

明 細 書

発明の名称： 単一細胞に含まれる核酸の切断を検出する方法

関連出願の相互参照

[0001] 本出願は、2012年7月27日出願の日本特願2012-166668号の優先権を主張し、その全記載はここに開示として援用される。

技術分野

[0002] 本発明は、1つの細胞に含まれる核酸の切断を検出する方法、核酸が切断されていない細胞を製造する方法およびこれらを実施するためのキットに関する。

背景技術

[0003] DNA損傷は、二重鎖切断、片側開裂、酸化的損傷、化学物質による塩基修飾など多様なものがあるが、中でも二重鎖切断は、内因的に最も修復が困難であり、重要な遺伝子が障害されれば1箇所の切断でも重大な問題となるため最も細胞致死性が高い。

[0004] 体細胞においては多重にDNA修復機構が備えられているが、精子は第2減数分裂後期以降DNA修復能を失う。もし未修復もしくは不完全に修復されたDNAを有する精子が卵と受精すれば、染色体異常、流産率の増加などの妊娠損失につながる。したがって、DNA二重鎖切断の許容限度は極めて低く、生殖補助医療（ART）における精子品質管理の観点から、DNA切断の初期段階を検出し得る方法の確立が望まれている。

[0005] DNA切断を検出する方法としては、精子クロマチン拡散試験（Sperm Chromatin dispersion test）、TUNEL法およびCOMET法などが知られている。

[0006] 精子クロマチン拡散試験においては、アガロースに包埋した精子を細胞溶解した後、周囲に拡散したDNA断片を観察する（下記の非特許文献1を参照、該文献の記載はここに開示として援用される）。TUNEL法は、DNA断片に蛍光色素をラベルして顕微鏡観察するものである（下記の非特許文献

2 および 3 を参照、該文献の記載はここに開示として援用される）。

[0007] 単一細胞のDNA切断を検出する方法として、現在最も汎用されているのは、COMET法であり、該方法を用いた論文は数多く発表されている（下記の非特許文献4～6を参照、該文献の記載はここに開示として援用される）。COMET法は、アガロースに包埋した精子を細胞溶解した後に、電気泳動によりDNA断片を分離するものである。COMET法は、アルカリ処理によりDNA二重鎖切断、片側開裂を観察できるとされている。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1: Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, et al. (2003) The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. J Androl 24:59-66.

非特許文献2: Dominguez-Fandos D, Camejo MI, Ballesca JL, Oliva R (2007) Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. Cytometry Part A 71A: 1011-1018.

非特許文献3: Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R, Gupta S, Thiyagarajan A, et al. (2010) TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. Urology 76: 1380-1386.

非特許文献4: Hughes CM, McKelvey-Martin VJ, Lewis SE (1999) Human sperm DNA integrity assessed by the Comet and ELISA assays. Mutagenesis 19 4: 71-75.

非特許文献5: Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR (2002) The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. Hum Reprod 17: 990-998.

非特許文献6: Simon L, Lutton D, McManus J, Lewis SE (2011) Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor

of male infertility and in vitro fertilization success. Fertil Steril 95: 652-657.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] しかし、精子クロマチン拡散試験、TUNEL法およびCOMET法は、いずれもDNA切断の初期段階を検出し得る方法としては不十分である。
- [0010] すなわち、精子クロマチン拡散試験は、断片化が進行した状態を検出するものであり、DNA切断の初期段階を検出し得ない。TUNEL法では、蛍光を感知するためには、ある程度の量のDNA断片が発色団によりラベルされる必要がある。TUNEL法も、DNA切断の初期段階検出には不向きである。
- [0011] さらに、COMET法は、DNA高度断片化により生じた粒子状断片を検出するものであることから、単一細胞に含まれるDNAの数カ所の切断を検出できるものではない。このため、COMET法は、DNA切断の初期段階を検出し得る方法としては、十分な感度を有するものではない。
- [0012] 本発明は、従前技術の問題点を鑑みて、DNA切断の初期段階を検出し得る新たな方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0013] 真核細胞において、細胞核内DNAは、核タンパク質と結合し、さらに核マトリックスと呼ばれる構造タンパク質で核膜に固定されている。また、原核生物において、DNAは核様体タンパク質に結合されている。
- [0014] 本発明者は、鋭意研究した結果、（a）予め不活性化状態にあるタンパク質分解酵素を添加した溶融ゲルに細胞を包埋および固化した後、ゲル内のタンパク質分解酵素を活性化させて細胞を溶解することによって、細胞核内DNAを、核タンパク質および核マトリックスから分離し得ること、および（b）分離された細胞核内DNAについてパルスフィールド電気泳動法により電気泳動を行うことにより、1つの細胞に含まれる細胞核内DNA切断過程の初期段階で見出される長鎖DNA断片を検出し得ることを見出し、上記課題

を解決するに至った。

[0015] 特に、本発明者は、より高感度に、種々の長鎖DNA断片を検出することを検討した。まず、本発明者は、一次元パルスフィールド電気泳動により得られるDNA断片の長さは、細胞核内DNAの長さに比べて短いものであることに着目した。そこで、一次元パルスフィールド電気泳動では観察しきれていない長鎖DNA断片があるのではないかという推測を立てた。そこで、パルスフィールド電気泳動法を、一次元的にではなく、二次元的に実施することを試みた。しかし、一次元パルスフィールド電気泳動の実験法を単に二次元パルスフィールド電気泳動法に適用させただけでは、電気泳動の観察結果に変化はなかった。

[0016] そこで、本発明者は、アガロース濃度、細胞溶解液の組成、2組の電極の角度、電気泳動電圧、電極の切替タイミング、電気泳動液の組成、細胞を塗抹したスライドガラスの回転角度などの諸条件について鋭意検討を進めた結果、二次元パルスフィールド電気泳動により、一次元パルスフィールド電気泳動では検出し得なかった長鎖DNA断片を検出することに成功した。これは、本発明者の推測に基づいて、本発明者によってはじめて見出された驚くべき事実である。本発明は以上の知見に基づいて完成された発明である。

[0017] すなわち、本発明によれば、下記(1)～(5)の工程を含む、1つの細胞に含まれる核酸の切断を検出する方法が提供される。

(1) 1つ又は複数の細胞を、表面にアミノ基を有する支持体に配置する工程

(2) 至適pHが弱アルカリ性にある精製タンパク質分解酵素とゲル化剤を含む弱酸性溶液との混合物により前記細胞を覆う工程

(3) 前記弱酸性溶液を固化させる工程

(4) 前記弱酸性溶液を固化させた支持体を、縮合リン酸化合物と界面活性剤と還元剤とを含む弱アルカリ性溶液に浸漬させる工程

(5) 縮合リン酸化合物を含む電気泳動用溶液を用いたパルスフィールド電気泳動により、前記弱アルカリ性溶液に浸漬させた支持体上の細胞に由来す

る核酸を分離する工程

[0018] 本発明の別の側面によれば、下記（１）～（６）の工程を含む、核酸が切断されていない細胞を製造する方法が提供される。

（１）被験試料中の１つ又は複数の細胞を、表面にアミノ基を有する支持体に配置する工程

（２）至適 pH が弱アルカリ性にある精製タンパク質分解酵素とゲル化剤を含む弱酸性溶液との混合物により前記細胞を覆う工程

（３）前記弱酸性溶液を固化させる工程

（４）前記弱酸性溶液を固化させた支持体を、縮合リン酸化合物と界面活性剤と還元剤とを含む弱アルカリ性溶液に浸漬させる工程

（５）縮合リン酸化合物を含む電気泳動用溶液を用いたパルスフィールド電気泳動により、前記弱アルカリ性溶液に浸漬させた支持体上の細胞に由来する核酸を分離する工程

（６）前記電気泳動された核酸の分離態様が、正常細胞に由来する核酸の分離態様と同程度である場合に、前記被験試料中の細胞を核酸が切断されていない細胞と判定する工程

[0019] 本発明において、好ましくは、前記至適 pH が弱アルカリ性にある精製タンパク質分解酵素が、アルギニンと任意のアミノ酸とのペプチド結合及び／又はリジンと任意のアミノ酸とのペプチド結合を分解する活性を有する。

[0020] 本発明において、好ましくは、前記至適 pH が弱アルカリ性にある精製タンパク質分解酵素が、精製トリプシン様酵素である。

[0021] 本発明において、好ましくは、前記縮合リン酸化合物は、ポリリン酸、ヘキサメタリン酸およびそれらの塩からなる群から選ばれる少なくとも一種の縮合リン酸化合物である。

[0022] 本発明において、好ましくは、前記パルスフィールド電気泳動は、２組または複数組の電極を有し、かつ、該２組または複数組の電極が 45°～120°の角度で交差してなる電気泳動装置により達成される。

[0023] 本発明において、好ましくは、前記パルスフィールド電気泳動は、第１のパ

ルスフィールド電気泳動を行った後に、支持体を、細胞配置部分を回転中心として、60～160度回転させて第2のパルスフィールド電気泳動を行うことによって達成される。

[0024] 本発明において、好ましくは、前記細胞が精子である。

[0025] 本発明の別の側面によれば、下記(1)～(5)の成分を含む、核酸の切断を検出するための、または核酸が切断されていない細胞を製造するためのキットが提供される。

(1) 表面にアミノ基を有する支持体

(2) 至適pHが弱アルカリ性にある精製タンパク質分解酵素

(3) ゲル化剤を含む弱酸性溶液

(4) 縮合リン酸化合物と界面活性剤と還元剤とを含む弱アルカリ性溶液

(5) 縮合リン酸化合物を含む電気泳動用溶液

[0026] 本発明において、好ましくは、さらに下記(6)の成分を含む。

(6) 2組または複数の電極を有し、かつ、該2組または複数組の電極が45～120度の角度で交差してなる電気泳動装置

発明の効果

[0027] 本発明によれば、染色体を構成する二本鎖DNAをDNA繊維として観察することができ、さらに細胞内の二本鎖DNAが切断された場合には、その切断の度合いに応じて、切断された糸状断片、粒子状断片として観察することができる。

[0028] すなわち、本発明によれば、1つの細胞に含まれる核酸が1カ所～数カ所切断されることにより切り出される糸状断片の数および切断点の増加による糸状断片の短縮化、さらには断片化が高度に進行することにより生じる粒子状断片を検出し得る。

[0029] よって、本発明は、1つの細胞に含まれる核酸の1カ所～数カ所の切断ですら検出できるきわめて優れた感度を有し、したがって、本発明では、従来のCOMET法では検出できなかったDNA切断の初期段階を検出し得る。

図面の簡単な説明

[0030] [図1A]図 1 A は、精製した運動精子を細胞溶解液に懸濁したときの精子頭部を表す写真である。電圧は印加されていない。

[図1B]図 1 B は、精製した運動精子を細胞溶解液に懸濁したときに、その懸濁液に精製トリプシンを添加したときの精子頭部を表す写真である。電圧は印加されていない。

[図2A]図 2 A は、アガロース包埋された精製した運動精子にトリプシンを添加したときのDNAを表す写真である。図 2 A のDNAには電圧は印加されていない。

[図2B]図 2 B は、アガロース包埋された射精精液にトリプシンを添加したときのDNAを表す写真である。図 2 B のDNAには電圧は印加されていない。

[図2C]図 2 C は、トリプシン存在下で細胞溶解された精製した運動精子について、パルスフィールド電気泳動法を行ったときのDNAを表す写真である。

[図2D]図 2 D は、トリプシン存在下で細胞溶解された射精精液について、パルスフィールド電気泳動法を行ったときのDNAを表す写真である。

[図3A]図 3 A は、パルスフィールド電気泳動により伸長されたDNA繊維の拡大図を表す写真である。このDNAにおいては、DNA繊維の切断は見られない。

[図3B]図 3 B は、パルスフィールド電気泳動により伸長されたDNA繊維の先端部分の拡大図を表す写真である。このDNAにおいては、DNA繊維の切断は見られない。

[図4A]図 4 A は、パルスフィールド電気泳動により伸長されたDNA繊維の拡大図を表す写真である。これらのDNAにおいては、DNA繊維の先端において数本の糸状断片および粒子状断片が認められる。

[図4B]図 4 B は、パルスフィールド電気泳動により伸長されたDNA繊維の拡大図を表す写真である。これらのDNAにおいては、DNA繊維の先端において数本の糸状断片および粒子状断片が認められる。

[図4C]図4 Cは、パルスフィールド電気泳動により伸長されたDNA繊維の拡大図を表す写真である。これらのDNAにおいては、DNA繊維の先端において数本の糸状断片および粒子状断片が認められる。

[図5A]図5 Aは、精製した運動精子の場合のトリプシンを添加しないで細胞溶解を行った後、パルスフィールド電気泳動を行ったときのDNAを表す写真である。

[図5B]図5 Bは、射精精液の場合のトリプシンを添加しないで細胞溶解を行った後、パルスフィールド電気泳動を行ったときのDNAを表す写真である。

[図6A]図6 Aは、トリプシン処理がされた精製した運動精子について、アルカリ処理後、パルスフィールド電気泳動を行った場合のDNAを表す写真である。アルカリ処理により人工的にDNA切断が誘起されたことが示された。

[図6B]図6 Bは、トリプシン処理がされた精製した運動精子について、アルカリ処理後、パルスフィールド電気泳動を行った場合のDNAを表す写真である。アルカリ処理により人工的にDNA切断が誘起されたことが示された。

[図6C]図6 Cは、トリプシン処理がされた精製した運動精子について、パルスフィールド電気泳動後、アルカリ処理を行ったときのDNAを表す写真である。アルカリ処理により人工的にDNA切断が誘起されたことが示された。

[図6D]図6 Dは、トリプシン処理がされた精製した運動精子について、パルスフィールド電気泳動後、アルカリ処理を行ったときのDNAを表す写真である。アルカリ処理により人工的にDNA切断が誘起されたことが示された。

[図7]図7は、二次元パルスフィールド電気泳動により伸長されたDNA繊維の拡大図を表す写真である。矢印(→)は、一次元パルスフィールド電気泳動では観察できない長鎖DNA断片を示す。COMET法では強アルカリ処

理によりDNA鎖を開裂し、ニックの検出を行う。

[図8]図8は、一次元パルスフィールド電気泳動（上側）および二次元パルスフィールド電気泳動（下側）により伸長されたDNA繊維の模式図である。

発明を実施するための形態

[0031] 1. 本発明の1つの細胞に含まれる核酸の切断を検出する方法

本発明は、1つの細胞に含まれる核酸の切断を検出する方法に関する。さらに、本発明の具体的な一態様は、下記（1）～（5）の工程を含む、1つの細胞に含まれる核酸の切断を検出する方法に関する。

（1）1つ又は複数の細胞を、表面にアミノ基を有する支持体に配置する工程

（2）至適pHが弱アルカリ性にある精製タンパク質分解酵素とゲル化剤を含む弱酸性溶液との混合物により前記細胞を覆う工程

（3）前記弱酸性溶液を固化させる工程

（4）前記弱酸性溶液を固化させた支持体を、縮合リン酸化合物と界面活性剤と還元剤とを含む弱アルカリ性溶液に浸漬させる工程

（5）縮合リン酸化合物を含む電気泳動用溶液を用いたパルスフィールド電気泳動により、前記弱アルカリ性溶液に浸漬させた支持体上の細胞に由来する核酸を分離する工程

[0032] 本発明において、「細胞」は、あらゆる生物種由来の試料から調製または分離されたものでもよい。そのような細胞を含む試料には、原核生物または真核生物の個体そのもの、あるいはその一部が使用できる。例えば、脊椎動物（ヒトを含む）では、糞便、尿、または汗のような排泄物、血液、精液、唾液、胃液、または胆汁のような体液、生検試料等が挙げられる。

[0033] なお、組織から分離していない細胞を用いる場合には、例えば、コラゲナーゼ処理をすることによって、組織から細胞を分離させることもできる。

[0034] また、「細胞」の非限定的な例としては、繊維芽細胞、神経細胞、血球細胞（T細胞など）などの体細胞、精子などの生殖細胞が挙げられるが、好ましくは生殖細胞、より好ましくは精子である。

[0035] 本発明において「核酸」とは、細胞（例えば、細胞核）に含まれるDNAおよびRNAをいうが、好ましくはDNAであり、より好ましくは細胞核内DNAである。なお、細胞核内DNAは染色体DNAやゲノムDNAと同義である。

[0036] 本発明において「核酸の切断」とは、二本鎖核酸および一本鎖核酸の切断をいう。

[0037] 以下、本発明の「1つの細胞に含まれる核酸の切断を検出する方法」の各工程について詳細に説明する。

[0038] (1) 1つ又は複数の細胞を、表面にアミノ基を有する支持体に配置する工程

工程(1)においては、1つ又は複数の細胞を表面にアミノ基を有する支持体に配置する。

[0039] 支持体は、工程(5)のパルスフィールド電気泳動を行う際に、電気泳動装置に配置される支持体である。支持体は、その表面にアミノ基を有するものであれば特に限定されず、例えば、表面にアミノ基を有するスライドガラスなどが挙げられる。支持体の表面にアミノ基を付与する方法は特に限定されず、支持体の表面をアミノ基含有化合物で処理する手法や構成成分にアミノ基を有する化合物を用いてアミノ基が表面に配向するように支持体を製造する手法など、当業者により知られる支持体の表面に特定の官能基を発現させる手法を採用できる。

[0040] 細胞を支持体に配置する方法は特に限定されず、たとえば、細胞を含む溶液を支持体上に滴下し、次いで遠心作用的に細胞を支持体上に固定する手法を採用できる。

[0041] (2) 至適pHが弱アルカリ性にある精製タンパク質分解酵素とゲル化剤を含む弱酸性溶液との混合物により前記細胞を覆う工程

工程(2)においては、至適pHが弱アルカリ性にある精製タンパク質分解酵素とゲル化剤を含む弱酸性溶液との混合物により細胞を覆う。

[0042] 本発明において、タンパク質分解酵素は、タンパク質を分解することによっ

て、細胞に含まれる核酸を、核タンパク質および／または核マトリックスから分離できるものである。

[0043] タンパク質分解酵素としては、精製されており、かつ、至適 pH が弱アルカリ性にあるものであれば特に限定されないが、例えば、アルギニンと任意のアミノ酸とのペプチド結合及び／又はリジンと任意のアミノ酸とのペプチド結合を分解する活性を有する酵素が挙げられる。主要な核タンパク質であるヒストンおよびプロタミンが、アルギニンとリジンに富むからである。核タンパク質内のこれらの塩基性残基のプラス電荷と DNA のリン酸基のマイナス電荷とがイオン結合を形成することから、このイオン結合を乖離し得るように機能する酵素が好ましい。タンパク質分解酵素の好適な例は、各種動物由来の膵臓製トリプシン、各種動物、微生物由来トリプシン類似の基質特異性を有するトリプシン様タンパク質分解酵素および汎用されるタンパク質分解酵素 (Proteinase K) であるが、より好ましいのはトリプシンである。トリプシンは、その純度および活性を、酸性条件下、たとえば、pH 2.0 以下の酸性条件下で維持することができる。

[0044] 本発明において、タンパク質分解酵素は精製されているものを用いる。タンパク質分解酵素の精製の程度は、細胞内の核タンパク質と DNA とを乖離する活性を示す程度であれば特に限定されないが、たとえば、タンパク質分解酵素の純度が 50% 以上、好ましくは 60% 以上、より好ましくは 70% 以上、さらに好ましくは 80% 以上、なおさらに好ましくは 90% 以上、特に好ましくは 95% 以上である。タンパク質分解酵素を精製する手法は特に限定されず、当業者に知られる汎用的なタンパク質の精製法を採用できるが、たとえば、タンパク質分解酵素に対して親和性の高い物質を固相化したカラムを用いるアフィニティークロマトグラフィー法を用いることができる。

[0045] 本発明において、タンパク質分解酵素は至適 pH が弱アルカリ性にある。至適 pH とは当業界において通常意味されたとおりのものであり、たとえば、タンパク質分解酵素が相対的に最も高い活性を示す pH であるといえる。タンパク質分解酵素は至適 pH が弱アルカリ性にあり、たとえば、pH 7.0

～12.0にあり、好ましくはpH7.5～10.0にあり、より好ましくはpH7.8～9.0にある。

[0046] なお、原核生物は、核タンパク質および／または核マトリックスを有せず、核様体タンパク質を有する。したがって、本願発明において、原核生物に適用されるタンパク質分解酵素は、核様体タンパク質から、細胞に含まれる核酸を分離できるものであり、例えば、トリプシンやProteinase Kなどを使用することができる。

[0047] 本発明で用いられるタンパク質分解酵素は、あらゆる生物種から単離されるタンパク質であってもよい。また、化学合成もしくは無細胞翻訳系で生化学的に合成されたタンパク質であってもよいし、あるいはタンパク質分解酵素をコードする塩基配列を有する核酸を導入された形質転換体から産生される組換えタンパク質であってもよい。

[0048] また、本発明において、タンパク質分解酵素は、単一のタンパク質分解酵素のみならず、複数のタンパク質分解酵素の混合物も使用することができる。

[0049] 本発明で用いられるゲル化剤としては、公知のゲル化剤を使用することができるが、例えば、アガロース、ゼラチン、デンプン、カラギーナン、ペクチン、アガロペクチン、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、またはトレハロース等を使用することができるが、好ましくは安定した三次元網目構造を形成するアガロースである。アガロースは、酸化剤や紫外線などのDNAに悪影響を及ぼす可能性がある因子を使用せずとも、安定した三次元網目構造を形成することができるからである。

[0050] アガロースの濃度は、細胞核内DNAの長さを考慮して、低濃度に設定する。例えば、アガロースの濃度（最終濃度）は、0.1～1.0 w/v %であり、好ましくは0.1～0.6 w/v %であり、より好ましくは0.2～0.5 w/v %であり、さらに好ましくは0.2～0.3 w/v %である。

[0051] 本発明において、弱酸性溶液には、細胞膜を可溶化するための可溶化剤を加えてもよい。

- [0052] 本工程で用いられる可溶化剤としては、例えば、界面活性剤がある。界面活性剤としては、タンパク質分解酵素に対する作用がより温和であるものが好ましい。界面活性剤の例として、ジギトニン、サポニン、T r i t o n X 1 0 0、T r i t o n X 1 1 4、T w e e n 2 0、T w e e n 8 0等が挙げられる。いずれの可溶化剤も商業的に入手可能である。
- [0053] 弱酸性溶液のpHの範囲は、たとえば、pH 3. 0～7. 0であり、好ましくはpH 4. 0～6. 0である。弱酸性溶液を弱酸性に調整する方法は特に限定されず、たとえば、弱酸性に調整した一定濃度の酸または緩衝液を含有することによって達成される。
- [0054] 工程（２）の溶液の濃度、処理温度、処理時間等のその余の条件は、細胞の種類やタンパク質分解酵素、ゲル化剤および可溶化剤などの含有物の種類により異なるが、当業者は適宜条件を設定し得る。至適pHが弱アルカリ性にある精製タンパク質分解酵素とゲル化剤を含む弱酸性溶液との混合物により支持体に配置した細胞を覆う手法は特に限定されず、たとえば、該混合物を支持体における細胞を塗抹した部分に滴下することにより実施できる。
- [0055] また、工程（２）において、pHが10以上とならないように、好ましくは中性から弱酸性になるようにpHを調整する。後述するように、アルカリ処理によって核酸の断片化が誘起されるからである。工程（２）は、ゲル化剤が溶融した状態を保てる比較的高温条件、たとえば、30℃以上で実施することが好ましいが、あまり高温であると酵素が失活し、かつ、核酸が変性する蓋然性がある。
- [0056] （３）工程（２）の弱酸性溶液を固化させる工程
工程（３）においては、工程（２）の弱酸性溶液を固化させる。
- [0057] 例えば、加温された液体に、タンパク質分解酵素とゲル化剤を添加し、得られた溶液を室温（たとえば10～30℃）に戻すことにより固化することができる。化学重合を要する場合は、ゲル化剤の特性に従い、重合開始剤を添加してもよい。
- [0058] 工程（２）および（３）によって、細胞核内DNAなどの核酸は、ゲルへ埋

め込まれる。工程（３）は、タンパク質分解酵素が不活性である条件下、たとえば、弱酸性条件下で実施する。

[0059] （４）工程（３）により弱酸性溶液を固化させた支持体を、縮合リン酸化合物と界面活性剤と還元剤とを含む弱アルカリ性溶液に浸漬させる工程
工程（４）においては、工程（３）により弱酸性溶液を固化させた支持体を細胞溶解液である弱アルカリ性溶液に浸漬させる。

[0060] 弱アルカリ性溶液は、縮合リン酸化合物と界面活性剤と還元剤とを含むものであれば特に限定されず、たとえば、緩衝剤やその他の成分をさらに含有することができる。縮合リン酸化合物とは、２個以上のリン酸が反応し、水分分子が脱離し、得られた１個の新たな分子（ $H_{n+2}P_nO_{3n+1}$ （ n は１以上の整数である）とも表される）またはその塩を意味する。

[0061] 細胞溶解液に縮合リン酸化合物を加える理由は、以下のとおりである。すなわち、DNAの構造は、デオキシリボース（五炭糖）とリン酸のホスホジエステル結合が反復した主鎖に核塩基が結合して２本がらせん状に結合した構造をとる。ホスホジエステル結合中のリン酸基は強い負電荷を持つ。一方、核タンパクを構成するアルギニンおよびリジンは陽電荷を持つため、核タンパクとリン酸は静電結合をする。縮合リン酸化合物は、競合的に核タンパクと静電結合することにより効率的にDNAを解離させることができる。このように、縮合リン酸化合物は、核タンパクとDNAとの結合を特異的に競合解離することができることから、その濃度は低濃度、たとえば、10 mM以下の濃度とすることができる。

[0062] 従来、DNAと核タンパクの解離および可溶化には、高濃度の塩類（2 M以上のNaClなど）が用いられてきた。本発明者は、僅かな量のヘキサメタリン酸およびポリリン酸などの縮合リン酸化合物がDNA-核タンパク質複合体を解離することに着目し、初めてこのことをDNA断片化検査に採用したのである。縮合リン酸化合物の好適な例は、ヘキサメタリン酸およびその塩ならびにポリリン酸およびその塩である。

[0063] ところで、本発明の工程（２）～（４）を、弱酸性溶液にタンパク質分解酵

素を含有させない状態でゲル化剤を含む弱酸性溶液を固化させ、次いでタンパク質分解酵素を含む細胞溶解液に支持体を浸漬する工程とすることが考えられる。しかし、ゲルへ埋め込まれた細胞を、その後に添加したタンパク質分解酵素で処理するには困難が伴う。ゲルが固化した後、低分子の試薬（D T T、塩など）は、ゲル網目構造内において容易に拡散するが、分子量が数万以上あるタンパク質分解酵素は、ゲル内において拡散するのは容易ではなく、ほとんどが細胞周囲に到達しないからである。

[0064] 工程（２）～（４）は、このような困難を克服したものである。工程（３）においては、工程（２）のタンパク質分解酵素とゲル化剤とを含む弱酸性溶液を固化させる。これらの工程により、タンパク質分解酵素は、固化したゲル中に均一に拡散した状態となる。

[0065] 重要なことは、工程（２）および（３）が、タンパク質分解酵素が不活性である条件下で行われ、工程（４）が、タンパク質分解酵素が活性である条件下で行われることである。これは、ゲルが固化する以前にタンパク質分解酵素により細胞が融解されると、DNAが溶液内に拡散して単一細胞に由来するDNA断片の判定が困難となるからである。したがって、本発明において用いられるタンパク質分解酵素は至適pHが弱アルカリ性にあるものであることから、工程（２）は弱アルカリ性以外のpH、たとえば、弱酸性条件下で実施され、かつ、工程（３）は弱アルカリ性条件下で実施する。なお、「タンパク質分解酵素が活性である」とは、タンパク質分解酵素がタンパク質を分解することを意味する。「タンパク質分解酵素が不活性である」とは、タンパク質分解酵素が実質的にタンパク質を分解しないことを意味する。

[0066] 例えば、ウシ膵臓性トリプシンのタンパク質分解活性はpH依存性であり、pH約6～10において活性を有する。これに基づいて、工程（２）～（３）のpHを6未満の弱酸性条件に設定し、工程（４）のpHを約6～10の条件に設定することによって、工程（２）および（３）をタンパク質分解酵素が不活性である条件下で行い、工程（４）をタンパク質分解酵素が活性である条件下で行うことが可能である。

[0067] より具体的な例として、トリプシンとアガロースとを含むpH4.7の溶液を固化させたゲル内においては、トリプシンは不活性である。アガロースをpH8.1の細胞溶解液に浸漬させることによって、トリプシンが活性化され、タンパク質分解反応が開始される。

[0068] 酵素の反応は、pH以外にも、温度、酵素濃度、反応時間および酵素阻害剤などに影響を受けることから、これらを因子として、タンパク質分解酵素の性質に従って、「タンパク質分解酵素が活性である」または「タンパク質分解酵素が不活性である」ように、工程（2）～（4）の条件を適宜設定し得る。

[0069] （5）縮合リン酸化合物を含む電気泳動用溶液を用いたパルスフィールド電気泳動により、工程（4）で処理された支持体上の細胞に由来する核酸を分離する工程

工程（5）においては、縮合リン酸化合物を含む電気泳動用溶液を用いたパルスフィールド電気泳動により、工程（4）で処理された支持体上の細胞に由来する核酸を分離する。

[0070] パルスフィールド電気泳動法は、複数の電極によって一定間隔で電場の方向を変えて電気泳動を行う。パルスフィールド電気泳動法は、電場の方向を一定時間毎に変化させることにより、核酸分子の形態的变化を誘発し、巨大な核酸分子をゲルの網目の中をうまくすり抜けさせるように移動させ分離することができるものである。

[0071] 本発明においては、電気泳動を行う前には、核酸は、細胞がゲル中で埋め込まれた位置に存在する。パルスフィールド電気泳動法により電気泳動を行うことによって、ゲル内において絡まった核酸をほぐしながら、原点（電気泳動を行う前に核酸が存在する位置）から核酸を伸長させ得る。

[0072] パルスフィールド電気泳動は当業者であれば適宜行い得る。例えば、パルスフィールド電気泳動に用いる電気泳動槽は、たとえば、40～120度、より具体的には40度、45度、50度、60度、70度、90度、100度、110度および120度からなる群から選ばれる角度で交差する2組の電

極、もしくはこの角度範囲内に位置する3組以上の複数の電極を有するもの
とすることができる。そして、その交点に細胞配置部位が位置するように、
工程（4）で処理された支持体をパルスフィールド電気泳動装置上に置き、
交互に通電して電気泳動を行うことができる。

[0073] また、パルスフィールド電気泳動法による電気泳動において、支持体を回転
させることによって、電気泳動させる方向を変え、電気泳動を2回またはそ
れ以上行うことができる。例えば、本発明においては、工程（5）のパルス
フィールド電気泳動は、1回目のパルスフィールド電気泳動を終えた後、支
持体を、支持体の細胞配置部分を回転中心として、一定角度に回転させた後
、2回目のパルスフィールド電気泳動を行うことにより達成することができる。
このように、電気泳動させる方向を変えて、電気泳動を2回以上行うこ
とによって、1回目の電気泳動では分離できないゲル内において絡まった長
い核酸断片を検出することができるようになる。

[0074] 一次元パルスフィールド電気泳動および二次元パルスフィールド電気泳動の
電気泳動結果の違いについて、これらの電気泳動結果を模式的に表した図8
を参照して説明する。図8の「1次元泳動」の模式図（上側図）が示すとおり、
一次元パルスフィールド電気泳動後において、原点から伸長する長鎖DNA、
その先端より分離された繊維状のDNA断片（a）、さらにその先に
分離されたより短いDNA鎖（b）および粒子状の断片（c）が観察される。
それに対して、二次元パルスフィールド電気泳動後においては、図8の「
2次元泳動」の模式図（下側図）が示すとおり、1回目の泳動で伸長しな
かった長鎖DNAが伸長し、1次元目で原点から伸長したDNA鎖に絡んでい
て分離できなかった非常に長いDNA断片（d）が検出される。また、a、
b、cおよびdのDNA断片または粒子は、それぞれ方向を変えて泳動され、
種々の長さのDNAが縦方向に略平行に並んで観察されるようになる。し
たがって、二次元パルスフィールド電気泳動では、a、b、cおよびdのDNA
断片が泳動されると推測される区画において、DNAが検出されない場
合に、その細胞の細胞核内DNAは切断されていないと判定することができ

る。

[0075] 二次元パルスフィールド電気泳動を行うに際して、1回目のパルスフィールド電気泳動の後に支持体を回転させる角度は、一次元パルスフィールド電気泳動では検出できない長鎖DNA断片を原点から伸びるDNA鎖に遮られることなく検出できる角度であれば特に限定されないが、例えば、支持体の細胞配置部分を回転中心として、60～160度、より具体的には60度、70度、80度、90度、100度、110度、120度、130度、140度、150度、および160度からなる群から選ばれる角度である。この角度が140度のときに、図8の下側の模式図のように、DNA断片・粒子a、b、cおよびdが明確に検出できるようになる。

[0076] 従来のCOMET法では、粒子状断片が原点から電気泳動されるパターンを解析する。従来のCOMET法では、タンパク質分解酵素を用いる核タンパク質の消化を行わない、さらに通常の単一電極を用いた電気泳動を行うため、ゲル内において絡まった核酸を核タンパク質から遊離させ、さらにこれらをほぐし、伸長させることができなかった。

[0077] 工程(5)で用いられる電気泳動用溶液は縮合リン酸化合物を含めば特に限定されず、たとえば、通常用いられる電気泳動用緩衝液の成分が加えられる。上記の工程(4)の説明で述べたように、縮合リン酸化合物を添加することによって、電気泳動中の核タンパク質消化物とDNAの再会合を防止し得る。これまでのDNA研究ではDNAの電気泳動は除タンパクした標品を使用していた。しかし、タンパク質分解酵素で処理した後においても、分解した核タンパク質に由来する塩基性ペプチドが系内に混在することから、これらの塩基性ペプチドが再びDNAに結合し、DNAのマイナス電荷を消失させて電気泳動に支障をきたす。そこで電気泳動用溶液においても、縮合リン酸化合物を含有させる。また、同様の理由により、核タンパク質から遊離した塩基性ペプチドをさらなる分解に供するために、電気泳動用溶液はタンパク質分解酵素が活性である弱アルカリ性であることが好ましい。

[0078] 工程(4)の弱アルカリ性溶液に含有される縮合リン酸化合物および工程(

5) の電気泳動用溶液に含有される縮合リン酸化合物は、互いに同一のものであっても、異なるものであってもよく、さらにそれぞれ2種以上の縮合リン酸化合物であってもよいが、たとえば、二次元パルスフィールド電気泳動を実施する場合は、該弱アルカリ性溶液に含有される縮合リン酸化合物はヘキサメタリン酸塩であり、かつ、該電気泳動用溶液に含有される縮合リン酸化合物はポリリン酸塩またはヘキサメタリン酸塩であることが好ましい。

[0079] パルスフィールド電気泳動に用いる電気泳動電圧、電極の切替のタイミングおよび電気泳動時間などの電気泳動条件は、一次元パルスフィールド電気泳動の場合については特に限定されないが、二次元パルスフィールド電気泳動については、たとえば、1回目の泳動を電位差1.0～2.0 V/cmで3～5秒ごとに交互に通電して5～10分間泳動を行った後、2回目の泳動を電位差1.0～2.0 V/cmで3～5秒ごとに交互に通電して5～10分間泳動を行う。

[0080] 工程(5)の電気泳動によって伸長された核酸は、核酸染色色素などを用いて染色し、蛍光顕微鏡などで観察することができる。本発明で使用される核酸染色色素は、蛍光を発するものであれば特に限定されないが、サイバーゴールドなどが例示される。1つの細胞に含まれる核酸の切断が可視化され、顕微鏡などで観察される。

[0081] 本発明によれば、染色体を構成する二本鎖DNAがDNA繊維として観察される(例えば、図3AおよびBならびに図7)。二本鎖DNAの切断が開始されると、まず数カ所の切断が起こり、数本の糸状断片が切り出される(例えば、図4AおよびB)。切断の進行に伴い、切り出される糸状断片の増加および短縮が起こる。さらに切断が進行すると、粒子状断片が出現する(例えば、図4C)。そして、断片化がさらに進行すると、最終的には、原点(電気泳動を行う前に核酸が存在する位置)に存在する核酸量が減少し、顕微鏡下では原点の縮小として観察される。

[0082] すなわち、本発明によれば、1つの細胞に含まれる二本鎖DNAの1カ所～数カ所の切断、切り出される糸状断片の増加および短縮ならびに粒子状断片

を観察し、検出することができる。

[0083] 本発明の特徴は、(i) タンパク質分解酵素処理を行うこと、(ii) アルカリ処理を行わないこと、(iii) パルスフィールド電気泳動法を使用すること、などである。

[0084] これに対して、従来のCOMET法は、(i) タンパク質分解酵素処理を行わず、(ii) アルカリ処理を行い、(iii) 単一の電極を用いる電気泳動を行っていた。従来のCOMET法は、以下の理由から適切な結果を得られないものであった。

[0085] すなわち、(i) タンパク質分解酵素処理を行わないため、核マトリックスがDNAを保持することによって、偽陰性を生じ（例えば、図5AおよびB）、(ii) アルカリ処理を行った場合にはDNAが人工的に切断されるため、偽陽性を生じ（例えば、図6A～D）、(iii) 単一の電極を用いる電気泳動では、ゲル内において絡まった核酸をほぐし、伸長させることができなかった。

[0086] したがって、従来のCOMET法は、偽陰性と偽陽性の両方を生じるものであるため、適切な結果を得られないものであることが判明した。

[0087] 2. 本発明の核酸が切断されていない細胞を製造する方法

本発明は、核酸が切断されていない細胞を製造する方法に関する。さらに、本発明の具体的な態様は、下記(1)～(6)の工程を含む、核酸が切断されていない細胞を製造する方法に関する。本発明において、「細胞を製造する」とは、特定の細胞を取得することを意味しており、その他の表現として「細胞を作製する」、「細胞を単離する」、「細胞を抽出する」などとすることもできる。

(1) 被験試料中の1つ又は複数の細胞を、表面にアミノ基を有する支持体に配置する工程

(2) 至適pHが弱アルカリ性にある精製タンパク質分解酵素とゲル化剤を含む弱酸性溶液との混合物により前記細胞を覆う工程

(3) 前記弱酸性溶液を固化させる工程

(4) 前記弱酸性溶液を固化させた支持体を、縮合リン酸化合物と界面活性剤と還元剤とを含む弱アルカリ性溶液に浸漬させる工程

(5) 縮合リン酸化合物を含む電気泳動用溶液を用いたパルスフィールド電気泳動により、前記弱アルカリ性溶液に浸漬させた支持体上の細胞に由来する核酸を分離する工程

(6) 前記電気泳動された核酸の分離態様が、正常細胞に由来する核酸の分離態様と同程度である場合に、前記被験試料中の細胞を核酸が切断されていない細胞と判定する工程

[0088] 被験試料は細胞を含む試料であれば特に限定されず、生体由来のものであっても、天然由来のものであってもどちらでもよい。たとえば、核酸が切断されていない精子を製造したいのであれば、被験試料を精液とすることができる。

[0089] 工程(1)～(5)は、本発明の1つの細胞に含まれる核酸の切断を検出する方法と同様に実施できる。したがって、本発明においては、工程(6)について詳細に説明する。

[0090] (6) 電気泳動された核酸の分離態様が、正常細胞に由来する核酸の分離態様と同程度である場合に、被験試料中の細胞を核酸が切断されていない細胞と判定する工程

工程(6)においては、工程(5)により電気泳動された核酸の分離態様が、正常細胞に由来する核酸の分離態様と同程度である場合に、被験試料中の細胞を核酸が切断されていない細胞と判定する。

[0091] 本発明において、核酸の分離態様とは、図8の二次元パルスフィールド電気泳動の模式図(下側の図)に示すDNA断片・粒子a、b、cおよびdの存在態様をいい、これが正常細胞に由来する核酸のDNA断片・粒子a、b、cおよびdの存在態様と同程度であれば、被験試料中の細胞を核酸が切断されていない細胞と判定することができる。この判定は定性的、定量的のいずれであってもよい。定性的判定と定量的判定の例を以下に示す。ただし、以下に示す判定は、その判定基準から明らかな通り、当業者の判断によらずと

も、プログラムの、自動的または機械的に行うことができる。

[0092] 定性的判定の一例としては、工程（５）により電気泳動された核酸から分離された上記DNA断片・粒子a、b、cおよびdのそれぞれの数または総数と正常細胞に由来する核酸から分離されたものとを統計学的に比較して、その差が統計学的に有意ではない場合に、被験試料中の細胞を核酸が切断されていない細胞と判定することができる。

[0093] 定量的判定の一例としては、以下に示すように工程（５）により電気泳動された核酸から分離されたDNA断片・粒子a、b、cおよびdのそれぞれの数または総数と正常細胞に由来する核酸から分離されたものとの相関性の範囲毎に被験試料中の細胞を核酸が切断されていない細胞とする可能性（％）を予め設定しておき、被験試料中の細胞および正常細胞の核酸の分離態様から上記可能性（％）を判定する：相関性がA～Bである場合、被験試料中の細胞を核酸が切断されていない細胞と判定する可能性は１０％以下である；相関性がB～Cである場合、被験試料中の細胞を核酸が切断されていない細胞と判定する可能性は１０％～３０％である；相関性がC～Dである場合、被験試料中の細胞を核酸が切断されていない細胞と判定する可能性は３０％～５０％である；相関性がD～Eである場合、被験試料中の細胞を核酸が切断されていない細胞と判定する可能性は５０％～７０％である；相関性がE～Fである場合、被験試料中の細胞を核酸が切断されていない細胞と判定する可能性は７０％～９０％である；相関性がFより大きい場合、被験試料中の細胞を核酸が切断されていない細胞と判定する。

[0094] ただし、正常細胞においては、工程（５）の電気泳動に供したとしても、上記DNA断片・粒子a、b、cおよびdが検出できない蓋然性がある。そこで、工程（６）では、正常細胞に由来する核酸の分離態様として、上記DNA断片・粒子a、b、cおよび／またはdの数がゼロである分離態様と設定することができる。

[0095] 正常細胞とは、形態や増殖性などのフェノタイプや特定遺伝子の発現などのジェノタイプといった細胞の特性において異常が認められない細胞をいう。

また、正常細胞は、単に被験者が設定した対照細胞（コントロール細胞）であってもよい。

[0096] 3. 本発明のキット

本発明は、本発明の方法を実施するためのキットに関する。さらに、本発明の具体的な一態様は、下記（１）～（５）の成分を含む、核酸の切断を検出するための、または核酸が切断されていない細胞を製造するためのキットに関する。

- （１）表面にアミノ基を有する支持体
- （２）至適 pH が弱アルカリ性にある精製タンパク質分解酵素
- （３）ゲル化剤を含む弱酸性溶液
- （４）縮合リン酸化合物と界面活性剤と還元剤とを含む弱アルカリ性溶液
- （５）縮合リン酸化合物を含む電気泳動用溶液

[0097] 本発明のキットに含まれる上記（１）～（５）の成分は、本発明の方法において説明したものである。本発明のキットは、さらに下記（６）の成分を含むことができる。

- （６）２組または複数組の電極を有し、かつ、該２組または複数組の電極が 45°～120°の角度で交差してなる電気泳動装置

実施例

[0098] 以下、本発明について実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

[0099] 1. トリプシンの精製

市販のウシ膵臓トリプシン標品は、通常、自己消化等により活性トリプシンの含量は２割以下である。また、市販のウシ膵臓トリプシン標品は、膵臓由来であることから、不純物として DNA 分解酵素が混入している。リマ豆トリプシンインヒビター（LBTI）を固定したアフィニティークロマトグラフィーによりトリプシンの精製を行った。LBTI 固定化吸着体を充填したカラムは予め 20 mM の Tris-HCl（pH 8.3）、1.0 mM の CaCl₂ で平衡化した。トリプシン粉末を同溶液に溶解し、カラムに添加した。

0.2 M NaCl を添加した平衡化溶液を用いて、分光光度計で溶出液の 280 nm における吸収が 0.01 以下になるまで、非吸着性の不純物を洗い出した。吸着トリプシンを 2.0% 酢酸溶液 (pH 1.8) で溶出した。得られた調製品を 2.0% 酢酸溶液で希釈して、トリプシンの濃度を 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした後、凍結保存した。

[0100] 2. パルスフィールド電気泳動法 (1)

(1) 方法

ヒト精液から運動精子を精製するには、Percoll 密度勾配遠心分離法と swim up 法を組み合わせた。サイトスピン装置 (サクラ精機) を用いて、 2×10^4 細胞の精製した運動精子を、 $7 \times 7 \text{ mm}$ の範囲で、スライドグラスに塗抹した。スライドグラスの表面には、アミノ基がラベルされていた。

[0101] 溶解した 0.56% アガロース (0.1 M の酢酸ナトリウム (pH 4.7)、0.05% の Triton X-100) を 0.22 μm ミリポアフィルターで濾過し、その 540 μl と精製トリプシン 60 μl を 40°C で混合した。精子塗抹位置を中心として $2.5 \times 2.5 \text{ cm}$ の範囲で厚さ 50 μm となるように調製アガロースを包埋し、低温で 30 分間固化した。固化したゲルを、細胞溶解液 (30 mM の Tris-ポリリン酸、8.2 mM の Na ヘキサメタリン酸、0.05% の Triton X-100、5.0 mM の dithiothreitol、pH 8.1) に浸漬して 37°C、30 分間反応させた。

[0102] パルスフィールド電気泳動に用いる電気泳動槽は 90 度の角度で交差する 2 組の電極を有するものを使用した。泳動液として、30 mM の Tris-ポリリン酸 (pH 8.1) を用いた。2 組の電極の交点に細胞塗抹部位が位置するようにスライドグラスを置き、電位差 1.5 V/cm で 3 秒ごとに交互に通電して 7 分間泳動を行った。

[0103] (2) 結果

タンパク質分解酵素による細胞消化をせずに、SyberGold を添加し

た細胞溶解液に、精製した運動精子を懸濁すると、その精子頭部は数分で膨潤したが、DNA繊維は膨潤した精子頭部内に留まっていた（図1A）。一方、その懸濁液に精製トリプシン（ $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を添加すると、数十秒でDNA繊維が頭部周囲に拡散することが認められた（図1B）。このように懸濁液中においては、DNA繊維は自由拡散をするため、1つの細胞に由来するDNA繊維およびその断片を特定するのは難しい。

[0104] そこで、精製した運動精子と射精精液をアガロース包埋してトリプシンを添加して細胞溶液を行うと、精製した運動精子では、絡まりあったDNA繊維の端が周囲に突き出した状態を示した（図2A）。一方、射精精液では多様な形態が認められ、精製した運動精子において見られた形態に加え、粒子状断片が同心円状に周囲に拡散した様相を示すものが観察された（図2B）。これらは電圧を印加することなくアガロース網目構造内を自由拡散したものである。射精精液で見られた粒子状断片から、その精液中の精子はすでにDNA断片化が進行した精子である蓋然性がある。

[0105] 次に、トリプシン存在下に細胞溶解した精子をパルスフィールド電気泳動法により電気泳動を行った。精製した運動精子では、原点（電気泳動を行う前に核酸が存在する位置）から数十本の均一なDNA繊維が伸長した（図2C）。一方、射精精液では極めて多様な泳動像が観察された（図2D）。射精精液では、精製した運動精子を用いた場合に観察された伸長したDNA繊維に加えて、伸長したDNA繊維の先端から分離された糸状断片を認められるものが存在した。糸状断片の数、長さ等は精子により大きく変化した。

[0106] 図3Aは、パルスフィールド電気泳動により伸長されたDNA繊維の拡大図を表す写真であり、図3Bは、そのDNA繊維の先端部分の拡大図を表す写真である。

[0107] 泳動されたDNA繊維を高倍率で鏡検すると、パルスフィールド電気泳動法により電圧を印加したことによりDNA繊維はアガロース網目構造内をジグザグに伸長しているのが観察された。

[0108] 精製した運動精子は、DNA繊維のみが観察されるグループ（図3Aおよび

B)、およびDNA繊維に加えて、DNA繊維の先端において数本の糸状断片が認められるグループ(図4A~C)に分けられた。すなわち、本発明者は、精製した運動精子であっても、断片化の初期段階のものが存在するという驚くべき結果を見出したのである。本発明は、1つの細胞に含まれるDNAの1カ所~数カ所の切断ですら検出できるきわめて優れた感度を有するものであり、DNA切断の初期段階を検出し得るものである。

[0109] 本発明者は、精製した運動精子であっても、断片化の初期段階のものが存在することを示すために、さらに以下の実験を行った。

[0110] 精製した運動精子の断片の数を調べるために、上記で述べたように、精液($n=8$; $vol=2.5 \pm 0.62$ ml; 濃度 $=58 \pm 26 \times 10^6$ 精子/ml; 運動率 $=59 \pm 17\%$)を処理して、精製した運動精子($vol=1.0$ ml; 濃度 $=5.3 \pm 2.7 \times 10^6$ 精子/ml; 運動率 $=94 \pm 2.1\%$)を得た。次いで、得られた精製した運動精子について、上述の方法に従って、パルスフィールド電気泳動法により電気泳動を行った。断片が検出されない精製した運動精子の率は、 $58.9\% \sim 87.2\%$ ($77.7 \pm 9.47\%$)であった。全ての検体において、断片が検出されない精製した運動精子の率は、運動率と比較して、比較して有意に低かった。このことは、精製した運動精子であっても、断片化の初期段階のものが存在することを示す。

[0111] (3) 比較例

以下、上記の「本発明と従来のCOMET法との比較について」で述べたことを立証するべく、比較例を示す。

[0112] (i) トリプシンを使用しない場合の比較例

トリプシンを添加しないで細胞溶解を行うと、パルスフィールドにおける泳動像は、トリプシンを添加して細胞溶解を行ったものと比較して、全く異なったものとなった。すなわち、精製した運動精子の場合、原点(電気泳動を行う前に核酸が存在する位置)からDNA繊維が伸長しなかった(図5A)。また、射精精液の場合も、少量の粒子状断片が泳動されるのみでDNA繊維を観察することはできなかった(図5B)。これは、トリプシンを添加し

ない場合には、DNAが核マトリックスに保持された状態となるため、DNA繊維およびそれから切り出された糸状断片を電気泳動法により観察すること不可能であることを示している。

[0113] (i i) アルカリ処理を行った場合の比較例

DNAに対するアルカリ処理の影響を観察した。トリプシンを添加して細胞溶解を行った精製した運動精子を0.05または0.1モル/LのNaOH溶液に室温で10分間浸漬した後、水洗してパルスフィールド電気泳動に供した。0.05モル/LのNaOH溶液の場合には、DNAの粒子状断片のみが泳動され、DNA繊維は認められなかった(図6A)。0.1モル/LのNaOH溶液の場合には、原点(電気泳動を行う前に核酸が存在する位置)における核酸が縮小し、断片化がさらに進行していた(図6B)。

[0114] 次に、精製した運動精子について、パルスフィールド電気泳動後に0.1モル/LのNaOH溶液に浸漬すると、伸長したDNA繊維は完全に断片化していた(図6C)。一方、トリプシンを添加することなく0.1モル/LのNaOH溶液で細胞溶解を行った精製した運動精子では、少量の粒子状断片が泳動されるのみであった(図6D)。

[0115] したがって、アルカリ処理を行うCOMET法では、DNAの断片化について偽陽性が生じる可能性が大きいのに対して、アルカリ処理を行わない本発明では、アルカリ処理によってDNAが切断されることはなく、偽陽性が生じないことが期待される。

[0116] (4) 精子以外の細胞について

上記の結果は、精子を用いた場合の結果であるが、以下の理由から、精子以外の細胞においても、精子と同様に、1つの細胞に含まれる核酸の切断を検出できる。

[0117] 本発明は、ゲル内にタンパク質分解酵素を添加して、タンパク質分解酵素処理をすることによって、細胞核内DNAを、核タンパク質および核マトリックスから分離し得ることなどを特徴とするものである。精子以外の細胞においても、細胞核内DNAは、核タンパク質および／または核マトリックスに

固定されている。したがって、本発明を用いれば、精子以外の細胞においても、精子と同様に、1つの細胞に含まれる核酸の切断を検出できる。

3. パルスフィールド電気泳動法 (2)

(1) 方法

ヒト精液から運動精子を精製するには、P e r c o l l 密度勾配遠心分離法と s w i m u p 法を組み合わせた。サイトスピン装置（サクラ精機）を用いて、 2×10^4 細胞の精製した運動精子を、 7×7 mmの範囲で、スライドグラスに塗抹した。スライドグラスの表面には、アミノ基がラベルされていた。

[0118] 溶解した0.3%アガロース(0.1Mの酢酸ナトリウム(pH4.7)、0.05%のT r i t o n X-100)を $0.22 \mu\text{m}$ ミリポアフィルターで濾過し、その $540 \mu\text{l}$ と精製トリプシン $60 \mu\text{l}$ を 40°C で混合した。精子塗抹位置を中心として 2.5×2.5 cmの範囲で厚さ $50 \mu\text{m}$ となるように調製アガロースを包埋し、低温で30分間固化した。固化したゲルを、細胞溶解液(30mMのT r i s-塩酸、1.0mMのNaヘキサメタリン酸、0.05%のT r i t o n X-100、5.0mMのd i t h i o t h r e i t o l、pH8.1)に浸漬して 37°C 、30分間反応させた。

[0119] パルスフィールド電気泳動に用いる電気泳動槽は60度の角度で交差する2組の電極を有するものを使用した。泳動液として、30mMのT r i s-酢酸、1.0mMのNaヘキサメタリン酸(pH8.1)または1.0mMのT r i s-酢酸および30mMのT r i s-ポリリン酸を含む溶液(pH8.1)を用いた。2組の電極の交点に細胞塗抹部位が位置するようにスライドグラスを置き、電位差 1.5 V/cm で3秒ごとに交互に通電して7分間泳動を行った。次いで、スライドグラスを、支持体の細胞配置部分を回転中心として140度回転させて、同様に7分間泳動を行った。泳動後のスライドグラス上の細胞塗抹部位にDNA蛍光染色試薬であるサイバーゴールドを滴下してDNAを染色した。染色したDNAを蛍光顕微鏡で観察した。

[0120] (2) 結果

上述の方法に従って二次元パルスフィールド電気泳動をしたDNAの顕微鏡観察結果を図7に示す。図中の矢印は、一次元パルスフィールド電気泳動では観察し得ない長鎖DNA断片を示す。この長鎖DNA断片を観察できることにより、本二次元パルスフィールド電気泳動による核酸の分離は、一次元パルスフィールド電気泳動による核酸の分離に比べて、高感度で細胞核内DNAが断片化した細胞を検出することができることがわかった。特に、DNA断片化は、ランダムに発生することから、長鎖DNA断片を観察できなければ、細胞核内DNAが断片化しているか否かを確認できない。すなわち、DNA断片化を模式的に表した図8の下側図に示すとおり、DNA断片化の一態様として、長鎖DNA断片化（図中のd）が起こり、次いで長鎖DNA断片化により短鎖DNA断片化（同a、b）が発生し、遂にはDNA粒子化（同c）が発生するという態様が考えられる。この態様では、たとえ一次元パルスフィールド電気泳動法により短鎖DNA断片（a、b）やDNA粒子（c）が検出できなかったとしても、長鎖DNA断片（d）が検出できていないのであれば、DNA断片化の初期段階にある細胞は観察できないことになる。本二次元パルスフィールド電気泳動による核酸分離は、この一次元パルスフィールド電気泳動による核酸分離の問題点を解決するものであり、従前の一次元パルスフィールド電気泳動法では観察し得なかった長鎖DNA断片（d）を観察することを可能にしたことにより、高感度にDNA断片化の初期段階にある細胞を観察できるのである。

請求の範囲

[請求項1] 下記（１）～（５）の工程を含む、１つの細胞に含まれる核酸の切断を検出する方法。

（１）１つ又は複数の細胞を、表面にアミノ基を有する支持体に配置する工程

（２）至適pHが弱アルカリ性にある精製タンパク質分解酵素とゲル化剤を含む弱酸性溶液との混合物により前記細胞を覆う工程

（３）前記弱酸性溶液を固化させる工程

（４）前記弱酸性溶液を固化させた支持体を、縮合リン酸化合物と界面活性剤と還元剤とを含む弱アルカリ性溶液に浸漬させる工程

（５）縮合リン酸化合物を含む電気泳動用溶液を用いたパルスフィールド電気泳動により、前記弱アルカリ性溶液に浸漬させた支持体上の細胞に由来する核酸を分離する工程

[請求項2] 下記（１）～（６）の工程を含む、核酸が切断されていない細胞を製造する方法。

（１）被験試料中の１つ又は複数の細胞を、表面にアミノ基を有する支持体に配置する工程

（２）至適pHが弱アルカリ性にある精製タンパク質分解酵素とゲル化剤を含む弱酸性溶液との混合物により前記細胞を覆う工程

（３）前記弱酸性溶液を固化させる工程

（４）前記弱酸性溶液を固化させた支持体を、縮合リン酸化合物と界面活性剤と還元剤とを含む弱アルカリ性溶液に浸漬させる工程

（５）縮合リン酸化合物を含む電気泳動用溶液を用いたパルスフィールド電気泳動により、前記弱アルカリ性溶液に浸漬させた支持体上の細胞に由来する核酸を分離する工程

（６）前記電気泳動された核酸の分離態様が、正常細胞に由来する核酸の分離態様と同程度である場合に、前記被験試料中の細胞を核酸が切断されていない細胞と判定する工程

- [請求項3] 前記至適 pH が弱アルカリ性にある精製タンパク質分解酵素が、アルギニンと任意のアミノ酸とのペプチド結合及び／又はリジンと任意のアミノ酸とのペプチド結合を分解する活性を有する、請求項 1 または 2 に記載の方法。
- [請求項4] 前記至適 pH が弱アルカリ性にある精製タンパク質分解酵素が、精製トリプシン様酵素である、請求項 1 または 2 に記載の方法。
- [請求項5] 前記縮合リン酸化合物は、ポリリン酸、ヘキサメタリン酸およびそれらの塩からなる群から選ばれる少なくとも一種の縮合リン酸化合物である、請求項 1 または 2 に記載の方法。
- [請求項6] 前記パルスフィールド電気泳動は、2 組または複数組の電極を有し、かつ、該 2 組または複数組の電極が 45°～120°の角度で交差してなる電気泳動装置により達成される、請求項 1 または 2 に記載の方法。
- [請求項7] 前記パルスフィールド電気泳動は、第 1 のパルスフィールド電気泳動を行った後に、支持体を、細胞配置部分を回転中心として、60°～160°回転させて第 2 のパルスフィールド電気泳動を行うことによって達成される、請求項 1 または 2 に記載の方法。
- [請求項8] 前記細胞が精子である、請求項 1 または 2 に記載の方法。
- [請求項9] 下記 (1) ～ (5) の成分を含む、核酸の切断を検出するための、または核酸が切断されていない細胞を製造するためのキット。
- (1) 表面にアミノ基を有する支持体
 - (2) 至適 pH が弱アルカリ性にある精製タンパク質分解酵素
 - (3) ゲル化剤を含む弱酸性溶液
 - (4) 縮合リン酸化合物と界面活性剤と還元剤とを含む弱アルカリ性溶液
 - (5) 縮合リン酸化合物を含む電気泳動用溶液
- [請求項10] さらに下記 (6) の成分を含む、請求項 9 に記載のキット。
- (6) 2 組または複数組の電極を有し、かつ、該 2 組または複数組の

電極が45～120度の角度で交差してなる電気泳動装置