

## Daratumumab の間接抗グロブリン試験および直接抗グロブリン試験に対する異なる作用：K 抗原の反応性を維持し Daratumumab の偽陽性反応を解消する 0.01 mol/l DTT を用いた新たな対処法（大阪法）

細川 美香<sup>1)</sup> 柏木 浩和<sup>2)</sup> 中山小太郎純友<sup>1)</sup> 櫻木美基子<sup>1)</sup> 中尾まゆみ<sup>1)</sup>  
森川 珠世<sup>1)</sup> 清川 知子<sup>1)</sup> 青地 寛<sup>1)</sup> 永峰 啓丞<sup>1)</sup> 柴山 浩彦<sup>2)</sup>  
富山 佳昭<sup>1)2)</sup>

【背景】Daratumumab (DARA) は CD38 を認識する IgG1κ モノクローナル抗体 (MoAb) であり、再発/難治性の多発性骨髄腫患者の治療薬として需要が増加している。しかし、DARA は間接抗グロブリン試験において汎反応性の凝集を呈する。さらに、DARA の生体内での作用は不明な点も多い。

【対象および方法】DARA による偽陽性反応への対処法として自動血球洗浄遠心機を用いた新しい方法を開発するために、様々な濃度の DTT を用いて赤血球膜上の CD38 と Kell 抗原に対する効果を検討すると共に、AABB の標準的な方法と比較した。

【結果】0.01mol/l DTT 処理赤血球および AABB 処理赤血球 (我々の方法では 0.15mol/l DTT に相当) では、PE 標識抗 CD38 MoAb や DARA との反応性は著しく低下した。また、AABB 処理赤血球では K 抗原の反応性が消失したが、0.01mol/l DTT 処理赤血球では K 抗原の反応性は減弱するもののその反応性は保持することが出来た。さらに、DARA 感作赤血球においても 0.01mol/l DTT 処理後で K 抗原の解析は可能となった。一方、DARA 投与中 MM 患者の DAT は弱陽性または陰性であった。さらに、イムノプロットにより DARA が *in vivo* では CD38 を消失させることを示した。

【考案】今回、我々は Kell 抗原の反応性は減弱するもののその反応性は保持したまま、DARA による偽陽性反応を解消できる簡便な方法 (大阪法) を提示した。大阪法では DARA 感作赤血球においても CD38 抗原性を消失させることが出来た。さらに DARA は *in vitro* での IAT と *in vivo* における DAT に関して異なった影響を及ぼすことも明らかにした。

キーワード：Daratumumab, 0.01mol/l DTT, 自動血球洗浄遠心機, CD38, K 抗原性保持

本論文内容は、Transfusion 誌 (第 58 巻 p.3003-3013, 2018) に最初に報告された研究に基づき作成したものである。(This article is based on a study first reported in the Transfusion 2018; 58; 3003-3013: Distinct effects of daratumumab on indirect and direct antiglobulin tests: a new method employing 0.01mol/L dithiothreitol for negating the daratumumab interference with preserving K antigenicity (Osaka method))

### はじめに

CD38 は、20 個のアミノ酸からなる短い N 末端細胞内領域と 256 個のアミノ酸からなる長い細胞外ドメインで構成される 46kDa の II 型膜貫通性糖タンパク質である<sup>1)2)</sup>。多発性骨髄腫 (MM) は、骨髄中で形質細胞が腫瘍性に増殖する悪性疾患であり、MM の悪性細胞において CD38 は高発現している。一方、正常なリンパ球

および骨髄細胞ならびに非造血起源のいくつかの組織では CD38 の発現が比較的 low であり、CD38 が MM の治療において優れた標的になる可能性を示している<sup>2)3)</sup>。実際、CD38 に対するヒト化 IgG1κ モノクローナル抗体 (DARA, Darzalex<sup>TM</sup>, Genmab / Janssen) は、再発または難治性 MM 患者の治療薬として日本では 2017 年 9 月、米国では 2015 年 11 月に承認された<sup>4)~6)</sup>。

1) 大阪大学医学部附属病院輸血部

2) 大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学

[受付日：2018 年 10 月 16 日, 受理日：2018 年 11 月 20 日]

CD38は赤血球膜上に弱く発現するため、DARAおよび他の抗CD38モノクローナル抗体(MoAb)は赤血球膜上のCD38に直接結合し、不規則抗体スクリーニングおよび交差適合試験などの間接的抗グロブリン試験(IAT)において汎反応性の凝集反応をもたらす<sup>7,8)</sup>。0.2mol/l Dithiothreitol (DTT)を用いた赤血球試薬の処理は、CD38の三次構造を破壊することでDARAによる偽陽性反応を解消する有効な方法として実証されている<sup>7)</sup>。さらに、DARAによる偽陽性反応を解消する方法として、トリプシン処理した赤血球、可溶性CD38または抗イディオタイプ抗体によるDARAの中和、臍帯赤血球の使用、さらにはDARAのF(ab')<sub>2</sub>の使用など、多くの手法が提案されている<sup>7-10)</sup>。これらの方法の中では、赤血球の0.2mol/l DTT処理は簡単な方法で国際的にもその有用性が示されている<sup>11)</sup>。

しかしながら0.2mol/l DTT処理の欠点は、赤血球膜上のKell抗原を完全に破壊すること、高濃度のために取り扱いが困難なことである<sup>7)</sup>。DARAを含むヒト化MoAbは様々な疾患でその使用は増加しており、DARAによる偽陽性反応を解消するための簡単で適切な方法が必要である。今回、我々はKell抗原の反応性は減弱するもののその反応性は保持したまま、簡単に行える方法(大阪法)を新たに開発した。大阪法は、0.01mol/l DTTと自動血球洗浄遠心機を用いたルーチン検査に適した容易な方法である。さらに、DARA投与MM患者の直接抗グロブリン試験(DAT)を検討した。その結果より、DARAはIATとDATで異なった影響を及ぼすことを明らかにした。

## 対象および方法

### 対象

DARAを使用した難治性MM患者3例を対象とした。3例ともにDARA 16mg/kgの用量を週1回8週間投与中の症例である。このMM患者3人から得られた赤血球あるいは血漿を用いた。また、対照として健常被験者の血漿を用いた。

対象患者からは書面による同意を得ており、さらに本研究は大阪大学機関審査委員会の承認を受けた。

この研究で使用したMM患者の赤血球以外は、赤血球試薬(Ortho-clinical diagnostics, Tokyo, Japan)を用いた。

### DTT処理赤血球の作製方法

a) AABBの標準的な方法によるDTT処理方法<sup>7)12)</sup>(AABB法)

pH7.3のリン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄したpacked cell 1溶にPBS(pH8.0)で溶解した0.2mol/l DTT(Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd. Osaka, Japan)を4溶添加し、その後37°Cで30分間インキュベ-

ートした。処理した赤血球をPBS(pH7.3)で4回洗浄後、PBSで3%~5%に再浮遊した。(AABB処理赤血球)

また、自己凝集を分散させるためのAABB 0.01mol/l DTT法も実施した<sup>12)</sup>。AABB 0.01mol/l DTT法では、50%の洗浄赤血球と等量の0.01mol/l DTTを混合し、37°Cで15分間インキュベートした。したがって、この方法のDTT濃度は大阪法での0.005mol/l DTTに相当すると考えられる。

b) 大阪大学医学部附属病院におけるDTT処理改良法(大阪法)

自動洗浄は容易でありルーチン検査に適しているため、赤血球の洗浄は自動血球洗浄遠心機(himac MC 450, Hitachi Koki Co., Ltd., Tokyo, Japan)を使用することとし、PBS(pH 8.0)の代わりに、PBS(pH 7.3)を用いてDTTを溶解した。

まず、適切なDTT濃度を決定するために、種々のDTT濃度の溶液(0.2mol/l, 0.15mol/l, 0.1mol/l, 0.05mol/l, 0.01mol/lおよび0.005mol/l)を作製した。自動血球洗浄遠心機を用いるため、3~5%赤血球浮遊液の量を100μlにし、自動血球洗浄遠心機を用いて生理食塩液で3回洗浄した後、洗浄したpacked cell(約3μl)にDTT溶液50μlを加え、37°Cで30分間インキュベートした。その後、自動血球洗浄遠心機を用いて生理食塩液で3回洗浄し、packed cellをそのまま検査に用いた。(各濃度DTT処理赤血球)

### 間接・直接抗グロブリン試験

未処理および各DTT処理赤血球とDARA投与患者血漿を用いてポリエチレングリコール(PEG)-IATを行い、未処理および各DTT処理赤血球へのDARAの結合を調べた。PEG-IATはAABBの方法に従って実施した<sup>12)</sup>。

直接抗グロブリン試験(DAT)は多特異性抗グロブリン抗体(DiaClon Coombs Serum green, Bio-Rad Laboratories, Inc., Tokyo, Japan)を用いて、DARA投与MM患者の赤血球について実施した。

### 各種血液型抗原検査

未処理および各DTT処理赤血球の種々の抗原性について、試験管法にて各抗血清の添付文書に従って実施した。

### Flow cytometry (FCM)

未処理およびDTT処理したpacked cell(約2.5μl)と10倍希釈したPE標識抗CD38モノクローナル抗体(抗CD38 MoAb: BioLegend, San Diego, CA) 50μlを共に30分間インキュベートし、1回洗浄後、FCMで分析した。PE-マウスIgG1を陰性コントロール(Beckman Coulter K.K., Tokyo, Japan)として使用した。

また、未処理およびDTT処理したpacked cell(約2.5μl)とDARA投与MM患者の血漿100μl(DARA

投与前に不規則抗体を持たない事を確認)を60分間37°Cでインキュベートし、生理食塩液で3回洗浄した後、赤血球を320倍希釈したAlexa-ヤギ抗ヒトIgG(Thermo Fisher Scientific KK, Tokyo, Japan) 50 $\mu$ lと共に30分間インキュベートし、1回洗浄後、FCMで分析した。対照血漿を陰性コントロールとして用いた。

同様に、未処理およびDTT処理した赤血球を37°Cで30分間抗K血清(Ortho)または抗Fy<sup>b</sup>血清(Ortho)と共にインキュベートし、洗浄後、Alexa-ヤギ抗ヒトIgGを添加し、上記と同様にFCMで分析した。

DARA投与前、投与後1日目および7~8日目のMM患者の赤血球を、Alexa-ヤギ抗ヒトIgGと共に30分間インキュベートし、1回洗浄後、FCMで分析した。

#### Immunoblotting

患者赤血球の凍結解凍を繰り返した後、上清が無色になるまで0.2%NaCl溶液で繰り返し洗浄することにより赤血球膜画分を得た。次いで、赤血球膜のペレットを2MEが入ったLaemmliサンプル緩衝液(Bio-Rad, Hercules, CA)で溶解し、タンパク質をSDS-PAGEにより5~20%勾配ゲル上で分離した。CD38は、マウスモノクローナル抗CD38抗体(AT1, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA)によって検出した。ストリッピング後、負荷量をマウスモノクローナル抗 $\beta$ -アクチン抗体(AC-15, Sigma, St Louis, MO)で評価した。

## 結 果

### 各DTT処理赤血球におけるCD38抗原性の評価

各DTT処理赤血球上のCD38抗原性について評価した。AABB法では1容量のpacked cellに0.2mol/l DTTを4容量添加しているため、最終的なDTT濃度は改良法においては0.16mol/lに相当すると考えられる。Fig. 1に示すように、大阪法(0.01mol/l DTT処理)ならびにAABB法(0.15mol/l DTT処理に相当)は、抗CD38 MoAbとの反応性を著しく低下させた。AABB処理と比べて0.005mol/l DTT処理では反応性の低下はわずかであった。また、AABB 0.01mol/l DTT法を用いた効果を調べたところ、AABB 0.01mol/l DTT処理法は0.005mol/l DTT処理とほぼ同じ結果を示した(結果は示さず)。したがって、AABB 0.01mol/l DTT法は0.005mol/l DTT処理と同様に、抗CD38 MoAbの反応性を消失させることが出来ないことが明らかとなった。また、低濃度DTTと比較して、高濃度DTTが赤血球への非特異的なIgG結合を有意に増加させたことは興味深く、これはAABB法では赤血球膜に若干のダメージを与えていることが示唆された。事実、二峰性FSC分布を示す正常の楕円形の赤血球(未処理の赤血球)と比較して、AABB処理赤血球ではFSCでの二峰性分布が消失し、FSC分布はより高い位置へと変化した<sup>13)</sup>。し

かし、この形態学的変化は、0.01mol/l DTT処理(大阪法)赤血球ではわずかに認められるのみであった(Fig. 1)。

次に、DARA投与MM患者の血漿を用いた各DTT処理赤血球へのDARA結合能より、各DTT処理の効果を調べた。抗CD38 MoAbを用いたデータと同様に、DARAとの結合に関しても基本的に同じ結果が得られた(Fig. 2)。Fig. 2Bに示すように、FCMにて0.01mol/l DTT処理(大阪法)後にDARAとの結合がわずかに検出されたため、残存している結合がPEG-IATにおいても陽性となるかを調べた。未処理の赤血球を陽性対照(1+)として使用した。0.01mol/l以上の濃度のDTT処理赤血球ではPEG-IATにて陰性を示したが、0.005mol/l DTT処理赤血球では弱陽性反応(w+)を示した(Fig. 2D)。これはFCMにおいてDARAおよび抗CD38 MoAbとの結合の平均蛍光強度(MFI)が低値であったため、PEG-IATにおいて陰性になったと考えられた。これらの結果より、我々は0.01mol/l DTTが不規則抗体検査や交差適合試験においてDARAによる偽陽性反応を十分に解消出来る最も低い濃度であると判断した。

### 各種血液型抗原に対するDTT処理の影響

0.2mol/lでのDTT処理ではいくつかの血液型抗原が壊されることが示されている<sup>7)12)</sup>。これらの血液型抗原の中でも、K抗原は特に重要である。抗Kは米国において一般的に遭遇し、DTT感受性抗原の中で唯一臨床的意義のある抗体であるためである<sup>7)</sup>。そのため、大阪法(0.01mol/l DTT処理)ならびにAABB法(0.15mol/l DTT処理)がKellおよびDuffy血液型の抗原性に及ぼす影響について、FCMおよび試験管法を用いて調べた。FCMでは大阪法(0.01mol/l DTT処理)およびAABB法のどちらの処理においてもFy<sup>b</sup>の抗原性に影響を与えなかったが、K抗原の反応性は著しく減少することが示された。しかしながら、AABB法と比較して大阪法(0.01mol/l DTT処理)では充分量のK抗原の反応性が保持されていることが示された(Fig. 3)。次いで、試験管法によってK抗原の被凝集価を調べたところ、Table 1に示すように、0.01mol/l DTT処理(大阪法)赤血球の被凝集価は未処理血球に比べ4倍低下した程度にとどまり、K抗原の反応性は減弱するものの、その反応性は保持できることが示された。しかし、AABB法ではK抗原の反応性は完全に消失した。Table 2に示す他の血液型抗原に関しては、AABB法または大阪法(0.01mol/l DTT処理)において、その抗原性に影響を及ぼさなかった。

**大阪法(0.01mol/l DTT処理)はDARAとの結合を消失させるが、K抗原性は保持する**

次の段落で示すように、DARA投与MM患者におい

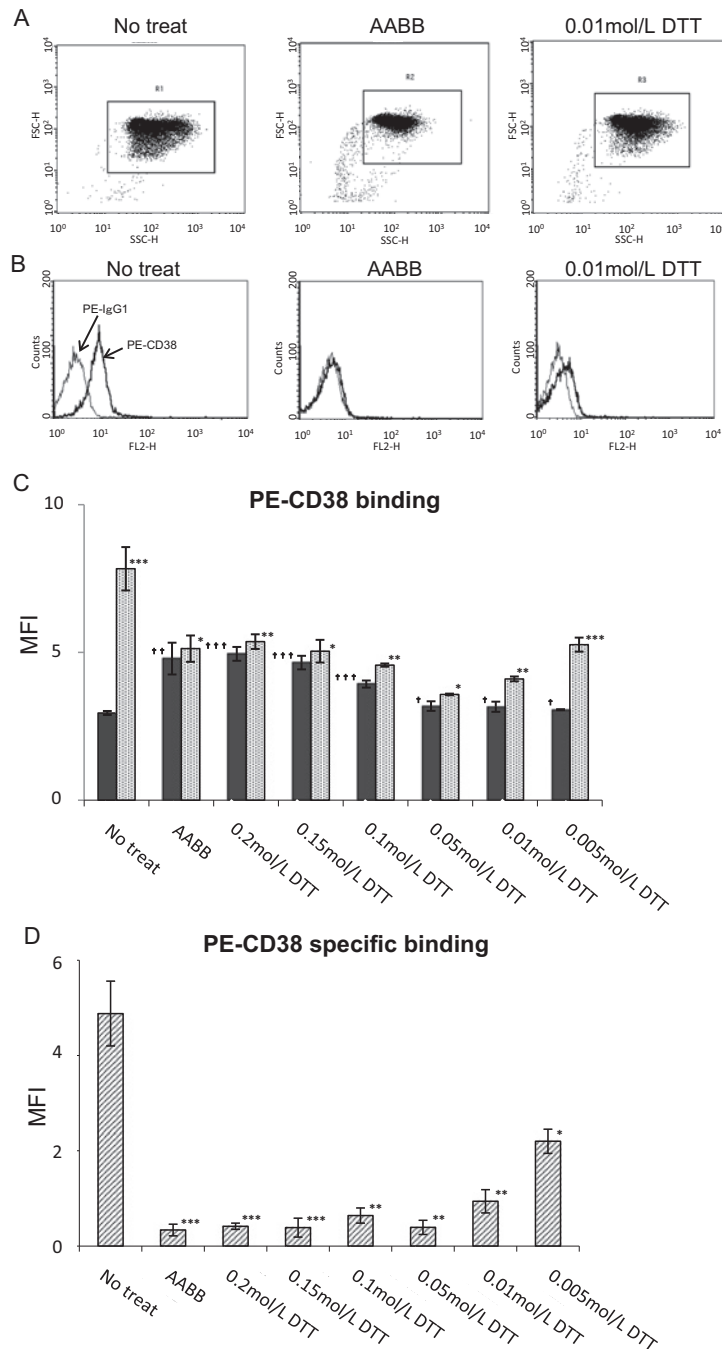


Fig. 1 Effects of various concentrations of DTT on PE-mouse anti-human CD38 MoAb binding.

(A) Scattergrams of RBC fraction obtained from nontreated RBCs, RBCs treated with the AABB procedure, and RBCs treated with 0.01mol/l DTT are shown. Gated area was analyzed for antibody binding. (B) Binding of PE-mouse anti-human CD38 MoAb and PE-mouse IgG1 (negative control) are indicated as black and gray lines, respectively. (C) Amounts of PE-mouse anti-human CD38 MoAb binding (▨) and PE-mouse IgG1 binding (■) are shown as MFI (mean ± SD, n = 4). Comparison between PE-anti-CD38 and PE-IgG1 binding by paired t test; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001. Comparison of PE-IgG1 binding between nontreated RBCs and DTT-treated RBCs by paired t test; †p < 0.05, ††p < 0.01, †††p < 0.001. (D) Amounts of specific binding of PE-mouse anti-human CD38 MoAb are shown as MFI (mean ± SD). Comparison between nontreated and DTT-treated RBCs; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.



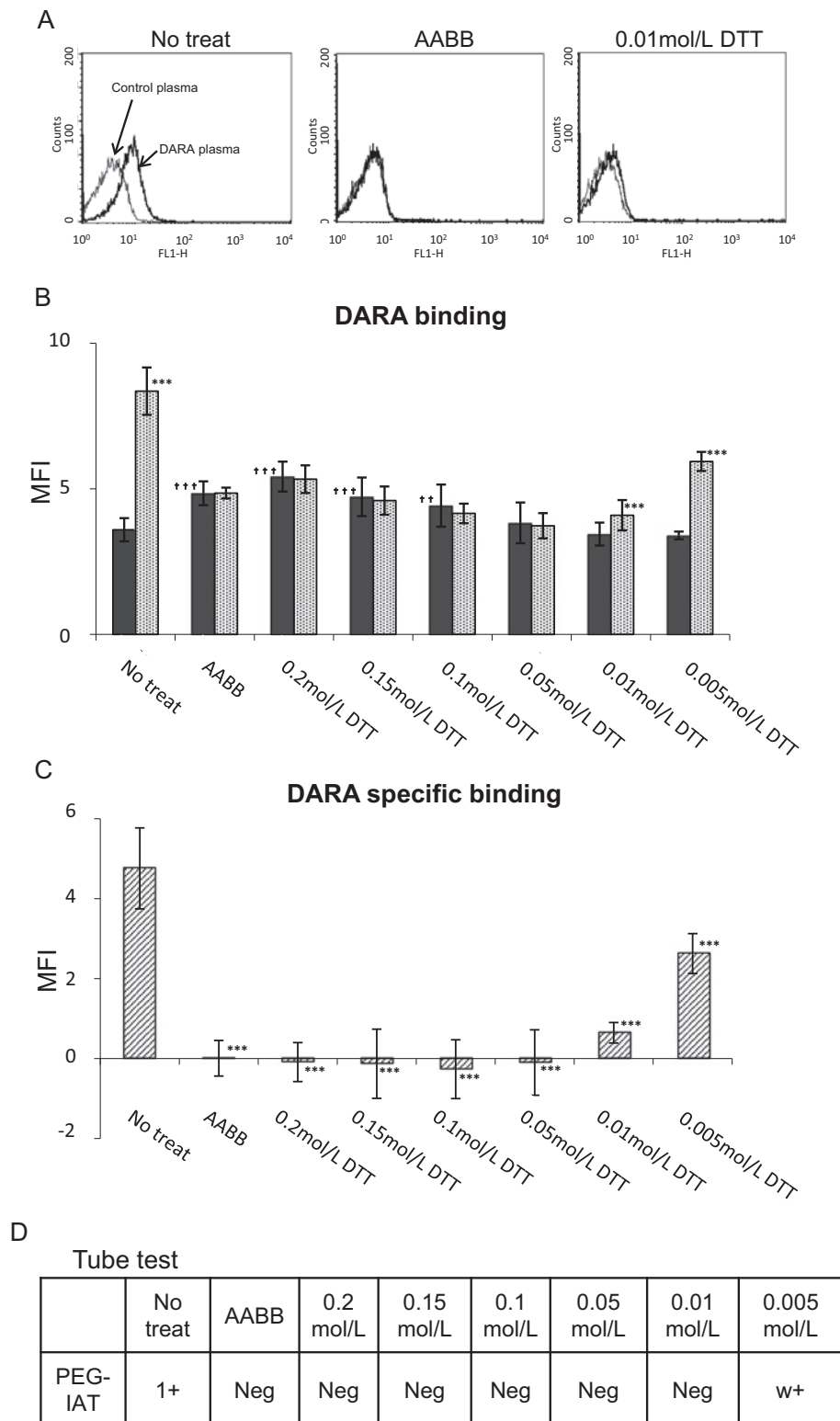


Fig. 2 Effects of various concentrations of DTT on DARA binding. (A) Binding of DARA and control plasma (negative control) are indicated as black and gray lines, respectively. (B) Amounts of DARA binding (▨) and control IgG binding (■) are shown as MFI (mean ± SD, n>5). Comparison between DARA binding and control IgG binding by paired t test; \*\*\*p<0.001. Comparison of control IgG binding between nontreated RBCs and DTT-treated RBCs by paired t test; †††p<0.001, ††p<0.01, †p<0.05. (C) Amounts of specific DARA binding are shown as MFI (mean ± SD). Comparison between nontreated and DTT-treated RBCs; \*\*\*p<0.001. (D) Results of PEG-IAT tube testing for each RBC sample.

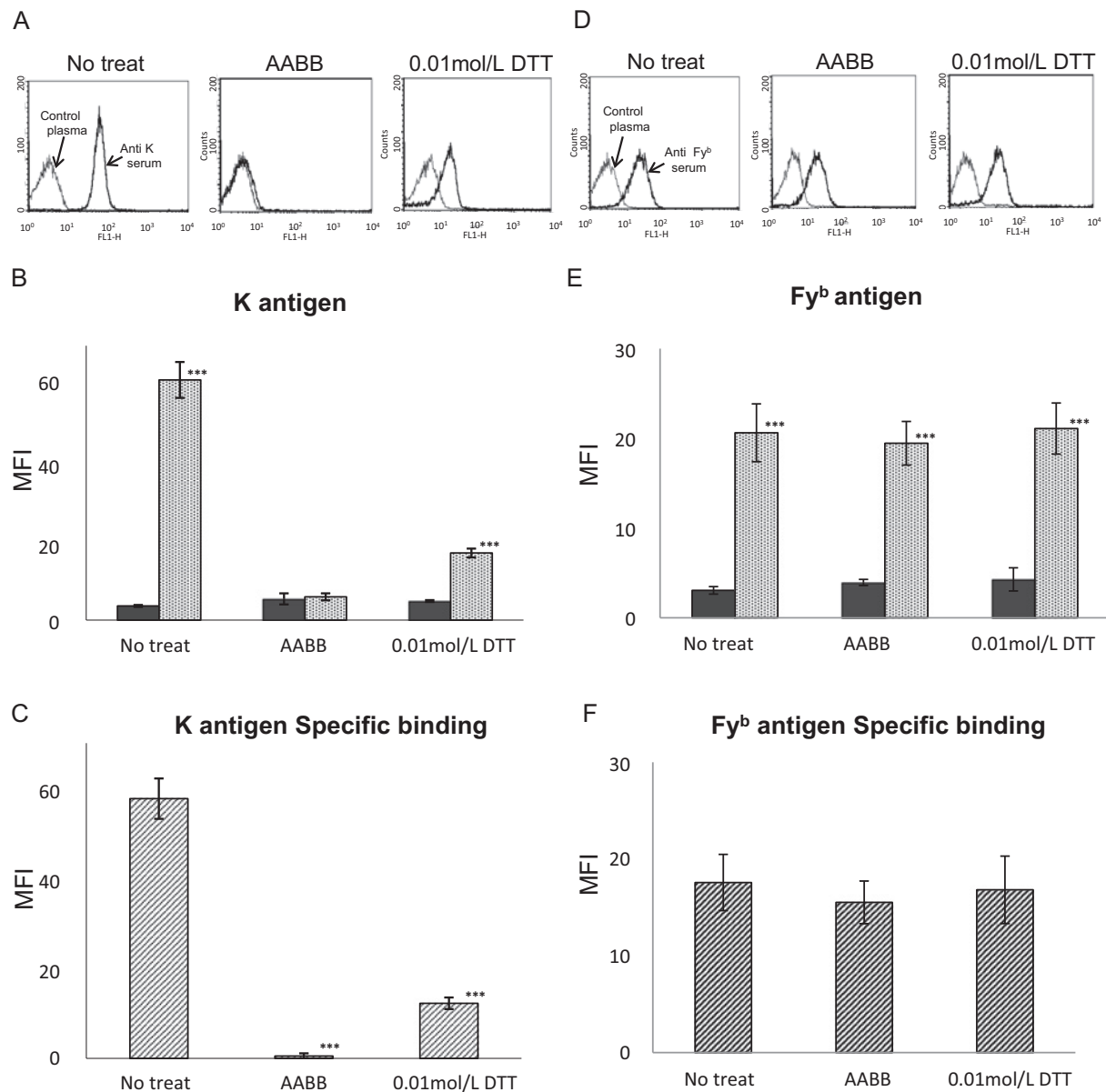


Fig. 3 Effects of DTT treatment on K and Fy<sup>b</sup> antigenicity.

(A and D) Binding of anti-K (A) and anti-Fy<sup>b</sup> antibody (D) to nontreated RBCs, RBCs treated with the AABB procedure, and RBCs treated with 0.01mol/l DTT are indicated. Gray line indicates control IgG binding. (B) Amounts of anti-K binding (▨) and control IgG binding (■) are shown as MFI (mean ± SD, n = 6). Comparison between anti-K binding and control IgG binding by paired t test; \*\*\*p < 0.001. (C) Amounts of specific anti-K binding are shown as MFI (mean ± SD). Comparison of anti-K binding between nontreated and DTT-treated RBCs by paired t test; \*\*\*p < 0.001. (E) Amounts of anti-Fy<sup>b</sup> binding (▨) and control IgG binding (■) are shown as MFI (mean ± SD, n = 6). Comparison between anti-Fy<sup>b</sup> binding and control IgG binding by paired t test; \*\*\*p < 0.001. (F) Amounts of specific anti-Fy<sup>b</sup> binding are shown as MFI (mean ± SD). Comparison of anti-Fy<sup>b</sup> binding between nontreated and DTT-treated RBCs by paired t test; \*\*\*p < 0.001.

Table 1 Effects of 0.01mol/l DTT and the AABB procedure on K antigen\*

|               | ×1 | ×2 | ×4 | ×8 | ×16 | ×32 | ×64 | ×128 |
|---------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|------|
| No treat      | 3+ | 2+ | 2+ | 1+ | 1+  | w+  | 0   | 0    |
| 0.01mol/l DTT | 2+ | 1+ | 1+ | w+ | 0   | 0   | 0   | 0    |
| AABB          | 0  | 0  | 0  | NT | NT  | NT  | NT  | NT   |

\* Anti-K antiserum was serially diluted and examined regarding its activity for RBC agglutination by tube testing.

NT = not tested.

Table 2 Effects of 0.01mol/l DTT and the AABB procedure on other RBC antigens in tube testing\*\*

|               | D  | C  | c  | E  | e  | Jk <sup>a</sup> | Jk <sup>b</sup> | Fy <sup>a</sup> | Fy <sup>b</sup> | M  | N  | S  | s  | Le <sup>a</sup> | Le <sup>b</sup> | P <sub>1</sub> | Di <sup>a</sup> |
|---------------|----|----|----|----|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----|----|----|----|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| No treat      | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+              | 2+              | 2+              | 2+              | 3+ | 3+ | 2+ | 3+ | 1+              | 2+              | 2+             | 2+              |
| 0.01mol/l DTT | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+              | 2+              | 2+              | 2+              | 3+ | 3+ | 2+ | 3+ | 1+              | 2+              | 2+             | 2+              |
| AABB          | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+              | 2+              | 2+              | 2+              | 3+ | 3+ | 2+ | 3+ | 1+              | 2+              | 2+             | 2+              |

\*\* Indicated RBC antigens were examined by specific antisera by tube testing.

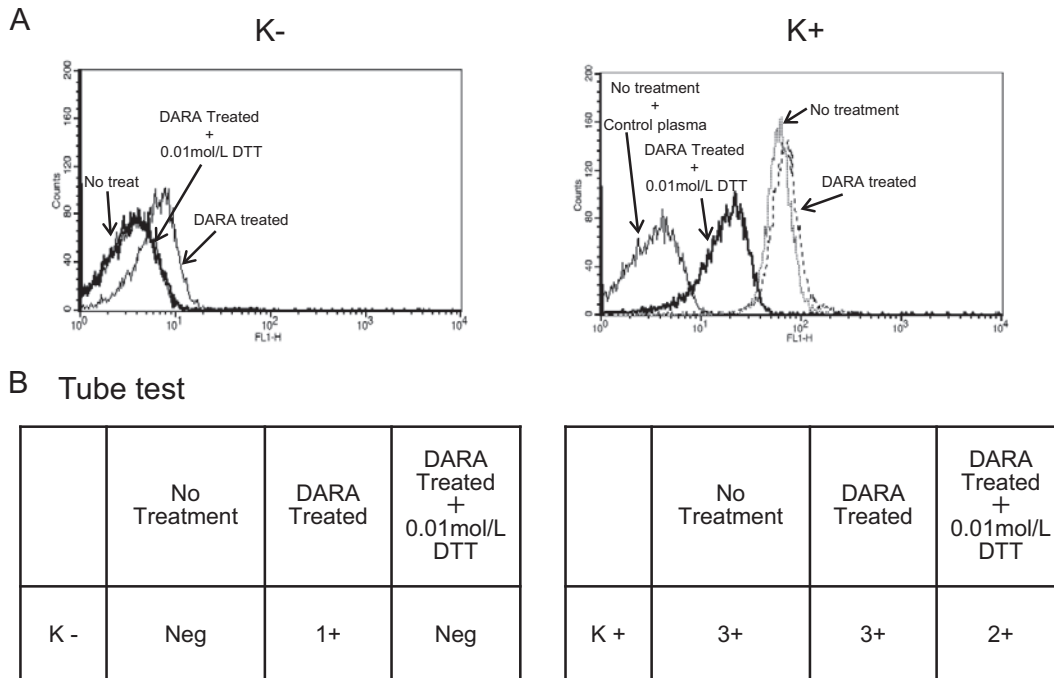


Fig. 4 DTT at 0.01mol/l treatment abolishes DARA binding but preserve K antigenicity.

(A) K- or K+RBCs were incubated with plasma DARA samples. DARA-treated RBCs were then incubated with 0.01mol/l DTT for 30 minutes at 37°C, and anti-K binding was examined by employing Alexa-goat anti-human IgG before (DARA treat) and after DTT treatment (DARA treated+0.01mol/l DTT, bold black line). K+RBCs incubated with control plasma are used as a negative control. (B) Results of tube testing for K antigenicity against K- and K+RBCs.

てDATが陽性となる可能性があるため、DARA感作赤血球においても大阪法(0.01mol/l DTT処理)でK抗原の表現型を決定出来るかを調べた。具体的には、DARA投与中MM患者の血漿とK+またはK-の赤血球をインキュベート後、自動血球洗浄遠心機を用いて生理食塩液で3回洗浄し、DARA感作血球を作製した。Fig.4に示すように、K-赤血球でさえDARAによる偽陽性反応のために抗K血清との反応が陽性となったが、0.01mol/l DTT処理(大阪法)後赤血球ではK抗原はDARAによる偽陽性反応の影響を受けずにK-と明確に同定された。従って、DARA投与後のMM患者においても大阪法(0.01mol/l DTT処理)を行う事で、DARAによる偽陽性反応をなくし、Kell抗原表現型の判定が可能であることが示された。

**MM患者における赤血球のCD38発現に対するDARA投与の影響**

DARA投与前、1日目および投与7日目または8

日目に試験管法によって3人のMM患者のDATを行った。1日目には、3人のMM患者のうち2人がw+となったが、7日目には3人の患者すべてがDAT陰性となった(Fig.5)。次に、これらの赤血球をFCMにて調べると、症例2,3においては、1日目にはDARAとの結合が明瞭に検出されたが、7日目および8日目にはDARAとの結合は著しく減少した。症例1においては、FCMにおいてDARAの結合は、投与前赤血球と比較して1日目でも増加しなかった(Fig.5)。これらの成績は、FCMの結果と試験管法の結果は一致する。

この3人の患者の血漿検体と赤血球試薬との反応では、毎回PEG-IATで陽性(1+)を示したが(結果は示さず)、DATにおいては7日目(または8日目)で陰性であった。この結果の不一致をさらに調べるために、DARA投与後の各患者赤血球にPE-抗CD38 MoAbまたはDARA投与患者血漿を加えた。DARA投与前赤血球とPE-抗CD38 MoAbとの結合量は、症例2およ

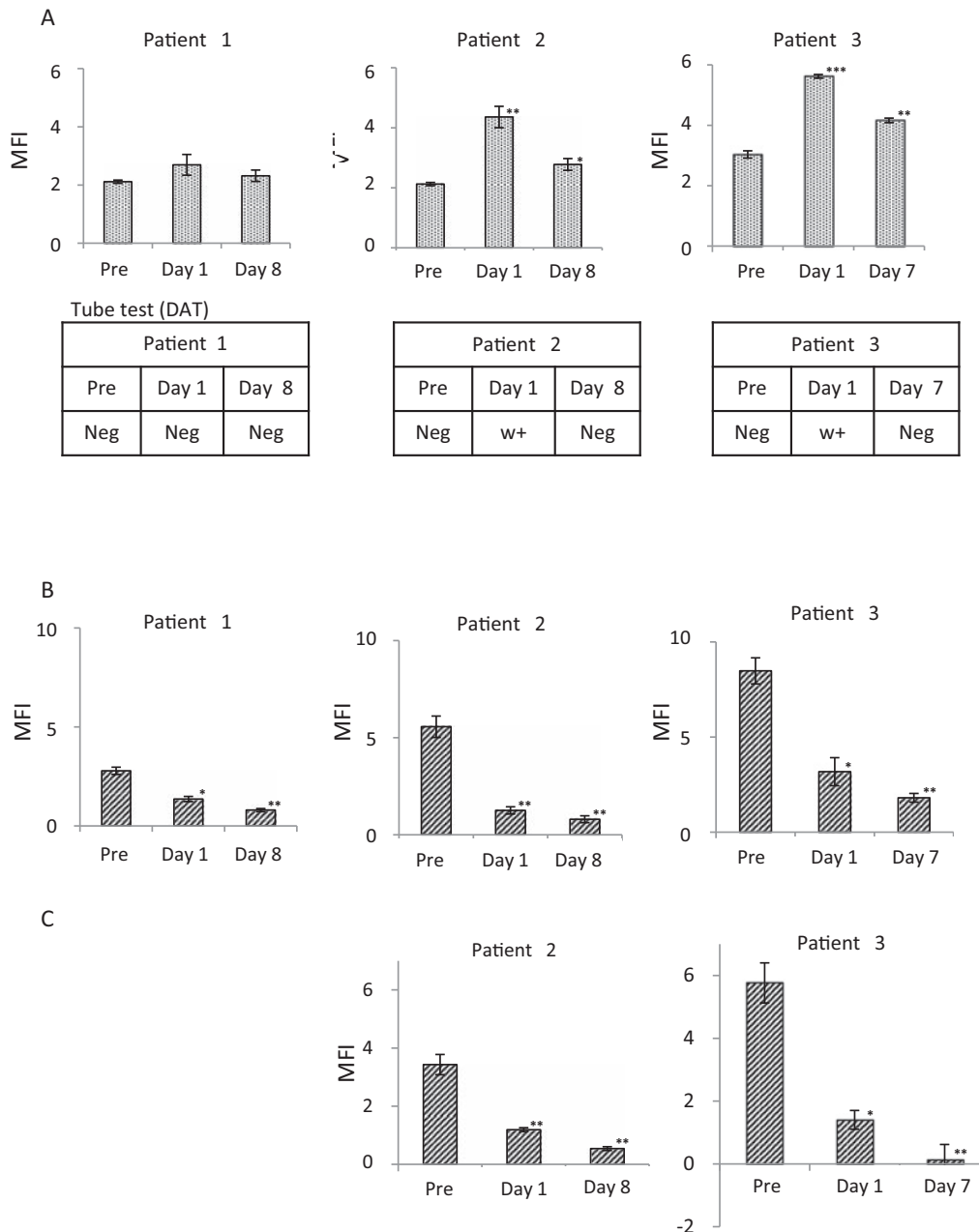


Fig. 5 Effects of DARA administration on RBC CD38 expression in MM patients.

(A) Amounts of DARA binding to RBCs obtained from three MM patients (Patient 1, 2, and 3) with DARA treatment were detected by Alexa-goat anti-human IgG and are shown as MFI (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Results of tube testing for DAT are indicated below. Comparison of DARA binding between pretreatment and after DARA treatment; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . (B) Amounts of specific PE-mouse anti-human CD38 MoAb binding to RBCs obtained from each MM patient are shown as MFI (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Comparison of PE-anti-CD38 MoAb binding between pretreatment and after DARA treatment; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . (C) Amounts of specific DARA binding to RBCs obtained from each MM patient after incubation with plasma DARA samples in vitro are shown as MFI (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Comparison of DARA binding between pretreatment and after DARA treatment; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

び症例3と比較して症例1では比較的低値であった。この成績は症例1の赤血球CD38の発現が少ないことを示している。症例1では赤血球CD38が低発現であったため、1日目のDATが陰性になったと考えられた。さらに、各患者において、7日目または8日目ではPE-抗

CD38MoAbとの結合量は著しく減少した(Fig. 5)。次に、DARA血漿を各患者の赤血球に加えたが、DARA投与7日目(または8日目)ではDARAの結合はほとんど増加しなかった。この成績は、DARAが赤血球表面上のCD38の発現を減少させている可能性を示唆して



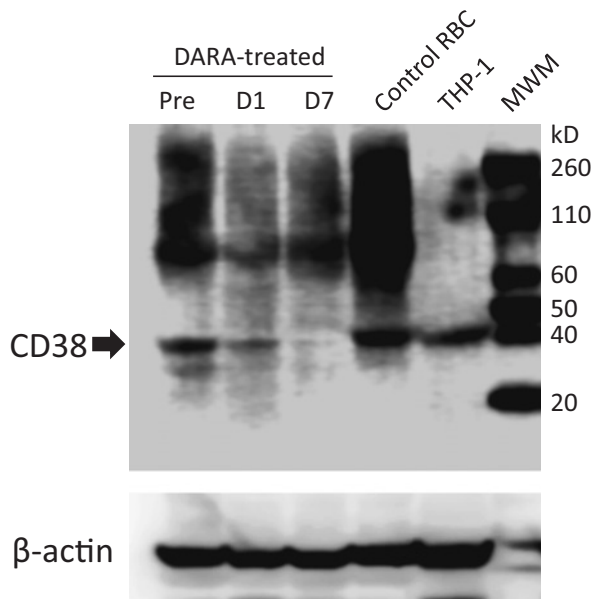


Fig. 6 Immunoblotting for CD38 expression in RBCs obtained from patient 3.

Pellets of RBC membranes were lysed with Laemmli sample buffer with 2-mercaptoethanol and separated on a 5% to 20% gradient gel by SDS-PAGE. CD38 was detected by a mouse anti-CD38 MoAb. Shown is a representative result of two independent experiments. RBCs obtained from a healthy control and THP-1 cells were used as positive controls. MWM=molecular weight marker.

いる。この可能性を調べるために、MM患者の赤血球をイムノプロット法にて解析した。Fig.6に示すように、DARA投与後1日目および7日目赤血球中のCD38の量が著しく減少することが明らかとなった。これらの成績は、DARAがin vivoでMM患者の赤血球のCD38の発現を消失させることを示している。

## 考 案

DARAおよび他のヒト化抗CD38 MoAbはその高い有効性により再発/難治性MM患者の治療薬としてそれらの需要が増えている。また、DARAの投与が中止されてからも最大6カ月間、DARAによる偽陽性反応が持続する可能性がある<sup>8)</sup>。したがって、輸血検査の観点からはDARAによる偽陽性反応を解消するため、ルーチン検査に取り入れやすい簡単で適切な方法の開発が必要である。そこで、AABB法の代わりとなる方法として、0.01mol/l DTTと自動血球洗浄遠心機を用いてKellの抗原性を保持し、DARAによる偽陽性反応を解消する大阪法をルーチン検査の簡便な方法として提示した。

ヒトCD38の細胞外ドメインは、タンパク質構造に重要な6つのジスルフィド結合(S-S結合)を持ち、CD38の構造はDTTのような還元剤に対して非常に感受性が

高いことが示されている<sup>14)15)</sup>。0.01mol/l DTTは、IgM抗体活性を壊すためのスルフヒドリル試薬として日常的に使用されている<sup>12)16)</sup>。そこで我々は、低濃度のDTTがKell血液型の抗原性を保持したまま、S-S結合を切断することでCD38の三次構造を壊し、DARAによる偽陽性反応を解消出来るか検討した。0.005mol/l DTTではDARAによる偽陽性反応が残ったが、0.01mol/l DTT(大阪法)では試験管法においてDARAによる偽陽性反応を解消できることを示した。さらに、AABB 0.01mol/l DTT法ではDARAによる偽陽性反応を解消できないことも明らかとなった。また、0.01mol/l DTT(大阪法)はFCMにおいてK抗原性の約25%を保持し、この発現レベルは試験管法によってK抗原を検出するのに十分な抗原量であることを示した。Kell抗原が保持出来る要因の一つとして、CD38と比較してその高い発現レベル(ヘテロ接合体で2,500~3,000分子/赤血球)に起因することが考えられる<sup>17)</sup>。大阪法と比較してAABB法ではK抗原は完全に壊され、また赤血球がより強いダメージをうけるために非特異的なIgG結合が増加した。さらに、大阪法の技術的な利点として、AABB法とは違い自動血球洗浄遠心機を使用し、PBS pH8.0を作製する必要がないことが挙げられる。大阪法では3%の血球試薬100μlを自動血球洗浄遠心機で3回洗浄し、packed cellを0.01mol/l DTT溶液の50μlと共にインキュベート後、自動血球洗浄遠心機で再び3回洗浄するのみであり、60分以内に終了することができる。

DARAおよび他のヒト化抗CD38 MoAbは、抗体依存性細胞傷害(ADCC)、抗体依存性細胞貪食(ADCP)および補体依存性細胞傷害(CDC)を含む古典的なFc依存性免疫エフェクター機序を有している。DARAは他のCD38 MoAbと比較して、MM細胞に対してCDCを誘導する能力がより高度である。また、DARAの認識エピトープはユニークであり、CD38の2つのβ鎖に含まれる233~266アミノ酸および267~280アミノ酸に存在する<sup>4)</sup>。しかし、赤血球に結合した抗CD38 MoAbに対するDTT処理の効果は、基本的にはDARAと市販のマウス抗ヒトCD38で同じであった。DARAおよびマウス抗ヒトCD38 MoAbの認識エピトープは両者とも大阪法で消失したことより、CD38の全ての抗原性が大阪法によって著明に減弱することが示唆された。我々の結果とは対照的に、HL60上に発現されたCD38の抗原性は0.005mol/l DTT処理に対して消失する<sup>7)</sup>。HL60上に異所的に発現させたCD38は、DTT処理に対してより脆弱である可能性が考えられる。

また、大阪法は赤血球にDARAが感作している場合でさえも、DARAによる偽陽性反応を解消し、Fig.4に示すようにKell抗原表現型を決定することが出来た

ことは注目に値する。したがって、大阪法により DARA 投与後のいつの時点においても、MM 患者の Kell 抗原表現型を決定することが可能であると考えられる。Berthelieer らは CD38 リガンドである NAD<sup>+</sup>によって誘導される CD38 の構造変化のために、NAD<sup>+</sup>の存在下では CD38 と抗 CD38 MoAb 結合は 0.01mol/l DTT にて減弱しなかったことを示している<sup>15)</sup>。しかしながら DARA の場合は異なっており、我々は DARA 結合時においても CD38 上のエピトープは、Fig. 4 に示すように大阪法にて消失することを示した。

我々はさらに、DARA 投与 MM 患者の赤血球上の CD38 発現を調べた。これまでの報告<sup>16)</sup>と同様に、DARA 投与中で血漿中に DARA が存在しても、DARA 投与患者では明らかな溶血所見を認めなかった（結果は示さず）。各患者の赤血球と DARA との結合は、投与後 1 日目には DAT 陽性となったが、7 日目または 8 日目には DAT は陰性化した。イムノプロット法では赤血球の CD38 量は 1 日目でも減少し、7 日目にほとんど検出されなくなった。従って、DARA 投与によって *in vivo* では赤血球 CD38 が消失することが、MM 患者において DARA による溶血所見を認めない理由として考えられた。DARA による赤血球 CD38 の消失メカニズムの詳細は不明であるが、いくつかのメカニズムが提唱されている<sup>17)</sup>。マウスモデルでは、典型的には Fcγ 受容体経路を介して抗体結合により標的抗原が消失することが示されている<sup>18)</sup>。また、骨髄腫細胞で示されている trogocytosis のように赤血球上の DARA-CD38 複合体が、単球および顆粒球に能動的に移動することに起因するかもしれない<sup>19)</sup>。正確なメカニズムを解明するためにはさらなる研究が必要である。

今後の課題として、大阪法を用いて DARA 投与中 MM 患者から得られた抗 K または抗 k の臨床検体を用いて、DARA による偽陽性反応解消後に抗 K または抗 k が検出できるかどうかを確認しなければならない。また、AABB 法は Kell 血液型抗体の検出が出来なくなるが、K 抗原が壊れることで DTT 処理が行われた品質管理指標を有する。しかし、大阪法を用いることで Kell 血液型抗体を検出出来るようになる反面、Kell 抗原が壊れることでの DTT 処理が行われたかどうかの品質管理指標を失うことになる。

本研究では、Kell 抗原の反応性は減弱はするもののその反応性は保持したまま、DARA による偽陽性反応を解消する、日常ルーチン検査として簡単で適切な方法（大阪法）を提示した。また、赤血球に DARA が感作している状態でも、大阪法により CD38 は抗原性を消失させることが出来る。我々の方法は、日々の輸血検査で DARA を含む血漿を処理する簡単な方法であると考えられた。

著者の COI 開示：柴山浩彦：講演料 (Janssen)。顧問報酬 (Janssen)。富山佳昭：講演料 (Janssen)。その他、記載すべき COI 無し。

謝辞：本研究は、日本文部科学省の科学研究費補助金と日本の厚生労働省の厚生労働科学研究費の助成を受けて行われた。

## 文 献

- 1) Nata K, Takamura T, Karasawa T, et al: Human gene encoding CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase): organization, nucleotide sequence and alternative splicing. *Gene*, 186: 285—292, 1997.
- 2) Malavasi F, Funaro A, Roggero S, et al: Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunol Today*, 15: 95—97, 1994.
- 3) Lin P, Owens R, Tricot G, et al: Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol*, 121: 482—488, 2004.
- 4) de Weers M, Tai YT, van der Veer MS, et al: Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol*, 186: 1840—1848, 2011.
- 5) Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, et al: Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 373: 1207—1219, 2015.
- 6) Lonial S, Weiss BM, Usmani SZ, et al: Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet*, 387: 1551—1560, 2016.
- 7) Chapuy CI, Nicholson RT, Aguad MD, et al: Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion*, 55: 1545—1554, 2015.
- 8) Oostendorp M, Lammerts van Bueren JJ, Doshi P, et al: When blood transfusion medicine becomes complicated due to interference by monoclonal antibody therapy. *Transfusion*, 55: 1555—1562, 2015.
- 9) Schmidt AE, Kirkley S, Patel N, et al: An alternative method to dithiothreitol treatment for antibody screening in patients receiving daratumumab. *Transfusion*, 55: 2292—2293, 2015.
- 10) Selleng K, Gebicka PD, Thiele T: F(ab')<sub>2</sub> fragments to overcome daratumumab interference in transfusion tests. *N Engl J Med*, 379: 90—91, 2018.
- 11) 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*, 56: 2964—2972, 2016.

- 12) Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, et al, eds: Technical manual, 18th ed, AABB, Bethesda (MD), 2014.
- 13) Piagnerelli M, Zouaoui Boudjeltia K, Brohee D, et al: Assessment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques. *J Clin Pathol*, 60: 549—554, 2007.
- 14) Zhao YJ, Lam CM, Lee HC: The membrane-bound enzyme CD38 exists in two opposing orientations. *Sci Signal*, 5: ra67, 2012.
- 15) Berthelie V, Laboureau J, Boulla G: Probing ligand-induced conformational changes of human CD38. *Eur J Biochem*, 267: 3056—3064, 2000.
- 16) 細川美香, 中山小太郎純友, 櫻木美基子, 他: 強い自己凝集を認めた低力価寒冷凝集素症に対する DTT 処理の有用性. *日本輸血細胞治療学会誌*, 63 : 716—722, 2017.
- 17) Jaber A, Blanchard D, Goossens D, et al: Characterization of the blood group Kell (K1) antigen with a human monoclonal antibody. *Blood*, 73: 1597—1602, 1989.
- 18) Sullivan HC, Gerner-Smidt C, Nooka AK, et al: Daratumumab (anti-CD38) induces loss of CD38 on red blood cells. *Blood*, 129: 3033—3037, 2017.
- 19) Krejcik J, Frerichs KA, Nijhof IS, et al: Monocytes and Granulocytes Reduce CD 38 Expression Levels on Myeloma Cells in Patients Treated with Daratumumab. *Clin Cancer Res*, 23: 7498—7511, 2017.

## **DISTINCT EFFECTS OF DARATUMUMAB ON INDIRECT AND DIRECT ANTIGLOBULIN TESTS: A NEW METHOD EMPLOYING 0.01 mol/l DITHIOTHREITOL FOR NEGATING THE DARATUMUMAB INTERFERENCE WITH PRESERVING K ANTIGENICITY (OSAKA METHOD)**

*Mika Hosokawa*<sup>1)</sup>, *Hirokazu Kashiwagi*<sup>2)</sup>, *Kotarosumitomo Nakayama*<sup>1)</sup>, *Mikiko Sakuragi*<sup>1)</sup>, *Mayumi Nakao*<sup>1)</sup>, *Tamayo Morikawa*<sup>1)</sup>, *Tomoko Kiyokawa*<sup>1)</sup>, *Hiroshi Aochi*<sup>1)</sup>, *Keisuke Nagamine*<sup>1)</sup>, *Hirohiko Shibayama*<sup>2)</sup> and *Yoshiaki Tomiyama*<sup>1)2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Blood Transfusion, Osaka University Hospital

<sup>2)</sup>Department of Hematology and Oncology, Osaka University Graduate School of Medicine

### **Keywords:**

Daratumumab, 0.01 mol/L DTT, Automatic blood cell washing centrifuge, CD38, Preserving K antigenicity