(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4620920号
(P4620920)

(45)発行日　平成23年1月26日(2011.1.26)　(24)登録日　平成22年11月5日(2010.11.5)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02	
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	15/00	F
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	5/00	101

請求項の数 34　(全 58 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2001-535401 (P2001-535401)
(86)(22)出願日	平成12年10月31日 (2000.10.31)
(65)公表番号	特表2003-513620 (P2003-513620A)
(43)公表日	平成15年4月15日 (2003.4.15)
(86)国際出願番号	PCT/EP2000/010745
(87)国際公開番号	WO2001/032702
(87)国際公開日	平成13年5月10日 (2001.5.10)
審査請求日	平成19年10月16日 (2007.10.16)
(31)優先権主張番号	99121686.2
(32)優先日	平成11年11月2日 (1999.11.2)
(33)優先権主張国	欧州特許庁 (EP)
(31)優先権主張番号	00111696.1
(32)優先日	平成12年5月31日 (2000.5.31)
(33)優先権主張国	欧州特許庁 (EP)

(73)特許権者　500343511
デーエルカー　ブルーツペンデディーンスト　バーデン－ヴュルテンベルク－ヘッセン　ゲーゲーエムベーハー
ドイツ連邦共和国　ウルム　デー－８９０８１　ヘルムホルツシュトラーセ　１０
(74)代理人　100095832
弁理士　細田　芳徳
(72)発明者　フレーゲル，ヴィリー，アー．
ドイツ連邦共和国　ディーブルク　６４８０７　グレンツシュトラーセ　１１
(72)発明者　ワーグナー，フランツ，エフ．
ドイツ連邦共和国　ウルム　８９０７５　ブルグンデルヴェーク　９

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＲＨＤ陰性遺伝子座の分子構造

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

Rhesusハイブリッドボックス、上流Rhesusボックス又は下流Rhesusボックスのいずれかを表し、その配列が、それぞれ配列番号：１８～２０に示されてなる、核酸分子構造体。

【請求項２】

共通のRHD陰性ハプロタイプを示し、該RHD陰性ハプロタイプが、ハイブリッドRhesusボックスを含むRhD抗原陰性ハプロタイプのことを指す、請求項１記載の核酸分子構造体。

【請求項３】

上流Rhesusボックス、下流Rhesusボックス又はその両方を含むRHD遺伝子欠失を含むRHD陰性ハプロタイプを示してなる、請求項１記載の核酸分子構造体。

【請求項４】

共通のRHD陽性ハプロタイプを示し、該RHD陽性ハプロタイプが、RHD遺伝子に特異的なDNA配列を含むハプロタイプのことを指す、請求項１記載の核酸分子構造体。

【請求項５】

血清学的にRhD陰性に分類されたRHD陽性ハプロタイプを含有した試料に由来し、ここで、該血清学的にRhD陰性に分類されたRHD陽性ハプロタイプは、常套的な血清学的アッセイを用いて、RhD抗原の存在について試験され、かかるアッセイの結果が陰性であった試料であることを示している、請求項１記載の核酸分子構造体。

【請求項６】

該試料が、白人集団から選ばれたものである、請求項５記載の核酸分子構造体。

【請求項７】
配列がそれぞれ配列番号：１８～２０に示されるハイブリッドRhesusボックス、上流Rhesusボックス又は下流Rhesusボックス、あるいは請求項２～６いずれか１項に記載の構造的特徴を利用して、試料中におけるRHD遺伝子のタンパク質産物の発現を終結又は消すRHD遺伝子内のナンセンス変異、ミスセンス変異、スプライス部位変異、部分欠失、部分挿入、部分逆位又はその組合せにより引き起こされるRHD陰性ハプロタイプを、PCR-RFLP、PCR-SSP又はロングーレンジPCRにより、特異的に検出する方法。
【請求項８】
請求項１～６いずれか１項に記載の核酸分子構造体を含んでなるベクター。
【請求項９】
請求項８記載のベクターにより形質転換されてなる非ヒト宿主。
【請求項１０】
請求項１～６いずれか１項に記載の核酸分子構造体の一部にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであって、
該一部が前記ハイブリッド遺伝子のブレークポイントを含む領域、又はその相補的な部分にハイブリダイズし、該ブレークポイントを含む領域が、上流RHDボックスの5'部分が下流RHDボックスの3'部分と空間的に近接することを特徴とし、該オリゴヌクレオチドが20ヌクレオチドを含んで、実際のブレークポイントの5'及び3'に位置する、オリゴヌクレオチド。
【請求項１１】
ストリンジェントな条件下に、請求項１０記載のオリゴヌクレオチドを、ヒトから得られた試料に含まれる核酸分子にハイブリダイズする工程、及び該ハイブリダイゼーションを検出する工程を含む、請求項１～６いずれか１項に記載の核酸分子構造体を特徴とするRHD遺伝子の欠失を保持する核酸分子の試料中における存在の試験方法。
【請求項１２】
該ハイブリダイゼーションの産物を制限エンドヌクレアーゼで消化する工程、及び該消化の産物を分析する工程をさらに含む、請求項１１記載の方法。
【請求項１３】
請求項１～６いずれか１項に記載の核酸分子構造体の少なくとも一部分であって、該ハイブリッド遺伝子のブレークポイントをコードする部分の核酸配列を決定する工程を含む、請求項１～６いずれか１項に記載の核酸分子構造体を特徴とするRHD遺伝子の欠失を保持する核酸分子の試料中における存在の試験方法。
【請求項１４】
該核酸配列を決定する前に、該核酸分子構造体の少なくとも前記部分を増幅する工程をさらに含む、請求項１３記載の方法。
【請求項１５】
該配列の少なくとも一部を増幅するプライマーのセットを用いて増幅反応を行なう工程を含む、請求項１～６いずれか１項に記載の核酸分子構造体を特徴とするRHD遺伝子の欠失を保持する核酸分子の試料中における存在の試験方法であって、該増幅反応に用いられるプライマーの少なくとも一つが、請求項１～６いずれか１項に記載の核酸分子構造体の一部に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであり、該一部が、該ハイブリッド遺伝子のブレークポイントを含む領域、又はその相補的な部分にハイブリダイズし、該ブレークポイントを含む領域が、上流RHDボックスの5'部分が下流RHDボックスの3'部分と空間的に近接することを特徴とする、試験方法。
【請求項１６】
該増幅が行われ、該増幅反応は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である、請求項１４又は１５記載の方法。
【請求項１７】
該PCRが、PCR-RFLP、PCR-SSP又はロングーレンジPCRである、請求項１６記載の方法。
【請求項１８】

増幅産物の分子量が分析される、請求項１４～１７いずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
下記工程：
(a) 血液試料又は血液ドナーから得られた試料からDNAを単離する工程；
(b) ストリンジェントな条件下に、少なくとも２つの逆に向き合うプライマーを、PCRを行なうようにDNAにハイブリダイズさせる工程；
(c) 標的配列を増幅する工程；
(d) ゲル上で増幅産物を分離する工程；及び
(e) 増幅産物を分析する工程
を含む、RHD陽性対立遺伝子をコードする請求項５又は６記載の核酸分子構造体の存在の試験方法。
【請求項２０】
該RHD陽性対立遺伝子が、血清学的にRhD陰性試料に由来するものである、請求項１９記載の方法。
【請求項２１】
該試料が、白人集団から選ばれる、請求項１９又は２０記載の方法。
【請求項２２】
該試料が、血液、血清、血漿、胎児組織、唾液、尿、粘膜組織、粘液、膣組織、膣から得られた胎児組織、皮膚、毛髪、毛包又は他のヒト組織である、請求項７及び１１～２１いずれか１項に記載の方法。
【請求項２３】
該試料から胎児細胞を濃縮すること又は末梢血、血清若しくは血漿などの母体組織の試料から胎児DNA若しくはmRNAを抽出することを含む、請求項２２記載の方法。
【請求項２４】
該試料由来の該核酸分子又はタンパク質性物質が、固体支持体に固定される、請求項７及び１１～２３いずれか１項に記載の方法。
【請求項２５】
該固体支持体がチップである、請求項２４記載の方法。
【請求項２６】
陰性又は陽性Rhesus D表現型の分析のための、請求項１～６いずれか１項に記載の核酸分子構造体の使用。
【請求項２７】
請求項２、５及び６いずれか１項に記載の１以上の核酸分子構造体の存在について、患者由来の試料を試験する工程を含み、ここで、２つの異なる該核酸分子構造体に対する試験が陽性の場合、Rh陰性血液の輸血を必要とすることを示す、輸血の必要がある患者がドナーからRhD陰性血液を輸血されるべきかどうかを決定する方法。
【請求項２８】
請求項１～６いずれか１項に記載の１以上の核酸分子構造体の存在について、ドナー由来の試料を試験する工程を含み、ここで、請求項４～６いずれか１項に記載の１以上の核酸分子構造体に対する試験が陰性であってもなくても、請求項２記載の核酸分子構造体に対する試験が陰性の場合、RhD陰性にタイプ分けされる患者へのドナーの血液の輸血を排除する、ドナーの血液が輸血を必要とする患者への輸血に用いられ得るかどうかを決定する方法。
【請求項２９】
請求項１～６いずれか１項に規定された１以上の核酸分子構造体の存在について、胎児の父から得られた試料を評価する工程を含む、RhD陰性母がRhD陽性胎児を妊娠若しくはもつリスク、又は抗D力価をもつ母が、新生児の溶血性疾患を発症するリスクをもって胎児を妊娠若しくはもつリスクの評価方法。
【請求項３０】
該核酸分子構造体が、変異又は欠失を保持する、請求項２９記載の方法。

【請求項３１】
請求項１～６いずれか１項に記載の１以上の核酸分子構造体の存在について、男性から得られた試料をアッセイすることによる男性が子供の父である可能性又は見込みの評価方法であって、ここで、試験結果は、該男性が、子供の父である可能性又は見込みを推量するのに用いられた請求項２及び４～６いずれか１項に記載の核酸分子構造体のホモ接合、ヘテロ接合又は非存在を決定するために用いられる、男性が子供の父である可能性又は見込みの評価方法。
【請求項３２】
(a) 請求項１０記載のオリゴヌクレオチド；及び／又は
(b) 請求項１５～１７いずれか１項に記載の増幅反応を行うに有用な一対のプライマーを含んでなるキット。
【請求項３３】
請求項１～６いずれか記載の核酸分子構造体の一部にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするためのオリゴヌクレオチドの使用であって、該一部が、該ハイブリッド遺伝子のブレークポイントを含む領域、又はその相補的な部分にハイブリダイズし、該ブレークポイントを含む領域が、上流Rhesusボックスの5'部分が下流Rhesusボックスの3'部分と空間的に近接することを特徴とする、オリゴヌクレオチドの使用。
【請求項３４】
下記工程：
(a) 血液試料又は血液ドナーから得られた試料からDNAを単離する工程；
(b) ストリンジェントな条件下に、少なくとも２つの逆に向き合うプライマーを、PCRを行なうようにDNAにハイブリダイズさせる工程；
(c) 標的配列を増幅する工程；
(d) ゲル上で増幅産物を分離する工程；及び
(e) 増幅産物を分析する工程
を含む、共通のRHD陰性ハプロタイプを示す請求項３記載の核酸分子構造体の存在の試験方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
本発明は、ＲＨＤ、ＳＭＰ１およびＲＨＣＥ遺伝子を含有するＲｈｅｓｕｓ遺伝子座および／またはＲｈｅｓｕｓボックス（群）、好ましくはハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックス、上流Ｒｈｅｓｕｓボックスおよび／または下流Ｒｈｅｓｕｓボックスを提示する核酸分子構造に関する。さらに、本発明は、一般的なＲＨＤ陰性ハプロタイプの特異的検出のための方法に関する。本発明はさらに、Ｄ陰性個体におけるＲＨＤ陽性ハプロタイプの検出に関する。診断用ツールの開発を可能にするＲＨＤ遺伝子における種々の変異が同定されている。本発明はまた、該ハイブリッドボックス、好ましくはブレークポイント(breakpoint)もしくはブレークポイントの領域に、または上流および下流Ｒｈｅｓｕｓボックスに特異的とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドに関する。さらにまた、本発明は、上述の本発明の化合物を含有または使用してなるキットに関する。
【０００２】
いくつかの文献が本明細書の本文中で引用されているが、本明細書に引用された文献の各々の開示内容（製造業者の仕様書、指示書などをいずれも含む）は、参照により本明細書に取り込まれる。
【０００３】
Ｒｈｅｓｕｓ Ｄ抗原（ＩＳＢＴ ００４．００１； ＲＨ１）は、タンパク質により決定される最も重要な血液型抗原である。抗－Ｄは、なお新生児溶血性疾患の主な原因である（Filbey, Acta Obstet Gynecol Scand, 74:687,1995； Bowman, J, Semin Perinatol 21:39, 1997）。集団によるが、白色系人種の３％～２５％は抗原Ｄをもたない（Mourant, The distribution of the human blood groups and other polymorphisms, London, Oxford University Press, 1976）。抗－Ｄ免疫化は、Ｄ－陰性レシピエントにおいて容易

に起こり得る（Urbaniak, Transfusion 21:64, 1981）。

【０００４】

ＲＨ血液型の抗原は、染色体上の位置１ｐ３４．１－１ｐ３６に（Cherif-Zahar, Hum. Genet. 86: 398, 1991; MacGeoch, Cytogenet. Cell Genet. 59:261, 1992）、おそらく４５０，０００塩基対（ｂｐ）未満の間隔をあけて（Carritt, Hum. Mol. Genet. 6:843, 1997）存在するＲＨＤおよびＲＨＣＥの２つの遺伝子にコードされるタンパク質に保有される。両遺伝子は、１０個のエキソンを含み、その構造は高度に相同である。両遺伝子の相対方向、間隔および他の遺伝子が散在する可能性は未知であった（Flegel, Transfus. Med. 8:281, 1998）。ごく最近になって、Ｏｋｕｄａらにより（Okuda, Biochem. Biophys. Res. Commun. 263:378, 1999）、ＲＨＤとＲＨＣＥとの間のＤＮＡセグメントを示すと思われる約１１，０００ｂｐの配列が報告された。

【０００５】

白色系人種では、Ｄ－陰性ハプロタイプの大部分は、ＲＨＤ遺伝子の欠失による。エキソン１から３’側非翻訳領域にわたるＲＨＤ－特異的配列は存在しないため（Gassner, Transfusion 37:1020, 1997）、この欠失は全ＲＨＤ遺伝子にわたる。該欠失の正確な程度は不明確であり、隣接（neighboring）遺伝子もまた影響される可能性が残ったままである。

【０００６】

Ｄ抗原の分子根拠としてのＲＨＤ遺伝子の同定により、ＤＮＡタイピングによるＲｈＤ表現型の予測が可能となった（Flegel, Transfus. Med. 8:281, 1998； Lo, Lancet 341:1147, 1993）。しかしながら、優勢（prevalent）Ｄ－陰性ハプロタイプの構造は未知であるため、ＲＨＤ欠失の特異的検出は不可能なままであり、RHD^{+}／RHD^{+}ホモ接合性個体とRHD^{+}／RHD^{-}ヘテロ接合性個体との区別は間接的な方法に依存した。この区別は、抗－Ｄを有するＤ－陰性の母親において、父親がRHD^{+}／RHD^{+}である子が影響を受けるリスクは１００％であるが、父親がRHD^{+}／RHD^{-}では５０％だけであるであるため、特に臨床的に重要である。

【０００７】

いくつかの間接的なアプローチが接合体構造を決定するために適用されている。（ｉ）表現型に基づく単純な推測は症例の約９５％において正確である、（ｉｉ）Ｃ抗原の存在などのファクターにより撹乱（confound）されうるＤ抗原密度の決定、および（ｉｉｉ）ＲＨＤ－およびＲＨＣＥ－特異的配列の同時（parallel）定量的増幅を含むいくつかの方法（Cossu, Electrophoresis 17:1911, 1996； Doescher, Infusionsr. Transfusionsmed. 26 (suppl 1): 31, 1999 （abstr.））。これらの精巧な技術は、通常の研究所では実用的でないことがある。また、何人かの研究者により、ＲＨＤ遺伝子の欠損に遺伝的に連鎖した、ＲＨＣＥ遺伝子または隣接配列における多型が同定された（Carritt, Hum. Mol. Genet. 6:843, 1997; Huang, Am. J. Hum. genet. 58: 133, 1996; Fujiwara, Hum. genet. 104:301, 1999; Onda, Gene 159:225,1995）。この間接的アプローチは、ＲＨＤ欠失を多型と関連づける連鎖不平衡に依存する。

【０００８】

さらに、ＲＨＤ　ＰＣＲの有用性は、ＲｈＤ－陰性においておそらく稀なＲＨＤ陽性対立遺伝子に関する不完全な知識によって制限される。ＲｈＤ陰性におけるＲＨＤ陽性対立遺伝子は、ＲＨＤ－ＣＥ－Ｄハイブリッド遺伝子（Huang, Blood 88:2326-33, 1996; Faas, Transfusion 37:38-44, 1997, Faas, Transfusion 36:506-11, 1996）、ナンセンス－変異（Avent, Blood 89:2568-77, 1997）、フレームシフト（Andrews, Blood 92:1839-40, 1998； Cherif-Zahar Br. J. Haematol. 102:1263-70, 1998）または偽遺伝子（Singleton, Blood 95:12-8, 2000）により引き起こされる。かかる対立遺伝子は、アフリカ系人種（Faas, Transfusion 37:38-44, 1997, Singleton, Blood 95:12-18, 2000）およびアジア系人種（Okuda, J. Clin. Invest. 100:373-9,1997）には頻繁にみられるが、白色系人種では稀である。それにもかかわらず、最近の解析（Avent, Blood 89:2568-77, 1997； Flegel, Transfus. Med. 8:281-302, 1998）では、白色人種においてさえ、これらの対立

遺伝子が、おそらく、不正確なＲｈ表現型予測の主な原因であることが示唆された。白色人種におけるいくつかの観察（Avent, Blood 89:2568-77, 1997； Hyland, Blood 84:321-4, 1994）は、これらの対立遺伝子が、ＣｄｅおよびｃｄＥハプロタイプ内に集中発生（cluster）していることを示した。

【０００９】

分子レベルでＲＨＤ遺伝子座を解析するための最も直接的なアプローチは、ＲＨＤ欠失部位にまたがる部位（spanning）のＰＣＲ増幅であろう。このようなアッセイは、ＲｈＤ陽性およびＲｈＤ陰性におけるＲＨＤ遺伝子座の構造の理解が不完全であったため、これまで利用可能ではなかった。

【００１０】

したがって、本発明の下地となる技術的課題は、信頼性のある、核酸に基づいた、Ｒｈｅｓｕｓ　Ｄ遺伝子座の解析のための手段および方法を提供することであった。これらの手段および方法は、ＲＨＤ$^{+}$／ＲＨＤ$^{+}$個体およびＲＨＤ$^{+}$／ＲＨＤ$^{-}$個体の検出および／または区別に特に好適であるはずである。

【００１１】

前述の技術的課題の解決は、特許請求の範囲において特徴づけられる実施態様を提供することにより達成される。

【００１２】

したがって、本発明は、ＲＨＤ、ＳＭＰ１およびＲＨＣＥ遺伝子を含有するＲｈｅｓｕｓ遺伝子座および／またはＲｈｅｓｕｓボックス、好ましくはハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックス、上流Ｒｈｅｓｕｓボックスおよび／または下流Ｒｈｅｓｕｓボックス（これらの配列を図８～１０に示す）を提示する核酸分子構造に関する。

【００１３】

本発明の文脈において、用語「核酸分子構造体」は、広義において、上述の遺伝子、すなわち、順に５’側から３’側に配列されたＲＨＤ、ＳＭＰ１およびＲＨＣＥ遺伝子、および／または前述のＲｈｅｓｕｓ遺伝子座を同時に規定（co-determine）するＲｈｅｓｕｓボックスの組合せを含んでなる線状ＤＮＡ－セグメントと定義される。本発明の分子構造体を生じるＤＮＡ配列には、以下のものが含まれ、該ヌクレオチド配列構造体は、Ｒｈｅｓｕｓボックス５’フランキング領域、ハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックス、または介在ＲＨＤ遺伝子を有する２つのＲｈｅｓｕｓボックス、およびＲｈｅｓｕｓボックス３’フランキング領域からなる。

【００１４】

以下の構造は、本発明の核酸分子構造体に含まれる好ましい態様を示す。

【００１５】

Ｒｈｅｓｕｓボックス５’フランキング領域は、ゲノムクローンＨＳ４６５Ｎ２４（GenBank 寄託番号AL031432.1）、塩基１～１２０，１５６で表される(represent)。

【００１６】

ハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスは、GenBank 寄託番号AL252313、塩基３３～９，１８０に代表される。

【００１７】

介在ＲＨＤ遺伝子を有する２つのＲｈｅｓｕｓボックスは、GenBank 寄託番号AL252311塩基３４～９，１７５に表される上流ＲｈｅｓｕｓボックスとＲＨＤ遺伝子とGenBank 寄託番号AL252312塩基２３～９，１７７で表される下流Ｒｈｅｓｕｓボックスとからなる（図８～１０参照のこと）。

【００１８】

Ｒｈｅｓｕｓボックス３’フランキング領域は、下流またはハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスとＳＭＰ１遺伝子、ＳＭＰ１遺伝子およびＲＨＣＥ遺伝子との間の小ＤＮＡセグメントからなる。

【００１９】

ＲＨＤ遺伝子は、ゲノムクローンHS469Ｄ22（GenBank 寄託番号AL031284.9）塩基５６，

０１２～５１，４７２に相同であり、「スタッファー（stuffer）断片」（GenBank 寄託番号AB029152）とも称する塩基７，７１６～１１，００５のヌクレオチドセグメントで示されるＲＨＤ５’側領域；ＲＨＤプロモーター（GenBank 寄託番号AJ252314）塩基１～１，２４６（図１１参照）、およびＲＨＤ　ｃＤＮＡ（GenBank 寄託番号X63097）塩基１～１，３７１およびそのイントロン配列により規定されるＲＨＤ遺伝子からなる。

【００２０】

小ＤＮＡセグメントは、好ましくは、下流またはハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスとＳＭＰ１遺伝子との間の１５ヌクレオチドを含有し、AL252312塩基９，１７８～９，１９２で表される。

【００２１】

ＳＭＰ１遺伝子は、GenBank 寄託番号AF0811282およびそのイントロン配列で表されるＳＭＰ１　ｃＤＮＡにより規定される。

【００２２】

ＲＨＣＥ遺伝子は、GenBank 寄託番号X63095およびそのイントロン配列で表され、さらに一部がゲノムクローンHS469D22 （GenBank 寄託番号AL031432.1）塩基１～５１，４７１で表されるＲＨＣＥ　ｃＤＮＡ、およびゲノムクローンHS469D22 塩基５１，４７２～８４，８１１で表されるＲＨＣＥ５’フランキング領域により規定される。

【００２３】

本発明のこの構造体内において、上流Ｒｈｅｓｕｓボックスは、ＲＨＤ遺伝子の５’側に位置するが、下流Ｒｈｅｓｕｓボックスは、ＲＨＤ遺伝子とＳＭＰ１遺伝子との間に位置する。あるいはまた、用語「核酸分子構造体」は、ここで述べる（referenced）Ｒｈｅｓｕｓボックスのみを含んでなるＤＮＡセグメントに関する。あるいはまたさらに、この用語は、ＲＨＤ、ＳＭＰ１およびＲＨＣＥ遺伝子と２つのＲｈｅｓｕｓボックス、すなわち上流Ｒｈｅｓｕｓボックスおよび下流ＲＨＤボックスとを含んでなるＤＮＡセグメントに関する。あるいはまたさらに、この用語は、ハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックス、ＳＭＰ１遺伝子とＲＨＣＥ遺伝子とを含んでなるＤＮＡセグメントを含む。あるいはまた、該用語は、ＳＭＰ１遺伝子およびハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスを含んでなるＤＮＡセグメントに関する。あるいはまた、この用語は、上流ＲｈｅｓｕｓボックスとＲＨＤと下流Ｒｈｅｓｕｓボックスとを含んでなるＤＮＡセグメントに関する。

【００２４】

あるいはまた、この用語は、下流ＲｈｅｓｕｓボックスとＳＭＰ１とを含有してなるＤＮＡセグメントに関する。特許請求の範囲に記載された主題をより充分に理解するために、後に図１および７で言及する。

【００２５】

本発明では、用語「核酸分子構造体」はまた、核酸プローブがハイブリダイズしうる、上述の核酸構造体の任意の可能な誘導体を含む。換言すれば、本発明の構造体は、合成または半合成的手段により調製してもよく、したがって、ペプチド核酸からなるか、ペプチド核酸を含んでなる。該用語はまた、核酸分子の意味合いももつ。

【００２６】

本発明では、用語「Ｒｈｅｓｕｓボックス」は、５’および３’末端でＲＨＤ遺伝子をフランキングする上流および下流ＤＮＡセグメントをいう。３つのＲｈｅｓｕｓボックスが、そのヌクレオチド配列により規定される。ハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスは、一態様においてGenBank 寄託番号AL252313 塩基３３～９，１８０で表される。介在ＲＨＤ遺伝子を有する２つのＲｈｅｓｕｓボックスは、一態様においてGenBank 寄託番号AL252311 塩基３４～９，１７５で表される上流Ｒｈｅｓｕｓボックス、および一態様においてGenBank 寄託番号AL252312 塩基２３～９，１７７で表される下流Ｒｈｅｓｕｓボックスからなる。添付の実施例において例示するように、前記Ｒｈｅｓｕｓボックスは、好ましくは、約９０００ｂｐ長であり、９８．６％同一性を有し、同一方向である。本発明では、上流および下流Ｒｈｅｓｕｓボックスは、少なくとも９５％相同である。これらのＲｈｅｓｕｓボックスの長さはさまざまでありうる。他の構造的特徴のうち、多数の反復エレメン

トのいくつかが縦列に配列されて（tandem array）構成されており、（配列の）伸長および欠失事象が生じやすいことが知られているため、Ｒｈｅｓｕｓボックスの長さはさまざまでありうることが期待される。かかる事象が起こると、Ｒｈｅｓｕｓボックスの長さは、１，０００ヌクレオチド長未満まで縮小されうるか、または２０，０００ヌクレオチド長を超えるまで伸長されうる。

【００２７】

本発明では、用語「同一性」は、ＢＬＡＳＴなどの適切なアラインメント・プログラムを用いて同定される配列の決定をいう。

【００２８】

先に指摘したように、分子レベルでのＲＨＤ陰性の診断的解析は、これまで、ＲＨＤ／ＲＨＣＥ遺伝子座の全体構造が未知であるという事実により妨げられていた。ここで、驚くべきことに、２つの遺伝子、ＲＨＤおよびＲＨＣＥが正反対の方向であり、３’末端で互いに対向していることがわかった。本発明では、ＲＨＤ遺伝子が２つの高度に相同なＲｈｅｓｕｓボックスにより囲まれていることがさらにわかった。ＲＨＤとＲＨＣＥとの間の物理的距離は、約３０，０００ｂｐであり、その間にＲｈｅｓｕｓボックスおよびＳＭＰ１遺伝子が存在する。優勢ＲＨＤ陰性ハプロタイプにおけるＲＨＤ欠失のブレークポイントは、Ｒｈｅｓｕｓボックスの１，４６３ｂｐ同一性領域に位置する。類似のＲＨＤ欠失事象は、高度に相同なＲｈｅｓｕｓボックス内の任意の他の領域を伴いうる。したがって、一般的なＲＨＤ欠失以外のＲＨＤ欠失を含有するブレークポイントの領域は、先に定義したＲｈｅｓｕｓボックス内の任意の位置に生じうることが予測される。

【００２９】

２つのＲＨ遺伝子が正反対の方向であることは、ＭＮＳおよびＲＨ血液型におけるハイブリッド遺伝子特徴の違いの説明となる。ＭＮＳ抗原をコードするグリコホリン遺伝子は同じ向きで存在し（Onda, Gene 159:225, 1995）、多くの組換えが、単一のハイブリッド遺伝子をもたらす不等乗り換えとして説明されうる（Blumenfeld, Hum. Mutat. 6:1999, 1995）。上述した驚くべき所見に基づき、ＲＨＤ陰性をもたらす分子レベルでの事象は、今ではより完全に理解することができる。ＲＨ遺伝子座では、互いに逆方向の配列は、不等乗り換えを誘起しにくく、この事象が起こった場合は、機能性ハイブリッド遺伝子は生じ得ない。ＲＨ遺伝子座での不等乗り換えがほとんどないという結論は、先に知得された（note）ように（Wagner, Blood 91:2157, 1998）、ほとんどのＲＨハイブリッド遺伝子がＲＨＤ－ＣＥ－ＤまたはＲＨＣＥ－Ｄ－ＣＥ型であり、cisに位置する相同ＤＮＡのストレッチ（stretches）を含むという説明となる。現在、ＲＨ遺伝子システムは、２つの遺伝子が反対方向である唯一充分に調査された遺伝子座であり、ゲノム全体において頻度に存在する、隣接する逆方向遺伝子（neighboring, oppositely oriented genes）の進化のモデルシステムとなっている。

【００３０】

ＲＨ遺伝子座の構造（図１）に基づいて、ＲＨＤ遺伝子欠失事象の節減（parsimonious）モデルを提案する（図７）。出願人は、理論に拘束されることを望まないが、ＲｈＤ陰性の発生に関して以下のことが信じられている。ＲＨＤ欠失は、ＲＨＤ遺伝子を囲む（embracing）高度に相度なＲｈｅｓｕｓボックスにより引き起こされる不等乗り換えにより説明されうる。上流および下流Ｒｈｅｓｕｓボックスの同一性領域内のブレークポイントの領域が関与する欠失事象をもたらす乗り換えがおこると、ＲＨＤ－陰性のハイブリッド型Ｒｈｅｓｕｓボックスが生じる。したがって、ハイブリッドＲＨＤボックスは、下流ＲＨＤボックス由来３’側部分に融合した上流ＲＨＤボックス由来５’側部分を特徴とする。好ましい一態様では、ブレークポイントの領域は９０３ｂｐ長である。この好ましいハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスの配列を図５に示す。実施例に記載した具体的な態様では、Ｒｈｅｓｕｓボックス内の該９０３ｂｐブレークポイントの領域は、相同性９９．９％の１，４６３ｂｐストレッチに位置し、ＴＨＥ－１Ｂヒト転位因子およびＬ２反復ＤＮＡエレメント（図４）に類似する。興味深いことに、ＲＨＤ陰性ハプロタイプにおいて欠失している＞６０，０００ｂｐのＤＮＡセグメントは、ＲＨＤ陽性ハプロタイプにおいて重

複するすべての配列のみからなるか、または該配列を含んでいた。

【００３１】

本明細書において上述した本発明の所見は、ＲＨ遺伝子座に関して個体の遺伝子型の解析のための実施しやすい、または洗練された方法をいくつか確立することを可能にする。かかる方法の例を本明細書において以下に提供する。

【００３２】

優勢ＲＨＤ陰性ハプロタイプをもたらす分子機構は、今や明らかであるが、どの程度古い重複事象が、ＲＨＤ陽性におけるＲＨ遺伝子の構造を生じたのかはあまり明確でない。２つのＲｈｅｓｕｓボックス全体の相同性は、ＲＨ遺伝子のものと非常に類似しているため、ＲｈｅｓｕｓボックスおよびＲＨ遺伝子の重複は、おそらく、単独事象として起こった。理論に拘束されないが、ＲＨＤ重複が、ほぼ（near）完全長の重複ＴＨＥ－１Ｂトランスポゾン様ヒトエレメントの挿入片との因果関係に由来すると推測することは興味深い。しかしながら、ＴＨＥ－１Ｂエレメントのオープン・リーディング・フレームは、おそらく重複の時点では非機能性であった。

【００３３】

本発明の好ましい態様では、該核酸分子構造は、一般的なＲＨＤ陰性ハプロタイプの代表例である。

【００３４】

本発明では、用語「表す」は、配列上および構造上の特徴を共有する一群の分子構造に構造を関連させるために、該特徴のすべてを含有する核酸分子構造に関する。上述の好ましい態様では、該特徴により一般的なＲＨＤ陰性ハプロタイプが生じる。本文脈において、これは、好ましくは、上流Ｒｈｅｓｕｓボックスと下流Ｒｈｅｓｕｓボックスとの間に位置する全ＲＨＤ遺伝子およびその５’側領域を含むＲＨＤ遺伝子の欠失を意味する。

【００３５】

本文脈において、これはまた、ＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物の発現を終結または消去する、ＲＨＤ遺伝子内の例えばナンセンス変異、ミスセンス変異、スプライス部位変異、部分欠失、部分挿入、部分逆位またはその組合せを共有するすべての構造がＲＨＤ陰性ハプロタイプの代表例であることを意味しうる。

【００３６】

用語「ハプロタイプ」は、母方または父方の単一の染色体上の規定領域内の一連の連鎖対立遺伝子に関する。

【００３７】

用語「一般的なＲＨＤ陰性ハプロタイプ」は、ハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスを含有してなる任意のＲｈＤ抗原陰性ハプロタイプをいう。好ましくは、上流Ｒｈｅｓｕｓボックスと下流Ｒｈｅｓｕｓボックスとの間に位置する全ＲＨＤ遺伝子およびその５’側領域を含むＤＮＡセグメントが欠失している。

【００３８】

別の態様では、本発明は、一般的なＲＨＤ陰性ハプロタイプにおけるＲＨＤ欠失のブレークポイントの領域にフランキングする２つのＲｈｅｓｕｓボックスである核酸分子構造に関する。

【００３９】

本発明では、用語「ＲＨＤ欠失のブレークポイントの領域」は、ＲＨＤ欠失に関与する異なるＤＮＡセグメントをいう。先に示したように、該欠失は、上流および下流Ｒｈｅｓｕｓボックスの両方が関与する不等乗り換え事象、散在配列の欠失および最終的な核酸分子構造の発生の結果であり得（上流および下流Ｒｈｅｓｕｓボックスからよりよく範囲規定するために、記載のＲｈｅｓｕｓボックスをハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスともよぶ）、ここで、上流ＲＨＤボックスの５’側部分は、下流ＲＨＤボックスの３’側部分に空間的に隣接している。上述し、かつ図７および４に示すように、この領域は、好ましくは、９０３ｂｐ長であり、Ｒｈｅｓｕｓボックス内の１，４６３ｂｐストレッチ内に位置し、このセグメントにおいて９９．９％相同性を有しうる。別の好ましい代替例では、該領

域は、該９０３ｂｐ断片より下流に位置するが、なお該１４６３ｂｐストレッチ内に含まれる。好ましくは、該断片は、５５６～５６０ｂｐ長である。実際のブレークポイントは、上流Ｒｈｅｓｕｓボックスおよび下流Ｒｈｅｓｕｓボックスがそれぞれの個体において異なるように変わり得る。しかしながら、本発明では、任意の場合のブレークポイントが上流および下流Ｒｈｅｓｕｓボックスに存在しうる。

【００４０】

ハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスは、ＲＨＤ－陰性ハプロタイプの解析に特に有用である。例えば、ＲＨＤ欠失の結果生じた、ブレークポイントを含有する核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを使用しうる。かかるオリゴヌクレオチドは、欠失事象を示すために実際のブレークポイントの領域の５’側および３’側に位置する、好ましくは２０ヌクレオチドを含む有意な（significant）部分とハイブリダイズする必要があることが理解される。例えば、かかるオリゴヌクレオチドが０．２×ＳＳＣ、０．１　ＳＤＳ、６５℃、プローブが９４３ヌクレオチド長などのストリンジェント条件下でハイブリダイズする場合、ハイブリダイズ領域は、ブレークポイントの３’側および５’側とハイブリダイズする部分を含むべきである。

【００４１】

例えば、Ｒｈｅｓｕｓボックスまたはブレークポイントの領域を含むその部分を増幅する。その後、増幅産物を、約６ヌクレオチド長以上のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより、配列特異的にアッセイする。

【００４２】

好ましくは、Ｒｈｅｓｕｓボックスまたはブレークポイントの領域を含むその部分を表すＤＮＡのストレッチを２種類のプライマーを用いて増幅する。一方のプライマーは、Ｒｈｅｓｕｓボックス内の同一性領域の５’側に位置し得、上流ＲｈｅｓｕｓボックスおよびハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスの両方に特異的である。他方のプライマーは、Ｒｈｅｓｕｓボックス内の同一性領域の３’側に存在し得、下流ＲｈｅｓｕｓボックスおよびハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスの両方に特異的である。この適用（application）では、期待する大きさの増幅産物の存在は、ハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスの存在を示し、したがってＲＨＤ欠失を示す。

【００４３】

プライマーの別の可能な組合せは以下の通りである。一方のプライマーは、Ｒｈｅｓｕｓボックス内の同一性領域の５’側に位置し得、上流ＲｈｅｓｕｓボックスおよびハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスの両方に特異的である。他方のプライマーは、Ｒｈｅｓｕｓボックス内の同一性領域の３’側に位置し得る。この適用では、ハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスの存在は、Ｒｈｅｓｕｓボックスの同一性領域の３’側のＤＮＡストレッチに関する増幅産物の部分の特異性を調べることにより決定される。これは、例えば、ハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスおよび下流Ｒｈｅｓｕｓボックスとハイブリダイズするが、上流Ｒｈｅｓｕｓボックスとはハイブリダイズしないオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより、またはハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスおよび下流Ｒｈｅｓｕｓボックスを切断するが上流Ｒｈｅｓｕｓボックスは切断しない制限酵素での消化により、またはハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスおよび下流Ｒｈｅｓｕｓボックスを切断しないが上流Ｒｈｅｓｕｓボックスは切断する制限酵素での消化により、または塩基配列決定により行ないうる。

【００４４】

プライマーの別の可能な組合せは以下の通りである。一方のプライマーは、Ｒｈｅｓｕｓボックス内の同一性領域の５’側に位置し得る。他方のプライマーは、Ｒｈｅｓｕｓボックス内の同一性領域の３’側に位置し得、下流ＲｈｅｓｕｓボックスおよびハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスの両方に特異的である。この適用では、ハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスの存在は、Ｒｈｅｓｕｓボックスの同一性領域の５’側のＤＮＡストレッチに関する増幅産物の部分の特異性を調べることにより決定される。これは、例えば、ハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスおよび上流Ｒｈｅｓｕｓボックスとハイブリダイズするが、下

流Ｒｈｅｓｕｓボックスとはハイブリダイズしないオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより、またはハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスおよび上流Ｒｈｅｓｕｓボックスを切断するが下流Ｒｈｅｓｕｓボックスは切断しない制限酵素での消化により、またはハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスおよび上流Ｒｈｅｓｕｓボックスを切断しないが下流Ｒｈｅｓｕｓボックスは切断する制限酵素での消化により、または塩基配列決定により行ないうる。

【００４５】

ハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスはまた、ハイブリッドボックスの１種以上の態様に特異的な抗－ＤＮＡ抗体、ｓｃＦｖＦａｂまたはＦ(ａｂ’)$_2$断片などの該抗体の断片もしくは誘導体またはアプタマーなどを用いて解析した場合のＲＨＤ欠失の存在の診断用ツールとして役立ち得る。したがって、抗体、その断片もしくは誘導体またはかかるアプタマーは、従来技術に従って当業者により作製されうる（例えば、 HarlowおよびLane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press 1988, Cold Spring Harborを参照のこと）。

【００４６】

好ましい態様では、本発明は、上流Ｒｈｅｓｕｓボックス、下流Ｒｈｅｓｕｓボックスまたはその両方が関与するＲＨＤ遺伝子欠失を含有する、ＲＨＤ陰性ハプロタイプを表す核酸分子構造に関する。

【００４７】

本発明は、さらに、一般的なＲＨＤ陰性ハプロタイプにおいてＲｈｅｓｕｓボックスにフランキングする核酸分子構造に関する。これらの構造または配列は、ＲＨＤ遺伝子座の分子解析のためのロングレンジ（long range）ＰＣＲなどの増幅反応のためのプライマーを誘導するのに使用しうる。

【００４８】

例えば、Ｒｈｅｓｕｓボックスおよびそのフランキング領域の部分またはブレークポイントの領域を含むその部分の代表的なＤＮＡのストレッチは、２種類のプライマーを用いて増幅する。一方のプライマーは、Ｒｈｅｓｕｓボックスの５’フランキング領域内に位置し得る。あるいはまた、このプライマーは、Ｒｈｅｓｕｓボックス内の同一性領域の５’側に位置し得、上流ＲｈｅｓｕｓボックスおよびハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスの両方に特異的である。他方のプライマーは、Ｒｈｅｓｕｓボックス内の３’フランキング領域内に存在し得る。あるいはまた、このプライマーは、Ｒｈｅｓｕｓボックス内の同一性領域の３’側に位置し得、下流ＲｈｅｓｕｓボックスおよびハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスの両方に特異的である。この適用では、期待する大きさの増幅産物の存在は、ハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスの存在を示し、したがってＲＨＤ欠失を示す。

【００４９】

プライマーの別の可能な組合せは以下の通りである。一方のプライマーは、Ｒｈｅｓｕｓボックスの５’フランキング領域内に位置し得る。他方のプライマーは、Ｒｈｅｓｕｓボックス内の同一性領域の３’側に位置し得る。この適用では、ハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスの存在は、Ｒｈｅｓｕｓボックスの同一性領域の３’側のＤＮＡストレッチに関する増幅産物の部分の特異性を調べることにより決定される。これは、例えば、ハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスおよび下流Ｒｈｅｓｕｓボックスとハイブリダイズするが、上流Ｒｈｅｓｕｓボックスとはハイブリダイズしないオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより、またはハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスおよび下流Ｒｈｅｓｕｓボックスを切断するが上流Ｒｈｅｓｕｓボックスは切断しない制限酵素での消化により、またはハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスおよび下流Ｒｈｅｓｕｓボックスを切断しないが上流Ｒｈｅｓｕｓボックスは切断する制限酵素での消化により、または塩基配列決定により行ないうる。

【００５０】

プライマーの別の可能な組合せは以下の通りである。一方のプライマーは、Ｒｈｅｓｕｓボックス内の同一性領域の５’側に位置し得る。他方のプライマーは、Ｒｈｅｓｕｓボックスの３’フランキング領域内に位置し得る。この適用では、ハイブリッドＲｈｅｓｕｓ

ボックスの存在は、Ｒｈｅｓｕｓボックスの同一性領域の５’側のＤＮＡストレッチに関する増幅産物の部分の特異性を調べることにより決定される。これは、例えば、ハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスおよび上流Ｒｈｅｓｕｓボックスとハイブリダイズするが、下流Ｒｈｅｓｕｓボックスとはハイブリダイズしないオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより、またはハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスおよび上流Ｒｈｅｓｕｓボックスを切断するが下流Ｒｈｅｓｕｓボックスは切断しない制限酵素での消化により、またはハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスおよび上流Ｒｈｅｓｕｓボックスを切断しないが下流Ｒｈｅｓｕｓボックスは切断する制限酵素での消化により、または塩基配列決定により行ないうる。

【００５１】

好ましい態様では、核酸分子構造は、ＲＨＤ陽性ハプロタイプを表す。

【００５２】

用語「ＲＨＤ陽性ハプロタイプ」は、ＲＨＤ遺伝子に特異的なＤＮＡ配列を含有する任意のハプロタイプをいう。

【００５３】

好ましい態様では、本発明は、一般的なＲＨＤ陽性ハプロタイプを表す核酸分子構造に関する。

【００５４】

別の好ましい態様では、核酸分子構造は、血清学的にはＲｈＤ陰性に分類されるＲＨＤ陽性ハプロタイプを含有する試料に由来する。

【００５５】

本発明の文脈において、用語「血清学的にＲｈＤ陰性に分類される」とは、例えば常套的な血清学的アッセイを用い、ＲｈＤ抗原の存在について試験した結果が陰性であった試料をいう。

【００５６】

特に好ましい態様では、ＲｈＤ陰性に分類される試料は、白人(Caucasian)集団から得られる。

【００５７】

別のより好ましい態様では、核酸分子構造は部分ＲＨＤ欠失を含有する。

【００５８】

通常ＲＨＤ陽性であると診断される対立遺伝子がＲｈＤ－陰性表現型を生じることの説明の１つは、ＲＨＤ遺伝子の部分の欠失、またはＰＣＲなどの標準的診断方法により検出されないＲＨＣＥ遺伝子由来の対応ＤＮＡセグメントによるＲＨＤ遺伝子の部分の置換である。

【００５９】

好ましい態様では、該欠失または置換は、ＣｃｄｄＥｅ表現型を生じるＲＨＤエキソン３～７もしくは４～７、または１～９を含有する。

【００６０】

最も好ましい態様では、該置換は、ＲＨＤ－ＣＥ（３～７）－Ｄハイブリッド遺伝子、ＣｃｄｄＥｅ表現型を生じる。ＲＨＤ－ＣＥ（４～７）－Ｄハイブリッド遺伝子、またはＲＨＣＥ（１～９）－Ｄ（１０）ハイブリッド遺伝子（これらはすべてＲｈＤ陰性表現型と相関する）を含有する。

【００６１】

別の最も好ましい態様では、本発明の核酸分子構造は、Ｃｄｅ^{S}ハプロタイプに代表的であるが他のＲｈｅｓｕｓハプロタイプにも存在するＲＨＤ－ＣＥ－Ｄハイブリッド対立遺伝子を含有し、イントロン３に位置する５’側ブレークポイント領域（該ブレークポイント領域の配列を図１２に示す）および/またはイントロン７に位置する５’側ブレークポイント領域（該ブレークポイント領域の配列を図１３に示す）または両方のブレークポイント領域を保有する。

【００６２】

ｒ'^{S}としても知られるＣｄｅ^{S}は、最初に、抗原ｅの代わりに抗原ｅ^{S}を発現し、抗原ｃを発現し、低減および改変された抗原Ｃを発現するとして特徴付けられた、Ｃｄｅに類似するＲＨハプロタイプである（Issitt, P.D. Aplied Blood Group Serology, Miami: Montgomery Scientific Publications, 1985, 239頁）。このハプロタイプの下地となる分子構造は最近明らかにされた（Blunt, T., Daniels, G.およびCarritt, B. Serotype switching in a partially deleted RHD gene. Vox Sang. 67:397-401, 1994； Faas, B.H.W., Becker, E.A.M., Wildoer, P., Ligthart, P.C., Overbeeke, M.A.M., Zondervan, H.A., von dem Borne, A.E.G.K.およびvan der Schoot, C.E. Molecular background of VS and weak C expression in blacks. Transfusion 37:38-44, 1997; Daniels, G.L., Faas, B.H., Green, C.A., Smart, E., Maaskant-van Wijk, P.A., Avent, N.D., Zondervan, H.A., von dem Borne, A.E., and van der Schoot, C.E. The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serologic and molecular analysis. Transfusion 38:951-958, 1998.）。Ｃｄｅ^{S}ハプロタイプは、抗原Ｃ免疫反応性をコードするＲＨＤ－ＣＥ－Ｄハイブリッド遺伝子を含み、ここでエキソン４～７はＲＨＣＥに由来し、エキソン３はＲＨＤ様構造を有するがＲＨＣＥ特異的Ｔｈｒをコドン１５２に保持する。

【００６３】

ＲｈＤ陰性個体に存在するいくつかのさらなるＲＨＤ陽性対立遺伝子が、これまでに部分的または完全に特性付けされている（表１０）。公表されたこれらの１０個のＲＨＤ対立遺伝子のうち３個が、ＲＨＣＥ特異的ストレッチが少なくともエキソン４～７を含むＲＨＤ－ＣＥ－Ｄハイブリッド対立遺伝子であった。これらの３個のハイブリッドＲＨＤ対立遺伝子の各々について、パートナーが適合性でありうる対立遺伝子が見出された（表１０）。本研究で観察された７個のＲｈＤ陰性パターンのうち、６個がかかるタイプのハイブリッドＲＨＤ対立遺伝子と適合性であった。公表された１０個のＲＨＤ対立遺伝子のうち７個が、欠失、ナンセンス変異または偽遺伝子を提示した。これらの対立遺伝子は本研究において存在せず、これは、それらが白色系人種に稀であることを示す。別の態様では、本発明は、これまでＲＨＤエキソン９陰性といわれており（Gassner, Transfusion 37:1020ff, 1997）、好ましくは、イントロン７およびイントロン８の部分におけるＲＨＤ特異的配列の欠失によりハイブリッドＲＨＤ－ＣＥ（９）－Ｄハイブリッド対立遺伝子を提示するＲＨＤ対立遺伝子の検出または決定を提供する。本方法で実施される具体的な工程は、本明細書に記載される本発明のさらなる方法で言及される任意の工程の単独または組み合せでありうる。

【００６４】

特に好ましい態様では、本発明の核酸分子構造における本発明のＲＨＤ－ＣＥ－Ｄハイブリッドが、抗原Ｃ反応性を有するポリペプチドをコードする。

【００６５】

抗原Ｃは、当該技術分野において公知のＲＨ血液型にシステムに属する血液型抗原であり、ＩＳＢＴ命名法にしたがって００４．００２で指定される。免疫血液学に関する多くのテキストブック、例えば、Reid, M.E.およびLomas-Francis, C. The Blood Group Antigen Facts Book, San Diego: Academic Press, 1997に記載がある。

【００６６】

さらに、本発明の好ましい態様では、本発明の核酸分子構造、またはＲＨＤ遺伝子に由来する核酸分子は、ＲＨＤ遺伝子のコード領域内または５’または３’スプライス部位内に一塩基置換を含有する。

【００６７】

用語「ＲＨＤ遺伝子に由来する核酸分子」は、この核酸分子が、ＲＨＤ遺伝子に由来するが、コード領域、任意のスプライス部位または非コード領域内に変異、欠失、挿入、置換または重複を含有することを意味するものとする。好ましくは、該核酸分子は異常型ポリペプチドを生じる。

【００６８】

さらに好ましい態様では、該塩基置換は、コドン１６に終止コドンを生じる。

【００６９】
より好ましい態様では、該置換遺伝子は、ＲＨＤ（Ｗ１６Ｘ）変異を生じる。
【００７０】
さらにより好ましい態様では、該置換はヌクレオチド４８位でのＧ　Ａ置換である。
【００７１】
本発明のさらに好ましい態様では、該塩基置換は、コドン３３０に終止コドンを生じる。
【００７２】
本発明のより好ましい態様では、該置換はＲＨＤ（Ｙ３３０Ｘ）変異を生じる。
【００７３】
本発明のさらにより好ましい態様では、該置換は、ヌクレオチド９８５位でのＣからＧへの置換である。
【００７４】
本発明の別の好ましい態様では、該置換はコドン２１２にミスセンス変異を生じる。
【００７５】
本発明の別の好ましい態様では、該置換は、ＲＨＤ（Ｇ２１２Ｖ）ミスセンス変異を生じる。
【００７６】
本発明のより好ましい態様では、該置換は、ヌクレオチド６３５位におけるＧからＴへの置換である。
【００７７】
本発明の別の好ましい態様では、該置換は、エキソン８／イントロン８境界にコンセンサススプライス部位を含有する４ヌクレオチド配列、６－ヌクレオチド配列または８－ヌクレオチド配列内での変異を生じる。
【００７８】
本発明の別のより好ましい態様では、該置換はＲＨＤ（Ｇ１１５３（＋１）Ａ）変異を生じる。
【００７９】
本発明のさらにより好ましい態様では、該置換は、イントロン８の５’スプライス部位でのＡＧｇｔからＡＧａｔへの置換である。
【００８０】
さらにより好ましい態様では、本発明の核酸分子構造またはＲＨＤ遺伝子に由来する核酸分子はＲｈＤ－陰性表現型と相関する。
【００８１】
本発明の別の好ましい態様では、該置換は、エキソン３／イントロン３境界のコンセンサススプライス部位を含有する４－ヌクレオチド、６－ヌクレオチド配列または８－ヌクレオチド配列内での変異を生じる。
【００８２】
本発明のさらに好ましい態様では、該置換は、ＲＨＤ（Ｇ４８６（＋１）Ａ）変異を生じる。
【００８３】
本発明のさらにより好ましい態様では、該置換は、イントロン３の５’スプライス部位でのＡＣｇｔからＡＣａｔへの置換である。
【００８４】
本発明のさらに好ましい態様では、該置換は、エキソン９／イントロン９境界のコンセンサススプライス部位を含有する４－ヌクレオチド配列、６－ヌクレオチド配列または８－ヌクレオチド配列内での変異を生じる。
【００８５】
別の好ましい態様では、該置換は、ＲＨＤ（Ｋ４０９Ｋ）変異を生じる。
【００８６】
本発明のさらにより好ましい態様では、該置換は、イントロン９の５’スプライス部位で

のＡＧｇｔからＡＡｇｔへの置換である。

【００８７】

本発明のより好ましい態様では、本発明の核酸分子構造またはＲＨＤ遺伝子に由来する核酸分子はD_{el}－表現型と相関する。

【００８８】

上述のことを要約して述べると、ＲＨＤ陽性対立遺伝子は、Ｄ－抗原発現の終結または低減をもたらす一塩基置換を保有しうる。本発明において開示される改良された検出方法を用い、ＲｈＤ陰性において、これまで記載されていなかった４個のＲＨＤ陽性対立遺伝子を見出した。２個の対立遺伝子、ＲＨＤ（Ｗ１６Ｘ）およびＲＨＤ（Ｙ３３０Ｘ）は、完全なＲｈＤタンパク質の発現を妨げる終止コドンを保有する。３個の対立遺伝子において、正確なスプライシングおよびＲｈＤ発現を妨げ得るスプライス部位変異が見出された。

【００８９】

試験された全RHD PCR法において、これらのアレレは、RHD陽性に分類され、正確な抗原D予測は、これらのアレレ又はこれらのアレレに連動した多型の特異的検出を必要とする。

【００９０】

以前、RHD同型接合体とRHD異型接合体との区別化は、困難であった。優勢なRHD陰性アレレは、特異的に検出されなかった(Flegel, Transfus. Med. 8:281, 1998; Cossu, Electrophoresis 17:1911, 1996)。本発明により見出された前記規定された変異は、優勢なRHD陰性ハプロタイプの検出の基礎を提供するため、今や、真のRHD遺伝子タイピングが、実施できる。

【００９１】

また、本発明は、当該技術分野で公知の技術、好ましくは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、より好ましくは、PCR-RFLP、PCR-SSP又はロング－レンジ（long range）PCRなどの増幅反応により、任意の構造的特徴又は塩基配列又は前記核酸配列分子構造の療法又はそれらの組合せを利用することによる、試料中のRHD陰性ハプロタイプの特異的検出方法に関する。

【００９２】

前記PCR-RFLP法及びロングレンジPCR法は、Rhesusボックス配列又はRhesusボックス隣接配列のいずれかを利用する。同じDNAストレッチ又はそれらの組合せを利用することにより、他の方法、PCR-SSO又はバイオチップなどが開発され、適用される。

【００９３】

本発明の1つの好ましい態様において、前記共通のRHD陰性ハプロタイプの特異的検出方法は、下記ステップ：

(a)　血液試料又は血液ドナーからDNAを単離するステップ、

(b)　PCRを行なうように、ストリンジェントな条件下に、少なくとも２つの逆に向き合うプライマーをDNAにハイブリダイズさせるステップ、

(c)　標的配列を増幅するステップ、

(d)　ゲルで増幅産物を分離するステップ、及び

(e)　増幅物(amplicon)を解析するステップ、

を含む。

【００９４】

前記試料は、血液、血清、痰、糞便又は他の体液であってもよく、由来するものであってもよい。解析対象の試料は、処理して抽出物としたもの、とりわけ、核酸であってもよい。好ましくはEDTA凝集血液試料又はクエン酸凝集血液試料からのDNAの単離は、改良塩析法、続くGassner, Transfusion 37: 1020, 1997に記載の標準技術により、行なわれうる。プライマーは、好ましくは、天然に生じたオリゴヌクレオチド又は精製制限消化物又は合成的に生産されたオリゴヌクレオチドのいずれかである。プライマーは、本発明の方法における効率を最大にするために、好ましくは、一本鎖であり、好ましくは、オリゴデオキシリボヌクレオチドである。当業者に周知の技術である高速液体クロマトグラフィー(HPLC)又はポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を含む前記プライマーの精製は、本発明

の方法における前記プライマーの使用に先立ち、一般的に認識される。PCR又はLCRなどの増幅方法は、当該技術分野において周知であり、例えば、Flegel, Transfusion Medicine 8 (1998), 281-302; Maaskant, Transfusion 38 (1998), 1015-1021及びLegler, Transfusion (1996), 426-31に記載される。

【００９５】

本発明によれば、RHD欠失を検出する好ましい方法は、エクスパンドハイフィデリティーPCRシステムと、Rhesusボックス同一(identity)領域の5'末端に結合する非特異的プライマー並びにRhesusボックスの下流に特異的であり、かつRhesusボックス同一(identity)領域の3'末端に結合するプライマーとを用いたPCR-RFLPを行なうことである。PCR条件は、好ましくは、65 ºCでのアニーリング、68ºC10分間での伸長を含む。その後、PCR増幅物(amplicon)をPstIを用いて37 ºCで3時間消化し、1%アガロースゲルを用いて、断片を分離(resolved)した。実施例10及び11に、さらなる好ましい方法がさらに記載される。

【００９６】

本発明の他の態様は、ハイブリッドRhesusボックスの検出を含む、共通のRHD陰性ハプロタイプの特異的検出方法に関する。

【００９７】

ハイブリッドRhesusボックスの検出は、対応のRHDアレレの性質に関する不明瞭でない結果を開業医に提供する。前記ハイブリッドrhesusボックスが検出されれば、ついで、RHD遺伝子が、欠失される。前記ハイブリッドRhesusボックスの検出は、ブレークポイント(breakpoint)を含有する領域に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いることにより、優先的に行われる。ハイブリダイゼーションに用いられるオリゴヌクレオチドは、直接的に、ブレークポイントのものにハイブリダイズし、かつ、さらに、前記ブレークポイントの5'及び3'の少なくとも943ヌクレオチドにハイブリダイズする必要がある。ハイブリダイゼーションは、好ましくは、0.2 X SSC、0.1% SDS、65 °Cなどのストリンジェントな条件下に起こる。ハイブリッドRhesusボックス内の実際のブレークポイントは、推定乗換え事象の正確な性質により変動するであろう。したがって、ハイブリッドRhesusボックスは、ハイブリダイゼーションに用いられる多くのオーバーラップするオリゴヌクレオチド又はオーバーラップしないオリゴヌクレオチドを用いても検出されるであろう。また、ハイブリッドRhesusボックスは、制限解析（好ましくは、サザンブロット解析との組合せ）、又は本明細書において前述のように、PCR技術などの他のプロトコルを用いて検出することもできる。

【００９８】

さらに、本発明の他の態様は、ハイブリッドRhesusボックスとその隣接領域とを含有した核酸分子構造を評価するステップを含む、共通のRHD陰性ハプロタイプの特異的検出方法に関する。

【００９９】

本発明によれば、分子核酸構造の評価は、アガロースゲル又はポリアクリルアミドゲルのいずれかを用いるゲル電気泳動、制限酵素による処理、サザン若しくはノーザンブロッティングなどのブロッティング技術又はハイブリダイゼーションの蛍光ガイド検出などの関連技術及び当該技術分野で公知の他の技術などの解析ステップを含む。

【０１００】

また、本発明は、本発明で述べられた任意のブレークポイント領域を検出するステップを含む、試料中のRHD陰性ハプロタイプの特異的検出方法に関する。

【０１０１】

好ましい態様では、本発明は、前記検出又は評価が、ハイブリッドRhesusボックス又はその一部を含有した核酸分子の長さの決定を含む、前記方法に関する。

【０１０２】

また、本発明の方法のこの好ましい態様は、ゲル電気泳動若しくはクロマトグラフィーなどの標準分離技術又は当業者に公知の塩基配列決定の標準技術を用いる。好ましくは、本発明は、この目的のために、実施例５にさらに記載されるように、市販のシークエンシン

グキット及びApplied Biosystems (ABI 373A又はABI 377)の自動シークエンシングマシーンを用いられる。

【０１０３】

本発明の他の好ましい態様は、前記検出又は評価がPCR-RFLP、PCR-SSP若しくはロングレンジPCR 又はハイブリッドRhesusボックス、好ましくは、ブレークポイント又は図4若しくは5又は図12若しくは13に記載のブレークポイント領域に特異的にハイブリダイズするプローブあるいは上流又は下流Rhesusボックスにハイブリダイズするプローブを用い、好ましくは、サザンブロット解析、ゲル電気泳動、バイオチップ解析、分子量測定又は蛍光により、行われる、前記方法に関する。

【０１０４】

本発明によれば、用語「～にハイブリダイズ」とは、ストリンジェント又は非ストリンジェント条件をいう。条件の設定は、当業者に周知であり、例えば、Sambrook, loc. cit. 又は HamesとHiggins、「核酸ハイブリダイゼーション、実用アプローチ（Nucleic acid hybridization, a practical approach）」、IRC Press, Oxford (1985)などに記載のプロトコルにしたがって、決定されるべきである。特異的にハイブリダイズする配列の検出は、通常、65oCで0.2 x SSC, 0.1% SDSなどのストリンジェントなハイブリダイズ及び洗浄条件を必要とするであろう。同質及び正確ではないが相補的な配列の検出のための非ストリンジェント条件は、50°C又は65oCで6x SSC, 1% SDSで設定されてもよい。周知のように、プローブの長さ及び測定対象の核酸の組成は、ハイブリダイゼーション条件のさらなるパラメータを構成する。

【０１０５】

さらに、本発明は、本発明の核酸分子構造又は核酸分子を含有したベクターに関する。

【０１０６】

前記ベクターは、増殖及び／又は発現のために用いられてもよく、遺伝子移入又はターゲティング目的のためにデザインされてもよい。かかるベクターの製造方法は、当該技術分野において周知である。同様のことが、変異を有する核酸の前記ベクターへのクローニング、適切な宿主中でのベクターの増殖などにあてはまる。

【０１０７】

前記ベクターは、特に、本発明の核酸分子を含有するものであって、遺伝子工学に慣用的に用いられるプラスミド、コスミド、ウイルス又はバクテリオファージであってもよい。レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス又はウシパピローマウイルスなどのウイルス由来の発現ベクターは、本発明の核酸分子又はベクターの標的細胞集団への送達に用いられうる。当業者に周知の方法を用いて、組換ウイルスベクターを構築することができる；例えば、Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. 及びAusubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)などを参照のこと。一方、本発明のポリペプチド及びベクターは、標的細胞への送達のために、リポソームに再構成されうる。本発明の核酸分子を含有したベクターは、宿主細胞のタイプによって異なる周知の方法により宿主細胞に導入されうる。例えば、塩酸カルシウムトランスフェクションは、原核細胞に慣用的に用いられるが、リン酸カルシウム処理又はエレクトロポレーションは、他の宿主細胞型に用いられうる；例えば、上記Sambrookを参照のこと。

【０１０８】

かかるベクターは、適切な細胞内及び適切な条件下での前記ベクターの選別を可能にするマーカー遺伝子などの遺伝子をさらに含有してもよい。好ましくは、本発明の核酸分子は、原核細胞又は真核細胞中での発現を可能にする発現調節配列に実施可能に連結される。前記ポリヌクレオチドの発現は、翻訳されうるmRNAへのポリヌクレオチドの転写を含む。真核細胞、好ましくは、哺乳動物細胞における発現を保証する調節エレメントは、当業者に周知である。前記調節エレメントは、通常、転写開始を保証する調節配列及び任意に転写の終結と転写産物の安定化とを保証するポリ-Aシグナルを含む。さらなる調節エレメン

トは、転写エンハンサー、翻訳エンハンサー及び／又は天然に付随する若しくは異質なプロモーター領域を含んでもよい。原核宿主細胞における発現を可能にする可能な調節エレメントとしては、例えば、大腸菌におけるPL、lac、trp又はtacプロモーターが含まれ、真核宿主細胞における発現を可能にする調節エレメントの例示としては、酵母におけるAOX1又はGAL1プロモーター、哺乳動物及び他の動物細胞におけるCMVプロモーター、SV40プロモーター、RSVプロモーター（ラウス肉腫ウイルス）、CMVエンハンサー、SV40エンハンサー又はグロブリンイントロンなどが含まれる。また、転写開始に応答するエレメントの他に、かかる調節エレメントは、前記核酸分子の下流にSV40－ポリA部位又はtk－ポリA部位などの転写終結シグナルを含んでもよい。さらに、用いられる発現系に応じて、前記ポリペプチドを細胞内成分に向けうるリーダー配列又は培地に分泌しうるリーダー配列を、本発明のポリヌクレオチドのコード配列に付加してもよく、前記リーダー配列は、当該技術分野に周知である。リーダー配列は、適当な段階で翻訳、開始、終結配列で組み立てられ、好ましくは、翻訳されたタンパク質又はその一部をペリプラズム域又は細胞外培地に分泌させうるリーダー配列である。任意に、異質の配列は、所望の性質、例えば、発現された組換産物の安定化又は単純化精製を与えうるC末端又はN末端識別ペプチドを含む融合タンパク質をコードしてもよい。このような状況下、適切な発現ベクターは、岡山－バーグcDNA発現ベクターpcDV1(Pharmacia)、pCDM8、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3(In-vitrogene)、又はpSPORT1(GIBCO BRL)など、当該技術分野に公知である。

【０１０９】

好ましくは、前記発現調節配列は、真核宿主細胞を形質転換しうるベクター又はトランスフェクトしうるベクターでの真核プロモーター系であるが原核宿主用の調節配列も使用されうる。

【０１１０】

また、前記のように、本発明のベクターは、遺伝子伝達又はターゲティングベクターであってもよい。治療用遺伝子をエクス・ビボ又はイン・ビボ技術で細胞に取り込むことに基づく遺伝子治療は、遺伝子伝達の最も重要な応用の1つである。エクス・ビボ又はイン・ビボ遺伝子治療に適したベクター及び方法は、文献に記載され、当該技術分野に公知である；例えば、Giordano、Nature Medicine 2 (1996)、534-539；Schaper、Circ. Res. 79 (1996)、911-919；Anderson、Science 256 (1992)、808-813；Isner、Lancet 348 (1996)、370-374；Muhlhauser、Circ. Res. 77 (1995)、1077-1086；Wang、Nature Medicine 2 (1996)、714-716；国際公開第94/29469号パンフレット；国際公開第97/00957号パンフレット又はSchaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640及び本明細書に記載の参考文献などを参照のこと。本発明のポリヌクレオチド及びベクターは、細胞への直接導入又はリポソーム若しくはウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス）を介する細胞への導入のためにデザインされてもよい。好ましくは、前記細胞は、生殖系細胞、胚性細胞若しくは卵細胞又はそれら由来の細胞であり、最も好ましくは、前記細胞は、幹細胞である。

【０１１１】

さらに、本発明は、本発明のベクターで形質転換された非ヒト宿主に関する。

【０１１２】

適切な宿主は、トランスジェニック動物；細菌、酵母細胞、動物、好ましくは、哺乳動物細胞、糸状菌細胞又は昆虫細胞などの細胞を含む。トランスフェクション、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどを含む形質転換プロトコルも当該技術分野で周知である。

【０１１３】

さらに、本発明は、適切な条件下に本発明の宿主を培養する工程及びRHD遺伝子のタンパク質産物を単離する工程を含む、RHD遺伝子のタンパク質産物の製造方法に関する。

【０１１４】

RHD遺伝子のタンパク質産物は、慣例／方法にしたがって、回収されうる培養培地に移出することが好ましい。また、本発明において用いられる用語「培養」は、トランスジェニ

ック動物の創出を含む。適切なベクター、構築及び任意に適切なフィードを用いて、抗原は、例えば、トランスジェニックウシのミルクから単離されてもよい。

【０１１５】

本発明は、さらに、本発明の核酸分子にコードされたRHD遺伝子のタンパク質産物又は本発明の方法により製造されたRHD遺伝子のタンパク質産物に関する。

【０１１６】

好ましくは、タンパク質は、天然の抗原と同様に、翻訳後修飾され、天然の抗原と同じ化学構造を有する。したがって、本発明の方法により製造される場合、前記タンパク質は、好ましくは、ヒト細胞において製造される。

【０１１７】

さらに、本発明は、ストリンジェントな条件下に、前記（ミスセンス）変異若しくは前記終止コドンを含有する本発明の核酸分子構造若しくは核酸分子の一部、又はその相補的成分にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドあるいは本明細書上記に同定された遺伝子変換のブレークポイントにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドに関する。

【０１１８】

本発明のこの態様において、オリグヌクレオチドは、変異配列又はブレークポイントに直接的にハイブリダイズする。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の設定は、例えば、Sambrook et al, "Molecular Cloning, A Laboratory Handbook" CSH Press, Cold Spring Harbor 1989又はHames及びHiggins, "Nucleic acid hybridization, a practical approach", IRL Press, Oxford (1985)によく記載されている。したがって、特異的にハイブリダイズする配列の検出は、通常、65°で0.2 x SSC, 0.1% SDS などのハイブリダイゼーション及び洗浄条件を必要とする。周知のように、プローブの長さ及び決定対象の核酸の組成は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件のさらなるパラメータを構成する。さらに、オリゴヌクレオチドは、12～50ヌクレオチド、より好ましくは、15～24ヌクレオチドを含むことが好ましい。ブレークポイントへのハイブリダイゼーションは、ストリンジェント又は非ストリンジェント条件下であってもよい。非ストリンジェントハイブリダイゼーション条件の例示は、50°Cで4 x SSC、0.1% SDSのハイブリダイゼーション及び洗浄である。

【０１１９】

さらに、本発明は、本発明のRHD遺伝子のタンパク質産物に特異的に結合する抗体又はアプタマーに関する。

【０１２０】

抗体は、試験管、ゲル、固相での凝集技術及び２次抗体の存在若しくは非存在下での捕獲技術などの当該技術分野に周知のいかなる血清学技術又は免疫蛍光エンハンスメントの存在若しくは非存在下でのフローサイトメトリーで試験され、用いられてもよい。

【０１２１】

本発明の抗体は、モノクローナル抗体であってもよく、ポリクローナル抗血清に由来又は含有される抗体であってもよい。さらに、本発明により用いられる用語「抗体」は、Fab、$F(ab')_2$、Fv又はscFv断片などの前記抗体の断片を含む；例えば、Harlow及びLane、"Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor, N.Y.を参照のこと。前記抗体又はその断片は、天然起源のものであってもよく、（半）合成的に生産されてもよい。また、かかる合成産物は、本発明の抗体と同じ又は実質的に同じ結合特異性を有する非タンパク質性物質又は半タンパク質性物質（non-proteinaceous as semi-proteinaceous material）を含む。かかる産物は、例えば、ペプチド模倣物により得られるであろう。

【０１２２】

用語「アプタマー」は、当該技術分野で周知であり、例えば、Osborneら, Curr. Opin. Chem. Biol. I (1997), 5-9 or in Stall and Szoka, Pharm. Res. 12 (1995), 465-483に定義される。

【０１２３】

さらに、本発明は、ストリンジェントな条件下に本発明のオリゴヌクレオチドを、ヒトから得られた試料中に含有される核酸分子にハイブリダイズするステップ、及び前記ハイブリダイゼーションを検出するステップを含む、変異Rhesus D抗原をコードする核酸分子又は本発明の核酸分子構造若しくは核酸分子により特徴づけられたRHD遺伝子の欠失を有する核酸分子の試料中における存在の試験方法に関する。

【０１２４】

好ましくは、本発明の方法は、制限酵素で前記ハイブリダイゼーションの産物を消化するステップ又は前記ハイブリダイゼーションの産物を制限酵素での消化に供するステップ、及び前記消化の産物を解析するステップをさらに含む。

【０１２５】

本発明のこの好ましい態様は、慣用の手段により、有効なハイブリダイゼーションと無効なハイブリダイゼーションとの差別化を可能にする。例えば、野生型RHD遺伝子は、制限酵素部位を含有する場合、ハイブリダイズした産物は、適切な制限酵素により切断され得るであろうが、変異した配列は、二本鎖産物を生じないか、認識されうる制限部位を含有せず、それゆえ、切断されないであろう。一方、ハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは、変異された配列にハイブリダイズするのみであってもよい。この場合、野生型配列でなく、変異配列を含有したハイブリッドだけが適切な制限酵素で切断されるであろう。消化産物の解析は、例えば、臭化エチジウムを用いた核酸の染色と任意に組み合わせてもよいゲル電気泳動などの慣用の手法により実施されうる。サザンブロッティングなどのさらなる技術との組合せも考えられうる。

【０１２６】

前記ハイブリダイゼーションの検出は、例えば、抗DNA二本鎖抗体により、又は標識オリゴヌクレオチドの利用により実施されてもよい。慣用的には、本発明の方法は、サザン又はノーザンブロッティング及び関連技術などのブロッティング技術とともに行われる。標識は、例えば、標準プロトコルにより実施されてもよく、放射活性マーカー、蛍光、リン光、化学発光、酵素標識などによる標識が挙げられる。

【０１２７】

また、本発明は、本発明のオリゴヌクレオチドとRHDΨ構造にハイブリダイズする少なくとも1つの他のオリゴヌクレオチドのいずれかを、ヒトから得られた試料中に含有された核酸分子にストリンジェントな条件下にハイブリダイズするステップ及び前記ハイブリダイゼーションを検出するステップを含む、本発明のRHDΨ及びRHD分子構造の存在の同時検出方法に関する。

【０１２８】

さらに、本発明は、前記（ミスセンス）変異、前記ストップコドン又は前記ハイブリッド遺伝子のブレークポイントをコードする本発明の核酸分子構造又は核酸分子の少なくとも一部の核酸配列を決定するステップ、及びRHDΨ構造の少なくとも一部を決定するステップを含む、試料中の本発明のRHDΨ及びRHD分子構造の存在の同時試験方法に関する。

【０１２９】

さらに、本発明は、前記（ミスセンス）変異、前記ストップコドン又は前記ハイブリッド遺伝子のブレークポイントをコードするものであって、かつ本発明の核酸分子構造又は核酸分子の少なくとも一部の核酸配列を決定するステップを含む、変異Rhesus D抗原をコードする核酸の存在又は本発明の核酸分子構造又は核酸分子により特徴付けられたようにRHD遺伝子の欠失を有する核酸分子の試料中における存在の同時試験方法に関する。

【０１３０】

好ましくは、本発明の方法は、前記核酸配列を決定するに先立ち、前記核酸分子構造の少なくとも前記部分の増幅をさらに含む。

【０１３１】

さらに、本発明は、前記配列の少なくとも一部を増幅するプライマーのセットであって、かつ増幅反応に用いられる前記プライマーの少なくとも1つが、本発明のオリゴヌクレオチドであり、少なくとも1つのプライマーが、RHDΨ構造を（例えば、特異的にハイブリダ

イズすることにより）増幅するものであるプライマーのセットを用いた増幅反応を行うステップ、及び増幅産物を解析するステップを含む、RHDΨ及び本発明のRHD分子構造のいずれかの試料中における存在の同時試験方法に関する。

【０１３２】

RHDΨは、Singletonら(Singleton, B.K., Green, C.A., Avent, N.D., Martin, P.G., Smart, E., Daka, A., Narter-Olaga, E.G., Hawthorne, L.M.,及びDaniels, G. Rh D-陰性血液群表現型のアフリカ人における37塩基対重複を含むRHD 偽遺伝子及びナンセンス変異の存在、Blood 95(1):12-18, 2000).によりキャラクタライズされているD陰性に検出されたRHDアレレである。

【０１３３】

さらに、本発明は、前記配列の少なくとも一部を増幅するプライマーのセットであって、かつ増幅反応に用いられる前記プライマーの少なくとも1つが、本発明のオリゴヌクレオチドであるプライマーのセットを用いて増幅反応を行うステップを含む、変異Rhesus D抗原をコードする核酸分子又は本発明の核酸分子構造又は核酸分子により特徴付けられたようにRHD遺伝子の欠失を有する核酸分子の試料中における存在を同時に試験する方法に関する。

【０１３４】

さらに、さらなる態様において、本発明の方法は、前記増幅反応に用いられる少なくとも1つのプライマーが本発明のオリゴヌクレオチドである方法である。

【０１３５】

好ましくは、増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で実施される。リガーゼ連鎖反応などの他の増幅方法も用いられてもよい。

【０１３６】

本発明の方法の好ましい態様において、前記PCRは、PCR-RFLP、PCR-SSP 又はロングーレンジPCRである。

【０１３７】

さらに、本発明の他の好ましい態様において、増幅産物の分子量が解析される。分子量の前記解析は、アガロースゲル電気泳動SDS-PAGEマススペクトロメトリー、この目的のためには、MALDI-TOFなどの当業者に周知である標準技術などを用いる。

【０１３８】

本発明の方法の1つの好ましい態様において、RHD陽性アレレの検出方法は、下記ステップ：

(a)　血液試料又は血液ドナーからDNAを単離するステップ；
(b)　PCRを行なうように、少なくとも２つの対向するプライマーをストリンジェントな条件下にDNAにハイブリダイズさせるステップ、
(c)　標的配列を増幅するステップ、
(d)　ゲル上で増幅産物を分離するステップ、及び
(e)　増幅物(amplicon)を解析するステップ、
を含む。

【０１３９】

種々のステップにおいて適用されるべき特定の条件に関して、本明細書で前記の対応の記載に述べられる。

【０１４０】

好ましい態様において、RHD陽性アレレは、血清学的にRhD陰性である集団に由来する。他の好ましい態様において、RhD陰性試料は、白人(Caucasian)集団から選ばれる。

【０１４１】

本発明の方法は、標的配列が変異そのものであるか、少なくとも1つの変異を有する場合、標的配列のみの増幅をもたらすであろう。これは、前記オリゴヌクレオチドは、好ましくはストリンジェントな条件下に、野生型配列とはハイブリダイズしないが（増幅産物が得られないという結果を伴う）、変異配列にのみハイブリダイズするであろうためである

。もちろん、2つの変異配列などの1以上のものにハイブリダイズするプライマーオリゴヌクレオチドが、本発明の方法に用いられるであろう。後者の態様は、変異の組合せが試験される場合に好ましいであろう。前記変異がほとんどないか、あるいはないことが、ミスセンス変異に必要であることに注目することが重要である。これは、他の型の変異が、前記ミスセンス変異との組合せ、又は前記遺伝子変換との組合せで生じる場合にあてはまるであろう。

【０１４２】

好ましくは、本発明の方法において、前記増幅又は増幅反応があるか、あるいは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により行われる。リガーゼ連鎖反応などの他の増幅方法も用いられるであろう。

【０１４３】

さらに、本発明は、本発明の抗体又はアプタマー又はファージへの特異的結合について、ヒトから得られた試料をアッセイするステップを含む、本発明のRHD遺伝子のタンパク質産物の試料中における存在の試験方法に関する。

【０１４４】

また、結合に関する試験は、ELISAなどの標準技術の実施を含むであろう；例えば、Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harborなどを参照のこと。

【０１４５】

他の好ましい態様において、本発明は、直接凝集法、間接抗グロブリン試験、モノクローナル抗D抗体及び吸着／溶出技術を用いるステップを含む、本発明の核酸分子構造又は本発明の核酸分子をコードするRHD遺伝子のタンパク質産物の存在の試験方法に関する。

【０１４６】

したがって、前記態様は、2つのモノクローナル抗D抗体を用いた直接凝集、他に、オリゴクローナル抗D抗体を含有したゲルマトリックスを用いた間接抗グロブリン試験、さらに他に、赤血球へのポリクローナル抗D抗体の吸収及びクロロホルム技術を用いた溶出を含んでもよい。本方法のさらなる記載は、実施例１８に示される。

【０１４７】

好ましくは、本発明の方法において、前記試料は、血液、血清、血漿、胎児組織、唾液、尿、粘膜組織、粘液、膣組織、膣から得られた胎児組織、皮膚、毛髪、毛包又は他のヒト組織である。

【０１４８】

さらに、本発明の方法は、好ましくは、胎児細胞を富化するステップを含む。本富化は、適切な抗体、レクチン若しくは胎児細胞に特異的に結合する他の試薬を用いること又は母体組織と胎児細胞との区別的分離を試みる任意の技術、例えば、密度勾配などにより達成されうる。また、好ましくは、前記方法において、有利には、慣用の手法にしたがって、末梢血、血清又は血漿などの母体組織から胎児DNA又はmRNAを抽出することもできる。

【０１４９】

本発明の方法のさらなる好ましい態様において、前記試料由来の前記核酸分子又はタンパク質加水分解物質を固相に固定化する。

【０１５０】

好ましくは、前記固相は、チップである。

【０１５１】

チップの利点は、当該技術分野で周知であり、本明細書においては、詳細には、論議される必要がない。これらには、小さいサイズ及び分析対象物のコンピューターに基づく解析の容易なアクセスを含む。

【０１５２】

さらに、本発明は、陰性又は陽性Rhesus D表現型の解析のための本発明の核酸分子構造又は核酸分子の使用に関する。

【０１５３】

前記解析は、例えば、本明細書で前記した方法に基づく。

【０１５４】

また、本発明は、モノクローナル抗D若しくは抗C抗体又はポリクローナル抗D若しくは抗C抗血清又は抗グロブリン又は抗ヒトグロブリン抗血清又はその製剤のアフィニティー、アビディティ及び／又は反応性の評価のための、本発明の核酸分子構造又は核酸分子、本発明のベクター又は本発明のRHD遺伝子のタンパク質産物の使用に関する。

【０１５５】

抗Cは、抗原Cに結合するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である。

【０１５６】

また、本発明は、モノクローナル抗D若しくは抗C抗体又はポリクローナル抗D若しくは抗C抗血清又は抗グロブリン又は抗ヒトグロブリン抗血清又はその製剤のアフィニティー、アビディティ及び／又は反応性の評価のための、本発明の核酸分子構造又は核酸分子を保持するプロバンド由来の細胞、好ましくは赤血球細胞の使用に関する。

【０１５７】

前記製剤は、当業者に周知の技術にしたがって提供されうる。前記製剤は、アルブミンなどの安定化剤、さらには、アジ化ナトリウム、塩イオン、緩衝液などを含有してもよい。製剤の処方は、当該技術分野に周知のように、抗体の結合特性に影響を有するであろう。

【０１５８】

例えば、第1のステップにおいて、キャリヤー又は血液ドナーのRhesus D遺伝子及びそのアレレ状態を解析し、前記遺伝子が本発明により、見出される変異を含有するかどうかを決定する。第2のステップにおいて、前記変異は、赤血球細胞の表面における特定のRhD抗原密度に相関する。慣用的には、前記相関は、本発明により提供されたデータ（変異自体など）及び当該技術分野に周知の技術（例えば、Jonesら、1996、Flegel及びWagner、1996など）により確立されうる。第3のステップにおいて、反応性、感度、アフィニティー、アビディティ及び／又は特異性などの抗体又は抗血清の特徴は、好ましくは、分子的に、及びRhD 抗原表面密度に関してステップ2で記載のようにキャラクタライズされた赤血球細胞を用いた適切な血液群血清学的技術で決定されうる。かかるデータは、例えば、性質調節、標準化などに用いられうる。

【０１５９】

本発明は、モノクローナル及びポリクローナル抗血清、好ましくは、抗Dモノクローナル又は抗血清のキャラクタリゼーション、標準化及び性質調節に最も有用であろう。さらに、例えば、抗グロブリン及び抗ヒトグロブリン抗血清は、本発明の教示に基づいてキャラクタライズされうる。適切にキャラクタライズされた抗Dモノクローナル抗体は、RhD診断に慣用的に用いられうる。例えば、適切にキャラクタライズされたモノクローナル抗体は、血液細胞の表面のD抗原密度を決定するのに有用であろう。したがって、診断に有用なモノクローナル抗体カットオフ値が確立されうる。これは、RhD診断に用いられる抗体の性質調節に重要である。

【０１６０】

したがって、本発明は、

(a)　本発明により決定されたブレークポイント又は変異の存在について、プロバンドの試料の核酸を試験するステップ；

(b)　RHD遺伝子の変異又は欠失状態とアレレ状態とに基づき、該核酸と、該プロバンドの赤血球細胞の表面におけるRHD遺伝子のタンパク質産物の密度とを相関させるステップ；

(c)　前記モノクローナル抗体又はポリクローナル抗血清又はその製剤と、表面にRHD遺伝子のタンパク質産物を有する細胞とを反応させるステップ；

(d)　ステップ(c)で得られた結果に基づき、前記モノクローナル抗体又はポリクローナル抗血清又はその製剤をキャラクタライズするステップ

を含む、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗血清又はそれらの製剤のキャラクタリゼーション法にも関する。

【０１６１】

用語「アレレ状態」に関して、本用語は、プロバンドにおけるRHDアレレは、均質、異質又は半均質状態で存在する可能性を述べる。また、2つのアレレが、本明細書において、上記で規定された2つの異なる変異（変換を含む）を有する可能性が、本用語により含まれる。

【０１６２】

本発明の方法の好ましい態様において、前記キャラクタリゼーションは、抗体及び抗血清の反応性、感度、アビディティ、アフィニティー、特異性及び／又は他の特徴の決定を含む。

【０１６３】

さらに、好ましくは、表面にRHD遺伝子のタンパク質産物を有する細胞が赤血球細胞である方法である。

【０１６４】

また、本発明は、本発明の1以上の核酸分子構造又は核酸分子の存在について、患者由来の試料を試験するステップを含み、ここで、2種の前記核酸分子構造又は核酸分子についての陽性試験が、Rh陰性血液を用いた輸血が必要であることの指標である、輸血の必要がある患者が、ドナー由来のRhD陰性血液で輸血すべきかどうかを決定する方法に関する。他方、前記核酸分子構造又は核酸分子の1つの同一の2コピーの付随する存在を示す陽性試験が、Rh陰性血液を用いた輸血の必要の指標である。

【０１６５】

一方、他の本発明のRHD陰性核酸分子構造又は核酸構造を表す1以上の核酸分子構造又は核酸分子についての陰性試験を行うか、あるいは行わない、共通のRHD陰性ハプロタイプを表わす核酸分子構造又は核酸分子についての陰性試験は、RhD陽性としてタイプづけられた血液の輸血を可能にする。目下、例えば、患者が、実際にRhD陰性血液を用いた輸血を必要とするかどうか、又はかかる警戒が必要でないかどうかを簡便に調べることができる。

【０１６６】

また、本発明は、ドナー由来の試料について、本発明の核酸分子構造の存在を試験するステップを含み、ここで、本発明の核酸分子構造の陽性試験が、ドナーの血液の輸血を排除する、ドナーの血液が、抗原Cに曝露されるべきでない輸血の必要がある患者への輸血に適するかどうかを決定する方法に関する。

【０１６７】

さらに、本発明は、ドナー由来の試料について、本発明の1以上の核酸分子構造又は核酸分子の存在を試験するステップを含み、ここで、他の本発明のRHD陰性ハプロタイプを表す1以上の核酸分子構造又は核酸分子について陰性試験をともなうか、あるいはともなわない共通のRHD陰性ハプロタイプを表す核酸分子構造の陰性試験が、RhD陰性としてタイプ付けられた患者へのドナーの血液の輸血を排除する、ドナーの血液が輸血の必要がある患者への輸血に用いてもよいかどうかを決定する方法に関する。

【０１６８】

また、本発明は、ドナー由来の試料について、1以上の本発明の核酸分子構造又は核酸分子の存在を試験するステップを含み、ここで、2種の異なる前記核酸分子構造又は核酸分子が、RhD陰性としてタイプ付けられた患者へのドナーの血液の輸血の可能性の指標である、ドナーの血液が、RhD陰性としてタイプ付けられた患者に輸血してもよいかどうかを決定する方法に関する。

【０１６９】

他方、前記核酸分子構造又は核酸分子の1つの同一の2つのコピーの付随する存在が、RhD陰性としてタイプ付けられた患者へのドナーの血液の輸血の可能性の指標である。

【０１７０】

前記方法で述べられた試料は、血液、血清などの明細書を通して述べられた試料であってもよい。

【０１７１】

前記いずれかの方法に基づき、患者に輸血するガイドラインに関して、次善の輸血ポリシーが避けられることに、最大級のケアが、払われなければならない。リスク因子は、つねに、受け持つ医者により考慮されるべきである。全ての症例において、患者の潜在的なリスクを最小化されるべきである。

【０１７２】

本発明はまた、本発明の１つ又はそれ以上の該核酸分子構造又は核酸分子の存在について胎児の父親から得られた試料を評価する工程を含む、ＲｈＤ陽性胎児を妊娠するか保有するＲｈＤ陰性の母親の危険性、又は新生児の溶血性疾患を発生する危険性がある胎児を妊娠するか又は保有する抗Ｄ力価を有する母親の危険性を評価する方法に関し、ここで通常のＲＨＤ陰性ハプロタイプを表す核酸分子構造又は核酸分子に関する陰性試験は、本発明の他のＲＨＤ陰性ハプロタイプを表す１つ又はそれ以上の核酸分子構造又は核酸分子に関する陰性試験のありなしに関わらず、ＲｈＤ陽性胎児を妊娠している高い危険性を示す。

【０１７３】

本発明の方法の好ましい態様では、該核酸分子構造は、変異又は欠失を有する。

【０１７４】

本発明はまた、本発明の１つ又はそれ以上の核酸分子構造又は核酸分子の存在について父親に由来する試料を試験する工程を含む、父親がＲｈＤ陰性であるかどうかを決定する方法に関し、ここで、２つの異なる該核酸分子構造又は核酸分子についての陽性試験は、父親がＲｈＤ陰性であることを示す。

【０１７５】

あるいは、ＲＨＤ陰性ハプロタイプを表す該核酸分子構造又は核酸分子の一方の２つの同一のコピーが同時に存在することを示す陽性試験は、父親がＲｈＤ陰性であることを示す。

【０１７６】

さらに、本発明は、本発明の１つ又はそれ以上の該核酸分子構造又は核酸分子の存在について男性から得られた試料をアッセイすることにより男性が子供の父親である可能性又は尤度を評価する方法に関し、ここで試験結果は、該男性が子供の父親である可能性又は尤度を推測するために使用される本発明のＲＨＤ陰性ハプロタイプを表す任意の核酸分子構造又は核酸分子の同型接合性、異型接合性又は非存在を決定するために使用される。

【０１７７】

製剤は、診断製剤又は医薬製剤であり得る。

【０１７８】

本発明の医薬組成物は、さらに薬学的に許容されうるキャリア及び／又は希釈剤を含み得る。適切な医薬キャリアの例は、当該分野で周知であり、リン酸緩衝化生理食塩水溶液、水、エマルジョン、例えば、オイル／水エマルジョン、種々のタイプの湿潤剤、無菌溶液等が挙げられる。かかるキャリアを含有する組成物は、周知の従来の方法により製剤化されうる。これらの医薬組成物は、適切な用量で被験体に投与されうる。

【０１７９】

非経口投与のための製剤としては、無菌の水性又は非水性の溶液、懸濁物、及びエマルジョンが挙げられる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブオイル等の植物油、及びオレイン酸エチルのような注射可能な有機エステルである。水性キャリアとしては、水、アルコール性／水性溶液、エマルジョン又は懸濁物が挙げられ、生理食塩水及び緩衝化媒体が含まれる。非経口ベヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、Ringerのデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸化したRinger、又は不揮発油が挙げられる。静脈内ベヒクルとしては、流体及び栄養の補充剤、電解質補充剤（例えば、Ringerのデキストロースに基づくもの）等が挙げられる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガス等の保存剤及び他の添加剤もまた存在し得る。さらに、本発明の医薬組成物は、医薬組成物の意図される使用に応じて、インターロイキン又はインターフェロン等のさらなる薬剤を含み得る。

【０１８０】

本発明はまた、女性に抗Ｄを投与することを含む、Rhesus D陰性である妊娠女性の治療方法に関し、ここで、胎児は、本発明の２つの核酸分子構造又は核酸分子を保有しないか、又は本発明の任意の核酸分子構造又は核酸分子について同型接合性でない。

【０１８１】

Rhesus陰性の母親がＲｈＤ陽性の胎児を保有する場合、妊娠女性は、現在、抗Ｄ予防法で治療され得る。本発明は、本発明のＲｈＤタンパク質を保有する母親及び/又は胎児の状態に応じて、抗Ｄ予防法の必要の区別を可能にする。本発明の１つ又はそれ以上のＲｈＤタンパク質は、それらのキャリアーの免疫化を容易にし得、従って、母親の治療の指標となる。同様に、本発明の１つ又はそれ以上のＲｈＤタンパク質は、胎児により保有される場合、母親に対して低い免疫原性を示すことが知られ得、従って、現在の臨床治療とは異なり抗Ｄ予防法の省略を示す。

【０１８２】

投与は、臨床医により規定されうる標準的な経路及び用量により達成されうる；Mollison,1993。好ましくは、モノクローナル抗Ｄ又はモノクローナル抗Ｄの組み合わせ／混合物は、静脈内投与又は筋肉内投与については５０μｇ～５００μｇの抗Ｄ抗体／抗血清又はそれ以上の用量で投与される（Bowman,1998）。これらの抗Ｄ抗体／抗血清の質的対照のために、本発明により提供される結果及び方法が好都合に使用され得る。

【０１８３】

本発明はまた、ＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物の測定に関して本発明において特徴付けられるファージ、アプタマー、モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗血清又はその製剤の使用に関する。

【０１８４】

該使用の好ましい態様において、ＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物の該測定は、血液型分類に関連して達成される。

【０１８５】

さらに、本発明は、本発明の抗体又はアプタマー又はファージを含む製剤に関する。

【０１８６】

本発明はまた、（ａ）本発明のＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物を、ファージの表面上のV_H鎖若しくはV_L鎖又はその組み合わせを示すファージライブラリー又はアプタマーと接触させる工程；

（ｂ）該ＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物に結合するファージ又はアプタマーを同定する工程；及び任意に

（Ｃ）工程（ａ）及び（ｂ）を１回又はそれ以上繰り返す工程を含む、本発明のＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物に特異的に結合する抗体V_H鎖若しくはV_L鎖又はその組み合わせあるいはアプタマーを同定する方法に関する。

【０１８７】

ファージライブラリーの調製及び所望の抗体（鎖）のスクリーニング／同定は、それ自体当該分野で周知であり、例えば、Winterら、Annu.Rev.Immunol. 12(1994),433-455及びそこに引用される参考文献に総説されている。また、アプタマーは、従来のプロトコルに従って調製され、ファージにクローン化されうる。単一のV_H鎖又はV_L鎖は、本発明のＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物に結合するので本発明の方法により同定され得るが、この状況は天然の抗体が結合する状況に似ているので、ファージにより発現されるV_H－V_L組み合わせを同定することが好ましい。工程（ａ）及び（ｂ）を１回又はそれ以上繰り返すことにより、より良好な結合特異性が同定され得る。結合したファージを取り出す溶出工程を含む、アフィニティー等の結合特性を最適化するためのプロトコルは当該分野で充分に確立されている。例えば、好都合な結合能力を有するV_H鎖が見出されれば、例えば、第一の選択工程においてV_H鎖と会合するV_L鎖をより適切なV_L鎖に置換することにより、抗体の結合能力を有意に改善するV_L鎖が同定され得る。

【０１８８】

本発明はまた、（ａ）本発明のＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物を１つ又はそれ以上のモノ

クローナル抗体と接触させる工程；
（ｂ）ＲＨＤ遺伝子の該タンパク質産物に結合するモノクローナル抗体を同定する工程；及び任意に
（ｃ）工程（ａ）及び（ｂ）を１回又はそれ以上繰り返す工程、
を含む、本発明のＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物に特異的に結合するモノクローナル抗体を同定する方法に関する。

【０１８９】
本発明はまた、（ａａ）ＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物及び
（ａｂ）（ａａ）のＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物より高いか、等しいか、又は低いモル質量で存在する、正常なＤポリペプチドをファージの表面上にV_H鎖あるいはV_L鎖又はその組み合わせを示すファージライブラリーあるいはアプタマーと接触させる工程、
（ｂ）（ａ）の該ＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物に結合するファージ又はアプタマーを同定する工程；及び任意に
（ｃ）工程（ａ）及び（ｂ）を１回又はそれ以上繰り返す工程
を含む、本発明のＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物に特異的に結合する抗体V_H鎖若しくはV_L鎖又はその組み合わせあるいはアプタマーを同定する方法に関する。

【０１９０】
工程（ａｂ）において特に好ましくは、正常なＤポリペプチドのモル質量は、（ａａ）のＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物よりも高い。

【０１９１】
１回だけの選択が同定に使用される場合（すなわち、工程（ｃ）が適用されない場合）、（ａａ）のＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物の数がファージ粒子の数に対してモル過剰であることが好ましい。本明細書上記の抗体V_H鎖若しくはV_L鎖又はその組み合わせあるいはアプタマーの同定方法の好ましい態様は、本発明の当該態様に等しく適用する。

【０１９２】
本発明はまた、（ａａ）ＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物及び
（ａｂ）（ａａ）のＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物より高いか、等しいか、又は低いモル質量で存在する、正常なＤポリペプチドを１つ又はそれ以上のモノクローナル抗体と接触させる工程；
（ｂ）（ａａ）の該ＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物に結合するモノクローナル抗体を同定する工程；及び任意に
（ｃ）工程（ａ）及び（ｂ）を１回又はそれ以上繰り返す工程
を含む、本発明のＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物に特異的に結合するモノクローナル抗体の同定方法に関する。

【０１９３】
好ましくは、ＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物は、細胞の表面に露出される。適切な表面は、赤血球の表面である。しかし、他の宿主細胞は、本発明のＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物の発現に適したベクターでトランスフェクトされ、その表面上に同物を発現し得る。抗体はまた、Ｄ抗原のタンパク質の組換えタンパク質又は一部及び精製タンパク質に結合し得る。

【０１９４】
ポリペプチド又は宿主細胞が、固相支持体に固定されることがさらに好ましい。固相支持体の適切な例は、マイクロタイタープレート又はビーズである。

【０１９５】
さらに好ましい抗体においては、工程（ｂ）又は（ｃ）に続いて、以下の工程が行われる：
（ｄ）V_H鎖又はV_L鎖のアミノ酸配列を同定する工程及び／又は該アミノ酸配列をコードする核酸配列を同定する工程。

【０１９６】
アミノ酸配列／核酸配列の同定は、従来のプロトコルに従って達成されうる；例えば、Sa

mbrookら、loc.cit.を参照のこと。

【０１９７】

それゆえ、及び要約すると、本発明は、上記の共通なＲＨＤ陰性ハプロタイプ、ならびに血清学的にＲｈＤ陰性な集団中のおそらく稀なＲＨＤ陽性アレレを含む、ＲＨＤハプロタイプの検出のための手段及び方法を提供する。ＲＨＤ配列を保有し、それゆえＲＨＤ陽性として決定される後者のアレレは、ＲＨＤ／ＲＨＣＥハイブリッド遺伝子、終止コドン、スプライシング部位変異又は遺伝子欠失のいずれかを含み、これはＲｈＤ抗原発現を終結又は減少させる。本発明の改善された検出方法を行うことにより、驚くことに、ルーチンな血清学においてＲｈＤ陰性であると測定されたいくつかの試料がＲＨＤ陽性アレレを有すると同定され得ることを見出した。さらに、それらの試料のいくつかは、吸着及び溶出に基づく検出アッセイを行った場合にもＲｈＤ抗原陽性であり、ＲｈＤ陰性においてＲＨＤ陽性アレレに基づく分子が、予測されるよりも不均一であることを示す。有益なことに、本発明の開示内容はいまや、ＲＨＤの特定の配列がＲｈＤ陽性の表現型を引き起こすかＲｈＤ陰性の表現型を引き起こすかを決定するための新規で実行可能な核酸増幅技術を提供する。

【０１９８】

特に好ましい態様では、本発明の方法は、１回だけの選択が同定に使用される場合、（ａ）のＲＨＤ遺伝子のタンパク質分子の数は、ファージ粒子の数に対してモル過剰である。

【０１９９】

さらに、本発明は、細胞、好ましくは本発明のＲＨＤ遺伝子のタンパク質産物を含む赤血球、又は本発明の方法により、本発明のモノクローナル抗Ｄ抗体若しくは抗Ｃ抗体又はポリクローナル抗Ｄ抗血清若しくは抗Ｃ抗血清又は抗グロブリン抗血清若しくは抗ヒトグロブリン抗血清又はその製剤のアフィニティー、アビディティ及び／又は反応性の評価のためにプロバンドから生産された赤血球の使用に関する。

【０２００】

さらに、本発明は、ＳＭＰ１多型に遺伝的に関連する特定のＲＨ（ＲＨＤ－ＲＨＣＥ）－ハプロタイプを決定するためのＳＭＰ１多型の使用に関する。

【０２０１】

本発明の当該態様の基礎は、３つの遺伝子：ＲＨＤ、ＲＨＣＥ、及びＳＭＰ１を含む、ＲＨ遺伝子座の独特の構造により提供される。後者の遺伝子のヌクレオチド配列は、１８ｋＤａ小膜タンパク質ファミリーの推定上のメンバーとしてＧｅｎｂａｎｋに寄託されている。その機能は、未だ不明である。それは、第２１染色体上のオープンリーディングフレームに相同性を示す（Reboul, Genome res.9:242,1999）。両方のＲＨ遺伝子の間の位置は、ＳＭＰ１遺伝子の任意の多型が特定のＲＨハプロタイプに密接に関連しており、ＳＭＰ１遺伝子の機能的に関連する変異が特定のＲＨハプロタイプについて、又はそれに対して選択圧を引き起こし得ることが予想される。かかる因子は、欧州においてＲＨ陰性の頻度が高いことのような、ＲＨハプロタイプ分布の以前には解決されなかったいくつかの問題を説明する。ＳＭＰ１における多型のスクリーニングは、それゆえ、ＲＨ遺伝子座の理解ならびにその診断適用のためにかなり興味深い。

【０２０２】

本発明による用語「多型」とは、集団における１より多くの遺伝子構造若しくはハプロタイプの遺伝子又はＤＮＡセグメントの存在に関する。にもかかわらず、時には、かかる遺伝的多型は、常に異なる表現型を生じるわけではなく、遺伝子レベルでのみ検出され得る。

【０２０３】

他の好ましい態様では、本発明は、当該分野で公知の技術、好ましくはＰＣＲ－ＲＦＬＰ、ＰＣＲ－ＳＳＰ又はロングレンジＰＣＲにより、任意の構造特徴又はヌクレオチド配列若しくは両方のＲＨ遺伝子座又はその組み合わせを利用することにより、ＳＰＭ１遺伝子におけるＳＭＰ１多型の決定を含む、特定のＲＨ（ＲＨＤ－ＲＨＣＥ）－ハプロタイプの検出方法に関する。

【０２０４】
さらに、本発明は、（ａ）本発明のオリゴヌクレオチド；及び／又は
（ｂ）本発明の抗体；
（ｃ）本発明のアプタマー；及び／又は
（ｄ）本発明のファージ；
（ｅ）本発明の増幅反応を行うために有用なプライマー対
を含んでなるキットに関する。
【０２０５】
キットのパーツは、バイアルに又は容器若しくは多容器単位との組み合わせに独立してパッケージされうる。本発明のキットは、本発明の方法を行うために好都合に使用され得、とりわけ上記の種々の適用に使用され得る。キットの製造は、好ましくは、当業者に公知の標準的な手順に従う。
【０２０６】
本発明はまた、本発明に記載の任意のブレークポイント領域を検出する工程を含む、ＲＨＤ遺伝子によりコードされる抗原Ｃの存在を決定するためのプロセスに関する。
【０２０７】
最後に、本発明は、本発明のプロセスの工程を含む、抗原Ｃの存在を決定するためのプロセスに関する。
【０２０８】
本明細書中に引用される文献の開示内容は、参考として本明細書に援用される。
【０２０９】
本実施例は、本発明を説明する。
【０２１０】
実施例１：血液試料およびＤＮＡ単離
白人の血液ドナーからＥＤＴＡ－またはクエン酸－抗凝固血液試料を回収し、抗－Ｄを用いる抗グロブリン試験を含む通常の分類においてＤ陰性として特徴付けた（Ｗｉｓｓｅｎｓｃｈａｆｔｌｉｃｈｅｒ Ｂｅｉｒａｔ ｄｅｒ Ｂｕｎｄｅｓａｅｒｚｔｅｋａｍｍｅｒ；Ｐａｕｌ－Ｅｈｒｌｉｃｈ－Ｉｎｓｔｉｔｕｔ．Ｒｉｃｈｔｌｉｎｉｅｎ ｚｕｒ Ｂｌｕｔｇｒｕｐｐｅｎｂｅｓｔｉｍｍｕｎｇ ｕｎｄ Ｂｌｕｔｔｒａｎｓｆｕｓｉｏｎ（Ｈａｅｍｏｔｈｅｒａｐｉｅ）．Ｋｏｅｌｎ：Ｄｅｕｔｓｃｈｅｒ Ａｅｒｚｔｅ－Ｖｅｒｌａｇ；１９９６；Ｗａｇｎｅｒ，Ｉｎｆｕｓｉｏｎｓｔｈｅｒ Ｔｒａｎｓｆｕｓｉｏｎｓｍｅｄ ２２：２８５－９０，１９９５）。必要な場合、特異的なＣｃＥｅ表現型に対してランダムに試料を回収した。全部で３１４個のｃｃｄｄｅｅ、４３３個のＣｃｄｄｅｅ、２７１個のｃｃｄｄＥｅ、１９個のＣｃｄｄＥｅ、２４個のＣＣｄｄｅｅ、１個のＣｃｄｄＥＥおよび６個のｃｃｄｄＥＥの試料を試験した。Ｇａｓｓｎｅｒら、Ｔｒａｎｓｆｕｓｉｏｎ ３７；１０２０、１９９７に記載の改変した塩析手順により、ＤＮＡを単離した。
【０２１１】
実施例２：分子研究
ＲＨＤプロモーター、イントロン４、エキソン７、およびエキソン１０の３’非翻訳領域に位置する４つの異なるＲＨＤ特異的多型の存在に対して、ＰＣＲ－ＳＳＰにより、全試料を試験した。少なくとも１つの陽性ＰＣＲ反応を用いて４８試料を検出した（表５）。エキソン３、エキソン４、エキソン５、エキソン６、エキソン７、イントロン７およびエキソン９におけるＲＨＤ特異的多型の存在に対して、それらの試料をさらに調査した。２６試料は、陽性および陰性反応の混合物を伴う８つの明確なＰＣＲパターンの１つを示した（表６）。２２試料は、調査された全てのＲＨＤ特異的多型に対して陽性であり、ゲノムＤＮＡ由来の１０個のＲＨＤエキソンのＲＨＤ特異的配列決定により８個のＲＨＤアレレに割り当てた（表７）。各ＰＣＲパターンおよび各ＲＨＤアレレに対して、１つの試料を血清学的に調査した。弱いＤ、部分的にＤ、およびD_{el}を示すために表現型を測定するか、吸着／溶出により血清学的にＤ陰性であると確認した（表６および７）。

【０２１２】
実施例３：ＤＮＡデータベース調査および解析
ＢＬＡＳＴプログラムを用いてＲＨＤ（ＲｈＸＩＩＩ、寄託番号Ｘ６３０９７）およびＲＨＣＥ（ＲｈＶＩ、Ｘ６３０９５）の代表的なｃＤＮＡ配列を用いて、ＧｅｎＢａｎｋ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ＢＬＡＳＴ／）およびＳａｎｇｅｒ　Ｃｅｎｔｅｒの第１染色体データベース（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｓａｎｇｅｒ．ａｃ．ｕｋ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ｎｐｈ－Ｂｌａｓｔ＿Ｓｅｒｖｅｒ．ｈｔｍｌ）を調査した。８４，８１０ｂｐゲノムクローンｄＪ４６９Ｄ２２（ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＡＬ０３１２８４）、１２９，７４７ｂｐゲノムクローンｄＪ４６５Ｎ２４（ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＡＬ０３１４３２）および２，２３４ｂｐ　ＳＭＰ１　ｃＤＮＡ（ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＡＦ０８１２８２）を同定した。ｄＪ４６９Ｄ２２は、ＲＨＣＥ開始コドンの３３，３４０ｂｐ５’側で始まり、エキソン９の１，１４２ｂｐ３’側で終わるＲＨＣＥ遺伝子の主要な断片を表した。ｄＪ４６５Ｎ２４において、１２０，１５８～１２１，５６８の間に位置する１，４１８ｂｐの内部ストレッチは、ＲＨＤ　ｃＤＮＡの３’末端に９６％相同であった。ＳＭＰ１　ｃＤＮＡの３’末端は、ＲＨＣＥ　ｃＤＮＡの３’末端に相補的であり、５８ｂｐが重複した。
【０２１３】
実施例４：ＰＣＲ
特に記載しないかぎり、拡大したロングテンプレート（expand long template）または拡大した高度忠実性ＰＣＲシステム（expand high fidelity PCR systems）（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ、Ｍａｎｎｈｅｉｍ、Ｇｅｒｍａｎｙ）および記載したプライマー(表１)を用いて６０℃のアニーリング、６８℃で１０分間伸長および９２℃での変性によりＰＣＲ反応を行なった。３つのＰＣＲ反応を用いて、ＲＨ遺伝子の３’隣接領域におけるギャップを埋めた。プライマーｒｅａ７およびｒｅｎｄ３１を用いてＰＣＲ１を行なった（ＰＣＲ２、ｒｅｎｄ３２、ｓｆ１ｃ；ＰＣＲ３、ｒｅａ７、ｓｆ３）。センスプライマーｒｅｎｄ３２、ｒｅｙ１４ａ、ｒｅｙ１５ａおよびアンチセンスプライマーｒｅ０１１ｄおよびｒｅ０１４を伴うＰＣＲ増幅で５’隣接領域の構造を確認した。ＲＨＤに対してｒｂ１０ｂおよびｒｒ４（ＲＨＣＥに対してｒｅ９６およびｒｈ７）を用いるＰＣＲ増幅に基づいてイントロン９のサイズを約９，０００ｂｐであると見積もった。
【０２１４】
実施例５：ヌクレオチド配列決定
ＤＮＡ配列決定ユニット（Ｐｒｉｓｍ　ＢｉｇＤｙｅターミネーターサイクルーシークエンシングレディー反応キット；ＡＢＩ　３７３Ａ、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｗｅｉｔｅｒｓｔａｄｔ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を用いてヌクレオチド配列決定を行なった。
【０２１５】
実施例６：ＲＨ遺伝子座の特徴付け
ＲＨ遺伝子座の物理的構造を誘導した（図１）。以下の考察からこの構造を推測した。（ｉ）３’隣接領域。ＲＨＤの３’隣接領域は、ｄＪ４６５Ｎ２４の３’部分に高度に相同性であった（図１Ｂ、領域ｃ）。ＰＣＲ増幅産物を得ることができたという事実により証明されるように、この相同性は、ＲＨＤ　ｃＤＮＡの末端を越えて続き、少なくとも８，０００ｂｐ伸びた（図１Ｂ、ＰＣＲ１）。ｄＪ４６５Ｎ２４の３'部分に対して相同な配列は、ＳＭＰ１遺伝子の５'領域に隣接した（図１Ｂ；ＰＣＲ２）。ＳＭＰ１遺伝子の３'末端は、それぞれのｃＤＮＡの３'末端の相補性により示されるようにＲＨＣＥ遺伝子にすぐ隣接して存在し、ＰＣＲにより確認した（図１Ｂ、ＰＣＲ３）。ＲＨＤ３'隣接領域（Ｒｈｅｓｕｓボックス）およびＳＭＰ１遺伝子のさらなる詳細を以下に記載する。（ｉｉ）５'隣接領域。ｄＪ４６９Ｄ２２は、ＲＨＣＥの隣接領域の５'側に３３，３４０ｂｐを含有した。ＲＨＤに対して、ｄＪ４６５Ｎ２４の３'末端およびｄＪ４６９Ｄ２２の間での４６６ｂｐ相同性は、ｄＪ４６５Ｎ２４がＲＨＤの５'隣接配列を表わすことを示した。この仮説をＰＣＲにより証明した（図２）。（ｉｉｉ）ＹＡＣ　３８Ａ－Ａ１０の解

析。ＹＡＣ　３８Ａ－Ａ１０由来のＤＮＡ（ＵＫ　ＨＧＭＰ資源センター、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）を、標準法（ｈｔｔｐ：／／ｈｄｋｌａｂ．ｗｕｓｔｌ．ｅｄｕ／ｌａｂ＿ｍａｎｕａｌ／ｙｅａｓｔ）による単一増殖期間後、単離した。このＹＡＣがＲＨ　ＤＮＡを含むことを確認した。さらに、ショットガンクローニング実験は、その挿入物のいくつかがおそらくＸ染色体に由来することを示した（データ示さず）。このＹＡＣは、ＲＨＣＥエキソン２～１０およびＲＨＤエキソン１～１０を含むことが知られており（Ｃａｒｒｉｔｔ，Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．６：８４３、１９９７）、したがってＲＨＤおよびＲＨＣＥの間に散在したＤＮＡセグメントを含むことが予期された。このＹＡＣにおけるＲＨ座の異なる部分に代表的なＤＮＡセグメントの存在を観察した（表２）。結果は、図１、パネルＡで示されるＲＨ座の提案された構造に一致した。

【０２１６】

実施例７：ＲＨＤプロモーターにおけるＲＨＤ特異的配列の同定

染色体ウォーキング（ＧｅｎｏｍｅＷａｌｋｅｒキット、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ、Ｇｅｒｍａｎｙ）により、約２，０００ｂｐのＲＨＤプロモーター配列を確立した。プライマーｒｅ０４およびｒｅ１１ｄ（表１）を用いた、Ｄ－陽性およびＤ－陰性試料を増幅し、内部プライマーを用いた配列決定により開始コドンの５’側の１，２００ｂｐに対してＲＨＤ－およびＲＨＣＥ－特異的配列を確立した。ＲＨＤ遺伝子における短い欠失を同定し、ＲＨＤ－特異的プライマーｒｅ０１１ｄを開発するために使用した。ＲＨＤプロモーターを含む１，２００ｂｐ配列を寄託番号ＡＪ２５２３１４のもとでＥＭＢＬに寄託した。

【０２１７】

実施例８：Ｒｈｅｓｕｓボックスの特徴付け

ＲＨＤ遺伝子の５’および３’に位置する約９，０００ｂｐの２つのＤＮＡセグメントは、高度に相同性であり、同一配向を有し、「Ｒｈｅｓｕｓボックス」と命名した（図４）。Ｒｈｅｓｕｓボックスを増幅し、ＰＣＲプライマー対のｒｅｚ４／ｒｅｎｄ３１およびｒｅｎｄ３２／ｒｅ０１１ｄ（Ｒｈｅｓｕｓボックス上流）、ｒｅａ７／ｒｅｎｄ３１およびｒｅｎｄ３２／ｓｒ９（Ｒｈｅｓｕｓボックス下流）ならびにｒｅｚ４／ｒｅｎｄ３１およびｒｅｎｄ３２／ｓｒ９（ＲＨＤ－陰性のハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックス）を使用して２つの重複断片における内部プライマーを用いて配列決定を行なった。Ｒｈｅｓｕｓボックスの上流（ＲＨＤの５’）は、約９，１４２ｂｐ長であり、ＲＨＤ開始コドンの４，９００ｂｐ５’側で終了した。Ｒｈｅｓｕｓボックスの下流（ＲＨＤの３’）は、９，１４５ｂｐ長であり、ＲＨＤ終始コドン後１０４ｂｐで始まった。Ｒｈｅｓｕｓボックスは、ＲＨＣＥに対して相同性を有するＲＨＤの部分を正確に含む。両方のＲｈｅｓｕｓボックスの中央部分は、トランスポゾン様ヒトエレメント（ＴＨＥ－１Ｂ）のほとんど完全な残りを含んだ。ＴＨＥ－１Ｂエレメントにおいて通常見出される単一オープンリーディングフレームは、しかしながら、コドン４でのナンセンス以上を含む、両方のＲｈｅｓｕｓボックスにおいて平行で生じるいくつかのヌクレオチド異常のために除外した。両方のＲｈｅｓｕｓボックスの間では全部で９８．６％相同であった一方で、５，７０１～７，１６３位の間に位置する１，４６３ｂｐ「同一領域」は、ポリＴ区域での４ｂｐＴ挿入の単一の例外を除き完全に同一であった。

【０２１８】

実施例９：ＳＭＰ１のゲノム構造の評価

内部プライマーを用いるＰＣＲおよびヌクレオチド配列決定により、ＳＭＰ１遺伝子のゲノム構造を評価した（図３）。プライマーｒｅｎｄ３２、ｓｒ９、ｓｆ１ｃ、ｓｆ１、ｓｍ１９、ｓｒ４５、ｓｒ４７、ｓｒ４７ｃ、ｓｒ５、ｓｒ５ｃ、ｓｒ５５、ｓｒ５５ｃ、ｓｒ３、ｓｒ３ｋｐ、ｒｅａ7を用いて得られたＰＣＲ増幅産物により、ＳＭＰ１イントロンのサイズを見積もった。イントロン／エキソンジャンクションの位置およびさらなるイントロンの不在を、ヌクレオチド配列決定により決定した。６個のイントロンを同定し得た。エキソン１は５’非翻訳配列のみを含み、Ｒｈｅｓｕｓボックスから１５ｂｐ離れていた。エキソン７のロング３’非翻訳配列は、ＲＨＣＥエキソン１０と重複した。全遺

伝子サイズは２０，０００ｂｐであると見積もられ、Ｒｈｅｓｕｓボックスの下流と連結すると、約３０，０００ｂｐのＲＨＤおよびＲＨＣＥの間の距離をもたらした、（図１）。

【０２１９】

実施例１０：ＲＨＤ陰性ハプロタイプにおけるＲＨＤ遺伝子欠失の局在

２つのＲｈｅｓｕｓボックスの相同は、共通のＲＨＤ陰性ハプロタイプにおけるＲＨＤ欠失の機構の助けになると推論した。ＲＨＤ陰性ＤＮＡにおけるＲｈｅｓｕｓボックスのヌクレオチド配列を決定した（図５）。ＲＨＤ陰性において検出された単一Ｒｈｅｓｕｓボックスは、ハイブリッド構造を有した。このＲｈｅｓｕｓボックスの５’末端はＲｈｅｓｕｓボックスの上流を表わし、３’末端はＲｈｅｓｕｓボックスの下流を表した。ＲＨＤ欠失の９０３ｂｐブレークポイント領域は、Ｒｈｅｓｕｓボックスの同一領域に位置した（図４、左を指す矢印）。

【０２２０】

実施例１１：ＰＣＲによるＲＨＤ欠失の特異的検出

優勢なＲＨＤ陰性ハプロタイプに生じるＲＨＤ遺伝子欠失の特異的な検出のために、２つのＰＣＲに基づく方法を開発した（図６）。バッファー３ならびにプライマーｒｅｚ４（Ｒｈｅｓｕｓボックスの上流の５’）およびｓｒ９（ＳＭＰ１エキソン１）を用いて拡大したロングテンプレートＰＣＲシステムを使用して、ロングレンジＰＣＲ－ＳＳＰを行なった。アニーリングは６０℃であり、伸長は２０分間６８℃であった。１％アガロースゲルを用いてＰＣＲ増幅産物を分離した。拡大した高度忠実性ＰＣＲシステムならびにプライマーｒｅｚ２７（非特異的、Ｒｈｅｓｕｓボックス同一領域の５’）およびｒｎｂ３１（Ｒｈｅｓｕｓボックスの下流に特異的、Ｒｈｅｓｕｓボックス同一領域の３’）を用いて、ＰＣＲ－ＲＦＬＰを行なった。アニーリングは６５℃であり、伸長は１０分間６８℃であった。ＰＣＲ増幅産物を、ＰｓｔＩで３時間３７℃で消化し、断片を１％アガロースゲルを用いて分離した。これらの技術により、たとえＲＨＤ陰性ハプロタイプがＲＨＤ陽性ハプロタイプに対してトランスであっても、共通のＲＨＤ陰性ハプロタイプの便利で直接の検出が可能になった。より多くの試料にＰＣＲ－ＲＦＬＰをさらに適用した（表３）。予期したように、既知の遺伝子型を有する全部で３３個の試料を正しく分類した。ごく普通の表現型に代表的な６８個のさらなる試料において、結果は集団における既知のハプロタイプ頻度と一致した。

【０２２１】

実施例１２：ＲＨＤ　ＰＣＲ－ＳＳＰ

ＰＣＲ－ＳＳＰ反応（表４）を、前に記載したＲＨＤエキソン特異的ＰＣＲ－ＳＳＰ法（Ｇａｓｓｎｅｒ、Ｔｒａｎｓｆｕｓｉｏｎ　３７：１０２０－６、１９９７）から適合および拡張し、同一のサーモサイクリング条件下で研究するために誘引（trigger）した。エキソン６（０．１μＭ）、イントロン７（０．４μＭ）およびエキソン９（０．４μＭ）を例外とし、全ての反応に対して特異的プライマーの濃度は０．２μＭであった。ほとんどの試料に対して、０．２μＭのエキソン７（プライマーセットｇａ７１／ｇａ７２）および０．１μＭのイントロン４プライマーを含む頻回反応としてイントロン４／エキソン７を試験した。各反応物は、プロモーター、イントロン４、およびｇａ７１／ｇａ７２を有するエキソン７に対して０．０５μＭ；エキソン１０に対して０．０７５μＭ；イントロン７に対して０．１μＭ；エキソン３、エキソン４、ｒｂ２６／ｒｅ７１を有するエキソン７およびエキソン９に対して０．１５μＭ；エキソン５およびエキソン６に対して０．２μＭの濃度で、内部対照としてＨＧＨプライマー（Ｇａｓｓｎｅｒ、Ｔｒａｎｓｆｕｓｉｏｎ　３７：１０２０－６、１９９７）の１セットを含んだ。Mg^{2+}濃度はイントロン７に対して０．４μＭであり、全ての他の反応物に対して０．１５μＭであった。エキソン６に対して、２０％溶液Ｑ（Ｑｕｉａｇｅｎ、Ｈｉｌｄｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を添加した。

【０２２２】

実施例１３．通常のＤＮＡタイピングのための改良したＲＨＤ　ＰＣＲ－ＳＳＰ

本研究で検出され、前記したアレレに基づいて、我々は、単一ＰＣＲ管におけるＲＨＤ（Ｗ１６Ｘ）と同様に、本研究で検出されたＲＨＤΨおよびアレレの特異的な検出を含む通常のＤＮＡタイピングのための改良したＲＨＤ　ＰＣＲ－ＳＳＰを考案した。反応Ａは、０．３μＭのプライマーｇａ７１およびｇａ７２、０．１μＭのｒｂ１２およびｒｅ４１、ならびに０．１μＭのＨＧＨプライマーを含んだ。Ｍｇ２＋は、０．１７５μＭであった。反応Ｂは、０．５μＭのプライマーＲｈＰｓｉＦおよびＲｈＰｓｉＢ、０．３μＭのｒｅ１１ｄおよびＲｈＸ１ｆ１、０．２μＭのｒｅ７２１およびｒｂ９ならびに対照プライマーとして０．２μＭのｒｅｎｄ９ｂ１およびｒｅｎｄ９ｂ２を含んだ。プライマー配列は、ｇａ７１，ｇｔｔｇｔａａｃｃｇａｇｔｇｃｔｇｇｇｇａｔｔｃ；ｇａ７２，ｔｇｃｃｇｇｃｔｃｃｇａｃｇｇｔａｔｃ；ｒｂ１２，ｔｃｃｔｇａａｃｃｔｇｃｔｃｔｇｔｇａａｇｔｇｃ；ｒｅ４１，ｃｇａｔａｃｃｃａｇｔｔｔｇｔｃｔｇｃｃａｔｇｃ；ＲｈＰｓｉＦ，ａｇａｃａｇａｃｔａｃｃａｃａｔｇａａｃｔｔａｃ；ＲｈＰｓｉＢ，ｔｃｔｇａｔｃｔｔｔａｔｃｃｔｃｃｇｔｔｃｃｃｔｃ；ｒｅ１１ｄ，ａｇａａｇａｔｇｇｇｇｇａａｔｃｔｔｔｔｔｃｃｔ；ＲｈＸ１ｆ１，ｃｇｃｔｇｃｃｔｇｃｃｃｃｔｃｔｇａ；ｒｅ７２１，ｃｔｇｇａｇｇｃｔｃｔｇａｇａｇｇｔｔｇａｇ；ｒｂ９，ａａｇｃｔｇａｇｔｔｃｃｃｃａａｔｇｃｔｇａｇｇ；ｒｅｎｄ９ｂ１，ｃａｃｔｇｃａｃｔｔｇｇｃａｃｃａｔｔｇａｇ；ｒｅｎｄ９ｂ２，ｔｔｃｃｇａａｇｇｃｔｇｃｔｔｔｔｃｃｃであった。ＰＣＲ反応を２つの管で（図１５）、５つの多型を試験することができ、１：１０，０００より少ない偽－陽性率を有することを予測した（表１１）。

【０２２３】

実施例１４：Cde^S に対するＰＣＲ反応

０．３μＭの特異的プライマーＲｈ１５２Ｔｂおよびｇａ３１を用いるＰＣＲ－ＳＳＰ反応により、Cde^S ハプロタイプに生じるＮ１５２Ｔ置換を有するハイブリッドエキソン３を検出した。Cde^S で観察されるＬ２４５Ｖ置換を０．２μＭの特異的プライマーＲｈ２２３ＶｆおよびＲｈ２４５Ｖｂを用いて検出した。ＨＧＨプライマー濃度は０．１μＭであった。他のＰＣＲ条件は、前の段落で記載したものと同じであった。プライマー配列は、Ｒｈ１５２Ｔｂ，ｇａｔａｔｔａｃｔｇａｔｇａｃｃａｔｃｃｔｃａｔｇｇ；ＲｈＲ２２３Ｖｆ，ｔｔｇｔｇｇａｔｇｔｔｃｔｇｇｃｃａａｇｔｇ；およびＲｈ２４５Ｖｂ，ｇｃｔｇｔｃａｃｃａｃｔｃｔｇａｃｔｇｃｔａｃであった。Cde^S ハプロタイプは、アフリカ人で頻繁であり（Ｆａａｓ、Ｔｒａｎｓｆｕｓｉｏｎ　３７：３８－４４、１９９７；Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ、Ｂｌｏｏｄ　９５：１２－８、２０００）、ＲＨＣＥ特異的Ｎ１５２Ｔ置換を有するハイブリッドエキソン３を持つ（Ｆａａｓ、Ｔｒａｎｓｆｕｓｉｏｎ　３７：３８－４４、１９９７）。このハイブリッドエキソンは、３８３位（コドン１２８）でＡを検出し、ＲＨＤエキソン３特異的ＰＣＲによりＲＨＤ陽性として分類されることが予期され、集団調査に使用した。パターン４およびパターン８がCde^S ハプロタイプについての既知のデータと一致するので、エキソン３の３’部分の配列決定およびCde^S を示すエキソン３ハイブリッドに特異的なＰＣＲ－ＳＳＰにより、ハイブリッドエキソン３の存在を２つの試料において評価した。パターン４の試料は、通常のＲＨＤエキソン３を持ち、一方パターン８の試料は、Cde^S ハプロタイプを予測するハイブリッドエキソン３を有した。また、Cde^S ハプロタイプに典型的であり（Ｄａｎｉｅｌｓ、Ｔｒａｎｓｆｕｓｉｏｎ　３８：９５１－８、１９９８）、Ｄカテゴリー ＩＩＩタイプ ＩＶにも存在する４１０位のＴ（Ａ１３７Ｖ置換）を検出した。７３３位でのＧ（Ｌ２４５Ｖ置換）を検出するＰＣＲ－ＳＳＰにより、パターン８とCde^S の同一性をさらに確証した。

【０２２４】

実施例１５：イントロン３におけるCde^S の５’ブレークポイント領域

そのｃＤＮＡに基づいて、エキソン３の５’部分がＲＨＤに由来し、コドン１５２を含むエキソン３の３’部分がＲＨＣＥに由来するＲＨＤ－ＣＥ（３－７）－Ｄハイブリッド遺伝子として、Cde^S を特徴付けた。我々は、Ｎ１５２Ｔ置換を有する同様のハイブリッドエキソン３が、Ｄカテゴリー ＩＩＩタイプ ＶＩで（Ｗａｇｎｅｒ，Ｆ．Ｆ．，Ｆｒｏｈ

majer, A., Ladewig, B., Eicher, N. I., Lonicer, C. B., Mueller, T. H., Siegel, M. H., およびFlegel, W. A. 弱いDアレレは明白な表現型を発現する（Weak D alleles express distinct phenotypes）、Blood 95：2699－2708, 2000）およびDカテゴリーIVaで（Rouillac, C., Colin, Y., Hughes－Jones, N. C., Beolet, M., D'Ambrosio, A. －M., Cartron, J. P., およびLe Van Kim, C.、Dカテゴリー表現型の転写解析はDエピトープの改変に関連するハイブリッドRh D－CE－Dタンパク質を予測する（Transcript analysis of D category phenotypes predicts hybrid Rh D-CE-D proteins associated with alteration of D epitopes）、Blood 85：2937－2944, 1995）、エキソン4～7がRHDに由来する2つの異常型RHDアレレが見られることに注目した。我々は、N152T置換がCde^SにおけるRHDエキソン4～7の置換より前であると推論した。この場合、5'ブレークポイント領域は、cDNAから予測されるようにエキソン3よりもむしろイントロン3に位置すると予期した。我々は、それゆえにCde^Sイントロン3におけるRHD特異的多型の存在を評価した。

【0225】

EcoRV－部位のヌクレオチド752位（RHD特異的）および2872位（RHCE特異的）ならびにPvuII－部位のヌクレオチド1777位（RHCE特異的）の存在を評価するために、RHDおよびRHCEのイントロン3の5'部分をプライマーrb3およびrb33を用いて増幅し、EcoRVまたはPvuIIで消化した。SacI－部位のヌクレオチド7797位（RHCE特異的）およびAlw44I－部位のヌクレオチド8550位（RHD特異的）の存在を評価するために、RHDおよびRHCEのイントロン3の3'部分をプライマーrb34およびrb5を用いて増幅し、SacIまたはAlw44Iで消化した。プライマー配列は、rb3, aaggtcaacttggcgcagttggtgg；rb33, gtgagactgagttctgtattctgg；rb34, ccagaatacagaactcagtctcac；rb5, ggcagacaaactgggtatcgttgcであった。

【0226】

これらのイントロン3多型のPCR－RFLP解析は、RHD特異的配列が、少なくともイントロン3の2872位までに存在することを示した。さらに、Cde^Sの5'ブレークポイント領域を決定するために、我々はブレークポイント領域を含むDNAストレッチを配列決定した。DNAをプライマーrb3およびrb37を用いて増幅し、プライマーrb33、rb34およびCdesf1を用いて配列決定した。プライマー配列は、re37, gggttaaagtcacatacacagatg；Cdesf1, atacagaactcagtctcacaacttagであった。我々は、図12に示されるように、ブレークポイント領域がイントロン3に位置すると確定した。

【0227】

実施例16：イントロン7におけるCde^Sの3'ブレークポイント領域

イントロン7におけるCde^Sの3'ブレークポイント領域を決定するために、我々はイントロン7の部分を配列決定した。センスプライマーrb8、re77およびrex1、ならびにアンチセンスプライマーrb51およびre711bを使用してDNAを増幅した。プライマーrb43、rex19c、cdes7b2およびcdes7f2をヌクレオチド配列決定のために用いた。プライマー配列は、rb8, gtgttgtaaccgagtgctgggg；re77, tctccacagctccatcatggg；rex1, ggctgtaaaaatggctgaagcag；rb51, gcatgacgtgttctgcctcttg；re711b, ctatcagcattctgatctcaacg；rb43, gaatagcagagaaaacctcagactgcc；rex19c, gctccattcttgacaatacaggc；cdes7b2, gcttatactatataagttgggttttttgg；cdes7f2, gtttgaatcccaagagccactcatであった。我々は、図13に示されるように

、ブレークポイント領域を確定した。ＲＨＣＥおよびＲＨＤの特異的配列の間に多数のスイッチがあるために、３’ブレークポイント領域の構造は興味深いものであった。これらの特徴はブレークポイント領域にはまれであり、Ｃｄｅ^{S} の特異的診断に使用しうる。それらは、親のアレレが標準のＲＨＣＥまたはＲＨＤ配列と異なったか、または主要な遺伝子変換の後、さらなる小さな遺伝子変換が導入されたことを示しうる。

【０２２８】

実施例１７：Ｃｄｅ^{S} を特異的に検出するためのＰＣＲ－ＳＳＰ

通常、Ｃｄｅ^{S} の存在は、ＲＨＤエキソン特異的ＰＣＲにおけるＲＨＤ－ＣＥ－Ｄハイブリッドパターンにより同定される。かかるアプローチは、ＲＨＤ陽性ハプロタイプがトランスで生じる場合、Ｄ陰性Ｃｄｅ^{S}ハプロタイプの特異的検出をすることができない。Ｃｄｅ^{S} はハイブリッドＲｈｅｓｕｓボックスを含まないので、ＲＨＤ／Ｃｄｅ^{S} 異型接合のヒトが、ＲＨＤ$^{+}$ ／ＲＨＤ$^{+}$ 同型接合として誤って分類されることが起こりうる。プロモーター、イントロン２、エキソン２およびエキソン３にＣｄｅ^{S} のいくつかの明白な特徴があり、それを特異的な検出に使用しうる。これらの特徴は、しかしながら、Ｄ陽性アレレＤカテゴリーＩＶａによりおよび部分的にＤカテゴリーＩＩＩタイプＩＶにより共有され、それゆえにかかる検出方法を混乱させうる。

【０２２９】

イントロン７におけるＣｄｅ^{S} 特異的ＤＮＡ配列に基づいて、我々は、Ｃｄｅ^{S} を特異的に検出するＰＣＲ－ＳＳＰを開発した。０．４μＭの特異的プライマーＣｄｅｓ７ｆ２およびＣｄｅｓ７ｂ２ならびに０．１５μＭのＨＧＨ対照プライマーを用いるＰＣＲ－ＳＳＰにより、イントロン７におけるＣｄｅ^{S} の３’ブレークポイント領域を検出した。他のＰＣＲ条件は、実施例１２で記載したものと同じであった。プライマー配列は、Ｃｄｅｓ７ｆ２，ｇｔｔｔｇａａｔｃｃｃａａｇａｇｃｃａｃｔｃａｔ；Ｃｄｅｓ７ｂ２，ｇｃｔｔａｔａｃｔａｔａａｇｔｔｇｇｇｔｔｔｔｔｔｇｇであった。我々は、インデックスＣｄｅ^{S} 試料（図１４）、２つのさらなるＣｄｅ^{S} 試料およびＲＨＤΨ／Ｃｄｅ^{S} 異型接合試料（図１４）を用いて特異的な産物を得た。通常のＲＨＤ陽性およびＲＨＤ陰性試料ならびにＤカテゴリーＩＩＩタイプＩＶおよびＤカテゴリーＩＶａの試料は、特異的なＰＣＲ産物を生じなかった（図１４）。我々は、我々のＰＣＲ－ＳＳＰ法が、Ｃｄｅ^{S} の特異的な検出を、たとえそれがもう１つのＲＨＤ陽性アレレに対してトランスで生じたとしても可能にすると結論付けた。さらに、Ｃｄｅ^{S} を有するＮ１５２Ｔ置換を共有するＤカテゴリーＩＩＩタイプＩＶまたはＤカテゴリーＩＶａにより、この検出方法は混乱されなかった。後者のハプロタイプは、Ｃｄｅ^{S} が優勢であるアフリカ系民族のバックグラウンドを含む集団で頻繁であることに注目すべきである。本実施例で我々が記載した方法は、Ｃｄｅ^{S} の特異的な検出を可能にし、他のハプロタイプと混同されることがなく、それゆえに従来技術に対するかなりの改良を提示する。５’ブレークポイント領域の我々の特徴付けは（実施例１５）、ＰＣＲ－ＳＳＰ、ＰＣＲ－ＬＰ、ＰＣＲ－ＲＦＬＰ、ＰＣＲ－ＳＳＯ、サザンブロットなどのような、当該技術分野で公知の任意の適切な方法によりＣｄｅ^{S} の特異的な検出を同様に可能にする。

【０２３０】

Ｃｄｅ^{S} の特異的な検出はまた、抗原Ｃの正確な予測に重要である。Ｃｄｅ^{S}のＲＨＤ遺伝子は、抗原Ｃの予測のためのＤＮＡに基づく方法においてしばしば見落とされる抗原Ｃをコードする。

【０２３１】

実施例１８：免疫血液学

各ＲＨＤ陽性アレレの１例を、２つのモノクローナル抗Ｄ（Seraclon 抗Ｄ、クローンＢＳ２２６；Biotest, Dreieich, GermanyおよびFrekaklon 抗Ｄ、クローンＭＳ２０１；Gull, Bad Homburg, Germany）を用いた直接凝集により評価した。間接的な抗グロブリン試験を、オリゴクローナル抗Ｄ（Seraclon抗Ｄブレンド、クローンH41 11B7, BS221およびBS232;Biotest）を用いて、ゲルマトリックス試験（LISS-Coombs 37℃、DiaMed-ID Micro Typing System, DiaMed, Cressier sur Morat, Switzerland）において行った。ゲルマト

リックス技術において反応性の試料を、モノクローナル抗Ｄ HM10, HM16, P3x61, P3x35, P3x212 11F1, P3x212 23B10, P3x241, P3x249, P3x290（Diagast, Loos, France）およびH41 11B7（Biotest）を用いてさらに調べた。D_{el}表現型の存在を、５００μｌの赤血球に対する５００μｌのポリクローナル抗Ｄ（ヒト不完全抗Ｄ；Lorne Laboratories, Reading,UK）の３７℃で１時間の吸収およびクロロホルム技術（Flegel, Transfusion 40:428-434,2000）を用いた溶出により決定した。Ｄ陰性であると通常分類される試料の分析により、１６のD_{el}試料、および弱いかまたは部分的なＤを伴った３のＤ陽性試料が明かになった。これらの試料は、ＣまたはＥを有するＤ陰性であると以前に考えられていた試料中に集まっていた（表９）。通常の血清学とイントロン４およびエキソン７のＰＣＲ試験との間の２７の内の１９の不一致は、血清学により見落とされたＤ陽性試料を示し、８つのみが偽陽性ＰＣＲによるものであった。

【０２３２】

実施例１９：ハプロタイプ頻度

一度より多く観察されたアレレについて、それらのハプロタイプ関連性はわずかであった。一度だけ観察されたアレレを、ｃｄｅハプロタイプよりむしろＣｄｅまたはｃｄＥハプロタイプに関連すると仮定した。なぜなら、ＲＨＤ陽性アレレがいずれのｃｃｄｄｅｅ試料においても検出されなかったからである。単一のＣｃｄｄＥｅ試料に存在するアレレは、Ｃｄｅについて２分の１であり、ｃｄＥについて２分の１であると形式的に計数した。Ｃｃｄｄｅｅ試料は、１つの異常な、および１つの正常なＣｄｅアレレを保有すると仮定した。そのハプロタイプにおける所定の異常なＲＨＤアレレの頻度を、観察下で対応するハプロタイプの数で観察された試料の数を割ることにより計算した（５００のＣｄｅ、３０２のｃｄＥ）。ＲＨＤアレレの集団頻度を、そのハプロタイプ中の当該アレレの頻度および地方集団におけるハプロタイプの既知の頻度から計算した（Wagner, Infusionsther. Transfusionsmed. 22:285-90, 1995）。各ＰＣＲパターンおよび各ＲＨＤアレレについてのハプロタイプ頻度を計算した（表８）。Aventらによる英国における以前の研究（Avent, Blood 89:2568-77,1997）と一致して、４．９％のＣｄｅハプロタイプおよび１．５％のｃｄＥハプロタイプが、我々の集団においてＲＨＤ陽性であった。ＲＨＤ陽性アレレが３１４のｃｃｄｄｅｅ試料内で検出されなかったので、ｃｄｅハプロタイプの頻度は０．５％未満であった（片側の上限、９５％の信頼区間、ポアソン分布）。３つの頻度は互いに統計学的に有意に異なっていた（ｐ＜０．０５；Bonferoni-Holmにより補正された各々の対比較法に関する両側フィッシャー正確（検定）。任意のＤ陰性ＲＨＤ陽性ハプロタイプの集団頻度は、１：１，６０６であると推定した。D_{el}アレレは、仮定されたＣｄｅハプロタイプでのみ観察され得た。血液バンクの常套手法においてＤ陰性に分類された抗原Ｃを保有する約３％の試料はD_{el}を示した。D_{el}アレレの集団頻度は、１：３，０３０であった。

【０２３３】

【表１】

表1. プライマー

プライマー	塩基配列	局在	位置
rb10b	ggctaaatatttgatgaccaagtt	*RHD* cDNA	1,194－1,217
re011d	gcagccaacttcccctgtg	*RHD* プロモーター	-883～-901
re014	gctctaccttggtcacctcc	dJ469D22	52,189～52,209
re04	aggtcacatccatttatcccactg	dJ469D22	53,968－53,945
re11d	agaagatgggggaatctttttcct	dJ469D22	51,193－51,216
re96	ttgtgactgggctagaaagaaggtg	dJ469D22	242－216
rea7	tgttgcctgcatttgtacgtgag	*RHD* cDNA	1,311～1,333
rend31	ttctgtctgggttgggggaggg	dJ465N24	128,649－128,629
rend32	ggaggggttaatatgggtggc	dJ465N24	127,355－127,375
rend8b1	tttgtcctggttgcctgtggtc	dJ465N24	69,296－69,274
rend8b2	caaatcctgttgactggtctcgg	dJ465N24	68,451－68,473
rend9a1	aacggctccatcacccctaaag	dJ465N24	50,008－49,987
rend9a2	cccactcctagataccaacccaag	dJ465N24	49,059－49,083
rey14a	ctttatgcactgcctcgttgaatc	dJ469D22	56,792～56,769
rey14b	ttgactggtgtggttgctgttg	dJ469D22	55,863－55,884
rey15a	gcagaaaggggagttgatgctg	dJ469D22	55,416～55,395
rey7	ctgacaaagttgagagcccactg	dJ469D22	62,324～62,346
rey8	ttaagcctacatccacatgctgag	dJ469D22	62,854－62,831
rez2	cctggtctgccagaatttttca	*RHD* cDNA	2738－2717
rez4	gtttggcatcataggagatttggc	dJ465N24	120,101－120,124
rez7	cctgtccccatgattcagttacc	dJ465N24	124,831－124,854
rh7	acgtacaaatgcaggcaac	*RHD* cDNA	1,330－1,312
rnb31	ccttttttgttgttttggcggtgc	下流 *Rhesus* ボックス	6,710－6,684
rr4	agcttactggatgaccacca	*RHD* cDNA	1,541－1,522
sf1	gactgggggggaaaagcgcaatac	*SMP1* cDNA	142－164
sf1c	gtattgcgctttcccccagtc	*SMP1* cDNA	164－142
sf3	tgacttgctctcatcccacatg	*SMP1* cDNA	1,696－1,717
sm19	gggcttgaagcaagtaaatggaag	*SMP1* イントロン1	-58～-35
sr1	gctatcaatatttcttggttacagacac	*SMP1* cDNA	2,172～2,144
sr3	gttcactgccataagtcttcagtgc	*SMP1* cDNA	575～551
sr3kp	tggccgcactgaagacttatgg	*SMP1* cDNA	546～567
sr45	cagctgcatctatgataatccacc	*SMP1* cDNA	224－243
sr47	atggacaagtccgaggtgatag	*SMP1* cDNA	315－344
sr47c	atcacctcggacttgtccattc	*SMP1* cDNA	342－321
sr5	gcaatcagagatccaaaggccaac	*SMP1* cDNA	428－405
sr5c	gttggccttggatctctgattgc	*SMP1* cDNA	405－428
sr55	gacatagtataccctggaattgctgt	*SMP1* cDNA	472－497
sr55c	acagcaattccagggtatactatgtc	*SMP1* cDNA	497－472
sr9	ctccccccgattttagccaagaa	*SMP1* cDNA	27－6

RHD プロモーター及び *RHD* cDNA について、位置は、開始コドンのAからの距離を参照する。イントロンについて、位置は、イントロン／エキソンジャンクションからの距離を参照する。*SMP1* cDNA を含む他の全ての配列について、距離は、公開された配列の開始からの距離を参照する。プライマー rey14b、rnb31、及び sf3 におけるミスマッチは、偶然(inadvertently)注意深く導入された。*RHD* の 5'隣接領域をカバーする本発明者らの生の配列からデザインされたため、プライマーre11d、re014 及び re04 は、dJ469D22 に正確にマッチしない。

【０２３４】
【表２】

表2. YAC 38A-A10 における *RHD* 隣接配列の存在

プライマー			増幅産物(Amplicon)		下記により得られた増幅産物		
					ゲノム DNA		YAC
センス	アンセンス	予想位置		サイズ	RHD⁺	RHD⁻	38A-A10
rend9a1	rend9a2	*RHD* 5' 隣接領域	ATG から約 85,000 bp	948 bp	yes	yes	yes
rend8b1	rend8b2	*RHD* 5' 隣接領域	ATG から約 50,000 bp	845 bp	yes	yes	yes
rea7	rez2	*RHD* 3' 隣接領域	STOP から約 1,500 bp	1,412 bp	yes	no	yes
rend32	sr9	*RHCE* 3' 隣接領域	STOP から約 20,000 bp	1,989 bp	yes	yes	yes
sr1	sf3	*RHCE* 3' 隣接領域	STOP から約 1,000 bp	477 bp	yes	yes	yes
rey14b	rey14a	*RHCE* 5' 隣接領域	ATG から約 5,300 bp	929 bp	yes	yes	no
rey7	rey8	*RHCE* 5' 隣接領域	ATG から約 10,000 bp	530 bp	yes	yes	no

【０２３５】
【表３】

表 3. *RHD* 欠失の特異的検出のための PCR-RFLP

	既知	試験された	*RHD* 遺伝子型の試料数							
			測定			期待*				
表現型	遺伝子型	試料(n)	+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	-/-	$P^{\S}$
既知遺伝子型									
cddee	cde/cde	14	0	0	14	0	0	14	N.A.
CCddee	Cde/Cde†	5	0	0	5	0	0	5	N.A.
ccddEE	cdE/cdE†	1	0	0	1	0	0	1	N.A.
D バリアント	D/cde†	9	0	9	0	0	9	0	N.A.
ccDEe	cDe/cDE‡	4	4	0	0	4	0	0	N.A.
共通の表現型									
CcDee		10	1	9	0	0.5	9.5	0	>0.4
ccDEe		10	0	10	0	0.3	9.7	0	>0.5
ccDee		10	1	9	0	0.5	9.5	0	>0.4
CCDee		10	9	1	0	9.5	0.5	0	>0.4
CcDEe		12	11	1	0	11	1	0	>0.5
ccDEE		10	10	0	0	9.2	0.8	0	>0.4
CCDEe		6	5	1	0	5.8	0.2	0	>0.1

*既知遺伝子型に基づく *RHD*/*RHD*' 及び *RHD*'/*RHD*' 試料の期待数又は局在集団におけるハプロタイプ頻度[41]

†PCR における *RHD*-陰性

‡弱いX抗部分的な D 表現型は、*RHD*'/*RHD*' 遺伝子型においてマスクされるであろうため、*RHD*'/*RHD*。これらの試料は、弱いD タイプ 1 (n=2)、タイプ 2 (n=2)、タイプ 3 (n=2)、タイプ 4 (n=2)及び D^{VII} (n=1)であった。

§イントロン 3[42]における多型 HaeIII 部位が異なる 2 つの *RHD* 遺伝子の存在は PCR-RFLP により決定された。

N.A.-適用せず。可能性は、二項分布の信頼限界に基づき算出された。

【０２３６】

【表４】

表4. *RHD* PCR-SSP

領域	名称 表示	DNA 配列	位置		検出された多型	増幅産物 サイズ	
プロモーター	re012	tccacttccacctcctgc	プロモーター	-1,137 — -1,119	-1125 で 7 bp 欠失	255	43
	re011d	gcagccaacttcccctgtg	プロモーター	-883 — -901	-896 で 4 bp 欠失		44
エキソン 3	ga31 (D-3-383)	ttgtcggtgctgatctcagtgga	エキソン 3	361 — 383	383 A	154	21
	rb21	aggtcctctcccagcac	イントロン 3	28 — 11			42
エキソン 4	ga41 (D-4-527)	acatgatgcacatctacgtgttcgc	エキソン 4	503 — 527		123	21
	ga42 (D-4-602)	cagacaaactgggtatcgttgctg	エキソン 4	625 — 602	602 C		21
イントロン 4	re41	cgataccagttgtctgccatgc	イントロン 4	608 — 631		226	本研究
	rb12	tcctgaacctgtctgtgaagtgc	イントロン 4	198 — 175	*RHD* 中イントロン 4 欠失		43
エキソン 5	rb24	agaccttggagcaggagtg	イントロン 4	-53 — -34		228	43
	ga51 (D-5-787)	ctgctcacctgctgatcttccc	イントロン 5/エキソン 5	8 — 787	787 G	21	
エキソン 6	ga62 (D-6-826)	ttatgtgcacagtgcgggtgtgg	エキソン 6	804 — 826		133	21
	ga61 (D-6-916)	caggtacttggctcccccgac	エキソン 6	936 — 916	916 G		21
エキソン 7	ga71 (D-7-967)	gttgtaaccgagtgctgtgggattc	エキソン 7	944 — 967		123	21
	ga72 (D-7-1048)	tgccggatccgacggtatc	エキソン 7	1,066 — 1,048	1,048 G		21
エキソン 7	rb26	agggtgggtagggaatatg	イントロン 6	-62 — -43		130	42
	re71	acccagcaagctgaagttgtagcc	エキソン 7	1,008 — 985	985/986 GG		42
イントロン 7	rb52	ccaggttgttaagcattgctgtacc	イントロン 7	6,666 — 6,690	6,690 C		42
	rb51	gcatgacgtgtctgcctctg	イントロン 7	6,794 — 6,713	6,713 C	169	本研究
エキソン 9	re93	gagataaaaatctgtgctcca	イントロン 8	-56 — -34		119	42
	re94	ctggtcatcaaaatattagcct	エキソン 9	1,216 — 1,193	1,193 A		本研究
エキソン 10 (3'UTR)	rea7	tgttgcctgcattgtacgtgag	3'UTR	1,310 — 1,333	*RHD/Rhesus* ギャップ	*23*	44
	rr4	agctactggatgaccacca	3'UTR	1,541 — 1,522	ジャンクション		42

*新規のプライマー名は、Gassner ら[21]により述べられたとおりである。
†プライマーセット ga71/ga72 は、スクリーニングに用いられ、プライマーセット rb26-re71 は、*RHD* エキソン特異的 PCR-SSP に用いられた。

【0237】
【表5】

表5. *RHD* PCR-SSP によりスクリーニングされた既知 D 陰性血液ドナーの集団調査

記載	試料 (n)	
表現型	スクリーニング*	PCR-SSP 陽性*
ccddee	314	0
Ccddee	433	34
ccddEe	271	5
CCddee	24	4
CcddEe	19	4
ccddEE	6	1
CcddEE	1	0
総計	1,068	48

* 試験された4つの *RHD* 特異的多型の少なくとも1つについて陽性 (プロモーター、イントロン4、エクソン4または3' UTR).

【0238】
【表6】

表 6. 25 D 陰性試料中の *RHD-RHCE-RHD* ハイブリッド遺伝子又は部分 *RHD* 欠失に適合しうる PCR パターン

PCR パターン	*RHD* 特異的 PCR-SSP[a]										試料	表現型				参照[f]
	P	E3	E4	I4	E5	E6	E7	I7	E9	E10	可能性のある原因[d]	(n)	記載	確認	ハプロタイプ[e]	
パターン 1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	*RHD-CE(3-9)-D*	11	Ccddee[g]	D 陰性	Cde	白人[1,23], アフリカ人[24]
パターン 2	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	*RHD-CE(3-7)-D*	4	Ccddee	D 陰性	Cde	本研究
パターン 3	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	*RHD-CE(4-7)-D*	3	ccddEe	D 陰性	cdE	白人[16]
パターン 4	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	*RHD-CE(4-7)-D*	1	CcddEe	D 陰性	n.k.[h]	本研究
パターン 5	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	*RHD-CE(4-5)-D*	2	ccddEe[n]	部分 D/D_{el}[g]	cDE	白人[3,22,36,40]
パターン 6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	*RHD-CE(8-9)-D*	3	CCddee	D 陰性	Cde	白人[21]
パターン 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	*RHCE(1-9)-D(10)*	1	ccddEe	D 陰性	cdE	本研究
パターン 8	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	*RHD(1-3)-CE(4-7)-D*	1	CcddEe	D 陰性	Cde[b]	アフリカ人[5,15]

[a] P - プロモーター, E3 - エキソン 3, E4 - エキソン 4, I4 - イントロン 4, E5 - エキソン 5, E6 - エキソン 6; E7 - エキソン 7; I7 - イントロン 7; E9 - エキソン 9; E10 - エキソン 10 (3' UTR)

[b] 一つの *RHD-CE-D* ハイブリッドの存在の確定。

[c] PCR パターン及び SNP 対立遺伝子に適合する既報のアレレ。

[d] 11 試料: 9 Ccddee, 1 CCddee, 1 CcddEe

[e] n.k. - 未知。

[f] 2 試料, D_{el} 表現型の 1 つの標識 CcddEe, 部分 D D[V] 表現型の 1 つの標識 ccddEe。

[g] Cde[b] とおそらく同一(下記参照のこと)。

【0239】

【表7】

表7．22 D陰性試料における一塩基置換を有するRHDアレル

アレル	置換	結果	試料 (n)	表現型 新鋭	表現型 範囲	ハプロタイプ	表示
RHD(W16X)	48 で G->A	3'エクソン 16 で終止コドン	2	Ccddee	D 陰性	Cde	本研究
RHD(G486+1A)	486+1 で g->a	5'スプライス部位イントロン 3 ACgt->ACat	3	Ccddee	D_{el}	CDe	本研究
RHD(G212V)	635 で G->T	3'スプライス部位イントロン 4 agGC->agTC ミスセンス変異 G212V	1	Ccddee	D 陰性	Cde	本研究
RHD(C285Y)	854 で G->A	ミスセンス変異 C285Y	1	ccddEe	部分 D*	cDE	本研究[1] 42
RHD(M295I)	885 で G->T	ミスセンス変異 M295I	7	Ccddee	D_{el}	CDe†	
RHD(Y330X)	985 で C->G	エクソン 330 で終止コドン	1	Ccddee	D 陰性	Cde	本研究
RHD(G1153(+1)A)	1153+1 で g->a	5'スプライス部位イントロン 8 AGgt->AGat	1	Ccddee	D 陰性	Cde	本研究 42
RHD(G385A)	1154 で G->C	3'スプライス部位イントロン 8 agGT->agCT ミスセンス変異 G385A	1	CcddEe	弱い D	cDE	
RHD(K409K)	1227 で G->A	5'スプライス部位イントロン 9 AGgt->AAgt	5	Ccddee	D_{el}	CDe	本研究

*部分 D DIM を示す本試料の詳細な血清学的解析は、以前公開されている[43]。
†cDe ハプロタイプに生じる同じアレルは、弱い D タイプ 11 として述べられている。

【０２４０】
【表８】

表8. 集団における推定頻度

PCRパターン/アレル	頻度 Cde/ cdE 全体に対して	頻度 集団において
パターン1	1:45	1:4,132
パターン2	1:125	1:11,364
パターン3	1:101	1:17,976
パターン4	1:500*	1:45,455*
パターン6	1:167	1:15,152
パターン7	1:302	1:53,929
パターン8	1:500	1:45,455
RHD(W16X)	1:250	1:22,727
RHD(G212V)	1:500	1:45,455
RHD(Y330X)	1:500	1:45,455
RHD(G1153(+1)A)	1:500	1:45,455
Any D 陰性	1:20 / 1:67†	1:1,607
RHD(G486(+1)A)	1:167	1:15,152
RHD(M295I)	1:71	1:6,493
RHD(K409K)	1:100	1:9,091
任意の D_{el}	1:33‡	1:3,030

* Cdeハプロタイプを推定；cdEハプロタイプは、cdE全体に対して1:302の頻度、集団において1:53,929の頻度をもたらす。統計値及び統計頻度として、ハプロタイプは、形式的に0.5 Cde及び0.5 cdEとしてカウントされた。

† Cde全体に対して、1:20、cdE全体に対して、1:67。

‡ Cdeハプロタイプに相対して1:33。

【０２４１】
【表９】

表9 抗原Dの日常のタイピングにおける擬陰性率

記載	試料	確認された表現型 (n)		擬陰性	
表現型	(n)	D_{el}	部分的な又は弱いD	n	率
ccddee	314	0	0	0	0%[†]
Ccddee	433	15	0	15	3.5%
ccddEe	271	0	2	2	0.7%
その他[*]	50	1	1	2	4%
D陰性	N.A.[‡]	0.15%	0.02%		0.17%

[*] CCddee、CcddEe、ccddEE及びCCddEe

[†] 95%信頼区間の上限は、0.95%であった(ポアソン分布)

[‡] N.A.-適用せず。頻度は、集団における表現型頻度に基づいて推定する。[41]

【０２４２】

【表１０】

表10 既報のD陰性, *RHD* 陽性アレル

アレル	ハプロタイプ	集団	適合可能性
RHD(Q41X)[2]	Cde	白人	検出せず
RHD-CE(2-9)-D[1,24,25]	Cde	白人[1,25]、黒人[24]	パターン1
RHD-CE(3-455-7)-D[5,15]	Cde[a]	黒人	パターン8
RHD(488del4)[1]	Cde	白人	検出せず
RHD-CE(4-7)-D[16]	cdE	白人	パターン3又は4
RHDψ[38]	cde	黒人	検出せず
RHD(600del)[10]	Cde	体細胞変異[*]	検出せず
RHD (エキソン5ナンセンス)[3]	cde	通信せず	検出せず
RHD(G314V)[34]	Cde	日本人	検出せず
RHD(エキソン9ナンセンス)	Cde	白人	パターン6

[*] 慢性骨髄性白血病の女性における体細胞変異により獲得され、骨髄球系統に制限されたアレル

【0243】
【表11】

表11 異なるRHD PCRストラテジーの擬陽性集団率及び陽性予想値

PCRストラテジー	擬陽性の割合	陽性結果の陽性予想値	試験された多型数
Eキシン10のみ	1:1,275	0.999216	1
イントロン4/Eキシン7	1:4,081	0.999755	2
イントロン4/Eキシン7/RHDΨ	1:4,700	0.999787	3
イントロン4/Eキシン7/W16X	1:5,212	0.999808	3
イントロン4/Eキシン7/イントロン7	1:6,051	0.999835	3
Eキシン3, 4, 5, 6, 7, 9	1:6,051	0.999835	6
Eキシン2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10	1:6,051	0.999835	8
イントロン4/Eキシン7/W16X/RHDΨ	1:6,267	0.999840	4
全Eキシン/RHDΨ	1:7,520	0.999867	9
イントロン4/Eキシン7/イントロン7/W16X	1:8,921	0.999888	4
イントロン4/Eキシン7/イントロン7/W16X/RHDΨ	1:12,533	0.999920	5

【０２４４】

引用文献

1. Andrews KT, Wolter LC, Saul A, Hyland CA: RHD遺伝子における４ヌクレオチド欠損に寄与するRhCCee表現型を有する白人患者におけるRhD形質. Blood 92:1839, 1998

2. Avent ND, Martin PG, Armstrong-Fisher SS, Liu W, Finning KM, Maddocks D, Urbaniak SJ: RHD遺伝子の頻回PCR解析により決定されたRhD陰性、弱いD(D^U)および部分的D表現型の根底にある遺伝子多様性の証拠. Blood 89:2568, 1997

3. Avent ND, Liu W, Jones JW, Scott ML, Voak D, Pisacka M, Watt J, Fletcher A. D^{VI}改変体表現型を示す個体に由来するRh転写物およびポリペプチドの分子解析：RRHD欠損事象は全てのD^{VI}ccEe表現型を生じない. Blood 1997;89:1779-86.

4. Blumenfeld OO, Huang CH:グリコホリン遺伝子ファミリーの分子遺伝学、MNSs血液型の抗原:スプライス部位使用頻度の多重遺伝子転位および調節は広範な多様化を生じる. Hum Mutat 6:199, 1995

5. Blunt T, Daniels G, Carritt B:部分的に欠損したRHD遺伝子における血清型転換. Vox Sang 67:397, 1994

6. Bowman J:胎児および新生児における溶血性疾患の管理. Semin Perinatol 21:39, 1997
7. Carritt B, Kemp TJ, Poulter M:ヒトＲＨ（rhesus）血液型遺伝子の進化：（部分的に）満たされた50歳予測. Hum Mol Genet 6:843, 1997
8. Carritt B, Steers FJ, Avent ND.胎児RhD型の出生前決定. Lancet 1994;344:205-6.
9. Cherif-Zahar B, Mattei MG, Le Van Kim C, Bailly P, Cartron JP, Colin Y:インサイチュハイブリダイゼーションによるヒトRh血液型遺伝子構造体の染色体領域1p34.3-1p36.1への局在化. Hum Genet 86:398, 1991
10. Cherif-Zahar B, Bony V, Steffensen R, Gane P, Raynal V, Goosens D, Laursen JS, Varming K, Jersild C, Cartron JP.慢性骨髄性白血病を有する患者におけるRHD遺伝子内の体細胞変異により引き起こされるRh陽性からRh陰性表現型へのシフト. Br J Haematol 1998;102:1263-70.
11. Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, van Huffel V, Cartron J-P. サザン解析により決定されたRhD陽性およびRhD陰性の血液型多型の遺伝的基礎. Blood 1991;78:2747-52.
12. Cossu G, Angius A, Gelfi C, Righetti PG: 定量的ポリメラーゼ連鎖反応およびキャピラリーゾーン電気泳動によるRh D/d遺伝子型決定. Electrophoresis 17:1911, 1996
13. Daniels GL, Faas BH, Green CA, Smart E, Maaskant-van Wijk PA, Avent ND, Zondervan HA, von dem Borne AE, van der Schoot CE. アフリカ人におけるVSおよびV血液型多型：血清型および分子解析. Transfusion 1998;38:951-8.
14. Doscher A, Schunter F, Muller TH: RHD接合性を評価するための定量的PCR. Infusionsther Transfusionsmed 26(suppl 1):31, 1999 (abstr.)
15. Faas BHW, Becker EAM, Wildoer P, Ligthart PC, Overbeeke MAM, Zondervan HA, von dem Borne AEGK, van der Schoot CE: 黒人におけるVSおよび弱いＣの発現の分子背景. Transfusion 37:38, 1997
16. Faas BHW, Beckers EAM, Simsek S, Overbeeke MAM, Pepper R, van Rhenen DJ, von dem Borne AEGK, van der Schoot CE:Ｇエピトープ形成におけるRhポリペプチドのSer103の改変. Transfusion 36:506, 1996
17. Filbey D, Hanson U, Wesstrom G:新生児の結果に相関した妊娠における赤血球抗体の罹患率：中央スウェーデンにおける12年の研究. Acta Obstet Gynecol Scand 74:687, 1995
18. Flegel WA, Khull SR, Wagner FF.弱いＤ型2RBCによる一次抗Ｄ免疫化. Transfusion 2000; 40: 428 - 434
19. Flegel WA, Wagner FF, Muller TH, Gassner C:DNA分類によるRh表現型予測および実践のためのその適用. Transfus Med 8:281, 1998
20. Fujiwara H, Okuda H, Omi T, Iwamoto S, Tanaka Y, Takahashi J, Tani Y, Minakami H, Araki S, Sato I, Kajii E:イントロン８におけるSTR多型は、RHハプロタイプの分子進化に関する情報を提供し得る. Hum Genet 104:301, 1999
21. Gassner C, Schmarda A, Kilga-Nogler S, Jenny-Feldkircher B, Rainer E, Muller TH, Wagner FF, Flegel WA, Schonitzer D:配列特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応によるRhesusD/CE分類. Transfusion 37:1020, 1997
22. Huang CH.ヒトD^{VI}カテゴリー赤血球：内部欠損RhD遺伝子ではなく新規ハイブリッドRhD-CE-D遺伝子との表現型の相関. Blood 1997;89:1834-9.
23. Huang CH, Reid ME, Chen Y, Coghlan G, Okubo Y:緊密に連鎖したSphI RFLPによる赤血球Rhハプロタイプの分子規定. Am J Hum Genet 58:133, 1996
24. Huang CH:ヒトdCCeeおよびDCW-赤血球におけるＲＨ遺伝子構造および発現の変化：表現型ホモ接合性対遺伝子型ヘテロ接合性. Blood 88:2326, 1996
25. Hyland CA, Wolter LC, Saul A.Rhesus Ccee (r'r')表現型を有する血液ドナー間で同定される３つの非関連RhD遺伝子多型. Blood 1994;84:321-4.
26. Kemp TJ, Poulter M, Carritt B:ヒトRHCE遺伝子内のミクロサテライト変化. Vox Sa

ng 77:159, 1999
27. Lo Y-MD, Bowell PJ, Selinger M, Mackenzie IZ, Chamberlain P, Gillmer MDG, Littlewood TJ, Fleming KA, Wainscoat JS:rhesus陰性の母親の末梢血の解析による胎児RhD状態の出生前決定. Lancet 341:1147, 1993
28. Maaskant-van Wijk PA, Hemker MB, Douglas-Berger Lら、Rhesus系の民族性変化. Transfusion 1999;39:(10S)103S-4S (Abstract).
29. Maaskant-van Wijk PA, Faas BHW, de Ruijter JAM, Overbeeke MAM, von dem Borne AEGK, van Rhenen DJ, van der Schoot CE.RHD特異的エキソンの頻回のポリメラーゼ連鎖反応解析によるRHDの遺伝子型分類. Transfusion 1998;38:1015-21.
30. Maaskant-van Wijk PA, Beckers EAM, van Rhenen DJ, Mouro I, Colin Y, Cartron J-P, Faas BHW, van der Schoot CE, Apoil PA, Blancher Aら、RHD(VI)欠損遺伝子型が存在しない証拠. Blood 1997;90:1709-11.
31. MacGeoch C, Mitchell CJ, Carritt B, Avent ND, Ridgwell K, Tanner MJ, Spurr NK:染色体領域1p36.13----p34へのヒト30kDal Rh(rhesus)血液型-抗原-関連タンパク質（Rh30A）の染色体座位の割当. Cytogenet Cell Genet 59:261, 1992
32. Mourant AE, Kopec AC, Domaniewska-Sobczak K:ヒト血液型および他の多型の分布. London, Oxford University Press, 1976
33. Okuda H, Suganuma H, Tsudo N, Omi T, Iwamoto S, Kajii E:RHD遺伝子とRHCE遺伝子の間のスペーサーの配列解析. Biochem Biophys Res Commun 263:378, 1999
34. Okuda H, Kawano M, Iwamoto S, Tanaka M, Seno T, Okubo Y, Kajii E:RHD遺伝子は、RhD陰性日本人ドナーにおいて高度に検出可能である. J Clin Invest 100:373, 1997
35. Onda M, Fukuda M:ヒトゲノムＤＮＡを含むP1プラスミドにより示されるグリコホリンＡ、ＢおよびＥをコードする遺伝子の詳細な物理マッピング. Gene 159:225, 1995
36. Reboul J, Gardiner K, Monneron D, Uze G, Lutfalla G:インターフェロン／インターロイキン－10レセプター遺伝子クラスターの比較ゲノム解析. Genome Res 9:242, 1999
37. Salvignol I, Calvas P, Socha WW, Colin Y, Le Van Kim C, Bailly P, Ruffie J, Cartron JP, Blancher A:非ヒト霊長類におけるＲＨ様血液型遺伝子産物の構造解析. Immunogenetics 41:271, 1995
38. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, Narter-Olaga EG, Hawthorne LM, Daniels G:RhD陰性血液型表現型を有するアフリカ人における37塩基対複製およびナンセンス変異を含むRHD偽遺伝子の存在. Blood 95:12, 2000
39. Urbaniak SJ, Robertson AE:凍結／解凍血液を用いた抗Ｄ産生についてのRh陰性男性ボランティアを免疫化する成功したプログラム. Transfusion 21:64, 1981
40. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA:３つの分子構造は、免疫血液学的特徴をともなったRhesusDカテゴリーVI表現型を引き起こす. Blood 91:2157, 1998
41. Wagner FF, Kasulke D, Kerowgan M, Flegel WA:南西ドイツにおける、血液型ABO、Rhesus、Ｄカテゴリー VI、Kell、および臨床的に関連した高頻度抗原の頻度. Infusionsther Transfusionsmed 22:285, 1995
42. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA:弱いＤ表現型の分子基礎. Blood 93:385, 1999
43. Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher NI, Lonicer CB, Muller TH, Siegel MH, Flegel WA.弱いＤ対立遺伝子は、異なる表現型を示す. Blood 2000; 95: 2699 － 2708
44. Wagner FF, Flegel WA.Rhesusボックスで生じたRHD遺伝子欠失. Blood 2000;
45. Wissenschaftlicher Beirat der Bundesarztekammer; Paul-Ehrlich-Institut. 血液型決定および輸血のガイドライン（血液治療）(Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion (Hamotherapie)). Koln: Deutscher Arzte-Verlag; 1996.
46. Legler TJ, Kohler M, Mayr WR, Panzer S, Ohto H, Fischer GF;頻回のポリメラーゼ連鎖反応およびライゲーションベース分類によるヒト血小板抗原系１～５の遺伝子型分

類. Transfusion 1996 May; 36(5): 426-31

【図面の簡単な説明】

【図１】　図１は、ＲＨ遺伝子座の模式的構造を示す図である。遺伝子及びRhesusボックスの位置及び方向を、それぞれ白抜きの矢印及び三角で示す（パネルＡ）。エキソンを垂直方向のバーとして示し、エキソン数を示す。２つのＲＨ遺伝子は、反対の方向を有し、互いに３’末端で向かい合っており、約３０，０００ｂｐ離れている。第３の遺伝子、ＳＭＰ１は、ＲＨＤと同じ方向を有し、ＲＨＤとＲＨＣＥとの間に位置する。ＲＨＤ遺伝子は、両端で２つの高度に相同的なRhesusボックス（ｂ）に隣接する。全てのエキソンは、ＲＨＤ及びＳＭＰ１の３’末端のエキソンを除いて２００ｂｐ未満である。当該構造を確立するために使用されるデータ（パネルＢ）としては、ｃＤＮＡ（水平方向の矢印）において表されるゲノム配列の伸長、ゲノムクローンに対する同一性及び相同性（バーａ：ｄＪ４６５Ｎ２４と同一；ｂ：ｄＪ４６９Ｄ２２に対するＲＨＤの相同性；ｃ：ｄＪ４６５Ｎ２４に対するＲＨＤの３’部分の相同性；ｄ：ｄＪ４６９Ｄ２２との同一性）が挙げられる。３つのブリッジするPCR反応の位置が示されている。ＲＨＤとＲＨＣＥとの間の「スペーサー」配列としてOkudaら（Okuda, Biochem.Biophys.Res.Commun.263:378,1999）により以前に報告されたヌクレオチドストレッチの正確な位置が標識されたバーにより示されている。

【図２】　図２は、ＲＨＤ及びＲＨＣＥ遺伝子の５’に位置するＤＮＡ領域の染色体機構を示す図である。ＲＨＣＥ及びＲＨＤの５’隣接領域の提案される構造を示す（パネルＡ）。ＡＴＧ開始コドンのすぐ５’の全４，９４１ｂｐがＲＨＣＥとＲＨＤ遺伝子との間で相同である（垂直方向に平行線を引いたバー）。当該相同領域を越えて相同性は存在しない（斜めに平行線を引いたバー）。２つのゲノムクローン、ｄＪ４６９Ｄ２２及びｄＪ４６５Ｎ２４を、プライマー設計に利用した。ＤＪ４６９Ｄ２２は、示されたＲＨＣＥ領域の全長を含み、一方でｄＪ４６５Ｎ２４は、相同領域に４６６ｂｐのみが伸長している。いくつかのＰＣＲプライマーの位置を示す（ａ、rey14a；ｂ、rend32；ｃ、rey15a；ｄ、re014；ｅ、re011d）。この提案される構造は、いくつかのＰＣＲ反応により支持されている（パネルＢ）。フォワードプライミングは、プライマーａ（ＲＨＣＥ特異的、レーン１～３）、プライマーｂ（ＲＨＤ特異的、レーン４～６）、及びプライマーｃ（ＲＨＣＥ及びＲＨＤ相同領域、レーン７～９）を用いて行った。増幅産物は、ＲＨＤ特異的リバースプライマーｅ（レーン２）でプライマーａについて欠失しており、及びＲＨＤ陰性ＤＮＡ（レーン６）でプライマーｂについて欠失していた。他の７つのＰＣＲ反応は、パネルＡに示されるゲノム構造に従って推定サイズの増幅産物を生じた。

【図３】　図３は、ＳＭＰ１遺伝子の染色体機構を示す図である。ＳＭＰ１遺伝子は７つのエキソンを有する。イントロンの位置及びおおよそのサイズが示されている。公開されたｃＤＮＡ（Genbank登録番号ＡＦ０８１２８２）の開始は、Rhesusボックスの下流からの１５ヌクレオチドにより分離されている。エキソン１は、５’非翻訳配列のみを含み、ＳＭＰ１開始コドンはエキソン２に配置されている。エキソン７は、１６コドンを含み、１，６５６ｂｐの３’非翻訳配列を含み、ＲＨＣＥエキソン１０の３’非翻訳配列と近接している。

【図４】　図４は、Rhesusボックスの染色体機構を示す図である。Rhesusボックス上流の物理的伸長（５’からＲＨＤ）は、９，１４５ｂｐ（黒バー）である。ボックスのヌクレオチド配列の約６３％が反復ＤＮＡからなる；反復ファミリーのタイプが示されている。Rhesusボックスの上流と下流との間の全体の相同性は、９８．６％であるが、１，４６３ｂｐ同一領域（水平方向の矢印）内では、単一の４ｂｐ挿入が存在するだけである（垂直方向の二重線）。ＣｐＧアイランド（Island）（２つの矢尻を有する矢印）が、３’末端に配置され、 ＳＭＰ１プロモーターに隣接するRhesusボックスの下流（３’からＲＨＤ）に存在する。

【図５】　図５は、Ｒｈ陰性ハプロタイプ中のＲＨＤ遺伝子欠損を示す図である。Rhesusボックスの３つの３，１００ｂｐセグメントが示されている。上部の線は、Ｄ陽性におけ

るRhesusボックスの上流のヌクレオチド配列を示し、下部の線は、Ｄ陽性におけるRhesusボックスの下流のヌクレオチド配列を示す。中央の線は、Ｒｈ陰性により保有される単一のRhesusボックスのヌクレオチド配列を示す。星印は、同一のヌクレオチドを示す。ＲＨＤ欠失は、１，４６３ｂｐの同一領域の一部である完全に同一な９０３ｂｐセグメントで起こった。プライマーｒｅｚ７及びｒｎｂ３１の位置を示す（ｍはミスマッチを示す）。ＰｓｔＩ制限部位は、挿入記号（＾）により示す。３つのRhesusボックスを登録番号ＡＪ２５２３１１（Rhesusボックス上流）、ＡＪ２５２３１２（Rhesusボックス下流）、及びＡＪ２５２３１３（ハイブリッドRhesusボックス）の下でＥＭＢＬに寄託されている。

【図６】　図６は、一般的なＲＨＤ陰性ハプロタイプにおけるＲＨＤ欠損の特異的検出のための２つの技術的手順を示す図である。非Rhesusボックス配列内に配置されたプライマーを用いたロングレンジＰＣＲ増幅（パネルＡ）及びRhesusボックス内に配置されたプライマーを用いたＰＣＲ－ＲＦＬＰを示す（パネルＢ）。推定される遺伝子型を示す。ロングレンジＰＣＲのプライマーをRhesusボックスの上流の５’（プライマーｒｅｚ４）かつＳＭＰ１エキソン１内（プライマーｓｒ９）に配置した。ＲＨＤ陰性ハプロタイプを特異的に検出した（パネルＡ、レーン１～６）。ＲＨＤ遺伝子についてＤＮＡ同型接合性は陰性であった。なぜなら、ＰＣＲはＲＨＤ遺伝子の７０，０００ｂｐのＤＮＡストレッチを増幅し得ないからである。ＰＣＲ－ＲＦＬＰ法に関して、ＰＣＲ増幅産物（プライマーｒｅｚ７及びｒｎｂ３１）をＰｓｔＩで消化した。Ｄ陰性において、増幅産物中に３つのＰｓｔＩ部位が存在し（図５参照）、１，８８８ｂｐ、５６４ｂｐ、３９７ｂｐ、及び１７９ｂｐの断片を生じる（レーン１～３）。Ｄ陽性のRhesusボックスの下流は、１つのＰｓｔＩ部位を欠失し、１，８８８ｂｐ、７４４ｂｐ、及び３９７ｂｐの断片を生じる（レーン７～９）。RHD^{+}／RHD^{-}異型接合性は、７４４及び５６４ｂｐの両方の断片を示す（レーン４～６）。ヘテロダイマーがＰｓｔＩにより切断されないため、５６４ｂｐ断片は弱く現れる。プライマーｒｎｂ３１は、Ｄ陽性のRhesusボックスの上流を増幅しない。

【図７】　図７は、白人に優勢なＲＨＤ陰性ハプロタイプを引き起こす提案される機構のモデルを示す図である。ＲＨＤ及びＲＨＣＥ遺伝子の遺伝子座の物理的構造を示す（パネルＡ）。Rhesusボックスの上流と下流との間にわたる不均一な横断は、それらの高相同性により引き起こされうる（パネルＢ）。Rhesusボックス内のブレークポイント領域は、９０３ｂｐについて１００％相同であることが見出された（図５を参照）。染色体をわたる横断（crossed over chromosome）を分離することにより、現存しているＲＨＤ陰性ハプロタイプのＲＨ遺伝子構造が生じる（パネルＣ）。

【図８】　図８は、ＲＨＤ陰性のハイブリッドRhesusボックスのＤＮＡ配列を示す図である。

【図９】　図９は、Ｄ陽性のRhesusボックスの上流のＤＮＡ配列を示す図である。

【図１０】　図１０は、Ｄ陽性のRhesusボックスの下流のＤＮＡ配列を示す図である。

【図１１】　図１１は、ＲＨＤプロモーターのＤＮＡ配列を示す図である。最後の３つのヌクレオチドは、ＲＨＤ遺伝子のコドン１を示す。

【図１２】　図１２は、ＲＨＤイントロン３中のCde^{S}ブレークポイント領域を示す図である。エキソン３／イントロン３ジャンクションの３’の２，９３８～３，６３６ｂｐのCde^{s}、ＲＨＤ及びＲＨＣＥのイントロン３の一部のヌクレオチド配列を示す。ＲＨＣＥ（GenBank登録番号ＡＬ０３１２８４）の遺伝子の５’部分を含有する、染色体１ｐ３５．１－３６．１３上のクローンＲＰ３－４６９Ｄ２２に由来するヒトＤＮＡ配列をリファレンスとして入手した；数字は、ＲＨＣＥ遺伝子中のイントロン３の最初の塩基と比べたこの配列における位置を示す。対応するＲＨＤ遺伝子配列は、GenBank登録番号ＡＬ１３９４２６に由来する。Cde^{S}配列のＲＨＤ又はＲＨＣＥの起点を示すヌクレオチドを強調する。Cde^{S}のブレークポイント領域を含む１５４ｂｐのＤＮＡストレッチを星印で示す。

【図１３】　図１３は、ＲＨＤイントロン７中のCde^{S}ブレークポイント領域を示す図である。エキソン７／イントロン７ジャンクションの３’の約２，７２６～３，７１９のCde^{S}、ＲＨＤ及びＲＨＣＥのイントロン７の一部のヌクレオチド配列を示す。ＲＨＣ

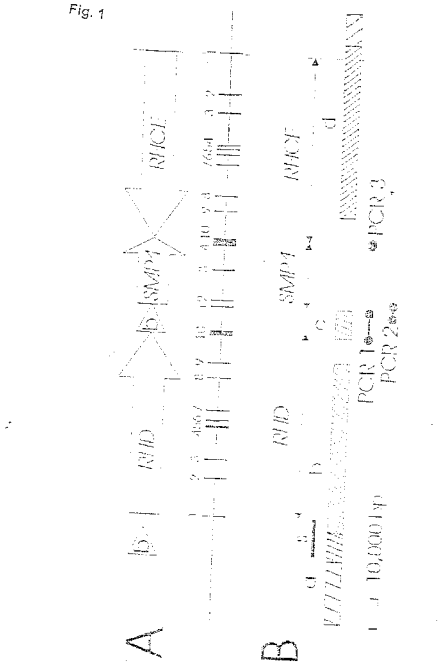
Ｅ（GenBank登録番号ＡＬ０３１２８４）の遺伝子の５’部分を含む染色体１ｐ３５．１－３６．１３上のクローンＲＰ３－４６９Ｄ２２に由来するヒトＤＮＡ配列をリファレンスとして入手した；数字はＲＨＣＥ遺伝子中のイントロン７の最初の塩基と比べた当該配列中の位置を示す。対応するＲＨＤ遺伝子配列は、GenBank登録番号ＡＬ１３９４２６に由来する。Ｃｄｅ^{S}配列のＲＨＤ又はＲＨＣＥの起点を示すヌクレオチドを強調する。Ｃｄｅ^{S}のブレークポイント領域を含む６６６ｂｐのＤＮＡストレッチを星印で示す。

【図１４】　図１４は、ＰＣＲ－ＳＳＰによるＣｄｅ^{S}の特異的検出を示す図である。イントロン７中のＣｄｅ^{S}の３’ブレークポイント領域を検出するＰＣＲ－ＳＳＰを示す。ＲＨＤ陰性試料（レーン１、ｃｃｄｄｅｅ）及び正常なＲＨＤ陽性試料（レーン２、ｃｃＤ．ＥＥ）の両方が、４３４ｂｐ対照産物のみを生じ、これはＨＧＨ遺伝子に由来する。対照的に、Ｃｄｅ^{S}試料（ＣｃｄｄＥｅ、レーン３）は、４３４ｂｐ対照断片に加えて、３３８ｂｐ特異的産物を生じ、これはイントロン７中のブレークポイント領域に由来する。当該反応は、Ｃｄｅ^{S}に特異的である；２つの部分的なＤ表現型Ｄ^{IVa}（レーン４）及びＤ^{III}タイプＩＶ（レーン５）は特異的産物を生じない。該反応はまた、Ｃｄｅ^{S}が、ＲＨＤΨ／Ｃｄｅ^{S}試料（レーン６）におけるように、他のＲＨＤアレレにトランスで生じる場合、Ｃｄｅ^{S}を特異的に検出する。

【図１５】　図１５は、通常のＤＮＡタイピングのためのＲＨＤ　ＰＣＲ－ＳＳＰを示す。２つの頻回反応、イントロン４／エキソン７頻回ＰＣＲ－ＳＳＰ（パネルＡ）およびＲＨＤ（Ｗ１６Ｘ）およびＲＨＤΨの特異的検出により高められたイントロン７ＰＣＲ（パネルＢ）からなるモジュラーシステムとしてＰＣＲを行なう。通常のＤ陽性試料（レーン１）、通常のＤ陰性試料（レーン２）、数個のまれなＤ陰性試料（レーン３～６）および主なＤ陽性ＲＨＤバリアント（レーン７および８）に対する結果を示す。標準のＤ陽性およびＤ陰性試料ならびにＤカテゴリーＩＶおよびＶＩを反応Ａにおいて認識する。イントロン７バンドの不在により反応ＢでＲＨＤ－ＣＥ（８－９）－Ｄが検出される。ＲＨＤ（Ｗ１６Ｘ）およびＲＨＤΨの存在もまた反応Ｂで検出される。バンドサイズは、パネルＡ、対照、４３４ｂｐ（ＨＧＨ遺伝子）；イントロン４、２２６ｂｐ；エキソン７、１２３ｂｐであり；パネルＢ、対照、６５９ｂｐ（Ｒｈｅｓｕｓボックスの約９０，０００ｂｐ５’側の第１染色体ゲノム配列）；イントロン７、３９０ｂｐ；ＲＨＤ（Ｗ１６Ｘ）、２４８ｂｐ；ＲＨＤΨ、１５４ｂｐである。内部対照増幅産物（amplicon）は、特異的な増幅産物より大きくなるように工夫され、特異的な産物が増幅される場合、競合のために抑制されうる。

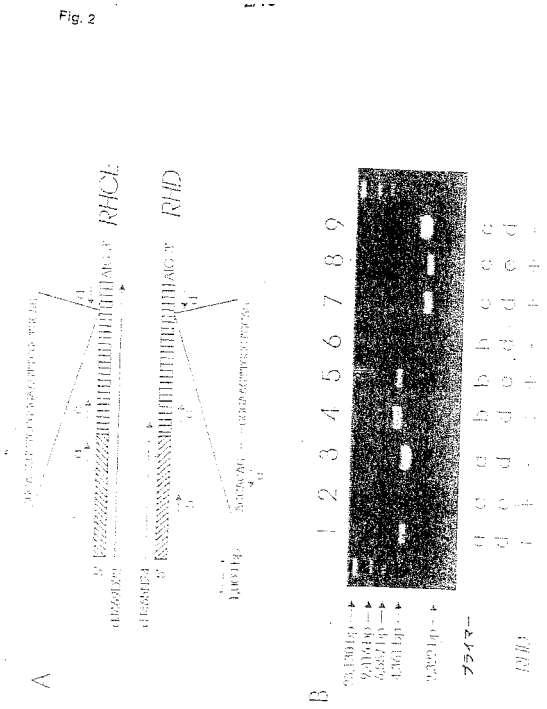
【図１】

Fig. 1



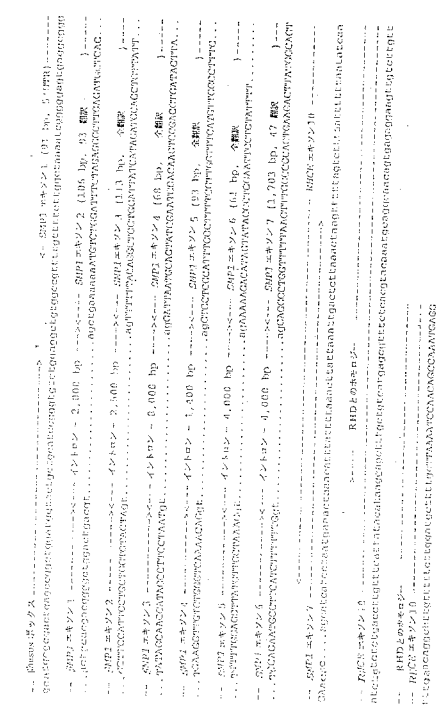
【図２】

Fig. 2



【図３】

Fig. 3



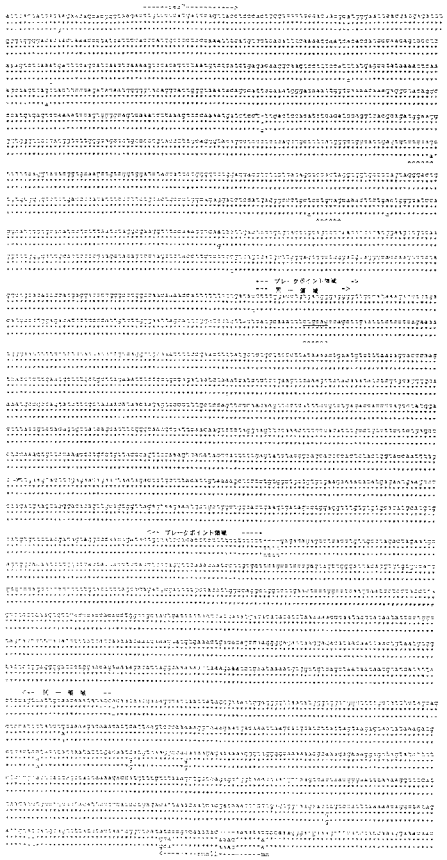
【図４】

Fig. 4



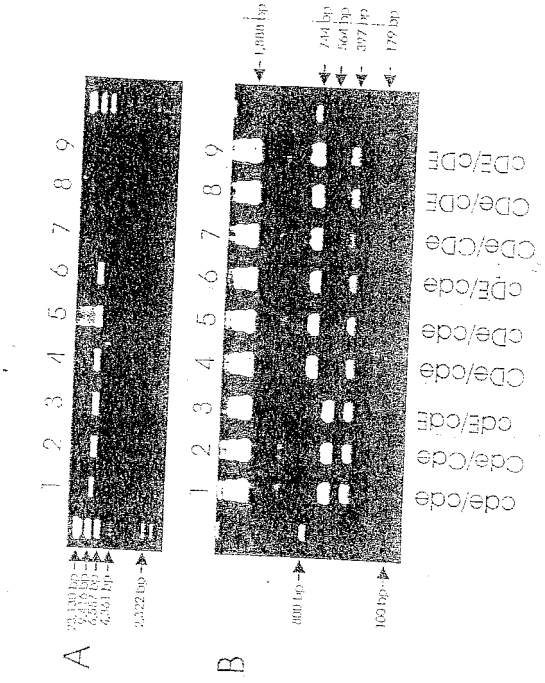
【図５】

Fig. 5



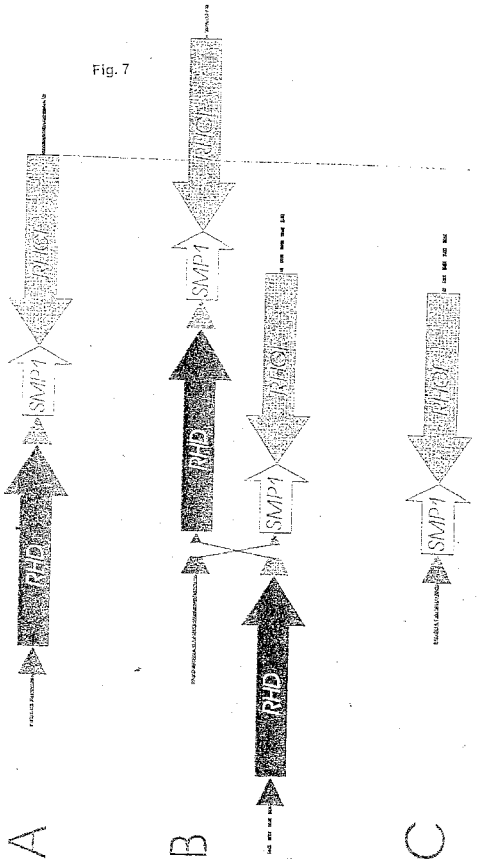
【図６】

Fig. 6



【図７】

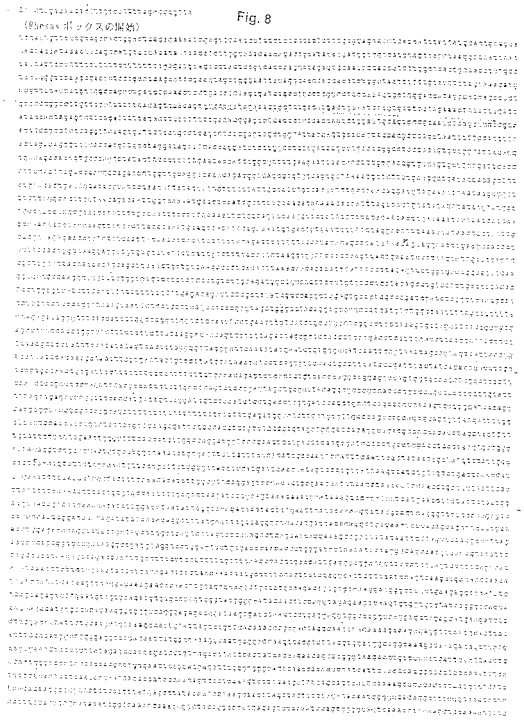
Fig. 7



【図８】

RHD陰性のハイブリッドRhesusボックス

Fig. 8



RHD陰性のハイブリッドRhesusボックス

Fig. 8 続き



(Rhesusボックスの続き)

【図９】

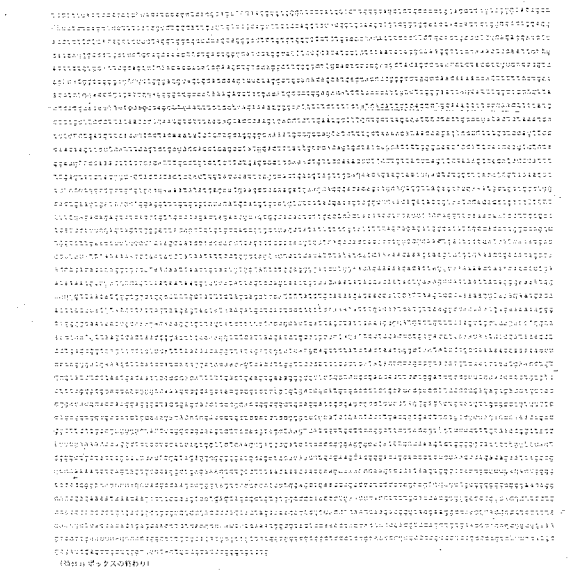
D陽性の上流Rhesusボックス

Fig. 9



D陽性の上流Rhesusボックス

Fig. 9 続き



(Rhesusボックスの続き)

【図１０】

D陰性の下流Rhesusボックス

Fig. 10





【図１１】

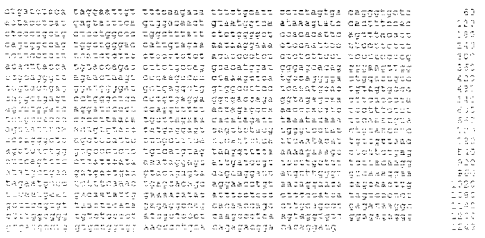


Fig. 11

【図１２】

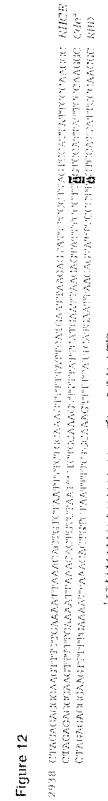


Figure 12

【図１３】

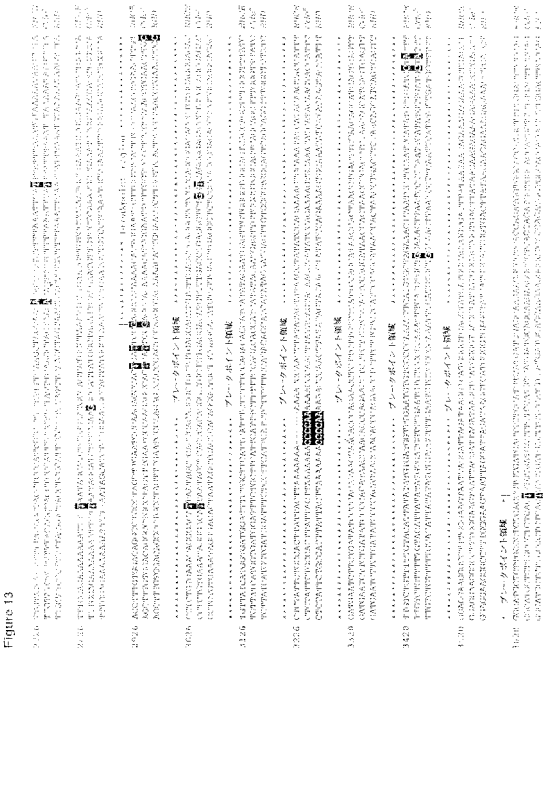
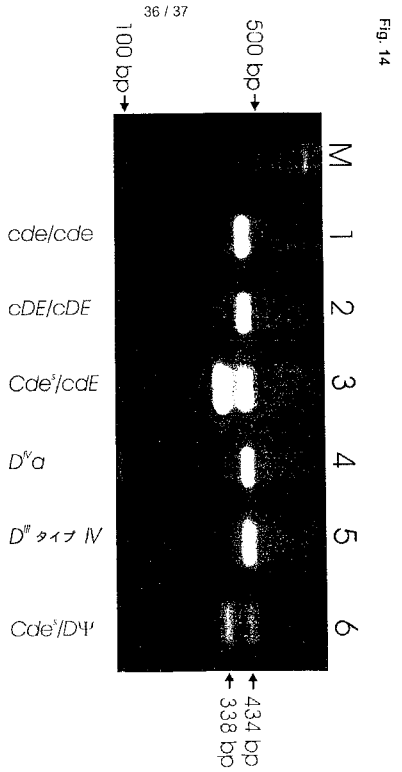
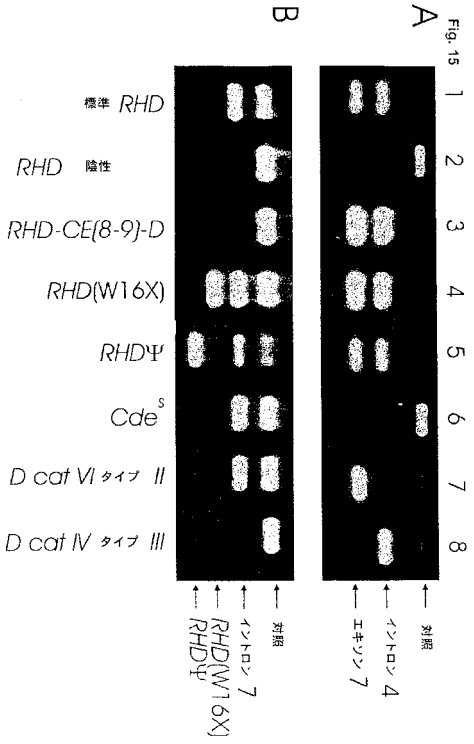


Figure 13

【図１４】


36 / 37
Fig. 14
100 bp
500 bp
M
1
2
3
4
5
6
cde/cde
cDE/cDE
Cde^s/cdE
D^IV a
D^III タイプ IV
Cde^s/DΨ
434 bp
338 bp

【図１５】


Fig. 15
A
B
1
2
3
4
5
6
7
8
標準 RHD
RHD 陰性
RHD-CE(8-9)-D
RHD(W16X)
RHDΨ
Cde^s
D cat VI タイプ II
D cat IV タイプ III
対照
イントロン 4
エキソン 7
対照
イントロン 7
RHD(W16X)
RHDΨ

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12N	***1/19***	***(2006.01)***	C12N	1/15	
C12N	***1/21***	***(2006.01)***	C12N	1/19	
A01H	***5/00***	***(2006.01)***	C12N	1/21	
A01K	***67/027***	***(2006.01)***	A01H	5/00	A
G01N	***33/53***	***(2006.01)***	A01K	67/027	
G01N	***37/00***	***(2006.01)***	G01N	33/53	D
			G01N	37/00	102

審査官　石丸　聡

(56)参考文献　Blood, vol. 93, pages 385-393 (1999)
Blood, vol. 89, pages 2568-2577 (1997)
Vox Sang., vol. 67, pages 397-401 (1994)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 89, pages 10925-10929 (1992)
Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 263, pages 378-383 (1999)
Ann. Hum. Genet., vol. 57, pages 273-279 (1993)
Hum. Mol. Genet., vol. 6, pages 843-850 (1997)
Blood, vol. 95, pages 3662-3668 (June 2000)

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/09
C12Q 1/68
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq