

多発性骨髄腫治療薬（抗 CD38）による偽陽性反応への対処法（一部改定版）  
（DTT 処理赤血球の作製法および DTT 処理赤血球による間接抗グロブリン試験）

CD38 は内在性膜蛋白で、骨髄腫細胞に著しく発現されており、抗 CD38 モノクローナル抗体は新しい骨髄腫の治療薬として注目されている<sup>1)</sup>。

CD38 は赤血球にも弱く発現されており、抗 CD38 を投与された患者の被検血漿は間接抗グロブリン試験（IAT）、すなわち不規則抗体スクリーニングおよび交差適合試験の抗グロブリン相において常に偽陽性（汎反応）を呈する。その際、凝集反応は通常 1+と弱い、固相法では 1+～4+と強く反応することがある。また、直接抗グロブリン試験（DAT）や不規則抗体検査の自己対照は陰性から陽性までさまざまである。しかし、ABO または RhD 血液型検査や交差適合試験の生理食塩液法には影響を及ぼさない<sup>2,3)</sup>。

なお、IAT における偽陽性反応は抗 CD38 の投与が中断されたとしても、最大 6 ヶ月まで検出されることがある。また、未処理または ZZAP 処理赤血球による吸着試験では、本抗体による影響を低減することはできない<sup>2,3)</sup>。

抗 CD38 治療薬がもたらす影響として、もし患者が抗 CD38 を投与されていることに輸血部門が気づかなかった場合、異常反応の問題解決に時間を費やし、赤血球製剤の出庫に遅れをきたすことが予想される。そのため輸血部門は臨床情報の入手に努力し、患者疾患名および使用薬剤についての情報を得る努力が必要である。

抗 CD38 投与患者のための不規則抗体検査の一助となるよう、DTT 処理赤血球の作製法および DTT 処理赤血球による間接抗グロブリン試験<sup>4,5)</sup>について、下記に示す。

尚、本対処法については各医療機関において、より安定した赤血球処理が行えるように改訂版とした経緯があります。また説明の文中には試薬の使用期限の目安の設定および参考文献の追加なども加えております。

日本輸血・細胞治療学会 輸血検査技術講習委員会  
2017. 11. 13

## 1. 必要な試薬

- A : Dithiothreitol (DTT)
- B : pH8.0 リン酸緩衝生理食塩液 (PBS)
- C : pH7.3 リン酸緩衝生理食塩液 (PBS)
- D : 10 x 75 mm 試験管
- E : マイクロピペット (100～1,000 $\mu$ L)
- F : ディスポーザブルピペット
- G : 市販スクリーニング赤血球
- H : 市販パネル赤血球
- I : 凍結保存用プラスチックチューブ (以下、保存用チューブと略す, 1 mL)
- J : 三角フラスコ (100mL)
- K : 抗 E 抗体試薬

- L：抗 K または抗 k 抗体試薬  
M：抗ヒト IgG グロブリン試薬

## 2. 必要な機器

- A：電子天秤  
B：恒温槽  
C：遠心機

## 3. 手順

### ① 0.2M DTT の準備

1. 三角フラスコに DTT 1g を入れ、pH8.0 PBS 32mL を加える。
2. よく混和して溶解する。
3. 保存用チューブに、“0.2M DTT” および“使用期限”を記載する。
4. 0.2M DTT 溶液を保存用チューブへ 500 $\mu$ L またはディスポーザブルピペット（約 50 $\mu$ L/滴）で 10 滴ずつ分注する。
5. 保存用チューブにキャップをして、 $-18^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存する。  
※使用期限は各試薬の使用期限に準ずるか、最終調製後 1 年間を目安にする。

### ② 赤血球の処理 ※用時調製

1. 凍結保存した 0.2M DTT 溶液は、その都度、新しいものを室温解凍し、よく混和して用いる。
2. 適宜、対照赤血球を選択する。通常、DTT 処理の効果判定には陰性対照赤血球として K+ または k+（抗 K 試薬で確認する場合：K+k+、抗 k で確認する場合：K-k+）を用い、K または k 抗原が変性・破壊されたかどうか確かめる。陽性対照赤血球には、便宜上、E+（E+e+または E+e-）を用いる。
3. 10 x 75mm 試験管に、スクリーニング赤血球またはパネル赤血球、交差適合試験に用いる赤血球、自己対照赤血球、陽性対照赤血球および陰性対照赤血球に関する識別番号または赤血球名等を明記する（上記の赤血球には 3~5%赤血球浮遊液を使用する）。
4. 各試験管に表記された 3~5%赤血球浮遊液を 8 滴（400 $\mu$ L）ずつ入れる。  
pH7.3 PBS で 4 回洗浄する。最終遠心後の上清を完全に除去する（赤血球沈渣が 12 $\mu$ L ~20 $\mu$ L 残る）。
5. 洗浄赤血球沈渣が入った各試験管に、0.2M DTT 溶液を 1 滴（50 $\mu$ L）ずつ加える。
6. よく混和し、 $37^{\circ}\text{C}$ で 20~30 分間インキュベートする。その間、3~4 回よく混和する。
7. pH7.3 PBS で 4 回洗浄する。
8. pH7.3 PBS を加え、3~5%赤血球浮遊液として使用する。

### ③ DTT 処理赤血球（陽性対照および陰性対照）の確認検査

DTT 処理の良否を確認するため、抗体試薬の添付文書に従った方法で、処理赤血球が抗 E で陽性、抗 K または抗 k で陰性であることを確認する。結果が予測と異なった場合は再度やり直す。

④ DTT 処理赤血球（自己対照を含む）による検査

※不規則抗体スクリーニングや交差適合試験に応用する

1. 3～5% PBS 浮遊 DTT 処理赤血球が入った各試験管に、被検血漿（血清）を 2 滴ずつ加え、よく混和する。
2. 適宜、反応増強剤添加または反応増強剤無添加-間接抗グロブリン試験を実施する。
3. 3～4 回洗浄する。
4. 抗ヒト IgG グロブリン試薬を 2 滴ずつ加え、よく混和する。
5. 遠心後、判定する。
6. 結果を記録する。
7. 陰性を呈した試験管へ IgG 感作赤血球を 1 滴ずつ加え、よく混和する。
8. 遠心後、判定する。
9. 凝集を観察し、ワークシートへ結果を記録する。凝集が確認されなかった場合は、結果が不適切であるため、もう一度やり直す。

⑤ 結果の解釈

1. DTT 処理赤血球と被検血漿（血清）との反応が陰性の場合、不規則抗体スクリーニングの結果は陰性とする。ただし、報告に際しては「DTT によって変性・破壊される血液型抗原、特に Kell 血液型抗原に対する抗体の存在は否定できない」旨を添えるのが望ましい。
2. 赤血球の K<sub>x</sub> 抗原は 0.2M DTT によって破壊されない。

4. 文献

- 1) Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP et al. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. N Engl J Med. 2015 Sep 24;373(13):1207-19.
- 2) Chapuy CI, Rachel T. Nicholson, et al. Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing. Transfusion 2015;55:1545-54.
- 3) Oostendorp M, Lammerts van Bueren JJ, Doshi P, et al. When blood transfusion medicine becomes complicated due to interference by monoclonal antibody therapy. Transfusion 2015;55(6pt2):1555-62.
- 4) AABB technical manual 14<sup>th</sup> edition, 2002.
- 5) Chapuy CI, Aguad MD, Nicholson RT, et al. International validation of a dithiothreitol (DTT)-based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing. Transfusion 2016 Dec;56(12):2964-2972.

多発性骨髄腫治療薬（抗CD38）による偽陽性反応への対処法－改定内容について

改定前	改定後
1. 必要な試薬 B : PBS (pH8.0)	1. 必要な試薬 B : <u>pH8.0 リン酸緩衝生理食塩液 (PBS)</u> C : <u>pH7.3 リン酸緩衝生理食塩液 (PBS)</u> M : <u>抗ヒトIgGグロブリン試薬</u>
3. 手順	3. 手順 <u>5. 保存用チューブにキャップをして、-18°C以下で凍結保存する。</u>
② 赤血球の処理	② 赤血球の処理 <u>※用時調製</u>
3. 10 x 75mm試験管に、スクリーニング赤血球またはパネル赤血球、自己対照、陽性対照および陰性対照に関する識別番号または試薬名等を明記する。	3. 10 x 75mm試験管に、スクリーニング赤血球またはパネル赤血球、 <u>交差適合試験に用いる赤血球</u> 、自己対照赤血球、陽性対照赤血球および陰性対照赤血球に関する識別番号または赤血球名等を明記する（ <u>上記の赤血球には3～5%赤血球浮遊液を使用する</u> ）。
4. 各試験管に表記された赤血球試薬を2滴ずつ加える。生理食塩液で4回洗浄	4. 各試験管に表記された <u>3～5%赤血球浮遊液を8滴（400μL）</u> ずつ入れる。 <u>pH7.3 PBSで4回洗浄する。最終遠心後の上清を完全に除去する（赤血球沈渣が12μL～20μL残る）。</u>
5. 洗浄赤血球が入った各試験管に、0.2M DTT溶液を8滴ずつ加える。	5. 洗浄赤血球沈渣が入った各試験管に、0.2M DTT溶液を <u>1滴（50μL）</u> ずつ加える。
6. よく混和し、37°Cで30分間インキュベート（最大45分まで）。その間、3～4回よく混和する。	6. よく混和し、37°Cで <u>20～30分間</u> インキュベートする。その間、3～4回よく混和する。
7. 生理食塩液で4回洗浄。	7. <u>pH7.3 PBSで4回洗浄する。</u>
	8. <u>pH7.3 PBSを加え、3～5%赤血球浮遊液として使用する。</u>
③ 対照赤血球の検査	③ <u>DTT処理赤血球（陽性対照および陰性対照）の確認検査</u>
④ DTT処理赤血球（自己対照を含む）による検査 1. 洗浄済みDTT処理赤血球が入った各試験管に、被検血漿(血清)を2滴ずつ加え、よく混和する。	④ DTT処理赤血球（自己対照を含む）による検査 1. <u>3～5% PBS浮遊DTT処理赤血球が入った各試験管に、被検血漿(血清)を2滴ずつ加え、よく混和する。</u>
3. 3～4回洗浄	3. <u>3～4回洗浄する。</u>
4. 抗IgGクームス試薬を2滴ずつ加え、よく混和する。	4. <u>抗ヒトIgGグロブリン試薬を2滴ずつ加え、よく混和する。</u>
5. 遠心判定	5. <u>遠心後、判定する。</u>
8. 遠心判定	8. <u>遠心後、判定する。</u>
4. 文献	4. 文献 1) <u>Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP et al. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. N Engl J Med. 2015 Sep 24;373(13):1207-19.</u>
1)Chapuy CI, Nicholson RT, Aguad MD, et al. Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing. Transfusion 2015;55(6pt2):1545-54.	2) <u>Chapuy CI,Rachel T. Nicholson, et al. Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing. Transfusion 2015;55:1545-54.</u>
4)Chapuy CI, Aguad MD, Nicholson RT, et al. International validation of a dithiothreitol (DTT)-based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing. Blood 2015;126(Suppl): Abstract 3567.	5) <u>Chapuy CI, Aguad MD, Nicholson RT, et al. International validation of a dithiothreitol (DTT)-based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing. Transfusion 2016 Dec;56(12):2964-2972.</u>