

明 細 書

発明の名称：

脱糖鎖化ハプトグロビンを用いたヘモグロビンの免疫学的測定方法

技術分野

[0001] 本発明は、ヘモグロビンの免疫学的測定方法に関し、特に脱糖鎖化ハプトグロビンを用いた免疫学的測定方法に関するものである。本発明はさらに、ヘモグロビンの測定値変動抑制方法、ヘモグロビンの安定化方法および安定化溶液、ヘモグロビン測定キット、並びに当該ハプトグロビン及びその製造方法にも関する。

背景技術

[0002] 糞便、尿、唾液等の検体に含まれる血液の検出は、多くの疾患の診断に有用である。例えば、糞便中の血液を検出する便潜血検査は、大腸癌の検診に利用されている。潜血を検出する方法として、糞便等の検体中の潜血に含まれるヘモグロビン（以下、Hbと表記することもある）を、抗ヘモグロビン抗体を用いて検出する免疫学的手法が知られている。

[0003] 潜血検査に供される検体は、通常、被験者によって保存溶液の入った容器に採取され、病院等の検査機関に送られる。多くの場合、検体を含有する保存溶液は、実際に検査に供されるまで数日間保管され、その間、高温下に置かれることも度々ある。ヘモグロビンは溶液中で不安定であり、高温条件下では特に変性又は分解しやすい。ヘモグロビンが変性又は分解することによりエピトープ又はその周辺部位の構造が変化すると、抗体がヘモグロビンを認識できなくなり、よって、免疫学的手法によるヘモグロビンの検出の正確性が低下する。

[0004] それゆえ、ヘモグロビンを安定化するために、検体の保存溶液にハプトグロビン（以下、Hp tと表記することもある）を添加する方法が用いられている（例えば、特許文献1及び特許文献2）。ハプトグロビンは、赤血球の溶血によって血液中に放出されたヘモグロビンを回収する役割を担うタンパ

ク質である。ハプトグロ빈はヘモグロ빈と速やかに不可逆的に結合し、安定なヘモグロ빈ーハプトグロ빈複合体（以下、Hb-Hptと表記することもある）を形成することが知られている。保存溶液等にあらかじめハプトグロ빈を添加しておくことで、検体を保存溶液等に加えた際に、検体に含まれるヘモグロ빈は、ヘモグロ빈ーハプトグロ빈複合体を形成し、安定化される。

[0005] しかしながら、ハプトグロ빈により、ヘモグロ빈の測定値に変動が認められることがあることが知られている。（特許文献1及び特許文献3）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開平10-132824公報

特許文献2：国際公開第2011/058958号

特許文献3：国際公開第2020/066722号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、上記問題に鑑みてなされたものであって、ハプトグロ빈に起因するヘモグロ빈の測定値の変動を抑制して、ヘモグロ빈を測定できる、免疫学的測定方法、ヘモグロ빈の安定化方法および安定化溶液、ヘモグロ빈の免疫学的測定キット、ならびに当該ハプトグロ빈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

[0008] 本発明者らは上記問題を解決すべく研究を行った結果、糖鎖を特定の構成としたハプトグロ빈を用いることにより、遊離ヘモグロ빈およびヘモグロ빈ーハプトグロ빈複合体の各形態に依存せず、ヘモグロ빈の測定値の変動を抑制できることを見出し、本発明を完成させた。具体的には、本発明は以下のとおりである。

[0009] [1] ヘモグロ빈の免疫学的測定方法であって：

前記ヘモグロビン及びハプトグロビンの共存下で抗ヘモグロビン抗体を用いて免疫学的に測定する工程；

を含み、

前記ハプトグロビンは、下記（１）の特性を備える：

（１） N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している；

免疫学的測定方法：

〔２〕 前記ハプトグロビンがさらに、下記（２）の特性を備える〔１〕に記載の免疫学的測定方法。

（２）前記ハプトグロビン 3. 1 pmolを含む 500 μ Lの緩衝液において、ヘモグロビン 3. 1 pmolを 37℃ 7日間保存したときの当該ヘモグロビンの残存率が 70%以上である。

〔３〕 前記特性（１）は、下記（１ a）の特性である、〔１〕又は〔２〕に記載の免疫学的測定方法：

（１ a）ペプチド-N-グリコシダーゼ（PNGase）で処理した前記ハプトグロビンにおける β 鎖の分子量と、当該処理しない前記ハプトグロビンにおける β 鎖の分子量との差が、6, 500以下である。

〔４〕 前記ハプトグロビンがN結合型糖鎖を有しない、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

〔５〕 N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失した前記ハプトグロビンに存在するN結合型糖鎖が、1残基のN-アセチルグルコサミンである、または、1残基のN-アセチルグルコサミンに1残基のフコースが結合したものである、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

〔６〕 前記ヘモグロビンが、糞便、血液、血清、血漿、尿、喀痰又は唾液に含まれる、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

〔７〕 前記抗ヘモグロビン抗体の少なくとも1種が不溶性担体に担持されている、〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

〔８〕 前記不溶性担体の不溶性粒子である、〔７〕に記載の免疫学的測定方法。

〔 9 〕 免疫凝集法である、〔 1 〕 ～ 〔 8 〕 のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

〔 1 0 〕 ヘモグロビンの免疫学的測定において、当該ヘモグロビンの測定値の変動を抑制する方法であって：

前記ヘモグロビン及びハプトグロビンの共存下で抗ヘモグロビン抗体を用いて免疫学的に測定する工程；を含み、

前記方法は、前記ハプトグロビンとして下記（ 1 ）の特性を備えるハプトグロビンを用いる：

（ 1 ） N 結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している；

ヘモグロビンの測定値変動抑制方法。

〔 1 1 〕 前記ハプトグロビンがさらに、下記（ 2 ）の特性を備える〔 1 0 〕 に記載のヘモグロビンの測定値変動抑制方法：

（ 2 ）前記ハプトグロビン 3. 1 pmol を含む 5 0 0 μ L の緩衝液において、ヘモグロビン 3. 1 pmol を 3 7 $^{\circ}$ C 7 日間保存したときの当該ヘモグロビンの残存率が 7 0 % 以上である。

〔 1 2 〕 ヘモグロビンを、下記（ 1 ）の特性を備えるハプトグロビンと共存させる工程を含む、ヘモグロビンの安定化方法：

（ 1 ） N 結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している。

〔 1 3 〕 前記ハプトグロビンは、さらに下記（ 2 ）の特性を備える、〔 1 2 〕 に記載のヘモグロビン安定化方法：

（ 2 ）前記ハプトグロビン 3. 1 pmol を含む 5 0 0 μ L の緩衝液において、ヘモグロビン 3. 1 pmol を 3 7 $^{\circ}$ C 7 日間保存したときの当該ヘモグロビンの残存率が 7 0 % 以上である。

〔 1 4 〕 前記ハプトグロビンが N 結合型糖鎖を有しない、〔 1 2 〕 又は〔 1 3 〕 に記載のヘモグロビン安定化方法。

〔 1 5 〕 N 結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失した前記ハプトグロビンに存在する N 結合型糖鎖が、 1 残基の N - アセチルグルコサミンである、または、 1 残基の N - アセチルグルコサミンに 1 残基のフコースが結合したものの

である、〔12〕又は〔13〕に記載のヘモグロビン安定化方法。

〔16〕 ハプトグロビンを含むヘモグロビン安定化溶液であって、

前記ハプトグロビンは、下記（1）の特性を備える、ヘモグロビン安定化溶液：

（1）N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している。

〔17〕 前記ハプトグロビンは、さらに下記（2）の特性を備える：

（2）前記ハプトグロビン3.1 pmolを含む500 μ Lの緩衝液において、ヘモグロビン3.1 pmolを37℃7日間保存したときの当該ヘモグロビンの残存率が70%以上である；

〔16〕に記載のヘモグロビン安定化溶液。

〔18〕 前記特性（1）は、下記（1a）の特性である、〔16〕又は〔17〕に記載のヘモグロビン安定化溶液：

（1a）ペプチド-N-グリコシダーゼ（PNGase）で処理した前記ハプトグロビンにおける β 鎖の分子量と、当該処理しない前記ハプトグロビンにおける β 鎖の分子量との差が、6,500以下である。

〔19〕 前記ハプトグロビンがN結合型糖鎖を有しない、〔16〕～〔18〕のいずれかに記載のヘモグロビン安定化溶液。

〔20〕 前記ハプトグロビンは、天然由来のハプトグロビンをペプチド-N-グリコシダーゼ（PNGase）で処理したものである、〔16〕～〔19〕のいずれかに記載のヘモグロビン安定化溶液。

〔21〕 N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失した前記ハプトグロビンに存在するN結合型糖鎖が、1残基のN-アセチルグルコサミンである、または、1残基のN-アセチルグルコサミンに1残基のフコースが結合したものである、〔16〕～〔18〕のいずれかに記載のヘモグロビン安定化溶液。

〔22〕 前記ハプトグロビンは、天然由来のハプトグロビンをエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ（ENGase）で処理したものである、〔16〕～〔18〕及び〔21〕のいずれかに記載のヘモグロビン安定化溶液。

〔23〕 前記ヘモグロビンが、糞便、血液、血清、血漿、尿、喀痰又は唾液中に含まれる、〔16〕～〔22〕のいずれかに記載のヘモグロビン安定化溶液。

〔24〕 〔16〕～〔23〕のいずれかに記載のヘモグロビン安定化溶液と；

抗ヘモグロビン抗体を含む試薬と；

を備える、ヘモグロビンを免疫学的に測定するためのキット。

〔25〕 前記抗ヘモグロビン抗体の少なくとも1種が不溶性担体に担持されている、〔24〕に記載のヘモグロビン測定キット。

〔26〕 前記不溶性担体の不溶性粒子である、〔25〕に記載のヘモグロビン測定キット。

〔27〕 前記試薬が免疫凝集法の試薬である、〔24〕～〔26〕のいずれかに記載のヘモグロビン測定キット。

〔28〕 下記（1）および（2）の特性を備えるハプトグロビン：

（1）N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している；および

（2）前記ハプトグロビン3.1 pmolを含む500 μ Lの緩衝液において、ヘモグロビン3.1 pmolを37℃7日間保存したときに、当該ヘモグロビンの残存率が70%以上である。

〔29〕 前記（1）の特性は、下記（1a）の特性である、〔28〕に記載のハプトグロビン：

（1a）ペプチド-N-グリコシダーゼ（PNGase）で処理した前記ハプトグロビンにおける β 鎖の分子量と、当該処理しない前記ハプトグロビンにおける β 鎖の分子量との差が、6,500以下である。

〔30〕 前記ハプトグロビンがN結合型糖鎖を有しない、〔28〕又は〔29〕に記載のハプトグロビン。

〔31〕 前記ハプトグロビンは、天然由来のハプトグロビンをペプチド-N-グリコシダーゼ（PNGase）で処理したものである、〔28〕～〔30〕のいずれかに記載のハプトグロビン。

〔32〕 N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失した前記ハプトグロビンに存在するN結合型糖鎖が、1残基のN-アセチルグルコサミンである、または、1残基のN-アセチルグルコサミンに1残基のフコースが結合したものである、〔28〕又は〔29〕に記載のハプトグロビン。

〔33〕 前記ハプトグロビンは、天然由来のハプトグロビンをエンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼ（EN G a s e）で処理したものである、〔28〕～〔29〕及び〔32〕のいずれかに記載のハプトグロビン。

〔34〕 N結合型糖鎖を有するハプトグロビンであって、N結合型糖鎖の糖鎖が、1残基のN-アセチルグルコサミンである、または、1残基のN-アセチルグルコサミンに1残基のフコースが結合した糖鎖のみであるハプトグロビン。

〔35〕 ハプトグロビンの製造方法であって、

天然由来のハプトグロビンを、グリコシダーゼ処理する工程を備え、

下記の（a）および（b）を満たす：

（a）前記グリコシダーゼ処理の前に、前記天然由来のハプトグロビンに90℃以上の熱ショックを与えない；

（b）前記グリコシダーゼ処理において、SDSを共存させない；

ことを特徴とするハプトグロビンの製造方法。

〔36〕 前記グリコシダーゼがペプチド-N-グリコシダーゼ（PN G a s e）である、〔35〕に記載のハプトグロビンの製造方法。

〔37〕 前記ペプチド-N-グリコシダーゼがPN G a s e Fである、〔36〕に記載のハプトグロビンの製造方法。

〔38〕 前記グリコシダーゼがエンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼ（EN G a s e）である、〔35〕に記載のハプトグロビンの製造方法。

〔39〕 前記エンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼがE n d o F 2である、〔38〕に記載のハプトグロビンの製造方法。

発明の効果

[0010] 本発明のハプトグロビンを含むヘモグロビンの保存溶液、ヘモグロビン測定キット、免疫学的測定方法及び当該ハプトグロビンによれば、ハプトグロビンに起因するヘモグロビンの測定値の変動を抑制することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1] N結合型糖鎖の模式図である。

[図2] 2型ヒトプレプロハプトグロビンのアミノ酸配列（配列番号1）を示す。図2～図5において、下線部分はN結合型糖鎖付加に特異的なコンセンサス配列を、太字はN結合型糖鎖付加を受けるアスパラギン残基を、それぞれ表す。

[図3] 1型ヒトプレプロハプトグロビンのアミノ酸配列（配列番号2）を示す。

[図4] ウマプレプロハプトグロビンのアミノ酸配列（配列番号3）を示す。

[図5] ブタプレプロハプトグロビンのアミノ酸配列（配列番号4）を示す。

[図6] 遊離ヘモグロビン（free-Hb）／ヘモグロビン－ハプトグロビン（Hb－Hp）複合体の各混合液（検体）を、参考例4で作製した免疫凝集反応測定試薬と、市販の比色測定試薬とを用いて測定した結果を表すグラフである。

[図7] ブタHp t、ウマHp tおよびヒトHp tについて脱糖鎖処理した結果を確認した電気泳動（SDS－PAGE）像を示す写真である。

[図8] ウマHp tについて脱糖鎖処理した結果を確認したMALDI－TOFマスペクトルを示す図である。

[図9] 脱糖鎖処理ウマHp t（dHp t）および未処理ウマHp tについて、還元PNGase処理による分子量の変化の有無を確認したMALDI－TOFマスペクトルを示す図である。

[図10] 各種Hp tおよびウマdHp tについて、各種濃度にて遊離Hbと複合体を形成させ、残存する遊離Hb量を測定した結果を表すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明の実施形態について説明する。

[0013] [用語]

(ヘモグロビン)

ヘモグロビンは、生体内中で赤血球中に含まれるタンパク質であり、酸素分子と結合する性質を持ち、酸素の運搬に関与している。

ヘモグロビンは、141個のアミノ酸からなる α 鎖（サブユニット）と、146個のアミノ酸からなる β 鎖（サブユニット）との2種類のサブユニットを二つずつ有する四量体構造 $[\alpha_2\beta_2]$ となっている。 α 鎖の分子量は約15,500、 β 鎖の分子量は約17,000であり、ヘモグロビン全体の分子量は、約64,500である。

[0014] (ハプトグロビン)

ハプトグロビンは、糖タンパク質の1種であり、ヘモグロビンと特異的に結合しヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を形成する。

本実施形態において用いるハプトグロビンの由来は、ヘモグロビンと複合化してヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を生成するものであれば特に限定されない。ヘモグロビンとハプトグロビンの結合の生物種特異性は低いので、幅広い生物種由来のハプトグロビンを利用することができる。検体中のヘモグロビンがヒトヘモグロビンであるときには、ヒトをはじめとして、ウマ、ブタ、サル、イヌ、ウシ等の動物に由来するハプトグロビンを利用できる。リコンビナントハプトグロビンも利用することができる。ハプトグロビンは、必ずしも高度に精製されている必要はない。

ヒトハプトグロビンには3種の血清型が存在し、1-1型、2-1型、2-2型がある。ハプトグロビンは、 α 鎖と β 鎖とから構成され、ヒトにおいては、 α 鎖が2種類（ $\alpha 1$ および $\alpha 2$ ）、 β 鎖が1種類である。

ヒト1-1型は最も単純な構造を有しており、2本の $\alpha 1$ 鎖と2本の β 鎖とから構成され、 $[\alpha 1\beta]_2$ と表記することができる。ヒト1-1型においては、 $\alpha 1$ 鎖と β 鎖との間および $\alpha 1$ 鎖どうしがS-S結合により連結されている。一方、ヒト2-1型は、 $[\alpha 1\beta]_2[\alpha 2\beta]_n$ 、 $n=0, 1, 2, \dots$ と表記することができ、ヒト2-2型は、 $[\alpha 2\beta]_m$ 、 $m=3, 4,$

5・・・と表記することができる。

[0015] ハプトグロ빈は、 β 鎖のアスパラギン残基が糖鎖（N結合型糖鎖）で修飾されていることが知られている。

分子量は、 α 1鎖が約10000、 α 2鎖が約18000、 β 鎖（糖鎖修飾されているもの）が約39000である。ハプトグロ빈全体の分子量は、例えば1-1型で約98000である。

ハプトグロ빈は、シグナル配列、 α 鎖および β 鎖を備えるプレプロハプトグロ빈として翻訳され、シグナル配列が切断除去され、さらに、 α 鎖と β 鎖と間の主鎖（ペプチド結合）が切断されるとともにジスルフィド結合が形成され、 α 鎖と β 鎖との二量体が形成され、ハプトグロ빈分子の基本構造が形成され、上記二量体が会合すると、さらに各種ハプトグロ빈分子（ $[\alpha 1 \beta]_2$ 、 $[\alpha 1 \beta]_2 [\alpha 2 \beta]_n$ 、 $[\alpha 2 \beta]_m$ 等）が形成される。

[0016] ハプトグロ빈は、他の哺乳動物や鳥類等でも知られており、例えばウマやブタ等のハプトグロ빈は、ヒト1-1型と同様の構造（すなわち、 $[\alpha \beta]_2$ ）を有することが知られている。

本実施形態で用いるハプトグロ빈は、 α 鎖と β 鎖との二量体が複数会合した、四量体以上の分子であってもよい。

[0017] （ヘモグロ빈ーハプトグロ빈複合体）

ヘモグロ빈とハプトグロ빈とが複合体を形成する際、1分子の四量体ヘモグロ빈 $[\alpha_2 \beta_2]$ は、2分子の二量体ヘモグロ빈 $[\alpha \beta]$ へと解離して、それぞれの二量体ヘモグロ빈がハプトグロ빈と結合する。ヒト1-1型ハプトグロ빈は、二量体ヘモグロ빈との結合部位を分子内に2か所（各 β 鎖に1か所ずつ）有する。そのため、ヒト1-1型ハプトグロ빈と四量体ヘモグロ빈 $[\alpha_2 \beta_2]$ とで複合体を形成すると、1分子のヒト1-1型ハプトグロ빈に、二量体ヘモグロ빈 $[\alpha \beta]$ が2つ結合した複合体となる。

ヒト2-1型や2-2型のハプトグロ빈は、分子内に2以上の β 鎖を有しており、その β 鎖の数に応じて、二量体ヘモグロ빈 $[\alpha \beta]$ と結合する

ことができる。

また、ウマやブタ等のハプトグロビンは、ヒト1-1型と同様の構造を有しており、1分子のハプトグロビンに、二量体ヘモグロビン $[\alpha\beta]$ が2つ結合した複合体を形成することができる。

なお、本明細書では、ヘモグロビンとハプトグロビンとが複合体を形成するにあたり1分子4量体のヘモグロビン $[\alpha_2\beta_2]$ が、2分子の二量体ヘモグロビン $[\alpha\beta]$ へと解離することは、ヘモグロビンの保存安定性の低下に相当するヘモグロビンの変性・分解に含まない。

[0018] (N結合型糖鎖)

N結合型糖鎖とは、タンパク質のコンセンサス配列(A s n - X - S e r / T h r : XはP r oを除く任意のアミノ酸)のアスパラギン(A s n)の側鎖のアミド窒素原子に結合する糖鎖をいう。

N結合型糖鎖は、通常、コア構造と呼ばれる基本骨格を有する。コア構造は、図1(i)に示すように、A s nのアミド窒素原子にN-アセチルグルコサミン(G l c N A c)が結合し、次いでG l c N A c、マンノース(M a n)と結合し、このマンノースにさらに2残基のマンノースが枝分かれして結合しており、すなわち2残基のG l c N A cと3残基のM a nからなる構造を有する。

[0019] 前述したハプトグロビンは、N結合型糖鎖を備えるN結合型糖タンパクであることが知られている。天然由来のハプトグロビンが有するN結合型糖鎖の例を図1の(ii)-1および(ii)-2に示す。なお、「天然由来のハプトグロビン」とは、遺伝子導入などによらずその生物が元来発現しているハプトグロビンをいう。

天然由来のハプトグロビンが有するN結合型糖鎖は、(ii)-1に示すように、上記コア構造の分岐した2残基のM a n末端に、それぞれさらにG l c N A c、ガラクトース(G a l)がこの順に付加されている。そして、当該G a lにさらにシアル酸が付加されていることが多い。

また、N結合型糖鎖に含まれるG l c N A cのうち一以上は、さらにフコ

ースによる修飾（フコシル化）を受けていることもある。(ii)－1では、N結合型糖鎖が、1残基のフコースを有するものの、どのGlcNAcに結合しているのかを特定していない態様を図示している。ただし、フコシル化を受けるGlcNAcは、典型的には、Asnに直接結合しているGlcNAcである。

[0020] 図1の(ii)－2は、上記コア構造の分岐した2残基のMan末端に、GlcNAc－Gal－（シアル酸）の糖鎖が合計3本結合しており、2残基のMan末端のどちらが2本の糖鎖と結合しているのかを特定しない態様を示している。それ以外は(ii)－1と同様である。なお、天然由来のハプトグロビンでは、GlcNAc－Gal－（シアル酸）の糖鎖が合計4本結合した態様も知られている。

[0021] 各動物種におけるプレプロハプトグロビンと、N結合型糖鎖が付加されるアスパラギンの位置を表1に示す。なお、各アミノ酸配列は、UniProt (<https://www.uniprot.org/>) で入手可能であり、本明細書に示すアクセッション番号は、いずれもUniProtのものである。

ヒトにおいては、シグナル配列－ α 1鎖－ β 鎖を含む1型ヒトハプトグロビンと、シグナル配列－ α 2鎖－ β 鎖を含む2型ヒトハプトグロビンとが知られており、これらの発現の組合せにより、上記3種の血清型（1－1型、2－1型、2－2型）となる。通常、配列番号1のアミノ酸配列を有する2型ヒトハプトグロビン（Accession No.P00738-1, 配列番号1, 図2参照）では、184位、207位、211位、241位にかかるアスパラギンが糖鎖付加される。なお、配列番号2のアミノ酸配列を有する1型ハプトグロビンは、上記2型ハプトグロビンの38位～96位に係るアミノ酸が欠失したものである（Accession No.P00738-2, 配列番号2, 図3参照）。

配列番号3のアミノ酸配列を有するウマハプトグロビン（Accession No.F6XWM5, 配列番号3, 図4参照）では、125位、148位、232位、265位にかかるアスパラギンが糖鎖付加される。

配列番号4のアミノ酸配列を有するブタハプトグロビン（Accession No.Q8

SPS7, 配列番号4, 図5参照)では、125位、151位、183位、232位にかかるアスパラギンが糖鎖付加される。

[0022] [表1]

	糖鎖数	糖鎖付加されるアスパラギンの位置				UniProt Accession No.
ウシ	2	286	316			Q2TBU0
ブタ	4	125	151	183	232	Q8SPS7
ウマ	4	125	148	232	265	F6XWM5
ヒト 1型	4	125	148	152	182	P00738-2
ヒト 2型	4	184	207	211	241	P00738-1

[0023] 後述する実施例にて示すように、ヘモグロビンは、ハプトグロビンと複合体を形成しヘモグロビン-ハプトグロビン複合体となることで、ヘモグロビン濃度の測定値に変動が生じてしまう。

これに対し、N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失しているハプトグロビンを用いることで、ヘモグロビン濃度の測定値の変動、特に低値化を抑制することができる。さらに、当該ハプトグロビンはヘモグロビンの変性・分解を抑制して、ヘモグロビンを安定化させることができる。

[0024] [脱糖鎖化ハプトグロビン]

本発明の一実施形態に係るハプトグロビンは、N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している。さらに、ヘモグロビンの保存安定性を備えることが好ましい。

[0025] (特性(1))

本実施形態のハプトグロビンは、以下の特性(1)を備える：

(1) N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している。

[0026] ここで、本実施形態において、「N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している」とは、天然由来のハプトグロビンと比べて、N結合型糖鎖の少なく

とも一部が欠失していることをいう。天然由来のハプトグロビンは、前述したようにN結合型糖鎖が付加されている。

[0027] ここで、ハプトグロビンの糖鎖の少なくとも一部が欠失していることにより、ヘモグロビンの測定値の変動が抑制される作用機序について、本発明者は以下のように考えている。

ヘモグロビンの測定は、しばしば抗ヘモグロビン抗体を用いた免疫学的測定法で行われる。正確な測定のためには、その抗体が反応するヘモグロビンのエピトープが露出した状態である必要がある。ヘモグロビンとハプトグロビンが複合体を形成した場合、ハプトグロビンのN結合型糖鎖によって、ヘモグロビンのエピトープが隠れてしまっている、もしくは抗体が結合するにあたり物理的な障害が起きている可能性がある。そのため、N結合型糖鎖の糖鎖を欠損したハプトグロビンでは、そのような障害が起きず、正確に測定ができるものと推察される。

ただし、本実施形態による効果は、上記作用機序に限定されるものではない。

[0028] あるハプトグロビンが、上記特性(1)を備えているか否かは、例えば、対象とするハプトグロビンをペプチド-N-グリコシダーゼ(PNGase)で処理し、処理したハプトグロビンと処理しないハプトグロビンとでβ鎖の分子量を比較することにより、評価することができる。

ここで、例えばヒト1-1型ハプトグロビン($[\alpha 1 \beta]_2$)は、そのβ鎖に結合したN結合型糖鎖により、分子量が約21,000増加していることが知られている。かかる分子量の増加分は、β鎖1本あたり約10,500となる。そのため、一つの目安として、例えば、PNGase処理したハプトグロビンと処理しないハプトグロビンとでβ鎖1本あたりの分子量の差が6,500以下であれば、そのハプトグロビンは特性(1)を備えているといえることができる。この場合、特性(1)は、好ましくは以下のように言い換えることができる。

(1a) ペプチド-N-グリコシダーゼ(PNGase)で処理した前記ハ

プトグロビンにおける β 鎖の分子量と、当該処理しない前記ハプトグロビンにおける β 鎖の分子量との差が、6,500以下である。

[0029] 上記分子量の差は、 β 鎖ハプトグロビンに由来するピークが複数検出された場合には、シグナル強度が最も大きいピークどうしで比較するものとする。

上記分子量の差は、6,500以下（ヒト1-1型やウマ等の $[\alpha\beta]_2$ 1分子に換算すると13,000以下）であればよいが、5,000以下（同10,000以下）であってもよく、さらには2,500（同5,000以下）であってもよく、1,550（同3,100以下）であってもよい。

なお、特性（1a）を備えているか否かの評価においては、ハプトグロビン β 鎖の分子量を評価するだけであるため、後述する方法（ハプトグロビンの製造方法）と異なり、ペプチド-N-グリコシダーゼ処理においてハプトグロビンを変性させてもよい。また、分子量の測定は、例えば、TOF MS分析により行うことができる。

[0030] 上記特性（1）に関し、「N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している」とは、ある1つのN結合型糖鎖について、そのN結合型糖鎖の一部が欠失していてもよく、そのN結合型糖鎖の全部が欠失していてもよい（すなわち、そのN結合型糖鎖を有しない）。

また、天然由来のハプトグロビンがN結合型糖鎖を複数有する場合、「N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している」とは、天然由来のハプトグロビンが有しているN結合型糖鎖のうちの少なくとも1つについて、その一部または全部が欠失していればよい。さらに、複数のN結合型糖鎖の一部または全部が欠失していてもよく、全てのN結合型糖鎖の一部または全部が欠失していてもよい。なお、全てのN結合型糖鎖の全部が欠失したハプトグロビンとは、そのハプトグロビンがN結合型糖鎖を全く有しないことを意味する。

[0031] 一方、「N結合型糖鎖のうちの一部が欠失したハプトグロビン」としては、例えば、図1の(iii)～(vi)に示すように、N結合型糖鎖の一部が欠失

したハプトグロビンが例示される。

図1の(iii)～(vi)では、残ったN結合型糖鎖に1残基のフコースが付加しているものが図示されている。ただし、残ったN結合型糖鎖におけるGlcNAc残基の数に応じて、2以上のフコースが付加されていてもよく、またはフコースが付加されていなくてもよい。

(iii) シアル酸およびGalが欠失し、コア構造にGlcNAcが付加したもの；

(iv) シアル酸、GalおよびGlcNAcが欠失し、コア構造のみが残ったもの；

(v) コア構造中の分岐した2残基のManが欠失し、2残基のGlcNAcおよび1残基のManが残ったもの；

(vi) コア構造中の3残基のManおよび1残基のGlcNAcが欠失し、1残基のGlcNAcが残ったもの）；

[0032] 本実施形態のハプトグロビンは、本実施形態の効果を効果的に発揮できる観点、また調製の容易さの観点から、複数のN結合型糖鎖の少なくとも1つを有しないもの；N結合型糖鎖を全く有しないもの；複数のN結合型糖鎖の少なくとも1つ又は全てが、1残基のN-アセチルグルコサミンであるか、1残基のN-アセチルグルコサミンに1残基のフコースが結合したもの；が好ましい。

[0033] (特性2)

本実施形態のハプトグロビンは、さらに以下の特性(2)を備えることが好ましい：

(2) 前記ハプトグロビン3.1 pmolを含む500 μ Lの緩衝液において、ヘモグロビン3.1 pmolを37℃7日間保存したときに、当該ヘモグロビンの残存率が70%以上である。

ここで、本実施形態において、「ヘモグロビンの残存率(%)」とは、

(37℃7日間保存後に測定したヘモグロビンの濃度／ヘモグロビンを緩衝液に加えた直後に測定したヘモグロビン濃度)×100として算出すること

ができる。

[0034] なお、本明細書では、上記特性（１）又は（１）及び（２）を有するハプトグロビンを「脱糖鎖化ハプトグロビン」（以下、d H p t と表記することもある）と記載することもある。

[0035] 上記特性（２）を備えるハプトグロビンは、ヘモグロビンと複合体を形成して当該ヘモグロビンを安定化できることを示す特性である。特性（２）におけるヘモグロビンの残存率は、７５％以上であることが好ましく、８０％以上であることが特に好ましい。

[0036] なお、ハプトグロビンは、各種グリコシダーゼ処理による糖鎖解析例が数多く報告されている糖タンパクの一つであるが、このような糖鎖解析においては、ハプトグロビンを含む糖タンパクを変性させたうえでグリコシダーゼ処理を行うことが一般的である。そのため、糖鎖解析に付するためにグリコシダーゼ処理されたハプトグロビンは、通常、上記特性（２）を満たさない。

[0037] 本明細書において、ハプトグロビン量は、特に断らない限り、ヒトヘモグロビンに対するモル当量が１：１となる時の物質質量を用いて表す。

前述したように、ヒトハプトグロビンは、１－１型（ $[\alpha 1 \beta]_2$ ）、２－１型（ $[\alpha 1 \beta]_2 [\alpha 2 \beta]_n$ 、 $n=0, 1, 2 \dots$ ）、２－２型（ $[\alpha 2 \beta]_m$ 、 $m=3, 4, 5 \dots$ ）が知られているが、本明細書においては、１－１型、２－１型および２－２型のいずれであっても、例えばヒト遊離ヘモグロビン１ μmol と複合体を形成することのできるハプトグロビン量を１ μmol と表す。

ハプトグロビン量を、ヒトヘモグロビンに対するモル当量が１：１となる時の物質質量を用いて表すことで、いかなる型であってもハプトグロビン量を特定することができ、またハプトグロビンが混合物中等に含まれる場合であっても定量することができる。

なお、ハプトグロビン量は、所定量のヒト遊離ヘモグロビンが全てハプトグロビンと結合して複合体となり、ヒト遊離ヘモグロビンがなくなる量として定量することができ、遊離ヘモグロビン特異的な測定試薬を用いて測定す

ることができる。具体的な測定方法は、後述する実施例にて示す。

[0038] 〔脱糖鎖化ハプトグロビンの製造方法〕

上記特性（１）又は（１）及び（２）を備えるハプトグロビンは、例えば、天然型のN結合型糖鎖を有するハプトグロビンに対してグリコシダーゼ処理を施し、N結合型糖鎖の全部又は一部をハプトグロビンから切断し、除去する方法によって、N結合型糖鎖の少なくとも一部がグリコシダーゼ処理により切断除去されたハプトグロビンとして得ることができる。また、例えば、遺伝子工学的手法により、ハプトグロビンに含まれるN結合型糖鎖付加に特異的な前記コンセンサス配列を改変し、N結合型糖鎖修飾を受けないリコンビナントハプトグロビンとしても得るようにしてもよい。

[0039] （グリコシダーゼ処理）

本実施形態において、「天然型のN結合型糖鎖を有するハプトグロビン」は、前述した天然由来のハプトグロビンと同等のN結合型糖鎖を有するハプトグロビンをいう。天然型のN結合型糖鎖を有するハプトグロビンとしては、例えば、天然由来のハプトグロビンのほか、ハプトグロビンを培養細胞（宿主細胞）で発現させたリコンビナントハプトグロビン等も利用することができる。

天然由来のハプトグロビンとしては、ヒト、ウマ、ブタ等各動物由来のハプトグロビン等を好適に用いることができる。

リコンビナントハプトグロビンとしては、例えば、補体C1rサブコンポーネント様タンパク質（C1r-LP）と共発現させて得られるリコンビナントハプトグロビン（Schaer et al. BMC Biotechnology (2018) 18:15参照）等が挙げられる。

安全性やコストの観点から、天然由来のハプトグロビンが好ましく、ヒト、ウマまたはブタに由来するハプトグロビンが特に好ましい。

[0040] ここで、特性（１）を備えるハプトグロビンのうち、複数のN結合型糖鎖の少なくとも１つを有しないハプトグロビン（例えば、N結合型糖鎖を全く有しないハプトグロビン）を得る場合、用いるグリコシダーゼとしては、特

に限定されるものではないが、ペプチド-N-グリコシダーゼ (P N G a s e) が挙げられる。ペプチド-N-グリコシダーゼは、窒素原子と糖とのグリコシド結合を切断する酵素であり、N結合型糖鎖においてはG l c N A c 残基とアスパラギン残基との結合を切断する。ペプチド-N-グリコシダーゼとしては、例えばP N G a s e Fを例示することができる。

[0041] また、少なくとも1つのN結合型糖鎖のうちの一部が欠失したハプトグロビンを得る場合、特に限定されるものではないが、用いることのできるグリコシダーゼと、それにより得られる一部が欠失したN結合型糖鎖とは、それぞれ以下に例示するとおりである。

- ・シアリダーゼおよび β -ガラクトシダーゼ： シアル酸およびG a l が欠失し、コア構造にG l c N A c が付加したもの (図1の (iii)) ；
- ・さらに、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (例えば β - (1-2, 3, 4, 6) -N-グルコシルアミニダーゼ) ： シアル酸、G a l およびG l c N A c が欠失し、コア構造のみが残ったもの (図1の (iv)) ；
- ・さらに、 α -マンノシダーゼ (例えば α - (1-2, 3, 6) -マンノシダーゼ) ： コア構造中の分岐した2残基のM a n が欠失し、2残基のG l c N A c および1残基のM a n が残ったもの (図1の (v)) ；
- ・エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (E N G a s e) ： コア構造中の3残基のM a n および1残基のG l c N A c が欠失し、1残基のG l c N A c が残ったもの (図1の (vi)) ；

なお、前述したとおり、図1の (iii) ~ (vi) では、残ったN結合型糖鎖に1残基のフコースが付加しているものが図示されているが、2以上のフコースが付加されていてもよく、またはフコースが付加されていなくてもよい。

[0042] 上述したグリコシダーゼのうち、シアリダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β - (1-2, 3, 4, 6) -N-グルコシルアミニダーゼ、および α - (1-2, 3, 6) -マンノシダーゼとしては、エキソグリコシダーゼのものが知られている。これらを用いる場合は、上掲の順序に沿ってグリコシダー

ぜを処理することで、所望のN結合型糖鎖を得ることができる。上掲の順序に沿う限りにおいては、グリコシダーゼを逐次的に処理してもよく、いくつかまたは全てのグリコシダーゼを同時に処理してもよい。

一方、エンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (ENCase) は、GlcNAcどうしの β 1-4結合を切断するエンドグリコシダーゼであり、N結合型糖鎖においては、コア構造中の上記結合が切断される。エンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼとしては、特に限定されるものではないが、例えばEndoS、EndoF3、EndoF2、EndoM、EndoOm、EndoCC等が挙げられる。

[0043] 前述したグリコシダーゼは、New England Biolabs社、Ludger社等より市販されている。

[0044] また、本実施形態の脱糖鎖化ハプトグロビンは、特性(1)に加え、好ましい態様として、特性(2)を備えている。かかる特性(2)を備えるハプトグロビンを得るためには、グリコシダーゼ処理にあたり、ハプトグロビンを変性させないことが好ましい。

より具体的には、天然型のN結合型糖鎖を有するハプトグロビン（好ましくは天然由来のハプトグロビン）を、グリコシダーゼ処理する工程を備え、下記の(a)および(b)を満たす：

(a) 前記グリコシダーゼ処理の前に、前記天然由来のハプトグロビンに90℃以上の熱ショックを与えない；

(b) 前記グリコシダーゼ処理において、SDSを共存させない；
ことが好ましい。

[0045] 前述したとおり、ハプトグロビンを含む糖タンパクの糖鎖解析においては、ハプトグロビンを含む糖タンパクを変性させたうえでグリコシダーゼ処理を行うことが一般的である。その理由は、糖タンパクを変性させることで、グリコシダーゼが糖鎖へアクセスしやすくなり、反応効率が上がるからであると考えられる。しかし、特性(2)を備える脱糖鎖化ハプトグロビンを製造する場合には、変性させる処理、具体的には上記(a)および(b)の処

理は、行わないことが好ましい。

[0046] (遺伝子工学的手法)

遺伝子工学的手法によりN結合型糖鎖を欠失させる方法としては、N結合型糖鎖付加に特異的なコンセンサス配列を改変することにより、N結合型糖鎖修飾を受けないリコンビナントハプトグロビンを宿主細胞において発現させる方法が挙げられる。

コンセンサス配列を改変する前のハプトグロビンは、公知のハプトグロビンのアミノ酸配列、例えば、配列番号1～4のいずれか一つと同一または80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有するものであってよい。

[0047] コンセンサス配列 (A s n - X - S e r / T h r : XはP r oを除く任意のアミノ酸) の改変は、具体的には、コンセンサス配列内のA s n、またはS e r / T h rを他のアミノ酸に置換する；コンセンサス配列内のいずれか1以上のアミノ酸を欠損させる；コンセンサス配列内に任意の1以上のアミノ酸を挿入する；方法が例示される。コンセンサス配列の改変（置換、欠損または挿入）は、従来公知の遺伝子工学的手法またはそれに準じた方法を適宜採用することができる。ハプトグロビンが複数のコンセンサス配列を有する場合、少なくとも1以上のコンセンサス配列を改変すればよいが、2以上のコンセンサス配列を改変することが好ましく、全てのコンセンサス配列を改変することがより好ましい。

[0048] 以上のようにして得られた改変ハプトグロビン遺伝子を、宿主細胞において発現させる方法および精製する方法は、従来公知の方法またはそれに準じた方法を適宜採用することができる。

[0049] [ヘモグロビンの安定化方法、安定化溶液]

本発明の一実施形態に係る、ヘモグロビンの安定化方法は、ヘモグロビンを、上記の脱糖鎖化ハプトグロビンと共存させる工程を含むものである。

また、本発明の一実施形態に係る、ヘモグロビン安定化溶液は、上記の脱糖鎖化ハプトグロビンを含むものである。

[0050] 具体的には、本実施形態で用いるハプトグロビン（脱糖鎖化ハプトグロビン）は、下記（１）の特性を備える：

（１）Ｎ結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している。

上記特性（１）は、好ましくは以下のように言い換えることができる。

（１a）ペプチド－Ｎ－グリコシダーゼ（PNGase）で処理した前記ハプトグロビンにおけるβ鎖の分子量と、当該処理しない前記ハプトグロビンにおけるβ鎖の分子量との差が、6,500以下である。

[0051] また、本実施形態で用いるハプトグロビンは、さらに下記（２）の特性を備えることが好ましい：

（２）前記ハプトグロビン3.1 pmolを含む500 μLの緩衝液において、ヘモグロビン3.1 pmolを37℃7日間保存したときの当該ヘモグロビンの残存率が70%以上である。

[0052] 本明細書において、ヘモグロビンと脱糖鎖化ハプトグロビンとが「共存する」とは、ヘモグロビンと脱糖鎖化ハプトグロビンとが複合体（ヘモグロビン－ハプトグロビン複合体）を形成している状態を包含する。

ヘモグロビンを脱糖鎖化ハプトグロビンと共存させる方法は特に限定されないが、例えば、脱糖鎖化ハプトグロビンを含む溶液（すなわち、安定化溶液）中に、ヘモグロビンを分散させる方法が挙げられる。ここで、「分散」には溶解および懸濁が含まれる。

ヘモグロビン安定化溶液としては、ヘモグロビンを保存するための保存用溶液、ヘモグロビンを保存溶液に分散させた試料をさらに希釈するための希釈用溶液、ヘモグロビンを検出するためのキット等における反応溶液などが挙げられる。ヘモグロビン安定化溶液は自動分析装置の校正又は精度管理に使用するキャリブレーション又はコントロールとして用いることもできる。

安定化の対象となるヘモグロビンは、血液、血清、血漿、尿、喀痰、リンパ液、刺液、髄液、汗、唾液、胃液、肺洗浄液、糞便等の、生体に由来する検体に含まれるものであってもよい。

[0053] ヘモグロビン安定化溶液中の脱糖鎖化ハプトグロビンの濃度は、特に限定

されないが、例えば、0.005～500 pmol/mL、0.05～250 pmol/mL、0.5～50 pmol/mLとすることができる。

[0054] ヘモグロビン安定化溶液は、pHを5～10、好ましくは6～8に保てる緩衝液であればよく、2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)、ヒドロキシエチルピペラジン-2-エタンスルホン酸(HEPES)、ピペラジーン-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)等のグッド緩衝液を含む緩衝液であってよく、リン酸緩衝液、トリス緩衝液またはグリシン緩衝液であってもよい。

[0055] 本実施形態に係るヘモグロビン安定化溶液は、上記脱糖鎖化ハプトグロビンを含むほか、ヘモグロビンの安定化に許容されるその他の成分を含有してもよい。このような成分として、例えば、抗菌剤、pH調整剤、イオン強度を調節するために塩類、界面活性剤、凝集促進剤、蛋白質の保存時に使用される公知の安定化剤等の添加剤が挙げられる。抗菌剤は、アジ化ナトリウム、抗生物質、溶菌酵素を含む。添加剤としては、ヒスチジン、リジン等のアミノ酸、アルブミン、プロテアーゼ阻害剤、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)等のキレート剤など、蛋白質を安定化する作用を持つことが知られている公知の物質が含まれる。

[0056] [ヘモグロビンの免疫学的測定方法]

本発明の一実施形態に係る、ヘモグロビンの免疫学的測定方法は：
ヘモグロビン及び上記の脱糖鎖化ハプトグロビンの共存下で抗ヘモグロビン抗体を用いて免疫学的に測定する工程；
を含む。

ヘモグロビンを脱糖鎖化ハプトグロビンと共存させる方法は特に限定されず、例えば、前述した安定化方法および安定化溶液で述べた方法を採用することができる。

[0057] 具体的には、本実施形態で用いるハプトグロビン(脱糖鎖化ハプトグロビン)は、下記(1)の特性を備える：

(1) N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している。

上記特性（１）は、好ましくは以下のように言い換えることができる。

（１ a）ペプチド-N-グリコシダーゼ（PNGase）で処理した前記ハプトグロビンにおけるβ鎖の分子量と、当該処理しない前記ハプトグロビンにおけるβ鎖の分子量との差が、6,500以下である。

[0058] また、本実施形態で用いるハプトグロビンは、さらに下記（２）の特性を備えることが好ましい：

（２）前記ハプトグロビン3.1 pmolを含む500 μLの緩衝液において、ヘモグロビン3.1 pmolを37℃7日間保存したときの当該ヘモグロビンの残存率が70%以上である。

[0059] （免疫学的測定方法）

本実施形態のヘモグロビンの免疫学的測定方法は、抗原抗体反応を利用する方法、すなわち免疫学的手法であれば特に限定されず、例えば、免疫比濁法、免疫比濁法等による免疫凝集法（例えば、ラテックス凝集法、金コロイド凝集法等）、例えば、ELISA法や生物発光酵素免疫測定法などの酵素免疫測定法（EIA法）、放射免疫測定法（RIA）、化学発光免疫測定法（CLIA法）、電気化学発光免疫測定法（ECLIA法）、蛍光免疫測定法、イムノクロマトグラフ法、ウエスタンブロット法、イムノブロット法が挙げられるが、これらに制限されない。本実施形態の測定方法は、これらの中でも免疫凝集法、より好ましくはラテックス凝集法に好適に用いられる。

[0060] （抗ヘモグロビン抗体）

本実施形態で使用し得る抗ヘモグロビン抗体の種類は特に限定されない。例えば、抗体が由来する動物種は特に限定されず、例えば、ウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ウマ、ヒツジ等の動物に由来する抗体が挙げられ、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、またはそれらの断片〔例えば、F（ab'）₂、Fab、Fab'、またはFv〕のいずれを用いてもよい。これらは、公知の方法により得ることができ、例えば、ポリクローナル抗体は、測定対象物を免疫した動物の血清から得られ、モノクローナル抗体は、測定

対象物を免疫した動物の脾臓又はリンパ節をミエローマ細胞と細胞融合して得られる。

[0061] (不溶性担体)

本実施形態で用いる抗ヘモグロビン抗体は、それらの少なくとも1種が不溶性担体に担持されていてもよく、2種以上が不溶性担体に担持されていてもよい。

かかる不溶性担体は、抗体を担持できるものであれば特に限定されず、前述した免疫学的測定法の種類に応じて適宜選択することができる。例えば、不溶性担体としては、例えば、免疫学的手法に使用できるプレートや多孔性メンブレンの他、不溶性粒子が挙げられ、不溶性粒子としては、一般的に使用される金コロイド粒子等の金属コロイド粒子、ラテックス粒子、シリカ粒子、磁性粒子、蛍光粒子、赤血球等が挙げられる。不溶性粒子としては、ラテックス粒子が好ましく、ポリスチレン系ラテックス粒子がさらに好ましい。不溶性担体は、好ましくは粒子状であり、その平均粒子径としては5～1,000nmが好ましく、30～500nmがより好ましく、75～350nmがさらに好ましいが、特にこの範囲に捉われることなく、使用することが可能である。

[0062] 抗体を担持しているとは、抗体が不溶性担体の表面に物理吸着または化学結合していることによって固定化されることをいう。担持方法（固定化方法）としては、例えば、公知の技術である、抗体と不溶性担体粒子とを混合して、不溶性担体粒子の表面に抗体を物理的に吸着させることにより不溶性担体粒子への抗体の固定化が可能である。また、表面にアミノ基やカルボキシル基を導入した不溶性担体粒子を用いる場合には、グルタルアルデヒドやカルボキシイミド試薬を用いた化学結合によって不溶性担体粒子の表面への抗体の固定化が可能である。

抗体の担持量は、特に限定されないが、0.5～2,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ラテックスであればよく、1～1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ラテックス、または2～500 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ラテックスであってもよい。抗体の担持量は、不溶性担体に固定化する前の

抗体量から固定化した後の抗体量を引いた量で算出することができる。

[0063] また、不溶性担体に2種以上の抗ヘモグロビン抗体が担持されている場合、ともに同じ不溶性担体に担持されてもよい。また、1種の不溶性担体に1種の抗ヘモグロビン抗体を担持させた不溶性担体を複数種混合して用いてもよい。この場合において、異なる種の抗ヘモグロビン抗体を担持するために用いられる不溶性担体は、同種の不溶性担体であってもよく、材質または粒径等が異なる異種の不溶性担体であってもよい。

[0064] (測定対象)

本実施形態の免疫学的測定方法が適用される測定対象は、ヘモグロビンを含み得るものであれば、特に限定されない。かかる測定対象としては、血液、血清、血漿、尿、喀痰、リンパ液、刺液、髄液、汗、唾液、胃液、肺洗浄液、糞便等の、生体に由来する検体；これらの検体を希釈又は懸濁した試料；などが挙げられる。

これらの中でも、糞便、血液、血清、血漿、唾液、尿、喀痰は、ヘモグロビンを含む測定対象として好適である。

本実施形態のハプトグロビンは、ハプトグロビンに起因するヘモグロビンの測定値の変動、特に低値化を抑制することができ、さらに、当該ハプトグロビンはヘモグロビンの変性・分解を抑制することもできるため、特にヘモグロビンの変性・分解が著しい糞便検体中のヘモグロビンを測定対象とすることが好ましい。

[0065] (測定)

免疫学的に測定する工程は、公知の免疫学的測定を適宜採用することができる。測定する指標は、採用した免疫学的手法に応じて適宜設定することができる。例えば、免疫凝集法であれば、所定時間における濁度変化量、ELISA法であれば標識化抗体の標識に起因して生じる発色・吸光量等が挙げられる。そのため、これらを測定する方法も、公知の方法、例えば光学的手法を採用することができ、汎用の光学的測定装置を用いることができる。

[0066] ヘモグロビンの免疫学的測定は、一例として、次のように行うことができ

る。まず、保存溶液の入った容器に検体を添加し、試料とする。容器内で検体を任意の時間保存してもよく、また検体を含有する保存溶液をろ過して試料としてもよい。次いで、試料中のヘモグロビンを、免疫学的測定方法、例えばラテックス凝集法により検出する。より具体的には、抗ヘモグロビン抗体を表面に担持させたラテックス粒子を含む試薬を、試料に加える。ラテックス粒子を含む試薬を加える前に、試料を希釈液により希釈してもよく、また反応溶液を添加してもよい。本態様において、脱糖鎖化ハプトグロビンを含む上述した安定化溶液は、保存溶液、希釈液、反応溶液のいずれであってもよい。保存溶液が、上述した安定化溶液であると、特に好ましく、この場合において、希釈液および／または反応溶液は、脱糖鎖化ハプトグロビンを含んでも含まなくてもよい。

[0067] 試料中にヘモグロビンが存在する場合、抗ヘモグロビン抗体がヘモグロビンを認識し、抗体を担持しているラテックス粒子が凝集する。凝集による濁度の変化を測定し、濃度既知のヘモグロビンおよび／またはヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を含むキャリブレーション用試薬を用いて作成した検量線により、試料中のヘモグロビン濃度を求める。また、キャリブレーション用試薬のヘモグロビンの濃度に基づいて作成した検量線により、試料中のヘモグロビンの濃度を求めることもできる。

[0068] 上記実施形態に係る免疫学的測定方法は、上記の脱糖鎖化ハプトグロビンとの共存下で、抗ヘモグロビン抗体を用いてヘモグロビンを測定するための抗原抗体反応を行うことにより、ハプトグロビンに起因する、ヘモグロビンの測定値の変動、特に偽低値を抑制することができる（本発明の一実施形態に係るヘモグロビンの測定値変動抑制方法に該当）。

[0069] [ヘモグロビン測定キット]

本発明の一実施形態に係る、ヘモグロビンを免疫学的に測定するためのキットは、上記の脱糖鎖化ハプトグロビンを含むヘモグロビン安定化溶液と；抗ヘモグロビン抗体を含む試薬を備える。

本実施形態で用いるヘモグロビン安定化溶液は、前述した安定化溶液を用

いることができる。

[0070] 具体的には、本実施形態で用いるハプトグロビンは、下記（１）の特性を備える：

（１）N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している。

上記特性（１）は、好ましくは以下のように言い換えることができる。

（１a）ペプチド-N-グリコシダーゼ（PNGase）で処理した前記ハプトグロビンにおけるβ鎖の分子量と、当該処理しない前記ハプトグロビンにおけるβ鎖の分子量との差が、6,500以下である。

[0071] また、本実施形態で用いるハプトグロビンは、さらに下記（２）の特性を備えることが好ましい：

（２）前記ハプトグロビン3.1 pmolを含む500 μLの緩衝液において、ヘモグロビン3.1 pmolを37℃7日間保存したときの当該ヘモグロビンの残存率が70%以上である。

[0072] （試薬）

本実施形態で用いる試薬は、抗ヘモグロビン抗体を含み、ヘモグロビンを免疫学的に測定することのできる試薬であれば、特に限定されない。前述した抗原抗体反応を利用する方法、例えば、免疫凝集法（例えば、ラテックス凝集法、金コロイド凝集法等）、ELISA法、イムノクロマトグラフ法等を利用した試薬とすることができる。これらの中でも、免疫凝集法の試薬であることが好ましく、ラテックス凝集法の試薬であることがより好ましい。

[0073] 本実施形態で用いる抗ヘモグロビン抗体は、前述した免疫学的測定方法において説明した抗体を用いることができる。

また、抗ヘモグロビン抗体は、それらの少なくとも1種が不溶性担体に担持されていてもよく、2種以上が不溶性担体に担持されていてもよい。かかる不溶性担体は、不溶性粒子であってよい。不溶性担体や不溶性粒子の種類、抗体の担持方法等については、前述した免疫学的測定方法で説明したとおりである。

[0074] （試薬の構成例）

本実施形態の測定試薬は、例えば、不溶性担体を含有しない試薬（第1試薬）および抗体を担持する不溶性担体（抗体担持不溶性担体）を含有する試薬（第2試薬）の二試薬系で構成されてもよく、抗体担持不溶性担体を含有する試薬のみの一試薬系で構成されるようにしてもよい。

ここで、第1試薬は、反応系における測定対象物や夾雑物の濃度の調整や反応速度の調整等の点から希釈液として用いるなど、測定環境を調整するよう利用することができる。第2試薬は、抗体担持不溶性担体を含有しており、第1試薬および試料と混合されて、免疫凝集反応を生じる。第1試薬および第2試薬は、pH緩衝剤、塩、界面活性剤、凝集促進剤、防腐剤などを、適宜含むことができる。凝集反応時のpHとしては5～9が好ましい。

[0075] また、測定試薬は試料と混合して反応液を得るが、不溶性担体の反応液中の濃度は、使用する不溶性担体の粒径や測定系全体の設計にあわせ、例えば0.0001mg/mL～10mg/mLの範囲から適宜選択をすることができる。測定試薬における抗ヘモグロビン抗体を担持する不溶性担体の濃度は、0.01～5mg/mL、または0.05～1mg/mLであってよい。なお、不溶性担体の第2試薬中の濃度は、使用時には第1試薬や試料等と混合することにより希釈されるため、その第2試薬中の不溶性担体の濃度は、希釈倍率に応じて適宜選択することができ、例えば、2倍希釈して用いる場合は、0.0002～20mg/mL、3倍希釈して用いる場合は、0.0003～30mg/mLとなるように適宜調整することができる。

[0076] （そのほかの構成）

本実施形態に係るヘモグロビン測定キットは、上記安定化溶液および測定試薬に加えて、キャリブレーション、およびコントロールなどの構成を含んでもよく、また、検体を採取するための器具および容器などの構成を含んでもよい。さらに、使用するための使用説明および／またはヘモグロビン陽性・陰性を判断するための参考となる基準値の範囲（基準範囲）等が記載された説明書などの添付文書（例えば紙もしくはプラスチック等に印刷してキット内に包含する形態、またはインターネットを介して閲覧もしくはダウンロード

ードする形態等)を含んでいてもよい。

[0077] 以上説明した実施形態は、本発明の理解を容易にするために記載されたものであって、本発明を限定するために記載されたものではない。したがって、上記実施形態に開示された各要素は、本発明の技術的範囲に属する全ての設計変更や均等物をも含む趣旨である。

[0078] [参考例]

なお、後述する実施例において用いた遊離ヘモグロビン測定試薬は、下記の参考例に沿って得たものである。

[0079] 参考例 1 : 抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体の作製

(1) マウスへの免疫

マウスに対してヘモグロビンで免疫した。各々の免疫後に、マウスの抗体価は、 ^{125}I で標識したヘモグロビンを用いた2抗体法のRIA法で測定した。その結果、高い抗血清価が得られたマウスを選択した。

(2) 細胞融合

選択したマウスより脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。調製した脾細胞とマウスミエローマ細胞とを電気融合法にて細胞融合を行い、融合細胞選択培地に懸濁して96穴マイクロプレートに播種した。

(3) モノクローナル抗体産生細胞株のスクリーニング

細胞融合の10日後に、 ^{125}I で標識したヘモグロビンを用いた2抗体法のRIA法で、抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体産生細胞をスクリーニングし、10クローンを得た。

[0080] 参考例 2 : 抗ヘモグロビン抗体の特異性確認

ヒトO型血液より精製したヒトヘモグロビン(栄研化学社製)を、電気泳動用ポリアクリルアミドプレキャストゲル(ATT0社製)およびAE-6530ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽(ATT0社製)を用いて泳動した。泳動したタンパク質を、トランスブロットSDセル(Bio-Rad社製)を用いてPVD F膜へ転写した。

一次抗体として参考例1で得られた抗体($1\text{ }\mu\text{g/mL}$)、二次抗体としてH

R Pで標識した抗マウス I g G抗体認識抗体（ウサギ由来ポリクローナル抗体、Cappel社製）を用いてウエスタンブロットを実施し、Western Lightning ECL Pro（PerkinElmer社製）を用いてH R Pを発光させ、バンド画像を取得した。バンド画像を、CS Analyzer ver.3.0（ATTO社製）を用いて解析し、計測モード：指定領域ゾーンデンストメトリーにて、泳動レーンのバンド輝度を積算値として算出した。

次に、ウエスタンブロットのバンド輝度より α 鎖、 β 鎖のバンド輝度積算値を求めた。なお、バンド輝度の補正のため、後述する方法により算出した係数0.783を α 鎖のバンド積算値に乗じた。

α 鎖積算値＋ β 鎖積算値を100%とした場合の各サブユニットのバンド輝度割合を求めた。この結果より、 α 鎖バンドの積算値割合が75%以上を示した抗体をヘモグロビン α 鎖特異的抗体、 β 鎖バンドの積算値割合が75%以上を示した抗体をヘモグロビン β 鎖特異的抗体と判断した。結果を表2に示す。

[0081] なお、バンド輝度を補正するため、ヒトヘモグロビンを、電気泳動用ポリアクリルアミドプレキャストゲル（ATTO社製）およびA E－6 5 3 0ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽（ATTO社製）を用いて上記と同様に泳動し、C B B染色を行った。得られた泳動画像の α 鎖、 β 鎖のバンド輝度の積算値を算出し、 α 鎖積算値＋ β 鎖積算値を100%とした場合の各サブユニットのバンド輝度割合を求めた。この結果より、 β 鎖と α 鎖のバンド輝度は43.9%：56.1%であり、バンド輝度のノーマライズのため、 α 鎖のバンド積算値に係数0.783をかけることとした。

[0082]

[表2]

サンプル	抗体名	認識部位	積算値		割合	
			β	α (補正後)	β	α
1	No.4	β	18732	438	97.7%	2.3%
2	No.11	β	160859	0	100.0%	0.0%
3	No.16	α	434	3180	12.0%	88.0%
4	No.8	α	465	2913	13.8%	86.2%
5	No.1	α	992	9466	9.5%	90.5%
6	No.12	α	312	1038	23.1%	76.9%
7	No.21	β	24696	362	98.6%	1.4%
8	No.23	β	9750	352	96.5%	3.5%
9	No.24	β	1118	122	90.2%	9.8%
10	No.32	β	6111	197	96.9%	3.1%

[0083] 表2に示すように、参考例1で得られた抗体のうち、No. 1、8、12および16は、 α 鎖積算値と β 鎖積算値との合計に対し、 α 鎖積算値の割合が75%以上であったことから、 α 鎖特異的抗体であると認められた。

これらに対し、No. 4、11、21、23、24および32は、 α 鎖積算値と β 鎖積算値との合計に対し、 β 鎖積算値の割合が75%以上であったことから、 β 鎖特異的抗体であると認められた。

[0084] 参考例3：モノクローナル抗体の反応性

参考例1で得られた抗体を用い、遊離ヘモグロビンに対する反応性と、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体に対する反応性とを評価した。以下に述べる方法により、各々の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体をポリスチレンラテックス粒子に固定化し、ヘモグロビンまたはヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を含む試料と反応させたときの凝集の度合いを比較した。

[0085] (1) モノクローナル抗体のポリスチレンラテックス粒子への固定化

ポリスチレンラテックス粒子への抗体の固定化は、公知の技術を利用して実施した。各抗ヘモグロビンモノクローナル抗体とポリスチレンラテックス

粒子（粒径200nm）を混合してそれぞれ固定化し、ポリスチレンラテックス粒子表面に抗ヘモグロビンモノクローナル抗体を担持することにより、抗体担持ポリスチレンラテックス粒子溶液を調製した。

[0086] （2）試料の調製

ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体の試料は、50mM HEPES緩衝液（pH7.4）に32.3pmol/mLのヘモグロビンと、それと等モルの32.3pmol/mLのハプトグロビンを等流量で混和して調製した。ヘモグロビンのみの試料は、50mM HEPES緩衝液（pH7.4）に16.1pmol/mLのヘモグロビンを含むものを使用した。

[0087] （3）ラテックス凝集の測定方法

96穴平底マイクロプレートのウェルを用いて凝集反応を行なった。具体的な方法は、50mM HEPES緩衝液（pH7.4）をマイクロプレートの各ウェルに100μL分注し、各々の抗体を固定化したポリスチレンラテックス粒子溶液を50μL添加した後に、（2）で調製した試料を30μL添加した。吸光マイクロプレートリーダー（テカンジャパン社）を用いて試料の添加10秒後および5分10秒後に波長660nmで吸光度を測定し、その差を凝集の指標とした。さらに、ヘモグロビンに対する凝集反応性と、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体に対する凝集反応性との比を求めた。

結果を表3に示す。

[0088]

[表3]

モノクローナル抗体の 組み合わせ		ヘモグロビン ($\Delta OD \times 10,000$)	ヘモグロビン -ハプトグロビン複合体 ($\Delta OD \times 10,000$)	比
No.1	No.32	1790	30	1.68%
No.8	No.4	1380	50	3.62%
No.8	No.21	1080	0	0.00%
No.8	No.23	540	0	0.00%
No.8	No.24	680	0	0.00%
No.8	No.32	580	0	0.00%
No.16	No.4	2680	20	0.75%
No.16	No.11	3120	80	2.56%
No.16	No.23	1280	0	0.00%
No.16	No.24	1700	0	0.00%
No.16	No.32	1950	0	0.00%

[0089] 表3に示すように、ヘモグロビン α 鎖特異的抗体およびヘモグロビン β 鎖特異的抗体の組み合わせにおいては、遊離ヘモグロビンに対し、特異的反応が認められた。ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体に対する反応性は、遊離ヘモグロビンに対する反応性の15%以下であった。

[0090] 参考例4：遊離ヘモグロビン測定試薬

参考例1で得られた抗体を用いて免疫凝集反応測定試薬を作製した。

[0091] 測定試薬として、第1試薬および第2試薬を調製した。第1試薬として、50mM HEPES緩衝液(pH7.4)を用いた。第2試薬として、参考例2の抗ヘモグロビンモノクローナル抗体(抗Hb抗体)のそれぞれを担持する各ポリスチレンラテックスを混合してラテックス濃度1.0mg/mLに調整

し、免疫凝集反応測定試薬を作製した。

抗体担持不溶性担体は、各抗ヘモグロビンモノクローナル抗体とポリスチレンラテックス粒子（平均粒径100nm）とを混合して、ポリスチレンラテックス粒子表面に抗ヘモグロビンモノクローナル抗体を担持することにより調製した。本試薬では、 α 鎖特異的抗ヘモグロビンモノクローナル抗体としてNo. 16を用い、 β 鎖特異的抗ヘモグロビンモノクローナル抗体としてNo. 11を用いた。

[0092] 参考例5：他の測定法との比較

遊離ヘモグロビンとヘモグロビン-ハプトグロビン複合体とを混合した検体で、測定法の比較を実施した。

[0093] （1）精製遊離ヘモグロビンとヘモグロビン-ハプトグロビン複合体の作製

総ヒトヘモグロビン常用参照標準物質JCCRM912-3H（検査医学標準物質機構製）を、生理食塩水を用いて2.0mg/mLに希釈した。

また、ヒトプール血漿由来ハプトグロビン（SIGMA-ALDRICH社製）凍結乾燥品1mgを、生理食塩水303 μ Lに溶解し、ハプトグロビン溶液（3.3mg/mL）を調製した。

[0094] （2）遊離ヘモグロビンとヘモグロビン-ハプトグロビン複合体の混合

2.0mg/mLに調製した遊離ヘモグロビン（free-Hb）は一定量とし、これに3.3mg/mLに調製したハプトグロビン（Hpt）溶液を表4の容量で混合し、混合比の異なる溶液（検体）を調製した。なお、表4中のfree-Complexは、遊離ヘモグロビンとヘモグロビン-ハプトグロビン複合体とのモル比を表す。

[0095] [表4]

free-Complex	0 : 1	1 : 3	1 : 1	3 : 1	1 : 0
free-Hb (2.0 mg/mL)	200 μ L	200 μ L	200 μ L	200 μ L	200 μ L
Hpt (3.3 mg/mL)	200 μ L	150 μ L	100 μ L	50 μ L	0 μ L
生理食塩水	0 μ L	50 μ L	100 μ L	150 μ L	200 μ L
Total	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L
free-Hb 濃度 (mg/mL)	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00

[0096] (3) 遊離ヘモグロビン／ヘモグロビン－ハプトグロビン複合体混合液の測定

市販のヘモグロビン比色測定試薬を使用し、参考例4で作製した免疫凝集反応測定試薬と比較した。

ヘモグロビン比色測定試薬は、ラウリル硫酸ナトリウムで赤血球膜を溶解し、溶出したヘモグロビンを吸光度測定することにより定量する試薬である。ただし本試験では溶血のステップを省略した。上記(2)で調製した遊離ヘモグロビン (free-Hb)／ヘモグロビン－ハプトグロビン (Hb-Hp) 複合体の各混合液 (検体) を、ヘモグロビン比色測定試薬と混合し、分光光度計 (島津社製、UV-1900) を用いて540nmで測定した。

[0097] 一方、参考例4で作製した免疫凝集反応測定試薬 (Latex 試薬) は、上記(2)で調製した各混合液 (検体) を、それぞれ生理食塩水で50倍に希釈し、下記の条件にて、生化学自動分析装置JCA-BM6070を用いて測定した。

検体量：1.0 μ L, 第1試薬：50 μ L, 第2試薬：50 μ L, 測定波長：658nm

結果を表5および図6に示す。

[0098] [表5]

free-Hb 濃度 (mg/mL)	0.000	0.250	0.500	0.750	1.000
比色測定法	1.036	0.990	0.984	0.977	0.971
Latex 試薬	0.065	0.387	0.544	0.706	1.010

[0099] 市販のヘモグロビン比色定量試薬は、遊離ヘモグロビンとヘモグロビン－ハプトグロビン複合体の比率が変わっても測定値が変化せず、両者を識別して測定することができなかった。これに対し、参考例4の免疫凝集反応測定試薬 (ラテックス試薬) は、ヘモグロビン－ハプトグロビン複合体の量に影響されず、遊離ヘモグロビン濃度に比例した測定値が得られた。

以上の結果から、参考例4のラテックス試薬は、遊離ヘモグロビンを特異的に測定することが示された。これにより、ヘモグロビン α 鎖特異的抗体およびヘモグロビン β 鎖特異的抗体の組合せを用いることで遊離ヘモグロビンを特異的に測定可能であることが示された。

実施例

[0100] 以下、調製例、試験例等を示すことにより本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は下記の調製例、試験例等に何ら限定されるものではない。

[0101] 調製例1：脱糖鎖処理したハプトグロビン（dHpt）の調製

（1）天然ハプトグロビン

天然由来のハプトグロビン（Hpt）として、ヒト血清、ウマ血清およびブタ血清よりそれぞれ精製したヒトHpt（1-1型）、ウマHptおよびブタHptを用いた。

[0102] （2）ENGase処理

各種Hpt 20 μ gに、64 UのEndo F2（Endo- β -N-acetylglucosaminidase F2, New England Biolabs社製）を添加し、40 μ LのGlycoBufer 1（5mM CaCl_2 / 50mM sodium acetate, pH 5.5）（New England Biolabs社製）中で37℃5日処理し、ENGase処理Hpt（dHpt）を得た。

[0103] （3）PNGase処理

各種Hpt 20 μ gに、4000 UのPNGase F（Peptide-N-Glycosidase F, New England Biolabs社製）を添加し、40 μ LのGlycoBufer 2（50mM sodium phosphate, pH 7.5）（New England Biolabs社製）中で37℃5日処理し、PNGase処理Hpt（dHpt）を得た。

[0104] 試験例1：脱糖鎖処理の確認（SDS-PAGE）

サンプルとして、調製例1で得られた、ENGase処理およびPNGase処理の各種Hpt（dHpt）と、対照としてグリコシダーゼ未処理の各種Hptを用いた。

Hpt溶液 200 μ g/mL 8 μ Lと、5×SDS-PAGE Sample Buffer

(SDS 5%, グリセロール 25%, ブロモフェノールブルー 0.05%, 0.5M Tris/HCl, pH 6.8) 2 μ Lと混合し、泳動サンプルとした。

[0105] 得られた泳動サンプル 10 μ Lを、ポリアクリルアミドゲル (e-PAGE LHR 7.5%, ATTO社製) にアプライした。電気泳動は、ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽およびパワーステーションギブリ (いずれも ATTO社製) を用い、60mAの定電流で60分間泳動した。なお、泳動バッファーは、Tris-Glycine-SDS Buffer powder (タカラバイオ社製) を規定どおり溶解したものを用いた。

泳動終了後、TaKaRa CBB Protein Safe Stain (タカラバイオ社製) にて30分染色し、その後精製水により脱色した。

結果を図7に示す。

[0106] 図7に示すように、ブタHpt、ウマHptおよびヒトHptのいずれにおいても、グリコシダーゼ未処理サンプルと比較して、ENGase処理またはPNGase処理したHptは低分子量化しており、脱糖鎖処理されたことが確認された。

[0107] 試験例2：脱糖鎖処理の確認 (MALDI-TOF MS)

サンプルとして、調製例1で得られた、ENGase処理およびPNGase処理のウマHpt (dHpt) と、対照としてグリコシダーゼ未処理のウマHptを用いた。

[0108] ウマHpt 200 μ g/mLを1 μ L用い、マトリクス (100% acetonitrileで飽和した2',4'-Dihydroxyacetophenone (DHAP)) と等容量で混合し、Big Anchor plateに1 μ L滴下した。サンプルを乾燥後、MALDI-TOF MS (使用機器: ultraflextreme, Bruker社製) にて解析を行った (測定条件: リニアポジティブモード)。

結果を図8に示す。

[0109] 図8に示すように、グリコシダーゼ未処理サンプルと比較して、ENGase処理またはPNGase処理したHptは低分子量化しており、脱糖鎖処理されたことが確認された。

なお、本試験で用いたウマH p t は $[\alpha\beta]_2$ の構造を有しており、すなわち 1 分子中に 2 つの β 鎖を有している。

[0110] 試験例 3：脱糖鎖処理の確認 (MALDI-TOF MS, 還元PNGase 処理)

サンプルとして、調製例 1 で得られた、ENGase 処理のウマH p t (dH p t) と、対照としてグリコシダーゼ未処理のウマH p t を用いた。

[0111] ウマH p t 各 25 μ g を、5 μ L の Denature Buffer (0.5% SDS, 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.6), 0.75% 2-メルカプトエタノール (用時添加), タカラバイオ社製) 中で 100°C, 3 分間加熱することで還元した。還元したサンプルに終濃度 1% の NP-40 を添加した後、1 mU の PNGase F (Peptide-N-Glycosidase F, タカラバイオ社製) を添加し、精製水で総液量 25 μ L として 37°C、24 時間処理した。

[0112] ウマdH p t、およびグリコシダーゼ未処理のウマH p t について、還元して PNGase 処理したサンプルと、還元のみ行い PNGase 処理しなかったサンプルとをそれぞれ用意した。得られたサンプルについて、試験例 2 と同様に MALDI-TOF MS にて解析を行った。なお、本試験ではハプトグロビンを還元しているため、 α 鎖と β 鎖とが別の分子として検出される。

結果を図 9 に示す。

[0113] 図 9 に示すように、(a) グリコシダーゼ未処理のウマH p t における β 鎖の分子量が約 36,000 であるのに対し、(b) これを PNGase 処理することで β 鎖の分子量が約 27,000 へと低分子量化した。一方、(c) ENGase により脱糖鎖処理していたウマdH p t と、(d) これをさらに PNGase 処理したウマdH p t とは、 β 鎖の分子量がほとんど変わらなかった。すなわち、脱糖鎖処理したハプトグロビンは、さらに PNGase 処理の有無による β 鎖の分子量の差が 6,500 以下であることが確認された。

したがって、PNGase 処理の有無でハプトグロビン β 鎖の分子量を比

較することにより、ハプトグロビンが脱糖鎖処理されているか否かを評価できることが示された。

[0114] 試験例4：遊離ヘモグロビン試薬によるハプトグロビンの定量

(1) サンプルの調製

ヒト血液より精製した10.5 mg/mLの精製ヘモグロビン(Hb)溶液を、希釈用溶液(0.1%BSA/0.9%NaCl/0.1%NaN₃/50mM HEPES, pH7.0)で希釈し、約120 µg/mLのHb溶液を調製した。

精製ウマHpt、精製ヒトHptおよび精製ブタHptの原液、ならびにENGase処理したウマHpt(ウマdHpt)の原液を、2%(vol/vol)となるよう希釈用溶液で希釈し、各種Hpt溶液を調製した。

上記Hb溶液200 µLと上記Hpt溶液200 µLとを混合し、サンプルを調製した。得られたサンプルには、Hbが59.4 µg/mL(=921 pmol/mL)含まれ、Hptが原液の1%(vol/vol)含まれている。なお、当該サンプルにおけるHb量は、上記Hb溶液200 µLと希釈用溶液200 µLとを混合したサンプルを後述の方法により測定して決定した。

さらに、サンプル中のHpt濃度が表6Aに示す濃度となるように変更した以外は上記と同様にして、Hpt濃度の異なる一連のサンプルを調製した。また、対照として、Hptを添加せず希釈用溶液を添加したサンプルを調製した。

[0115] (2) 測定

これらのサンプルにおける遊離Hb量を、参考例4の遊離ヘモグロビン測定試薬を用いて測定した。測定は、下記の条件にて生化学自動分析装置JCA-BM6070/C(BioMajesty 6070 G)(JEOL社製)を用いて測定した。

分析試料量：5.0 µL 第1試薬：50 µL 第2試薬：50 µL 測定波長：658 nm 希釈倍率：5倍

※分析試料：サンプルを生理食塩水により指定の希釈倍率で希釈して得たもの。

測定結果を図 1 0 および表 6 A に示す。測定結果から、以下の式で表される近似直線を得た。

$$Y = a X + b$$

Y : 遊離 H b 濃度 (μ g/mL) 、 a : 傾き、 X : H p t 濃度 (% (vol/vol)) 、 b : 切片

[0116] そして、遊離 H b 濃度が 0 μ g/mL になるときの、サンプルにおける H p t 原液の添加量を算出した。そして、 H p t 原液中の H p t 濃度を算出した (表 6 B) 。

ここで、遊離 H b 濃度が 0 μ g/mL になる H p t 量とは、サンプル中の H b が全て H p t と結合して H b – H p t 複合体となり、遊離 H b がなくなる H p t 量である。そのため、 H p t が混合物中等に含まれる場合であっても、ヒト H b に対するモル当量として、 H p t を定量することができる。

結果を図 1 0 、表 6 A および表 6 B に示す。

[0117] [表6A]

添加した Hpt の種類		Hpt 添加量 (% (vol/vol))					
		2.000	1.000	0.500	0.250	0.125	0.063
ウマ dHpt	遊離 Hb 濃度 (μ g/mL)		15.6	34.7	45.3	51.8	55.4
ウマ			43.2	51.0	54.6	58.3	58.2
ブタ		52.4	55.9	57.0	57.8	58.6	
ヒト		29.8	43.7	50.8	55.9	57.1	

[0118] [表6B]

添加した Hpt の種類	遊離 Hb 濃度が 0 と なる Hpt 原液量 % (vol/vol)	Hpt 原液中の Hpt 濃度 (nmol/mL)
ウマ dHpt	1.35	68
ウマ	3.62	25
ブタ	18.65	5
ヒト	4.01	23

[0119] 図10、表6Aおよび表6Bに示すように、ウマdHptは、脱糖鎖処理していない各種Hptと同様に、遊離Hbとの結合能を保持しており、ヒトHbに対するモル当量としてHpt濃度を定量することができた。

[0120] 試験例5：Hb安定性試験（便なし）

（1）サンプルの調製

80 μg/mLの精製ヒトHb溶液を、希釈用溶液（0.1%BSA／0.9%NaCl／0.1%NaN₃／50mM HEPES, pH7.0）で希釈し、800 ng/mL（12.4 pmol/mL）のHb溶液を調製した。

精製ブタHpt（脱糖鎖処理なし）、ENGase処理ブタHptおよびPNGase処理ブタHptの原液を、上記希釈用溶液で希釈し、Hpt溶液を調製した。なお、これらのHptはいずれも上記試験例4の方法に沿ってHpt濃度（ヒトHbに対するmol当量）を算出し、これに基づき濃度を調整した。

上記Hb溶液250 μLと上記Hpt溶液250 μLとを混合し、サンプルを調製した。得られたサンプルは500 μLであり、Hbが200 ng（3.1 pmol）、各種Hptが3.1 pmol含まれている。

[0121] 上記サンプルにおいて、Hpt 3.1 pmolは、サンプル中のHb 200 ng（3.1 pmol）を全てHb-Hpt複合体とするのに必要十分な量である。かかるHpt量（3.1 pmol）を、本試験における1 Unitとし、本試験ではHptをそれぞれ1.0、0.5、0.25、0.125 Unit添加したサンプルを調製した。

ウマHptについても、ブタ各種Hptと同様にサンプルを調製した。

また、ヒトHptについては、ブタ各種Hptと同様にサンプルを調製したほか、Hptを2 Unit添加したサンプルも調製した。

さらに、Hptを添加せず希釈用溶液を加えたサンプル（Hpt無添加）も対照として調製した。

[0122] （2）測定

これらのサンプルについて、Hb測定試薬（OC-ヘモディア^(R)オートIII

‘栄研’，栄研化学社製）、および便潜血全自動免疫化学分析装置（OCセンサー D I A N A，栄研化学社製）を用い、H b 値を測定した。ここでの測定値を初発値とした。

そして、初発値を測定したサンプルを、37℃で7日間および14日間保存し、再度H b 値を測定した。

[0123] 初発値は、H p t 無添加サンプルの初発値と比較し、「H p t 無添加に対する比率」を求めH p t 添加によるH b 測定値の変動を評価した。

$$\text{H p t 無添加に対する比率 (\%)} = (\text{各ハプトグロビン量を添加したサンプルのヘモグロビンの濃度} / \text{ハプトグロビンを添加していないサンプルの濃度}) \times 100$$

また、保存7日間後、14日間後の測定値は、それぞれの初発値と比較し、以下の式から「ヘモグロビンの残存率」を求め、H p t 添加によるH b 安定化効果を評価した。

$$\text{ヘモグロビンの残存率 (\%)} = (37^\circ\text{C} 7\text{日後又は} 14\text{日後に測定したヘモグロビンの濃度} / \text{ヘモグロビンを希釈液およびハプトグロビンと混合した直後に測定したヘモグロビン濃度 (初発値)}) \times 100$$

結果を表7～9に示す。

[0124]

[表7]

	Hpt	添加量 (Unit)	0	0.125	0.25	0.5	1
		濃度 (pmol/mL)	0	0.775	1.55	3.1	6.2
ブタ Hpt(酵素処理なし)	Hpt無添加に 対する比率(%)		100	97	89	81	65
ブタ dHpt(ENGase)			100	98	96	94	88
ブタ dHpt(PNGase)			100	97	95	89	78

	Hpt	添加量 (Unit)	0	0.125	0.25	0.5	1
		濃度 (pmol/mL)	0	0.775	1.55	3.1	6.2
ブタ Hpt(酵素処理なし)	Hb 残存 率(%)	保存 0 日目	100	100	100	100	100
ブタ dHpt(ENGase)			100	100	100	100	100
ブタ dHpt(PNGase)			100	100	100	100	100
ブタ Hpt(酵素処理なし)		保存 7 日目	40	40	41	49	79
ブタ dHpt(ENGase)			43	45	46	55	86
ブタ dHpt(PNGase)			41	41	45	58	88
ブタ Hpt(酵素処理なし)		保存 14 日目	7	22	32	48	79
ブタ dHpt(ENGase)			15	24	33	54	88
ブタ dHpt(PNGase)			11	23	34	58	87

[0125]

[表8]

	Hpt	添加量 (Unit)	0	0.125	0.25	0.5	1
		濃度 (pmol/mL)	0	0.775	1.55	3.1	6.2
ウマ Hpt(酵素処理なし)	Hpt無添加に 対する比率(%)		100	94	90	74	50
ウマ dHpt(ENGase)			100	101	101	106	93
ウマ dHpt(PNGase)			100	97	92	88	68

	Hpt	添加量 (Unit)	0	0.125	0.25	0.5	1
		濃度 (pmol/mL)	0	0.775	1.55	3.1	6.2
ウマ Hpt(酵素処理なし)	Hb 残存 率(%)	保存 0 日目	100	100	100	100	100
ウマ dHpt(ENGase)			100	100	100	100	100
ウマ dHpt(PNGase)			100	100	100	100	100
ウマ Hpt(酵素処理なし)		保存 7 日目	43	46	48	63	102
ウマ dHpt(ENGase)			46	47	52	51	97
ウマ dHpt(PNGase)			42	49	56	71	96
ウマ Hpt(酵素処理なし)		保存 14 日目	12	18	28	57	100
ウマ dHpt(ENGase)			13	25	34	34	99
ウマ dHpt(PNGase)			15	28	41	67	101

[0126]

[表9]

	Hpt	添加量 (Unit)	0	0.125	0.25	0.5	1	2
		濃度 (pmol/mL)	0	0.775	1.55	3.1	6.2	12.4
ヒト Hpt(酵素処理なし)	Hpt無添加に 対する比率(%)		100	94	91	85	72	39
ヒト dHpt(ENGase)			100	98	98	93	87	65
ヒト dHpt(PNGase)			100	99	94	93	82	47

	Hpt	添加量 (Unit)	0	0.125	0.25	0.5	1	2
		濃度 (pmol/mL)	0	0.775	1.55	3.1	6.2	12.4
ヒト Hpt(酵素処理なし)	Hb 残存 率(%)	保存 0 日目	100	100	100	100	100	100
ヒト dHpt(ENGase)			100	100	100	100	100	100
ヒト dHpt(PNGase)			100	100	100	100	100	100
ヒト Hpt(酵素処理なし)		保存 7 日目	42	45	50	57	85	98
ヒト dHpt(ENGase)			43	48	51	57	80	101
ヒト dHpt(PNGase)			44	48	55	62	94	100
ヒト Hpt(酵素処理なし)		保存 14 日目	15	22	30	44	87	100
ヒト dHpt(ENGase)			13	22	31	44	83	100
ヒト dHpt(PNGase)			16	23	35	50	95	101

[0127] 表 7～9 のそれぞれ A に示すように、それぞれの初発値を H p t 無添加サンプルの初発値と比較すると、脱糖鎖処理してない H p t を添加することにより H b 測定値が低下しており、H p t 添加量が増えると測定値の低下の程度も大きくなった。

これに対し、E N G a s e 処理または P N G a s e 処理した H p t は、脱糖鎖処理していない H p t と比較して、H b 測定値の低下が抑制されており、特に E N G a s e 処理した H p t は抑制効果が高かった。

以上の傾向は、ブタ H p t、ウマ H p t、ヒト H p t の全てにおいて共通して確認された。

[0128] また、表 7～9 のそれぞれ B に示すように、ブタ H p t、ウマ H p t、ヒト H p t のいずれも、E N G a s e 処理および P N G a s e 処理した H p t は、脱糖鎖処理なし H p t と同程度に、H p t の濃度依存的に H b を安定化

させた。

なお、H p t を 1 U n i t 含むサンプル（すなわち、H p t および H b を 3. 1 p m o l 含む 5 0 0 μ L のサンプル）で 3 7 $^{\circ}$ C 7 日間保存したときの H b 残存率は、いずれも 7 0 % 以上であった。

[0129] 以上より、H p t を脱糖鎖処理すると、H b 安定化効果を維持したまま、H b 測定値の変動を抑制できることが示された。

[0130] 試験例 6 : H b 安定性試験（便あり）

（1）サンプルの調製

8 0 μ g / m L の精製ヒト H b 溶液（栄研化学社製）を、希釈用溶液（0. 1 % B S A / 0. 9 % N a C l / 0. 1 % N a N ₃ / 5 0 m M H E P E S , p H 7. 0）で希釈し、1 2 0 0 n g / m L の H b 溶液を調製した。

また、精製ブタ H p t （脱糖鎖処理なし）、E N G a s e 処理ブタ H p t および P N G a s e 処理ブタ H p t の原液（それぞれ H p t 濃度（ヒト H b に対する mol 当量）を算出済み）を、上記希釈用溶液で希釈し、H p t 溶液を調製した。

さらに、ヒト糞便を上記希釈用溶液に溶解させ、2 0 % (w t / v o l) 便溶液を調製した。

上記 H b 溶液 2 5 0 μ L、H p t 溶液 2 3 7. 5 μ L および 2 0 % 便溶液 1 2. 5 μ L を混合し、サンプルを調製した。得られたサンプルは 5 0 0 μ L であり、H b が 3 0 0 n g (4. 6 5 p m o l) 、各種 H p t が 4. 6 5 p m o l および糞便が 0. 5 % 含まれている。

[0131] 上記サンプルにおける H p t 量（4. 6 5 p m o l）を、本試験における 1 U n i t とし、本試験では、H p t 量をそれぞれ 1. 0、0. 5、0. 2 5 U n i t 添加したサンプルを調製した。

また、ウマ H p t およびヒト H p t についてもブタと同様に各サンプルを調製した。

さらに、H p t を添加せず希釈用溶液を加えたサンプル（H p t 無添加）も対照として調製した。

[0132] (2) 測定

これらのサンプルについて、Hb測定試薬（OC－ヘモディア^(R)オートIII ‘栄研’，栄研化学社製）および便潜血全自動免疫化学分析装置（OCセンサー D I A N A，栄研化学社製）を用い、Hb値を測定した。ここでの測定値を初発値とした。

そして、初発値を測定したサンプルを、37℃で7日間および14日間保存し、再度Hb値を測定した。

[0133] 初発値は、Hpt無添加サンプルの初発値と比較し、Hpt添加によるHb測定値の変動を評価した。

また、保存7日間後、14日間後の測定値は、それぞれの初発値と比較し、Hpt添加によるHb安定化効果を評価した。

結果を表10～12に示す。

[0134] [表10]

	Hpt	添加量 (Unit)	0	0.25	0.5	1
		濃度 (pmol/mL)	0	2.325	4.65	9.3
ブタ Hpt(酵素処理なし)	Hpt無添加に 対する比率(%)		100	93	84	69
ブタ dHpt(ENGase)			100	100	98	94
ブタ dHpt(PNGase)			100	95	91	81

	Hpt	添加量 (Unit)	0	0.25	0.5	1
		濃度 (pmol/mL)	0	2.325	4.65	9.3
ブタ Hpt(酵素処理なし)	Hb 残存 率(%)	保存 0 日目	100	100	100	100
ブタ dHpt(ENGase)			100	100	100	100
ブタ dHpt(PNGase)			100	100	100	100
ブタ Hpt(酵素処理なし)		保存 7 日目	6	19	34	75
ブタ dHpt(ENGase)			6	18	30	57
ブタ dHpt(PNGase)			6	19	34	69
ブタ Hpt(酵素処理なし)		保存 14 日目	1	16	34	78
ブタ dHpt(ENGase)			1	16	29	56
ブタ dHpt(PNGase)			1	16	32	67

[0135] [表11]

	Hpt	添加量 (Unit)	0	0.25	0.5	1
		濃度 (pmol/mL)	0	2.325	4.65	9.3
ウマ Hpt(酵素処理なし)	Hpt無添加に 対する比率(%)		100	93	85	67
ウマ dHpt(ENGase)			100	100	101	96
ウマ dHpt(PNGase)			100	98	97	92

	Hpt	添加量 (Unit)	0	0.25	0.5	1
		濃度 (pmol/mL)	0	2.325	4.65	9.3
ウマ Hpt(酵素処理なし)	Hb 残存 率(%)	保存 0 日目	100	100	100	100
ウマ dHpt(ENGase)			100	100	100	100
ウマ dHpt(PNGase)			100	100	100	100
ウマ Hpt(酵素処理なし)		保存 7 日目	6	21	39	93
ウマ dHpt(ENGase)			6	22	36	74
ウマ dHpt(PNGase)			6	21	36	68
ウマ Hpt(酵素処理なし)		保存 14 日目	1	18	38	95
ウマ dHpt(ENGase)			1	19	34	73
ウマ dHpt(PNGase)			1	17	32	66

[0136]

[表12]

	Hpt	添加量 (Unit)	0	0.25	0.5	1
		濃度 (pmol/mL)	0	2.325	4.65	9.3
ヒト Hpt(酵素処理なし)	Hpt無添加に 対する比率(%)		100	95	88	75
ヒト dHpt(ENGase)			100	98	94	86
ヒト dHpt(PNGase)			100	99	93	87

	Hpt	添加量 (Unit)	0	0.25	0.5	1
		濃度 (pmol/mL)	0	2.325	4.65	9.3
ヒト Hpt(酵素処理なし)	Hb 残存 率(%)	保存 0 日目	100	100	100	100
ヒト dHpt(ENGase)			100	100	100	100
ヒト dHpt(PNGase)			100	100	100	100
ヒト Hpt(酵素処理なし)		保存 7 日目	6	23	44	97
ヒト dHpt(ENGase)			6	23	41	84
ヒト dHpt(PNGase)			6	23	43	82
ヒト Hpt(酵素処理なし)		保存 14 日目	1	21	41	96
ヒト dHpt(ENGase)			1	19	40	84
ヒト dHpt(PNGase)			1	18	40	80

[0137] 表 1 0 ～ 1 2 に示すように、測定サンプルが便を含む場合であっても、便なしと同様の傾向が認められた。

すなわち、脱糖鎖処理してないH p t を添加することにより、濃度依存的にH b 測定値（初発値）が低下するが、E N G a s e 処理またはP N G a s e 処理したH p t は、かかる低下が抑制されていた。

また、E N G a s e 処理およびP N G a s e 処理したH p t は、H p t の濃度依存的にH b を安定化させた。

以上の傾向は、ブタH p t、ウマH p t、ヒトH p t の全てにおいて共通して確認された。

請求の範囲

- [請求項1] ヘモグロビンの免疫学的測定方法であって：
- 前記ヘモグロビン及びハプトグロビンの共存下で抗ヘモグロビン抗体を用いて免疫学的に測定する工程；
- を含み、
- 前記ハプトグロビンは、下記（１）の特性を備える：
- （１）N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している；
- 免疫学的測定方法。
- [請求項2] 前記ハプトグロビンがさらに、下記（２）の特性を備える請求項１に記載の免疫学的測定方法：
- （２）前記ハプトグロビン３．１ pmolを含む５００ μLの緩衝液において、ヘモグロビン３．１ pmolを３７℃７日間保存したときの当該ヘモグロビンの残存率が７０％以上である。
- [請求項3] 前記特性（１）は、下記（１a）の特性である、請求項１又は２に記載の免疫学的測定方法：
- （１a）ペプチド-N-グリコシダーゼ（PNGase）で処理した前記ハプトグロビンにおけるβ鎖の分子量と、当該処理しない前記ハプトグロビンにおけるβ鎖の分子量との差が、６，５００以下である。
- [請求項4] 前記ハプトグロビンがN結合型糖鎖を有しない、請求項１又は２に記載の免疫学的測定方法。
- [請求項5] N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失した前記ハプトグロビンに存在するN結合型糖鎖が、１残基のN-アセチルグルコサミンである、または、１残基のN-アセチルグルコサミンに１残基のフコースが結合したものである、請求項１又は２に記載の免疫学的測定方法。
- [請求項6] 前記ヘモグロビンが、糞便、血液、血清、血漿、尿、喀痰又は唾液に含まれる、請求項１又は２に記載の免疫学的測定方法。
- [請求項7] 前記抗ヘモグロビン抗体の少なくとも１種が不溶性担体に担持され

ている、請求項 1 又は 2 に記載の免疫学的測定方法。

[請求項8] 前記不溶性担体が不溶性粒子である、請求項 7 に記載の免疫学的測定方法。

[請求項9] 免疫凝集法である、請求項 1 又は 2 に記載の免疫学的測定方法。

[請求項10] ヘモグロビンの免疫学的測定において、当該ヘモグロビンの測定値の変動を抑制する方法であって：

前記ヘモグロビン及びハプトグロビンの共存下で抗ヘモグロビン抗体を用いて免疫学的に測定する工程；を含み、

前記方法は、前記ハプトグロビンとして下記（１）の特性を備えるハプトグロビンを用いる：

（１）N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している；
ヘモグロビンの測定値変動抑制方法。

[請求項11] 前記ハプトグロビンがさらに、下記（２）の特性を備える請求項 10 に記載のヘモグロビンの測定値変動抑制方法：

（２）前記ハプトグロビン 3. 1 pmolを含む 5 0 0 μ Lの緩衝液において、ヘモグロビン 3. 1 pmolを 3 7℃ 7日間保存したときの当該ヘモグロビンの残存率が 7 0 %以上である。

[請求項12] ヘモグロビンを、下記（１）の特性を備えるハプトグロビンと共存させる工程を含む、ヘモグロビンの安定化方法：

（１）N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している。

[請求項13] 前記ハプトグロビンは、さらに下記（２）の特性を備える、請求項 1 2 に記載のヘモグロビン安定化方法：

（２）前記ハプトグロビン 3. 1 pmolを含む 5 0 0 μ Lの緩衝液において、ヘモグロビン 3. 1 pmolを 3 7℃ 7日間保存したときの当該ヘモグロビンの残存率が 7 0 %以上である。

[請求項14] 前記ハプトグロビンがN結合型糖鎖を有しない、請求項 1 2 又は 1 3 に記載のヘモグロビン安定化方法。

[請求項15] N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失した前記ハプトグロビンに存

在するN結合型糖鎖が、1残基のN-アセチルグルコサミンである、または、1残基のN-アセチルグルコサミンに1残基のフコースが結合したものである、請求項12又は13に記載のヘモグロビン安定化方法。

[請求項16] ハプトグロビンを含むヘモグロビン安定化溶液であって、
前記ハプトグロビンは、下記(1)の特性を備える、ヘモグロビン安定化溶液：

(1) N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している。

[請求項17] 前記ハプトグロビンは、さらに下記(2)の特性を備える：
(2) 前記ハプトグロビン3.1 pmolを含む500 µLの緩衝液において、ヘモグロビン3.1 pmolを37℃7日間保存したときの当該ヘモグロビンの残存率が70%以上である；
請求項16に記載のヘモグロビン安定化溶液。

[請求項18] 前記特性(1)は、下記(1a)の特性である、請求項16又は17に記載のヘモグロビン安定化溶液：
(1a) ペプチド-N-グリコシダーゼ(PNGase)で処理した前記ハプトグロビンにおけるβ鎖の分子量と、当該処理しない前記ハプトグロビンにおけるβ鎖の分子量との差が、6,500以下である。

[請求項19] 前記ハプトグロビンがN結合型糖鎖を有しない、請求項16又は17に記載のヘモグロビン安定化溶液。

[請求項20] 前記ハプトグロビンは、天然由来のハプトグロビンをペプチド-N-グリコシダーゼ(PNGase)で処理したものである、請求項16又は17に記載のヘモグロビン安定化溶液。

[請求項21] N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失した前記ハプトグロビンに存在するN結合型糖鎖が、1残基のN-アセチルグルコサミンである、または、1残基のN-アセチルグルコサミンに1残基のフコースが結合したものである、請求項16又は17に記載のヘモグロビン安定化

溶液。

- [請求項22] 前記ハプトグロビンは、天然由来のハプトグロビンをエンドー β - N - アセチルグルコサミナーゼ (E N G a s e) で処理したものである、請求項 16 又は 17 に記載のヘモグロビン安定化溶液。
- [請求項23] 前記ヘモグロビンが、糞便、血液、血清、血漿、尿、喀痰又は唾液に含まれる、請求項 16 又は 17 に記載のヘモグロビン安定化溶液。
- [請求項24] 請求項 16 又は 17 に記載のヘモグロビン安定化溶液と；
抗ヘモグロビン抗体を含む試薬と；
を備える、ヘモグロビンを免疫学的に測定するためのキット。
- [請求項25] 前記抗ヘモグロビン抗体の少なくとも 1 種が不溶性担体に担持されている、請求項 24 に記載のヘモグロビン測定キット。
- [請求項26] 前記不溶性担体の不溶性粒子である、請求項 25 に記載のヘモグロビン測定キット。
- [請求項27] 前記試薬が免疫凝集法の試薬である、請求項 24 に記載のヘモグロビン測定キット。
- [請求項28] 下記 (1) および (2) の特性を備えるハプトグロビン：
(1) N 結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失している；および
(2) 前記ハプトグロビン 3、1 pmol を含む 500 μ L の緩衝液において、ヘモグロビン 3、1 pmol を 37℃ 7 日間保存したときに、当該ヘモグロビンの残存率が 70% 以上である。
- [請求項29] 前記 (1) の特性は、下記 (1 a) の特性である、請求項 28 に記載のハプトグロビン：
(1 a) ペプチド - N - グリコシダーゼ (P N G a s e) で処理した前記ハプトグロビンにおける β 鎖の分子量と、当該処理しない前記ハプトグロビンにおける β 鎖の分子量との差が、6,500 以下である。
- [請求項30] 前記ハプトグロビンが N 結合型糖鎖を有しない、請求項 28 又は 29 に記載のハプトグロビン。

- [請求項31] 前記ハプトグロビンは、天然由来のハプトグロビンをペプチド－N－グリコシダーゼ（PNGase）で処理したものである、請求項28又は29に記載のハプトグロビン。
- [請求項32] N結合型糖鎖の少なくとも一部が欠失した前記ハプトグロビンに存在するN結合型糖鎖が、1残基のN－アセチルグルコサミンである、または、1残基のN－アセチルグルコサミンに1残基のフコースが結合したものである、請求項28又は29に記載のハプトグロビン。
- [請求項33] 前記ハプトグロビンは、天然由来のハプトグロビンをエンド－β－N－アセチルグルコサミニダーゼ（ENGase）で処理したものである、請求項28又は29に記載のハプトグロビン。
- [請求項34] N結合型糖鎖を有するハプトグロビンであって、N結合型糖鎖の糖鎖が、1残基のN－アセチルグルコサミンである、または、1残基のN－アセチルグルコサミンに1残基のフコースが結合した糖鎖のみであるハプトグロビン。
- [請求項35] ハプトグロビンの製造方法であって、
天然由来のハプトグロビンを、グリコシダーゼ処理する工程を備え、
下記の（a）および（b）を満たす：
（a）前記グリコシダーゼ処理の前に、前記天然由来のハプトグロビンに90℃以上の熱ショックを与えない；
（b）前記グリコシダーゼ処理において、SDSを共存させない；
ことを特徴とするハプトグロビンの製造方法。
- [請求項36] 前記グリコシダーゼがペプチド－N－グリコシダーゼ（PNGase）である、請求項35に記載のハプトグロビンの製造方法。
- [請求項37] 前記ペプチド－N－グリコシダーゼがPNGase Fである、請求項36に記載のハプトグロビンの製造方法。
- [請求項38] 前記グリコシダーゼがエンド－β－N－アセチルグルコサミニダーゼ（ENGase）である、請求項35に記載のハプトグロビンの製

造方法。

[請求項39] 前記エンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼがEndo F 2である、請求項38に記載のハプトグロビンの製造方法。