

大阪法によるダラツムマブ干渉の解消例：他院での治療歴入手に苦慮した 骨髄腫症例

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

ダラツムマブは CD38 を認識する IgG1κ モノクローナル抗体であり、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が、間接抗グロブリン試験における輸血検査干渉に関しては、ダラツムマブ投与中止後も 6 カ月間程度持続する可能性がある。今回我々は、汎反応性の不規則抗体を検出し精査を進めるも、当院でのダラツムマブ投与歴が無い時間時間を要したが、他院での詳細な病歴入手と大阪法 (0.01mol/l DTT) によりダラツムマブの輸血検査への干渉であることを確認できた症例を報告する。

患者は 60 歳、日本人女性の多発性骨髄腫症例で、他院での治療歴があり同種骨髄移植目的で当院転院となった。入院時の不規則抗体スクリーニングは陽性で汎反応性であり、患者情報を確認したが、当院でのダラツムマブ投与歴はなかった。さらに患者情報の収集に努めると、他院にて約半年間ダラツムマブが投与されており、投与中止から約 3 カ月経過していることが判明した。筆者らが開発した大阪法で検討した結果、高頻度抗原に対する抗体と考えられた抗体はダラツムマブによる輸血検査への干渉であることを確認出来た。大阪法は簡便で、ダラツムマブの干渉の解消法として有用であると考えられた。

キーワード：ダラツムマブ、大阪法、0.01mol/l DTT

はじめに

多発性骨髄腫は、骨髄中で形質細胞が腫瘍性に増殖する悪性疾患であり、多発性骨髄腫細胞において 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では CD38 の発現が比較的 low、CD38 が多発性骨髄腫の治療において優れた分子標的になると考えられる¹⁾²⁾。実際、CD38 に対するヒト化 IgG1κ モノクローナル抗体、ダラツムマブ (daratumumab, ヤンセンファーマ株式会社) は、再発または難治性多発性骨髄腫の治療薬として日本では 2017 年 9 月、米国では 2015 年 11 月に承認されており、優れた臨床成績が示されている^{3)~5)}。

しかしながら輸血検査の観点からは、CD38 は赤血球膜上に弱く発現しており、ダラツムマブが赤血球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ため、大きな問題となっている (ダラツムマブによる輸血検査への干渉)⁶⁾⁷⁾。ダラツムマブの輸血検査への干渉を解消する方法として、種々の方法が提唱されているが、0.2mol/l Dithiothreitol (DTT) を用いた赤血球の処理は、CD38 の三次構造を破壊することでダラツムマブによる干渉を解消する有効な方法として世界において汎用されている (以下 AABB 法)⁶⁾。しかしながら、0.2mol/l DTT による検査は時間も手間も掛かるため、その導入は決して容易ではない。我々はダラツムマブの干渉を解消するより簡便な方法として、0.01mol/l DTT と自動血球洗浄装置を用いた方法 (以下大阪法) を新たに開発し発表した⁸⁾。

今回、不規則抗体検査で高頻度抗原に対する抗体が示唆された骨髄腫症例に対して精査を進めるも、当院でのダラツムマブ投与歴が無い時間時間を要したが、前院にて約半年間ダラツムマブが投与されていたことが判明し、0.01mol/l DTT を用いた大阪法にて検討した結果、高頻度抗原に対する抗体と考えられていた抗体がダラツムマブによる輸血検査への干渉であることを確認出来た症例を経験した。大阪法の詳細も含め報告する。

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：2019 年 1 月 23 日、受理日：2019 年 2 月 22 日〕

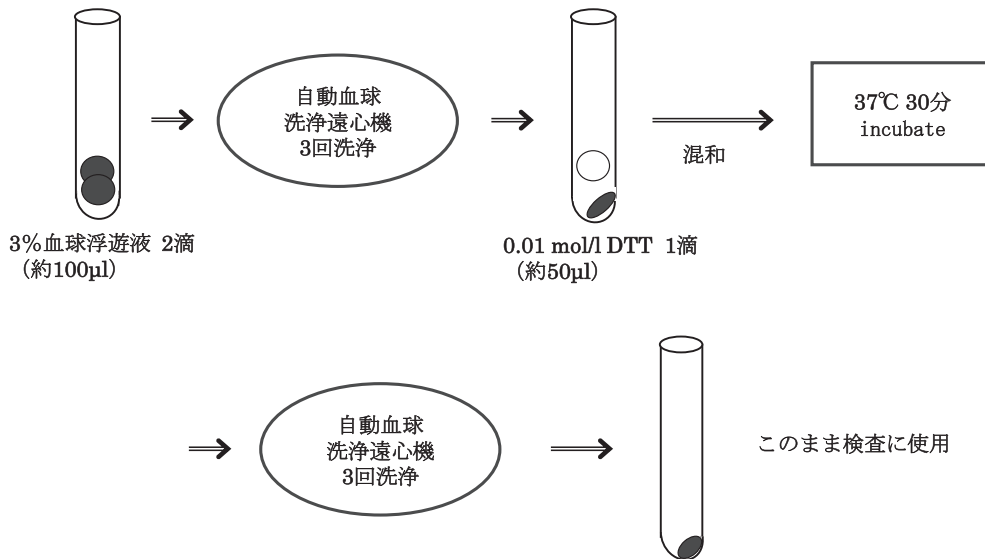


図1 大阪法 (0.01mol/l DTT 使用) による DTT 処理血球作製方法

1. pH7.3 PBS を用いて 0.01mol/l DTT を作製
2. 3～5% 赤血球浮遊液 2 滴 (約 100 μ l) を生理食塩液で 3 回洗浄 (自動血球洗浄遠心機を使用)
3. 0.01mol/l DTT 溶液 1 滴 (約 50 μ l) を添加
4. 37 $^{\circ}$ C, 30 分間加温
5. 生理食塩液で 3 回洗浄 (自動血球洗浄遠心機を使用)
6. pack cell を DTT 処理赤血球として使用

症 例

60 歳女性, O 型 RhD 陽性, 輸血歴あり, 妊娠歴あり.

20XX 年多発性骨髄腫と診断され, 他院にて 2 度の自己末梢血幹細胞移植を実施するも再燃を認め, 同種骨髄移植施行目的で当院へ紹介入院となった.

方 法

1) 不規則抗体検査

不規則抗体スクリーニング検査はスクリーニング血球 (スクリーンサイト Di⁺, カイノス) を用いて, 生理食塩液法と PEG 間接抗グロブリン試験 (PEG-indirect antiglobulin test : PEG-IAT) を実施した.

不規則抗体同定検査ではパネル血球 (リゾルブ パネル A, オーソ) を用いて実施した.

2) 大阪法 (0.01mol/l DTT 使用) を用いた DTT 処理血球の作製

図 1 に大阪法の概要を示す. PBS (pH 7.3) を用いて DTT を 0.01mol/l に調製. 試験管に 3～5% 赤血球浮遊液を 2 滴 (約 100 μ l) 滴下し, 自動血球洗浄遠心機 (himac MC450, Hitachi Koki Co., Ltd.Tokyo, Japan) を用いて生理食塩液にて 3 回洗浄後, 洗浄した packed cell に 0.01mol/l DTT 溶液を 1 滴 (約 50 μ l) 加え, 37 $^{\circ}$ 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にて 3 回洗浄し, packed cell をそのまま DTT 処理血球として検査に用いた.

結 果

1) 入院時の検査データ

患者の入院時の検査データを表 1 に示す. 末梢血液検査では Hb 8.4g/dl, Plt $3.9 \times 10^4/\mu$ l と貧血及び血小板数の低下を認め, 生化学検査では IgA の著明な増加と IgG, IgM の著明な減少が認められた. M 蛋白は IgA- κ 型であった.

2) 入院時の不規則抗体検査

生理食塩液法と PEG 間接抗グロブリン試験 (PEG-indirect antiglobulin test : PEG-IAT) で不規則抗体検査を実施したところ, 生理食塩液法陰性, PEG-IAT では全ての血球で w+~1+ の凝集を認め, 自己対照は陰性であり, 高頻度抗原に対する抗体を疑い精査を進めた. PEG-IAT での結果を表 2 に示す.

3) 患者情報

骨髄腫患者で同種骨髄移植予定の症例で, 当院でのダラツムマブ投与歴はなかった.

不規則抗体検査の精査を進めつつ, さらに患者情報の収集に努めると前院にてダラツムマブが投与されていたことが判明した. 前院ではダラツムマブが約半年間投与され, 当院へ入院する約 3 カ月前に投与終了となっていた.

4) 大阪法による DTT 処理血球を用いた不規則抗体検査 (表 2)

大阪法 (図 1) にて処理した DTT 処理血球を用いて不規則抗体検査を実施すると, PEG-IAT での凝集は消

表1 入院時の検査所見

末梢血		Ca	8.9 mg/dl
WBC	3,430 / μ l	IP	4.0 mg/dl
Seg	76 %	Mg	2.3 mg/dl
Eo	0 %	BUN	12 mg/dl
Ba	0 %	UA	4.6 mg/dl
St	0 %	Cr	0.75 mg/dl
Lym	14 %	推定 GFR	60.6 ml/min/1.73m ²
Mo	10 %	T-Bil	0.5 mg/dl
RBC	267 \times 10 ⁴ / μ	D-Bil	0.1 mg/dl
Hb	8.4 g/dl	I-Bil	0.4 mg/dl
Ht	26.5 %	CRP	3.33 mg/dl
MCV	99.3 fl	TP	8.2 g/dl
MCH	31.5 pg	Alb	2.3 g/dl
MCHC	31.7 %	血清蛋白分画	
Plt	3.9 \times 10 ⁴ / μ l	Alb	36.1 %
生化学		α -globulin	5.9 %
AST	17 U/l	α_2 -globulin	9.8 %
ALT	27 U/l	β -globulin	44.9 %
γ GTP	47 U/l	γ -globulin	3.3 %
ALP	288 U/l	IgG	150 mg/dl
LD	142 U/l	IgA	2,861 mg/dl
LAP	95 U/l	IgM	27 mg/dl
ChE	191 U/l	κ 型 FLC	9.2 mg/l
CK	17 U/l	λ 型 FLC	0.6 mg/l
Amylase	57 U/l	β_2 MG	5.3 μ g/ml
Glucose	107 mg/dl		
Na	140 meq/l		
K	3.8 meq/l		
Cl	102 meq/l		

表2 入院時の不規則抗体検査

Cell #	D	C	E	c	e	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Xg ^a	Le ^a	Le ^b	S	s	M	N	P ₁	未処理血球		DTT 処理血球 (大阪法)			
																				PEG/IAT	IgG 感作血球	PEG/IAT	IgG 感作血球		
1	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	1+	nt	0	+	
2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	1+	nt	0	+
3	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	0	W+	nt	0	+
4	+	0	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+	0	0	0	+	
5	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	1+	nt	0	+
6	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	
7	0	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	1+	nt	0	+
8	0	0	0	+	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	1+	nt	0	+
9	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	1+	nt	0	+
10	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	1+	nt	0	+
11	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	
Auto cell																						0	+	0	+

* 血球試薬はパネル血球 (リゾルブ パネル A, オーソ) を使用

* nt : not tested

失し、ドラツムマブによる輸血検査干渉であり、不規則抗体検査は陰性であることが判明した。その後、約1カ月後(ドラツムマブ投与終了から約4カ月後)ドラツムマブによる輸血検査への干渉は消失した。

5) 赤血球輸血

当院でドラツムマブによる輸血検査への干渉が持続

している間にRBC2単位の輸血が計3回施行された。輸血前後のHb, LD, I-Bilの推移を図2に示す。Hbは3回の輸血全てにおいて上昇しており、輸血効果がみられた。LDやI-Bilは正常値範囲内であり目立った上昇はなく溶血所見は認められなかった。また副作用もみられなかった。

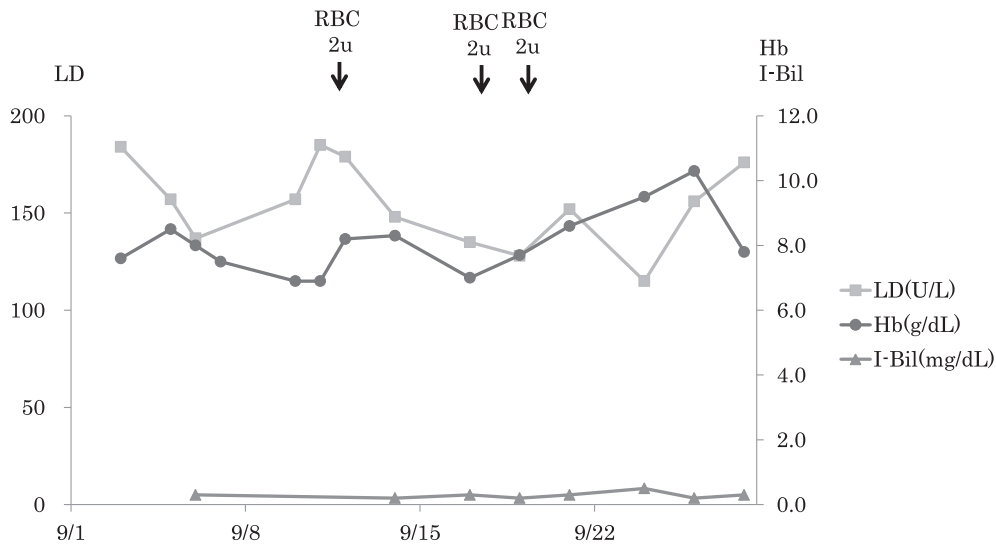


図2 赤血球輸血前後の検査データ

本症例において、ダラツムマブの輸血検査への干渉が認められた時の赤血球輸血に伴う検査データの推移を示す。溶血所見を認めず、輸血効果も得られた。

表3 AABB法と大阪法でのDTT処理血球作製法の比較

	AABB法	大阪法
DTT 作製 PBS pH	pH 8.0	pH 7.3
DTT 濃度	0.2mol/l	0.01mol/l
赤血球試薬量	8 滴 (約 400μl) 赤血球 1 容	2 滴 (約 100μl)
洗浄操作	手洗浄	自動血球洗浄遠心機
DTT 試薬添加量	1 滴 (約 50μl) DTT 4 容	1 滴 (約 50μl)
インキュベート	37℃ 20 ~ 30 分	37℃ 30 分
使用時	3 ~ 5% に調製後使用	そのまま使用
検査終了までの所要時間	約 2 時間	1 時間以内

考 案

ダラツムマブはその高い有効性により再発/難治性骨髄腫患者の治療薬として需要が増えている。ダラツムマブによる輸血検査干渉に関しては、ダラツムマブ投与中止後も6カ月程度持続する可能性がある⁷⁾。したがって、今回示した症例のように自施設でダラツムマブが投与されていない場合においても、過去に遡りダラツムマブが投与されていないか確認する必要がある。ダラツムマブ投与歴が不明な場合、自己対照が陽性の場合には温式自己抗体、自己対照が陰性の場合には高頻度抗原に対する抗体に対しての精査を進める必要があり、多大な時間と労力を要する恐れがある。自施設内での情報の共有はもちろんであるが、他施設の情報入手することは困難な場合もあるもののその情報入手は重要である。

ダラツムマブを投与されていた患者が救命救急等に交通外傷や骨髄腫以外の疾患により搬送された場合は特に情報量が乏しく、かつ輸血を急ぐ場合もあり、他施設間においても情報を共有するための有効な手段を

考えておく必要がある。情報を共有するための手段として輸血関連情報カード(日本輸血・細胞治療学会)やダラザレックス[®]患者IDカード(ヤンセンファーマ株式会社)があるが、これらのカードを患者が携帯することで輸血検査に影響を与える薬剤情報の共有化が図られ、精査をスムーズに行うことが出来、輸血開始の遅延を回避出来る有効な手段であると思われる。一方で、情報を共有するための手段が講じられたとしても、必ずしも情報が伝わるとは限らないため、IATで汎凝集反応を示した場合、温式自己抗体や高頻度抗原に対する抗体を疑うと同時に、ダラツムマブ干渉の可能性も念頭において精査を進めなければならない。特に骨髄腫患者においては注意が必要であると考えられる。

ダラツムマブによる輸血検査干渉を解消する方法として、0.2mol/l DTTを用いたAABB法を初めとして、トリプシン処理した赤血球、可溶性CD38または抗イデオタイプ抗体によるダラツムマブの中和、臍帯赤血球の使用、さらにはダラツムマブのF(ab')₂の使用など、多くの手法が提案されている^{6)~11)}。しかしながら、これ

らの方法は煩雑でありルーチン業務には不向きである。表3にAABB法と大阪法の比較を示す。AABB法ではpH8.0のPBSを用いてDTTを調製しなければならずpHの調整が必要であったが、大阪法では一般的に用いられているpH7.3のPBSを使用しておりpHの調整を必要としない。また、赤血球試薬量を2滴に減量することで自動血球洗浄遠心機が使用可能となり、人手が必要なく、時間も短縮される。さらに、AABB法ではDTT処理後、3~5%に血球濃度を調製しなければならないが、大阪法では最終のpacked cell量が約3 μ lとなるため血球濃度の調整を必要とせず、そのまま用いることが出来る。このようにAABB法は手洗浄であり検査結果を得るまでに約2時間程度要していたが¹¹⁾、大阪法では煩雑さがなくなり1時間以内に検査結果を得ることが出来る。

本症例でもDARA投与患者と判明してから大阪法を用いてDTT処理血球を作製したことで、1時間以内で不規則抗体陰性であることが判明している。AABB法(0.2mol/l DTT処理)に比べ大阪法は、短時間かつ簡便にDTT処理を行うことが出来るため、ルーチン検査時だけでなく、当直帯等で人手が足りない場合や、外来患者等で輸血を急ぐ場合には非常に有用であると思われた。

ドラツムマブによる輸血検査への干渉が存在する時のRBC輸血は、輸血製剤の赤血球CD38にドラツムマブが反応し溶血所見などが出現する可能性が懸念されたが、本症例ではRBC2単位の輸血を計3回施行したものの、溶血所見は出現せず、Hbも上昇し輸血効果が得られた。ドラツムマブ投与中のRBC輸血の安全性に関しては、今後も症例を重ね検討する必要があると考えられる。

結 語

本症例はドラツムマブ投与歴が不明な骨髄腫症例であり、不規則抗体検査で高頻度抗原に対する抗体が示唆され精査を進めたが、前院にて約半年間ドラツムマブが投与されていたことが判明し、大阪法にてドラツムマブによる輸血検査への干渉であることを確認出来た症例であった。ドラツムマブの投与が中止されてからも6カ月程度、ドラツムマブによる偽陽性反応が持続する可能性があるため、各施設内での情報の共有はもちろんであるが、他施設の情報を入手することは困難な場合もあるが重要となり、情報を共有するための有効な手段を考えておく必要がある。また、大阪法は短時間かつ簡便にDTT処理を行うことが出来るため、ルーチン検査時だけでなく人手が足りない場合や輸血を急ぐ場合には非常に有用であると思われた。

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：本論文の一部は厚生労働科学研究費助成金(H29-難治等(難)-一般-012)および日本学術振興会科学研究費助成金(18K08326)の助成を受けた。

文 献

- 1) Malavasi F, Funaro A, Roggero S, et al: Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunol Today*, 15: 95—97, 1994.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, et al: Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 373: 1207—1219, 2015.
- 5) 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.
- 6) Chapuy CI, Nicholson RT, Aguad MD, et al: Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion*, 55: 1545—1554, 2015.
- 7) 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.
- 8) Hosokawa M, Kashiwagi H, Nakayama K, et al: Distinct effects of daratumumab on indirect and direct antiglobulin tests: A new method employing 0.01 M dithiothreitol for negating the daratumumab interference with preserving K antigenicity (Osaka method). *Transfusion*, 58: 3003—3013, 2018.
- 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')₂ 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.

OSAKA METHOD (0.01 mol/l DTT) EFFECTIVELY NEGATES DARATUMUMAB INTERFERENCE: A PATIENT WITH MULTIPLE MYELOMA AND DIFFICULT-TO-OBTAIN PREVIOUS MEDICAL HISTORY

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

¹⁾Department of Blood Transfusion, Osaka University Hospital

²⁾Department of Hematology and Oncology, Osaka University Graduate School of Medicine

Abstract:

There is increasing demand for daratumumab (DARA), a humanized IgG1κ monoclonal antibody to CD38 approved for the treatment of relapsed and/or refractory multiple myeloma (MM). However, DARA interference in indirect antiglobulin tests (IATs) may persist for up to 6 months after discontinuation of DARA. Here, we describe a patient with MM with pan-reactive antibody in an antibody screening test and no history of DARA administration at Osaka University Hospital. We confirmed that the suspected pan-reactive antibody was due to DARA interference based on her medical history of DARA administration in a previous hospital and negated the positive reaction in IATs using the Osaka method (0.01 mol/l DTT).

The patient was a 60-year-old Japanese female who had been suffering from MM. She was referred to Osaka University Hospital for allogeneic bone marrow transplantation following relapse despite treatment at a previous hospital. The antibody screening test performed at admission was positive and pan-reactive. However, there was no indication of any history of DARA administration at our hospital. We tried to obtain her medical history in the previous hospital further and noted that DARA had been administered for 6 months, and that 3 months had elapsed since the discontinuation of DARA. By employing the newly developed Osaka method, we confirmed that the suspected pan-reactive reaction was due to DARA interference. This case report suggests that the Osaka method is easy to perform and effective for negating DARA interference.

Keywords:

daratumumab, Osaka method, 0.01 mol/l DTT