● 原著

直接クームス試験陰性の全身性エリテマトーデス患者 における赤血球結合 IgG の高感度定量

鉢村 和男・内山 幸信・大谷 英樹*

Jpn. J. Clin. Immun., 22 (2) : 63~71, 1999.

A sensitive enzyme immunoassay for the measurement of small quantities of erythrocyte-associated IgG in patients with systemic lupus erythematosus who had negative direct antiglobulin test

Kazuo Hachimura, Yukinobu Uchiyama and Hideki Ohtani*

*Department of Clinical Technology, Kitasato University School of Allied Health Sciences and Clinical Pathology, Kitasato University School of Medicine**

【Summary】

To measure the amount of erythrocyte-associated IgG (EAIgG) molecules from 70 patients with systemic lupus erythematosus (SLE) who had negative direct antiglobulin test (DAT), we employed a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique. Ninety-five percent of healthy individuals were less than 65 molecules of EAIgG per red cell (RBC). About 51 percent of these patients with SLE were positive (over 65 molecules of EAIgG per RBC) by this technique that showed more sensitive than the DAT. EAIgG levels of these patients were inversely proportional to RBC count ($r = -0.369$, $p < 0.005$), and EAIgG positive patients were recognized by 88 percent in patients group who were less than $4 \times 10^6 / \mu\text{l}$ RBC counts. These results suggest that even a few EAIgG, as of a DAT shows negative, are related to the catabolism of erythrocytes in patients with SLE.

EAIgG determination value in this method calculated and converted with CRM 470 that is the IFCC international reference preparation for plasma protein.

Key words : erythrocyte-associated IgG (EAIgG),
direct antiglobulin test (DAT),
enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),
systemic lupus erythematosus (SLE),
CRM 470 (IFCC international reference)

【概 要】

直接クームス試験 (DAT) が陰性の全身性エリテマトーデス (SLE) 患者 70 例, 健常者 98 例について, 酵素抗体法を用い赤血球結合 IgG (EAIGG) を測定した。SLE 患者群は健常者群と比較し有意に EAIGG が高値であった。健常者の 95% は EAIGG が 65 分子/RBC 未満であり, この値以上を EAIGG 陽性とする, SLE 患者 70 例のうち 36 例 (51.4%) が陽性であった。また, EAIGG 量と赤血球数とは逆相関 ($r=-0.369$, $p<0.005$) し, 赤血球数が $4\times 10^6/\mu l$ 未満の患者群では, その 88% が EAIGG 陽性であった。以上の結果から, SLE 患者赤血球には, DAT が陰性であっても健常者と比較し多くの EAIGG が結合しており, 赤血球の異化の亢進に関与することが示唆された。

I. はじめに

抗赤血球自己抗体の検出法として通常 DAT が用いられ, 自己免疫性溶血性貧血 (AIHA) の診断に不可欠である。SLE では抗核抗体をはじめ種々の自己抗体が産生され, 抗赤血球抗体もそのひとつであり, ARA の SLE 診断基準に溶血性貧血も挙げられている¹⁾。またヒト赤血球膜上には補体レセプター type 1 (CR1) が存在し, 流血中の免疫複合体 (CIC) が増加する SLE 患者²⁾では, CIC が CR1 を介して赤血球に結合していると考えられている³⁾。これらの要因により, SLE 患者の赤血球膜上には多くの EAIGG が結合している可能性があるにもかかわらず, DAT の陽性率は必ずしも高くない⁴⁾。

一方, 微量 EAIGG の検出に ELISA が有用であることが報告され, 我々も輸血検査用抗 D 血清から分離した IgG を検量用標準品として用い, 新たな ELISA を開発した。今回, 本法を用いて DAT 陰性 SLE 患者の EAIGG 定量を試み, 同時に測定した赤血球数および CIC との関連性について検討した。また, DAT の陰・陽性を分ける境界点の EAIGG 量を求め, DAT の結果解釈に関する留意点および EAIGG の本体について考察した。

II. 対象および方法

1. 対 象

SLE と診断され, 北里大学病院膠原病内科外来において治療, 観察中の DAT 陰性 70 例を対象とした。また, SLE 患者のうち DAT 陽性 (1+) 10 例, 弱陽性 (weakly-positive) 8 例についても同様に測定した。健常者は, 検診目的で提出され, かつ血液所見に異常が認められなかった 98 例を用いた。採血はすべて EDTA-2K で行い, EAIGG, DAT とも当日中に

測定した。DAT には広範囲クームス血清 (Ortho) を用いた。

2. 方 法

1) 検量線用抗 D 抗体解離液の作成と力価測定

市販の抗 D ヒト血清 (Ortho) を生食で 25 倍希釈し不活化したものと, 輸血用 O 型赤血球の生食 10% 浮遊液とを等量混合し, 37°C, 2 時間静置した。感作終了後, Rubin の方法⁵⁾により抗 D 抗体解離液を得た。解離液は小分け分注し, 使用時まで -70°C で凍結保存した。

この解離液の力価を間接クームス試験で求めた。すなわち, Rh (D) 陽性の輸血用 O 型赤血球を 10 名分ブールし生理食塩水で 2% に調整したものの 50 μl と, Geratin Veronal Buffer (GVB) pH 7.5 (協和薬品) で 2 倍段階希釈した抗 D 抗体解離液を 100 μl 加え, 37°C, 90 分間静置した。生食で 4 回洗浄後, クームス血清で (1+) を示す最高希釈倍数を解離液の力価 (単位) とした。

2) 抗 D 抗体液の IgG 濃度

抗 D 抗体解離液中の IgG 濃度は, 我々が報告した ng レベルまで測定可能な ELISA⁶⁾を用いて測定した。IgG 標準血清は N-蛋白標準血清 (ヘキスト) を使用した。

3) EAIGG の定量

a. 検量線の作成

① 輸血用 O 型赤血球を 10 名分ブールし, 生食にて 3 回洗浄後, 試験管あたり 2.5×10^8 個に調整したものを 8 本用意した。② GVB で 4 単位から 2 倍段階希釈した抗 D 抗体解離液を 500 μl 加え (Blank 用として 1 本は GVB のみを加える), 37°C, 90 分間静置した。③ 生食で 4 回洗浄後, GVB で 1000 倍希釈した抗ヒト IgG-Alp 標識抗体 (TAGO # AHI-0305) を

500 μ l 加え、室温で 60 分間静置した。④ 生食で 4 回洗浄後、基質液 (1.0 mg/ml p-Nitrophenyl Phosphate in 0.1 M Glycine buffer pH 10.4, containing 0.001 M $MgCl_2$ and 0.001 M $ZnCl_2$) を 250 μ l 加え、室温で 60 分間静置した。⑤ 2,500 回転 5 分間遠心後、上清 100 μ l を平底マイクロプレートに移し、1N-NaOH を 100 μ l 加え攪拌した。⑥ マイクロプレート用比色計を用いて、波長 405 nm にて比色し検量線を作成した。

b. 検体の測定

① 赤血球を試験管あたり 2.5×10^8 個に調整した。これを 1 検体あたり 2 本準備した。② 検量線の作成 ③ より同様の操作を行った。ただし、1 本は抗ヒト IgG-Alp 標識抗体のかわりに GVB を 500 μ l 加え、検体 Blank とした。③ 2 本を比色後、検体 Blank を差し引いた吸光度で検量線から EAIgG 量を求めた。

4) 再現性および希釈試験

EAIgG 量の異なる 3 検体について、同時および日差再現性を検討するため各々 10 回測定し変動係数を求めた。また、検体血球を GVB で 2 倍段階希釈を行い直線性を確認した。

5) 赤血球および CIC の測定

赤血球数は自動血球計算機 Sysmex CC-780 (東亜医用電子) により、CIC は Clq 固相法を原理とするサンアッセイ IC²⁾ (三光純薬) により測定した。

3. 統計的検討

EAIgG の基準値は、健常者 98 例の測定結果からノンパラメトリック法 (集団の上方 5% を基準外とする 95% タイル値を上限とした) により求めた。また、DAT 陰性 SLE 患者と DAT 陽性検体および健常者の EAIgG 量の比較は、Student の t 検定を行い有意水準 5% で差を判定した。

III. 結 果

1. 抗 D 抗体液の力価および IgG 濃度

解離液を用いて間接クームス試験を行うと 128 倍まで陽性であった。この結果より、原液の 128 倍希釈液を 1 単位、以下順次 2 倍段階希釈したものを 0.5 単位、0.25 単位…、とした。

解離液中の IgG 濃度は、6.8 μ g/ml であった。得られた定量値を血漿蛋白国際標準品 CRM 470⁷⁾ を基にした IgG 濃度 (IFCC 単位) に換算すると、5.78 μ g/ml であった (IgG factor : 0.85)⁸⁾。

2. 抗 D 抗体感作時間の検討

解離液中の抗 D 抗体 (IgG) がすべて赤血球に結合しなければ正確な定量値が得られないため、感作に必要な最適時間について time course をとり検討した (図 1)。0.25 単位以上では 30 分である程度抗体が結合するが、0.125 単位以下ではまだ反応がみられない。4 単位は 60 分、2 単位は 90 分で最高点に達し、その後吸光度の減少がみられた。0.5 および 1 単位は 90 分でほぼ平衡に達しているため、感作最適時間は 90 分とした。

3. 標準曲線と定量可能域

抗 D 抗体感作時間 90 分で作成した標準曲線を図 2 に示した。2 単位から 0.25 単位まではほぼ直線で、0.25 単位以下はなだらかな曲線となった。4 単位では、抗体の解離とみられる吸光度の減少が感作時間の検討時に認められたことから、2 単位以下が本法の定量可能域と判断した。

4. 再現性、希釈試験

同時・日差再現性の成績を表 1 に示した。低濃度試料の日差再現性で、CV 13.5% と若干のバラツキを認めたが、他は 3.33~9.55% と満足できる結果であった。また、表 2 に示す希釈試験においても、低値傾向は認められるものの、ほぼ満足できる結果が得られた。

5. 健常者、DAT 陰性 SLE 患者、および DAT 陽性検体の EAIgG

健常者、DAT 陰性 SLE 患者、DAT 弱陽性および陽性検体の EAIgG 測定結果は、各々 0.07 ± 0.06 , 0.24 ± 0.20 , 0.73 ± 0.20 , 1.12 ± 0.24 単位 (平均値 $\pm$ 標準偏差) であった (図 3)。

健常者 98 例の測定結果から、ノンパラメトリック法で求めた基準値上限は 0.19 単位であり、0.20 単位以上を陽性とする、SLE 患者では 70 例中 36 例 (51.4%) が陽性であった。DAT 陽性検体 10 例および弱陽性検体 8 例は、全例が本法で陽性を呈し、健常者群、DAT 陰性 SLE 患者群と比較し明らかな高値を示した。また、4 群間でも互いに有意な差が認められた。

Fig. 1 Kinetics of anti-Rh (D) antibodies binding to RBC

Anti-Rh (D) antibody eluate was used as EAIgG and we defined the minimum EAIgG volumes that a DAT had positive as one unit in this method. Seven EAIgG calibrators were given for each time-course curve.

Fig. 2 Typical calibration curve of assay for EAIgG by ELISA

Table 1 Intra-and Interassay precision of EAIgG

sample	Intraassay precision			Interassay precision		
	1	2	3	1	2	3
n	10	10	10	10	10	10
mean (unit)	0.22	0.51	0.90	0.23	0.53	0.89
SD*	0.021	0.032	0.030	0.031	0.048	0.053
CV** (%)	9.55	6.27	3.33	13.5	9.06	5.96

* SD : standard deviation ** CV : coefficient of variation

Table 2 Dilution test of EAIgG for accuracy

dilution	1/8	1/4	1/2	1/1
1	0.14	0.25	0.53	1.03
2	0.11	0.21	0.50	1.10
mean (practical value) (unit)	0.125	0.230	0.515	1.065
theoretical value (unit)	0.133	0.266	0.533	1.065
recovery (%)	93.9	86.4	96.7	—

6. DAT 陰性 SLE 患者における EAIgG と RBC および CIC との相関

今回 EAIgG を測定した DAT 陰性 SLE 患者 70 例について、EAIgG と RBC および CIC との相関分析を行った (図 4, 5)。相関係数は、各々 -0.369 ($p < 0.005$), $+0.346$ ($p < 0.005$) であり、EAIgG は RBC とは負の、CIC とは正の、それぞれ弱いながらも有意な相関が認められた。

7. DAT 陰・陽性境界点の EAIgG 量

Rubin の方法により得た抗 D 抗体解離液中の IgG は、赤血球に抗 D 抗体を感作し、反応しない IgG を十分に洗浄した後に解離したものであるため、すべて抗 D 活性を有するものと考えられる。解離液原液中の IgG 量は $5.78 \mu\text{g/ml}$ であり、DAT 陰性と陽性を分ける境界点 (本法での 1 単位) の IgG 量を次のように求めた。

① 解離液原液 $500 \mu\text{l}$ 中の IgG 量は、

$$5.78 (\mu\text{g/ml}) \div 2 = 2890 (\text{mg})$$

② 解離液原液の間接クームス試験の力価が 128 であるため、解離液 128 倍希釈液 $500 \mu\text{l}$ 中の IgG が 2.5×10^8 個の赤血球に結合している。したがって本法 1 単位の IgG 量は、

$$2890 \div 128 = 22.58 (\text{ng}) / 2.5 \times 10^8 (\text{個})$$

③ 赤血球数を 1×10^{10} 個に換算すると

$$22.58 \times 40 = 903.2 (\text{ng}) / 10^{10} (\text{個})$$

④ アボガドロの法則から IgG は 6×10^{23} 分子の重量が $1.6 \times 10^{14} \text{ ng}$ である。したがって、IgG 903.2 ng の分子数 (X) は、

$$6 \times 10^{23} : 1.6 \times 10^{14} = X : 903.2$$

$$X = 3.4 \times 10^{12} (\text{分子}) / 10^{10} (\text{個})$$

⑤ 赤血球 1 個あたりの EAIgG 分子数は

$$(3.4 \times 10^{12}) \div 10^{10} = 340 (\text{分子})$$

以上から、1 単位の EAIgG は約 $900 \text{ ng} / 10^{10} \text{ RBC}$, $340 \text{ 分子} / \text{RBC}$ であった。しかし、厳密にはクームス試験の陽性と陰性を分ける境界点は 1 単位から 0.5 単位の間に存在する (標準曲線作成時 2 倍段階希釈を用いたため)。そのため、抗 D 抗体解離液を 1 単位から 0.1 単位おきに 0.5 単位まで調整し間接クームス試験を行ったところ、0.9 単位まで陽性、0.8 単位が weak、0.7 単位以下は陰性であった。つまり、DAT の陰・陽性境界点は 0.9 単位であり、EAIgG 量は、
 $903.2 \times 0.9 = 813 (\text{ng}) / 10^{10} \text{ RBC}$,
 $340 \times 0.9 = 306 (\text{分子}) / \text{RBC}$
 であった。

IV. 考 察

従来の DAT は簡便でどこ施設でも行えるため、EAIgG 検出の標準法として広く普及している。しかし、赤血球の凝集状態を肉眼的に判定することから客観性に乏しく、弱い凝集では判定に迷うことが少なくない。

一方、EAIgG の検出に感度および定量性に優れた ELISA が報告⁹⁻¹¹⁾され、我々は特に DAT の検出限界付近の精密測定に有用と考え本法を応用した。

本法による基準値上限は 0.19 単位であるから、EAIgG 量は $172 \text{ ng} / 10^{10} \text{ RBC}$, $65 \text{ 分子} / \text{RBC}$ となる。DAT 陰・陽性境界点と健常者の EAIgG について既報告と比較したものを表 3 に示す。今回の結果は Bodensteiner ら⁹⁾の報告とほぼ同様であった。山田ら¹⁰⁾, Sokol ら¹¹⁾は、やや低値の報告をしている。報

Fig. 3 Distribution of EAIgG values in healthy controls, DAT negative SLE and DAT positive patients

告値の異なる原因として、クームス血清や検量用標準 IgG が異なること、クームス試験判定時の主観的差異などが考えられた。

DAT 陽性検体 10 例および弱陽性検体 8 例は本法でもすべて陽性を示し、本法の定量性、信頼性が確認できた。加えて再現性、希釈試験もほぼ問題なく、異常抗体スクリーニングや交差適合試験にも、高感度で客観的な検査法として応用可能と考えられる。

SLE 患者の DAT 陽性頻度は、診断時で約 20% に認められるが⁴⁾、本法では DAT 陰性の SLE 患者において 51.4% が陽性を呈した。これは、本法の陽性感度が従来の DAT より約 5 倍（陽性境界点が DAT は EAIgG 0.9 単位、本法は 0.19 単位）高いためであり、SLE 患者の多くに従来の DAT では検出できない微量 EAIgG の結合を認めた。今回の対象は DAT 陰性の SLE 患者であり、活動期を含めた SLE 患者全体を対象とした場合は、陽性率がより高くなるのは確実である。

Gilliland ら¹²⁾は補体を利用した方法によって EAIgG を測定し、我々と同様の結果を報告している。

また、DAT 陰性の AIHA 患者の EAIgG も測定しており、70~434 分子/RBC であったという。この報告を、今回我々が得た基準値上限（0.19 単位：65 分子/RBC）と比較すると、DAT 陰性の SLE 患者においても、本法が陽性であれば AIHA を呈する症例が少なからず存在することが示唆される。DAT は手技が簡便で優れた検査法であるが、今回の結果から測定感度は臨床的に不十分であり、DAT が陰性でも EAIgG を否定することはできない。

臨床的に、DAT 成績の強弱は必ずしも個々の貧血の程度と一致しないが、EAIgG 量と赤血球寿命が逆相関することが報告されている¹³⁾。図 4 に示すように、SLE 患者の赤血球数は EAIgG と有意な逆相関を呈し、加えて、赤血球数が $4 \times 10^6 / \mu l$ 未満の患者群では、その 88% が EAIgG 陽性であり、赤血球数がそれ以上の患者群との間に、EAIgG 量において有意な差が認められた（表 4）。これらの結果から、DAT では検出できない微量な EAIgG でも、赤血球の異化の亢進、強いては AIHA の惹起に関与することが示唆された。

Fig. 4 Correlation between EAIgG and RBC in patients with SLE

Fig. 5 Correlation between EAIgG and CIC in patients with SLE

Table 3 Boundary point that separates DAT positive from negative

investigator	boundary point	normal individuals
Bodensteiner et al. ⁹⁾	300~500 mol*/RBC	<54 mol/RBC
Yamada et al. ¹⁰⁾	80~200 mol/RBC	
Sokol et al. ¹¹⁾	100~120 mol/RBC	
Hachimura et al.	306 mol/RBC	<65 mol/RBC

* mol : molecule

一方、DAT が陽性を呈した場合、通常赤血球自己抗体の存在を疑うが、検出感度が高くなれば抗赤血球抗体のみならず、近年 AIHA との関連で注目されている抗リン脂質抗体 (aCL) を検出している可能性がある。赤血球から解離した IgG が aCL 活性を有する症例が報告されており^{14,15)}、SLE 患者において aCL は健常者と比較し有意に高値である¹⁶⁾。しかしながら、AIHA を呈する患者群と呈さない患者群の間に、aCL 濃度の有意差は認められていない¹⁶⁾。

その他、赤血球膜上の CR 1 を介した CIC¹⁷⁾ を検出

Table 4 Relationship between positive percentage of EAIGG and RBC count in patients with SLE

group	RBC ($\times 10^4$)	n	positive (%) ^{*1}	mean ^{*2}	SD	p
A	<400	17	15 (88)	0.368	0.159	
B	400~450	27	15 (56)	0.253	0.179	0.035 ^{*3}
C	>450	26	7 (27)	0.161	0.209	0.091 ^{*4}

EAIGG positive numbers (%)^{*1} and mean of EAIGG (unit)^{*2} in a group.

Statistical analysis: Student's *t*-test was used to compare mean of EAIGG between group A and B (^{*3}), group B and C (^{*4}).

していることも否定しえない。赤血球 CR1 の主な働きとして、CIC の運搬ならびにクリアランス³⁾と補体の不活化¹⁸⁾が挙げられており、SLE で高感度に検出される CIC が赤血球膜上に結合している可能性は高い。図 5 で示すように EAIGG と CIC は弱いながら正の相関を呈した。一部 CIC が異常高値にもかかわらず、EAIGG が基準範囲内である例が認められたが、これは健常者にも存在する赤血球 CR1 数が先天的に少ない例と思われ¹⁹⁾、CIC が赤血球に結合できないための乖離と考えられた。

多量の CIC は赤血球のみならず、Fc レセプターをもつマクロファージにも結合する。SLE 患者では、マクロファージの Fc レセプターが CIC により飽和され、EAIGG が結合した赤血球は貪食されない。SLE 患者において EAIGG が陽性でも溶血性貧血を呈さない一因として、CIC によるマクロファージの貪食能の低下が疑われる²⁰⁾。実際、未治療の SLE 患者において溶血性貧血を伴う頻度は約 16~18%¹⁾であり、本法での EAIGG 陽性率と比較するとかなり低い。

EAIGG は患者のみならず健常者の赤血球からも確認された。これは赤血球膜上のシアル酸が血球の老化とともに減少することに起因する IgG の非特異的吸着と考えられており、幼若赤血球より老熟赤血球に多く認められる²¹⁾。老熟赤血球には、IgG のほかにも IgA, IgM, C3d も幼若赤血球より多く結合している²²⁾。この現象は、単球による老熟赤血球の貪食・排

除に寄与している。

今回は EAIGG を測定したが、補体成分のみが赤血球に結合した AIHA も存在することから²³⁾、本検討と同様な目的により補体成分を検出する必要があると考える。図 4 に示す EAIGG が少量であるにもかかわらず RBC が低下している例では、DAT では検出できない量ではあるが、健常者より多くの補体成分が結合している可能性もあり興味深い。IgA や IgM が単独で結合していることは少なく²³⁾、それらの測定意義はまだ確立されていない。

本法の EAIGG 量は、国際単位 (IFCC 単位) で算出、標準化を計った。血漿蛋白成分の免疫学的測定法では、標準血清の違いに起因する成績の差が生じやすい。CRM 470 の利用により、今後さらなる成績の統一化が望まれる。

V. 結 語

我々は、ELISA を用いて従来の DAT と比較し高感度に EAIGG を検出した。また、DAT で主観的に赤血球凝集が認められる境界点を IgG の分子レベルで算出するとともに、DAT が陰性でも SLE 患者赤血球膜上に多くの IgG が結合していることを明らかにした。更に、EAIGG と赤血球数が逆相関することから、DAT で検出できない微量 EAIGG でも、赤血球の異化の亢進、強いては溶血性貧血の惹起に関与することが示唆された。

文 献

- 1) Tan, M.E., et al: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 25: 1271~1277, 1982.
- 2) 鉢村和男・他: Clq Solid-phase EIA を用いた Circulating Immune Complex (CIC) 測定に関する臨床的有用性の検討—基礎的検討ならびに病態における変動—. *基礎と臨床*, 23: 357~366, 1990.
- 3) Schifferli, J.A., et al: The role of hypocom-

- plementaemia and low erythrocyte complement receptor type 1 numbers in determining abnormal immune complex clearance in humans. *Clin. Exp. Immunol.*, 75 : 329~335, 1989.
- 4) 大藤 眞・宮脇昌二：全身性エリテマトーデスのすべて，内科シリーズ No. 25 鈴木秀郎編，第1版，南江堂，東京，p 105~122, 1978.
- 5) Rubin, H. : Antibody elution from red blood cells. *J. Clin. Pathol.*, 16 : 70~73, 1963.
- 6) 坪 茂典・他：ELISA によるリンパ球培養上清中の微量 Ig の測定について．臨床病理，32 : 1247~1252, 1984.
- 7) 伊藤喜久・河合 忠：IFCC 血漿蛋白国際標準品 (CRM 470/RPPHS). 臨床病理，特集 101 号 : 24~37, 1996.
- 8) 伊藤喜久・他：IFCC 血漿蛋白国際標準品 CRM 470 の性状，安全性，反応性の検討．臨床検査機器・試薬，18 : 1~12, 1995.
- 9) Bodensteiner, D., et al : The enzyme-linked immunosorbent assay : Accurate detection of red blood cell antibodies in autoimmune hemolytic anemia. *Am. J. Clin. Pathol.*, 79 : 182~185, 1983.
- 10) 山田英雄・平野明人：自己免疫性溶血性貧血における抗赤血球自己抗体の定量と病態解析．臨床血液，24 : 1173~118, 1983.
- 11) Sokol, R.J., et al : Enzyme linked direct antiglobulin tests in patients with autoimmune haemolysis. *J. Clin. Pathol.*, 38 : 912~914, 1985.
- 12) Gilliland, B.C., et al : The detection of cell-bound antibody on complement-coated human red cells. *J. Clin. Invest.*, 49 : 898~906, 1970.
- 13) Rosse, W.F. : Quantitative immunology of immune hemolytic anemia. II. The relationship of cell-bound antibody to hemolysis and the effect of treatment. *J. Clin. Invest.*, 50 : 734~743, 1971.
- 14) Hazeltine, M., et al : Antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus : Evidence of an association with positive Coombs' and hypocomplementemia. *J. Rheumatol.*, 15 : 80~86, 1988.
- 15) Stoege, Z., et al : The role of anticardiolipin autoantibodies in the pathogenesis of autoimmune hemolytic anemia in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.*, 20 : 2058~2061, 1993.
- 16) Lang, B., et al : Elevated anticardiolipin antibodies in autoimmune haemolytic anaemia irrespective of underlying systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 6 : 652~655, 1997.
- 17) Roes, G.D., et al : Disease associated loss of erythrocyte complement receptors (CR 1, C 3 b receptors) in patients with systemic lupus erythematosus and other disease involving autoantibodies and/or complement activation. *J. Immunol.*, 135 : 2005~2014, 1985.
- 18) Iida, K. & Nussenzweig V. : Complement receptor is an inhibitor of the complement cascade. *J. Exp. Med.*, 153 : 1138~1150, 1981.
- 19) Holme, E., et al : Decreased C 3 b receptors (CR 1) on erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.*, 63 : 41~48, 1986.
- 20) Sokol, R.J., et al : The pathology of autoimmune haemolytic anaemia. *J. Clin. Pathol.*, 45 : 1047~1052, 1992.
- 21) Alderman, E.M., et al : Binding of immunoglobulin classes to subpopulations of human red blood cells separated by density-gradient centrifugation. *Blood*, 55 : 817~822, 1980.
- 22) Freedman, J. : Membrane-bound immunoglobulins and complement components on young and old red cells. *Transfusion*, 24 : 477~481, 1984.
- 23) Sokol, R.J., et al : Small quantities of erythrocyte bound immunoglobulins and autoimmune haemolysis. *J. Clin. Pathol.*, 40 : 254~254, 1987.