

## 多発性骨髄腫患者に対する抗 CD38 モノクローナル抗体製剤投与が 直接抗グロブリン試験に与える影響

細川 美香<sup>1)</sup> 永峰 啓丞<sup>1)</sup> 青地 寛<sup>1)</sup> 中山小太郎純友<sup>1)</sup> 櫻木美基子<sup>1)</sup>  
森川 珠世<sup>1)</sup> 中尾まゆみ<sup>1)</sup> 清川 知子<sup>1)</sup> 加藤 恒<sup>2)</sup> 富山 佳昭<sup>1)3)</sup>  
柏木 浩和<sup>1)2)</sup>

抗 CD38 モノクローナル抗体 (MoAb) 製剤であるダラツムマブおよびイサツキシマブにより間接抗グロブリン試験は陽性となるが、直接抗グロブリン試験 (DAT) に関しては不明な点が多い。我々はこれらの製剤が投与された多発性骨髄腫患者 17 例における DAT を検討した。Tube 法では 15 例が投与前陰性、Day1 に 9 例が陽性化した。Day6~8 には再度陰性化した。CAT 法では投与前に 8 例が陽性であり、Day1 に 15 例が陽性となったが、Day6~8 には陽性化した 7 例が全例陰性化した。患者赤血球の IgG 結合量は 16 例で Day1 に上昇し、Day6~8 には前値近くまで復した。また CD38 発現は Day1 で約 70%、Day6~8 には約 90% 低下したことから、CD38 の経時的な発現低下により Day1 で陽性化した DAT は、Day6~8 で陰性化すると考えられた。またヘモグロビン値は初回投与 1 日後で 8.7% 減少した。低濃度 DTT 処理赤血球の検討から、Day6~8 に DAT 陽性であった症例の多くは非特異的 IgG 結合によると思われる。多発性骨髄腫患者に対する抗 CD38 MoAb 製剤投与後の DAT には CD38 発現の変化と非特異的 IgG 結合が影響するためその解釈を慎重に行う必要がある。

キーワード：抗 CD38 モノクローナル抗体製剤、DAT、CD38、大阪法

### はじめに

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 の発現は比較的低く、CD38 が MM の治療において優れた分子標的になると考えられる<sup>1)2)</sup>。実際、CD38 に対するヒト化 IgG1κ モノクローナル抗体 (MoAb) であるダラツムマブ (Dara, Darzalex™, Genmab / Janssen) は、再発または難治性 MM 患者の治療薬として米国では 2015 年 11 月に、日本では 2017 年 9 月に承認された<sup>3)~5)</sup>。さらに 2019 年 12 月には造血幹細胞移植を伴う大量化学療法が適応とならない多発性骨髄腫患者への第一選択薬としての適応を取得し、2021 年 3 月には皮下注製剤が承認され、その需要が増加している。また 2020 年 6 月には Dara に加え、抗 CD38 キメラ IgG1κ MoAb、イサツキシマブ (Isa, Sarclisa™, Sanofi) も承認され、抗 CD38MoAb 製剤の使用は益々増加している。しかしながら、CD38 は赤血球膜上に弱く発現する

ため、これら抗 CD38MoAb 製剤は赤血球膜上の 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抗グロブリン試験 (IAT) において偽陽性を呈し輸血検査に影響を及ぼす<sup>6)7)</sup>。

我々は Dara による IAT の偽陽性を解消するための方法として、従来の 0.2mol/l DTT ではなく、新たに 0.01mol/l DTT を用いた赤血球処理法である大阪法を考案し<sup>8)</sup>、輸血検査 (IAT) に及ぼす Dara の干渉作用を簡便に解消することに成功している。一方、直接抗グロブリン試験 (DAT) に関しては、抗 CD38MoAb 製剤が CD38 発現に影響を与えること、また MM 患者における IgG 高値により DAT の偽陽性が増加することから、その結果の解釈に難渋する場合が多い。今回、我々は抗 CD38MoAb 製剤が投与された MM 患者において、DAT の変化を経時的に検討し、赤血球膜上 CD38 発現量および貧血や溶血所見との関連を検討した。

### 対 象

抗 CD38MoAb 製剤投与後 1 週間以内に輸血歴のない

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

3) 上ヶ原病院

[受付日：2021 年 12 月 16 日，受理日：2022 年 3 月 14 日]

難治性 MM 患者 17 例 (Case1~14 : Dara, Case15~17 : Isa) を対象とした。Dara は 16mg/kg, Isa は 10mg/kg を週 1 回点滴静注した。赤血球および EDTA 血漿は、抗 CD38MoAb 製剤投与前、投与後 1 日目 (Day1), および 6~8 日目 (Day6~8) に採取した。Day6, 7 に採取した検体は、抗 CD38MoAb 製剤 2 回目投与前であり (Dara 7 例), Day8 に採取した検体は 2 回目投与後になる (Dara 7 例, Isa 3 例)。赤血球は洗浄後アルセバール浮遊、血漿は使用時まで凍結保存した。対照としては健常被験者の赤血球と血漿を用いた。

本研究は大阪大学医学部附属病院倫理委員会の承認を受けており、対象患者からは書面による同意を得た。

## 方 法

### 1) 間接抗グロブリン検査 (IAT)

IAT はスクリーニング赤血球 (Screen-Cyte<sup>®</sup> Di<sup>a</sup>, Medion Grifols Diagnostics AG, Switzerland) を用い、生理食塩液法および PEG 間接抗グロブリン試験 (PEG-IAT) にて行った。

### 2) 直接抗グロブリン試験 (DAT)

#### a) Tube 法

抗 CD38MoAb 製剤投与患者赤血球を 3% 赤血球浮遊液に調整し、多特異抗ヒトグロブリン試薬 (DiaClon Coombs Serum green, Bio-Rad Laboratories, Inc., Tokyo, Japan) を用いて実施した。DAT の陰性コントロールとして生理食塩液を用いた。

#### b) カラム凝集法 (CAT)

抗 CD38MoAb 製剤投与患者赤血球を ID-Diluent2 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) で 0.8% 赤血球浮遊液に調整し、IgG カード (Micro Typing System IgG card, Bio-Rad Laboratories) を用いて実施した。

### 3) 酸解離試験

抗 CD38MoAb 製剤投与前の患者赤血球の DAT が陽性であった 8 症例において、患者赤血球を酸解離液 (グリシン酸解離システム II (Immucor, Inc., Tokyo, Japan) に処理し、得られた解離液を用いて PEG-IAT を実施した。

### 4) FACS を用いた解析

#### a) 赤血球表面結合 IgG 量の解析

患者赤血球を Alexa488-抗ヒト IgG (Thermo Fisher Scientific KK, Tokyo, Japan) と反応後、Flow cytometry (FCM) を用いて解析した。

#### b) CD38 発現量の解析

赤血球表面 CD38 発現量は、既報のとおり Dara, Isa あるいは市販 PE 標識抗 CD38 MoAb (clone HIT2 ; BioLegend, SanDiego, CA) の結合を FCM で解析することにより検討した<sup>8)</sup>。簡単に記述すると、Dara 投与患者血漿 (Dara 血漿) あるいは Isa 投与患者血漿 (Isa

血漿) と赤血球を反応後、Alexa488-抗ヒト IgG と反応させ、FCM で解析した。抗 CD38 MoAb 製剤投与前患者赤血球に対照血漿 (健常被験者血漿) を反応させた Mean Fluorescence Intensity (MFI) を陰性コントロールとして用い、投与前陰性コントロールの MFI を差し引いた値を Dara あるいは Isa 結合とした。また、患者赤血球を PE-抗 CD38 MoAb (HIT2) と反応後、FCM で解析し、陰性コントロール (IgG1 Mouse-PE, clone 679.1Mc7 ; BECKMAN COULTER, California) の MFI を差し引いた値を、HIT2 結合とした。

### 5) 0.01mol/l DTT (大阪法) を用いた抗 CD38 MoAb 製剤の DAT 陽性への関与の検討

Day6~8 に CAT-DAT 陽性であった症例において、抗 CD38 MoAb 製剤の結合がどの程度 DAT 陽性に関与しているか、患者赤血球を 0.01mol/l DTT 処理し、更なる検討を行った。全ての検体において 3 回測定を行い、その平均値を結果として用いた。

患者赤血球の DTT 処理は、既報のごとく、洗浄赤血球浮遊液に 0.01mol/l DTT を加え、37°C で 30 分加温後、再度洗浄し DTT 処理赤血球として用いた<sup>8)</sup>。

### 6) ヘモグロビン (Hb), LD

Hb は Sodium Lauryl Sulfate (SLS)-ヘモグロビン法を用いて測定し、LD は国際臨床化学連合 (IFCC) 対応法 : 乳酸基質法 (乳酸→ピルビン酸反応) を用いて測定した。

### 7) 統計

赤血球 IgG 結合および CD38 発現においては Student's paired t 検定、その他は Student's unpaired t 検定を使用し、 $p < 0.05$  を有意と判定した。

## 結 果

### 1) IAT

全症例ともに抗 CD38MoAb 製剤投与前の IAT は陰性、Day1 以降は PEG-IAT にて w+~1+ の凝集を認めしたが、0.01mol/l DTT 処理赤血球を用いた場合は全症例が陰性となり、未処理赤血球を用いた PEG-IAT での凝集は抗 CD38MoAb 製剤による偽陽性反応であることが確認された。

### 2) DAT

#### a) Tube 法-DAT

抗 CD38MoAb 製剤投与前には 17 例中 2 例で w+ の凝集を認め、15 例は陰性であった。Day1 には陰性であった 15 例中 9 例が w+ となった。しかし Day6~8 では Day1 で陽性化した全例が再度陰性となった (表 1)。

#### b) CAT-DAT

抗 CD38MoAb 製剤投与前には 8 例で w+~3+ の凝集を認め、9 例が陰性であった。Day1 には陰性であった 9 例中 7 例で陽性となり、また投与前に陽性であっ

表1 抗 CD38 MoAb 製剤投与患者の投与前血清 IgG 値と DAT (Tube 法および CAT)  
Day 6, 7 (抗 CD38 MoAb 製剤投与 2 回目前) の赤血球を使用した患者は太字で示し, その他は Day8 (2 回目投与後) の赤血球を使用した。

Case	抗 CD38 製剤	Pre 血清 IgG (mg/dl)	Tube-DAT			CAT-DAT		
			Pre	Day1	Day6~8	Pre	Day1	Day6~8
1		393	Neg	w+	<b>Neg</b>	Neg	1+	<b>Neg</b>
2		407	Neg	w+	Neg	Neg	1+	Neg
3		940	Neg	w+	<b>Neg</b>	Neg	1+	<b>Neg</b>
4		978	Neg	w+	Neg	Neg	1+	Neg
5		1,604	Neg	w+	<b>Neg</b>	Neg	1+	<b>Neg</b>
6		1,757	Neg	Neg	<b>Neg</b>	Neg	Neg	<b>Neg</b>
7	Dara	2,156	Neg	w+	Neg	Neg	2+	Neg
8		2,373	Neg	Neg	Neg	Neg	1+	Neg
9		2,678	Neg	w+	Neg	w+	2+	1+
10		2,982	Neg	w+	Neg	w+	2+	1+
11		3,099	Neg	Neg	<b>Neg</b>	w+	1+	<b>1+</b>
12		3,790	Neg	w+	<b>Neg</b>	1+	1+	<b>1+</b>
13		5,740	w+	w+	w+	3+	3+	3+
14		5,830	w+	w+	<b>w+</b>	2+	3+	<b>3+</b>
15	Isa	363	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
16		4,505	Neg	Neg	Neg	1+	1+	1+
17		5,462	Neg	Neg	Neg	2+	2+	1+

た症例も半数の症例で凝集の増強が認められた。Day 6~8 では Tube 法と同様に, Day1 で認めた凝集の増強は消失し, 投与前とほぼ同様の結果となった (表 1)。

### 3) 酸解離試験

投与前の Tube 法または CAT で DAT 陽性を認めた症例について酸解離試験を実施したところ全て陰性となり, DAT の陽性は IgG の非特異的な結合であることが示唆された。

### 4) FCM を用いた解析

#### a) 赤血球表面 IgG 結合量

赤血球表面 IgG 結合量を抗ヒト IgG 抗体を用いて FCM にて解析した (図 1)。抗 CD38 抗体製剤投与 17 例中 1 例を除いて, Day1 には IgG 結合量の増加が認められた ( $150\% \pm 56.2$ ,  $p < 0.01$ )。この成績は, 抗 CD38 抗体製剤が赤血球上の CD38 に結合していることを示している。しかしながら, Day6~8 には Day1 に比して, IgG 結合量は低下し, 投与前と比べ有意差は認められなかった ( $121\% \pm 35.2$ ) (図 1A)。この抗 CD38 抗体製剤投与前後の赤血球表面 IgG 結合量の変動には, 血清 IgG 高値による非特異的な結合が関与している可能性があるため, 2,500mg/dl を基準に IgG 高値群 ( $\geq 2,500\text{mg/dl}$ ) 8 例と低値群 ( $< 2,500\text{mg/dl}$ ) 9 例に分けて検討したところ, IgG 結合量増加の程度は, IgG 低値例においてより顕著であった (図 1B, C)。

#### b) 赤血球膜上 CD38 発現量

赤血球膜上の CD38 発現を抗 CD38 MoAb 製剤の赤血球への結合量により評価した。要約すると, 3%Dara 投与患者赤血球 50 $\mu\text{l}$  には Dara 血漿を 100 $\mu\text{l}$  (n=14),

3%Isa 投与患者赤血球 50 $\mu\text{l}$  には Isa 血漿 100 $\mu\text{l}$  (n=3) を加え, 37 $^{\circ}\text{C}$  で 60 分間インキュベートし赤血球膜上の CD38 を飽和させた後に, 抗ヒト IgG 抗体を用いて結合量を検討した。その結果, Day1 で Dara 結合は  $71 \pm 15\%$  減少 ( $p < 0.001$ ), Isa では  $70 \pm 12\%$  減少 ( $p < 0.01$ ), Day6~8 で Dara 結合は  $91 \pm 10\%$  ( $p < 0.001$ ), Isa では  $108 \pm 6\%$  減少 ( $p < 0.001$ ) を認めた。また, Dara の 2 回目投与前 (Day 6, 7) および投与後 (Day 8) 患者間 (90%vs92%) に差は認めなかった (図 2A)。

一方, 予備的実験にて正常赤血球に飽和量の Dara が結合すると PE-抗 CD38 MoAb (HIT2) の結合を  $56 \pm 3\%$  ( $p < 0.001$ ) 阻害したのに対し, Isa は HIT2 の結合を  $10 \pm 2\%$  (有意差認めず) しか阻害しなかった (成績示さず)。そこで, HIT2 の結果は Isa 投与患者の結果だけを採り用し Isa 投与患者赤血球上の CD38 発現をさらに HIT2 にて検討した (n=3)。その結果, Isa 投与前に比べ Day1 で HIT2 の結合は  $69 \pm 13\%$  ( $p < 0.01$ ) 減少し, Day6~8 では  $88 \pm 3\%$  ( $p < 0.001$ ) 減少し, 上記と同様の結果であった (図 2B)。

以上の結果により, Dara あるいは Isa 投与により赤血球膜上 CD38 抗原は Day1 で約 70%, Day6~8 では約 90% 低下すると考えられた。

### 5) 0.01mol/l DTT (大阪法) を用いた抗 CD38 MoAb 製剤の DAT 陽性への関与の検討

予備的実験として正常赤血球に Dara 感作後, 0.01 mol/l DTT 処理すると, Dara の結合は著明に低下し DAT も陰性化した。一方, 血清 IgG 高値例に認められる DAT 陽性赤血球を DTT 処理しても DAT は陰性化

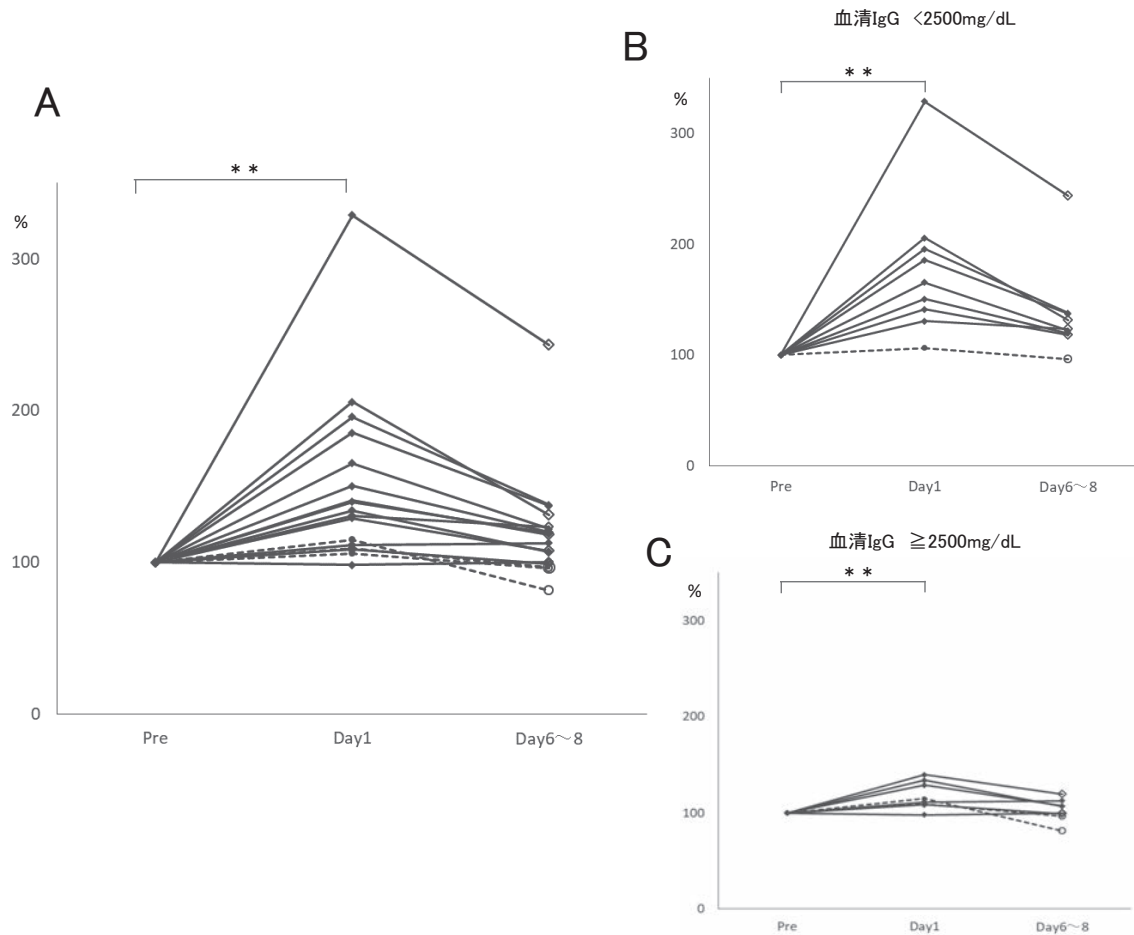


図1 抗 CD38 MoAb 製剤投与後の赤血球表面結合 IgG 量の変化  
 赤血球表面 IgG 結合量を Alexa488- 抗ヒト IgG 抗体を用いて FCM にて解析した. 縦軸は投与前を 100% とした場合の増加率を示す. (A) 全症例 (n=17), (B) 血清 IgG 2,500mg/dl 未満の症例 (n=9), (C) 血清 IgG 2,500mg/dl 以上の症例 (n=8). Dara 投与例— Isa 投与例…… Day 6, 7 (2 回目投与前) の赤血球を使用したもの (closed symbol), Day 8 (2 回目投与後) の赤血球を用いたもの (open symbol) \*\*: p<0.01

せず, IgG 結合量もほとんど変化しない(図 3A). このように, DTT 処理により, Dara 結合と非特異的 IgG 結合による DAT 陽性を区別できる可能性がある.

そこで, Dara 投与後 Day6~8 に CAT-DAT が陽性であり, 追加検査が可能であった 4 例(症例 9, 10, 12, 13)の Day6~8 赤血球を用いて, DTT 処理による IgG 結合量と DAT の変化について検討した. Case 10 を除いて DTT 処理後の IgG 結合量の低下はわずかであり, CAT-DAT の凝集グレードも軽度の変化であったことから, これらの症例における Day6~8 の DAT 陽性は主に IgG の非特異的結合によるものと考えられた(図 3B).

一方, Case13 の Day6~8 赤血球においては DTT 処理後の IgG 結合は, Dara 感作赤血球と同様に著明な低下を認め, CAT-DAT の凝集グレードも大きく低下した. しかし Case 13 では Dara 投与前から DAT は強陽性であったことから, 投与前および Day1 の赤血球についても DTT 処理を行い, 同様の検討を行ったところ,

投与前, Day1 とともに Day 7 と同様に DTT 処理により IgG 結合の低下と DAT 凝集の低下を認めた. 以上の結果から, Case13 では CD38 以外の DTT 処理によって影響を受ける赤血球膜成分に対する IgG の非特異的結合が DAT 陽性に関連していると思われる(図 3C).

#### 6) ヘモグロビン (Hb), LD の経時変化

抗 CD38 MoAb 製剤投与後の Hb および LD 値の変化について検討した. 多くの症例において Hb は抗 CD38 MoAb 製剤初回投与 1 日後で 8.2% 減少したが (p < 0.001), 2 回目投与後 (Day 8) は 4.8% の低下に留まった (p < 0.05). また, LD は初回投与 1 日後で約 30% 上昇したが (p < 0.01), 2 回目投与後 (Day 8) は上昇を認めなかった(図 4).

#### 考 案

今回の解析にて明らかにした輸血関連検査における知見を図 5 に示している. 要約すると, 1) 抗 CD38 MoAb 製剤投与翌日には多くの症例が DAT 陽性となる

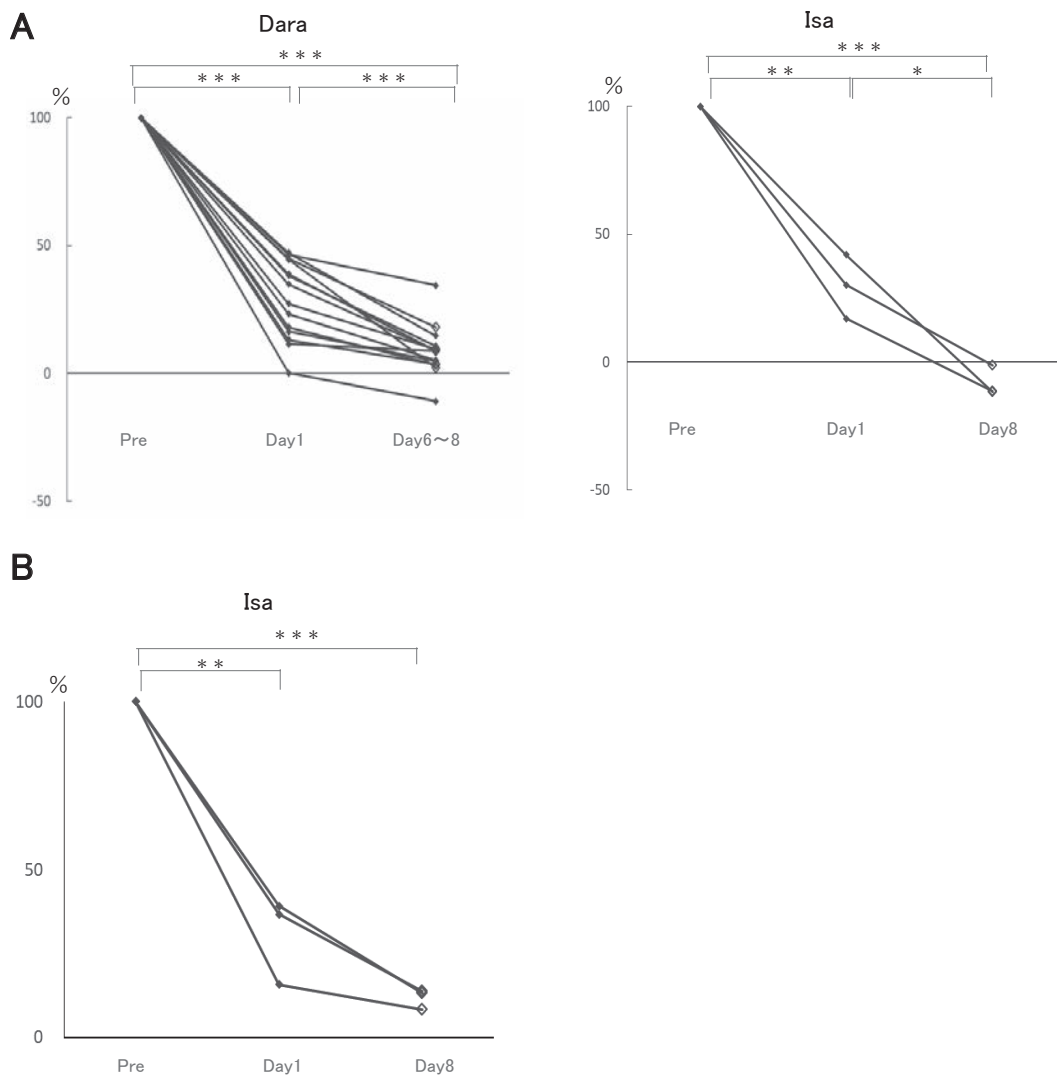


図2 抗 CD38 MoAb 製剤投与後の赤血球表面 CD38 発現量の変化

縦軸は投与前を 100% とした場合の変化を示す。

(A) Dara 投与患者赤血球は Dara 血漿 (n=14), Isa 投与患者赤血球は Isa 血漿 (n=3) にて結合を飽和させた後に, 抗ヒト IgG 抗体を用いて結合量を検討した. Day6, 7 (2 回目投与前) (closed symbol) Day8 (2 回目投与後) (open symbol) (B) Isa 投与患者における抗 CD38 MoAb, HIT2 結合の変化を経時的に検討した. (n=3) Day6, 7 (2 回目投与前) (closed symbol), Day8 (2 回目投与後) (open symbol) \* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001

が, 赤血球 CD38 発現低下により, 投与 1 週間後には抗 CD38 MoAb 製剤による DAT への影響はほぼ消失すること (図 5A), 2) 投与 1 週間後にも DAT 陽性を示す例があるが, それらは主に IgG 高値に伴う非特異的な結合によること, および 3) 抗 CD38 MoAb 製剤結合と非特異的 IgG 結合による DAT 陽性の鑑別に低濃度 DTT 処理が有用である可能性があること (図 5B) を示唆した. 抗 CD38 MoAb 製剤投与による DAT の一過性陽性化により 1 回目の投与翌日には軽度の Hb の低下と LD 増加を認めたが, 臨床的には問題が無い程度であった.

赤血球には CD38 が発現しているため, 抗 CD38 MoAb 製剤投与により不規則抗体スクリーニングおよび交差

適合試験などの IAT において汎反応性の凝集反応をもたらす<sup>6)7)</sup>. また, この Dara による干渉作用は 3~6 カ月続くと報告されており<sup>7)</sup>, 我々も 4 カ月間 Dara による干渉作用が続いた症例を報告している<sup>9)</sup>. 一方で, Sullivan 等は Dara 投与患者の DAT は陰性になると報告しており<sup>10)</sup>, 我々も同様の現象を報告した<sup>8)</sup>. これは赤血球の CD38 発現が抗 CD38 MoAb 製剤投与後に低下することによると考えられている<sup>8)10)</sup>. 今回の検討において, 我々は抗 CD38 MoAb 製剤投与 17 例において, 投与後翌日には多くの症例が DAT の陽性化あるいは凝集の増強を認めるが, 反応増強は一過性であり, Day 6~8 にはほぼ投与前の状態に復することを示した. 赤

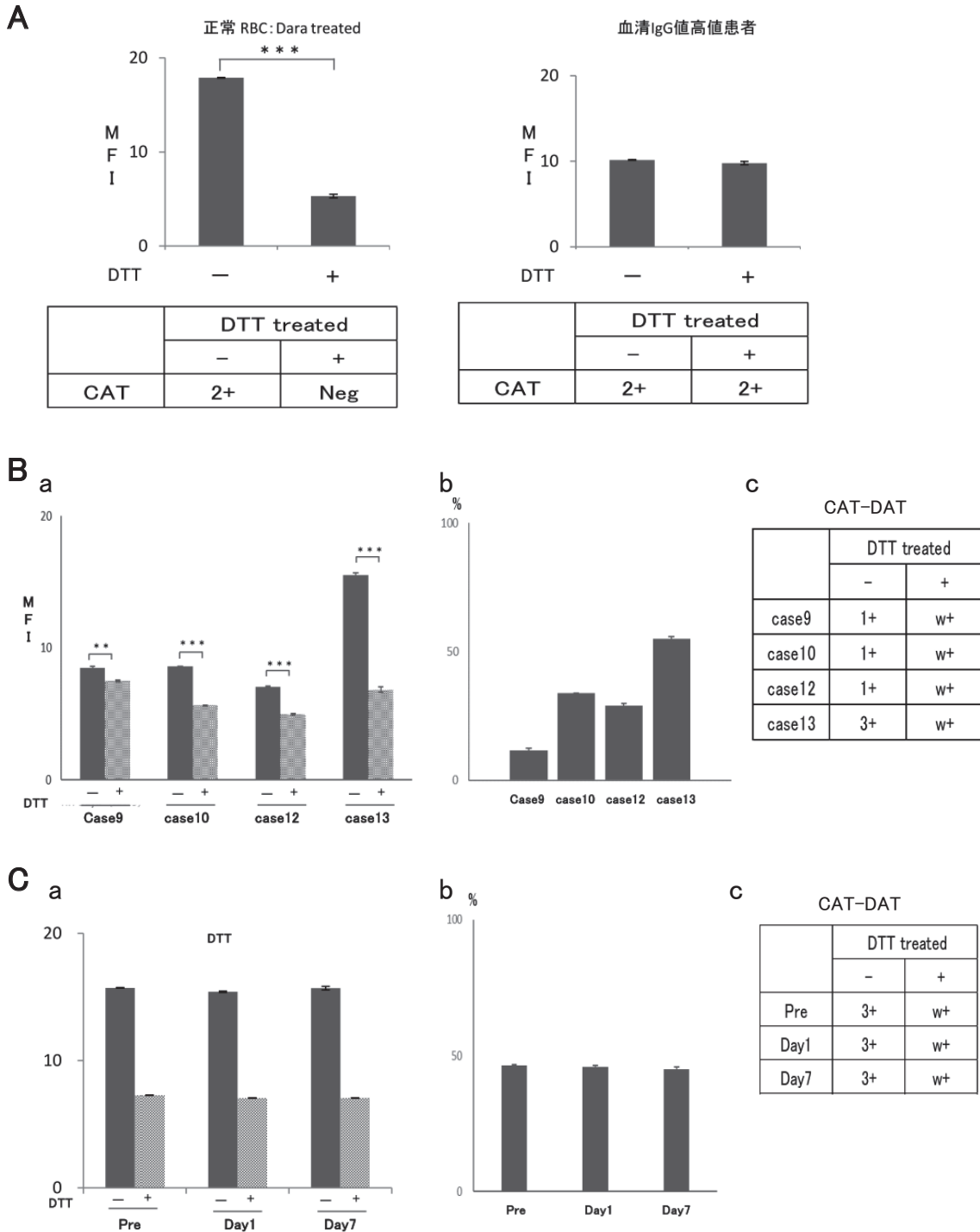


図3 0.01mol/l DTT 処理後赤血球の IgG 結合量の比較

洗浄赤血球浮遊液に 0.01mol/l DTT を加え、37℃ で 30 分加温後、再度洗浄し DTT 処理赤血球として用いた。また各測定は全て 3 回ずつ実施した。図は全て mean ± 2SD を示す。(A) Dara 感作正常 RBC あるいは血清 IgG 値高値患者赤血球 (多発性骨髄腫、血清 IgG : 3.610mg/dl) を用いた未処理赤血球と DTT 処理後赤血球の IgG 結合量および CAT-DAT の比較。\*\*\* : p<0.001 (B) Day6-8 の CAT-DAT 陽性であった症例における未処理赤血球と DTT 処理後赤血球の解析 (a) 未処理赤血球と DTT 処理後赤血球の IgG 結合量の比較。\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001 (b) Day6-8 の CAT-DAT 陽性であった症例の未処理赤血球を 100% とした場合の DTT 処理後の MFI 低下率。(c) 未処理赤血球と DTT 処理後赤血球での CAT-DAT の比較。(C) Case13 における未処理赤血球と DTT 処理後赤血球の解析 (a) 未処理赤血球と DTT 処理後赤血球の IgG 結合量の比較。(b) Case13 未処理赤血球を 100% とした場合の DTT 処理後の MFI 低下率。(c) 未処理赤血球と DTT 処理後赤血球での CAT-DAT の比較。

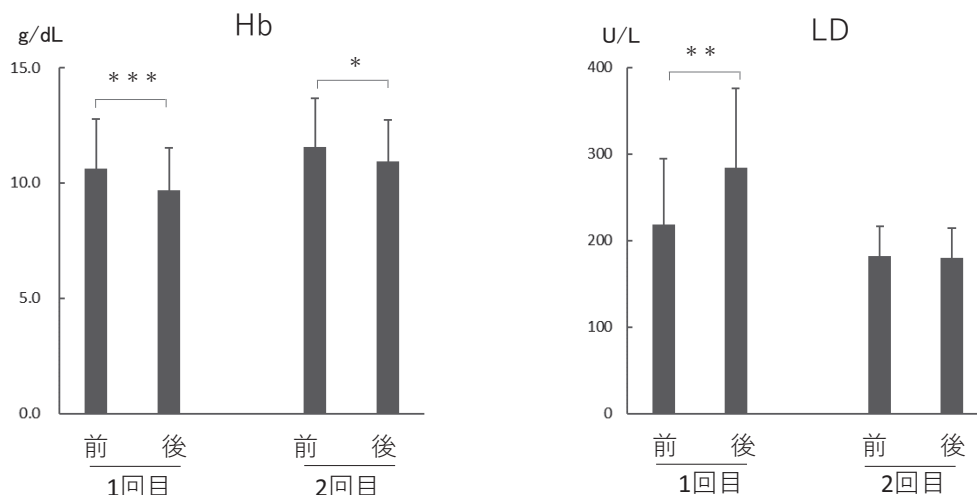


図4 抗CD38 MoAb製剤投与前後のHb, LDの変動

初回投与後はDay1, 2回目投与前はDay6または7, 2回目投与後はDay8のデータを示す. n=17, mean ± 2SD. \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001

血球IgG結合量の検討においても,同様にDay1では増加するが,Day6~8ではほぼ前値に復した.FCMを用いた検討から,赤血球CD38発現を,DaraあるいはIsaの結合を飽和させた後,Alexa488-抗ヒトIgG抗体を用いてCD38発現を評価した.その結果,すでにDay1において投与前に比べCD38発現の低下を認めるが,Day6~8ではさらに低下することが示された.この現象は,PE-HIT2を用いた解析でも確認された.以上の結果より,Day1で陽性であったDATは,CD38発現の低下とともに陰性化すると思われた.また,IgG結合量増加の程度は,IgG低値例(<2,500mg/dl)ではIgG高値例(≥2,500mg/dl)に比してより顕著であったが,これはIgG高値例では非特異的なIgG結合が多いため,抗CD38 MoAb製剤の影響が相対的に低下するためと考えられる.

一方で,我々は抗CD38 MoAb製剤の投与1週間が経過しても,多くの症例でDAT,特にCAT-DATが陽性であることを見出した.CAT-DATはTube-DATに比べて血清IgG値の影響を受けやすいことが知られているが<sup>11)</sup>,これらの症例においては,全例抗CD38 MoAb製剤投与前からCAT-DAT陽性であり,また血清IgGが著明高値であった.我々は抗CD38 MoAb製剤が結合した赤血球を低濃度DTT処理することにより,抗CD38 MoAb製剤の結合が消失することを明らかにし,これを用いて抗CD38 MoAb製剤と非特異的IgG結合によるDAT陽性が区別できる可能性を示した.実際,Day6~8のCAT-DAT陽性赤血球の多くは,DTT処理の影響をほとんど受けないことから,主に非特異的IgG結合によるものであると考えられた.しかし,Case13のように非特異的IgG結合であってもDTT

処理により赤血球IgG結合量が低下する場合も見受けられた.

抗CD38 MoAb製剤投与では溶血所見は認めないとする報告が多いが<sup>10)12)</sup>,今回の検討では,HbはDay1において投与前と比べ約9%の有意な減少とLDの増加も認めた.しかし間接ビリルビンの変動はなく,LDの増加は腫瘍崩壊の影響も考えられることから,抗CD38 MoAb製剤により軽度の溶血が起きている可能性はあるが臨床問題にならないレベルであると思われた.2回目投与後のHbの低下は5.3%と赤血球CD38発現の低下に伴い抗CD38 MoAb製剤の赤血球に対する影響はさらに低下したと思われる.

抗CD38 MoAb製剤による赤血球CD38の消失メカニズムの詳細は不明であるが,筆者らは試験管内で赤血球CD38抗原の発現低下の再現を試みたが,赤血球に抗CD38 MoAbを反応させるだけでは,CD38発現は低下しなかった(成績示さず).そのため,CD38発現低下には生体内の要因が関与していると考えられる.骨髄腫細胞で示されているtrocytosis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>13)14)</sup>.また,Isa投与後,骨髄腫細胞ではCD38がinternalizationすると提唱されている<sup>15)</sup>.我々は予備的検討にて抗CD38 MoAb製剤投与後に赤血球上のCD38発現が著減した症例に関して,Western blotにて赤血球全体のCD38抗原を解析したが,赤血球CD38抗原量の変化は症例によりばらつきがあり,一定の傾向を示さなかった(結果示さず).抗CD38 MoAb製剤の赤血球CD38消失メカニズムの解明には,さらなる研究が必要であると考えられる.

抗CD38 MoAb製剤のDATおよびIgG結合に対する

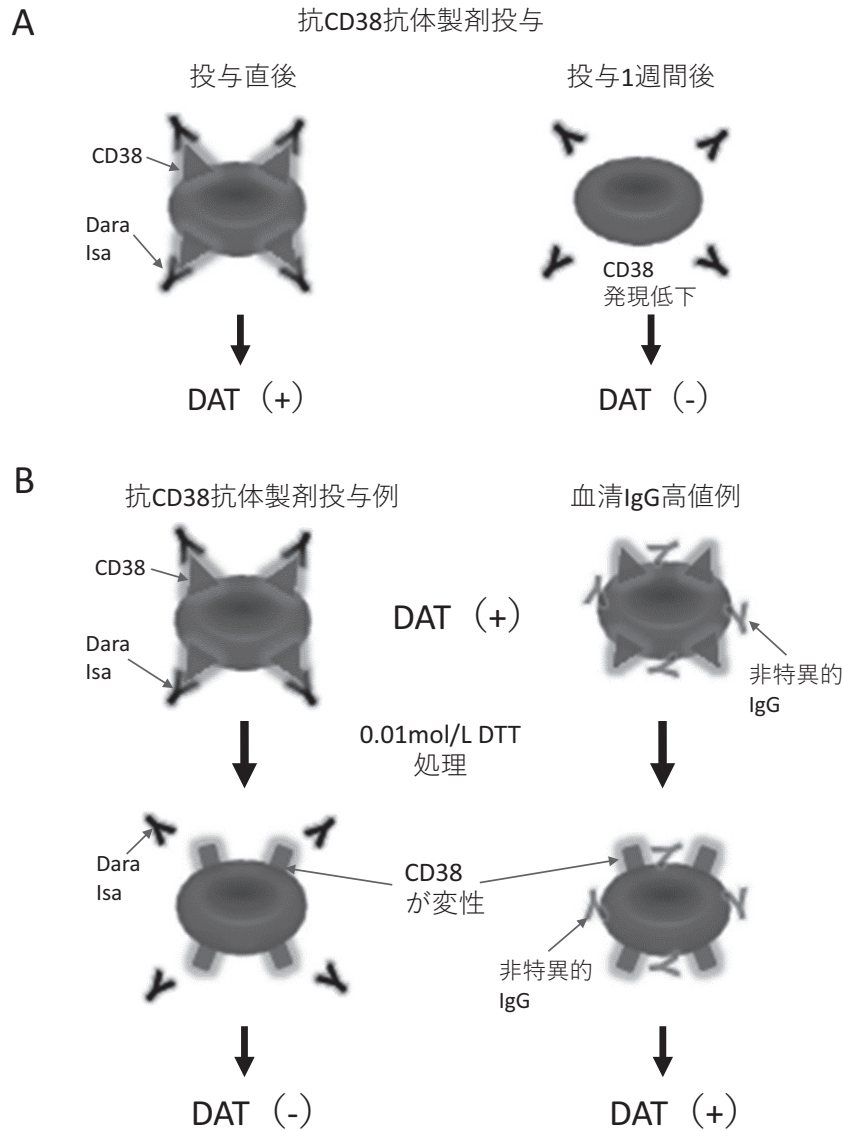


図5 Graphical summary

(A) 抗 CD38 MoAb 製剤投与による CD38 発現低下が及ぼす DAT への影響  
 抗 CD38 MoAb 製剤により多くの症例が投与直後 DAT 陽性となるが、赤血球 CD38 発現低下により投与 1 週間後には抗 CD38 MoAb 製剤による DAT への影響はほぼ消失する。

(B) 大阪法 (0.01mol/l DTT 処理) を用いた抗 CD38 MoAb 製剤結合と非特異的 IgG 結合の鑑別  
 抗 CD38MoAb 製剤感作赤血球を 0.01mol/l DTT 処理すると、CD38 が変性することで抗 CD38MoAb 製剤の結合は著明に低下し DAT は陰性化するが、血清 IgG 高値例に認められる DAT 陽性赤血球を DTT 処理しても DAT は陰性化しない。

影響は Isa 投与例では Dara ほど顕著に認められなかった。また IAT も Isa においては Dara よりも弱い傾向があった(結果示さず)。Isa と Dara は CD38 の異なるエピトープを認識しており、赤血球への結合の程度は異なる可能性がある<sup>3)16)</sup>。今後、より詳細な検討が必要であると考えられる。また本検討で用いた Day6~8 の赤血球は、抗 CD38 MoAb 製剤 2 回目投与前のものと、投与後翌日のものが混在しているが、それらの間で DAT

および CD38 発現等に違いは認めず、2 回目投与がこれらの結果に影響を与えた可能性は低いと考える。

抗 CD38 MoAb 製剤投与後の DAT は、抗 CD38 MoAb 製剤自体の影響、赤血球 CD38 発現の低下さらに非特異的 IgG 結合が関与していると示唆され、その解釈を慎重に行う必要がある。抗 CD38 MoAb 製剤投与後には全例で IAT は陽性となるものの、DAT に関しては必ずしも陽性にならないことを念頭に置いて輸血検査を



しなくては、もし抗 CD38 MoAb 製剤投与患者である情報がないまま抗体同定検査を行うと、高頻度抗原に対する抗体ではないかと思誤る可能性があるため注意しなければならない。

## 結 語

抗 CD38 MoAb 製剤投与により赤血球膜上の CD38 発現が低下するため、抗 CD38 MoAb 製剤による DAT は陰性～弱陽性反応になると考えられ、またその反応は一過性であることが示唆された。また骨髄腫患者では非特異的 IgG 結合により DAT が陽性となる場合があるが、DTT 処理により抗 CD38 MoAb 製剤と非特異的 IgG 結合による DAT 陽性を区別できる可能性があることを示した。

著者の COI 開示：富山佳昭：講演料 (Janssen)

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) 細川美香, 柏木浩和, 中山小太郎純友, 他: 大阪法によるグ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. *日本輸血細胞治療学会誌*, 65: 600—605, 2019.
- 10) 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.
- 11) Fabijanska-Mitek J, Namirska-Krzton H, Seyfried H: The value of gel test and ELAT in autoimmune haemolytic anaemia. *Clin Lab Haematol*, 17: 311—316, 1995.
- 12) Plesner T, Krejci J: Daratumumab for the Treatment of Multiple Myeloma. *Frontiers in immunology*, 9: 1228, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.01228.
- 13) Krejci 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.
- 14) van de Donk NW, Usmani SZ: CD38 Antibodies in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Modes of Resistance. *Frontiers in immunology*, 9: 2134, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.02134.
- 15) Moreno L, Perez C, Zabaleta A, et al: The Mechanism of Action of the Anti-CD38 Monoclonal Antibody Isatuximab in Multiple Myeloma. *Translational Cancer Mechanisms and Therapy*, 2019. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1597.
- 16) Deckert J, Wetzel MC, Bartle LM, et al: SAR650984, A Novel Humanized CD38-Targeting Antibody, Demonstrates Potent Antitumor Activity in Models of Multiple Myeloma and Other CD38<sup>+</sup> Hematologic Malignancies. *Clin Cancer Res*, 20: 4574—4583, 2014.

## DIRECT ANTIGLOBULIN TESTING OF PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA TREATED WITH ANTI-CD38 MONOCLONAL ANTIBODIES

*Mika Hosokawa*<sup>1)</sup>, *Keisuke Nagamine*<sup>1)</sup>, *Hiroshi Aochi*<sup>1)</sup>, *Kotarusumitomo Nakayama*<sup>1)</sup>, *Mikiko Sakuragi*<sup>1)</sup>, *Tamayo Morikawa*<sup>1)</sup>, *Mayumi Nakao*<sup>1)</sup>, *Tomoko Kiyokawa*<sup>1)</sup>, *Hisashi Kato*<sup>2)</sup>, *Yoshiaki Tomiyama*<sup>1)3)</sup> and *Hirokazu Kashiwagi*<sup>1)2)</sup>

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

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

<sup>3)</sup>Uegahara Hospital

### **Abstract:**

Daratumumab and Isatuximab are humanized IgG monoclonal antibodies (MoAbs) which target CD38. Administration results in a positive indirect antiglobulin test because erythrocytes express CD38. However, effects on the direct antiglobulin test (DAT) are unclear. We investigated DAT in 17 patients with multiple myeloma (MM) treated with these MoAbs. Tube-DAT was negative in 15 cases before administration (Pre). Nine turned positive on Day 1 after administration, and became negative again on Days 6-8. CAT-DAT was positive in 8 and 15 cases on Pre and Day 1, respectively, and all 7 cases who turned positive on Day 1 became negative again on Days 6-8. The amount of IgG bound on erythrocytes increased on Day 1 in 16 cases, and returned to near the Pre level on Days 6-8. CD38 expression on erythrocytes decreased by ~70% and ~90% on Day 1 and Days 6-8, respectively, and it is highly likely that a severe reduction in CD38 expression lead to a loss of DAT positivity on Days 6-8. Hemoglobin level decreased by 8.7% on Day 1. Low-concentration DTT treatment showed that most of the positive DAT results on Days 6-8 were caused by non-specific IgG binding. DAT of MM patients after anti-CD38 MoAb administration should be carefully interpreted, because it is affected by a reduction in CD38 expression and non-specific IgG binding.

### **Keywords:**

Anti-CD38 monoclonal antibody, DAT, CD38, Osaka method