

不規則抗体スクリーニング赤血球試薬の DTT 処理後の赤血球抗原保存性の検討

奥田 誠 町田 保 栗林 智子 山田由香里 日高 陽子
 遊佐 貴司 祖父江晃基 田中 美里 瀬崎 晴美 石橋 瑞樹
 齋藤 光平 館野 友紀 塩野 則次

Daratumumab (DARA) は多発性骨髄腫の骨髄腫細胞に多く発現している CD38 に特異的に結合し治療効果を認める薬剤である。CD38 はヒト赤血球表面上に発現しており、DARA 投与後の血清を用いた不規則抗体スクリーニングや交差適合試験では汎凝集反応を呈することが判っている。今回の検討は DARA の非特異反応を回避し、かつジチオスレイトール (Dithiothreitol : DTT) により臨床的に問題となる抗原が変性しない至適濃度について検討した。次いで、DTT 処理したスクリーニング赤血球試薬の保存について併せて検討を行った。

方法：DTT 濃度と DTT を溶解するリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) の pH を調整し、至適な条件を設定した。また調製後の DTT 処理赤血球の保存性について血清学的および光学的に抗原反応性を確認した。

結果：DTT 濃度の至適濃度は 0.01mol/l、DTT を溶解する PBS は pH7.0 以上であれば問題なく CD38 の変性が確認できた。同時に Kell 血液型抗原についてはやや抗原性は低下するが検出は可能であった。DTT 処理赤血球の保存性については、DTT 処理後 28 日目であっても主要抗原の抗原性は確認できた。

考察：DTT 処理赤血球試薬の調製は都度実施するのが煩雑である。不規則抗体スクリーニング赤血球試薬を DTT 処理後、保存が可能であれば、検査室で都度の DTT 処理の作業が軽減でき、効率の良い検査が可能である。

キーワード：DTT, CD38, Daratumumab, 間接抗グロブリン試験, スクリーニング赤血球の保存

はじめに

Daratumumab (DARA) は、ヒト化抗 IgG1κ 型 CD38 抗体であり、多発性骨髄腫 (MM) の治療薬剤である^{1)~4)}。CD38 が比較的多く発現している骨髄腫細胞に作用し、主に CDC (Complement-Dependent Cytotoxicity : 補体依存性細胞傷害)、ADCC (Antibody-Dependent-Cellular-Cytotoxicity : 抗体依存性細胞傷害)、apoptosis 誘導体等の機序により死滅させる^{1)~4)}。CD38 は骨髄腫細胞以外にも、多くの組織や細胞に分布し、赤血球上にも発現する^{5)~8)}。DARA 投与により、患者血清中の抗 CD38 がスクリーニング赤血球試薬または提供者赤血球に感作し、間接抗グロブリン試験 (IAT) を用いた不規則抗体検査、交差適合試験において陽性反応を生じることが判っている^{5)~8)}。

この抗 CD38 による陽性反応への対策として、0.2mol/l ジチオスレイトール (Dithiothreitol : DTT) を用いて赤血球を処理することで、赤血球上の CD38 の三次元構造が破壊され、上述の輸血関連検査が実施できる⁹⁾。一方で、0.2mol/l DTT は、Kell 抗原を変性させるため、Kell 血液型抗原に対する不規則抗体を検出することは

出来ない¹⁰⁾¹⁶⁾。Kell 血液型抗原に対する不規則抗体は、溶血性輸血反応を引き起こす原因となる抗体であるが、日本人での K 抗原発現率は 0.01~0.02%¹¹⁾であるため、抗 K については重要視されていない。しかし、欧米の K 抗原の発現頻度は 9% に認められ、また溶血性輸血反応の原因となるため、Kell 血液型抗原に対する不規則抗体の検出が重要になる¹⁰⁾¹²⁾。

Chapuy CI らは、DARA による IAT の影響を回避する目的で、2015 年に DTT を使用した国際サーベイを実施した¹³⁾。この方法では pH の調製が必要とする pH 8.0 のリン酸緩衝液 (PBS) を使用することや、赤血球の洗浄作業が煩雑で、全作業時間がかかることが問題点である。

2018 年に Sigle JP らは、0.2mol/l 濃度の DTT を用いた赤血球を保存液に浮遊することで赤血球の主要抗原の保存性について報告している¹⁴⁾が、0.2mol/l 濃度の DTT を用いることは前記のごとく Kell 血液型抗原の変性に繋がる¹⁰⁾。

Branch DR らは DTT の濃度による Kell 血液型抗原の変性について検討している。0.01mol/l 濃度の DTT

ではK抗原の活性が75%程度は担保できると報告している¹⁵⁾。また, Hosokawa M ら¹⁷⁾は0.01mol/l 濃度のDTTを用いた赤血球の処理について報告している。本方法は自動血球洗浄装置を用い、煩雑な操作を回避でき、かつCD38の変性とKell抗原の保存性について述べている。非常に簡便な手法として報告している。そこで、我々は赤血球をDTT処理に使用するDTTの濃度をHosokawa M らの方法に準じ、0.01mol/l を基準として本濃度が有効であることを検証するとともに、より低濃度のDTT処理の有効性について検討した。更に、我々は臨床的に重要であるKell血液型抗原に対する抗体を適切に検出することが重要と考え、赤血球のDTT処理に適したpHとDTT濃度を同定することを目的にした。また、Hosokawa M らは、DTT処理赤血球の保存性については言及していない。このため、本研究では不規則抗体スクリーニング赤血球試薬のDTT処理後の保存による各種赤血球の抗原性について血清学的に観察し、0.01mol/l 濃度のDTT処理によるスクリーニング赤血球は長期の保存においても不規則抗体検査に使用可能であるかを検討した。

対象および方法

1) 赤血球試薬および抗体試薬

不規則抗体検査で使用するスクリーニング赤血球試薬は、納品直後のオーソサージスクリーン®(オーソ・クリニカル・ディアグノスティックス株式会社, 東京), DiaCell I+II+III, DiaCell Di® (Diego) Positive (バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社, 東京) およびパノセル-16(株式会社イムコア, 東京)を使用した。また抗体試薬としては、ダイアクローン抗E(バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社, 東京), オーソ抗D血清(オーソ・クリニカル・ディアグノスティックス株式会社, 東京), オーソ抗K血清(オーソ・クリニカル・ディアグノスティックス株式会社, 東京), Anti-Fy^b human(バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社, 東京), オーソ抗Di^a血清(オーソ・クリニカル・ディアグノスティックス株式会社, 東京)を添付文書に則り使用した。Daratumumab (DARA) は, Janssen Research & Development, LLC と 東 邦 大 学 で Material Transfer Agreement により DARA20mg/ml の研究用譲渡契約を結び、CD38の反応性の確認として使用した。DARAを使用し検討を行うために、東邦大学医療センター大森病院倫理委員会の承認(審査番号M18190)を受けている。

2) 0.2mol/l DTT 溶液の調製

Dithiothreitol (DTT)(関東化学株式会社, 東京) 1gをPBS 32mlで溶解し、セラムチューブ(2ml)容器に分注し、使用時まで-80℃で凍結した。

3) DTT 濃度における抗原性の変化および DTT 調製に使用するリン酸緩衝生理食塩液(PBS)のpHに関する検討

DTTの赤血球処理はAABBテクニカルマニュアルの手法¹⁶⁾に則り行った。0.2mol/l DTTを使用し、0.2mol/l, 0.01mol/l, 0.005mol/l, 0.0025mol/l, 0.00125mol/l 濃度に希釈し、DTT溶液に抗原が耐性であるE抗原, DTT溶液による変性する可能性のあるK抗原およびCD38の反応を観察した。続けてDTTの至適濃度を設定後、pH 8.0, 7.2, 7.0, 6.0, 5.0としたDTT溶液を作成し、前記同様にE抗原, K抗原, CD38の抗原性を血清学的に観察した。

4) DTT 処理直後のK抗原およびCD38のMFI値の変化

光学的に抗原性を確認するために、10種類のK抗原陽性の赤血球試薬を使用した。DTT処理直後および未処理の赤血球についてFACS CantoII フローサイトメータ(ベックマンコールター株式会社, 東京)で平均蛍光強度(MFI)値を計測し評価を行った。一次抗体として、K抗原にはオーソ抗K血清(オーソ・クリニカル・ディアグノスティックス株式会社, 東京), CD38には最終濃度5μg/ml 濃度のDARAを、K抗原は抗体試薬の添付文書に則り反応させた。DARAはpolyethyleneglycol (PEG)を反応増強剤とし、添付文書の指示に従い、37℃15分間反応させたのち生理食塩液で4回洗浄した。K抗原は反応後生理食塩液で3回洗浄した。DARAの陰性対照は0.2mol/l DTTで処理した赤血球試薬、K抗原陰性の赤血球試薬をそれぞれ使用した。標識二次抗体試薬として、PE-anti-human IgG Fc Antibody (Bio Legend 社, San Diego)を使用しFCM解析を実施した。

5) DTT 処理赤血球の保存のための調製方法について

DTT処理済み赤血球抗原の保存のための調製方法について検討した。使用する赤血球は不規則抗体スクリーニングに用いる赤血球試薬を使用した。赤血球試薬は3%濃度および0.8%濃度について検討を行った。DTT処理済み3%および0.8%赤血球浮遊液の調製法はFig. 1に準じて調製を行った。

操作手技を以下に示す。

- (1) 清潔なチューブに3%濃度の赤血球を1ml分注する。
- (2) 3,000回転, 5分間遠心する。
- (3) 遠心後の上清(保存液)を清潔なチューブに一時保存する。(0.8%浮遊液調製の場合は上清を廃棄)
- (4) 赤血球沈渣(30~50μl)に対し、pH7.2 0.01mol/l DTT溶液を120μl添加し、良く混和する。
- (5) 37℃, 30分間反応させる。その際適宜攪拌する。
- (6) 3,000回転, 5分間遠心し上清を除去する。

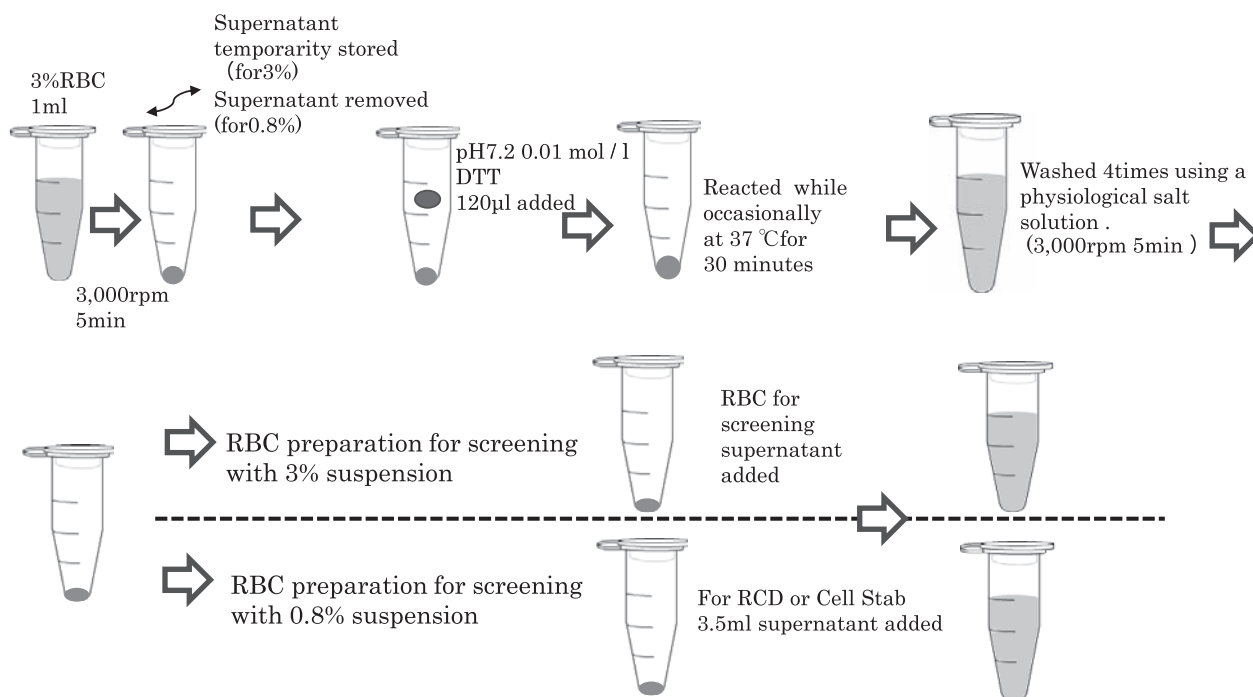


Fig. 1 Adjustment method (3% and 0.8% suspension) for screening of RBC reagents using DTT treatment

(7) 赤血球沈渣に対し、生理食塩液 1ml を加え洗浄を行う。(3,000 回転、5 分間遠心し、4 回繰り返す)

(8) 3% 赤血球浮遊液を調製する場合は、赤血球沈渣に (3) で一時保存してある上清 (保存液) を移し調製する。

0.8% 赤血球浮遊液を調製する場合は、赤血球沈渣に 0.8% RCD (オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス株式会社、東京) または Cell Stab (パイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社、東京) を 3.5ml 添加し調製した。

6) DTT 処理済み 3% および 0.8% 赤血球浮遊液の保存による各種抗原の変化

3% および 0.8% スクリーニング赤血球の反応性について、3% DTT 処理赤血球は試験管法 (TT), 0.8% DTT 処理済み赤血球はカラム凝集法 (CAT) にて実施した。抗原の確認は、D 抗原、K 抗原、Fy^b 抗原、Di^a 抗原および CD38 の反応性を確認した。それぞれの抗原は抗体試薬の添付文書に従い反応させた。また CD38 に関しては、DARA を最終濃度 5μg/ml に調製し試験管法で Polyethyleneglycol-indirect antiglobulin test (PEG-IAT) にて実施した。調製済みのスクリーニング赤血球は 2~6℃ で保管し、使用時には室温に戻してから使用した。観察期間は、処理日 (Day0)、14 日目 (Day14) および 28 日目 (Day28) とした。

結 果

1) DTT の濃度における抗原性の変化および DTT 調製に使用する PBS の pH に関する検討

0.2mol/l DTT では、E 抗原の反応態度は 4+ を呈したが、K 抗原の反応は陰性化した。

0.01mol/l から 0.00125mol/l 濃度の DTT 処理赤血球の E 抗原は DTT 処理赤血球、DTT 未処理赤血球ともに 4+ の反応性を示した。K 抗原はすべての DTT の濃度で DTT 処理赤血球および DTT 未処理赤血球ともに 3+ の凝集態度を示した。

CD38 は 0.01mol/l DTT で処理した赤血球は陰性を示したが、それ以下の濃度の DTT 処理赤血球では W+ の反応を示した (Table 1)。

以上の結果から DTT の至適濃度は E 抗原および K 抗原の反応性が確認でき、CD38 が陰性化する 0.01mol/l 濃度と推定した。

また、DTT を溶解する PBS のそれぞれの pH において E 抗原、K 抗原に DTT 処理赤血球および未処理赤血球の反応性に変化は認められなかった。

CD38 は、pH が 6.0 以下に低下することで DTT の還元作用効果は低下し、1+ 程度の凝集反応が認められた (Table 2)。以上の結果から DTT を溶解に使用する PBS の pH は 7.0 以上であれば良いことが推測された。以降の検討は一般の検査室でも入手しやすい pH7.2 の PBS を用いて施行した。

Table 1 Effect of DTT concentration on RBC antigens

	E-Antigen	K-Antigen	CD38
0.2 mol/l DTT※	4+	0	0
0.01 mol/l DTT	4+	3+	0
0.005 mol/l DTT	4+	3+	W+
0.0025 mol/l DTT	4+	3+	W+
0.00125 mol/l DTT	4+	3+	W+
Control No DTT	4+	3+	W+

DTT concentration in pH 8.0 PBS

※Method using the AABB standard

DTT denatured CD38 at concentrations of 0.01 mol/l or greater.

DTT did not denature the K antigen.

Table 2 Changes in RBC antigens by pH of DTT treatment

0.01 mol/l DTT	E-Antigen	K-Antigen	CD38
pH 8.0	4+	3+	0
pH 7.2	4+	3+	0
pH 7.0	4+	3+	0
pH 6.0	4+	3+	1+
pH 5.0	4+	3+	1+

The effect of the pH of PBS used to dissolve DTT was examined 0.01 mol/l DTT.

CD38 was denatured at pH values above 7.0.

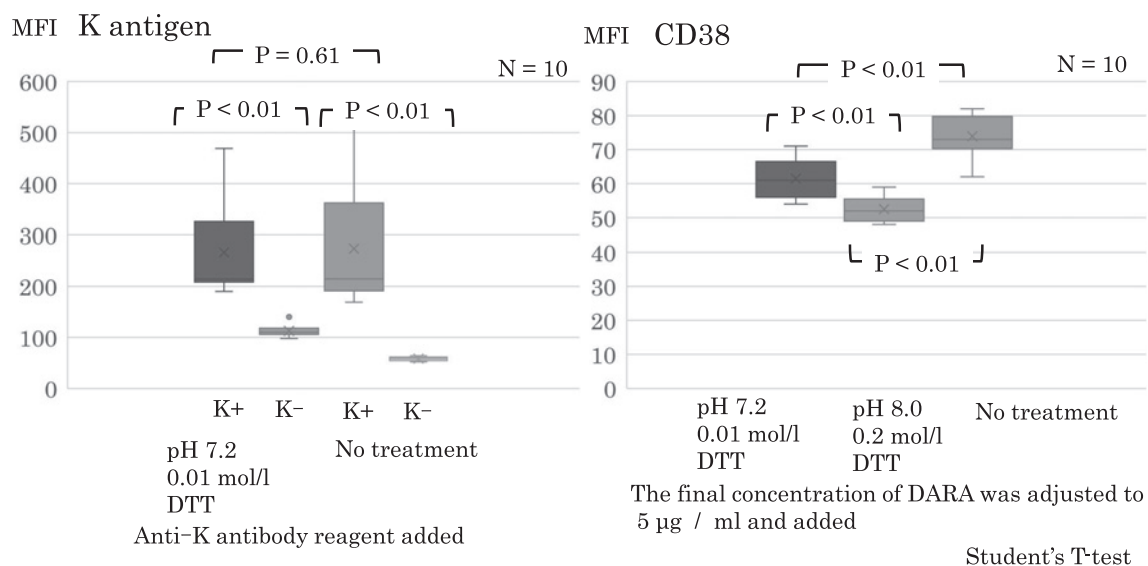


Fig. 2-1 MFI of K antigen and CD38 after treatment with pH 7.2 0.01 mol/l DTT

The antigenicity of K antigen decreased after DTT treatment according to the MFI, while no significant difference was observed compared to untreated K antigen.

CD38 was treated with DTT and control, and significant differences were observed according to the MFI.

2) pH7.2 0.01mol/l DTT 処理直後の K 抗原および CD 38 の MFI 値の変化 (Fig. 2-1~3)

DTT 処理済みの K 抗原陽性の平均 MFI 値は 266.5 であった。未処理の K 抗原陽性の平均 MFI 値は 273.9 であり、DTT 処理赤血球について約 10% 程度の MFI 値の低下は認められたが、Student's T-test の有意差検定の結果、MFI 値からは有意な差は認められなかった (P=0.61)。

CD38 は DTT 処理済み赤血球の平均 MFI 値は 61.5、未処理赤血球は 73.9 であり有意差を認めた (P<0.01)。

CD38 が変性する pH8.0 0.2mol/l 濃度の DTT を用いた赤血球を陰性対照とした。同様に測定した結果、平均 MFI 値が 52.5 を呈し、有意な低値を示した (P<0.01)。

続けて、0.01mol/l DTT 処理および未処理の赤血球の K 抗原および CD38 の血清学的な反応について測定した。

K 抗原は抗 K 試薬の添付文書に則り測定した。K 抗原は未処理赤血球ですべての赤血球で 3+ を示したが、0.01mol/l DTT 処理済みの赤血球では 2+~3+ の反応態度であった。

CD38 は最終濃度 5μg/ml 濃度の DARA を用いて PEG-IAT にて測定した。CD38 は未処理赤血球で W+~2+ の反応であった。0.01mol/l DTT 処理済みの赤血球はすべて陰性を呈した。

3) 3% および 0.8%DTT 処理赤血球の保存による各種抗原の変化

3% 赤血球では、Day14 より Di^a 抗原の反応性に低下が認められた。DTT 未処理赤血球に関しても同様に反応性の低下が認められることから抗 Di^a の検出に際しては DTT 処理による赤血球の保存性に問題はないと判断した。またその他の抗原反応性に有意な低下は認められなかった (Table 3)。

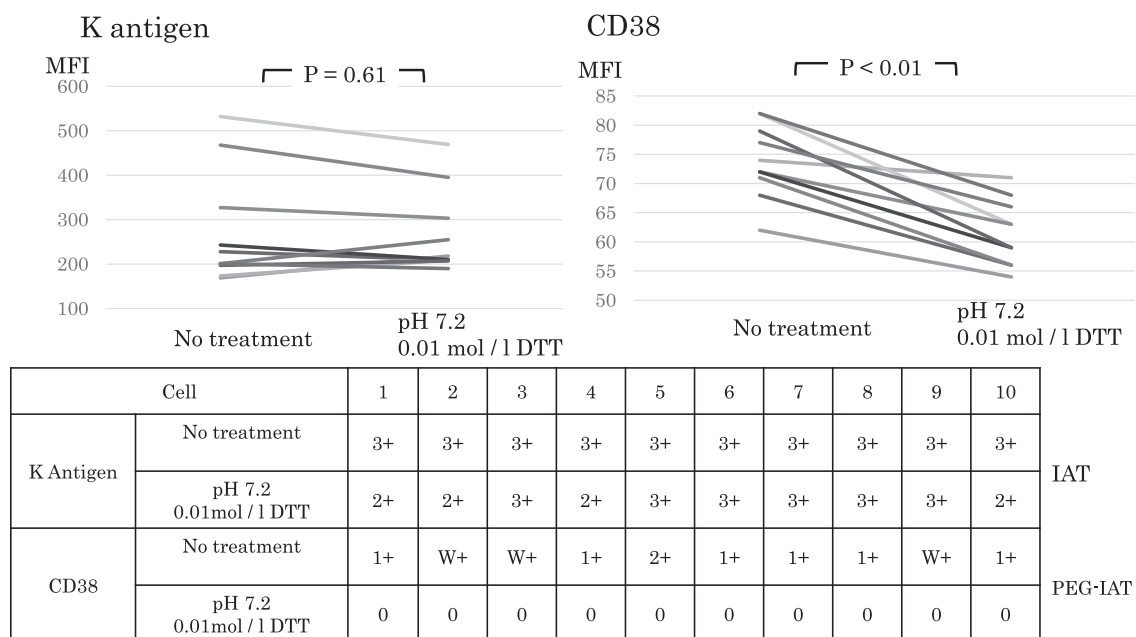


Fig. 2-2 MFI of K antigen and CD38 after treatment with pH 7.2 0.01 mol/l DTT and the results of agglutination using the tube test, and result of agglutination by the tube test

The K antigen was measured using the method described on the package insert of the anti-K reagent.

Approximately equivalent responses were obtained immediately after treatment of RBCs with and without 0.01 mol/l DTT.

CD38 was reacted with PEG-IAT in vitro. Denaturation was negative in 0.01 mol/l DTT treatment RBCs.

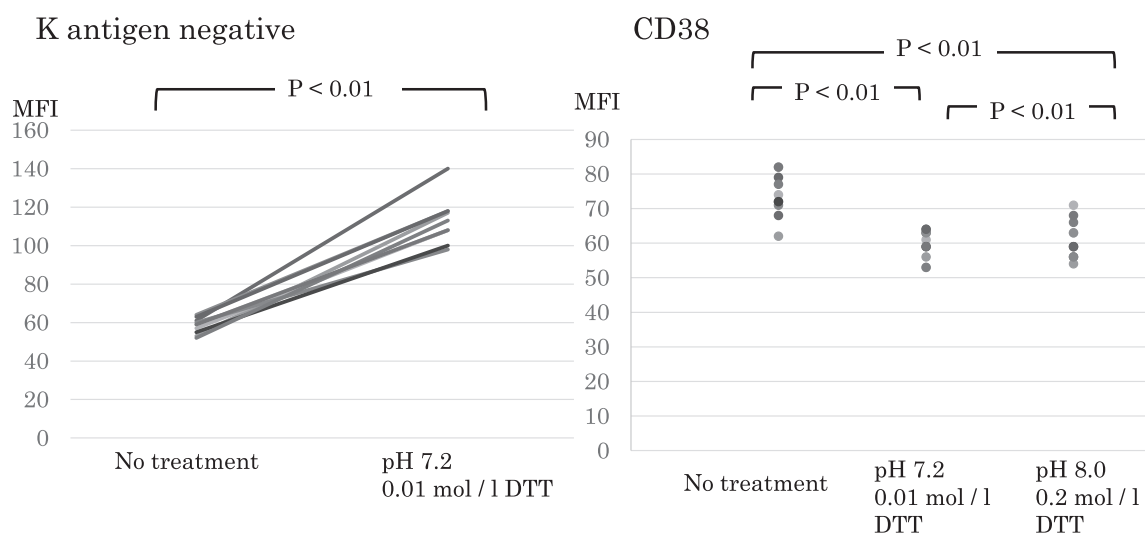


Fig. 2-3 Change in the MFI of K antigen-negative RBCs after 0.01 mol/l DTT treatment and comparison of the MFI of CD38 after treatment of RBCs with and without 0.2 mol/l and 0.01 mol/l DTT.

MFI of K antigen-negative RBCs increased after treatment with 0.01 mol/l DTT.

Treatment of RBCs with 0.2 mol/l DTT served as a negative control for CD38.

The MFI of RBCs following treatment with and without 0.01 mol/l DTT was FCM.

DTT 処理済み 0.8% スクリーニング赤血球および未処理赤血球の CAT において赤血球の保存による明確な反応性の違いは認められなかった (Fig. 3-1~3).

考 察

DARA は、多発性骨髄腫の新たな治療薬として開発されその効果は広く評価されている^{1)~3)}。一方、DARA は赤血球上に発現している CD38 に対し特異的に結合することから、輸血検査で最も重要な IAT において汎凝

Table 3 Study of RBC antigens after treatment with pH 7.2 DTT

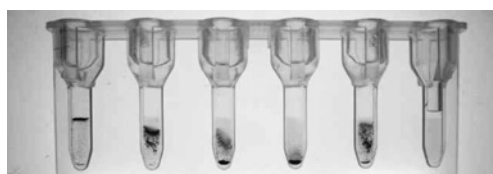
3% Bio-Rad Scr-Cells (DTT/no treatment)	Anti-D	Anti-Fy ^b	Anti-K	Anti-Di ^a	DARA
Day0	4+ / 4+	3+ / 3+	3+ / 4+	3+ / 3+	0 / 2+
Day14	4+ / 4+	1+ / 1+	2+ / 3+	1+ / 1+	0 / 1+
Day28	4+ / 4+	2+ / 2+	2+ / 3+	1+ / 1+	0 / 1+

3% Ortho Scr-Cells (DTT/no treatment)	Anti-D	Anti-Fy ^b	Anti-K	DARA
Day0	4+ / 4+	2+ / 3+	3+ / 3+	0 / 1+
Day14	4+ / 4+	2+ / 1+	2+ / 3+	0 / 1+
Day28	4+ / 4+	2+ / 2+	2+ / 3+	0 / w+

Di^a and K antigens became less reactive over time.

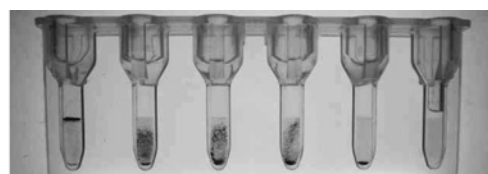
In addition, it has been confirmed that the reactivity of the K antigen weakens after treatment with DTT.

Day0



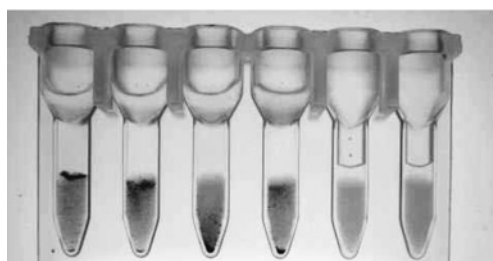
0.8% Cell Stab RBCs

Anti-D	Anti-K	Anti-Fy ^b	Anti-Di ^a	DARA
4+	3+	2+	1+	3+



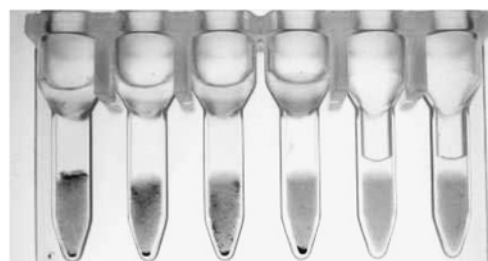
0.8% Cell Stab DTT-treated RBCs

Anti-D	Anti-K	Anti-Fy ^b	Anti-Di ^a	DARA
4+	2+	2+	2+	0



0.8% RCD RBCs

Anti-D	Anti-K	Anti-Fy ^b	DARA
4+	3+	2+	3+



0.8% RCD DTT-treated RBCs

Anti-D	Anti-K	Anti-Fy ^b	DARA
4+	2+	2+	0

Fig. 3-1 Stability of RBC antigens after treatment with pH 7.2 0.01 mol/l DTT by CAT. (Day 0).

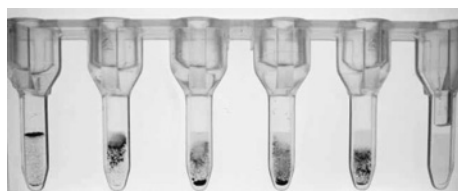
K antigen in 0.8% Cell Stab RBCs and 0.8% RCD RBCs showed decreased reactivity after DTT treatment.

集反応を呈する^{1)~4)13)17)}。この汎凝集反応を回避する目的で, Chapuy CI⁴⁾¹³⁾らは検査に使用する赤血球を DTT 処理することで細胞表面上に発現している CD38 を変性させる検討として, 国際サーベイを実施し報告した。Chapuy CI らの方法と AABB の DTT 処理赤血球に用いる DTT 濃度は 0.2mol/l であるため, 国際的に問題となる K 抗原に対する抗体の検出が出来ない⁴⁾¹⁰⁾¹³⁾¹⁶⁾。また 0.2mol/l の DTT を調製するにあたり, pH8.0 の PBS は pH の調整が必要である。そのために, 入手が容

易な pH7 付近の市販の PBS を用いることとした。

DTT の活性を担保するために, 溶解に用いる pH はアルカリ側が良いとの報告がある¹⁸⁾。そこで我々は Branch DR らの報告¹⁵⁾を基に, DTT 濃度の検討並びに DTT を溶解する pH の限界について併せて検討した結果, 0.01mol/l 濃度の DTT と PBS の pH が 7.0 以上を使用し DTT 処理することで, 赤血球上の CD38 は変性, K 抗原はやや反応性は低下するが抗原性が保たれていることが判った。

Day14



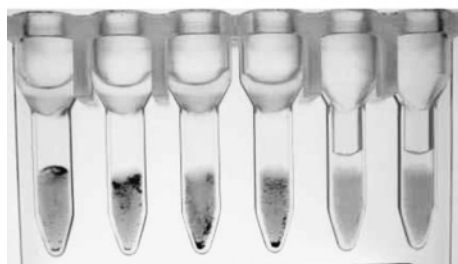
0.8% Cell Stab RBCs

Anti-D	Anti-K	Anti-Fy ^b	Anti-Di ^a	DARA
4+	3+	2+	2+	2+



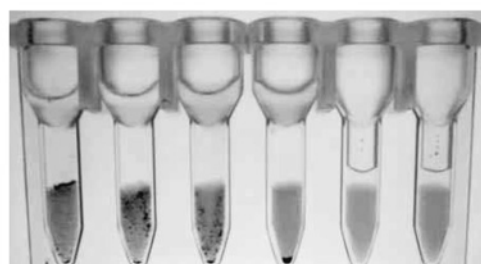
0.8% Cell Stab DTT-treated RBCs

Anti-D	Anti-K	Anti-Fy ^b	Anti-Di ^a	DARA
4+	2+	2+	W+	0



0.8% RCD RBCs

Anti-D	Anti-K	Anti-Fy ^b	DARA
4+	3+	2+	2+



0.8% RCD DTT-treated RBCs

Anti-D	Anti-K	Anti-Fy ^b	DARA
4+	3+	2+	0

Fig. 3-2 Stability of RBC antigens after treatment with pH 7.2 0.01 mol/l by CAT. (Day14)
Reactivity of the Di^a antigen decreased over the 14-day storage period.

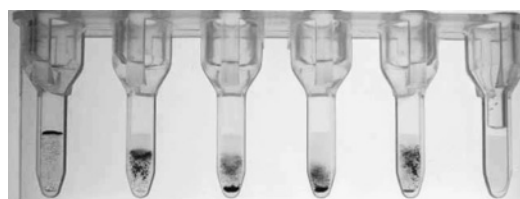
DTT 処理赤血球の保存については、従来の 0.2mol/l DTT 処理赤血球において、赤血球保存液下では 12 から 14 日間保存できると報告されているが¹⁹⁾²⁰⁾、0.01 mol/l DTT 処理赤血球において、検討されたデータがない。そこで、今回 0.01mol/l DTT 処理赤血球の長期的な保存が可能かの検討を行った。DARA を投与された多発性骨髄腫で、繰り返し輸血が必要な患者または多くの DARA 投与患者のいる施設においては不規則抗体検査時の DTT 処理赤血球が長期的に保存できることは大変有意義なことである。そのため Sigle JP らの報告¹⁴⁾に準じ、赤血球保存液を用いて主要抗原の保存性についての検討を行った。Sigle JP らは、DTT 濃度を 0.2 mol/l で検討したが、我々は 0.01mol/l 濃度として K 抗原の保存性についても併せて経時的観察を行った。3% および 0.8% スクリーニング赤血球試薬の抗原の保存性について D 抗原、K 抗原、Fy^b 抗原、Di^a 抗原について観察した。DTT 処理した赤血球と未処理赤血球の抗原性について、3% スクリーニング赤血球では DTT 処理後 14 日目以降に Di^a 抗原の反応性に低下が認められたが抗 Di^a の検出感度については問題ないと判断した。したがって、3% スクリーニング赤血球試薬は DTT 処理後、再び保存液を添加しても実験開始から 28 日目までは問題なく判定が可能と判断した。また 0.8% ス

リーニング赤血球試薬には、DTT 処理後に 0.8%RCD または Cell Stab に再浮遊し保管しても同様に抗原性は保てるとし、判定可能と判断した。0.01mol/l DTT で処理した赤血球の K 抗原について MFI 値で解析した結果、DTT 未処理の赤血球と比較し、3% 赤血球では 10% 程度の活性の低下が認められた。これは Branch DR¹⁵⁾ らの報告にもあるように、10mM (0.01mol/l) 濃度の DTT において、K 抗原の活性がおおよそ 25% 程度低下する結果が得られている。我々の検討した MFI 値から同程度またはそれ以下の抗原の変性が起きていることが推測された。

交差適合試験に用いる赤血球製剤の試験用チューブの処理においては赤血球浮遊液の保存の必要性が無い。ため、Hosokawa M らの方法¹⁷⁾は迅速で簡易に DTT 処理が可能と考えられる。問題は輸血を前提に多くの DARA 投与患者がいる医療施設や、DARA 投与後に繰り返しの輸血が施行される患者の不規則抗体検査である。そのためには DTT 処理済みの不規則抗体スクリーニング赤血球が長期間保存できることが望ましいと考える。

本論文では、DARA 投与の患者検体は使用しておらず、DARA 原末を希釈して検討を実施した。不規則抗体スクリーニング赤血球については、DTT 処理後最大

Day28



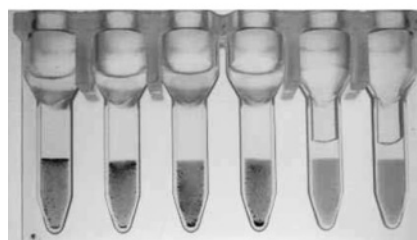
0.8% Cell Stab RBCs

Anti-D	Anti-K	Anti-Fy ^b	Anti-Di ^a	DARA
4+	3+	2+	2+	3+



0.8% Cell Stab DTT-treated RBCs

Anti-D	Anti-K	Anti-Fy ^b	Anti-Di ^a	DARA
4+	2+	2+	1+	0



0.8% RCD RBCs

Anti-D	Anti-K	Anti-Fy ^b	DARA
4+	3+	2+	2+



0.8% RCD DTT-treated RBCs

Anti-D	Anti-K	Anti-Fy ^b	DARA
4+	3+	2+	0

Fig. 3-3 Stability of RBC antigens after treatment with pH 7.2 0.01 mol/l by CAT. (Day28)

We confirmed that the quality of antigens was conserved after storage of DTT treated RBCs for up to 28days. The K antigen showed decreased reactivity just after DTT treatment.

The Di^a antigen had decreased antigen reactivity after both treatment with and without DTT over time.

28日間までの抗原性を確認した結果である。各施設で DTT 処理を行い主要抗原 (Rh, Kidd, Duffy, Diego など) の抗原性の確認を行い、保存液や使用するスクリーニング赤血球およびパネル赤血球に関しては、メーカー指定の使用期限を遵守し、使用期限範囲内で用いることが必要である。

今後は DARA 投与患者において、保存性の担保された不規則抗体スクリーニング赤血球で不規則抗体検査を検討することで、本法が実臨床の場で有用である事を検討する必要がある。

著者の COI 開示：本研究に際し、Janssen Research & Development, LLC と東邦大学で Material Transfer Agreement より Daratumumab 20mg/ml の試料提供を受け研究しました。

文 献

- 1) 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.

- 2) Plesner T, Lokhorst H M, Gimsing P, et al: Daratumumab, a CD38 monoclonal antibody in patients with multiple myeloma-data from a dose-escalation phase I/II study. *ASH Annual Meeting Abstracts*, 120: 73, 2012.
- 3) Lokhorst HM, Plesner T, Laubach J P, et al: Targeting CD38 with daratumumab monotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med*, 373: 1207—1219, 2015.
- 4) Chapuy CI, Nicholson R T, Aguad M D, et al: Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion*, 55: 1545—1554, 2015.
- 5) Deaglio S, Canella D, Baj G, et al: Evidence of an immunologic mechanism behind the therapeutic effects of arsenic trioxide (As₂O₃) on myeloma cells. *Leuk Res*, 25: 227—235, 2001.
- 6) Mehta K, Shahid U, Malavasi F: Human CD38, a cell surface protein with multiple functions. *FASEB J*, 10: 1408—1417, 1996.

- 7) Zocchi E, Franco L, Guida L, et al: A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD1 glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 196: 1459—1465, 1993.
- 8) Albeniz I, Demir O, Türker-Sener L, et al: Erythrocyte CD38 as a prognostic marker in cancer. *Hematology*, 12: 409—414, 2007.
- 9) Egea PF, Muller-Steffner H, Kuhn I, et al: Insights into the Mechanism of Bovine CD38/NAD+Glycohydrolase from the X-Ray Structures of Its Michaelis Complex and Covalently-Trapped Intermediates. *PLoS ONE*, 7 (4): e 34918, 2012.
- 10) THE BLOODGROUP ANTIGEN FactsBook, Third Edition, 2012.
- 11) 内川 誠 : Kell (KEL) 血液型, Kx (XK) 血液型, 編者 前田平生, 大戸 斉, 岡崎 仁, 輸血学, 改訂第4版, 中外医学社, 東京, 2018, 328—346.
- 12) Hamilton HB, Nakahara Y: The rare Kell blood group phenotype Ko in a Japanese family. *Vox Sang*, 20: 24—28, 1971.
- 13) 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.
- 14) Sigle JP, Mihm B, Suna R, et al: Extending shelf life of dithiothreitol-treated panel RBCs to 28 days. *Vox sang*, 113: 397—399, 2018.
- 15) Branch DR, Muensch HA, Sy Siok Hian AL, et al: Disulfide bonds are a requirement for Kell and Cartwright (Yta) blood group antigen integrity. *Br J Heamatol*, 54: 573—578, 1983.
- 16) TECHNICAL MANUAL, AABB, 18th EDITION, 2014.
- 17) Hosokawa M, Kashiwagi H, Nakayama K, et al: 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). *Transfusion*, 58: 3003—3013, 2018.
- 18) Cleland WW: Dithiothreitol, A New Protective Reagent for SH Groups. *Biochemistry*, 3: 480—482, 1964.
- 19) Disbro WL: Stability guidelines for dithiothreitol-treated red blood cell reagents used for antibody detection methods in patients treated with daratumumab. *Immunohematology*, 33: 105—109, 2017.
- 20) Hugan SL, Cooling L, Larsson VM: An evaluation of storage time for dithiothreitol-treated reagent cells. *Transfusion*, 57: 2545—2546, 2017.

RED BLOOD CELLS ANTIGEN STABILITY AFTER DTT TREATMENT OF RED BLOOD CELL REAGENTS USED FOR IRREGULAR ANTIBODY SCREENS

Makoto Okuda, Tamotsu Machida, Tomoko Kuribayashi, Yukari Yamada, Yoko Hidaka, Takashi Yusa, Kouki Sobue, Miri Tanaka, Harumi Sezaki, Mizuki Ishibashi, Kohei Saito, Yuki Tateno and Noritsugu Shiono

Division of Blood Transfusion, Toho University of Omori Medical Center Hospital

Abstract:

Introduction: Daratumumab (DARA) is a drug that specifically binds to CD38, which is abundantly expressed in myeloma cells, and has a therapeutic effect. CD38 is expressed on the surface of human red blood cells (RBCs). Irregular antibody screening and cross-matching using serum obtained after DARA administration have demonstrated panagglutination. In this study, we avoided the nonspecific reaction of DARA and studied the optimal concentration at which dithiothreitol (DTT) does not denature the clinically problematic antigen. Next, we studied storage of DTT treated cell reagents for screening.

Method: The DTT concentration and pH of phosphate buffered saline (PBS) used to dissolve DTT were adjusted, and the optimal conditions were set. In addition, serological and optical confirmation of the antigen reactivity of DTT treated RBCs were preformed after the preparation.

Result: The optimum concentration of DTT was 0.01 mol/l. When DTT was dissolved in PBS at pH 7.0 or higher, denaturation of CD38 was detected. At the same time, the Kell blood group antigen was also detectable, although its antigenicity was slightly reduced. With regard to the preservation of DTT treated RBCs, the antigenicity of the main antigen was detectable even at 28 days after DTT treatment.

Discussion: Preparation of DTT treated RBC reagents is too complicated to perform before each use. If RBC reagents for irregular antibody screening can be stored after DTT treatment, the work required in the laboratory for each DTT treatment can be reduced and efficiency of the test can be increased.

Keywords:

DTT, CD38, Daratumumab, IAT, Storage of RBCs for antibody screens