偏差は、それぞれ $0.300\pm0.032\text{ ng}/100\text{ml}$ 、 $0.884\pm0.048\text{ ng}/100\text{ml}$ および $4.74\pm0.49\text{ ng}/100\text{ml}$ で、変動係数はそれぞれ10.7%、5.4%および10.3%であった(Table 2)。

Table 1 Intraassay variability

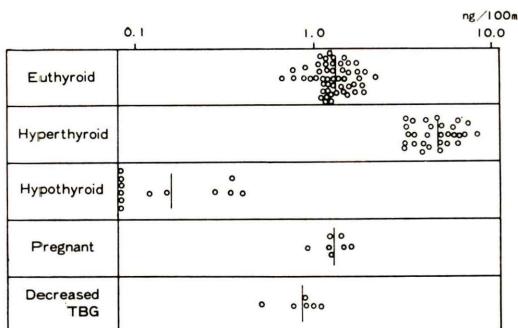
No.	Serum		
	1	2	3
1	0.52	0.83	4.1
2	0.57	0.90	4.1
3	0.57	0.75	4.4
4	0.49	0.84	4.0
5	0.52	0.85	4.5
6	0.46	0.82	3.7
7	0.47	0.88	3.7
8	0.49	0.89	4.0
9		0.84	
10		0.97	
Mean	0.51	0.86	4.06
SD	0.042	0.058	0.287
CV (%)	8.2	6.7	7.1

(ng/100ml)

Table 2 Interassay variation

No.	Serum		
	1	2	3
1	0.29	0.85	4.13
2	0.25	0.88	4.35
3	0.33	0.91	5.20
4	0.31	0.83	4.83
5	0.32	0.95	5.20
Mean	0.300	0.884	4.74
SD	0.032	0.048	0.49
CV (%)	10.7	5.4	10.3

(ng/100ml)

Fig. 8 Free T₄ concentration

2. 臨床的検討の成績

1) 各種疾患における free T₄ 値の測定成績

(Fig. 8) 甲状腺機能正常者 51 例の血清 free T₄ 濃度は 0.72~2.33 ng/100ml の間に分布し、平均 1.34 ± 0.33 ng/100ml (Mean \pm SD) であった。正常域として平均値 \pm 2 SD をとると、0.68~2.00 ng/100ml となる。甲状腺機能亢進症患者 29 例では 3.2~8.4 ng/100ml、平均 5.02 ± 1.41 ng/100ml と全例高値を示し、甲状腺機能低下症患者 12 例では 0~0.40 ng/100ml、平均 0.16 ± 0.15 ng/100ml と全例低値を示し、3 者の間には全く重なりはみられなかった。妊婦 7 例では 0.91~1.57 ng/100ml、平均 1.28 ± 0.22 ng/100ml で全例正常範囲内にあった。また、TBG 減少症 6 例では 0.50~1.07 ng/100ml、平均 0.85 ± 0.20 ng/100ml で、平均値では甲状腺機能正常者に比べて有意に ($p < 0.01$) 低下していたが、1 例で幾分低値を示したほかは正常範囲にあった。

2) total T₄ 値との関係 本法により得られた血清 free T₄ 値と total T₄ 値との関係を Fig. 9 に示す。両者の間には相関係数 0.895 と有意の正の相関がみられた。しかしながら、妊婦では 7 例中 3 例で total T₄ が高値を示し、平均値でも $11.7 \mu\text{g}/100\text{ml}$ と甲状腺機能正常者の $9.4 \mu\text{g}/100\text{ml}$ に比べやや高値を示したのに対し、free T₄ は全例正常範囲内にあった。一方、TBG 減少症では、6 例中 5 例で total T₄ が低値を示し、平均値でも $3.7 \mu\text{g}/100\text{ml}$ と明らかに低値を示したのに対し、free T₄ は 1 例で幾分低値を示したほかは正常範

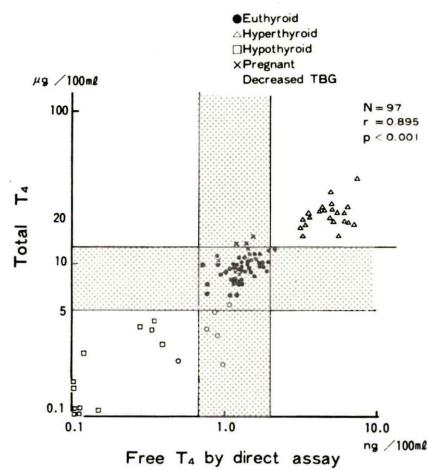


Fig. 9 Correlation of serum free T₄ values obtained by GammaCoat free T₄ RIA kit with serum total T₄

囲内にあった。

3) % free T₄ および血清 TBG 濃度 Table 3 に示すように、% free T₄ は甲状腺機能亢進症患者では 0.0338 ± 0.00812 %、甲状腺機能低下症患者では 0.0156 ± 0.00192 % と甲状腺機能正常者の 0.0190 ± 0.00182 % に比べて、それぞれ有意に高値 ($p < 0.001$) および低値 ($p < 0.001$) を示した。

妊婦では、TBG 濃度および % free T₄ は $36.1 \pm 6.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ および 0.0163 ± 0.00082 % で、甲状腺機能正常者に比して有意に高値 ($p < 0.05$) および低値 ($p < 0.01$) を示し、total T₄ と平衡透析による % free T₄ の積から求めた Absolute free T₄ (AF T₄) 値は 1.92 ± 0.33 ng/100ml で、甲状腺機能正常者の 1.76 ± 0.28 ng/100ml とほぼ同様の値を示した。

一方、TBG 減少症では、TBG 濃度および % free T₄ はそれぞれ $6.3 \pm 4.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ および 0.0329 ± 0.0088 % と、甲状腺機能正常者に比して有意に低値 ($p < 0.001$) および高値 ($p < 0.05$) を示し、AF T₄ は 1.13 ng/100ml と、甲状腺機能正常者に比して有意に ($p < 0.001$) 低値であった。

4) AF T₄ との関係 Fig. 10 に本法による free T₄ 測定値と、AF T₄ 値との関係を示す。本法により得られた free T₄ 値は、AF T₄ 値と比べ若干

Table 3 Serum free T₄ and TBG values

	Total T ₄		% free T ₄ *		AFT ₄		Free T ₄ ** direct assay		TBG	
	N	(μ g/100 ml)	N		N	(ng/100 ml)	N	(ng/100 ml)	N	(μ g/ml)
Euthyroid	50	9.43 \pm 1.51	36	0.0190 \pm 0.00182	36	1.76 \pm 0.28	51	1.34 \pm 0.33	45	22.6 \pm 4.5
Hyperthyroid	22	21.6 \pm 4.65	21	0.0338 \pm 0.00812	21	7.35 \pm 2.51	29	5.02 \pm 1.41		
Hypothyroid	12	2.01 \pm 1.45	11	0.0156 \pm 0.00192	11	0.335 \pm 0.228	12	0.157 \pm 0.145		
Pregnant	7	11.7 \pm 2.44	6	0.0163 \pm 0.00082	6	1.92 \pm 0.33	7	1.28 \pm 0.22	5	36.1 \pm 6.2
Decreased TBG	6	3.65 \pm 1.31	6	0.0329 \pm 0.0088	6	1.125 \pm 0.263	6	0.85 \pm 0.20	5	6.3 \pm 4.0

* by equilibrium dialysis

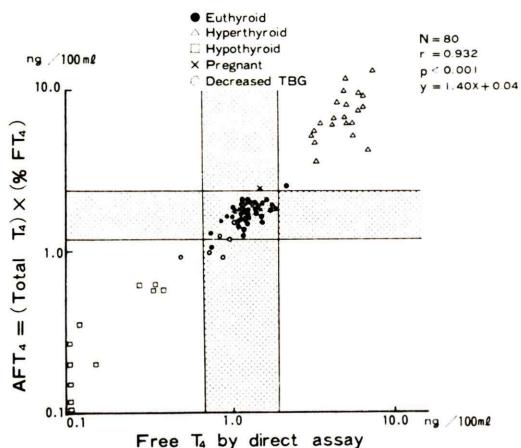
(Mean \pm SD)** by GammaCoat free T₄ RIA kit

Fig. 10 Correlation of serum free T₄ values obtained by GammaCoat free T₄ RIA kit with those by total T₄ × % FT₄

低値の傾向 ($y = 1.40x + 0.04$) を示したが、両者の間には相関係数 0.932 ときわめて良好な正の相関がみられた。

V. 考 察

甲状腺ホルモンは free の状態で細胞内にとりこまれ、核などの receptor と結合して作用を発揮すると考えられている⁷⁻⁹⁾。従って、細胞内の free ホルモン濃度は重要な意味をもっているが、今までその測定は、ヒト赤血球¹⁰⁾で試みられているにすぎない。一方、細胞内外の free ホル

モンは平衡関係にあり、細胞内の free ホルモン濃度は細胞外のそれに伴って増減する¹⁰⁾ので、血清の free ホルモン濃度を測定することにより、細胞内の free ホルモン濃度を推定することが可能である。

冒頭にも述べたように、free T₄ の測定は、tracer 量の ¹²⁵I または ¹³¹I-T₄ を血清に加え、平衡透析法、限外濾過法あるいはゲル濾過法などにより % free T₄ を求め、それと血清の total T₄ との積から算出されているが、なかでも平衡透析法が現在最も広く行なわれている。平衡透析による % free T₄ の測定は、1962年に Sterling ら¹¹⁾により始められ、その後種々の改良が加えられてきたが、現在でもなお標識 T₄ 中に contaminate しているヨードの影響¹²⁾ および dilution effect⁵⁾ など、いくつかの問題点が残されている。

一方、最近になり、比放射能の高い ¹²⁵I-T₄ の作製が可能になり、RIA の感度が著しく上昇したため、透析外液中の微量の free T₄ を直接に RIA で測定することが可能になり^{12,13)}、従来の tracer を用いた方法による問題点もかなり改善されるようになった。しかしながら、これらの測定法は手技が煩雑で、また多量の検体を同時に処理することが困難である。

このたびTravenol社により開発されたGammaCoat free T₄ RIA kit は、手技が非常に簡単であ

り、しかも、短時間で血清 free T₄ 濃度を測定できるという利点をもっている。

本キットの基礎的検討のうち、まず incubation 時間については、bound % が第 1 incubation 時間が 5~10 分の間では急激に減少する傾向があり、また第 2 incubation 時間が 30~60 分の間では急激に増加し、その後は変動がゆるやかになるため、第 1 および第 2 incubation 時間はそれぞれ規定の 10 分および 60 分以上であれば十分と考えられた。

incubation 温度については、規定の 37°C 以下では不十分であった。

再現性に関しては、intraassay でも、interassay でも、ともに良好な結果が得られた。一方、free T₄ 濃度が高値の患者血清の稀釈試験では、TBG 濃度が低下している例では、稀釈により実測値が理論値よりも低下しており、安易に 0 血清で稀釈測定すべきでないと思われた。

本キットの抗 T₄ 抗体と T₃ および reverse T₃ との交叉反応は、それぞれ 1.1% および 1.6% であったが、血中の free T₃ および free reverse T₃ の濃度は free T₄ の約 15% および数 %¹⁴⁾ であるため、これらが free T₄ の測定値に及ぼす影響は、ほとんど無視しうるものと考えられた。

本測定法による甲状腺機能正常者 51 例の血清 free T₄ 濃度は $1.34 \pm 0.33 \text{ ng}/100\text{ml}$ で、正常域として平均値 $\pm 2 \text{ SD}$ をとると $0.68 \sim 2.00 \text{ ng}/100\text{ml}$ となる。甲状腺機能亢進症患者では全例高値を、甲状腺機能低下症患者では全例低値を示し、3 者の間に全く重なりはみられなかった。また、妊婦では全例正常範囲内にあり、TBG 減少症でも 1 例で若干低値を示したほかは正常範囲内にあった。

本法により得られた free T₄ 値と total T₄ 値との間には、相関係数 0.895 と有意の正の相関がみられたが、妊婦では total T₄ が 7 例中 3 例で高値を示し、また、TBG 減少症では 6 例中 5 例で低値を示した。このように妊婦や TBG 減少症などで TBG が増減する場合には、total T₄ 値はそれに伴って増減するため、total T₄ 値は甲状腺機能を正確に反映しないことになる。これに対し、free T₄ 値は TBG 減少症の 1 例で若干低値を示し

たほかは、全例正常範囲内にあった。

TBG 減少症は euthyroid であるということから、血清 free T₄ は正常値を示すことが期待されるが、これまでの測定結果は必ずしもそうではなく、free T₄ 値が正常であったという報告¹⁵⁾ のほかに、7 例中 3 例で低値¹⁶⁾、あるいは 5 例の平均値が正常値より明らかに低値であったとする報告¹⁷⁾などもみられる。われわれの例でも、本キットにより得られた free T₄ 値は 6 例中 1 例で低値を示し、平均値でも甲状腺機能正常者より有意に低下していた。また、AF T₄ も 6 例中 3 例で低値を示し、平均値でも甲状腺機能正常者より低下していた。しかしながら、TBG 減少症では %free T₄ は全例高値であり、この値が低下していた甲状腺機能低下症とは明らかに異なっており、また、今回のキットにより得られた free T₄ 値および AF T₄ 値は、ともに全例で甲状腺機能低下症の最高値よりも高い値を示した。

本法により得られた free T₄ 値は、AFT₄ の 70 % と若干低値の傾向を示したが、両者の間には相関係数 0.93 ときわめて良好な相関関係がみられた。本法による測定値が若干低値を示した理由は今のところ不明であるが、¹²⁵I-T₄ 中への ¹²⁵I の contamination のため、AF T₄ 値が幾分高めになった可能性は否定できない。透析外液中の free T₄ を直接に RIA で測定する最近の方法によれば、血清 free T₄ 濃度は甲状腺機能正常者で $0.76 \text{ ng}/100\text{ml}$ ¹²⁾ および $0.83 \text{ ng}/100\text{ml}$ ¹³⁾ と報告されており、本キットで得られた測定値よりさらに低値であった。この点は今後に残された問題と思われる。

VI. 結 語

Travenol 社製 GammaCoat free T₄ RIA キットを用いて血清 free T₄ 濃度を測定し、また、従来の平衡透析法で得られた値と比較して、次の結果を得た。

- 1) 標準曲線は良好であった。
- 2) intraassay および interassay においてもほぼ満足できる結果が得られた。
- 3) 本測定による血清 free T₄ 濃度は、甲状腺

機能正常者で 1.34 ± 0.33 ng/100ml, 甲状腺機能亢進症で 5.02 ± 1.41 ng/100ml, 甲状腺機能低下症で 0.16 ± 0.15 ng/100ml で、3者の間には全く重なり合いはみられなかった。

4) 妊娠により TBG が増加している時には、total T₄ 値も7例中3例で上昇していたが、free T₄ 値は全例において正常範囲内にあった。

5) TBG 減少症では、total T₄ は6例中5例で低下していたが、free T₄ は1例で低値を示したほかは正常範囲内にあった。

6) 本キットによる free T₄ の測定値は、total T₄ と % free T₄ の積より求めた AF T₄ 値に比べ、若干低値の傾向を示したが、両者の間には相関係数 0.93 ときわめて良好な相関関係がみられた。

以上、本法によれば、少量の血清を用いて、簡便かつ短時間に再現性のよい血清 free T₄ 濃度の測定が可能であり、しかも、従来の平衡透析法により得られた free T₄ 値とはきわめて良好な正の相関を示したので、今後は甲状腺機能状態を最もよく反映する検査として、ルーチンに行なわれるようになるものと思われる。

吉永馨教授のご校閲を感謝します。

キットをご提供頂いたトラベノール・パシフィック株式会社に感謝します。

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) Schussler GC, Plager JE: Effect of preliminary purification of ¹³¹I-thyroxine on the determination of free thyroxine in serum. *J Clin Endocrinol Metab* **27**: 242-250, 1967
- 4) Lee ND, Henry RJ, Golub OJ: Determination of the free thyroxine content of serum. *J Clin Endocrinol Metab* **24**: 486-495, 1964
- 5) Spaulding SW, Gregerman RI: Free thyroxine in serum by equilibrium dialysis: Effects of dilution, specific ions and inhibitors of binding. *J Clin Endocrinol Metab* **34**: 974-982, 1972
- 6) Davis PJ, Hsu T, Bianchine JR: Effects of new hypolipidemic agent, MK-185, on serum thyroxine-binding globulin (TBG) and dialyzable fraction thyroxine. *J Clin Endocrinol Metab* **34**: 200-208, 1972
- 7) Oppenheimer JH, Schwartz HL, Surks MI, et al: Nuclear receptors and the initiation of thyroid hormone action. *Recent Progress in Hormone Research* **32**: 529-565, 1976
- 8) Samuels HH, Tsai JS: Thyroid hormone action. Demonstration of similar receptors in isolated nuclei of rat liver and cultured GH₁ cells. *J Clin Invest* **53**: 656-659, 1974
- 9) DeGroot LJ, Torresani J: Triiodothyronine binding to isolated liver cell nuclei. *Endocrinol* **96**: 357-369, 1975
- 10) Yoshida K, Davis PJ: Estimation of intracellular free thyroid hormone in man. Program of the 1979 Annual Meeting of the Endocrine Society, Anaheim, CA, 1979
- 11) Sterling K, Hegedus A: Measurement of free thyroxine concentration in human serum. *J Clin Invest* **41**: 1031-1040, 1962
- 12) Jiang N, Tue KA: Determination of free thyroxine in serum by radioimmunoassay. *Clin Chem* **23**: 1679-1983, 1977
- 13) Yeo PPB, Lewis M, Evered DC: Radioimmunoassay of free thyroid hormone concentrations in the investigation of thyroid disease. *Clin Endocrinol* **6**: 159-165, 1977
- 14) Chopra IJ: Reciprocal changes in serum concentrations of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T₃) and 3,3',5-triiodothyronine (T₃) in systemic illnesses. *J Clin Endocrinol Metab* **41**: 1043-1049, 1975
- 15) Cavalieri RR, Searle GL: The kinetics of distribution between plasma and liver of ¹³¹I-labeled L-thyroxine in man: Observations of subjects with normal and decreased serum thyroxine-binding globulin. *J Clin Invest* **45**: 939-949, 1966
- 16) Bayley AT, Higgins PH, Row VV, et al: The metabolic significance of thyroxine-binding globulin. Studies in a family with decreased thyroxine-binding globulin. *Acta Endocrinol* **61**: 137-150, 1969
- 17) Heinonen OP, Lamberg BA, Virtamo J: Inherited decrease of the binding capacity of thyroxine-binding globulin (TBG). *Acta Endocrinol* **64**: 171-180, 1970