

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

BEFORE THE PATENT TRIAL AND APPEAL BOARD

GENEOSCOPY, INC.,
Petitioner

v.

EXACT SCIENCES CORPORATION,
Patent Owner

Case IPR2024-01330
U.S. Patent No. 11,970,746

EXHIBIT 2049

DECLARATION OF John Andrews

I, John Andrews, upon oath, hereby attest to the following:

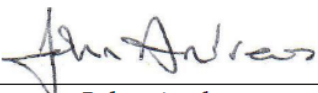
1. I am a professional translator and am certified to translate from Japanese to English.

2. I have translated the attached Japanese Unexamined Patent Application No. H5-99923 from Japanese to English.

3. I certify that, to the best of my knowledge, the attached English translation is a true and correct translation of Japanese Unexamined Patent Application No. H5-99923 from Japanese to English.

I declare under penalty of perjury that the foregoing is true and correct, and understand that willful false statements and the like are punishable by fine or imprisonment, or both pursuant to 18 U.S.C. 1001.

Date: May 30, 2025



John Andrews

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-99923

(43) 公開日 平成 5 年 (1993) 4 月 23 日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/531	B	8310-2 J		
33/50	N	7055-2 J		
33/53	K	8310-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全 4 頁)

(21) 出願番号	特願平3-292163	(71) 出願人	000003964 日東電工株式会社 大阪府茨木市下穂積 1 丁目 1 番 2 号
(22) 出願日	平成 3 年 (1991) 10 月 11 日	(72) 発明者	辻 孝 大阪府茨木市下穂積 1 丁目 1 番 2 号 日東 電工株式会社内

(54) 【発明の名称】 ヒトヘモグロビンの検出方法及びそれに用いる便溶解用緩衝液

(57) 【要約】

【目的】 糞便を含有する被検液中に存在するヒトヘモグロビンが、放置下で変性することを防止し、しかも高感度で正確にヒトヘモグロビンを検出する方法、およびこれに用いる便溶解用緩衝液を提供する。

【構成】 キレート試薬を便溶解するための緩衝液中に添加し、抗ヒトヘモグロビン抗体を用いたヒトヘモグロビンの検出を行なう。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗ヒトヘモグロビン抗体を用いたヒトヘモグロビンの検出において、キレート試薬を被検液中に添加することを特徴とするヒトヘモグロビンの検出方法。

【請求項2】 ヒトヘモグロビンの検出に用いる、キレート試薬を含有することを特徴とする、被検体を溶解するための便溶解用緩衝液。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は抗ヒトヘモグロビン抗体を用いた免疫学的なヒトヘモグロビン検出方法に関し、特に糞便を含む被検液中に存在するヒトヘモグロビンを高感度にて検出することができる方法、及びそれに用いる便溶解用緩衝液に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、大腸癌などの下部消化器の疾患を検査する方法として、消化器管からの出血に起因する糞便中の潜血成分、特にヒトヘモグロビンの検出が主に行われている。中でも、食品摂取や薬剤投与の制限を必要とし、抗ヒトヘモグロビン抗体を用いた免疫学的な検出方法が提案されている。

【0003】 このような検出方法には例えば、寒天板内での抗ヒトヘモグロビン抗体と、被検液中のヒトヘモグロビンとの沈降線を利用してヘモグロビンを検出する一次元免疫拡散法や、動物血球に抗ヒトヘモグロビン抗体を感作したものと、被検液とを混合して生じる沈降現象像を利用して検出する逆受身血球凝集法、高分子ラテックス粒子に抗ヒトヘモグロビン抗体を感作したものと、被検液を混合して生じる凝集像を利用して検出するラテックス凝集法、酵素や放射性同位元素で標識した抗ヒトヘモグロビン抗体を利用する酵素免疫法や放射免疫法などがある。

【0004】 上記検出法においては被検物質であるヒトヘモグロビンは通常、溶解液状態で検査に供され、例えば便潜血検査では糞便を生理食塩水や緩衝液中に溶解する事により、糞便中のヒトヘモグロビンを溶解液状態にして被検液として用いられている。

【0005】 ヒトヘモグロビンの構造は、例えば、ヘモグロビンAではアミノ酸141個からなる α 鎖とアミノ酸146個からなる β 鎖と呼ばれるポリペプチドが、それぞれ2個から形成してなる四量体であり、これらが立体構造で配置されている。このような構造のヒトヘモグロビンは糞便溶解液中で徐々に変性するために、従来から用いられている免疫学的方法では検出感度が著しく低下するものである。特に、被検液中の糞便濃度が高い場合には上記ヒトヘモグロビンの変性が著しく、診断上、意義のある低濃度領域での検出が困難となる。

【0006】 一方、便潜血検査では検査員の手間や不快感を少なくするために、被検者自身が自宅などで糞便中

2

に含まれるヒトヘモグロビンを溶解液状態にする場合があり、このような場合は溶解液状態で数日間放置されることが多い。また、検査員がヒトヘモグロビンを溶解液状態にした場合でも、作業の都合上、検査までに数時間放置される場合もあり、このような放置状態では前述のようにヒトヘモグロビンの変性が起こってしまい好ましくない。

【0007】 また、酵素免疫法のような検出方法を採用した場合、高温下で数分間上記溶解液をインキュベートすることがあり、やはりヒトヘモグロビンの変性によって正確な検出が困難となる。このようなヒトヘモグロビンの変性を防止する目的で、例えばウシ血清アルブミンや糖類などを添加することが行われているが、十分に効果を発揮できるものとはいえないのが実情である。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は上記従来の技術の欠点を解決するためになされたものであって、その目的とするところは糞便を含有する被検液中に存在するヒトヘモグロビンの放置下での変性を防止しながら、かつ、高感度で正確にヒトヘモグロビンを検出する方法、およびこれに用いる便溶解用緩衝液を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】 即ち、本発明は、抗ヒトヘモグロビン抗体を用いたヒトヘモグロビンの検出において、キレート試薬を被検液中に添加することを特徴とする検出方法およびこれに用いる便溶解用緩衝液に関する。

【0010】 本発明の方法において被検体としてのヒトヘモグロビンもしくはヒトヘモグロビンを含有する糞便を溶解するための液としては、例えばりん酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス-塩酸緩衝液、ほう酸緩衝液などがベース液として用いられる。緩衝液のpHは6~9、好ましくは6.5~8.5の範囲とする。緩衝液中には生理食塩濃度近傍の食塩を添加することが好ましい。また、細菌などによるヒトヘモグロビンの変性を抑制するために、0.05~0.5重量%濃度のアジ化ナトリウムなどの抗菌剤を添加することが好ましい。

【0011】 本発明の方法においては上記緩衝液中にキレート試薬を添加し、ヒトヘモグロビンの変性を抑制する。本発明にて用いるキレート試薬としては、Ethylene diamine tetraacetic acid (以下、EDTAという)や、Trans-1,2-Cyclohexanediamine-N,N',N'-tetraacetic acid, mono-hydrate、N,N-Di(hydroxyethyl)glycine、Ethylenediamine-N,N'-diacetic acid、Ethylenediamine-N,N'-dipropionic acid, dihydrochloride、Ethylenediamine-N,N',N'-TETRAKis(methylenephosphonic acid)、Glycoetherdiamine-N,N',N'-tetraacetic acid、Hexamethylenediamine-N,N',N'-tetraacetic acid、Hydroxyethyliminodiacetic acid、Iminodiacetic

acid、1,2-Diaminopropane-N,N',N'-tetraacetic acid、Nitrilotriacetic acid (以下、NTAという)、Nitrilotripropionic acid、Nitrilotris(methylenephosphonic acid)trisodium salt など、およびその金属塩を用いることができる。キレート試薬の添加量は被検液中の糞便の濃度によって適宜設定するが、糞便濃度4mg/mlの場合、0.01mmol/l以上、好ましくは0.1~50mmol/lの濃度となるように添加する。添加量が少なすぎるとヒトヘモグロビンの変性を抑制する作用が充分でなくなり好ましくなく、また多すぎると増量効果が認められず不経済であると共に、溶解しがたくなる。

【0012】本発明の方法では上記のようにしてキレート試薬を添加した緩衝液中に、被検物質であるヒトヘモグロビンもしくはヒトヘモグロビンを含有する糞便を溶解して被検液とする。具体的には、便潜血検査の場合、被検者の糞便の一定量をキレート試薬を含有する一定量の緩衝液中に溶解することにより調製することができる。

【0013】本発明の検出方法を実施するには、従来から知られている抗ヒトヘモグロビン抗体を用いた免疫学的検出方法が採用できる。

【0014】以下にラテックス凝集法を利用した検出方法について例示する。精製したヘモグロビンAを抗原としてウサギ、ヤギなどの動物に免疫したのち、採血、精製をして抗ヒトヘモグロビン抗体を得る。この抗体を中性pHでポリスチレンラテックス(粒径0.3μm)と混合して数時間吸着反応させたのち、ウシ血清アルブミンおよび食塩を含む緩衝液などで遠心分離精製を行い、抗ヒトヘモグロビン抗体感作ラテックス試薬を得る。

【0015】次に、このラテックス試薬と被検液とをガラス板上で攪拌混合し、数分後のラテックスの凝集像によって、ヒトヘモグロビンを定性的に検出することができる。

【0016】また、酵素免疫法の場合は、抗ヒトヘモグロビン抗体を感作したマイクロプレートのウェルに被検液を入れ、洗浄した後、ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼで標識した抗体を添加し、発色度合いを測定する。

【0017】

【実施例】以下に本発明の実施例を示し、さらに具体的に説明する。

【0018】実施例

0.2mmol/lグリシン、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%アジ化ナトリウム、0.9%塩化ナトリウムからなる水溶液を作製したのち、この溶液に表1中に記載のキレート試薬を濃度を変えて溶解し、1N水酸化ナトリウム水溶液にてpH8.0に調整した。

【0019】次に、5%カルボキシ化ポリスチレンラテックス10mlに1mg/mlの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド10mlを加え、20分間攪拌しながら反応させた後、0.01mol/lほう酸緩衝液(pH8.0)で2回遠心分離精製した。

【0020】このラテックス(濃度5%)10mlに、精製ヒトヘモグロビンをウサギに免疫して作製した抗ヒトヘモグロビン抗体(ウサギIgG、濃度5mg/ml)7mlを添加し、5時間ゆっくりと攪拌しながら反応させ、さらに0.1%ウシ血清アルブミンを含む0.01mol/lほう酸緩衝液(pH8.0)で3回遠心分離精製し、ラテックス濃度1%の抗ヒトヘモグロビン抗体感作ラテックス試薬を得た。

【0021】次に、前記にて調製したキレート試薬溶解溶液中にヒトヘモグロビンを濃度を変えて溶解し、さらに健常人糞便を4mg/ml濃度で溶解し、この溶液80μlと前記ラテックス試薬20μlとをウェル内で混合、攪拌して、10分後の凝集像を肉眼にて観察した。その結果を表1に示す。表1から明らかなように、高感度でヒトヘモグロビンを検出できることが判明した。

【0022】次に、前記ヒトヘモグロビン溶解液を25℃で6日間放置した後、再び前記ラテックス試薬と混合して凝集像を観察した。その結果を表2に示す。

【0023】比較例

キレート試薬を添加しなかった以外は実施例と同様にラテックス凝集反応を行い凝集像を観察した。その結果を表1および表2に併記した。

【0024】<凝集判定基準>

++：非常に強い凝集がみられた。 +：強い凝集がみられた。

±：弱い凝集がみられた。 -：凝集がみられない。

【0025】

【表1】

		キレート試薬 (mmol/ml)							比較例
		EDTA-2Na				NTA			
		0.01	0.1	1	10	0.01	0.1	1	
ヒトヘモグロビン濃度	25600	++	++	++	++	++	++	++	++
	12800	++	++	++	++	++	++	++	++
	6400	++	++	++	++	++	++	++	++
	3200	++	++	++	++	++	++	++	++
	1600	++	++	++	++	++	++	++	++
	800	++	++	++	++	++	++	++	++
	400	+	++	++	++	+	++	++	+
	200	+	+	+	+	±	+	+	±
	100	±	±	±	±	-	±	±	-
	0	-	-	-	-		-	-	-

【0026】

【表2】

		キレート試薬 (mmol/ml)							比較例
		EDTA-2Na				NTA			
		0.01	0.1	1	10	0.01	0.1	1	
ヒトヘモグロビン濃度	25600	++	++	++	++	++	++	++	++
	12800	++	++	++	++	++	++	++	++
	6400	++	++	++	++	++	++	++	++
	3200	++	++	++	++	++	++	++	++
	1600	++	++	++	++	++	++	++	+
	800	++	++	++	++	+	++	++	±
	400	+	+	++	++	±	+	++	-
	200	±	±	+	+	-	±	+	-
	100	-	±	±	±	-	-	±	-
	0	-	-	-	-	-	-	-	-

【0027】

【発明の効果】以上のように本発明の方法によれば、キレート試薬を被検液中に添加しているの、被検液中の

ヒトヘモグロビンが変性することを制御でき、その結果、被検液を長時間放置する場合でも高感度にヒトヘモグロビンを検出することができるものである。

**(12) Japanese Unexamined
Patent Application Publication
(A)**

H5-99923

(51) Int. Cl. ⁵	Identification codes	JPO file numbers	FI	Technical indications
G01N	33/531	B 8310-2J		
	33/50	N 7055-2J		
	33/53	K 8310-2J		

Request for examination Not yet requested Number of claims 2 (Total of 4 pages)

(21) Application number	Japanese Patent Application H3-292163	(71) Applicant	000003964 Nitto Denko Corporation 1-1-2 Shimohozumi, Ibaraki City, Osaka Prefecture
(22) Date of application	October 11, 1991	(72) Inventor	Takashi Tsuji c/o Nitto Denko Corporation 1-1-2 Shimohozumi, Ibaraki City, Osaka Prefecture

(54) [Title of the Invention] Method of detecting human hemoglobin and buffer solution for stool dissolution used therein

(57) [Abstract]

[Objective] To provide a method for detecting human hemoglobin accurately and sensitively, while preventing the denaturation of human hemoglobin present in a test liquid containing feces when left unattended, and a buffer solution for dissolving feces to be used therein.

[Constitution] A chelating agent is added to a buffer for dissolving stool, and human hemoglobin is detected using an anti-human hemoglobin antibody.

[Scope of Patent Claims]

[Claim 1] A method for detecting human hemoglobin using an anti-human hemoglobin antibody, characterized in that a chelating agent is added to a test liquid.

[Claim 2] A stool dissolving buffer for dissolving the test specimen, which is used for detecting human hemoglobin and is characterized in that it contains a chelating agent.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of Industrial Application] The present invention relates to an immunological method for detecting human hemoglobin using an anti-human hemoglobin antibody, and in particular to a method capable of detecting human hemoglobin present in a test liquid containing feces with high sensitivity, and a buffer solution for dissolving feces used therein.

[0002]

[Prior Art] In recent years, the main method for testing for diseases of the lower digestive tract, such as colon cancer, is the detection of occult blood components in feces caused by bleeding from the digestive tract, particularly human hemoglobin. In particular, an immunological detection method using anti-human hemoglobin antibodies has been proposed, which does not require restrictions on food intake or drug administration.

[0003] Such detection methods include, for example, one-dimensional immunodiffusion, which detects hemoglobin using the precipitation line between anti-human hemoglobin antibodies in an agar plate and human hemoglobin in the test liquid; reverse passive hemagglutination, which detects hemoglobin using the precipitation phenomenon image that occurs when animal blood cells sensitized with anti-human hemoglobin antibodies are mixed with the test liquid; latex agglutination, which detects hemoglobin using the agglutination image that occurs when polymer latex particles sensitized with anti-human hemoglobin antibodies are mixed with the test liquid; and enzyme immunoassay and radioimmunoassay, which use anti-human hemoglobin antibodies labeled with enzymes or radioisotopes.

[0004] In the above detection methods, the test substance, human hemoglobin, is usually provided in the form of a dissolved liquid. For example, in fecal occult blood tests, feces is dissolved in saline or a buffer solution to convert the human hemoglobin in the feces into a dissolved liquid, which is then used as the test liquid.

[0005] The structure of human hemoglobin, for example, is a tetramer formed by two polypeptides called alpha chains, which consist of 141 amino acids, and B chains, which consist of 146 amino acids, in hemoglobin A, which are arranged in a three-dimensional structure. Human hemoglobin with this structure gradually denatures in fecal solution, and the detection sensitivity of conventional immunological methods is significantly reduced. In particular, when the concentration of feces in the test liquid is high, the denaturation of the human hemoglobin is significant, making it difficult to detect the hemoglobin in a diagnostically significant low concentration range.

[0006] On the other hand, in fecal occult blood tests, in order to reduce the labor and discomfort of the examiner, the subject may dissolve the human hemoglobin contained in the feces at home or elsewhere, and in such cases the solution is often left for several days. Furthermore, even if the examiner puts the human hemoglobin into a dissolved state, it may be left for several hours before testing for operational reasons, and leaving it in such a state can cause denaturation of the human hemoglobin, as mentioned above, which is undesirable.

[0007] In addition, when a detection method such as enzyme immunoassay is used, the above-mentioned solution may be incubated at high temperatures for several minutes, which again makes accurate detection difficult due to denaturation of the human hemoglobin. In order to prevent this denaturation of the human hemoglobin, for example, bovine serum albumin or sugars have been added, but the reality is that these are not sufficiently effective.

[0008]

[Problems to be Solved by the Invention] The present invention has been made to solve the above-mentioned shortcomings of the conventional technology, and its purpose is to provide a method for detecting human hemoglobin accurately and with high sensitivity while preventing the denaturation of human hemoglobin present in a test liquid containing feces when left unattended, and a buffer solution for dissolving feces to be used therein.

[0009]

[Means for Solving the Problems] That is, the present invention relates to a detection method for detecting human hemoglobin using an anti-human hemoglobin antibody, characterized by adding a chelating reagent to the test liquid, and a fecal dissolution buffer used therein.

[0010] In the method of the present invention, as a liquid for dissolving human hemoglobin or feces containing human hemoglobin as a test subject, for example, a phosphate buffer, a glycine buffer, a Tris-HCl buffer, a borate buffer, or the like is used as the base liquid. The pH of the buffer should be in the range of 6 to 9, preferably 6.5 to 8.5. It is preferable to add salt to the buffer solution at a concentration close to that of physiological salt. Moreover, to inhibit the denaturation of the human hemoglobin by bacteria, etc., it is preferable to add an antibacterial agent such as sodium azide at a concentration of 0.05 to 0.5 mass%.

[0011] In the method of the present invention, a chelating agent is added to the above buffer solution to suppress the denaturation of human hemoglobin. The chelating agents used in the present invention may include ethylenediamine tetraacetic acid (hereinafter referred to as EDTA), trans-1,2-cyclohexanediamine-N,N',N'-tetraacetic acid, monohydrate, N,N-di(hydroxyethyl) glycine ethylenediamine-N,N'-diacetic acid, ethylenediamine-N,N'-dipropionic acid, dihydrochloride, ethyl enediamine-N,N,N',N'-TETRAKis (methyl enephosphonic acid), glycoetherdiamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid, hexamethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid, hydroxyethyliminodiacetic acid, iminodiacetic acid, 1,2-diaminopropane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, nitrilotriacetic

3

acid (hereinafter referred to as NTA), nitrilotripropionic acid, nitrilotris (methylenephosphonic acid) trisodium salt, or metal salts thereof. The amount of chelating agent added is set appropriately depending on the concentration of feces in the test liquid, but if the feces concentration is 4 mg/ml, the amount should be added to give a concentration of 0.01 mmol/l or more, preferably 0.1 to 50 mmol/l. If the amount added is too small, the effect of inhibiting the denaturation of human hemoglobin will be insufficient, which is undesirable, and if the amount added is too large, the effect of increasing the amount will not be observed, which is uneconomical and makes the compound difficult to dissolve.

[0012] In the method of the present invention, the test substance, human hemoglobin or feces containing human hemoglobin, is dissolved in a buffer solution to which a chelating agent has been added as described above to prepare a test liquid. Specifically, in the case of a fecal occult blood test, the test sample can be prepared by dissolving a certain amount of the subject's feces in a certain amount of buffer solution containing a chelating agent.

[0013] In order to implement detection method of the present invention, a conventionally known immunological detection method using an anti-human hemoglobin antibody can be used.

[0014] An example of a detection method using the latex agglutination method is given below. Purified hemoglobin A is used as an antigen to immunize animals such as rabbits and goats, after which blood is collected and purified to obtain anti-human hemoglobin antibodies. This antibody is mixed with polystyrene latex (particle size 0.3 μm) at neutral pH and allowed to react for several hours, after which it is centrifuged and purified using a buffer containing bovine serum albumin and salt to obtain an anti-human hemoglobin antibody-sensitized latex reagent.

[0015] Next, the latex reagent and the test liquid are mixed by stirring on a glass plate, and the human hemoglobin can be qualitatively detected based on the image of latex agglutination after a few minutes.

[0016] Further, in the case of the enzyme immunoassay, the test solution is placed in the wells of a microplate sensitized with anti-human hemoglobin antibody, and after washing, an antibody labeled with peroxidase or alkaline phosphatase is added and the degree of color development is measured.

[0017]

[Examples of Embodiment] The present invention will be described in more detail with reference to the embodiment below.

4

[0018] Examples of Embodiment

An aqueous solution consisting of 0.2 mol/l glycine, 0.1% bovine serum albumin, 0.1% sodium azide, and 0.9% sodium chloride was prepared, and the chelating agents shown in Table 1 were dissolved in varying concentrations in this solution, and the pH was adjusted to 8.0 with 1N aqueous sodium hydroxide solution.

[0019] Next, 10 ml of 1 mg/ml 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide was added to 10 ml of 5% carboxylated polystyrene latex, and the mixture was reacted for 20 minutes with stirring, after which it was centrifuged twice with 0.01 mol/l borate buffer (pH 8.0) for purification.

[0020] 7 ml of anti-human hemoglobin antibody (rabbit IgG, concentration 5 mg/ml) prepared by immunizing rabbits with purified human hemoglobin was added to 10 ml of this latex (concentration 5%), and the mixture was allowed to react for 5 hours with slow stirring. The mixture was then centrifuged and purified three times with 0.01 molar borate buffer (pH 8.0) containing 0.1% bovine serum albumin to obtain an anti-human hemoglobin antibody-sensitized latex reagent with a latex concentration of 1%.

[0021] Next, the human hemoglobin was dissolved in varying concentrations in the chelating reagent solution prepared above, and healthy human feces was further dissolved at a concentration of 4 mg/ml. 80 μl of this solution was mixed and stirred with 20 μl of the latex reagent in a well, and the agglutination image after 10 minutes was observed with the naked eye. The results are shown in Table 1. As is clear from Table 1, it was found that human hemoglobin can be detected with high sensitivity.

[0022] Next, the human hemoglobin solution was left to stand at 25°C for 6 days, and then mixed again with the latex reagent to observe the agglutination image. The results are shown in Table 2.

[0023] Comparative Example

A latex agglutination reaction was carried out in the same manner as in the Embodiment, except that no chelating agent was added, and the agglutination images were observed. The results are shown in Table 1 and Table 2.

[0024] <Aggregation criteria>

+ +: Very strong agglutination was observed. +: Strong agglutination was observed.

±: Weak aggregation was observed. -: No aggregation was observed.

[0025]

[Table 1]

5

6

		Chelating agent (mmol/ml)							Comparative Example
		EDTA-2Na				NTA			
		0.01	0.1	1	10	0.01	0.1	1	
Human hemoglobin concentration ng/ml	25600	++	++	++	++	++	++	++	++
	12800	++	++	++	++	++	++	++	++
	6400	++	++	++	++	++	++	++	++
	3200	++	++	++	++	++	++	++	++
	1600	++	++	++	++	++	++	++	++
	800	++	++	++	++	++	++	++	++
	400	+	++	++	++	+	++	++	+
	200	+	+	+	+	±	+	+	±
	100	±	±	±	±	-	±	±	-
	0	-	-	-	-		-	-	-

[0026]

[Table 2]

		Chelating reagent (mmol/ml)							Comparative Example
		EDTA-2Na				NTA			
		0.01	0.1	1	10	0.01	0.1	1	
Human hemoglobin concentration ng/ml	25600	++	++	++	++	++	++	++	++
	12800	++	++	++	++	++	++	++	++
	6400	++	++	++	++	++	++	++	++
	3200	++	++	++	++	++	++	++	++
	1600	++	++	++	++	++	++	++	+
	800	++	++	++	++	+	++	++	±
	400	+	+	++	++	±	+	++	-
	200	±	±	+	+	-	±	+	-
	100	-	±	±	±	-	-	±	-
	0	-	-	-	-	-	-	-	-

[0027]

[Effects of the Invention] As described above, according to the method of the present invention, a chelating agent is added to the test liquid, so that the denaturation of human hemoglobin

in the test liquid can be controlled. As a result, human hemoglobin can be detected with high sensitivity even if the test liquid is left to stand for a long period of time.