

# 血中 Thyroxine-結合-globulin(TBG)의 T<sub>4</sub> 結合能 測定에 관한 考察

서울대학교 醫科大學 內科學教室

李慶子·高昌舜·李文鎬

==Abstract==

## Estimation of the T<sub>4</sub> Binding Capacity of Serum Thyroxine Binding Globulin

Kyung-Ja Lee, M.D., Chang Soon Koh, M.D. and Munho Lee, M.D.

*Department of Internal Medicine, College of Medicine, Seoul National University  
Seoul, Korea*

The most commonly used methods for determining thyroxine binding globulin(TBG) concentration as the total thyroxine-binding capacity utilize electrophoretic separation of serum. Although technically simple, the electrophoretic method is time consuming and is limited in the number of samples which can be run in a single assay.

The author presented a single T<sub>4</sub> load ion exchange resin method as an approach to simplify the technique as with clinical practicability and results were analyzed.

For construction of the standard curves, serum mixtures were diluted with barbital buffer which effectively blocked T<sub>4</sub>-binding to TBPA. For each serum dilution, a constant amount of T<sub>4</sub>-<sup>125</sup>I and increments of unlabelled T<sub>4</sub> were added. After incubation in water bath, resin beads were dispensed to the samples which binded all T<sub>4</sub> not bound to TBG. The radioactivity in the supernatant was counted in the gamma scintillation counter.

Each standard curve was plotted from the percent counts in the supernatant and total T<sub>4</sub> in each tube.

Unknown samples were diluted to 1:40 and ran at a single T<sub>4</sub> loading concentration, and the TBG capacity of the samples was able to be read on the standard isobars.

The following results were obtained.

- 1) Mean and standard deviation for TBG capacity in normal population was  $28.6 \pm 5.09 \mu\text{g T}_4/100 \text{ ml}$ .
- 2)  $24.9 \pm 3.87 \mu\text{g T}_4/100 \text{ ml}$  in hyperthyroidism showed low TBG capacity comparing to normal population. ( $p < 0.025$ )
- 3)  $31.0 \pm 2.40 \mu\text{g T}_4/100 \text{ ml}$  in hypothyroidism showed high TBG capacity tendency comparing to normal population.
- 4) Reversed correlation existed between TBG capacity and T<sub>3</sub> resin uptake ( $r = -0.624$ ), TBG capacity and serum T<sub>4</sub> value ( $r = -0.859$ ), and TBG capacity and free thyroxine index ( $r = -0.623$ ).

The author assumes that this method of assay is considerably simpler in instrumentation and technique than any other assays traditionally being used, and seems to be more practical for routine clinical laboratory use.

## 緒 論

血中 triiodothyronine ( $T_3$ ) resin 攝取率<sup>30,51)</sup> 또는 competitive binding analysis 로서 血中 thyroxine( $T_4$ ) 을 測定<sup>9,19,20,22,23,31,32,34)</sup> 하는 소위 시험관내 檢査法의 發達이 甲狀腺機能檢査의 正確性을 더 한층 높혀 주었다. 한편 이와같은 方法에 의한  $T_3$ 나  $T_4$  値의 上昇 또는 低下가 반드시 甲狀腺機能의 亢進 또는 低下를 의미한다고는 볼 수 없으며 매우 微量이지만 血中 蛋白質과 結合되지 않은 狀態로 循環하는 遊離  $T_4$  量이 全  $T_4$  量보다 代謝利用率에 보다 더 重要함은 이미 잘 알려진 사실이다.<sup>43)</sup> 遊離  $T_4$  値 또한 항상 眞정한 代謝狀態를 反映하는 것이라고 할 수 없으며, 各種 重症疾患,<sup>17,37,50)</sup> 妊娠,<sup>17,49)</sup> 또는 藥物治療經過中에<sup>1,39,55)</sup> 變化될 수 있는 點等으로 보아 甲狀腺ホルモン은 血中 蛋白質과 組織內 總量(tissue pool) 사이에서 급속한 交換性 이 있음이 알려지게 되었다.<sup>5,12,36)</sup> 따라서 이 경우 血中  $T_4$ 와  $T_4$ 結合 蛋白質과의 相互關係를 比較함으로써 遊離  $T_4$  値의 精確한 해석이 내려질 수 있다고 하겠다. 循環 $T_4$ 는 99.95%가 3種의 搬送蛋白質 即 thyroxine binding globulin (TBG), thyroxine binding prealbumin (TBPA) 및 albumin 등과 結合되어 있으며,<sup>47,52)</sup> 이들중 TBG는 TBPA 나 albumin 에 비하여 그 結合能(binding capacity)은 훨씬 적지만 結合親和力(binding affinity)은 크다. 따라서 全 $T_4$  量의 約 60%以上이 TBG 와 結合되어 있으며<sup>44)</sup> TBG 의 測定이 실제적 문제로 등장되었다. 血中 TBG 는 直接 測定하기 곤란함으로 著者는 여러 方法<sup>8,10,11,13,21,26,28,42,45)</sup> 을 검토하여 가장 簡便하면서 正確하고 迅速한 Refetoff, Hagen 및 Selenkow<sup>41)</sup> 에 의한 單一  $T_4$  負荷 이온 交換 樹脂法을 이용함으로써 血中 TBG 의  $T_4$  結合能을 測定하여 間接적으로 TBG 量을 추정하고 甲狀腺疾患時 各種 檢査値와 比較 觀察한 成績을 報告하는 바이다.

## 對象 및 方法

### 1. 對 象

甲狀腺疾患이 없는 正常成人韓國人(18~40歲) 15例와 서울大學校 醫科大學 附屬病院 內科에서 觀察한 治療前의 甲狀腺疾患을 李等<sup>27)</sup>이 보고한 바와 같은 方法으로 機能別로 分類한 甲狀腺機能亢進症 14例 및 甲狀腺機能低下症 7例를 對象으로 血中 TBG 의  $T_4$  結合能(以下 TBG 結合能으로 略함)을 測定하였고, <sup>125</sup>I  $T_3$

resin 攝取率, 血清  $T_4$  値 및 遊離  $T_4$  係數(free thyroxine index) 등을 區分 測定하여 比較 觀察하였다.

### 2. 測定原理

血清  $T_4$  測定은 Murphy 와 Jachan<sup>32,33)</sup>이 說明한 바와 같이  $T_4$ 의 競爭的 蛋白結合現象을 이용한 分析으로서 특히 親和力이 강한 結合部位를 지닌 TBG 와 結合되어있는  $T_4$ 를 용매로써 그 結合狀態를 풀어놓은 다음 標識된 放射性  $T_4$ 에 結合된 TBG 를 一定量 첨가 혼합하여 다시 反應시키면 그 混合  $T_4$ 는 競爭的으로 TBG 와 結合하게 되며 그 固定量의 TBG 가 포화되고 나면 나머지의 일부 混合  $T_4$ 는 遊離狀態로 남아 있게 된다. 이때 精確한 方法으로써 遊離狀態의 標識  $T_4$ 와 TBG 結合 標識  $T_4$ 를 分離하여 各各 測定하면 당초의 標識안된  $T_4$  量을 間接적으로 定量할 수 있다.

이 原理를 거꾸로 利用하여 血中內  $T_4$  量과 標識된  $T_4$  量을 一定하게 하면 TBG 結合部位의 크기를 決定할 수 있다. 또 血清 蛋白中 TBG 만이  $T_4$ 와의 結合蛋白質으로서 作用할 수 있게되는 것은 TBPA는 barbital 완충액의 存在下에 억제되며 albumin 은 血清을 매우 稀釋하는 것 만으로도 無視될 만한 量이기 때문이다. 各 血清稀釋液에 一定量의  $T_4$ -<sup>125</sup>I와 점차 增量의 非標識  $T_4$ 를 첨가하면 混合  $T_4$ 는 TBG 의 同一한 結合部位에 대하여 경쟁에 도달할 때까지 競爭的으로 結合되고 나머지 遊離狀態의  $T_4$ 는 ion 交換樹脂에 걸러서 吸收 分離시킬 수 있다. TBG 結合  $T_4$ -<sup>125</sup>I(첨가된 全  $T_4$ -<sup>125</sup>I 量에 대한 吸收안된 上層液의  $T_4$ -<sup>125</sup>I)의 百分率은 血清 희석도와는 關係없이  $T_4$ 에 의한 TBG 포화정도에 比例한다.

이러한 原理로써 여러가지 濃度의 TBG 結合標準曲線을 作成하기 위하여 이미 TBG 結合能을 알고 있는 標準血清을 임의로 희석하여 上記 原理대로 만든 후 그 上層液의  $T_4$ -<sup>125</sup>I/加한 全  $T_4$ -<sup>125</sup>I 百分率과 各 血清稀釋液에 포함되어 있는 全  $T_4$  量과의 相關關係를 그려 標準曲線을 作成한다. 희점혈청중 交換樹脂에 의하여 吸收안된 上層液內  $T_4$ -<sup>125</sup>I/加한 全  $T_4$ -<sup>125</sup>I 百分率을 求하고 또한 시험관내 포함된 희점혈청의 全  $T_4$  量을 求하여 標準曲線에서 읽으면 희점혈청의 TBG 結合能을 알 수 있다.

### 3. 材 料

重要한 材料는 다음과 같다.

a) Barbital 완충액은 0.075 M 및 pH 8.6이었다.

b) 標識 L-thyroxine-<sup>125</sup>I은 約 4×10<sup>6</sup> cpm/ml 되도록 barbital 완충액으로 稀釋하였다.

c) 標識안된 thyroxine 溶液의 濃度は 50 μg/ml 이었다.

d) 標準血清, 全 T<sub>4</sub>量과 TBG 結合能을 이미 알고 있는 血清으로서 正常甲狀腺機能을 가졌다고 생각되며 TBG 結合能에 영향을 줄만한 약물복용을 하지 않았던 건강한 100名의 男女 獻血者 血清을 모아 혼합하여 冷凍 보관하였다. 標準血清의 內因性 T<sub>4</sub>는 10.0 μg/100 ml이었으며 正常人만을 선택하였으므로 TBG 結合能을 약 20 μg T<sub>4</sub>/100 ml로 간주하였고 이는 다시 reverse-flow electrophoresis<sup>10)</sup>方法에 의하여 TBG 結合能을 求하여 一致함을 確認하였다.

e) 陰이온 交換樹脂(resin beads) Amberlite IRA-400을 증류수에 4~5회 씻은후 室溫에서 유리병안에 보관하였다.

f) 試料血清은 被檢者의 前肘靜脈에서 채취된 약 3 ml의 血液을 곧 2,000 rpm로 5分 동안 원심분리하여 얻어진 血清 約 1 ml를 冷凍보관하였다.

#### 4. 方 法

TBG의 T<sub>4</sub>結合能 測定을 위한 모든 實驗溶液과 血清稀釋은 barbital 완충액을 이용하였다.

##### A. 標準曲線(TBG 等線)의 作成

1) 이미 알고 있는 TBG 結合能을 가진 標準血清을 1:20, 1:30, 1:35, 1:40, 1:60, 1:80 및 1:160으로 희석하여 血清內 포함된 TBG 量을 一定倍率로 하였다.

2) 희석한 各 血清에 約 100,000 cpm/ml 되도록 T<sub>4</sub>-<sup>125</sup>I을 微量 첨가하였다.

3) 7個의 標準曲線을 만들기 위하여 7雙의 polystyrene 시험관 7組의 各雙에 absolute alcohol 內에 50 μg T<sub>4</sub>/ml를 포함하고 있는 unlabeled T<sub>4</sub>용액을 各組마다 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 및 0.3 ml씩 첨가하여 건조시켰다. 이로서 各組의 시험관에는 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 및 15.0 μg의 unlabeled T<sub>4</sub>를 포함하게 하였다.

4) 1)과 2)에서 만든 T<sub>4</sub>-<sup>125</sup>I가 포함되어 있는 표준혈청 희석액의 各各에서 1 ml를 取하여 3)에서 준비한 건조된 unlabeled T<sub>4</sub>의 增量이 포함된 7組 7雙의 시험관에 加했다. 또한 全 <sup>125</sup>I放射能 計測을 위하여 여러 標準血清 稀釋液가운데 어떤것에서던 1 ml를 취한 한雙의 시험관을 추가하여 준비하였다.

5) 모든 시험관을 45°C되는 水槽속에서 15分동안

貯置시켰다.

6) 貯置과정에서 끝나는 즉시 各 시험관을 冷槽에 옮겨서 20分동안 방치했다.

7) resin을 푸는 勺자(scoop)로서 0.5 ml의 resin을 정확히 채취하여 冷槽속에 있는 各各의 시험관에 신속히 첨가하였다. 이때 첨가하는 순서는 雙을 이루는 시험관의 한쪽에 첨가후 그 나머지 다른 한쪽에 첨가하여 全 49雙의 시험관에 첨가하였다

全 <sup>125</sup>I放射能을 計測하기 위하여 준비한 한雙의 시험관에는 resin을 첨가하지 않았다.

8) Resin을 加한 후 시험관들은 冷槽에 2分동안 더 놓아 두었다가 水平振盪器로서 2分동안 진탕하였다.

9) 그 以後 즉시 冷槽에 옮겨놓고 4°C의 증류수 4 ml를 持續的 pipetting 裝置를 이용하여 신속히 各各의 시험관에 분사하였다. 이는 7)에서 resin을 첨가한 것과 同一한 순서대로 하였다. 증류수를 힘껏 强하게 분사함으로써 resin을 진탕시켜 용액과 resin이 균등하게 혼합되도록 하였으며 이때 resin은 數秒內에 침전하였다.

10) 지체함이 없이 누름단추式 microliter pipette를 使用하여 resin을 넣지않은 한雙의 시험관도 포함된 各雙의 시험관의 上層液 1 ml를 취하여 放射能 計測시험관에 옮겼다. 이때 모든 시험관은 그 上層液이 채취될때까지 冷槽에 그대로 두었다.

11) 10)에서 준비된 各各의 시험관의 放射能을 well type scintillation counter에서 計測하였다.

12 標準曲線(TBG 等線: isobar)의 計算과 作成 한쌍의 시험관의 방사능의 合을 resin을 넣지 않은 시험관 한雙의 방사능의 合에 대한 %로서 나타냈다. 이렇게 얻은, resin에 의해서 吸收안된 上層液 放射能의 百分率을 semilogarithm 座標의 從좌표에 구도하고, 各 시험관에 들어있는 全 T<sub>4</sub>量 즉 內因性 T<sub>4</sub>와 標識用 T<sub>4</sub>와 첨가된 unlabeled T<sub>4</sub>와의 合을 橫좌표에 구도하여 各標準曲線을 作成하였다(Fig. 1). 標準曲線을 보통 graph 用紙에도 作成할 수 있었으나 各 曲線사이에서 補插하여 TBG 結合能을 求함이 semilogarithm 用紙에서 보다 용이하였다.

##### B. 試料의 TBG 結合能 測定

TBG 以外의 다른 血中 蛋白質의 濃度나 血清稀釋이 TBG 結合能 測定에 영향을 주지 않으므로 모든 試料은 1:40으로 稀釋하였으며 T<sub>4</sub>負荷濃度도 一定하게 하였다.

1) 持續的 pipetting 裝置를 사용하여 試料數만큼의 polystyrene 시험관에 barbital 완충액을 3.8 ml씩 첨가하였다. 이때 標準曲線作成時에 사용하였던 標準血清도 동시에 하였다.

2) 누름단추式 microliter pipette 을 사용하여 試料 0.1 ml 를 1)에서 준비된 시험관에 첨가하여 稀釋하였다.

3) 모든 試料를 첨가한 시험관들은 시험관 뚜껑에 꽂아놓은 상태로 조심스럽게 흔든 다음에 2)에서 사용한 같은 pipette 을 사용하되 tip 을 바꾸어  $T_4$ - $^{125}I$  와 負荷量의 unlabeled  $T_4$ (材料에서 說明함)가 포함되어 있는 thyroxine-용액 0.1 ml 를 각 시험관에 첨가한 후 잘 혼합시켰다.

4) 각 시험관에서, 누름단추式 microliter pipette 을 사용하여 한쌍의 1 ml-용액을 채취하여 polystyrene 시험관에 옮겨 넣었다. 또한 나머지 희석된 血清에서 한쌍의 1 ml-용액을 全放射能 計測을 위하여 보관하였다.

5) 모든 시험관이 뚜러진 시험관뚜껑을 그대로 45°C 의 水槽에 담구어 15분동안 貯置시켰다.

6) 以後부터의 실험방법은 標準曲線의 作成時와 똑같이 하였다.

7) 試料의 TBG 結合能計算은 다음과 같이 하였다.

① 각 시험관에 포함되어 있는 全  $T_4$ 量은 內因性  $T_4$  [( $T_4$   $\mu$ g/100ml)/4,000]와 標識된  $T_4$  및 unlabeled  $T_4$  量의 合이었고 標識된  $T_4$ 와 unlabeled  $T_4$  量은 一定하여 本實驗에서 5  $\mu$ g/tube 이었다.

② 각 시험관內에 포함되어 있는 全  $T_4$ 量과 上層液의  $T_4$ - $^{125}I$ 放射能의 百分율을 알게 되었으므로 標準曲線에서 TBG 結合能을 求하였다.

만일 橫좌표와 縱좌표와의 만나는 點이 TBG 結合能 等線들 사이에 存在하게 되면 그 等線에 平行하게 補插하여 求하였다

③ 만일 TBG 結合能이 40  $\mu$ g  $T_4$ /100 ml 보다 크거나 5  $\mu$ g  $T_4$ /100 ml 보다 적을 때는 試料의 血清量을 各 各 半으로 줄이거나, 2倍로 늘려서, 卽 血清量을 0.05 ml, 혹은 0.2 ml 사용하여 再檢하여 決定하였다. 이때는 물론 內因性  $T_4$ 와 血清稀釋으로 인한 全  $T_4$ 量의 變化를 고려하여 TBG 結合能을 求하였다.

### C. 試料의 $T_3$ resin 攝取率, 血清 $T_4$ 值 및 遊離 $T_4$ 係數( $T_7$ )의 測定

①  $^{125}I$   $T_3$  resin 攝取率: Abbott Laboratories 에서 제작 고안된 Triosorb-125,  $T_3$  diagnostic kit 를 사용하여 測定하였다.

② 血清  $T_4$ 值: Abbott Laboratories 에서 제작 고안된 Tetrasorb-125,  $T_4$  diagnostic kit 를 사용하여 測定하였다.

③ 遊離  $T_4$ 係數( $T_7$ ): 얻어진 血清  $T_4$ 值와  $^{125}I$   $T_3$  resin 攝取率의 相乘積을  $T_7$ 으로 하였다.

## 成 績

標準曲線 및 TBG 結合能을 求하고  $T_3$  resin 攝取率, 血清  $T_4$ 值 및 遊離  $T_4$ 係數와의 關係를 觀察하였다.

### 1. 標準曲線

本 實驗에서 얻은 標準曲線의 하나는 Fig. 1. 과 같다. 試料의 TBG 結合能을 直接 이 曲線에서 얻었다. 이 曲線의 測定限界는 5~40  $\mu$ g  $T_4$ /100 ml 이나 限界밖의 것은 試料 稀釋濃度를 半으로 줄이거나 2倍로 늘려서 測定할 수 있었다

試料를 모아서 實驗할때 마다 標準曲線을 作成하였으나  $T_4$ - $^{125}I$  使用量과 同一 resin 을 使用하였을때는 標準曲線의 형태가 同一하여 實驗狀態가 一定하게 유지된다면 꼭 같은 標準曲線을 반복하여 使用할 수 있었다.

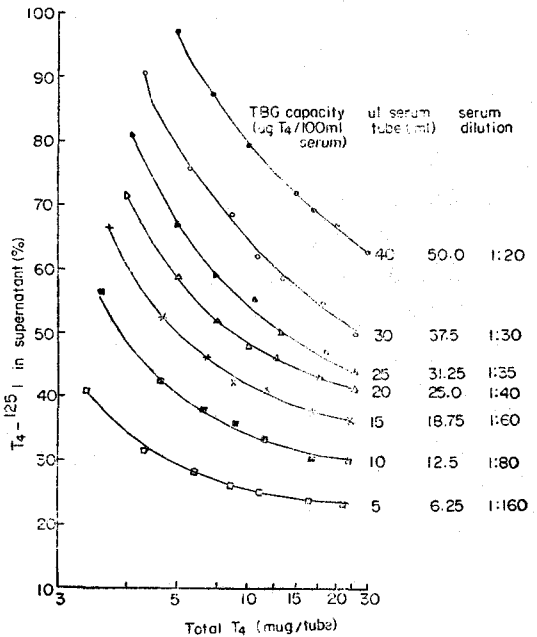


Fig. 1. TBG isobars as standard curves for determination of TBG capacity.

$T_4$  負荷量의 變化에 의한 영향: unlabeled  $T_4$  負荷量을 變化시켜 各 各 다른 量을 첨가하여 보았다. 일단  $T_4$  結合 蛋白質이 포화된 후에는 標準曲線上 같은 曲線과 平行하였다.

Resin 의  $T_4$  攝取에 대한 安定度: 0°C 에서 resin 과 稀釋된 血清사이에서 resin 에 의한  $T_4$  攝取率은 1.5분에 頂上에 달하였으며 그 이상으로 접촉시간을 연장하여

**Table 1. TBG capacity and other parameters of thyroid function in normal group.**

Case number	T <sub>3</sub> resin uptake (%)	Serum T <sub>4</sub> (μg/100ml)	Free T <sub>4</sub> index	TBG capacity (μgT <sub>4</sub> /100 ml)
1	30.3	8.4	2.5	33.4
2	29.8	9.5	2.9	26.0
3	32.3	13.0	4.3	35.0
4	30.9	8.0	2.4	26.0
5	29.6	8.6	2.5	21.5
6	25.3	7.5	1.9	23.8
7	25.3	1.6	0.4	20.0
8	30.5	12.8	3.9	22.5
9	31.0	15.8	4.5	34.0
10	33.5	15.5	5.2	36.0
11	28.2	7.4	2.1	34.0
12	23.5	7.7	1.8	29.5
13	23.3	8.6	2.0	31.0
14	31.2	12.5	3.8	26.3
15	32.8	11.8	3.9	29.8
Mean±s.d.	29.2±3.19	9.9±3.25	2.9±1.07	28.6±5.09

**Table 2. TBG capacity and other parameters of thyroid function in hyperthyroid patients**

Case number	T <sub>3</sub> resin uptake (%)	Serum T <sub>4</sub> (μg/100ml)	Free T <sub>4</sub> index	TBG capacity (μgT <sub>4</sub> /100 ml)
1	47.6	19.0	9.0	27.0
2	48.3	19.5	9.4	27.5
3	47.5	20.5	9.8	29.0
4	48.8	19.0	9.3	27.5
5	53.6	22.0	11.7	24.0
6	57.0	25.0	14.0	23.6
7	50.7	25.0	12.6	24.2
8	52.2	25.0	13.0	22.0
9	45.6	25.0	11.4	22.5
10	46.0	17.0	7.8	23.8
11	46.6	19.0	8.9	24.5
12	60.6	25.0	15.0	25.0
13	49.9	25.0	12.8	24.3
14	56.0	25.0	14.0	24.2
Mean±s.d.	50.7±4.4	22.2±2.96	11.3±2.15	24.9±3.87

**Table 3. TBG capacity and other parameters of thyroid function in hypothyroid patients**

Case number	T <sub>3</sub> resin uptake (%)	Serum T <sub>4</sub> (μg/100ml)	Free T <sub>4</sub> index	TBG capacity (μgT <sub>4</sub> /100 ml)
1	24.6	8.2	2.05	28.8
2	23.8	7.1	1.7	29.0
3	23.5	5.2	1.2	28.5
4	25.8	3.5	0.9	32.5
5	21.8	1.3	0.3	30.0
6	18.7	1.6	0.3	33.0
7	25.0	4.0	1.0	35.3
Mean±s.d.	23.3±2.18	4.4±2.15	1.1±0.2	31.0±2.40

도 攝取率이 더 이상 증가하지 않는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 2).

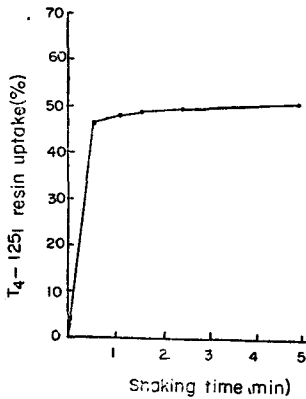


Fig. 2. Partition of  $T_4$  between serum resin (barbital buffer at  $0^\circ\text{C}$ ) as function of time.

2. 試料의 TBG 結合能

正常對照群, 甲狀腺機能亢進症群 및 甲狀腺機能低下症群으로 區分하여 觀察한  $T_3$  resin 攝取率,  $T_4$ 值, 遊離  $T_4$ 係數 및 TBG 結合能은 Table 1, 2 및 3에서와 같았다. 卽 TBG 結合能은 正常對照群에서  $20.0\sim 36.0 \mu\text{g } T_4/100 \text{ ml}$  로서 평균  $28.6 \pm 5.09 \mu\text{g } T_4/100 \text{ ml}$  로 폭넓은 分布를 나타냈으며 甲狀腺機能亢進症群에서는  $22.0\sim 29.0 \mu\text{g } T_4/100 \text{ ml}$  로 평균  $24.9 \pm 3.87 \mu\text{g } T_4/100 \text{ ml}$  로서 正常對照群보다 低下를 보였고 ( $p < 0.025$ ), 甲狀腺機能低下症群에서는  $28.5\sim 35.3 \mu\text{g } T_4/100 \text{ ml}$  로 평균  $31.0 \pm 2.40 \mu\text{g } T_4/100 \text{ ml}$  로 正常對照群에 비하여 약간의 上昇경향을 보였다 (Fig. 3).

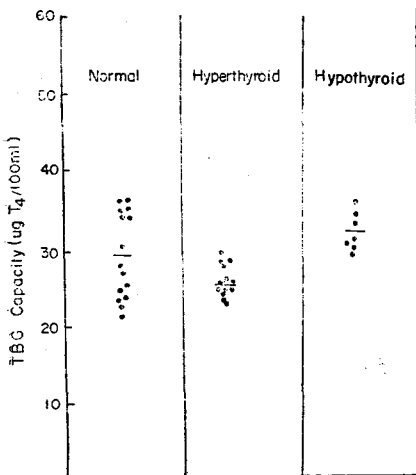


Fig. 3. TBG capacity in each group.

$T_3$  resin 攝取率은 正常對照群에서는  $29.2 \pm 3.19\%$ 의 平均値를 보였고 甲狀腺機能亢進症群에서는  $50.7 \pm 4.4\%$  甲狀腺機能低下症群에서는  $23.3 \pm 2.18\%$ 였으며, 血清  $T_4$ 值의 平均値는 各各  $9.9 \pm 3.25 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ,  $22.2 \pm 2.96 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  및  $4.4 \pm 2.15 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  이었고,  $T_7$ 의 平均値는 各各  $2.9 \pm 1.07$ ,  $11.3 \pm 2.15$ ,  $1.1 \pm 0.2$  이었다.

TBG 結合能과  $T_3$  resin 攝取率과의 關係: TBG 結合能과  $T_3$  resin 攝取率과의 相關關係 (Fig. 4)는 甲狀腺機能亢進症에서는  $T_3$  resin 攝取率은 증가한 반면 TBG 結合能은 감소하였으며, 甲狀腺機能低下症에서는  $T_3$  resin 攝取率은 低下되고 TBG 結合能은 上昇하여 이들의 相關關係는 逆相關關係이었다 ( $r = -0.624$ ).

한편 甲狀腺機能亢進群의 TBG 結合能은 相關曲線에서 벗어나  $T_3$  resin 攝取率의 上昇은 TBG 結合能의 低下에 比하여 훨씬 کم을 알 수 있었다.

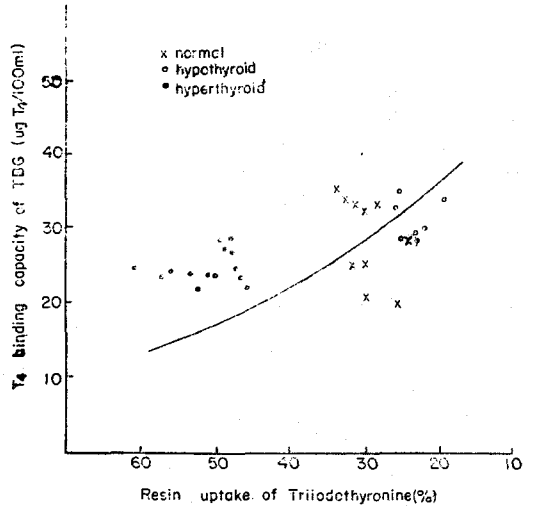


Fig. 4. Correlation between TBG capacity and  $T_3$  resin sponge uptake.

TBG 結合能과 血清  $T_4$ 值와의 關係: 血清  $T_4$ 值가 증가함에 TBG 結合能은 低下됨을 볼 수 있어서 (Fig. 5) 甲狀腺機能亢進群의 血清  $T_4$ 值는  $22.2 \pm 2.96 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  로 증가되고 TBG 結合能은  $24.9 \pm 3.87 \mu\text{g } T_4/100 \text{ ml}$  로서 正常群에 비하여 低下하였으며, 甲狀腺機能低下群에서는 血清  $T_4$ 值는  $4.4 \pm 2.15 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  이며 TBG 結合能은  $31.0 \pm 2.40 \mu\text{g } T_4/100 \text{ ml}$  로 약간 상승하여 全體의 逆相關關係를 나타내었다 ( $r = -0.859$ ).

TBG 結合能과 遊離  $T_4$ 係數와의 關係: TBG의 變動에 起因한 診斷上的 誤差를 줄이자는데 그 意義가 있다고 보는 遊離  $T_4$ 係數 (FTI로 略稱)와 TBG 結合能을

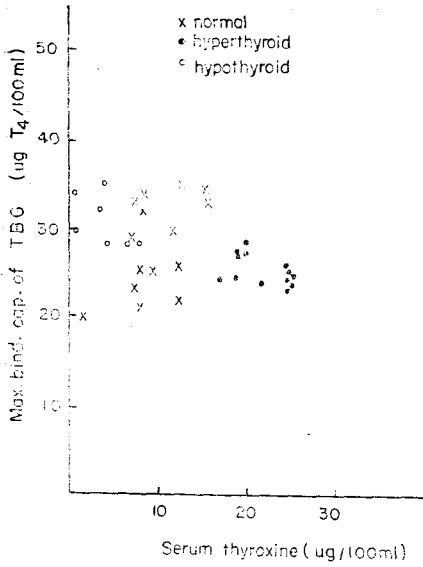


Fig. 5. Correlation between TBG capacity and the serum thyroxine.

比較하여 TBG의變化가 FTI에 미치는 영향을觀察하고저 甲狀腺機能亢進症群 및 低下症群을 TBG結合能에 따라서 區分하여 正常範圍內에 속한 TBG結合能群과 變化된 TBG結合能群으로서 區別하여 보았다.

甲狀腺機能亢進症에서 低下된 TEG結合能群은 正常인 TEG結合能群에 비하여 FTI가 더욱 상승함을 보였으며 甲狀腺機能低下症에서도 上昇된 TBG結合能을 가진 群은 正常範圍內에 속한 群에 비하여 FTI가 더

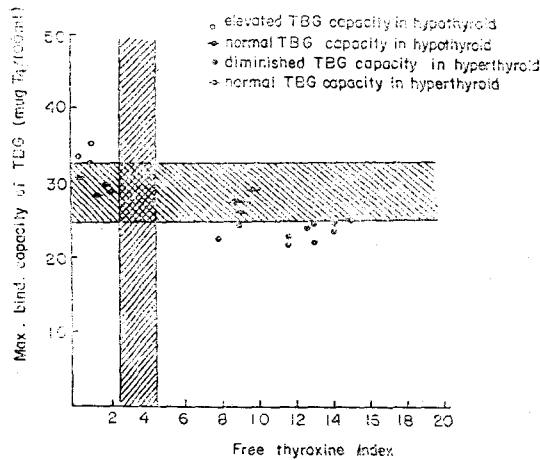


Fig. 6. Correlation between TBG capacity and FTI. The cross hatched areas indicate the normal ranges.

욱 低下경향을 보였다(Fig. 6). 결과적으로 TBG結合能과 FTI는 逆相關關係( $r = -0.623$ )를 나타냈다.

考 按

血中 蛋白質의 分離方法이 발달함에도 불구하고 electrophoresis가 thyroxine結合蛋白質의 분리 및 定量分析에 가장 많이 이용되어 왔으며 이로서 血中 3種의 搬送蛋白質 즉 TBPA, albumin 및 TBG를 쉽게 區分할 수 있었다.<sup>13,19</sup> 또 微量의 標識된 thyroxine을 血清에 첨가하여 電氣泳動하면 放射能의 30%는 TBPA와, 60%는 TEG와, 나머지 10%는 血清 albumin과 부합되어 있음이 밝혀졌다.<sup>37</sup> 그러나 各結合部位(binding site)의 親和力은 使用된 완충액의 種類와 酸度에 영향을 받으므로<sup>6,16,53</sup> 이들 蛋白質의 生體內의 分布를 電氣泳動法으로 正確히 反映시키지 못 할 때도 있다.

Thyroxine이 各各의 結合部位에 結合되는 比率은 個個의 結合部位의 thyroxine에 對한 親和力과 濃度와 thyroxine의 濃度에 의해서 결정된다.<sup>16,52</sup> 이때 結合部位의 量은 搬送蛋白質의 結合能을 測定함으로써 評價할 수 있다.

Oppenheimer<sup>38</sup>는 非放射性 thyroxine을 포화량 첨가하여 TBPA의 thyroxine結合能을 測定하여 그 값이 216~342  $\mu\text{g T}_4/100 \text{ ml serum}$ 이라고 報告하였다. 또한 albumin은 순환되는 thyroxine의 約 10%와 結合하고 있지만 結合能이 대단히 커서 포화처리방법으로 직접 측정하기 곤란하다.

TEG의 結合能 測定은 종전의 standard paper electrophoresis<sup>8,11</sup>에 의하여서는 albumin이 TBG보다도 始發點에서부터 더 멀리 移動함으로써 主 albumin帶 뒤에 "얼룩"을 남기게되어 TBG영역에 소량의 albumin이 混合되므로 TBG의 最大結合能을 正確히 얻을 수 없는 점이 있다.

Robbins<sup>42</sup>는 이러한 問題點을 reverse-flow electrophoresis를 이용함으로써 해결할 수 있었는데 이는 완충액을 사용하여 電流가 蛋白質分子를 移動시키는 方向의 反對方向으로 濾紙를 따라 流動시키는 것이다.

Elzinga, Carr 및 Beierwaltes<sup>10</sup>는 standard Durrum apparatus를 사용하여 쉽게 TBG結合能을 구할 수 있었다. 이 方法을 사용한 경우 TBG의 正常結合能은 16~24  $\mu\text{g T}_4/100 \text{ ml}$ 이었다.<sup>44</sup> Durrum型의 장점은 電極產出物이 濾紙조각에 도달하는것을 방지하기 위하여 완충액 저장소가 4個의 조절벽을 갖게되어 있어 pH變化에 따른 영향을 경감시킬 수 있는 長點이 있다.<sup>14</sup>

그러나 이와같은 電氣泳動法에 의한것은 기술적으로 간단할지 모르나 시간이 많이 소모되며 실험현황의 적용시에 세심한 注意가 요구되고 血清蛋白을 分離하는데 장시간의 電氣泳動조작이 불가피하며 各蛋白을 확인하여 放射能計測에 알맞게 잘라서 計測한 후 다시 합쳐야 하는 번거로움이 있고 또 電氣泳動器의 數가 제한되어 있으므로 한 檢査室에서 一回에 檢査할 수 있는 數가 限定되어 있다.<sup>41)</sup>

이러한 不便한 點을 감안한 非電氣泳動方法으로서 dextran-coated charcoal<sup>45)</sup> 및 ion exchange resin<sup>21, 25)</sup>에 의한 方法이 근래에 개발되었다

Kean 등<sup>21)</sup>에 의한 方法은 試驗血清을 8種의 다른  $T_4$  負荷量으로서 조작시키는 복잡함이 있다. Nicoloff 등<sup>25)</sup>에 의한 方法은  $T_3$  resin sponge uptake(Abbott Triosorb)를 적용하는 것으로 TBG의 遊離  $T_4$ 結合能을 알 수 있다.

Roberts 와 Nikolai<sup>46)</sup>에 의한 dextran-coated charcoal을 이용한 方法은 간편하지만 역시 正確성이 결여된다

TBG의 量을 直接 測定할 수 있는 radioimmunoassay<sup>24, 25)</sup>가 近來에 發達하여 極微量의 血清(10  $\mu$ l以上)으로도 測定이 可能하며 同時에 100個以上の 試料를 單회에 檢査할 수 있는 장점이 있다.

TBG 結合能은 radioimmunoassay에 의해서 얻어진 TBG 濃도와 正比例하여 6.7  $\mu$ g의  $T_4$ 가 1mg의 TBG와 결합함을 알 수 있었으나 TBG 結合能의 測定은 시험관내에서 시행된것이어서 生體內에서의 結合能을 正確히 알 수 없으므로 실제의 TBG 濃도와 結合能과의 關係를 나타내는지는 正確히 判斷하기 어렵다. 더욱이 TBG를 純化하는 동안 TBG의 構造에 약간의 變化를 일으켜서 抗原성에 영향을 줄 수 있으므로 이 方法에 의한 TBG 量은 TBG의 絕對量의 近似值라고 밖에 볼 수 없다.

血中蛋白과 結合 혹은 遊離된 物質을 서로 分離시키는 여러가지 方法中 本實驗에서 채택한 resin 沈澱 方法은 특정한 기구를 필요로 하지 않고, 간편하며 비교적 正確하다.

TBG에 의해서 결합안된 thyroxine은 resin으로 흡수시키며 resin과 thyroxine의 結合은 不可逆의이어서 진탕시간이 중요하였다. 너무 오랫동안 진탕하면 본래 TBG에 結合되었던 thyroxine이 떨어져 나와 resin에 부착될 수 있으며 너무 짧은 시간 진탕하면 未結合 thyroxine이 resin에 부착되지 않을수도 있으므로, 완충액이 後續反應을 어느정도 방지할 수 있겠으나, resin을 加한 후에는 빨리 실험과정을 진행시켜야 했다.

가벼운 resin을 使用하여도 비슷한 結果를 얻을 수 있겠으나 이때는 침전이 신속치 못하므로 완충액을 加한 후 後續反應을 막기위하여 遠心分離가 必要하게 된다.

또한 全實驗을 통하여 低溫을 유지하여야 좋은 結果를 얻을 수 있었다.

Thyroxine의 標識로는  $T_4$ -<sup>125</sup>I이거나 혹은  $T_4$ -<sup>131</sup>I를 사용하거나 거의 同一한 結果를 얻을 수 있지만  $T_4$ -<sup>125</sup>I의 半減期(60日)가 훨씬 길므로 使用上 便利하였다. <sup>125</sup>I나 <sup>131</sup>I로 標識된 放射性 thyroxine계제는 大部分 放射性 沃素를 微量포함하고 있으나 純化는 必要치 않았다. 標識된 thyroxine의 특수작용은 대단히 높아서 첨가된 방사성동위원소의 精確한 양이 중요하것이 아니어서 신속히 計測함으로써 조정할 수 있었다.

本方法에 의한 TBG 結合能은 電氣泳動法이나 radioimmunoassay에 의하여 測定된 TBG 値와 일치하였으며<sup>25)</sup>, 正常男女群에서 TBG 結合能의 差를 관찰할 수 있어서<sup>4, 46)</sup> 女子는 平均 21.6 $\pm$ 4.0  $\mu$ g  $T_4$ /100ml 이고 男子는 平均 19.2 $\pm$ 4.0  $\mu$ g  $T_4$ /100ml이라 하였으며 正常女子에서 높은 TBG 結合能은 상승된 血清  $T_4$ 值를 동반하였으나 平均 FTI의 男女差는 없었다<sup>4)</sup>.

甲狀腺機能亢進症에서 TBG의 減少는 Silverstein 등<sup>48)</sup>, Cuaron<sup>7)</sup> 및 Schussler 등<sup>47)</sup>에 의해서 이미 보고되었다. 本研究에서 甲狀腺機能亢進症 14例中 TBG 結合能이 減少한 10例의 FTI는 큰 上昇을 보인 반면 TBG 結合能이 비교적 正常範圍內에 속한 群은 FTI는 약간의 上昇을 보였다.

또한 甲狀腺機能低下症의 경우에서도 TBG 結合能이 증가된 7例中 4例는 FTI의 減少를, TBG 結合能이 正常인 群의 FTI는 약간의 減少를 보인 것은 (Fig. 6) Inada<sup>14)</sup>의 보고와 一致하였으며 그들은 또한 TBPA 결합능은 甲狀腺機能亢進症의 全例에서 低下되었으며 甲狀腺機能低下症에서는 全例에서 큰 變化가 없었음을 관찰하였고 TBPA 結合能과 FTI와 關係는 특별한 關係를 관찰할 수 없었음에 반하여 TBG 結合能과 FTI와의 關係는 逆相關關係를 뚜렷히 볼 수 있어서 TBG가 FTI의 決定에 더욱 重要한 역할을 하고 있음을 보고하였다.

Robbins 와 Rall<sup>43, 44)</sup>이 이미 지적했듯이 蛋白에 結合된 thyroxine과 遊離 thyroxine과의 관계는 질량作用(mass-action)原理에 의한 “複合-平衡系”로서 설명할 수 있다. 即 TBG, albumin, TBPA에 結合된 thyroxine의 量은 各蛋白의 濃度, 結合部位와의 親和力 및 thyroxine 濃度에 의해서 영향을 받는다.

만일 시험관내 상태로 국한하여 생각할 때 일정한 결



합단백질의 농도(結合能)나 혹은 단백질과의 親和力이 변하면 遊離 thyroxine의 濃度뿐 만 아니라 各 結合蛋白質과 結合된 thyroxine의 分劃도 變한다. 그리하여 만일 TBG가 複合 平衡系內에 첨가되면 thyroxine이 더 많이 TBG에 결합되고 TBPA나 albumin과의 結合은 저하되며 遊離 thyroxine 濃度는 저하된다. 反對로 TBG가 저하되면 遊離 thyroxine 및 albumin과 TBPA에 結合되는 양은 증가한다.

또한 thyroxine이 첨가되면 全結合蛋白質과 結合되는 thyroxine도 증가하고 遊離 thyroxine도 증가한다.

甲狀腺機能亢進症에서 TBG 結合能의 감소는 적어도 3가지 要因이 關여한다고 하였다.<sup>17,37,43</sup> 即 thyroxine의 분비증가가 限定된 TBG 結合部位를 일부 포화시키고, TBPA 量은 다른 疾病<sup>39</sup>에서와 마찬가지로 低하되며, 어떤 亢進症患者에서는 TBG의 量도 또한 低하되기 때문이다.<sup>25</sup> 反對로 甲狀腺機能低下症에서 TBG 結合能의 상승은 血中 thyroxine 量이 低하되어 蛋白質結合部位가 상대적으로 不飽和되어 더욱이 TBG 結合能이 증가된다고<sup>14,37,43</sup> 보나 이때에 TBG 量의 變化는 正常과 큰差가 없었다.<sup>25</sup>

TBG 結合能과 T<sub>3</sub> resin 攝取率과의 關係(Fig. 4)는 그 相關關係가 일직선이 아님을 볼 수 있는데 이는 標識된 T<sub>3</sub>가 ion 交換 resin과 TBG 사이에서 結合함에 있어 血中에 TBG 以外의 다른 因子, 예를 들어 TBPA나 albumin이 적은 역할을 하고 있지 않나 생각된다 하였다.<sup>25</sup> 이때 TBG 結合能이 증가하면 이들 血中內의 因子의 역할은 T<sub>3</sub> resin 攝取率의 결정에 별 영향을 주지 않는다. 이들의 關係는 甲狀腺疾患에서도 관찰할 수 있어서 甲狀腺機能亢進症에서의 T<sub>3</sub> resin 攝取率은 TBG 結合能이 약간 低下되는데 비하여 훨씬 높음을 알 수 있었다. 甲狀腺機能低下症에서는 T<sub>3</sub> resin 攝取率이 약간 低下되고 TBG 結合能이 약간 상승됨을 볼 수 있었다. 이는 T<sub>3</sub> resin 攝取率이 血中 TBG 濃度와 이미 흡착된 T<sub>4</sub>結合部位에 關係있음을 확인하는 것이라 하겠다. 고로 T<sub>3</sub> resin 攝取率이나 TBG가 甲狀腺疾患 진단에 단독으로 사용되어서는 안됨을 간접적으로 시사해 주었다.

### 結 論

T<sub>3</sub> resin 攝取率, 血清 T<sub>4</sub>值 및 遊離 T<sub>4</sub>係數의 測定은 甲狀腺機能을 評價하는데 많이 使用되고 있으나 血清內 搬送蛋白質이 各 測定法에 미치는 영향이 적지 않다.

著者は 簡便할 뿐 아니라 正確한 새로운 方法을 使

用하여 正常成人韓國人 15例와 서울大學校 醫科大學 附屬病院 內科에서 觀察한 治療前의 甲狀腺機能亢進症 14例 및 甲狀腺機能低下症 7例를 對象으로 하여 單一 T<sub>4</sub>負荷 이온 交換樹脂法을 채택하여 血中 thyroxine 結合 globulin의 T<sub>4</sub>結合能을 測定하여 T<sub>3</sub> resin 攝取率, 血清 T<sub>4</sub>值 및 遊離 T<sub>4</sub>係數와의 關係를 比較觀察하여 다음과 같은 成績을 얻었다.

1) TBG 結合能을 測定하는 單一 T<sub>4</sub>負荷 이온 交換樹脂法은 중진의 方法에 비하여 實驗器具 및 技術이 簡便하여 臨床領域에서 容易하게 利用할 수 있었다.

2) TBG 結合能은 正常對照群에서 28.6±5.09 μg T<sub>4</sub>/100 ml로 비록 넓은 範圍를 보였으나 甲狀腺機能亢進症群에서 24.9±3.87 μg T<sub>4</sub>/100 ml로서 有意한 低下를 나타내었으며(p<0.025), 甲狀腺機能低下症群에서는 31.0±2.40 μg T<sub>4</sub>/100 ml로서 上昇傾向만을 보였다.

3) TBG 結合能과 T<sub>3</sub> resin 攝取率과의 關係는 逆相 關係係數(r=-0.624)를 나타냈으며, TBG 結合能과 血清 T<sub>4</sub>值와의 關係는 血清 T<sub>4</sub>值가 增加함에 따라 TBG 結合能의 低下를 보여 逆相關係를 보였고(r=-0.829), TBG 結合能과 遊離 T<sub>4</sub>係數와의 關係 또한 逆相 關係係數를 보였다(r=-0.623).

以上の 成績으로부터, thyroxine 結合 globulin의 變化가 진정한 甲狀腺ホル몬의 臨床的 역할에 關係함을 暗示할 수 있다.

(끝으로 本 研究를 始終 指導하여 주시고 本 論文을 校閱하여 주신 李文鎬教授님과 高昌舜副教授님께 深甚한 感謝를 드리며, 끊임 없는 激勵을 해 주신 閔獻基教授님께 感謝드리며, 아울러 많은 協力을 아끼지 않은 同位元素室 徐壹澤先生 및 여러 人의 勞苦에 謝意를 드립니다.)

### REFERENCES

- 1) Austin, F.K., Rubini, M.E., Meroney, W.H. and Wolff, J.: *Salicylates and thyroid function. I. Depression of thyroid function. J. Clin. Investigation, 37:1131, 1958.*
- 2) Berger, S., Goldstein, M.S. and Metzger, B.E.: *Electrophoretic method for characterizing thyroid function. New Eng. J. Med., 267:801, 1962.*
- 3) Bernstein, G. and Oppenheimer, J.H.: *Factors influencing the concentration of free and total thyroxine in patients with nonthyroidal disease. J. Clin. Endocrinol., 26:195, 1966.*
- 4) Braverman, L.E., Foster, A.E. and Ingbar, S.H.:

- Sex related differences in the binding in serum of thyroid hormones. J. Clin. Endocrinol.*, 27: 227, 1967.
- 5) Cavalieri, R.R. and Searle, G.L.: *Kinetics of distribution between plasma and liver of <sup>131</sup>I-labeled L-thyroxine in man: Observations of subjects with normal and decreased serum thyroxine-binding globulin. J. Clin. Investigation*, 45:939 1966.
  - 6) Christensen, L.K. and Litonjua, A.D.: *Is thyroxine binding by pre-albumin of physiologic importance? J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 21:104 1961.
  - 7) Cuaron, A.: *Relationship between the in vitro uptake of <sup>131</sup>I-triiodothyronine by erythrocytes and its binding by serum proteins in thyroid disease. J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 26:53, 1966.
  - 8) Dowling, J.T., Freinkel, N. and Ingbar, S.H.: *Thyroxine-binding by sera of pregnant women, newborn infants, and women with spontaneous abortion. J. Clin. Investigation*, 35:1263, 1956.
  - 9) Ekins, R.P.: *The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. Clin. Chim. Acta*, 5:453, 1960.
  - 10) Elzinga, K.E., Carr, E.A., Jr. and Beierwaltes, W.H.: *Adaptation of standard Durrum-type cell for reverse-flow electrophoresis. Am. J. Clin. Path.*, 36:125, 1961.
  - 11) Freinkel, N., Dowling, J.T. and Ingbar, S.H.: *The interaction of thyroxine with plasma proteins. Localization of thyroxine-binding protein in Cohn fractions of plasma. J. Clin. Investigation*, 34: 1698, 1955.
  - 12) Hasen, J., Bernstein, G., Volpert, E.M. and Oppenheimer, J.H.: *Analysis of rapid interchange of thyroxine between plasma and liver and kidney in intact rat. Endocrinology*, 82:37, 1968.
  - 13) Hollander, C.S., Odak, V.V., Prout, T.E., et al.: *An evaluation of the role of prealbumin in the binding of thyroxine. J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 22:617, 1962.
  - 14) Inada, M. and Sterling, K.: *Thyroxine transport in thyrotoxicosis and hypothyroidism. J. Clin. Investigation*, 46:1442, 1967.
  - 15) Ingbar, S.H.: *Interaction of thyroid hormones with proteins of human plasma. Ann. New York Acad. Sci.*, 86:440, 1960.
  - 16) Ingbar, S.H.: *Observations concerning binding of thyroid hormones by human serum prealbumin. J. Clin. Investigation*, 42:143, 1963.
  - 17) Ingbar, S.H., Braverman, L.E., Dawber, N.A. and Lee, G.Y.: *New method for measuring free thyroid hormones in human serum and analysis of factors that influence its concentration. J. Clin. Investigation*, 44:1679, 1965.
  - 18) Ingbar, S.H. and Woeber, K.A.: *The thyroid gland. William's Textbook of Endocrinology*, 4th ed., pp.121, 1968,
  - 19) Ingbar, S.H.: *Prealbumin: a thyroxine-binding protein of human plasma. Endocrinology*, 63: 256, 1958.
  - 20) Kaplan, B.C.: *A simple method for the determination of serum thyroxine, a talk presented before the bioanalysis section. American Association for the Advancement of Science*, 133rd meeting, December 28, 1966.
  - 21) Keane, P.M., Pegg, P.J. and Johnson, E.: *Estimation of thyroxine binding protein capacities using a non-electrophoretic technique. J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 29:1126, 1969.
  - 22) Kennedy, J. A. and Abelson, D.M.: *Determination of serum thyroxine using a resin sponge technique. J. Clin. Path.*, 20:89, 1967.
  - 23) 金東集, 閔炳奭, 朴龍輝, 金富成: 정상인 및 각종 갑상선질환 환자의 혈청 thyroxine. 大韓核醫學會雜誌, 3:141, 1969.
  - 24) 金錫根, 林壽德, 李文鎬: 甲狀腺 疾患의 thyroglobulin 에 관한 研究(豫報). 大韓核醫學會雜誌, 4: 43, 1970.
  - 25) Levy, R.P., Marshall, J.S. and Velayo, N.: *Radioimmunoassay of human thyroxine-binding globulin (TBG). J. Clin. Endocrinol.*, 32:372, 1971.
  - 26) Lutz J.H. and Greycerman, R.I.: *pH dependence of the binding of thyroxine to prealbumin in human serum. J. Clin. Endocrinol. & Metab.*

- 29:487, 1969.
- 27) 李文鎬, 高昌舜, 盧興圭, 李正相, 具寅晝, 徐桓祚, 李慶子, 李弘奎: 放射性 同位沃素(<sup>131</sup>I)에 의한 甲狀腺疾患의 臨床的 研究. 大韓核醫學會雜誌, 4: 99, 1970.
- 28) Marshall, J.S. and Levy, R.P.: *Polyacrylamide electrophoretic study of thyroxine binding to human serum. J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 26:87, 1966.
- 29) McAdams, G.B. and Reinfrank, R.F.: *Resin sponge modification of the <sup>131</sup>I-T<sub>3</sub> test. J. Nuclear Med.*, 5:112, 1964.
- 30) Mitchell, M.L., Harden, A.B. and O'Rourke, M. E.: *The in vitro resin sponge uptake of triiodothyronine-<sup>131</sup>I from serum in thyroid disease and in pregnancy. J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 20:1474, 1960.
- 31) Murphy, B.E.P. and Pattee, C.J.: *Determination of thyroxine utilizing the property of protein-binding. J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 24:187, 1964.
- 32) Murphy, B.E.P.: *Application of the property of protein-binding to the assay of minute quantities of hormones and other substances. Nature(London)*, 201:679, 1964.
- 33) Murphy, B.E.P. and Jachan, C.: *Determination of thyroxine by competitive protein-binding analysis employing an anion-exchange resin and radiothyroxine. J. Lab. & Clin. Med.*, 66:161, 1965.
- 34) Nakajima, H., Kuramochi, M., Horiguchi, T. and Kubo, S.: *A new and simple method for the determination of thyroxine in serum. J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 26:99, 1966.
- 35) Nicoloff, J.T., Gross, H.A., Warren, D.W., et al.: *Thyroxine binding globulin values as a measure of placental adequacy. Obstet. Gynec.*, 35:191, 1970.
- 36) Oppenheimer, J.H., Bernstein, G. and Hasen, J.: *Estimation of rapidly exchangeable cellular thyroxine from plasma disappearance curves of simultaneously administered thyroxine-<sup>131</sup>I and albumin-<sup>125</sup>I. J. Clin. Investigation*, 46:762, 1967.
- 37) Oppenheimer, J.H., Squel, R., Surks, M.I., and Hauer, H.: *Binding of thyroxine by serum proteins evaluated by equilibrium dialysis and electrophoretic techniques: alterations in nonthyroidal illness. J. Clin. Investigation*, 42:1769, 1963.
- 38) Oppenheimer, J.H., Martinez, M., and Bernstein, G.: *Determination of maximal binding capacity and protein concentration of thyroxine binding prealbumin in human serum. J. Lab. & Clin. Med.*, 67:500, 1966.
- 39) Oppenheimer, J.H., Fisher, L.V., Nelson, K.M., and Jailer, J.W.: *Depression of serum protein-bound iodine level by diphenylhydantoin. J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 21:252, 1961.
- 40) Oppenheimer, J.H.: *Role of plasma proteins in the binding, distribution and metabolism of the thyroid hormones. New Eng. J. Med.*, 278: 1153, 1968.
- 41) Refetoff, S., Hagen, S.R., and Selenkow, H.A.: *TBG and TBPA by a single T<sub>4</sub> load ion exchange resin method. J. Nuclear Med.*, 13:2, 1972.
- 42) Robbins, J.: *Reverse-flow zone electrophoresis: method for determining thyroxine-binding capacity of serum protein. Arch. Biochem.*, 63:461, 1956.
- 43) Robbins, J. and Rall, J.E. II.: *Hormone transport in circulation: interaction of thyroid hormones Estimation of the T<sub>4</sub> binding capacity of serum and proteins in biological fluids. Recent Progr. in Hormone Reserch*, 13:161, 1957.
- 44) Robbins, J. and Rall, J.E. II.: *Proteins associated with thyroid hormones. Physiol. Rev.*, 40:415, 1960.
- 45) Roberts, R.C. and Nikolai, T.F.: *Determination of thyroxine-binding globulin: A simplified procedure utilizing Dextran-coated charcoal. Clin. Chem.*, 15:1132, 1969.
- 46) Roberts, R.C. and Nikolai, T.F.: *Assay of thyroxine-binding globulin by polyacrylamide electrophoresis: normal values. Clin. Chem.*, 15:367, 1969.
- 47) Schussler, G.C.: *Thyroxine binding globulin*

- (TEG) in thyrotoxicosis and nonthyroidal illness. *The Endocrine Society: Program of the 48th meeting in Chicago*. 113(Abstr.), 1966.
- 48) Silverstein, J.N., Schwartz, H.L., Feldman, E.B., Kydd, D.M. and Carter, A.C.: *Correlation of the red blood cell uptake of  $I^{131}$ -L-triiodothyronine and thyroxine binding globulin capacity in man*. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.* 22:1002, 1962.
- 49) Sterling, K. and Brenner, M.A.: *Free thyroxine in human serum simplified measurement with aid of magnesium precipitation*. *J. Clin. Investigation*, 45:153, 1966.
- 50) Sterling, K. and Hegedus, A.: *Measurement of free thyroxine concentration in human serum*. *J. Clin. Investigation*, 41:1031, 1962.
- 51) Sterling, K. and Tabachnick, M.: *Resin uptake of  $I^{131}$ -triiodothyronine as a test of thyroid function*. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 21:456, 1961.
- 52) Sterling, K. and Tabachnick, M.: *Paper electrophoretic demonstration of thyroxine-binding prealbumin fraction in serum*. *Endocrinology*, 68:1073, 1961.
- 53) Tata, J.R., Widnell, C.C., and Gratzner, W.B.: *Systematic study of factors affecting binding of thyroxine and related substances to serum proteins*. *Clin. Chim. Acta.*, 6:597, 1961.
- 54) Vannotti, A. and Béraud, T.: *Functional relationships between the liver, the thyroxine-binding protein of serum, and the thyroid*. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 19:466, 1959.
- 55) Wolff, J., Standaert, M.E., and Rall, J.E.: *Thyroxine displacement from serum proteins and depression of serum protein-bound iodine by certain drugs*. *J. Clin. Investigation*, 40:1372, 1961.