

Testosterone의 방사면역측정법의 정립과 한국인 아동 및 정상성인의 혈청내 농도*

Testosterone Radioimmunoassay and Serum Levels in Korean Children and Adult Males

서울대학교 의과대학 연구의학연구소

윤용달** · 김응익 · 서판길 · 한정호 · 채범석

의 변화를 조사 연구하고자 하였다.

서 론

방사면역측정법(radioimmunoassay)이 개발된 이래 체내의 미량으로 존재하는 steroid hormone의 농도를 측정하는 매우 감도 높은 방법들이 개발되었고(Abrraham, 1975; Cameron et al., 1975; Lorain and Bell, 1976) 근래에는 순수한 내분비학적 임구의 방법에서 임상에 적절 이용할 수 있도록 응용되고 있다(Hopkins et al., 1977). 그러나 방사면역측정법이 매우 정밀하고 감도가 높더라도 그 사용방법에 따라 매우 큰 측정치 범위를 보이며 정밀한 측정을 위해서는 세심하게 표준화(standardization)시켜 정도관리되어야 함이 밝혀졌다.

특히 testosterone은 최근 그 측정방법이 개발되고(Collins et al., 1972; Auletta et al., 1974; Bardin and Santen, 1975) 또한 나이, 성별, 생식주기, 계절, 수면, 성적 활동, 병적 상태등에 의해 그 양의 변화를 보인다는 것이 서양인에서 잘 알려져 있다(Dawood and Saxena, 1976; Lewis et al., 1976; Aajes et al., 1977; Horst et al., 1977; Pirke et al., 1977; Pakarinen et al., 1979; Illig et al., 1980).

그러나 한국인을 대상으로 시행한 연구는 전무한 상태에 있으며, 최근 국내에서도 인구조절을 위해 남성 불임제제의 사용과 남성 불임시술등이 보편화됨에 따라 testosterone 정상치의 임상적 요구성이 증대되고 있다.

그러므로 본 연구는 일차적으로 testosterone의 방사면역 측정법을 정립시키고 이 방법을 이용하여 한국인의 생식생리학적인 정상치와 병적 상태에 따른 농도

재료 및 방법

1. 대상과 혈액채취

본 실험의 대상은 서울시내 3개국민학교 남학생 116명을 1학년에서 6학년까지 각 20명씩 선출하여 채혈하고 서울대학교 연구의학연구소에 내소한 정상남자 136명을 20세부터 50세까지 5년 차이를 1군으로하여 각각 20명씩을 채혈하였다. 또한 생식생리학적으로 비정상인 환자 62명을 선정하여 진단에 따라 구분하였다. 그리고 건강한 한국여성중 정상적인 월경주기를 가진 35명과 불임성 환자 56명을 선정하여 채혈하였다.

1회용 주사기(Plastipak)를 사용하여 주정중피정맥(median cubital vein)에서 채혈한 후, 분리한 혈청을 0.5ml씩 분주하여 사용시까지 -20°C 에 보관하였다.

2. 분석준비 및 시약

본 실험의 기본적인 완충액(PAS-GEL)은 0.1M sodium phosphate buffer로서 NaCl (Merck, 0.15M), merthiolate(Sigma Chem. Co., 0.25mM), gelatin (Sigma, 1.0g/l)을 첨가하였다.

Free testosterone의 흡착에 사용한 DCC는 charcoal (Amend Co., Norit A, 6.25g/l)과 dextran T-70(Pharmacia Fine Chemicals, 0.625g/l)을 100ml의 상기 분석용 완충액으로 부유액을 만들어 4°C 에 보관하였고, magnetic stirrer로 계속 교반시키면서 균일한 용액으로 만들어 사용하였다.

방사능의 측정을 위한 scintillation fluid는 2,5-di-phenyloxazole (PPO, Sigma, 22.5g)을 3 l의 toluene에 잘 섞어 용해시킨 후 1.5 l의 Triton-X-100(New England Nuclear)를 혼합하여 안정시킨 후 사용하였다.

표지된 testosterone는 $1, 2, 6, 7\text{-}^3\text{H-testosterone}$ (spec.

* 본 연구는 재단법인 보건장학회에서 지원된 장학금의 일부 보조로 이루어졌다.

** 현주소 : 한양대학교 의과대학 생물학과

act. 315 mCi/mg, The Radiochemicals, Amersham, U.K.)를 정제하여 사용하였고 steroid hormones의 표준시약들은 Steraloid 또는 Sigma 회사에서 구입하였다.

본 실험에 사용한 항혈청은 testosterone-3-carboxy methyloxime-bovine serum albumin(3-CMO-BSA)를 가토에 주입하여 얻은 항혈청을 세계보건기구(WHO)와 Dr. Aakvaag(Hormon of Isotoplaboratriet, Aker sykehus, Norway)으로부터 기증받아 사용하였다. 본 실험에 주로 이용한 항혈청(WHO 기증)의 다른 steroid hormone과의 cross reaction을 보면 5-alpha-dihydro-testosterone, 14%; 4⁴-androstenedione, 0.8%; 5-alpha-androstanediol, 6%; 4⁵-androstenediol, 2.1%이었다.

2. Chromatography

방사성 표지 testosterone 및 시료의 testosterone의 분리, 정제를 위하여 paper chromatography(PC), thin layer chromatography(TLC) 또는 liquid column chromatography(LC)를 사용하였다. 20~50 μ Ci의 radioligand를 질소가스 존재하 37°C에서 전조시킨 후 각 chromatography를 위한 유기용매에 녹인 다음 시료를 지지체에 올렸다.

Paper chromatography는 Heftman(1976)의 방법에 의하여 2×50cm의 Whatman No. 1 paper와 n-heptane/methanol/H₂O(5:4:1) system을 이용하여 5~6시간동안 하행전개법으로 분리하였다. 전개 후 방사성 추적자는 Actigraph III(Nuclear-Chicago)로 주사하여 최적위치를 신경 후 잘라내어 90% ethanol로 추출하였다.

Thin layer chromatography(TLC)는 0.25mm두께의 Silica gel(Type GF 254, Merck, Darmstadt, Germany)판을 이용하였다. 시료에서 testosterone의 분리를 위해 benzene/ethylacetate(6:1, v/v) system을 이용하여 Shandon S/P Chromatank(30×12×30cm) 상행전개를 실시하였다. 방사성 testosterone은 TLC scanner (Model PW 4007, Philips)를 이용하여 적정이동거리를 측정 후 유리용매(ethanol/diethyl ether, 1:1, v/v)로 testosterone을 추출 분리하였다.

Liquid column chromatography는 5~6g의 LH-20 Sephadex(hydroxy-propylated and cross-linked dextran, Pharmacia, Fine Chemicals)를 각각의 elution solvent에 처리한 후 0.9×30cm의 column에 채웠다. steroid를 diethyl ether로 추출 후 N₂ gas하에 말린 다음 0.3ml의 elution solvent에 녹여 column에 침가하였다. 용출된 용액은 1ml 씩 fraction collector(Red-iRack, LKB)로 받은 후 적정 peak을 결정하기 위하여 방사성 testosterone은 각 분획에서 20 μ l씩을 떼내어 10 ml의 scintillation fluid에 넣어 beta-counter(Packard

Tri-Carb, Model 2450)로 방사능을 측정하였다.

4. Testosterone의 방사면역 측정

대상인의 혈청에서 0.05~0.5ml을 떼내어 1 nCi의 radioligand를 침가하여 잘 섞은 다음 diethyl ether 5ml로 steroid hormone을 추출하였다. steroid hormone을 함유하는 diethyl ether총을 37~40°C의 Sample Concentrator(Brinkman SC/48S)에서 유기용매를 증발시킨 후, 난은 dry extract를 2ml의 분석원액으로 부유시켜 0.5ml은 추출효율(recovery efficiency) 검사용으로, 0.5ml씩 2개의 tube는 testosterone 정량에 사용하였다. 각각의 tube에 항혈청(100 μ l)과 추적자(100 nCi/100 μ l)를 넣어 혼합하여 총량이 700 μ l되게 한 후 4°C에 16~24시간 incubation하였다. 항체-항원 결합이 이루어지지 않은 항원을 분리하기 위해 200 μ l의 charcoal 혼탁액을 침가하여 잘 섞은 다음, 4°C에서 15분간 방치한 후 4°C에서 5분간 500g에서 원침시켰다. 상동액 전량을 10ml의 scintillation fluid와 잘 혼합하여 counting vial(Packard)에서 1시간 이상 안정화시켜 beta-counter로 방사능을 측정하였다.

본 연구 기간중 방사면역 측정의 정도관리(Quality Control, QC)를 위하여 내부정도관리(Internal Quality Control, IQC)용 시료를 3가지를 사용하였고, 외부정도관리(External Quality Control, EQC)를 위해 WHO에서 EQC시료들을 기증받아 정량후 세계의 다른 연구실에서의 측정치와 비교하였다.

결 과

I. 방사면역 측정법(RIA)의 정립

현장내 testosterone의 농도를 정밀하게 측정하기 위해 적절한 측정방법을 조사한 결과는 다음과 같았다.

1. 항체가 RIA 특성에 미치는 영향

1) Antiserum dilution curve: 본 실험에서 측정 항체의 양을 결정하기 위하여 lyophilized anti-testosterone-3-CMO-BSA serum을 10배씩 PAS-GEL 원액으로 희석하여 기본적인 방사면역 측정법을 실시한 결과, 항혈청의 적정희석농도(50% binding)은 1/210,000으로 나타났다.

2) 항체의 특성에 미치는 charcoal량의 영향: 항원-항체 결합을 위해 18~24시간 배양 후 결합되지 않은 항원, 특히 추적자를 제거하기 위해 사용하는 charcoal의 양이 미치는 영향을 조사한 결과를 그림 1에 나타내었다. 배양후 charcoal의 양을 증가시킴에 따라 optimal dilution factor는 감소하였다. 즉 charcoal

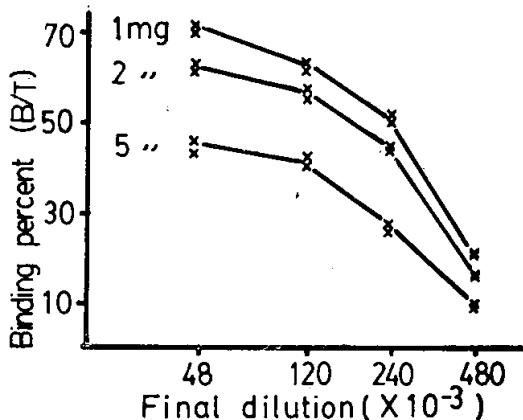


Fig. 1. Effect of charcoal amount on the antibody characteristics. Normal assay conditions except the addition of various amount of charcoal were followed for a series of initial bindings and non-specific bindings in triplicate at each dilution of antiserum.

의 양을 많이 사용하면 Bo와 NSB가 낮아지는 반면 항체는 더욱 고농도로 사용해야 하는 것을 관찰하였다. 그러므로 본 실험이후의 실험에서는 assay tube 당 1.25 mg/tube의 charcoal양을 사용하였다.

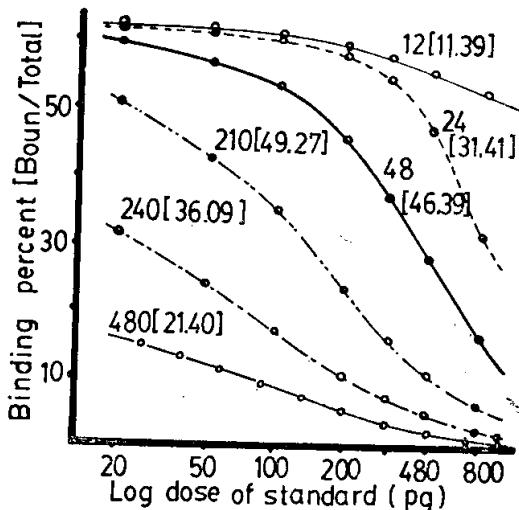


Fig. 2. Effect of antiserum amount on the initial bindings and their replacements by cold standards in testosterone RIA. The numbers on each line represent the factor of final dilutions ($\times 10^{-3}$) of the antiserum. The numbers in the parentheses on each line mean the deviation (%) between the maximal binding (Bo) and the binding in the presence of 800 pg/tube of cold testosterone.

3) 항체의 보존기간과 양의 영향 : lyophilized된 상태의 항체를 PAS-GEL assay buffer로 희석하여 4°C에서 약 7개월간 보관하면서 시기에 따른 표준곡선을 얻어본 결과 PAS-GEL완충 용액에 희석된 상태로 장기간 보존될 경우 측정의 질이 다소 떨어지더라도 측정에는 사용할 수 있음을 관찰하였다.

한편 항체의 양에 따른 표준곡선의 변화를 관찰한 결과를 그림 2로 나타내었다. 본 도표가 제시하는 바와 같이 1/240,000의 희석 항체를 사용한 결과 1/210,000의 표준 곡선과 비슷한 양상을 나타내었고 항체의 양이 높은 경우, 표준시약의 양이 적은 때에는 완만한 곡선을 나타내는 반면 고농도의 좀은 영역(300~800 pg/tube)에서 갑작스런 하향을 나타내었다. 이에 반해 저농도의 항체양을 사용할 경우는 고농도 표준시약의 영역에서는 지농도시에 비해 비교적 완만한 곡선을 보였다. 즉 항체의 사용양이 많고 또한 적은 것이 측정방법의 질을 낮추는 것을 관찰하였다.

2. Tracer가 RIA 특성에 미치는 영향

1) 추적자의 순수정제 : Paper chromatography에 의한 1, 2, 6, 7-³H-testosterone의 분리결과 R_f 값은 0.25±0.01이었고, 추적자의 회수율은 85.3±5.0%이었다. 한편 TLC에 의한 추적자분리 실험에서는 R_f 값은 0.56±0.03이었고, 회수율은 89.4±2.5%이었다.

한편 testosterone과 antiserum에 14%의 cross reaction을 일으키는 5 alpha-dihydro-testosterone을 분리하기 위해 각각의 추적자를 100 nCi 씩첨가하여 liquid column chromatography를 실시하였다. 각각의 용매를

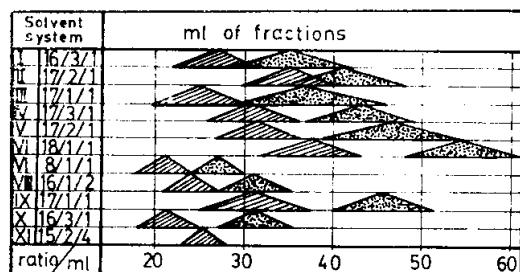


Fig. 3. Elution patterns for the separation of testosterone (▲) from 5 α -dihydrotestosterone (▲) by LH-20 column chromatography. The Roman numerals in the left column represent the solvent systems as shown in the followings and the Arabic numerals in the second column show the mixing ratio of the solvents. I, II: heptane/benzene/methanol; III: heptane/chloroform/methanol; IV to VI: isoctane/benzene/methanol; VII to IX: hexane/benzene/methanol; X: cyclohexane/benzene/methanol; XI: cyclohexane/chloroform/ethanol.

에 24시간이상 처리한 5~6g의 LH-20를 0.9×3.0cm의 column에 넣은 후 각 시료를 해당 용매에 녹여 column에 올리고 같은 용매로 용출시켜 얻은 적정분획을 그림 3으로 나타내었다. 용매내 methanol 및 ethanol은 두 물질의 분리에 필수적이며 또한 methanol의 농도가 상대적으로 낮아진에 따라 5-alpha-dihydro-testosterone과 testosterone의 분리는 명확해지는 경향을 보였다. 또한 cyclohexane/chloroform/ethanol(15:2:4)의 용매가 비교적 신속히 testosterone의 적정분획을 나타내었다. 본 실험후의 정기적인 순수 tracer의 분리는 solvent system XI을 사용하였다. 또한 5-alpha-DHT의 농도가 높은 것으로 예상되는 시료는 solvent system IX나 X를 이용하여 분리 후 정량하였다.

2) 추적자가 황원-황체 결합에 미치는 영향: 추적자를 paper, LH-20(LC) 또는 TLC chromatography로 정제한 후 주적자의 순도가 측정에 미치는 영향을 4개월 이상 정제하지 않은 추적자를 사용한 경우와 비교하였다. 그림 4에서 보이는 바와 같이 chromatograph에 의해 순수 정제한 추적자를 사용한 경우 측정의 절차를 높였다. 정제하지 않은 추적자를 사용할 경우의 NSB는 4.7%였고, 정제한 경우는 2.21%이하였다.

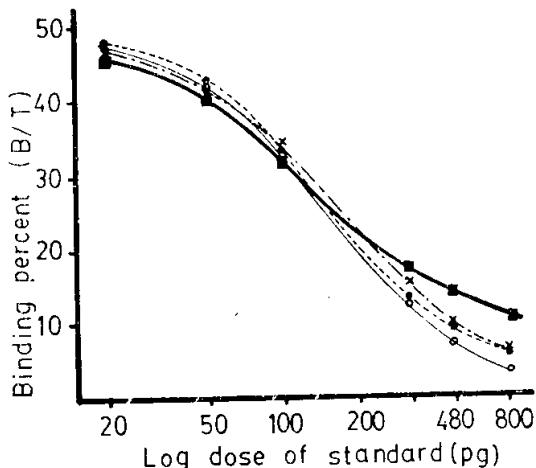


Fig. 4. Effect of tracer purified by paper, LH-20 column and thin layer chromatography on dose-response curve. Normal assay conditions were carried out for a calibration curve in testosterone RIA using the tracers purified by paper chromatography ($\circ-\circ$, n-heptane/methanol/ H_2O ; 5/4/1), column chromatography ($\bullet-\bullet$, cyclohexane/chloroform/ethanol; 15/2/4), thin layer chromatography ($\times-\times$, benzene/ethylacetate; 1/1) and also without any purification ($\blacksquare-\blacksquare$) as a control).

3) Column chromatography시 각 분획의 추적자가 측정방법에 미치는 영향: cyclohexane/chloroform/ethanol(15/2/4, v/v)용매에 의해 용출된 추적자의 최적정 fraction(17~18ml분획)과 pre-peak fraction(13~16ml분획) post-peak fraction(19~21ml분획)이 측정의 질에 미치는 영향을 비교한 결과를 그림 5로 나타내었다.

적정 전 분획의 Bo는 48.36%, 적정 분획 Bo는 57.08%, 적정 후 분획의 Bo는 59.97%로 column chromatography 시행후 분획들이 initial binding Bo를 높히는 것을 관찰하였다. 그러나 Bo와 300 pg의 표준시약이 존재 할 때의 B/T%와의 차이는 적정 분획이 35.3%로 시 적정 전(33.5%)이나 적정 후(31.84%)에 비해 높아 적정 분획 전후의 분획은 측정의 질을 낮추는 것을 관찰하였다.

3. 원총용액이 RIA 특성에 미치는 영향

1) 원총용액의 ionic strength의 영향: ionic strength를 증가시키기 위하여 NaCl의 양을 측정원증액(PAS-GEL, 0.75 μ)의 2배(0.90 μ), 5배(1.4 μ)로 높였다. 그림 6에서 보는 바와 같이 고농도의 표준시약의 존재하

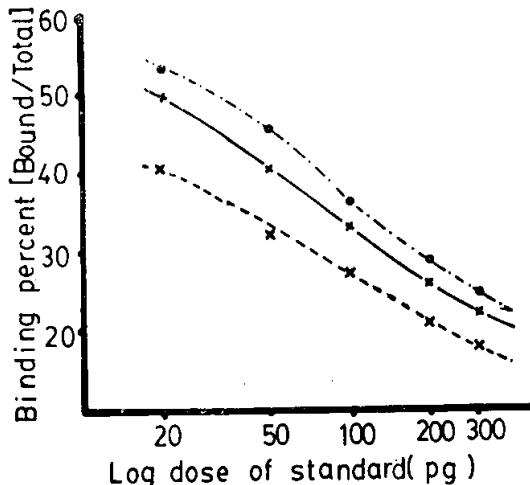


Fig. 5. Comparison of the effects of tracers obtained from the fractions of pre-peak and post-peak during the column chromatography. Normal assay conditions were carried out for these standard curves except the using of the tracers purified by column chromatography (0.9cm×25cm). The solid line with \times marks represents the standard curve using the tracer from the peak fractions (17~18ml). The dotted line with the open circles, using tracers from post-peak(19~21ml) and the dotted line with \times marks, using tracers from pre-peak (13~16ml) fractions.

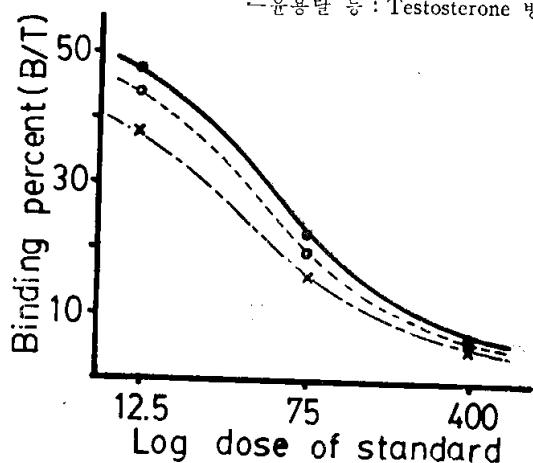


Fig. 6. Effects of ionic strength on the dose-response curve. The ionic strength of assay buffer solution was increased by adding sodium chloride in PAS-GEL buffer. All the reagents were dissolved in each buffer solution and normal assay conditions were performed. The solid line with the closed circles represent the standard ionic strength (0.75μ), the dotted line with open circles, ionic strength (1.15μ) and the dotted line with \times marks, 1.4μ of buffer solution.

에서는 차이가 없었으나, 측정도의 표준시약이 존재할 때는 측정의 질에 영향을 끼쳤다. 특히 ionic strength가 2배로 증가될 때 측정의 질이 현저히 떨어졌다. 본 실험의 결과는 $0.75\sim0.9\mu$ 일 때 항원-항체 결합에 대한 영향이 가장 없는 것으로 관찰하였다.

2) 완충용액의 steroid carrier의 영향 : 불수용성인 steroid hormones의 항체와의 고른 반응을 위해 사용하는 gelatin이 반응온도 (4°C)에서 결정화 하는 경향이 있으므로 polyvinylpyrrolidin (PVP), bovine serum albumin (BSA), ficoll 등의 steroid carrier를 이용하여 측정법의 질에 미치는 영향을 조사한 결과는 그림 7과 같다.

본 표에서 보이는 바와 같이 BSA를 사용할 경우 initial binding (Bo)는 대조군인 gelatin을 carrier로 사용하는 경우 (50%)에 비해 낮은 반면, BSA농도를 0.1 %에서 1%로 높이면 non-specific binding (NSB)는 대조군의 2%보다 약 4~5배 상승하는 것을 관찰하였다.

한편 PVP를 사용할 경우 Bo는 PVP 0.1~0.5%에서 대조군보다 높은 반면 NSB는 3~1%로 증가하였다. ficoll을 사용할 경우 0.1~1%까지 모두 Bo가 대조군보다 높았고 NSB는 3~2%로 비교적 낮은 NSB치를 나타내었다.

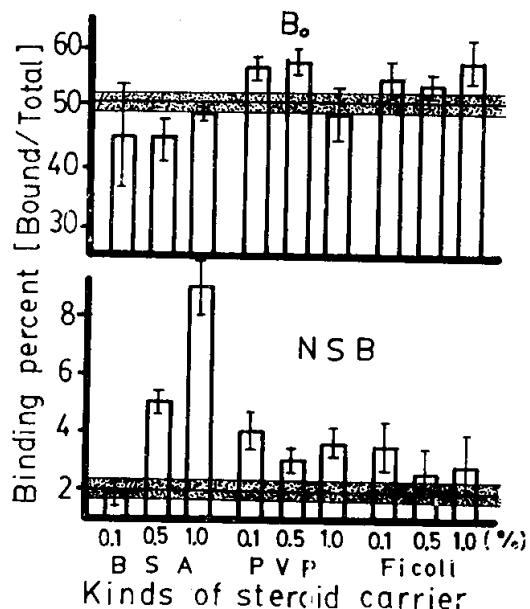


Fig. 7. Effects of steroid carriers in assay buffer on the initial binding (Bo) and non-specific binding (NSB). Normal assay conditions except the carrier components in assay buffer were carried out in testosterone RIA. Shaded areas represent those of mean \pm 1 standard deviation in Bo (upper figure) and NSB (lower) obtained in the normal assay condition. The abbreviation, BSA, represent a batch of bovine serum albumin and PVP, polyvinyl-pyrrolidin.

본 결과로 보아 steroid 측정의 전을 낮추는 BSA를 제외한 PVP와 ficoll이 실질적인 표준곡선에 미치는 영향을 조사한 결과를 표 1로 나타내었다. 본 도표에서 보는 바와 같이 initial binding은 PVP 사용시는 약간의 저하를 보이나 ficoll의 사용시는 증가하는 경향을 보였다. 한편 $400\text{pg}/\text{tube}$ 표준시약을 써서 추적자와 항체의 반응을 억제하는 결과는 대동소이하였고, 표준곡선의 correlation coefficient (r), 기울기 ($slope, m$), logit axis의 절편 ($intercept, b$) 역시 대동소이하였다. 그리고 최대 결합율과 $400\text{pg}/\text{tube}$ 존재시의 결합율의 차이 즉 결합저해율 또는 displacement (d) 역시 대동소이하나 ficoll을 사용하였을 때가 가장 높은 것을 관찰하였다.

3) pH의 영향 : 완충용액의 pH가 측정의 질에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH 6.5~8.0 사이에서 표준곡선의 변화를 관찰한 결과를 그림 8로 나타내었다. 도표에서 보이는 바와 같이 완충용액의 pH가 7.0일 경우가 가장 좋은 표준곡선을 보이는 한편 pH 6.5 또는

Table 1. Effects of steroid carriers in assay buffer on the dose-response characteristics

	Gelatin	PVP 0.1%	PVP 1%	Ficoll 0.1%	Ficoll 1%
Total cpm	7110.60	7052.6	7052.6	6479.6	6479.6
NSB (%)	2.33	3.26	1.90	3.51	2.73
Bo (%)	51.38	45.06	49.21	54.64	57.68
400pg (%)	7.03	5.71	6.58	6.59	6.34
correlation coefficient(r)	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00
Slope (m)	-2.32	-3.00	-2.37	-2.41	-2.27
intercept (b)	3.77	5.04	3.90	3.53	3.30
displacement (d)	44.35	39.35	42.63	48.05	51.34

* Intercept (b): refers to the point on the logit axis where it is intersected by the regression line. r: correlation coefficient, d: deviation between Bo percentage and the binding percentage in the presence of 400pg /tube of cold standard.

pH 8.0에서는 측정의 질이 다소 낮아지는 것을 관찰하였다.

4. Charcoal 접촉시간과 온도의 영향

항원-항체를 결합시킨 후 자유추적자(free tracer)를 제거하기 위해 charcoal을 사용할 때 charcoal의 항원-항체 결합체와의 접촉시간이 측정의 질에 미치는 영향을 관찰한 결과를 그림 9로 표시하였다.

Charcoal을 넣은 후 5분에 원심분리 시킨 결과 Bo 및 NSB는 현저히 감소하였다. 특히 Bo는 10분 이내에 급작스런 결합체의 분리 및 자유추적자의 흡수를 나타내었고 이후에는 비교적 일정비율로 흡수 및 해리를 유발하는 것으로 나타났다. 또한 charcoal을 넣은 후

37°C로 접촉 온도를 유지시킨 결과 정상적인 유지온도인 0°C로 유지했던 결과에 비해 항원-항체 결합체

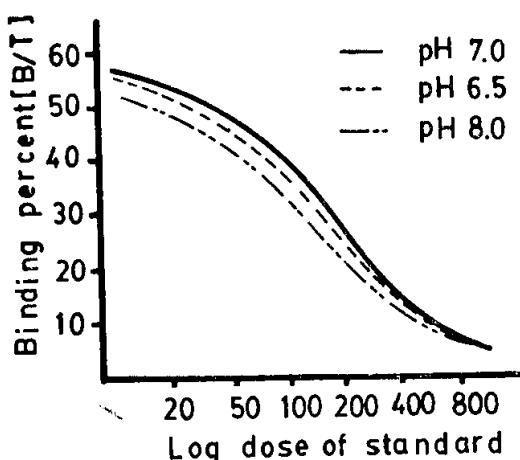


Fig. 8. Effect of pH on the dose-response curve in testosterone RIA. Normal conditions except the pH of assay buffer were performed. All the reagents were dissolved in the same buffer of each pH.

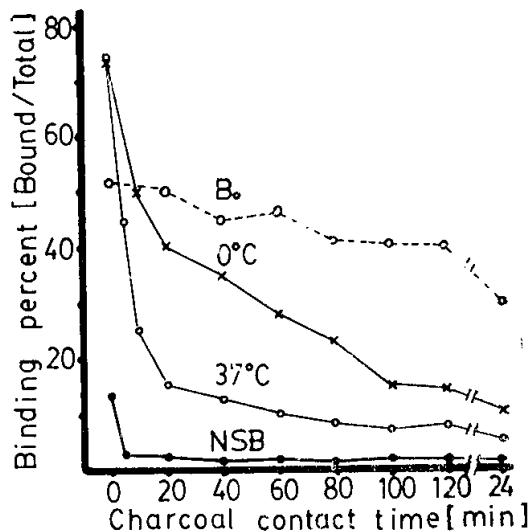


Fig. 9. Effect of charcoal contact time on the efficiency of separation of bound from free testosterone. After the incubation in the presence of charcoal at 37°C (solid line with open circles), or at 0°C (solid line with 'x' marks), the initial binding tubes and nonspecific binding tubes (solid lines with closed circles) were centrifuged at 500g for 10 minutes at 4°C. The dotted line with open circles represents the initial bindings which were obtained from Bo tubes contacting with pelleted charcoal centrifuged at 500g after incubating at 4°C for 15 min in the presence of the suspended charcoal.

—윤용달 등 : Testosterone 방사면역 측정과 한국인 혈청농도—

의 해리가 현저히 증가되었다. 한편 원심분리시킨 후 charcoal을 제거하지 않고 두었다가 일정시간에 분리한 결과 2시간 내에는 해리현상이 비교적 적었으나 24시간 후에는 현저히 증가하였다.

5. 정립된 방사면역 측정법의 특성

위의 실험에서 고려된 측정상의 오차를 최소화함으로 줄인 후 시료내 testosterone의 측정을 위한 기초적인 연구결과는 다음과 같았다.

1) 정확도(Accuracy): 측정의 정확도를 조사하기 위하여 16.11 ± 6.78 pg/tube의 testosterone를 가진 혈청을 12.5 pg/tube에서 400 pg/tube까지의 cold standard를 넣어 잘 섞은 후 testosterone의 농도를 측정한 결과를 표 2에 표시하였다. 기본 시료내에 testosterone 을 50 pg/tube에서 400 pg/tube까지 측정한 경우에는 $96 \sim 104\%$ 사이의 회수율을 보여 매우 정확히 측정되는 반면 저농도에서는 상대적으로 정확성이 저하됨을 관찰하였다.

한편 세계 각국에서 37~60개의 연구실이 같은 시료를 같은 기간내 각기 다르거나 같은 방법으로 측정하여 결과를 비교하는 외부정도관리계획에 참여하여 본 연구기간중의 결과를 비교하여 표 3으로 나타내었다.

본 결과가 제시하는 바와같이 같은 방법이거나 다른 측정방법에 의한 결과는 대동소이하였다. 한편 같은 측정방법을 사용한 연구실들(6~17개)의 결과와 비교하여 보면 측정결과는 80%가 평균값으로부터 1표준편차(± 1 Standard deviation)내에, 100%가 2표준차 내에 포함되었다.

Table 2. Replicated analysis of testosterone concentration added to the serum samples

amount added pg/tube	amount recovered pg/tube	recovery %
400	411.67 ± 55.64	103
200	194.38 ± 10.65	97
100	104.30 ± 10.65	104
50	48.20 ± 4.17	96
25	22.17 ± 3.67	89
12.5	6.79 ± 4.22	54

Absolute amount of cold standard, testosterone, was added to the sample which had the 16.11 ± 6.78 pg/tube of testosterone. The concentrations in the samples were determined five times.

2) 정밀도(Precision): 측정의 정밀도를 구하기 위해 내부정도관리(IQC) 시료를 한번 측정시 (one batch) 25번 중복으로 넣어 측정한 결과 평균 값은 3.63 ± 0.24 ng/ml로 변이 계수는 6.61% 로 나타났다. 정밀도의 내부정도관리를 위해 매회 측정마다 2개의 IQC 시료를 100 tube중 15~20, 43~48, 73~78번 등 3위치에 중복으로 넣어 측정시마다의 변이 즉 측정내변이(within assay variation)과 측정기간중 매 다른 batch에서 넣어 측정하여 측정간의 변이(between assay variation)를 구한 결과를 4표로 표시하였다.

10회의 각 시료 측정에서 IQC 1시료의 측정내변이계수는 13.44 ± 4.98 (범위 $6.59\% \sim 22.44\%$)이었고 IQC 시료의 측정내변이 계수는 12.89 ± 5.23 ($7.50\% \sim 24.16\%$)

Table 3. Results of external quality control in testosterone RIA

회수	All Lab. Results		Same Method		This Study
	n	mean \pm SD	n	mean \pm SD	
1.	37	0.53 ± 0.29	6	0.60 ± 0.35	0.34
2.	41	7.52 ± 1.57	9	7.10 ± 0.58	6.98
3.	46	2.40 ± 0.34	7	2.52 ± 0.34	1.90
4.	46	0.50 ± 0.20	7	0.50 ± 0.24	0.28
5.	49	7.47 ± 1.72	12	6.69 ± 1.69	5.86
6.	58	2.66 ± 0.65	15	2.38 ± 0.55	2.87
7.	53	4.79 ± 1.19	15	4.53 ± 0.85	4.43
8.	53	2.58 ± 0.45	16	2.60 ± 0.41	2.75
9.	59	0.54 ± 0.25	17	0.48 ± 0.17	0.25
10.	60	4.92 ± 1.18	14	5.27 ± 1.08	4.41

In order to compare the results of the same samples, data obtained in the world-wide laboratories were sent to Chelsea Hospital, UK, and computed.

Table 4. Results of precision of testosterone RIA using two internal quality control samples

	IQC 1		IQC 2	
	within assay mean±S.D. (ng/ml)	variation C.V. (%)	within assay mean±S.D. (ng/ml)	variation C.V. (%)
1.	2.17±0.36	16.58	6.64±0.86	12.95
2.	1.96±0.44	22.44	6.67±0.50	7.50
3.	2.03±0.31	15.27	5.44±0.93	17.09
4.	2.36±0.31	13.14	6.80±0.74	10.88
5.	2.84±0.21	7.39	7.01±0.76	10.70
6.	3.64±0.24	6.59	9.30±0.87	9.35
7.	2.83±0.43	15.19	8.07±1.95	24.16
8.	2.91±0.26	8.93	6.59±1.15	17.45
9.	2.85±0.39	13.40	6.80±0.76	11.18
10.	2.91±0.45	15.46	7.15±0.55	7.69
means(ng/ml)	2.62±0.46	13.44±4.78	7.05±1.02	12.89±5.23
Between assay variation C.V. (%)	17.55		14.46	

In order to check the assay precision, two kinds of internal quality control samples were inserted in duplicates, on three positions in every batch.

%)로 비교적 만족할만한 결과를 얻었다. 한편 IQC 1시료의 측정간 변이계수는 17.55%이었고 2시료는 14.46%로 나타났다.

II. 정상 아동과 성인의 혈청내 농도

위의 정립된 방법으로 측정한 한국인 아동과 정상성

Table 5. Normal values in the peripheral sera of normal Korean man

	Age group	n	Dose(ng/ml)	Recovery(%)	Ranges
Prepubertal boy	7—8	17	0.23±1.19	81.92±5.98	0.09—0.88
	8—9	19	0.16±0.08	84.90±6.66	0.09—0.31
	9—10	20	0.14±0.05	79.38±6.80	0.09—0.55
	10—11	20	0.13±0.06	84.5±6.36	0.09—0.17
	11—12	20	0.22±0.14	79.77±4.30	0.10—5.30
	12—13	20	0.22±0.11	85.83±6.36	0.10—3.53
Subtotal		116	0.19±0.13		0.09—5.30
Adult	15—19	5	7.01±2.2	63.22±25.59	6.50—9.55
	20—25	20	7.32±2.54	71.39±19.50	3.63—12.0
	26—30	21	6.26±1.95	72.94±12.42	4.04—9.78
	31—35	29	5.97±2.05	68.71±11.10	3.80—12.0
	36—45	21	6.34±1.60	73.03±13.37	3.14—10.2
	46—50	10	5.65±1.70	74.76±14.83	2.82—5.12
	Subtotal	136	6.85±2.05		2.82—15.41

Data are expressed as the means±S.D.

Table 6. Preliminary summary of the values in the peripheral sera of some pathological conditions in Korean

Group man	n	Values(ng/ml)	Group women	n	Values(ng/ml)
Normal	136	6.85±2.05	Normal	35	0.42±0.07
Sterility	16	3.24±1.26	1° infertility	17	6.10±1.79
Kleinfelter syndrome	7	1.91±1.36	2° infertility	15	0.60±0.16
Poor erection	12	7.16±1.56	1° amenorrhea	15	0.43±0.18
Impotence	18	4.58±1.68	2° amenorrhea	10	0.49±0.34
Azoospermia	9	5.40±2.12	Ovarian dysfunction	14	0.62±0.23
Data are expressed as the means±S.D.					

인 남자의 혈청내 호르몬의 농도를 표 5로 나타내었다. 한국 정상 아동 즉 7~13세 사이의 혈청내 testosterone의 농도는 0.19 ± 0.13 ng/ml이었다. 이들의 범위는 $0.09 \sim 5.30$ ng/ml이었으나 3ng/ml 이상의 아동은 119명 중 4명뿐이었다. 본 연구의 결과로 보아 한국인 국민학교 아동의 95%는 0.45ng/ml이하인 것을 알 수 있었다.

한편 한국인 중 15~50세 사이의 정상 성인 136명의 testosterone의 농도는 6.85 ± 2.05 ng/ml으로서 2.82~12.00ng/ml의 범위내에 있고 2.75~10.95ng/ml 사이에 존재하는 사람은 95%에 해당되었다.

불임 및 생식 생리학적인 병인을 가진 환자의 혈청내 testosterone의 농도를 측정한 결과를 표 6으로 나타내었다. 남성 불임환자의 혈청내 농도는 3.24 ± 1.26 , 열색체 검사에 의해 Kleinfelter syndrome으로 판정받은 (15~20세) 환자의 농도는 1.91 ± 1.36 으로 나타났다. 한편 impotence나 azoospermia 환자의 혈청내 testosterone의 수준은 정상수준에 의해 subnormal range에 있었다. 그러나 poor erection을 호소한 환자의 혈청내 testosterone의 농도는 7.16 ± 1.56 ng/ml로 정상 범위에 있었다.

한국인 중 가임 정상 여성의 혈청내 testosterone의 농도를 조사한 결과 0.42 ± 0.07 ng/ml이었고 secondary infertility 및 ovarian dysfunction 환자의 혈청내 농도는 정상에 비해 다소간 높은 경향을 나타내었다.

그러나 amenorrhea 환자의 경우는 정상과 차이가 없었다. 한편 primary infertility 환자의 혈청내 농도는 정상에 비해 매우 헌지히 높았다 ($P < 0.001$).

논 의

I. 방사면역 측정법의 정립

최근 방사면역 측정법이 1960년대 초반부터 발전을 거듭하여 생의학 분야 특히 내분비학 분야의 연구 방

법의 주종을 이루게 되었다. 이 방법이 비교적 실험실에서 용이하게 이용될 수 있고, 자료 및 방법을 자동화(automation)하기 쉬우며 고도로 특이성을 갖고, 정밀 정확하며, 매우 간단한 방법으로 알려져 왔으나 경비가 많이 들고, 특수 계기가 요구되며, 시약등의 정제가 비교적 어렵다는 것이 단점으로 지적되어 왔다(Cameron et al., 1975). 또한 현재 개발된 많은 방법들은 각 연구실 사정에 따라 여러가지 측정치의 번이를 나타내는 것이 발견되고 있다.

방사면역 측정법을 이용하여 호르몬을 측정하는 방법은 다음 3가지에 의해 그 질이 좌우된다. 즉 1) 표준시약, 항체 그리고 방사성 추적자 등 제 1차적 주요 시약들의 질적인 문제와 이를 상호간의 작용에 관한 문제, 2) 제 2차적인 시약들 즉 완충액이나 항원-항체의 결합체와 자유 항원의 분리에 이용되는 시약들, 3) 각 연구실에서 사용되는 측정용 기구의 정확도 또는 방법상의 문제들로 나누어 생각할 수 있다.

우선적으로 한 호르몬의 측정 방법을 정립하기 위해 시는 표준화가 잘된 시약의 사용이 필수적이며, 현재 많은 표준화된 상업용 시약(Hopkins et al., 1977) 및 세계보건기구에서 공급하는 표준화된 시약(WHO Matched Reagent Programme, WHO Technical Report Series, No. 565, 1975; 동책자 No. 578, 1975) 등을 손쉽게 획득할 수 있어 문제의 해결이 손쉽게 되었다. 그러나 같은 시약을 이용하더라도 여러 연구실이 동시에 측정하는 EQC 결과에서 보여지는 바와 같이 각 연구실의 측정치가 서로 다르다.

이것은 여러가지 제 2차적인 시약 및 측정조건이 항원-항체의 결합에 어떤 영향을 일으키는 결과로 사료된다. 우선적으로 적정 항체의 회색농도를 구하는 과정에서 항원-항체 결합체와 자유 항원과의 분리방법은 항체의 특성에 주요한 영향을 미친다(Odell et al.,

1975). 즉 본 실험에서 다량의 charcoal을 쓸 경우 고농도의 항체량이 필요한 것이 입증되었다. 이는 항원-항체의 결합이 charcoal의 흡수로 인하여 해리되기 때문으로 사료된다. 이외에도 anti-steroid anti-sera의 특성과 결합력 등은 항체를 얻기 위한 면역기간 및 개체의 변이, tracer에 부착시킨 방사선 물질의 종류 (^3H , ^{125}I , ^{131}I) 및 방사선량 등에 따라 영향을 받는다 그리고 항원-항체 결합을 위한 완충용액의 온도, pH, ionic strength 등이 영향을 주는 요소로 고려되고 있으나 체계적인 연구는 아직까지 없었다(Abraham, 1975). 부가하여 항체를 완충용액에 장기간 보존하는 것은 완충액 자체의 변질인지 또는 항체의 변질인지는 불분명하더라도 측정의 질에 다소간 변동을 유발하는 것이 본 실험의 결과로 알 수 있었다. 또한 본 실험에서는 방사성 추적자의 순수도가 측정의 전에 영향을 주는 요소가 됨을 알 수 있었다. 특히 순수정제하지 않은 추적자가 자연상태에서의 해리 및 봉괴로 인해 비특이성 결합(non-specific binding)을 증진시키는 것을 관찰하였다. 이는 특정 항체 자체가 방사선 추적자 ^3H 의 위치에 따라 그 결합도가 달라진다는 보고가 있는 것으로 보아(Jeffcoate et al., 1975), 봉괴 또는 해리된 추적자의 수가 많아져 항원-항체결합율이 낮아지기 때문인 것으로 사료된다. 이는 본 실험에서 column chromatography로 분리시 적정분획이외의 분획에서 얻은 추적자가 측정의 질을 낮추는 것으로 보아서도 입증된다고 사료된다. 완충용액의 ionic strength, steroid carrier, pH의 영향 등을 조사한 본 연구의 결과로 보아서도 이들이 측정의 질에 주요한 영향을 주는 것을 볼 수 있었다. 즉 ionic strength가 높아짐에 따라 저농도의 측정은 질이 떨어지고, 완충용액내 BSA나 PVP 같은 steroid hormone의 지지체는 항원-항체의 결합을 일부 저해하는 것을 발견하였다. 또한 각 호르몬 측정의 적정 pH를 유지하는 것이 필요함을 알 수 있었다.

또한 방사면역 측정방법의 전을 좌우하는 주요한 과정은 항원-항체의 결합체와 자유항원을 완전히 분리하는 과정이라 할 수 있다(Collins et al., 1975). Charcoal은 steroid hormone의 측정에서 일반적으로 사용되나 본 실험의 결과에서 나타난 바와 같이 자유항원의 흡수력은 charcoal과 결합체 및 자유항원의 접촉시간 및 온도에 따라서 매우 큰 영향을 받는 것을 관찰할 수 있었다. 본 실험의 결과로 원실분리한 후의 charcoal의 영향이 감소한다 하더라도 가능한 짧은 시간에 상동액을 분리해내는 것이 측정의 질을 높이게 되는 것을 알 수 있었다. 그러므로 분리된 상동액을 신

속히 counting vial에 decanting하여 끓기는 것이 측정의 질을 높이는 것으로 사료된다. 그리고 본 실험의 결과로 보아 방사선량의 측정시 최대선량을 측정하는 scintillation fluid의 양 및 준비후 측정시 까지의 시간, quenching agents의 제거, 또한 적절한 측정용 시약의 배합이 최대 방사선량을 측정하기 위해 고려되어야 할 요소임을 알 수 있었다.

이들 이외에도 측정하는 사람의 습관 및 정신적 상태, 피펫이나 듀브등 사용하는 기구 및 방법상에서 오는 오차를 고려할 수 있고, 특히 방사선을 측정하는 beta-counter의 사용법에 따른 오차를 고려할 수 있다 그리고 측정 결과를 계산하는 과정에서 역시 많은 오차를 낼 수 있다는 것이 알려져 왔다(Collins et al., 1972; Rodbard and Hutt 1974). 그러므로 위의 결과를 종합하여 볼 때 각 연구실 내의 체계적인 오차(systemic error) 외에 무작위적인 오차(random error)들을 최소화 감소시키는 노력이 필요하며, 각 연구실이 본 연구와 같이 측정방법의 정립 및 정도관리를 실시해야 한다고 사료된다.

본 연구에서 정립시킨 testosterone의 방사면역 측정법으로 IQC 및 EQC시료내 호르몬의 양을 측정하여 정도관리를 실시한 결과가 타연구실의 결과와 비교해 볼 때, 본 측정방법은 혈청 testosterone의 측정에 매우 양호한 방법으로 사료된다.

II. 한국인 아동과 정성성인의 혈청내 농도

한국인 국민학교 학생의 혈청내 testosterone의 농도는 $0.19 \pm 0.13 \text{ ng/ml}$ (범위 $0.13 \pm 0.06 \sim 0.23 \pm 0.19$)이다. 이 농도는 Horst et al. (1977)이 같은 나이군, 즉 0.5~9세 사이에서 $0.22 \pm 0.05 \sim 0.43 \pm 0.21 \text{ ng/ml}$ 의 범위내 존재하다는 보고나, 사춘기 이전 즉 Tanner's genital size G1 (1.5cc까지)이하의 소년이 0.87 ng/ml 이라는 Lee et al.(1974)의 보고보다는 낮았다. 그러나 Finkelstein(1980)은 G1 stage에서 $0.1 \pm 0.01 \text{ ng/ml}$ 로 보고하고 있고, Nieschlag(1975) 역시 0.1 ng/ml 이하로 보고하고 있어 본 결과와 비슷한 수치를 제시하고 있다. 위의 결과로 보아도 혈청내 호르몬량의 측정에는 매우 상이한 결과를 제시할 수 있으므로 매우 산정도관리된 방법에 의해 측정하여야 함을 알 수 있다.

한편 정상 성인 남자 testosterone의 혈청농도는 $6.85 \pm 2.05 \text{ ng/ml}$ (범위 : $2.82 \sim 15.4$)로 타 연구자들의 보고가 평균값이 5.89 ± 2.19 에서 $7.59 \pm 2.6 \text{ ng/ml}$, 또 한 정상범위가 $2.51 \sim 11.0 \text{ ng/ml}$ 임으로, 본 연구에서 $2.75 \pm 10.90 \text{ ng/ml}$ 을 정상범위(95%범위)로 보는 것이

타당한 것으로 사료된다(Dufau, 1972; Reinburg, 1975; Pirke and Doerr, 1975; Ismail et al., 1972; Anderson et al., 1975; Corker and Davidson, 1978).

한편 상업적인 kit로서 측정되어 보고되는 정상치 및 범위와 본 연구의 결과를 비교하면 대부분의 kit가 3ng/ml이상에서 12.0ng/ml을 정상치의 범위로 보고하고 있어(Hopkins, 1977) 본 연구의 결과와 일치한다는 것을 알 수 있었다. 그러므로 본 연구의 결과로 한국인 정상남성의 혈청내 testosterone의 농도는 3~11ng/ml로 보는 것이 타당하겠다.

한편 정성월경주기를 가진 서양 여성의 혈청내 testosterone의 농도를 보면 276.26 ± 34.49 pg/ml에서 540 ± 220 pg/ml 수준임을 보고하고 있다(Dufau et al., 1972; Dawood and Saxena, 1976; Tyler et al., 1975). 본 연구의 결과에 의하면 한국인 정상여성의 평균 혈청testosterone농도는 420 ± 70 pg/ml이 있다.

또한 최근 상업적인 kit의 정상치 범위 역시 100~700pg/ml로 보고하고 있다.(Hopkins et al., 1977). 그러므로 280~640pg/ml(95% confidence level)를 한국인의 정상범위로 보는 것이 타당하다고 사료된다.

총괄

혈청내 testosterone의 측정을 위한 간접하고도 신뢰도 있는 방사면역측정법을 개발하기 위하여 분석결과의 질에 영향을 주는 분석완충액의 이온강도, pH 및 steroid carrier, charcoal처리시간 및 온도 등의 여러 요인들을 조사하였다.

또한 내부 및 외부 정도판리 결과로써 본 분석방법의 정확도 및 정밀도를 평가하였다.

본 분석방법에 의한 한국인 정상성인 남자의 정상치는 6.85 ± 2.05 ng/ml로 연령에 따른 변화는 유의하지 않았으며 사춘기전의 소년들에 있어서 평균치는 0.19 ± 0.13 ng/ml, 정상여성의 평균치는 420 ± 70 pg/ml이었다.

—ABSTRACT—

Testosterone Radioimmunoassay and Serum Levels in Korean Children and Adult Males

Yong Dal Yoon, Eung Ik Kim,
Pan Gil Suh, Jung Ho Han
and Bum Suk Tchai,

The Institute of Reproductive Medicine and Population, College of Medicine, Seoul National University

In order to improve a simple and reliable radioimmunoassay method for the determination of testosterone in human serum, various factors affecting the assay quality were investigated: the purity of tracer; ionic strength; pH and steroid carriers of buffer solution; and the contact time and temperature of charcoal with antigen-antibody complex etc.

The present method was evaluated in terms of accuracy, precision and the results of internal and external quality control.

The concentrations (mean \pm SD) of testosterone in serum from 136 healthy normal men (aged 15~50yr) and from 116 prepubertal boys (aged 7~13yr) were 6.85 ± 2.05 ng/ml and 0.19 ± 0.13 , respectively. There were no significant changes in the serum levels as the age was increased in each group. The concentration from 35 normal ovulatory women was 420 ± 70 pg/ml. These values were compared with the results of other investigators and those from several commercial kits.

REFERENCES

- Aafjes, J.H., van der Vijver, J.C.M., Docter, R. and Schenck, P.E.: *Serum gonadotrophins, testosterone and spermatogenesis in subfertile men*. Acta Endocrin., 86: 651-658, 1977.
Abraham, G.E.: *Characterization of anti-steroid antisera*. In: *Steroid Immunoassay*. pp. 67-78, (Eds) E.D.H. Cameron, S.G. Hillier and K. Griffiths. Alpha Omega Publishing Ltd. 1975.
Andersen, P.H., Fukushima, K. and Schiller, H.S.: *Radioimmunoassay of plasma testosterone with use of polyethyleneglycol to separate anti-bound and free hormone*. Clin. Chem., 21: 708-714, 1975.
Auletta, F.J., Caldwell, B.V. and Hamilton, G.L.: *Androgens: Testosterone and dihydrotestosterone* In: "Methods of hormone radioimmunoassay" pp. 359-370, (Eds) B.M. Jaffe and H.R. Behrman. Academic Press, 1974.
Bardin, C.W. and Santen, R.J.: *Androgen assay in*

- blood and other biological fluids.* In: "Steroid Hormones". pp.52-70, (Eds) R.I. Dorfman. North-Holland Publishing Co., 1975.
- Cameron, E.H.D., Miller, S.G. and Griffiths, K.: *Steroid Immunoassay.* Alpha Omega Pub. Ltd., 1975
- Collins, W.P., Barnard, G.J.R. and Hennam, J.F.: *Factors affecting the choice of separation technique.* In: *Steroid Immunoassay* pp.223-228, (Eds) E.D.H. Cameron, S.G. Hillier and K. Griffiths. Alpha Omega Publishing Ltd., 1975.
- Collins, W.P., Mansfield, M.D., Alladina, N.S. and Sommerville, I.F.: *Radioimmunoassay of plasma testosterone.* J. Steroid Biochem., 3: 333-348, 1972.
- Corker, C.S. and Davidson, D.W.: *A radioimmunoassay for testosterone in various biological fluids without chromatography.* J. Steroid Biochem., 9: 373-374, 1978.
- Dewood, M.Y. and Saxena, B.B.: *Plasma testosterone and dihydrotestosterone in ovulatory and anovulatory cycles.* Am. J. Obstet. Gynecol., 126:430-435, 1976.
- Dufau, M.L., Catt, K.J., and Tasuruhara, T.: *Radioimmunoassay of plasma testosterone.* Clin. Chim. Acta, 37: 109-116, 1972.
- Finkelstein, J.W.: *The endocrinology of adolescence.* Ped. Clin. North Amer., 27: 53-69, 1980.
- Heftman, E.: *Chromatography of steroids.* Else Scientific Publishing Co., 1976.
- Hopkins, J.A.C., Edwards, L., Herner, A.E. and Dreal, P.V.: *The chemist's guide to radioassay products.* Clin. Chem., 23: 405-446, 1977.
- Horst, H.J., Bartsch, W. and Dirksen-Thens, I.: *Plasma testosterone sex hormone binding globulin binding capacity and percent binding of testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone in prepubertal, pubertal and adult males.* J. Clin. Endocrinol. Metab., 45: 522-527, 1977.
- Illig, R., Torresani, T., Bucher, H., Zachmann, M. and Prader, A.: *Effect of intranasal LHRH therapy on plasma LH, FSH and testosterone, and relation to clinical results in prepubertal boys with cryptorchidism.* Clin. Endocr., 12: 91-97, 1980.
- Ismail, A.A.A.: *Testosterone.* In: "Hormone assays and their clinical application." pp.580-629, (Eds) J.A. Loraine and E.Y. Bell, Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York., 1976.
- Ismail A.A.A., Niswender, G.D. and Midgley, A.R.: *Radioimmunoassay of testosterone without chromatograph.* J. Clin. Endocr. Metab., 34: 177-184, 1972.
- Jeffcoate, S.L., Edwards, R., Gilby, E.D. and White, N.: *The role of (³H)-labelled ligands in steroid radioimmunoassay.* In: "Steroid Immunoassay." pp. 133-140, (Eds) E.D.H. Cameron, S.F. Hillier and K. Griffiths. Alpha Omega Publishing Ltd., 1975.
- Lee, P.A., Jaffe, R.B. and Midgley, A.R. Jr.: *Serum gonadotropin, testosterone and prolactin concentrations throughout puberty in boys: A longitudinal study.* Clin. Endocrinol. Metab., 39: 664-672, 1974.
- Lewis, J.G., Ghanadian, R. and Chisholm, G.D.: *Serum 5 alpha-dihydrotestosterone and testosterone changes with age in man.* Acta Endocr., 82: 444-448, 1976.
- Lorain, J.A. and Bell, E.Y.: *Hormone assays and their clinical application.* Churchill Livingstone, Edinburgh, London, and New York., 1976.
- Nieshlag, E.: *Radioimmunoassay for plasma testosterone.* In: "Radioimmunoassay of steroid hormones." pp.83-90, (Eds) D. Gupta. Verlag Chemie, GmbH., 1975.
- Odell, W.D., Silver, C. and Grover, P.K.: *Competitive protein binding assays; methods of separation of bound from free.* In: "Steroid Immunoassay." pp.207-222, (Eds) E.D.H. Cameron, S.H. Hillier and K. Griffiths. Alpha Omega Publishing Ltd., 1975.
- Pakarinen, A., Hammond, G.L. and Vihko, R.: *Serum pregnenolone, progesterone, 17 alpha-hydroxy-progesterone, androstenedione, testosterone, 5 alpha-dihydrotestosterone and androsterone during puberty in boys.* Clin. Endocr., 11: 465-474, 1979.
- Pirke, K.M. and Doerr, P.: *Age related changes in free plasma testosterone, dihydrotestosterone and oestradiol.* Acta. Endocr., 80: 171-178. 1975.
- Pirke, K.M., Doerr, P., Sintermann, R. and Vogt, H.J.: *Age dependent of testosterone precursors in plasma of normal adult males.* Acta Endocr., 86: 415-429, 1977.
- Reinberg, A., Lagoguey, M. Chauffournier, J.M. and Cesselin, F.: *Circannual and circadian rhythms in plasma testosterone in five healthy young parisian males.* Acta Endocr., 80: 732-748, 1975.

—윤용달 등 : Testosterone 방사면역측정과 한국인 혈청농도—

Rodbrd, D. and Hutt, D.M.: *Statistical analysis of radioimmunoassays and immunoradiometric assays; a generalized, weighted, iterative, least-squares method for logistic curve fitting.* In: "Radioimmunoassay and related procedures in medicine." vol. 1, pp. 165-192. *Proc. symposium, Istanbul, 10-14, 1973. Intern.*

Atomic Energy Agency, Vienna, 1974.

Tyler, J.P.P., Newton, J.R. and Collins, W.P.: *Variations in the concentration of testosterone in peripheral venous plasma from healthy women.* *Acta Endocr., 80:* 542-550, 1975.