

不規則抗体保有の Daratumumab 投与患者から学ぶ、酵素法の有用性

大槻 晋也¹⁾ 道野 淳子¹⁾ 雨野里奈子¹⁾ 佐竹伊津子¹⁾ 富山 隆介¹⁾
和田 暁法²⁾ 村上 純¹⁾ 仁井見英樹¹⁾

多発性骨髄腫に対する分子標的薬である Daratumumab (DARA) 投与患者では、赤血球膜表面上に微弱に発現している CD38 の影響により間接抗グロブリン試験 (IAT) が偽陽性となり輸血前検査に影響を及ぼすため、IAT に使用する赤血球はジチオスレイトール (DTT) 処理を行う必要がある。

今回我々は、DARA 投与患者で不規則抗体を保有する 2 症例を経験した。症例 1 は、DARA 投与前の不規則抗体検査で抗 E を検出したため、投与後の輸血検査の際、事前に E 抗原陰性赤血球液 (RBC) を選択することが可能だった。症例 2 は、投与前の不規則抗体スクリーニングは陰性だったが、投与後に 5 回の RBC 輸血を行い 5 回目の輸血検査で抗 C が検出された。そのため不規則抗体を同定し適合血で交差適合試験を行うまでに赤血球試薬及び RBC に対し計 3 回の DTT 処理が必要であり、輸血準備に長時間を要した。交差適合試験で併用している酵素法は DARA の影響を受けていない。今回経験した Rh 抗原に対する不規則抗体は日本人において検出率も高く、DARA 投与患者の不規則抗体スクリーニングに酵素法を取り入れることは Rh 抗原に対する不規則抗体の適合血選択時の時短に繋がると考える。

キーワード：Daratumumab, 不規則抗体, 間接抗グロブリン試験, 酵素法

はじめに

多発性骨髄腫 (multiple myeloma : MM) は、腫瘍化した形質細胞 (骨髄腫細胞) が骨髄中で増殖する造血器腫瘍であり、貧血や腎障害など様々な病変を呈する疾患である。2017年9月に治療薬 Daratumumab (DARA) が日本で承認された。DARA は、骨髄腫細胞表面に発現している CD38 と結合することで抗腫瘍効果を発揮する分子標的薬である。CD38 は赤血球膜表面上にも微弱に発現しており、間接抗グロブリン試験 (IAT) が偽陽性となるため、IAT に使用する赤血球に対しジチオスレイトール (DTT) 処理を行う必要がある¹⁾²⁾。今回我々は不規則抗体を保有する DARA 投与患者 2 症例の経験から、不規則抗体スクリーニングでの酵素法併用の有用性について報告する。

症例 1

70 代 男性。MM (IgA-κ 型)。進行度：国際病期分類 (ISS) : Stage II。病勢進行のため、DARA・ボルテゾミブ・デキサメタゾン療法が開始となった。DARA 投与前の評価では、異常形質細胞を骨髄中に 89.6%、末梢血中にも 5.0% 認め、かつ IgA 3,452mg/dl であった。

DARA 初回投与前に不規則抗体検査を実施した結果、抗 E が検出された。DARA 投与後、貧血改善を目的に 85 日間に渡り 14 回、計 28 単位の赤血球液 (RBC) 輸血を行った。RBC は E 抗原陰性血を選択し輸血後に新たな抗体は検出されていない。DARA は 3 回投与したが、DARA 投与後 28 日目に肺炎を併発しており LD が一時的に 2,413U/l と高値となった。治療後の評価では stable disease であり、かつ肺炎併発にて初回投与より 22 日以降は投与を行っていない (図 1)。

症例 2

70 代 男性。MM (BJP-κ 型)。ISS : Stage I。病勢進行のため DARA・ボルテゾミブ・メルファラン・ブレドニゾン療法が開始となった。DARA 初回投与前の不規則抗体スクリーニングは陰性であった。DARA 投与開始後貧血改善を目的に 5 回の RBC 輸血を実施し、5 回目の輸血前検査で抗 C が検出された (図 2)。

使用試薬/機器及び検査方法

①使用試薬/機器

カラム凝集法は BioRad 社のマイクロタイピングシス

1) 富山大学附属病院検査・輸血細胞治療部

2) 富山大学附属病院血液内科

〔受付日：2022 年 2 月 22 日、受理日：2022 年 6 月 14 日〕

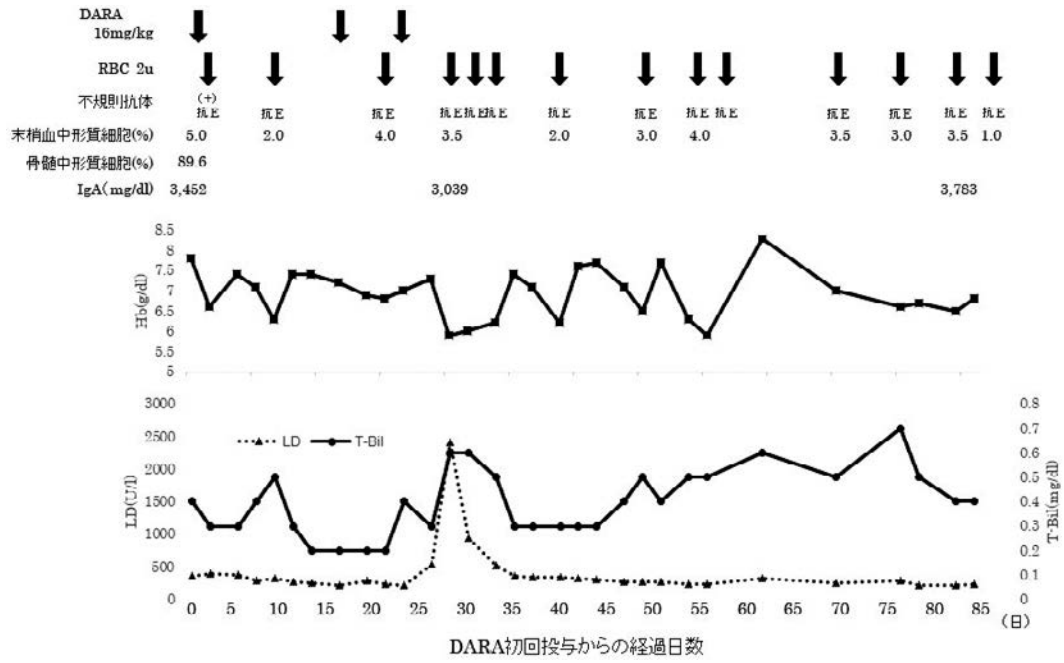


図1 症例1 臨床経過

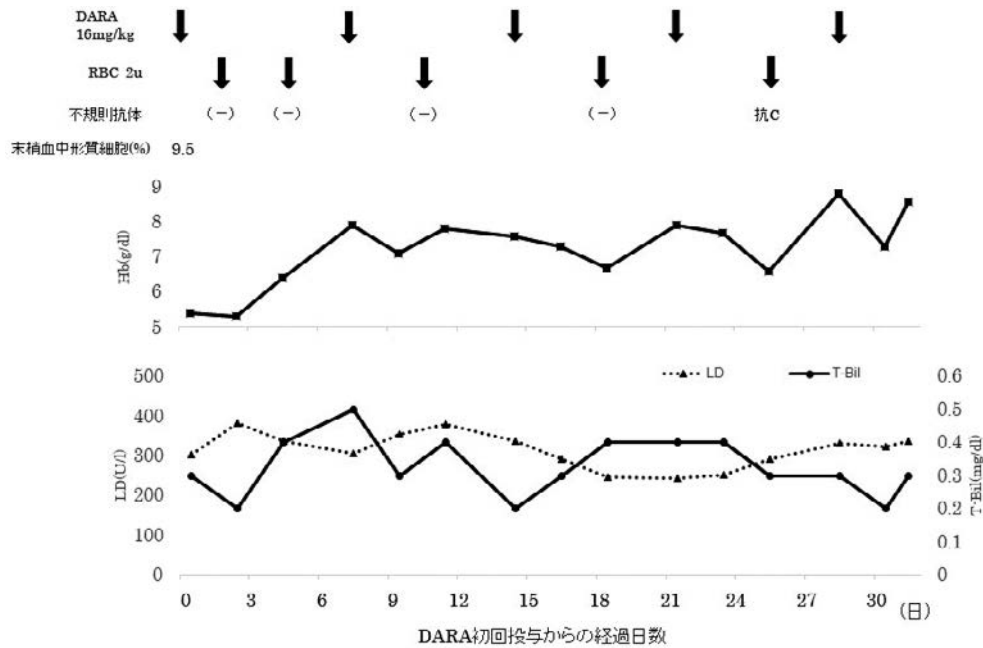


図2 症例2 臨床経過

テム AHG カード及び NaCl/Enzyme test, 反応増強剤として ID-Diluent1 及び ID-Diluent2 を使用し, 不規則抗体スクリーニング及び不規則抗体同定用赤血球試薬は BioRad 社の DiaCellII+II, DiaCell Dia+ 及び DiaPanel を使用した. 抗原検査は市販の抗体試薬 (オーソ社の バイオクロン®抗 C, バイオクロン®抗 E, バイオクロン®抗 c̄, バイオクロン®抗 ē, バイオクロン®抗 Jk^a, バイオクロン®抗 Jk^b, BioRad 社の DiaClon

Anti-K, DiaClon Anti-k, ImuMed 社の Anti-Fy^a, イムコア社の Anti-S IgM, Anti- \bar{s} IgM, Anti-Fy^b, ガンマクロン Anti-Le^a, ガンマクロン Anti-Le^b, ガンマクロン Anti-M, ガンマクロン Anti-N) を使用した. 全自動輸血検査装置は, BioRad 社の IH-500 を使用した. 直接抗グロブリン試験 (DAT) の試験管法用試薬は, オーソ社のクームス血清バイオクロンを用いた.

②検査方法

DARA 投与前及び投与後の DTT 処理前赤血球試薬を用いた LISS-IAT による不規則抗体スクリーニング (Sc), DTT 処理前のドナー RBC を用いた LISS-IAT による交差適合試験 (Cr), DTT 処理前ドナー RBC を用いたプロメリン 1 段法 (酵素法) による交差適合試験 (E-Cr) 及び DAT は全自動輸血検査装置で行い, DTT 処理後赤血球試薬を用いた LISS-IAT による不規則抗体スクリーニング (DTT-Sc), DTT 処理後のドナー RBC を用いた LISS-IAT による交差適合試験 (DTT-Cr), DTT 処理前赤血球試薬を用いた LISS-IAT による同定検査 (Id), DTT 処理後赤血球試薬を用いた LISS-IAT による同定検査 (DTT-Id) 及び DTT 処理前赤血球試薬を用いた酵素法による同定検査 (E-Id) は用手法によるカラム凝集法を添付文書に従って行った. DAT が陽性となった場合は, 試験管法にて再検を行い判定結果とした. DTT 処理は, 「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)」²⁾ に従った. 抗原検査は試験管法を用い添付文書に従って実施した.

③DARA 投与前輸血検査

Sc, DAT 及び Rh 系, Duffy, Kell, Kidd, Lewis, MNS の抗原検査を行った. 不規則抗体スクリーニングで陽性を呈した場合は Id に加え E-Id を実施した.

④DARA 投与後輸血検査

輸血検査は, まず Sc, Cr, E-Cr を実施し, LISS-IAT で DARA による偽陽性が疑われた場合は DTT-Sc 及び DTT-Cr を実施した. 不規則抗体が陽性となった場合は DTT-Id 及び E-Id を行い, 検出した不規則抗体に対する抗原陰性血について DTT-Cr 及び E-Cr を実施した. DTT-Id を行う際の自己対照は, DTT 処理した患者赤血球を用いた. DARA 投与後, DTT 処理が必要であった患者の輸血検査の所要時間についても示した.

検査結果

症例 1

1) 不規則抗体検査

DARA 初回投与前の不規則抗体スクリーニングは R_2R_2 赤血球に 2+, Id は R_2R_2 赤血球 2+, $r''r$ 赤血球 1+ であった. E-Id は R_2R_2 及び $r''r$ 赤血球に 3+ の反応を認め抗 E が同定された. DAT は陰性であり, 抗原検査の結果は, C+c-E-e+, K+k+, Fy (a+b-), Jk (a+b+), Le(a-b+), M+N+, S-s+ であった. DARA 投与後 Sc は, R_1R_1 赤血球に 2+, R_2R_2 赤血球に 3+ の反応を示したが, DTT-Sc は R_2R_2 赤血球のみに 2+, DTT-Id は R_2R_2 赤血球に 2+, $r''r$ 赤血球に 1+ の反応を呈し抗 E が同定された. E-Id は, R_2R_2 及び $r''r$ 赤血球に 3+ の反応を認め抗 E の特異性を示した. 初回 DARA

投与後の DAT は陰性であった. DARA は 22 日以降投与しておらず最終投与日から 55 日 (初回投与から 77 日) 以降 12 回目から 14 回目の Sc は R_2R_2 赤血球のみに 2+ を示し, DARA による偽陽性は確認されなかった.

2) 交差適合試験

輸血は E 抗原陰性血を選択し DARA 投与から 70 日後までの計 11 回の結果は Cr で 2+, DTT-Cr で交差適合となった. DARA 投与後 12 回目から 14 回目の輸血検査は Cr 適合となり DTT-Cr は行っていない. E-Cr は, すべての検査で陰性であった (表 1).

3) 検査に要した時間

Sc, Cr 及び E-Cr に 40 分, DARA による非特異反応が認められたと思われる反応に対し, DTT-Sc 及び DTT-Cr に 90 分の計 2 時間 10 分を要した.

症例 2

1) 不規則抗体検査

DARA 初回投与前の検査は, 不規則抗体スクリーニング陰性, DAT 陰性であり, 抗原検査の結果は, C-c+E+e+, K-k+, Fy (a+b-), Jk (a-b+), Le (a+b-), M+N-, S+s+ であった. DARA 初回投与から 18 日後までに行った 4 回の Sc は, 全ての赤血球で 1+ 又は 2+ の反応を示していたが, DTT-Sc は陰性となった. DARA 投与 26 日後 5 回目の輸血前検査で Sc は R_1R_1 赤血球 2+, R_2R_2 赤血球 1+ となり DTT-Sc では R_1R_1 赤血球のみに 1+ を認めた. DTT-Id は, $R_1''R_1$, R_1R_1 及び $r' r$ 赤血球に 1+, E-Id は $R_1''R_1$, R_1R_1 , $r' r$ 赤血球に 2+ を示し, 双方の検査から抗 C が同定された. DAT は初回投与時陰性, 5 回目の輸血検査では不規則抗体同定時の自己対照が陽性となり DAT は 1+ であった (表 2).

2) 交差適合試験

初回輸血検査から 4 回目までの結果は, Cr 2+, DTT-Cr 陰性であった. 5 回目の検査で DTT-Cr が 1+ と陽性を呈した. E-Cr は 4 回目までは陰性, 5 回目の検査で 1+ となった. 不規則抗体検査で抗 C が同定されたことより, 日本赤十字社が提供する赤血球抗原情報検索システム³⁾にて交差適合試験に用いた RBC 及び院内在庫の RBC を検索したところ全て C 抗原陽性であったため, 血液センターに C 抗原陰性血を発注し, 適合血について DTT-Cr 及び E-Cr を行い陰性となった (表 2). 後日, 過去に輸血したドナー赤血球抗原を確認したところ, すべて C 抗原陽性であったことが判明した.

3) 検査に要した時間

1 回目から 4 回目までの輸血検査は, 症例 1 と同じく計 2 時間 10 分, 5 回目の輸血では DTT-Id 及び E-Id に 90 分, 適合血を得るまでに 100 分, DTT-Cr 及び E-Cr に 90 分の計 4 時間 40 分が加わり, 輸血の準備に計 6 時間 50 分を要した (図 3).

表1 症例1 DARA 投与前後の輸血検査結果

輸血検査		投与前	投与後 1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	7回目	8回目	9回目	10回目	11回目	12回目	13回目	14回目		
DARA 初回投与後の日数(日)			2	9	21	28	31	33	40	49	55	57	70	77	83	86		
DARA 最終投与後の日数(日)						6	9	11	18	27	33	35	48	55	61	64		
不規則抗体スクリーニング	Sc*1	I R1R1	0	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	0	0	0	
		II R2R2	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+
		Di ^a	R1R1	0	2+	/	/	/	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	0	0	0
			R2R2	/	/	3+	3+	3+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	DTT-Sc*2	I R1R1	NT*6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	NT	NT
		II R2R2	NT	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	NT	NT	NT
		Di ^a	R1R1	NT	0	/	/	/	0	0	0	0	0	0	0	NT	NT	NT
			R2R2	NT	/	2+	2+	2+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	交差	Cr*3	/	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	0	0	0
		DTT-Cr*4	/	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	NT	NT
E-Cr*5		/	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
DAT		0	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	

*1: DTT 処理前赤血球試薬を用いた LISS-IAT による不規則抗体スクリーニング *2: DTT 処理後赤血球試薬を用いた LISS-IAT による不規則抗体スクリーニング *3: DTT 処理前のドナー RBC を用いた LISS-IAT による交差適合試験 *4: DTT 処理後のドナー RBC を用いた LISS-IAT による交差適合試験 *5: DTT 処理前のドナー RBC を用いたプロメリン 1 段法 (酵素法) による交差適合試験 *6: nottest

表2 症例2 DARA 投与前後の輸血検査結果

輸血検査		投与前	投与後 1回目	2回目	3回目	4回目	5回目*	5回目(2)**	
DARA 初回投与からの日数(日)			2	4	10	18	26		
不規則抗体スクリーニング	Sc	I R1R1	0	2+	1+	1+	1+	2+	
		II R2R2	0	2+	1+	1+	1+	1+	
		Di ^a	R1R1	/	/	/	/	/	2+
			R2R2	0	2+	1+	2+	1+	/
	DTT-Sc	I R1R1	NT	0	0	0	0	1+	
		II R2R2	NT	0	0	0	0	0	
		Di ^a	R1R1	NT	/	/	/	/	1+
			R2R2	NT	0	0	0	0	/
交差	Cr	/	2+	2+	2+	2+	2+	NT	
	DTT-Cr	/	0	0	0	0	1+	0	
	E-Cr	/	0	0	0	0	1+	0	
	DAT	0	0	NT	NT	NT	1+	NT	

*5 回目の輸血検査結果

**5 回目の抗原陰性血の交差適合試験の検査結果

考 察

今回我々は DARA 投与前後で不規則抗体が検出された 2 症例を経験した。

通常の輸血検査の所要時間は、輸血検査部門に検体が届いてから 1 時間程度だが、DARA 投与患者は DARA による偽陽性を回避するために赤血球を DTT 処理する必要がある。山田らは、遅延時間は 94 施設で 45 分から 24 時間であったと報告している⁴⁾。症例 1 では、事

前に不規則抗体を把握していたため、DARA 投与後は抗原陰性血を選択し交差適合試験を行い、DTT 処理操作は 1 回で、所要時間 2 時間 10 分程度であった。本症例は、DARA 最終投与後 55 日後に DTT 処理前の LISS-IAT が陰性化した。DARA による干渉は投与終了後約 6 カ月間を考慮するとされる¹⁾が、小島らは、DARA 投与後早期の IAT 陰性化は骨髓中の腫瘍細胞量が多いことを示唆している⁵⁾。本症例においても DARA 投与

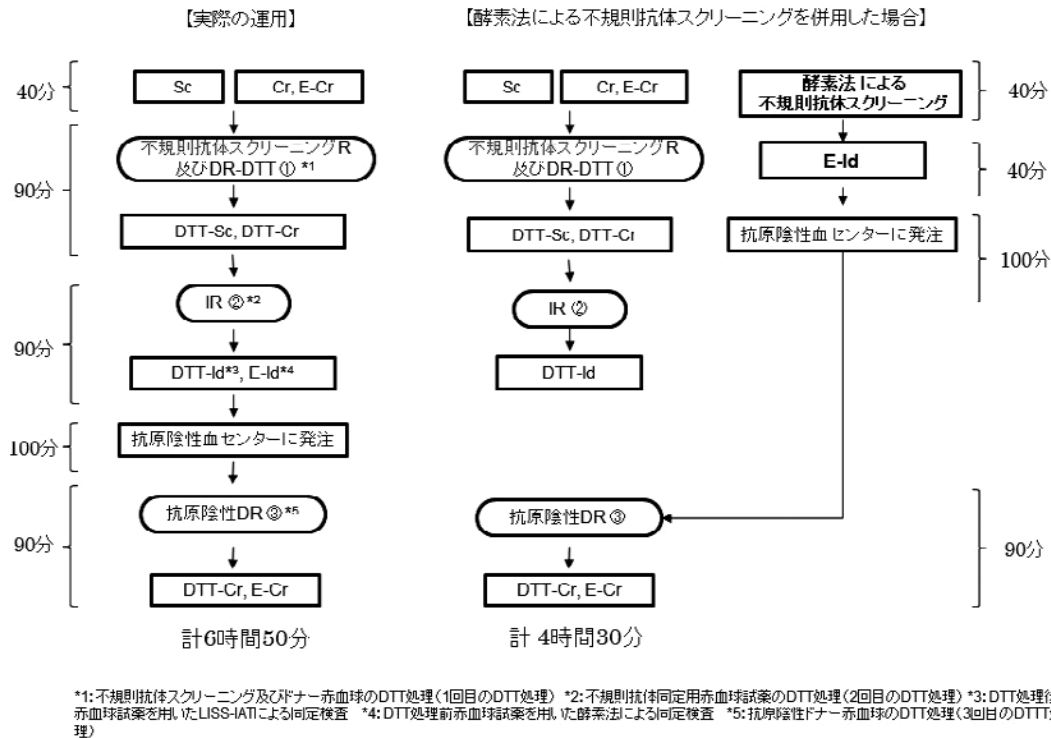


図3 新たに不規則抗体が検出された場合の実際の運用と不規則抗体スクリーニングに酵素法を併用した場合の所要時間

前の骨髄中異常形質細胞比率が89.6%と高く、治療後の評価においても stable disease であったことからこの報告に合致しているものと推察される。

症例2では、5回目の輸血検査でDATが陽性に転じている。解離試験は行っていないが、輸血による免疫抗体と考えられる抗Cが産生されたことから、過去に輸血したC抗原陽性RBCとの反応が影響しておりDARAとの関連はないと推察する。このDARA投与期間中の輸血によって不規則抗体が産生されたことにより、製剤準備に6時間50分を要した。その理由として、LISS-IATに対し不規則抗体スクリーニング時に1回目のDTT処理、不規則抗体同定時に2回目、不規則抗体に対する抗原陰性血に対し3回目と計3回のDTT処理が必要になったこと及び抗原陰性血の確保に時間を要したことが挙げられる。IATはDTT処理が必要であり時間がかかるが、交差適合試験時の酵素法はDARAの影響は受けていなかった。山田らの報告⁴⁾では、68例中DARA投与後に酵素法陽性となった11例のうち不規則抗体が原因と考えられる4例を除く7例についてはDARAの酵素法への影響は否定できないながら、我々の経験では酵素法による交差適合試験はDARAの影響を受けず、また酵素法による同定検査もDARA投与後に汎凝集反応は認めず抗体同定を正しく行うことができた。症例2で不規則抗体スクリーニングに酵素法を導入していればLISS-IATによる結果を待たずに抗体を同定し

抗原陰性血を選択することで、輸血の準備完了までに2時間20分程度の時間を短縮することが可能であった(図3)。臨床的意義のある不規則抗体検出にはIATが必須であり、酵素法は臨床的に重要なDuffyやMNSなどの抗原に対する不規則抗体を検出することができないため、酵素法による結果のみで不規則抗体を特定することはできず、最終的にはLISS-IATによる不規則抗体検査及び交差適合試験の結果を待つこととなる。しかしながら今回検出したRh抗原に対する不規則抗体は臨床的に意義のある不規則抗体の中で最もよく検出され⁶⁾、酵素法での反応性も優れていることからDARA投与患者の輸血検査に酵素法による不規則抗体スクリーニングを併用することでRh抗原に対する不規則抗体を保有していた場合には適合血を選択する際の時短の一助になると考える。

著者のCOI開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

1) 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.

- 2) 多発性骨髄腫治療薬 (抗 CD38) による偽陽性反応への対処法 (一部改訂版), 日本輸血・細胞治療学会輸血検査技術講習委員会, 2017.
- 3) 日本赤十字社ホームページ: 血液製剤発注システム. <https://www.jrc.or.jp/mr/relate/order/>, (2022年2月現在).
- 4) 山田千亜希, 竹下明裕, 李 政樹, 他: 抗 CD38 抗体治療における輸血検査上の問題点と対処法に関する多施設共同研究. 日本輸血細胞治療学会誌, 67: 440—448, 2021.
- 5) 小島奈央, 畑山祐輝, 仲田夢人, 他: Daratumumab 投与後早期に間接抗グロブリン試験が陰性となった2症例. 日本輸血細胞治療学会誌, 66: 649—653, 2020.
- 6) 竹下明裕, 渡邊弘子, 万木紀美子, 他: アジアにおける赤血球不規則抗体研究 進捗状況と国内調査結果. 日本輸血細胞治療学会誌, 60: 435—441, 2014.

USEFULNESS OF THE ENZYME METHOD IN PATIENTS WITH IRREGULAR ANTIBODIES WHO ARE TREATED WITH DARATUMUMAB

Shinya Ohtsuki¹⁾, Junko Michino¹⁾, Rinako Ameno¹⁾, Itsuko Satake¹⁾, Ryusuke Tomiyama¹⁾, Akinori Wada²⁾, Jun Murakami¹⁾ and Hideki Niimi¹⁾

¹⁾Department of Laboratory Medicine and Transfusion Cell Therapy, University of Toyama Hospital

²⁾Department of Hematology, University of Toyama Hospital

Abstract:

Daratumumab (DARA), a human monoclonal antibody which targets CD38 in the treatment of multiple myeloma (MM), can interfere with the indirect antiglobulin test (IAT) due to the weak expression of CD38 on red blood cell (RBC) membranes. To eliminate this interference in pretransfusion testing, RBCs should be treated with DTT. We experienced two cases in which irregular antibodies were identified in patients treated with DARA. In case 1, anti-E was detected on testing for irregular antibodies before DARA administration, which allowed the selection of E antigen-negative RBC in advance of the transfusion test after DARA administration. In case 2, anti-C was detected after transfusion of 8 units of RBCs following receipt of DARA, even though the results of antibody screening were negative before receipt of DARA. A clinically relevant delay in the selection of compatible RBCs can be prevented in cases in which antibody screening and identification is performed before DARA administration, such as in case 1. However, a serious delay in preparing compatible blood may arise in cases in which antibodies are detected following DARA administration, such as in case 2, due to the repeated requirement of DTT treatment of RBCs in pretransfusion testing. The enzyme method may be effective in detecting Rh antibodies, due to the rare interference by DARA in this test.

Keywords:

Daratumumab, Irregular antibody, Indirect antiglobulin test, Enzyme method