(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102422160 B
(45)授权公告日 2014.09.10

(21)申请号 201080021069.2
(22)申请日 2010.05.11
(30)优先权数据
2009-114572 2009.05.11 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2011.11.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2010/057974 2010.05.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2010/131660 JA 2010.11.18
(73)专利权人 荣研化学株式会社
地址 日本东京都
专利权人 大塚制药株式会社
(72)发明人 峰川贵之 新留久美子 阿部克司 大熊博 安藤知英子 阿比留康弘
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
代理人 杨宏军
(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
(56)对比文件
WO 2004/009035 A2,2004.01.29,
JP 2006-242602 A,2006.09.14,
Kennth DR Setchell.s-equol a potent ligand for estrogen receptor beta ,is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial floral.《The American Journal of Clinical Nutrition》.2005, 第81卷
吴健全.大豆素代谢产物---雌马酚研究进展.《生理科学进展》.2006, 第37卷(第4期), 第359-361页.
C.Bennetau-Pelissero.ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human &#64258
uids.《Food Chemistry》.2003, 第82卷第645-658页.
Duncan C.S.Talbot.Monoclonal antibody-based time-resolved fluorescence immunoassays for daidein genistein and equol in blood and urine: application to the isoheart intervention study.《Clinical Chemistry》.2007, 第53卷 (续)
审查员 刘迎鸣

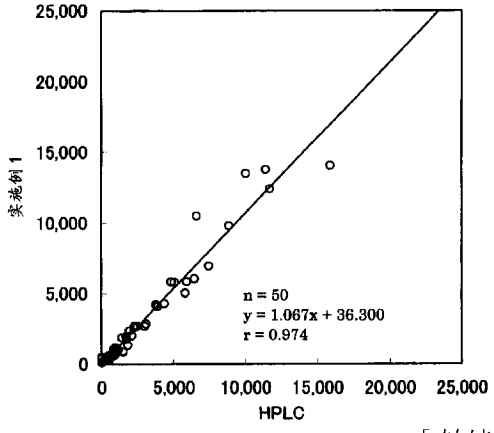
权利要求书1页 说明书23页 附图7页

(54)发明名称

利用免疫法测定生物样品中的雌马酚的方法、用于该测定的试剂盒、以及判定受试者的雌马酚产生能力的方法

(57)摘要

本发明的目的在于提供利用免疫法测定生物样品中的雌马酚的方法,用于该测定的试剂盒和判定受试者的雌马酚产生能力的方法。本发明的测定方法的特征在于,使用S-雌马酚作为抗原,所述抗原为选自由用于制作标准曲线的标准抗原和与生物样品中的雌马酚竞争的标记抗原组成的组中的至少一种。本发明的试剂盒的特征在于,含有S-雌马酚作为抗原,所述抗原为选自由该标准抗原和该标记抗原组成的组中的至少一种。本发明的判定方法包括下述步骤:利用使用S-雌马酚作为抗原的免疫法,测定来自摄取了大豆异黄酮的受试者的生物样品中的雌马酚的步骤,所述抗原选自由该标准抗原和该标记抗原组成的组中的至少一种;和基于在上述步骤中得到的雌马酚的测定值,判定受试者的雌马酚产生能力的步骤。



[转续页]

CN 102422160 B

[接上页]

(56)对比文件

Paul I Creeke.Development of ELISAs for the measurement of the dietary phytoestrogens daidzein and equol in human plasma.《 Food and Agricultural Immunology》.1998, 第 10 卷

Elke Brouwers.Time-resolved &#64258 uoroimmunoassay for equol in plasma and urine.《Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology》.2003, 第 84 卷第 577--588 页.

1. 一种利用免疫法测定生物样品中的雌马酚的方法，其特征在于，使用 S- 雌马酚作为抗原，所述抗原为用于制作标准曲线的标准抗原和与生物样品中的雌马酚竞争的标记抗原两者，并且使用抗血清作为一次抗体。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中，将抗雌马酚抗体作为一次抗体使用，将相对于 S- 雌马酚的交叉反应性设定为 100％时，所述抗雌马酚抗体相对于黄豆苷元的交叉反应性为 10％以下，相对于染料木黄酮的交叉反应性为 10％以下，相对于黄豆黄素的交叉反应性为 10％以下，相对于二氢黄豆苷元的交叉反应性为 20％以下，以及相对于脱氢雌马酚的交叉反应性为 20％以下。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述标记抗原的标记物为选自由酶、放射性同位素、色素、荧光物质、胶乳和金属胶体组成的组中的至少一种。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述免疫法为选自由 ELISA 法、放射免疫测定法和免疫层析法组成的组中的至少一种。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述生物样品为选自由尿和血液组成的组中的至少一种。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，在不对所述生物样品中的雌马酚的偶联物进行去偶联处理的情况下进行测定。

7. 一种用于利用免疫法测定生物样品中的雌马酚的试剂盒，其特征在于，含有抗血清作为一次抗体，含有 S- 雌马酚作为抗原，所述抗原为用于制作标准曲线的标准抗原和与样品中的雌马酚竞争的标记抗原两者。

8. 如权利要求 7 所述的试剂盒，其中，还含有抗雌马酚抗体作为一次抗体，将相对于 S- 雌马酚的交叉反应性设定为 100％时，所述抗雌马酚抗体相对于黄豆苷元的交叉反应性为 10％以下，相对于染料木黄酮的交叉反应性为 10％以下，相对于黄豆黄素的交叉反应性为 10％以下，相对于二氢黄豆苷元的交叉反应性为 20％以下，以及相对于脱氢雌马酚的交叉反应性为 20％以下。

9. 如权利要求 7 所述的试剂盒，其中，所述免疫法为选自由 ELISA 法、放射免疫测定法和免疫层析法组成的组中的至少一种。

10. 如权利要求 7 所述的试剂盒，其中，所述生物样品为选自由尿和血液组成的组中的至少一种。

11. 一种判定受试者的雌马酚产生能力的方法，包括下述步骤，

步骤 (1) ：利用使用 S- 雌马酚作为抗原、使用抗血清作为一次抗体的免疫法，测定来自摄取了大豆异黄酮的受试者的生物样品中的雌马酚，所述抗原为用于制作标准曲线的标准抗原和与生物样品中的雌马酚竞争的标记抗原两者 ；和

步骤 (2) ：基于在所述步骤 (1) 中得到的雌马酚的测定值，判定受试者的雌马酚产生能力。

12. 如权利要求 11 所述的判定方法，其特征在于，在所述步骤 (1) 中，在不对生物样品中的雌马酚的偶联物进行去偶联处理的情况下进行测定。

利用免疫法测定生物样品中的雌马酚的方法、用于该测定的试剂盒、以及判定受试者的雌马酚产生能力的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及利用免疫法测定生物样品中的雌马酚的方法、用于该测定的试剂盒、以及判定受试者的雌马酚产生能力的方法。

背景技术

[0002] 大豆中含有的异黄酮对乳癌、前列腺癌等具有预防效果（抗雌激素效果），并且对更年期障碍、绝经后的骨质疏松症・高脂血症・高血压症等具有改善效果（雌激素样效果），这已广为人知。

[0003] 最近，报道了除了大豆异黄酮所带来的直接的临床效果之外，作为大豆异黄酮的活性代谢物的雌马酚代替该大豆异黄酮，成为临床应用中有效性的关键。即，已出现很多报道指明雌马酚对乳癌、前列腺癌、更年期障碍和绝经后的骨质疏松症有效。

[0004] 此外，还报道了由于雌马酚由肠道细菌产生，所以其产生量随着肠道菌丛的不同而不同，存在个体差异。因此，不能否认存在即使摄取大豆加工品，也不能期待所希望的抗雌激素效果、雌激素样效果的人。

[0005] 之后，通过分离、鉴定有效地产生雌马酚的乳酸菌（专利文献 1）、口服摄取该乳酸菌制剂使乳酸菌到达或固着于肠道，可期待雌马酚在体内的有效的摄取。此时，通过测定例如尿、血液、粪便等的雌马酚，可确认该乳酸菌是否到达或固着在肠道中。

[0006] 作为该雌马酚的测定方法，已知有下述使用仪器分析的方法：为血液样品时，使用液相色谱－质谱联用仪或气相色谱－质谱联用仪，为尿样品时，使用高效液相色谱 (HPLC) 法等，但是期待更简便的测定方法。

[0007] 此外，作为利用免疫测定的雌马酚的测定方法，使用了时间分辨荧光分析法的 Labmaster TR-FIA Research Reagents for the Measurement of Equol(LABMASTER DIAGNOSTIC 公司）已有市售（非专利文献 1）。

[0008] 另一方面，对于雌马酚，已知存在 S- 雌马酚和 R- 雌马酚两种光学异构体。其中，作为雌马酚的前体物质的黄豆苷元的由肠道细菌产生的代谢产物仅为 S- 雌马酚。此外，与雌激素受体的结合也是 S- 雌马酚一方相对较强（非专利文献 2）。

[0009] 即，作为在生物体内存在的指标的血液样品和尿样品中含有的雌马酚为 S- 雌马酚，特异性地测定 S- 雌马酚是有用的。

[0010] 专利文献 1：日本特开 2006-296434 号公报

[0011] 非专利文献 1：E.Brouwers 等，Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology，2003 年，第 84 卷，p.577-588

[0012] 非专利文献 2：K.D.R.Setchell 等，The American Journal of Clinical Nutrition，2005 年，第 81 卷，p.1072-1079

发明内容

[0013] 本发明的目的在于构筑在使用了免疫法、即免疫测定的雌马酚的测定方法中，特异性且精确地测定 S- 雌马酚的方法。此外，本发明的目的在于构筑在使用了免疫法的雌马酚的浓度测定中，可特异性且精确地测定 S- 雌马酚的试剂盒。进而，本发明的目的在于构筑判定受试者的雌马酚产生能力的方法。

[0014] 作为显著影响免疫测定的性能的因素，可以举出标准物质或竞争物质、与测定对象物的同一性或相似性，所述标准物质用于由试样中的测定对象物与其结合对的反应求出浓度，所述竞争物质用于竞争反应。

[0015] 因此，通过使用 S- 雌马酚作为用于制成用于求出测定值的标准曲线的标准物质，提高了测定值的精确性。

[0016] 此外，在使用了竞争免疫反应的免疫测定中，通过使用标记过 的 S- 雌马酚作为竞争反应物，抑制了非特异反应，与使用了 S- 雌马酚和 R-- 雌马酚的混合物时相比，扩大了能够精确测定的范围。

[0017] 本发明是基于该发现进一步反复研究而完成的。

[0018] 即，本发明包括以下构成。

[0019] 1. 一种利用免疫法测定生物样品中的雌马酚的方法，其特征在于，使用 S- 雌马酚作为抗原，所述抗原为选自由用于制作标准曲线的标准抗原和与生物样品中的雌马酚竞争的标记抗原组成的组中的至少一种。

[0020] 2. 如 1 所述的方法，其中，将抗雌马酚抗体作为一次抗体 (primary antibody) 使用，将相对于 S- 雌马酚的交叉反应性设定为 100％时，所述抗雌马酚抗体相对于黄豆苷元的交叉反应性为 10％以下，相对于染料木黄酮的交叉反应性为 10％以下，相对于黄豆黄素的交叉反应性为 10％以下，相对于二氢黄豆苷元的交叉反应性为 20％以下，以及相对于脱氢雌马酚的交叉反应性为 20％以下。

[0021] 3. 如 1 所述的方法，其中，所述标记抗原的标记物为选自由酶、放射性同位素、色素、荧光物质、胶乳和金属胶体组成的组中的至少一种。

[0022] 4. 如 1 所述的方法，其中，所述免疫法为选自由 ELISA 法、放射免疫测定法和免疫层析法组成的组中的至少一种。

[0023] 5. 如 1 所述的方法，其中，所述生物样品为选自由尿和血液组成的组中的至少一种。

[0024] 6. 如 1 所述的方法，其特征在于，在不对所述生物样品中的雌马酚的偶联物 (conjugate) 进行去偶联 (deconjugate) 处理的情况下进行测定。

[0025] 7. 一种用于利用免疫法测定生物样品中的雌马酚的试剂盒，其特征在于，含有 S- 雌马酚作为抗原，所述抗原为选自由用于制作标准曲线的标准抗原和与样品中的雌马酚竞争的标记抗原组成的组中的至少一种。

[0026] 8. 如 7 所述的试剂盒，其中，还含有抗雌马酚抗体作为一次抗体，将相对于 S- 雌马酚的交叉反应性设定为 100％时，所述抗雌马酚抗体相对于黄豆苷元的交叉反应性为 10％以下，相对于染料木黄酮的交叉反应性为 10％以下，相对于黄豆黄素的交叉反应性为 10％以下，相对于二氢黄豆苷元的交叉反应性为 20％以下，以及相对于脱氢雌马酚的交叉反应性为 20％以下。

[0027] 9. 如 7 所述的试剂盒，其中，所述免疫法为选自由 ELISA 法、放射免疫测定法和免

疫层析法组成的组中的至少一种。

[0028] 10. 如 7 所述的试剂盒，其中，所述生物样品为选自由尿和血液组成的组中的至少一种。

[0029] 11. 一种判定受试者的雌马酚产生能力的方法，包括下述步骤，

[0030] 步骤 (1) ：利用使用 S- 雌马酚作为抗原的免疫法，测定来自摄取了大豆异黄酮的受试者的生物样品中的雌马酚，所述抗原选自由用于制作标准曲线的标准抗原和与生物样品中的雌马酚竞争的标记抗原组成的组中的至少一种 ；和

[0031] 步骤 (2) ：基于在所述步骤 (1) 中得到的雌马酚的测定值，判定受试者的雌马酚产生能力。

[0032] 12. 如 11 所述的判定方法，其特征在于，在所述步骤 (1) 中，在不对生物样品中的雌马酚的偶联物进行去偶联处理的情况下进行测定。

[0033] 通过实施本发明的测定方法，在利用免疫测定测定生物样品中的雌马酚的方法中，可抑制非特异反应，得到精确的测定结果。此外，通过本发明的试剂盒，可进一步简便地实施该方法。此外，通过本发明的判定方法，可精确且简便地判定受试者是否具有雌马酚产生能力。

[0034] 此外，通过本发明测定的雌马酚浓度与利用 HPLC 法测定的雌马酚浓度显示高相关性。此外，根据本发明，其检测时间也仅为 3 小时左右，与需要 72 小时、或受托时约 2 周的 HPLC 法相比，可迅速地测定雌马酚浓度。此外，虽然本发明的试剂盒与 HPLC 法相比非常廉价，但也可得到与 HPLC 法同等程度的检测灵敏度。

[0035] 此外，由于根据本发明，可精确、简便、迅速且高特异性地掌握受试者的雌马酚产生能力的有无及其程度，所以基于该测定结果和判定结果，可掌握与雌马酚产生能力的欠缺相关的疾病（例如乳癌、前列腺癌、更年期障碍、绝经后的骨质疏松症・高脂血症・高血压症等）的发病可能性和症状程度，可适当地实施该疾病的预防和改善方案。

附图说明

[0036] [图 1] 图 1 为由 HPLC 法和由实施例 1 测定的结果的相关图。图中，纵轴表示由 ELISA 法得到的值，横轴表示由 HPLC 法得到的值，单位均为 ng/ml。

[0037] [图 2] 图 2 为由 HPLC 法和由实施例 2 测定的结果的相关图。图中，纵轴表示由 ELISA 法得到的值，横轴表示由 HPLC 法得到的值，单位均为 ng/ml。

[0038] [图 3] 图 3 为由 HPLC 法和由实施例 3 测定的结果的相关图。图中，纵轴表示由 ELISA 法得到的值，横轴表示由 HPLC 法得到的值，单位均为 ng/ml。

[0039] [图 4] 图 4 为由 HPLC 法和由比较例测定的结果的相关图。图中，纵轴表示由 ELISA 法得到的值，横轴表示由 HPLC 法得到的值，单位均为 ng/ml。

[0040] [图 5] 图 5 为 ELISA 法中的竞争法的模型图。

[0041] [图 6] 图 6 为由 LC/MS/MS 和由试验例 3 中记载的本发明的免疫测定方法测定雌马酚浓度的结果的相关图。

[0042] [图 7] 图 7 表示使用 HPLC 法测定的尿中的黄豆苷元浓度。

[0043] [图 8] 图 8 表示 EQL ELISA 与 Log E/D ratio 的图。

具体实施方式

[0044] 以下对本发明进行说明。

[0045] 1. 利用免疫法测定生物样品中的雌马酚的方法

[0046] 本发明的利用免疫法测定生物样品中的雌马酚的浓度的方法（以下，有时将其记为免疫测定方法）的特征在于，使用 S- 雌马酚作为抗原，所述抗原为选自由用于制作标准曲线的标准抗原和与生物样品中的雌马酚竞争的标记抗原组成的组中的至少一种。下面对本发明的免疫测定方法进行说明。

[0047] 用于制备抗 S- 雌马酚抗体的免疫抗原

[0048] 由于作为本发明的测定对象的雌马酚为低分子的半抗原，所以其自身不具有免疫原性。因此，为了得到用于免疫测定方法的抗体，优选合成雌马酚与抗原支持物质的结合体来制备免疫抗原。

[0049] 作为上述抗原支持物质，只要是可制备上述免疫抗原就没有限制，优选高分子物质（分子量 1 万以上、优选 5 万～ 100 万），其中，优选蛋白质。作为优选的蛋白质的例子，可以举出抗体、牛血清白蛋白 (BSA)、酪蛋白、明胶、铁蛋白等，但并不限于此。

[0050] 此外，使半抗原与抗原支持物质结合的方法只要是它们能够结合就没有限制，优选共价结合。

[0051] 在共价结合的情况下，例如，在使用蛋白质作为抗原支持物质的情况下，可利用 N- 羟基琥珀酰亚胺活化酯法，使导入至半抗原的琥珀酰亚胺基与蛋白质或糖蛋白的氨基反应，使半抗原与抗原支持物质结合。此外，此时，作为其他方法，可举出戊二醛法等。

[0052] 此外，在半抗原与抗原支持物质结合时，为了扩大半抗原与抗原支持物质之间的距离，可通过在向半抗原中导入间隔化合物后与抗原支持物质结合，从而改变与抗体的亲和性、抗体的特异性。

[0053] 作为间隔化合物的例子，只要是可通过间隔化合物将半抗原与抗原支持物质结合的间隔物就没有限制，此外，只要是可改变与上述抗体的亲和性、抗体的特异性的间隔物就没有限制，可以举出羧基甲基醚 (CME)、羧基丙基醚 (CPE)、羧基丁基醚 (CBE)、羧基苯基醚 (CPhE) 等，优选举出 CME。

[0054] 作为通过间隔化合物将半抗原与抗原支持物质结合的例子，可以举出下述雌马酚 -CME- 蛋白质，除此之外，可以举出雌马酚 - CPE- 蛋白质、雌马酚 -CBE- 蛋白质、雌马酚 -CPhE- 蛋白质等。雌马酚 -CME- 蛋白质可如下述实施例那样进行制备，其他的具备间隔化合物的免疫抗原可根据使用的间隔物的种类，由本领域技术人员适当地制备。

[0055] 标记半抗原

[0056] 对于检测抗体的存在的标记半抗原，可通过使用标记物来代替上述抗原支持物质，按照相同方式来制备，可通过向半抗原与标记物之间导入间隔化合物，调节与检测的抗体的亲和性。

[0057] 作为标记物，只要是不妨碍抗原抗体反应即可，可以使用现有公知的标记物。作为标记物，可以举出酶、放射性同位素、色素、荧光物质、胶乳、金属胶体、铕、吖啶酯等，优选从由酶、放射性同位素、色素、荧光物质、胶乳和金属胶体组成的组中选择。此外，作为酶，可以举出过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光素酶等；作为放射性同位素，可以举出 ^{125}I 等；作为色素，可以举出花青类色素等；作为荧光物质，可以举出 FITC、cy3、cy5 等；作为胶乳，可以举

出聚苯乙烯胶乳、磁性胶乳等；作为金属胶体，可以举出金、银、铂等。上述标记物中，从可容易地进行高灵敏度的检测这样的优点考虑，优选举出酶，更优选举出过氧化物酶，特别优选举出辣根过氧化物酶。

[0058] 此外，作为用于半抗原与标记物的结合的间隔化合物，可以举出羧基甲基醚(CME)、羧基丙基醚(CPE)、羧基丁基醚(CBE)、羧基苯基醚(CPhE)等，优选举出CPE。

[0059] 抗体：一次抗体

[0060] 对于本发明中使用的一次抗体，只要是可与雌马酚特异性地结合就没有限制，可使用多克隆抗体，也可使用单克隆抗体。此外，只要维持与雌马酚的特异性，也可使用其抗体片段作为一次抗体。此外，也可使用抗血清作为一次抗体。

[0061] 免疫测定方法中使用的一次抗体可通过实施公知的方法来制备。例如，该一次抗体可如下制备，但制备方法不限于以下的例子。

[0062] 即，多克隆抗体可通过如下方法制备：将使雌马酚与抗原支持物质结合的免疫抗原与弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant)混和来制备免疫剂，多次定期地对兔、山羊、马、绵羊、豚鼠、鸡等皮下和/或皮内注射所制备的免疫剂，然后得到抗血清，将得到的抗血清纯化或稀释等。作为免疫抗原，可以举出上述物质，佐剂的使用并非必须，但优选使用佐剂。抗血清可按照现有公知的方法采集来制备。作为本发明中使用的一次抗体，优选使用兔抗血清。

[0063] 单克隆抗体可通过如下方法制备：将使雌马酚与抗原支持物质结合的免疫抗原与弗氏完全佐剂混和来制备免疫剂，多次定期地对小鼠、大鼠等皮下和/或皮内注射所制备的免疫剂，然后，单独地静脉内注射或腹腔内注射上述免疫抗原，数日后，将由摘出的脾脏制备的脾细胞和骨髓瘤细胞融合，选择培养融合细胞。

[0064] 对增殖后的融合细胞进行克隆化培养，选定产生与雌马酚特异性结合的IgG抗体的细胞株。可通过对培养所选定的细胞株而得到的培养上清进行纯化或稀释等来制备用于测定的单克隆抗体。与多克隆抗体相同，作为免疫抗原，可以举出上述物质，佐剂的使用并非必须，但优选使用佐剂。

[0065] 期待本发明中使用的一次抗体相对于S-雌马酚的特异性高，相对于其他的结构类似的异黄酮的交叉反应性低。特别是，由于黄豆苷元、二氢黄豆苷元和脱氢雌马酚是导致生物样品中的雌马酚误检测的主要原因，所以期待使用相对于这些化合物的交叉反应性低的一次抗体。具体而言，作为本发明中使用的一次抗体，当将相对于S-雌马酚的交叉反应性设为100％时，期待其相对于黄豆苷元、染料木黄酮、黄豆黄素、二氢黄豆苷元、和脱氢雌马酚的交叉反应性满足下述范围：

[0066] 相对于黄豆苷元的交叉反应性：10％以下，优选1％以下，更优选0.1％以下；

[0067] 相对于染料木黄酮的交叉反应性：10％以下，优选1％以下，更优选0.1％以下；

[0068] 相对于黄豆黄素的交叉反应性：10％以下，优选1％以下，更优选0.1％以下；

[0069] 相对于二氢黄豆苷元的交叉反应性：20％以下，优选5％以下，更优选1.1％以下；和

[0070] 相对于脱氢雌马酚的交叉反应性：20％以下，优选5％以下，更优选1％以下。

[0071] 上述交叉反应性可如下说明。即，上述交叉反应性表示以下比例：相对于可抑制20％的标记化过的S-雌马酚向抗雌马酚抗体的结合反应的各异黄酮类等的浓度(IC_{20})的、

可抑制20％的标记化过的S-雌马酚向抗雌马酚抗体的结合反应的未标记的S-雌马酚的浓度（IC_{20}）的比例（％）。更具体而言，将标记化过的S-雌马酚单独向抗体的结合设为100的情况下，在该标记化过的S-雌马酚与未标记的S-雌马酚的竞争反应中，求出该标记化过的S-雌马酚向抗体的结合为80时的、该未标记的S-雌马酚的浓度。同样地，对于未标记的各种异黄酮类等，进行与该标记化过的S-雌马酚的竞争反应，求出该标记化过的S-雌马酚向抗体的结合为80时的、各种异黄酮类等的浓度。

[0072] 将以百分比形式表示的如上所述得到的未标记的S-雌马酚的浓度（IC_{20}）、与各种异黄酮类等的浓度（IC_{20}）之比作为交叉反应性。由下式表示。

[0073] 交叉反应性（％）＝（S-雌马酚的IC_{20}/各种异黄酮类等的IC_{20}）×100

[0074] 此处，该交叉反应率使用ELISA中的竞争法确定，使用S-雌马酚作为用于制作标准曲线的标准抗原和与生物样品中的雌马酚竞争的标记抗原。

[0075] 此外，在该交叉反应率的确定中使用的标记化过的S-雌马酚的浓度可被适当设定为在竞争法中可高灵敏度地测定抗原的条件。作为标记物，可以举出上述酶。

[0076] 更具体而言，例如，该交叉反应率可按照与下述的试验例2相同的步骤确定。

[0077] 通过使用具备上述特异性的一次抗体，并且使用S-雌马酚作为标准抗原和/或与生物样品中的雌马酚竞争的标记抗原，可更高精度地检测生物样品中的雌马酚。

[0078] 抗体：二次抗体

[0079] 本发明中使用的二次抗体（secondary antibody）为与上述一次抗体特异地结合的抗体，该二次抗体可按照公知的方法来制备。

[0080] 当使用兔抗体或兔抗血清作为一次抗体时，优选使用山羊抗兔IgG抗体作为二次抗体。

[0081] 此外，也可利用生物素-抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白的结合，此种情况下，例如，可制备生物素化一次抗体，使该生物素、与固定化在固相上的抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白结合。

[0082] 标准抗原、和与生物样品中的雌马酚竞争的标记抗原

[0083] 此外，在本发明中，使用利用上述方法制备出的抗体测定生物样品中的雌马酚时，通过使用S-雌马酚作为用于制作标准曲线的标准抗原和/或与试样中的雌马酚竞争的标记抗原，可得到精确的雌马酚的测定值。即，在本发明中，使用S-雌马酚作为用于制作标准曲线的标准抗原和与试样中的雌马酚竞争的标记抗原中的至少一种，但从提高生物样品中的雌马酚的测定精度的观点考虑，优选使用S-雌马酚作为用于制作标准曲线的标准抗原和与试样中的雌马酚竞争的标记抗原双方。

[0084] 作为上述标记抗原的标记物，只要是不妨碍抗原抗体反应，就可以使用现有公知的标记物。作为标记物，可以举出酶、放射性同位素、色素、炭光物质、胶乳、金属胶体、铕、吖啶酯等，优选从由酶、放射性同位素、色素、荧光物质、胶乳和金属胶体组成的组中进行选择。此外，作为酶，可以举出过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光素酶等；作为放射性同位素，可以举出^{125}I等；作为色素，可以举出花青类色素等；作为荧光物质，可以举出FITC、cy3、cy5等；作为胶乳，可以举出聚苯乙烯胶乳、磁性胶乳等；作为金属胶体，可以举出金、银、铂等。在这些标记物中，从可容易地进行高灵敏度的检测的优点考虑，优选举出酶，更优选举出过氧化物酶，特别优选举出辣根过氧化物酶。

[0085] 出于抗原与标记物的结合的目的，和出于该抗原与抗体的亲和性等的调整的目的，可向该抗原与标记物之间导入间隔化合物。作为用于抗原（S-雌马酚）与标记物的结合的间隔化合物，可以举出羧基甲基醚（CME）、羧基丙基醚（CPE）、羧基丁基醚（CBE）、羧基苯基醚（CPhE）等，优选举出 CPE。

[0086] 生物样品

[0087] 作为测定雌马酚的生物样品，只要是来自包括动植物在内的生物体的试样、可进行雌马酚的测定的样品就没有特别限制，例如，可以举出尿、血液（例如血清，和血浆）、粪便、组织提取物、细胞提取物、食材等。作为生物样品，优选为来自人的生物样品，更优选为来自人的尿和血液，特别优选为来自人的尿。

[0088] 此外，对于用于雌马酚的测定的生物样品，也可根据需要将其稀释。

[0089] 用于对生物样品进行前处理（去偶联）的酶

[0090] 上述生物样品中含有的雌马酚通常以偶联物的形态存在。因此，可在将该生物样品用于抗原抗体反应之前，将其用于用来使雌马酚去偶联的前处理。

[0091] 该去偶联处理可使用 β-glufatase（含有葡糖醛酸酶、硫酸酯酶）、葡糖醛酸酶、硫酸酯酶等酶进行。更具体而言，作为去偶联处理中使用的酶液的优选例子之一，可以举出以 6％ β-glufatase、0.1M 乙酸缓冲液（pH5.5）为主成分的组成。

[0092] 此外，该去偶联处理可在抗原抗体反应之前实施，也可与抗原抗体反应同时实施。该去偶联处理的反应条件可根据使用的酶的种类和生物样品的种类等适当设定，但通常在 25 ～ 56℃下进行 5 分钟至一昼夜。

[0093] 生物样品和／或标准抗原的稀释液

[0094] 对于用于稀释生物样品和标准抗原的稀释液，只要是不给测定带来不良影响就没有限制，可使用一般的免疫法中使用的稀释液。作为本发明中使用的稀释液的优选例子之一，可以举出含有氯化钠、含牛血清白蛋白的磷酸缓冲液（pH7.5）的混合溶液、100％活性炭处理人血清等。更具体而言，作为稀释液，可以举出 150mM 氯化钠、含 1.0％牛血清白蛋白的 0.1M 磷酸缓冲液（pH7.5）的混合溶液。

[0095] 用于测定雌马酚的浓度的免疫法

[0096] 接着，以下给出用于测定雌马酚的免疫法的具体例，但本发明的本质并不受这些例子的限制。

[0097] 在本发明中，作为用于测定雌马酚的免疫法，只要是可通过利用了上述抗原和抗体的抗原抗体反应，测定生物样品中的雌马酚的浓度就没有限制，例如，可以举出 ELISA 法、放射免疫测定法和免疫层析法等。

[0098] 当使用 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 法作为免疫法时，生物样品中的雌马酚的测定可按照现有公知的 ELISA 的方法进行，也可为竞争法、夹心法、直接法中的任一种。优选竞争法作为 ELISA 法。作为参考，图 5 中给出了 ELISA 法中的竞争法的模型。

[0099] 例如，当采用竞争法时，利用 ELISA 法的生物样品中的雌马酚的测定例如可如下进行：向预先固相化有二次抗体的微量培养板的孔中添加生物样品、酶标记过的抗原（标记抗原）和一次抗体并使其反应，形成二次抗体－一次抗体－雌马酚的结合体。此外，一次抗体可与生物样品和标记抗原同时添加，也可分别添加。反应后，用洗涤液洗涤孔，加入对

应于上述酶的底物并使其反应，然后，通过反应终止液等使反应终止，测定吸光度，由按照相同方法测定标准抗原得到的标准曲线算出试样中的雌马酚浓度。

[0100] 此种情况下，微量培养板可使用现有公知的微量培养板，对于其孔的大小和形状，只要是可实施上述反应就没有限制。此外，二次抗体向孔的固相化可利用现有公知的方法实施。此外，对于底物，使用适于该酶的现有公知的底物即可。

[0101] 此外，在该竞争法中，对于一次抗体、二次抗体、标记抗原的添加量，只要是可利用该方法精确地测定生物样品中的雌马酚就没有限制，可根据一般的 ELISA 法的条件适当设定。此外，即使是 ELISA 法之外的免疫法，一次抗体、二次抗体、标记抗原的添加量也可同样地根据现有公知的条件适当设定。

[0102] ELISA 法中的各反应按照现有公知的条件进行即可，可根据生物样品的种类和 ELISA 法的方法等适当设定。例如，当为竞争法时，用于形成二次抗体 - 一次抗体 - 雌马酚的结合体的抗原抗体反应通常在 4 ～ 37℃下进行 5 分钟至一昼夜。

[0103] 更具体而言，对于利用 ELISA 法（竞争法）的尿中雌马酚的测定，向尿样品中加入样品稀释液来制备稀释尿样品液，向预先固相化有山羊抗兔 IgG 抗体（二次抗体）的微量培养板的孔中，加入制备出的稀释尿样品液、辣根过氧化物酶标记雌马酚和稀释过的抗雌马酚兔抗血清（一次抗体）并反应一定时间。反应后，洗涤孔，加入显色底物液并反应一定时间，一定时间后，终止反应，测定吸光度，由按照相同方法测定标准抗原而得到的标准曲线算出试样中的雌马酚浓度。

[0104] 对于用于稀释抗血清的缓冲液（抗血清稀释缓冲液），只要是可合适地稀释抗血清且不给测定带来不良影响就没有限制。作为本发明中使用的抗血清稀释缓冲液的优选例子之一，可以举出含有氯化钠、牛血清白蛋白、含 Tween20 的磷酸缓冲液 (pH7.5) 等的混合溶液。更具体而言，作为抗血清稀释缓冲液，可以举出 150mM 氯化钠、0.5％牛血清白蛋白、含 0.01％ Tween20 的 0.1M 磷酸缓冲液 (pH7.5) 的混合溶液。该抗血清稀释缓冲液不仅可应用于竞争法，而且可在除竞争法之外的 ELISA 法、进而在各种免疫法中使用。需要说明的是，Tween 是注册商标。

[0105] 利用 RIA(Radioimmunoassay) 法的生物样品中的雌马酚的测定也可按照现有公知的方法进行，除了使用放射性同位素作为标记物 之外，可按照与上述 ELISA 法相同的方法实施。以下举出使用尿作为生物样品、使用 ^{125}I 作为放射性同位素的 RIA 法。

[0106] 向尿样品中加入样品稀释液制备稀释尿样品液，向预先固相化有山羊抗小鼠 IgG 抗体的微量培养板的孔中加入制备出的稀释尿样品液、^{125}I 标记 S- 雌马酚和稀释过的抗雌马酚抗体产生细胞培养上清并反应一定时间。反应后，在洗涤孔之后，测定微量培养板的孔的放射性活度，由按照相同方法测定标准抗原而得到的标准曲线算出试样中的雌马酚浓度。

[0107] 利用免疫层析 (immunochromatography) 法的生物样品中的雌马酚的测定也可按照现有公知的方法进行。作为使用尿作为生物样品、使用胶体金作为标记物的免疫层析法，可以举出以下的方法。即，向尿样品中加入胶体金标记抗雌马酚小鼠单克隆抗体来制备稀释尿样品液，向免疫层析试条的样品垫部滴加稀释尿样品液并反应一定时间。反应后，测定固定化有雌马酚的捕捉部的、依赖于胶体金标记物的着色，由按照相同方法测定标准抗原而得到的标准曲线算出试样中的雌马酚浓度。

[0108] 此外，作为使用标记过的抗体测定生物样品中的雌马酚的方法，如下所述：将结合有抗原支持物质的雌马酚或其类似物固相化，与用荧光物质标记过的抗雌马酚兔多克隆抗体和生物样品混合，由此荧光物质与生物样品中的测定对象物质竞争而与固相结合，将上述荧光物质洗涤之后进行测定，由按照相同方法测定标准抗原而得到的标准曲线算出试样中的雌马酚浓度。

[0109] 此外，作为使用标记过的抗体片段测定生物样品中的雌马酚的方法，已知有开放式夹心法 (open sandwich ELISA)。对于该测定方法，例如，可使用抗雌马酚小鼠单克隆抗体的轻链抗原结合部位片段和重链抗原结合部位片段来测定生物体中的雌马酚，可通过形成插入有生物样品中的雌马酚的聚合物来测定。

[0110] 具体而言，将轻链抗原结合部位片段固相化，与用碱性磷酸酶标记过的重链抗原结合部位片段和生物样品混合，由此，在洗涤后 测定通过生物样品中的雌马酚与固相结合后的碱性磷酸酶活性，由按照相同方法测定标准抗原而得到的标准曲线算出试样中的雌马酚浓度。

[0111] 此外，用不同的荧光物质标记轻链抗原结合部位片段与重链抗原结合部位片段，通过生物样品中的雌马酚形成复合物，由此产生荧光共振能量转移现象，测定该荧光共振能量转移现象，由按照相同方法测定标准抗原而得到的标准曲线算出试样中的雌马酚浓度。

[0112] 作为本发明的优选方式之一，可以举出 ELISA 法作为免疫法，更优选举出通过竞争法进行的 ELISA 法，特别优选举出使用 S- 雌马酚作为用于制作标准曲线的标准抗原和与试样中的雌马酚竞争的标记抗原双方、通过竞争法进行的 ELISA 法。

[0113] 2. 用于利用免疫法测定生物样品中的雌马酚的浓度的试剂盒

[0114] 本发明的用于利用免疫法测定生物样品中的雌马酚的浓度的试剂盒的特征在于，含有 S- 雌马酚作为抗原，所述抗原为由用于制作标准曲线的标准抗原和与试样中的雌马酚竞争的标记抗原组成的组中的至少一种。本发明的试剂盒还可以含有特异地结合 S- 雌马酚的一次抗体。

[0115] 此外，本发明的试剂盒也可根据需要进一步含有选自由生物样品和 / 或标准抗原的稀释液、用于对试样中的 S- 雌马酚的偶联物进行去偶联处理的酶液、固相化有二次抗体的培养板 (plate)、和洗涤液组成的组中的至少一种。

[0116] 此外，根据采用的免疫法的种类，本发明的试剂盒也可含有其他必要试剂。例如，当用于通过竞争法进行的 ELISA 法时，可进一步含有选自由标记抗原的标记物的底物、用于终止标记物与底物的反应的反应终止液、和用于溶解底物的溶解液组成的组中的至少一种。

[0117] 此外，当在本发明的试剂盒中使用抗血清时，也可含有用于稀释该抗血清的抗血清稀释缓冲液。

[0118] 以下，对本发明的试剂盒中可具有的各试剂进行说明。

[0119] 标准抗原

[0120] 作为标准抗原，可同样地使用上述抗原。该标准抗原可以以溶液的形式包含在试剂盒中。例如，当使用 S- 雌马酚作为标准抗原时，可以是含有 S- 雌马酚、氯化钠、含牛血清白蛋白的磷酸缓冲液 (pH7.5) 的标准雌马酚溶液的形式。作为标准雌马酚溶液，例如，可以

举出含有 810ng/mL S- 雌马酚、150mM 氯化钠、含 0.1％牛血清白蛋白的 0.01M 磷酸缓冲液 (pH7.5) 的混合溶液。此外，作为其他的标准雌马酚溶液，可以举出 S- 雌马酚和 100％活性炭处理人血清的混合溶液等。

[0121] 标记抗原

[0122] 作为标记抗原，可同样地使用上述的标记抗原。优选举出过氧化物酶标记 S- 雌马酚，特别优选举出辣根过氧化物酶标记 S- 雌马酚。

[0123] 标记物的底物

[0124] 作为标记物的底物，可使用现有公知的底物，可以以与现有公知的标记物的组合的形式使用。例如，为辣根过氧化物酶时，可以举出将过氧化氢作为底物。该底物优选在溶解在下述的溶解液中之后使用。

[0125] 溶解液

[0126] 使用溶解液的目的在于根据需要进行溶解。对于该溶解液，只要是可合适地溶解底物、且不给测定带来不良影响就没有限制，可使用现有公知的缓冲液，可以举出柠檬酸缓冲液、乙酸缓冲液等。该溶解液可以以预先含有底物的形式提供。

[0127] 当底物为上述过氧化氢时，将在溶解液中溶解 OPD（邻苯二胺二盐酸盐）所得的溶液用作底物液。作为优选方式之一，可以举出含有 0.05％过氧化氢水溶液、含 2.2mg/mL OPD（邻苯二胺二盐酸盐）的 50mM 柠檬酸缓冲液 (pH5.5) 的底物液。

[0128] 抗体：一次抗体

[0129] 作为一次抗体，可同样地使用上述的一次抗体。优选使用抗血 清，更优选使用兔抗血清。该抗血清可根据需要在用下述的抗血清溶解缓冲液稀释后使用。该抗血清可以以用该抗血清稀释缓冲液稀释的状态包含于试剂盒中。

[0130] 抗体：二次抗体

[0131] 作为二次抗体，可同样地使用上述的二次抗体。当使用兔抗体或兔抗血清作为一次抗体时，优选使用山羊抗兔 IgG 抗体作为二次抗体。此外，当采用 ELISA 法中的竞争法时，优选将二次抗体固相化于微量培养板的孔中。该微量培养板可使用现有公知的微量培养板，固相化可按照现有公知的方法实施即可。

[0132] 抗血清稀释缓冲液

[0133] 使用抗血清稀释缓冲液的目的在于根据需要将上述的抗血清稀释。该抗血清稀释缓冲液只要是可合适地稀释抗血清且不给测定带来不良影响就没有限制，可同样地使用上述抗血清稀释缓冲液。该抗血清稀释缓冲液可以以稀释了抗血清的状态包含于试剂盒中。

[0134] 用于对生物样品进行前处理（去偶联）的酶液

[0135] 作为用于对生物样品进行前处理（去偶联）的酶液，可同样地使用上述酶液。

[0136] 生物样品和 / 或标准抗原的稀释液

[0137] 作为生物样品（样品）和标准抗原的稀释液，可同样地使用上述稀释液。

[0138] 用于终止标记物质与底物的反应的反应终止液

[0139] 用于终止标记物质与底物的反应的反应终止液只要是可终止这些反应、且不给测定结果带来影响就没有限制，可使用现有公知的反应终止液。作为反应终止液，可以举出硫酸、盐酸、硝酸等。

[0140] 洗涤液

[0141] 使用洗涤液的目的在于：在抗原抗体反应结束后，在注入底物之前，将剩余的生物样品和抗体等从孔等中除去。该洗涤液只要是可合适地进行洗涤、且不给测定带来不良影响就没有限制，可使用现有公知的洗涤液，可直接使用，也可用纯化水等稀释进行使用。作为洗涤液，可以举出纯化水、用缓冲液稀释表面活性剂而得到的溶液等。

[0142] 此外，本发明的试剂盒中也可含有记载有使用该试剂盒的流程的说明书、稀释用的培养板、培养板密封带等。此外，为了着色，也可进一步向试剂盒中含有的上述溶液中添加色素。

[0143] 作为本发明的试剂盒的测定对象的生物样品可以举出上述生物样品。此外，使用该试剂盒实施的免疫法也可举出上述方法，优选为 ELISA 法，在 ELISA 法中，优选竞争法。

[0144] 本试剂盒中的上述抗体、抗原、溶液等的含量只要是可测定生物样品中的雌马酚浓度就没有限制，如上所述，可根据以 ELISA 法为代表的免疫法的一般条件适当设定。

[0145] 3. 判定受试者的雌马酚产生能力的方法

[0146] 本发明的判定受试者的雌马酚产生能力的方法（以下，有时记为判定方法）包括下述步骤，步骤 (1)：利用使用 S- 雌马酚作为抗原的免疫法，测定来自摄取了大豆异黄酮的受试者的生物样品中的雌马酚，所述抗原选自由用于制作标准曲线的标准抗原和与生物样品中的雌马酚竞争的标记抗原组成的组中的至少一种；和步骤 (2)：基于在上述步骤 (1) 中得到的雌马酚的测定值，判定受试者的雌马酚产生能力。以下，对本发明的判定方法的各步骤进行说明。

[0147] 步骤 (1)

[0148] 在本步骤 (1) 中，利用使用 S- 雌马酚作为抗原的免疫法，测定来自摄取了大豆异黄酮的受试者的生物样品中的雌马酚，所述抗原选自由用于制作标准曲线的标准抗原和与生物样品中的雌马酚竞争的标记抗原组成的组中的至少一种。

[0149] 用于本步骤 (1) 的生物样品为来自摄取了大豆异黄酮的受试者的生物样品。由于雌马酚为大豆异黄酮的活性代谢物，所以存在下述倾向：对于未摄取大豆异黄酮的受试者来说，即使在具有雌马酚产生能力时，也不能检出雌马酚或其测定值非常低。因此，有必要让受试者预先摄取大豆异黄酮。对于让受试者摄取的大豆异黄酮的量，没有特别限制，例如，可以举出大豆异黄酮的总量为 20 ～ 70mg，优选 25 ～ 50mg 左右。此外，对于摄取大豆异黄酮的时间，没有特别限制，例如，可以举出在生物样品采集前的 3 天中的每天摄取或在生物样品采集前 6 ～ 24 小时、优选在生物样品采集前 8 ～ 12 小时摄取。让受试者摄取的大豆异黄酮可以使用以豆浆、大豆异黄酮片、大豆条、纳豆、豆腐、煮大豆、毛豆、黑豆、天贝等大豆制品的形式存在的物质。

[0150] 用于本步骤 (1) 的生物样品可以是尿、血液（血清、血浆）、粪便等任一种，优选为尿、血液，更优选为尿。

[0151] 本步骤 (1) 中的利用免疫法的雌马酚的测定按照上述的“1. 利用免疫法测定生物样品中的雌马酚的方法”进行。

[0152] 步骤 (2)

[0153] 在本第 2 步骤中，基于由上述步骤 (1) 得到的雌马酚的测定值，判定受试者的雌马酚产生能力。

[0154] 在本步骤 (2) 中，将在上述步骤 (1) 中检测到雌马酚的生物样品的受试者判定为

具有雌马酚产生能力，另外将在上述步骤 (1) 中未检测到雌马酚的生物样品的受试者判定为不具有雌马酚产生能力。

[0155] 需要说明的是，在本步骤 (2) 中，为了抑制在判定雌马酚产生能力的有无时的误判定，优选对测定的雌马酚的浓度是否低于截断值进行判定。即，若测定出的生物样品的雌马酚的浓度低于截断值，则判定该生物样品的受试者没有雌马酚产生能力，若测定出的生物样品的雌马酚的浓度在截断值以上，则判定该生物样品的受试者具有雌马酚产生能力。截断值可按照如下方式设定。

[0156] 1. 利用上述免疫法测定生物样品中的雌马酚浓度。

[0157] 2. 测定同一生物样品中的黄豆苷元浓度。该测定使用现有的测定方法 (HPLC 法、GC-MS 法等) 进行测定。

[0158] 3. 对于每份生物样品，算出雌马酚浓度相对于黄豆苷元浓度的对 数比。

[0159] 由于雌马酚为黄豆苷元的代谢产物，所以通过算出该对数值，就可以掌握在生物体内产生了何种程度的雌马酚。

[0160] 4. 利用 HPLC 法，测定生物样品中的 S- 雌马酚浓度和黄豆苷元。

[0161] 5. 基于上述 4 的测定值，对于每份生物样品，算出雌马酚浓度相对于黄豆苷元浓度的对数比。

[0162] 6. 将依据由上述 5 得到的对数比设定的标准值、与由上述 3 得到的对数比进行比较，对于上述 3，分类为产生雌马酚 / 未产生雌马酚的结果。基于此确定雌马酚未产生者 / 雌马酚产生者的误判定率为最低的雌马酚浓度，将该浓度设为截断值。

[0163] 对于上述 6，具体而言，例如，将由 HPLC 法算出的对数比为低于 -1.75 时判定为雌马酚未产生者、为 -1.75 以上时判定为雌马酚产生者的情况下，将该值 (-1.75) 作为标准值 (例如，Setchell and Co，2006)。然后，对照该标准值与由上述 3 得到的对数比，同样地如下进行分类 ：若低于 -1.75 则为雌马酚未产生者，若为 -1.75 以上则为雌马酚产生者。而后，对照该分类与由上述 1 测定的雌马酚浓度，以上述分类为基准，确定雌马酚未产生者 / 产生者的误判定率为最低的雌马酚浓度，将该浓度设定为截断值。

[0164] 此外，在本步骤 (2) 中，可如下判定 ：对于在上述步骤 (1) 中检测到高浓度的雌马酚的生物样品的受试者，判定为雌马酚产生能力高，此外，对于在上述第 (1) 步骤中检测到低浓度的雌马酚的生物样品的受试者，判定为雌马酚产生能力低。

[0165] 实施例

[0166] 已知雌马酚存在 S- 雌马酚和 R- 雌马酚两种光学异构体，在生物体内的存在仅限于前者 S- 雌马酚。因此，作为测定方法，寻求特异性地、精确地测定 S- 雌马酚的方法。因此，对给利用竞争免疫法的测定带来影响的标准抗原和标记抗原进行研究。

[0167] 以下对进行了评价的测定方法及其结果进行说明。

[0168] < 试验例 1>

[0169] • 实施例 1

[0170] 利用使用 S- 雌马酚作为标记抗原和标准抗原的测定试剂盒的测定

[0171] 1. 生物样品

[0172] 使用尿作为生物样品。生物样品数为 5。

[0173] 2. 抗雌马酚兔抗血清溶液的制备 (一次抗体)

[0174] 免疫抗原的合成

[0175] 将100mg的雌马酚溶解于400μL的DMSO中，加入58μL的溴乙酸甲酯和140mg的K_2CO_3，在25℃下反应4小时。反应结束后，用盐酸调节至酸性，然后用乙酸乙酯进行萃取，脱水后蒸发干固。

[0176] 接着，使用氯仿甲醇（19 ： 1）作为展开溶剂，在薄层色谱（1.05717、默克日本公司）上展开分离，仅对1分子的雌马酚中导入了1分子的CME(carboxymethylether)-甲基酯的级分进行回收。

[0177] 向回收的每一分子结合后的雌马酚-CME-甲基酯中加入8N的氢氧化钠，在50℃下加热20分钟。在加热后使用盐酸调节至酸性，然后使用乙酸乙酯进行萃取，蒸发干固得到雌马酚-CME-酸。

[0178] 向得到的2mg雌马酚-CME-酸中加入1.5mg的N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）、1.5mg的水溶性碳二亚胺（WSC），将该混合物溶解于20μL的DMSO中，在25℃下反应1小时，得到雌马酚-CME-NHS。

[0179] 向20mg/mL的BSA溶液（将牛血清白蛋白20mg溶解于50mM碳酸缓冲液(pH9.7)1mL中而得）250μL中添加雌马酚-CME-NHS(10mg/mL DMF溶液)10μL，在25℃下反应30分钟。反应结束后，利用凝胶过滤除去未反应物，制成雌马酚-CME-BSA抗原的原液。

[0180] 抗血清的制备

[0181] 将合成的免疫抗原雌马酚-CME-BSA(2.5mg/mL)与弗氏完全佐剂等量混和，制备免疫剂。使用该免疫剂在兔背部数个位置进行皮下注射，每3周一次，1mL/次。从免疫开始后第12周开始采血，每3周一次，5次部分采血后采集全血。采血后的抗血清的抗体效价 示于表1。用抗血清稀释缓冲液适当稀释由所述采集全血得到的抗血清，将其用于下述试验。

[0182] 需要说明的是，此处，将可利用现有公知的方法检测抗体的抗血清的最大稀释倍数作为抗体效价。该稀释使用下述的抗血清稀释缓冲液进行。

[0183] [表1]

[0184] 每次采血的抗血清的抗体效价

[0185]

抗血清	采血1	采血2	采血3	采血4	采血5	采血6（采集全血）
No.11	49,000	80,000	130,000	160,000	200,000	280,000

[0186] 3. 山羊抗兔IgG抗体（二次抗体）和该抗体固相化培养板的制备

[0187] 向96孔微量培养板的各孔中加入10μg/mL的山羊抗兔IgG抗体溶液100μL。在4℃下静置2晚，然后，抽吸（suction）除去山羊抗兔IgG抗体溶液。

[0188] 向抽吸除去了溶液的96孔微量培养板的各孔中加入0.5mg/mL的牛血清白蛋白溶液300μL。在4℃下静置18小时，然后，抽吸除去牛血清白蛋白溶液，真空干燥，制成山羊抗兔IgG抗体固相化培养板。

[0189] 4. 辣根过氧化物酶标记S-雌马酚（与生物样品中的雌马酚竞争的标记抗原）的制备

[0190] 将100mg的S-雌马酚(S-equol)溶解于400μL的DMSO中,加入58μL的4-溴正丁酸和140mg的K_2CO_3,在25℃下反应4小时。反应结束后,使用盐酸调节至酸性,然后使用乙酸乙酯进行萃取,在脱水后蒸发干固。

[0191] 接着,使用氯仿甲醇(19∶1)作为展开溶剂,在薄层色谱(1.05717,默克日本公司)上进行展开分离,仅对1分子的S-雌马酚中导入了1分子的CPE(carboxypropylether)-甲基酯的级分进行回收。

[0192] 向回收的每一分子结合后的S-雌马酚-CPE-甲基酯中加入8N的氢氧化钠,在50℃下行加热20分钟。在加热后使用盐酸调节至酸性,然后使用乙酸乙酯进行萃取,蒸发干固得到S-雌马酚-CPE-酸。

[0193] 向得到的S-雌马酚-CPE-酸2mg中加入1.5mg的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、1.5mg的水溶性碳二亚胺(WSC),将该混合物溶解于20L的DMSO中,在25℃下反应1小时,得到S-雌马酚-CPE-NHS。

[0194] 向20mg/mL的HRP溶液(将辣根过氧化物酶20mg溶解于50mM碳酸缓冲液(pH9.7)1mL中而得)250μL中添加S-雌马酚-CPE-NHS(10mg/mL DMF溶液)10μL,在25℃下反应30分钟。反应结束后,利用凝胶过滤除去未反应物,制成辣根过氧化物酶标记S-雌马酚溶液的原液(标记抗原液)。

[0195] 5.标准抗原

[0196] 使用S-雌马酚作为标准抗原。需要说明的是,使用0、30、90、270或810ng/mL S-雌马酚和100%活性炭处理人血清的混合溶液的标准雌马酚溶液。

[0197] 6.生物样品稀释液、标准抗原稀释液

[0198] 作为生物样品(样品)和标准抗原的稀释液,使用100%活性炭处理人血清(SERACON II∶CD INTERGEN公司)。

[0199] 7.抗血清稀释缓冲液的组成

[0200] 将含有150mM氯化钠、0.5%牛血清白蛋白、0.01% Tween20的0.1M磷酸缓冲液(pH7.5)作为抗血清稀释缓冲液。需要说明的是,Tween为注册商标。

[0201] 8.洗涤液的组成

[0202] 将含有100mM氯化钠、0.025% Tween20的0.3mM磷酸缓冲液(pH7.5)制成洗涤液。

[0203] 9.酶液的组成

[0204] 将含有6% β-glufatase(Nippon Biotest Laboratories制)的0.1M乙酸缓冲液(pH5.5)作为酶液。

[0205] 10.底物

[0206] 将含有0.05%过氧化氢水溶液、2.2mg / mL OPD(邻苯二胺二盐酸盐)的50mM柠檬酸缓冲液(pH5.5)作为底物(底物液)。

[0207] 11.反应终止液

[0208] 将3N硫酸作为反应终止液。

[0209] 12.使用生物样品的雌马酚的测定

[0210] 向尿样品20μL中加入样品稀释液200μL,制备11倍稀释尿样品。向抗兔IgG山羊抗体固相化培养板的孔中加入11倍稀释尿样品20μL、酶和标记抗原的混合液50μL(相对于标记抗原液1份,酶液10份),搅拌后在25℃下静置30分钟。然后,加入抗雌马酚兔

抗血清溶液 50μL，搅拌后在 25℃下静置 1 小时。

[0211] 从山羊抗兔 IgG 抗体固相化培养板的孔中除去反应溶液，然后使用洗涤液洗涤 3 次孔。洗涤后，向山羊抗兔 IgG 抗体固相化培养板的孔中加入底物 100μL，在 25℃下静置 30 分钟。然后，向山羊抗兔 IgG 抗体固相化培养板的孔中加入反应终止液 100μL，测定波长 490nm 的吸光度，由按照同样方法测定的、使用标准稀释液制备的标准抗原的稀释系列得到的标准曲线算出试样中的雌马酚浓度。

[0212] • 实施例 2

[0213] 利用使用 S- 雌马酚作为标记抗原的测定试剂盒的测定

[0214] 与实施例 1 相比，除了将“标准抗原”从 S- 雌马酚改为雌马酚（S- 雌马酚和 R- 雌马酚的混合物）之外，按照与实施例 1 相同的方法实施。

[0215] • 实施例 3

[0216] 利用使用 S- 雌马酚作为标准抗原的测定试剂盒的测定

[0217] 如下所述，与实施例 1 相比，除了将“辣根过氧化物酶标记 S- 雌马酚的制备”中的 S- 雌马酚改为雌马酚（S- 雌马酚和 R- 雌马酚的混合物）之外，按照与实施例 1 相同的方法实施。

[0218] 辣根过氧化物酶标记雌马酚的制备

[0219] 将 100mg 的雌马酚（Equol）溶解于 400μL 的 DMSO 中，加入 58μL 的 4- 溴正丁酸和 140mg 的 K_2CO_3，在 25℃下反应 4 小时。反应结束后，使用盐酸调节至酸性，然后使用乙酸乙酯进行萃取，在脱水后蒸发干固。

[0220] 接着，使用氯仿甲醇（19 ：1）作为展开溶剂，在薄层色谱（1.05717，默克日本公司）上进行展开分离，仅对 1 分子的雌马酚中导入了 1 分子的 CPE(carboxypropylether)- 甲基酯的级分进行回收。

[0221] 向回收的每一分子结合后的雌马酚 -CPE- 甲基酯中加入 8N 的氢氧化钠，在 50℃下加热 20 分钟。在加热后使用盐酸调节至酸性，然后使用乙酸乙酯进行萃取，蒸发干固得到雌马酚 -CPE- 酸。

[0222] 向得到的雌马酚 -CPE- 酸 2mg 中加入 1.5mg 的 N- 羟基琥珀酰亚胺（NHS）、1.5mg 的水溶性碳二亚胺（WSC），将该混合物溶解于 20μL 的 DMSO 中，在 25℃下反应 1 小时，得到雌马酚 -CPE-NHS。

[0223] 向 20mg/mL 的 HRP 溶液（将辣根过氧化物酶 20mg 溶解于 50mM 碳酸缓冲液 (pH9.7)1mL 而得）250μL 中，添加雌马酚 -CPE-NHS(10mg/mL DMF 溶液）10μL，在 25℃下反应 30 分钟。反应结束后，利用凝胶过滤除去未反应物，制成辣根过氧化物酶标记雌马酚溶液的原液。

[0224] • 比较例

[0225] 利用使用雌马酚作为标记抗原和标准抗原的测定试剂盒的测定

[0226] 与实施例 1 相比，将“标准抗原”的 S- 雌马酚改为实施例 2 中记载的雌马酚，将“辣根过氧化物酶标记 S- 雌马酚的制备”中的 S- 雌马酚改为实施例 3 中记载的雌马酚，除此之外，按照与实施例 1 相同的方法实施。

[0227] • 实施例 4

[0228] 与 HPLC 法的测定值的比较（一组样品 (Panel Sample)）

[0229] 对采用 HPLC 法测定的雌马酚浓度已知的 5 份尿样品，通过实施例 1、实施例 2、实施例 3 和比较例进行测定，结果示于表 2，将利用 HPLC 法的测定值设为 100％的各测定值的比例示于表 3。

[0230] [表 2]

[0231] 5 份尿试样的测定值 (ng/mL)

[0232]

	HPLC	实施例 1	实施例 2	实施例 3	比较例
尿样品 A	507	541	659	808	418
尿样品 B	1,775	1,703	2,175	1,844	906
尿样品 C	4,008	3,961	5,044	5,353	2,385
尿样品 D	8,360	7,436	9,332	7,691	3,251
尿样品 E	12,540	11,447	13,230	12,315	4,877

[0233] [表 3]

[0234] 5 份尿试样的测定值与 HPLC 法的比例（％）

[0235]

	实施例 1	实施例 2	实施例 3	比较例
尿样品 A	107	130	159	82
尿样品 B	96	123	104	51
尿样品 C	99	126	134	60
尿样品 D	89	112	92	39
尿样品 E	91	106	98	39

[0236] 由比较例得到的测定结果与由 HPLC 法得到的测定结果之比为 39 ～ 82％，相对于此，实施例 1、实施例 2 和实施例 3 中，分别为 89 ～ 107％、106 ～ 130％和 92 ～ 159％，通过使用 S- 雌马酚作为标准抗原和 / 或标记抗原，缩小了与 HPLC 法的测定值的偏差。

[0237] • 实施例 5

[0238] 与 HPLC 法的相关（测定值）

[0239] 按照与实施例 1、实施例 2、实施例 3 和比较例相同的方法对采 用 HPLC 法测定的雌马酚浓度已知的 50 份尿样品进行测定，将测定的结果与由 HPLC 法得到的测定结果的相关图分别示于图 1、图 2、图 3 和图 4。该尿样品如下获得 : 让受试者在前一天摄取大豆异黄酮 (以异黄酮苷元计为 26mg)，使用清晨第一次尿。

[0240] 在由比较例得到的测定结果中，相关系数 r ＝ 0.973，相关性高，回归方程的斜率为 0.664，接近于由 HPLC 法得到的测定值的一半。

[0241] 另一方面，在由实施例 1 得到的测定结果中，相关系数 r ＝ 0.974，相关性高，回归方程的斜率为 1.067，与 HPLC 法等同。因此判断与比较例相比实施例 1 精确性高。

[0242] 需要说明的是，在由实施例 2 得到的测定结果中，相关系数 r ＝ 0.987，相关性高，回归方程的斜率为 1.594，比由 HPLC 法得到的测定值高。

[0243] 需要说明的是，在由实施例 3 得到的测定结果中，相关系数 r ＝ 0.973，相关性高，回归方程的斜率为 1.712，比由 HPLC 法得到的测定值高。由图 (图 3) 可见，测定结果的偏差大，特别是在测量值为高值时，可确认到测定值的偏差，

[0244] < 试验例 2>

[0245] 交叉反应性

[0246] 在本试验例中，对采用 ELISA 法中的竞争法、并且使用 S- 雌马酚作为标准抗原和

标记抗原时的、一次抗体的交叉反应性进行研究。具体而言，按照如下方式对交叉反应性进行研究。

[0247] 1. 试样

[0248] 用 100％活性炭处理人血清溶解下述的表 4 所示的各种异黄酮类等制成试样。

[0249] 2. 一次抗体

[0250] 与实施例 1 相同，使用抗雌马酚兔抗血清作为一次抗体。将该抗血清用下述的抗血清稀释缓冲液适当稀释之后用于试验。

[0251] 3. 二次抗体

[0252] 与实施例 1 相同，使用山羊抗兔 IgG 抗体作为二次抗体。按照 与实施例 1 相同的方法将该抗体固相化，制成山羊抗兔 IgG 抗体固相化培养板。

[0253] 4. 与生物样品中的雌马酚竞争的标记抗原

[0254] 与实施例 1 相同，使用辣根过氧化物酶标记 S- 雌马酚作为标记抗原。

[0255] 5. 标准抗原

[0256] 与实施例 1 相同，使用 S- 雌马酚作为标准抗原。需要说明的是，使用 0、30、90、270 和 810ng/mL S- 雌马酚以及 100％活性炭处理人血清的混合溶液的标准雌马酚溶液。

[0257] 6. 试样和标准抗原稀释液

[0258] 使用 100％活性炭处理人血清作为试样和标准抗原的稀释液。

[0259] 7. 抗血清稀释缓冲液

[0260] 将含有 150mM 氯化钠、0.5％牛血清白蛋白、0.01％ Tween20 的 0.1M 磷酸缓冲液 (pH7.5) 作为抗血清稀释缓冲液。

[0261] 8. 洗涤液

[0262] 使用含有 100mM 氯化钠、0.025％ Tween20 的 0.3mM 磷酸缓冲液 (pH7.5) 作为洗涤液。

[0263] 9. 酶液

[0264] 使用含有 6％ β -glufatase(Nippon Biotest Laboratories 制）的 0.1M 乙酸缓冲液 (pH5.5) 作为酶液。

[0265] 10. 底物

[0266] 使用含有 0.05％过氧化氢水溶液、2.2mg/mL OPD（邻苯二胺二盐酸盐）的 50mM 柠檬酸缓冲液 (pH5.5) 作为底物（底物液）。

[0267] 11. 反应终止液

[0268] 使用 3N 硫酸作为反应终止液。

[0269] 12. 交叉反应性的研究步骤

[0270] 制备各种异黄酮类等和未标记的 S- 雌马酚的浓度稀释系列，对于各异黄酮类等和未标记的 S- 雌马酚，分别测定浓度为 0 至加入了过量时的竞争反应的吸光度。将此处得到的各测定值与由标准抗原 (S- 雌马酚）的稀释系列得到的标准曲线进行对照，基于算出的各值比较反应抑制，确定对标记化过的 S- 雌马酚向抗雌马酚抗体的结合反应抑制 20％的各异黄酮类等的浓度和未标记的 S- 雌马酚的浓度 (IC_{20})。

[0271] 该竞争反应按照与实施例 1 相同的步骤，使用 ELISA 中的竞争法进行。此外，使用辣根过氧化物酶作为标记物。

[0272] 将如上所述得到的各种异黄酮类等的浓度、与未标记的 S- 雌马酚的浓度之比用百分数表示，将所得的值作为交叉反应性。将其用下式表示。

[0273] 交叉反应性（%）＝ (S- 雌马酚的 IC_{20}/ 各种异黄酮类等的 IC_{20})×100

[0274] 结果如表 4 所示。

[0275] [表 4]

[0276]

异黄酮类等	交叉率
S- 雌马酚	100%
R- 雌马酚	13.24%
黄豆苷元	0.08%
染料木黄酮	0.05%
黄豆黄素	0.03%
Glycitin	0.02%
雌二醇	0.01%
黄豆苷	0.06%
染料木苷	0.06%
鹰嘴豆素 A	0.11%
芒柄花黄素	0.21%
二氢黄豆苷元	1.03%
芹菜苷元	0.00%
毛地黄黄酮	0.00%
去氢雌马酚	0.33%

[0277] 由该结果可知，对于该一次抗体的交叉反应性，相对于与 S- 雌马酚的交叉反应性为 100%，与 R- 雌马酚的交叉反应性为 13.24%，与雌马酚的代谢前的黄豆苷元的交叉反应性为 0.08%，与二氢黄豆苷元的交叉反应性为 1.03%，与脱氢雌马酚的交叉反应性为 0.33%，与黄豆苷的交叉反应性为 0.06%，与其他各种物质的交叉反应性也明显较低。这意味着，根据本发明的方法、进而通过本发明的试剂盒，可特异性地检测、测定 S- 雌马酚。

[0278] 此外，例如使用现有公知的 LABMASTER 公司的试剂盒 Labmaster Equol TR-FIA 时，与黄豆苷元的交叉反应率为 0.8%，（参见 http://labmaster.fi/products/tr-fia-kits/epuol-tr-fia.htm），该交叉反应性是本试剂盒的 10 倍。此外，使用 Labmaster Equol TR-FIA 时，与脱氢雌马酚的交叉反应率为 42.3%，与二氢黄豆苷元的交叉反应率为 4.0%，可以说本试剂盒的特异性明显高于现有公知的试剂盒。

[0279] 此外，迄今为止，在使用单克隆抗体的论文 (Duncan C. S. Talbot，等，Clinical Chemistry 53 :748-756，2007) 中，有相对于黄豆苷元的交叉反应率＜ 0.04%的报道，这表明尽管在本发明中使用抗血清作为一次抗体，但也可得到与单克隆抗体同等的特异性。

[0280] ＜试验例 3＞

[0281] 与液相色谱 / 串联质谱仪 (LC/MS/MS) 的相关性

[0282] 在本试验例中，对采用 ELISA 法中的竞争法、并且使用 S- 雌马酚作为标准抗原和标记抗原时与 LC/MS/MS 法的相关性进行研究。具体而言，按照下述方法研究相关性。

[0283] 1. 生物样品

[0284] 使用异黄酮摄取前和摄取后的血清（男性 10 名）作为生物样品。

[0285] 2. 一次抗体

[0286] 与实施例 1 相同，使用抗雌马酚兔抗血清作为一次抗体。将该抗血清用下述的抗

血清稀释缓冲液适当稀释之后用于试验。

[0287] 3. 二次抗体

[0288] 与实施例 1 相同，使用山羊抗兔 IgG 抗体作为二次抗体。按照 与实施例 1 相同的方法将该抗体固相化，制成山羊抗兔 IgG 抗体固相化培养板。

[0289] 4. 与生物样品中的雌马酚竞争的标记抗原

[0290] 与实施例 1 相同，使用辣根过氧化物酶标记 S- 雌马酚和标记抗原液作为标记抗原。

[0291] 5. 标准抗原

[0292] 与实施例 1 相同，使用 S- 雌马酚作为标准抗原。需要说明的是，用标准抗原稀释液将 810ng/mL S- 雌马酚适当稀释，制成标准雌马酚溶液。

[0293] 6. 标准抗原稀释液

[0294] 使用 100％活性炭处理人血清作为标准抗原的稀释液。

[0295] 7. 抗血清稀释缓冲液

[0296] 将含有 150mM 氯化钠、0.5％牛血清白蛋白、0.01％ Tween20 的 0.1M 磷酸缓冲液 (pH7.5) 作为抗血清稀释缓冲液。

[0297] 8. 洗涤液

[0298] 使用含有 100mM 氯化钠、0.025％ Tween20 的 0.3mM 磷酸缓冲液 (pH7.5) 作为洗涤液。

[0299] 9. 酶液

[0300] 将含有 6％ β-glufatase(Nippon Biotest Laboratories 制) 的 0.1M 乙酸缓冲液 (pH5.5) 作为酶液。

[0301] 10. 底物

[0302] 将含有 0.05％过氧化氢水溶液、2.2mg/mL OPD(邻苯二胺二盐酸盐) 的 50mM 柠檬酸缓冲液 (pH5.5) 作为底物 (底物液)。

[0303] 11. 反应终止液

[0304] 将 3N 硫酸作为反应终止液。

[0305] 12. 雌马酚浓度的测定步骤

[0306] 向山羊抗兔 IgG 抗体固相化培养板的孔中，加入血清样品 20μL、酶和标记抗原的混合液 50μL(相对于标记抗原液 1 份，加入酶液 10 份)，搅拌后，在 25℃下静置 30 分钟。然后，加入抗雌马酚 兔抗血清溶液 50μL，搅拌后，在 25℃下静置 1 小时。

[0307] 从山羊抗兔 IgG 抗体固相化培养板的孔中除去反应溶液，然后，使用洗涤液洗涤 3 次孔。洗涤后，向山羊抗兔 IgG 抗体固相化培养板的孔中加入底物 100μL，在 25℃下静置 30 分钟。然后，向山羊抗兔 IgG 抗体固相化培养板的孔中加入反应终止液 100μL，测定波长 490nm 的吸光度，由按照同样方法测定的、使用标准稀释液制备的标准抗原的稀释系列得到的标准曲线算出试样中的雌马酚浓度。

[0308] 此外，使用液相色谱 / 串联质谱仪 (LC/MS/MS) 测定同一生物样品的雌马酚浓度。比较得到的结果。将它们的相关性示于表 5 和图 6。

[0309] [表 5]

[0310]

	LCMSMS(ng/mL)	ELISA(ng/mL)
血清样品 1	3.5	1.0
血清样品 2	2.8	2.0
血清样品 3	21.0	7.8
血清样品 4	35.6	17.9
血清样品 5	50.9	19.0
血清样品 6	49.5	22.8
血清样品 7	63.9	24.9
血清样品 8	55.9	19.2
血清样品 9	78.7	30.2
血清样品 10	121.9	56.3
相关系数		0.984

[0311] 由表 5 可知，由实施例 4 得到的血清样品的测定结果的绝对值低，低于 LC/MS/MS 的一半。由表 5 可知，它们的相关系数高至 0.984。

[0312] <试验例 4>

[0313] S- 雌马酚产生者 / 未产生者的判定 1（截断值的设定）

[0314] 在本试验例中，按照如下方式设定截断值。

[0315] 尿样品如下获得：在前一天晚饭时，让受试者摄取大豆异黄酮（以异黄酮苷元计约 25mg），使用摄取 6 小时以后的早晨第一次尿。对象者人数为 244 人（男性：76 名，女性：168 名），生物样品数为 432。

[0316] 黄豆苷元 (DZN) 浓度的测定结果示于图 7。DZN 浓度使用 HPLC 法测定。由于在前一天摄取异黄酮，所以可在早上第一次尿中检测到充分量的 DZN，因此，可进行 S- 雌马酚产生者 / 未产生者的判定。

[0317] 接着，使用 ELISA 法，测定尿中雌马酚 (EQL) 浓度 (EQLELISA)。检测限为 330ng/ml。同时，基于 HPLC 法的结果，算出 EQL 浓度相对于 DZN 浓度的对数比 (Log E/D ratio)。图 8 表示 EQLELISA 与 Log E/D ratio 的图。需要说明的是，Log E/D ratio 以 -1.75(Kenneth D.R.Stechell and Sindey J.cole, J.Nutr.136 :2188-2193, August 2006) 为基准值，将 -1.75 以上判断为 S- 雌马酚产生者，将低于 -1.75 判断为未产生者。

[0318] 基于此，研究了雌马酚产生者 / 未产生者的误判定率最低的雌马酚浓度、即截断值。研究结果示于表 6。需要说明的是，在 HPLC 法中，判断为产生者的生物样品数为 377，判断为未产生者的生物样品数为 55。

[0319] [表 6]

[0320]

截断值（ng/ml）	① 将未产生者判定为产生者的误判定 未产生者样品数：55		② 将产生者判定为未产生者的误判定 产生者样品数：377		误判定总计 总样品数：432	
	样品数	误判定率（%）	样品数	误判定率（%）	样品数	总计误判定率（%）
330	23	41.8	2	0.5	25	42.3
400	16	29.1	4	1.1	20	30.2
450	14	25.5	5	1.3	19	26.8
500	11	20.0	8	2.1	19	22.1
550	9	16.4	11	2.9	20	19.3
600	8	14.5	15	4.0	23	18.5
650	5	9.1	17	4.5	22	13.6
700	4	7.3	20	5.3	24	12.6
750	3	5.5	25	6.6	28	12.1
800	2	3.6	29	7.7	31	11.3
850	2	3.6	31	8.2	33	11.9
900	2	3.6	35	9.3	37	12.9
950	1	1.8	39	10.3	40	12.2
1000	0	0.0	45	11.9	45	11.9

[0321] 由表 6 可知，当雌马酚浓度为 800ng/ml 时，雌马酚产生者 / 未产生者的误判定率最低。因此，此时，将截断值设定为 800ng/ml。

[0322] < 试验例 5>

[0323] S- 雌马酚产生者 / 未产生者的判定 2（截断值的设定）

[0324] 按照与试验例 4 相同的方法，设定用作是 S- 雌马酚产生者还是未产生者的判定标准的截断值。

[0325] 需要说明的是，免疫测定方法中的生物样品数为 713。此外，将检测限以下的值设为“0”。研究结果如表 7 所示。

[0326] [表 7]

[0327]

截断值（ng/ml）	① 将未产生者判定为产生者的误判定 未产生者样品数：337		② 将产生者判定为未产生者的误判定 产生者样品数：376		误判定总计 总样品数：713	
	样品数	误判定率（%）	样品数	误判定率（%）	样品数	总计误判定率（%）
330	63	18.9	1	0.3	64	19.2
400	45	13.6	3	0.8	48	14.4
450	35	10.7	4	1.1	39	11.7
500	29	8.6	7	1.9	36	10.4
550	22	6.5	10	2.7	32	9.2
600	18	5.3	14	3.7	32	9.0
650	13	3.8	16	4.3	29	8.1
700	11	3.3	19	5.1	30	8.3
750	9	2.7	24	6.4	33	9.0
800	6	1.8	28	7.4	34	9.2
850	5	1.5	30	8.0	35	9.5
900	4	1.2	34	9.0	38	10.2
950	3	0.9	38	10.1	41	11.0
1000	1	0.3	44	11.7	45	12.0
1050	1	0.3	47	12.5	48	12.8
1100	1	0.3	50	13.3	51	13.6
1150	1	0.3	50	13.3	51	13.6
1200	1	0.3	53	14.1	54	14.4
1250	1	0.0	54	14.4	55	14.4

[0328] 由表 7 可知，当雌马酚浓度为 650ng/ml 时，雌马酚产生者 / 未产生者的误判定率最低。因此，这时将截断值设定为 650ng/ml。

[0329] < 试验例 6>

[0330] S- 雌马酚产生者 / 未产生者的判定 3

[0331] 按照与试验例 4 相同的方法，设定用作是 S- 雌马酚产生者还是未产生者的判定标准的截断值。

[0332] 需要说明的是，免疫测定方法中的生物样品数为 118。研究结果如表 8 所示。

[0333] [表 8]

[0334]

截断值（ng/ml）	① 将未产生者判定为产生者的误判定 未产生者样品数：55		② 将产生者判定为未产生者的误判定 产生者样品数：63		误判定总计 总样品数：118	
	样品数	误判定率（%）	样品数	误判定率（%）	样品数	总计误判定率（%）
330	23	41.8	1	1.6	24	43.4
400	16	29.1	1	1.6	17	30.7
450	14	25.5	2	3.2	16	28.6
500	11	20.0	3	4.8	14	24.8
550	9	16.4	3	4.8	12	21.1
600	8	14.5	3	4.8	11	19.3
650	5	9.1	3	4.8	8	13.9
700	4	7.3	3	4.8	7	12.0
750	3	5.5	3	4.8	6	10.2
800	2	3.6	3	4.8	5	8.4
850	2	3.6	3	4.8	5	8.4
900	2	3.6	4	6.3	6	10.0
950	1	1.8	4	6.3	5	8.2
1000	0	0.0	4	6.3	4	6.3

[0335] 由表 8 可知，当雌马酚浓度为 1000ng/ml 时，雌马酚产生者 / 未产生者的误判定率最低。因此，此时，将截断值设定为 1000ng/ml。

[0336] 产业上的可利用性

[0337] 当期待抗雌激素效果、雌激素样效果而摄取大豆加工品时，通过测定尿中、血液中的雌马酚浓度，来判断该效果的有无，但在为了精确地测定雌马酚而使用 HPLC 法等仪器分析的方法中，多样品处理耗费时间和工时，不适于日常测定。

[0338] 但是，根据本发明，可在短时间内且精确地测定尿中、血液中的雌马酚，可类推大豆加工品摄取的效果，包括判断给予产生雌马酚的安全的乳酸菌制剂的效果。

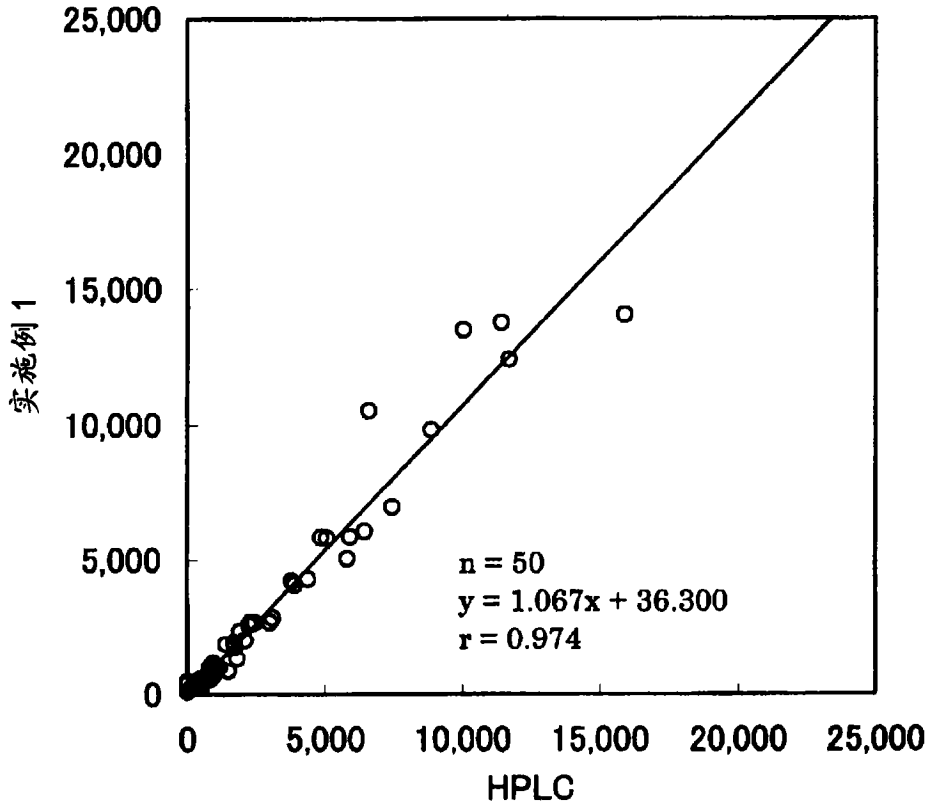

25,000
20,000
15,000
10,000
5,000
0
实施例 1
0
5,000
10,000
15,000
20,000
25,000
HPLC
n = 50
y = 1.067x + 36.300
r = 0.974

图 1

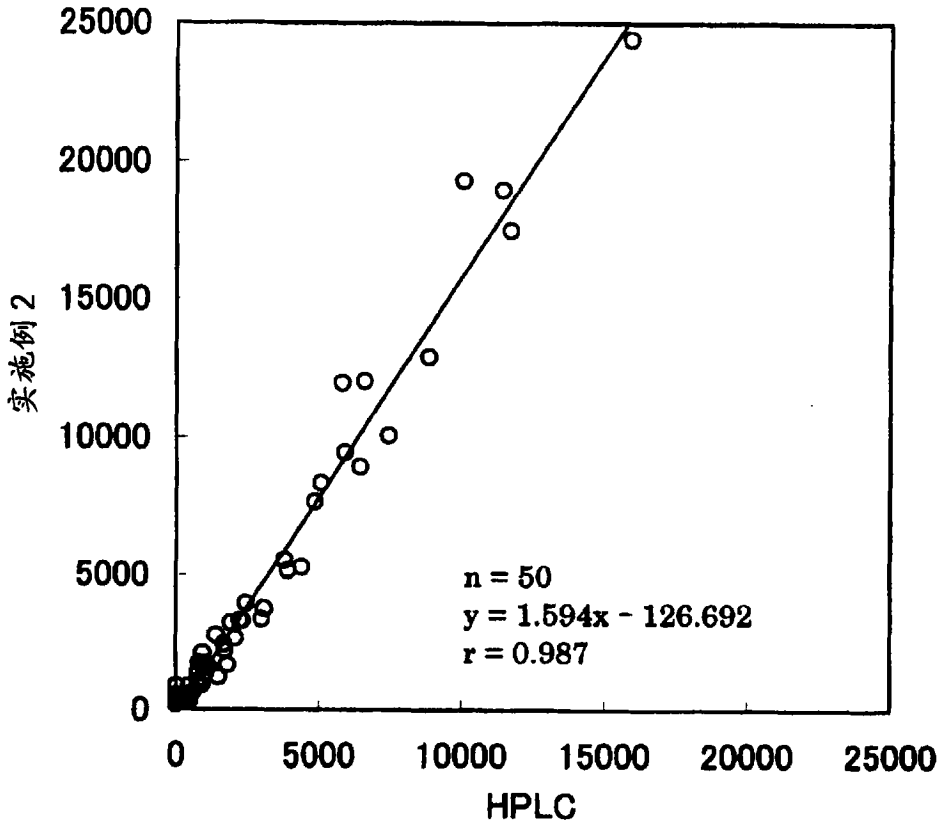

25000
20000
15000
10000
5000
0
实施例2
0
5000
10000
15000
20000
25000
HPLC
n = 50
y = 1.594x - 126.692
r = 0.987

图 2

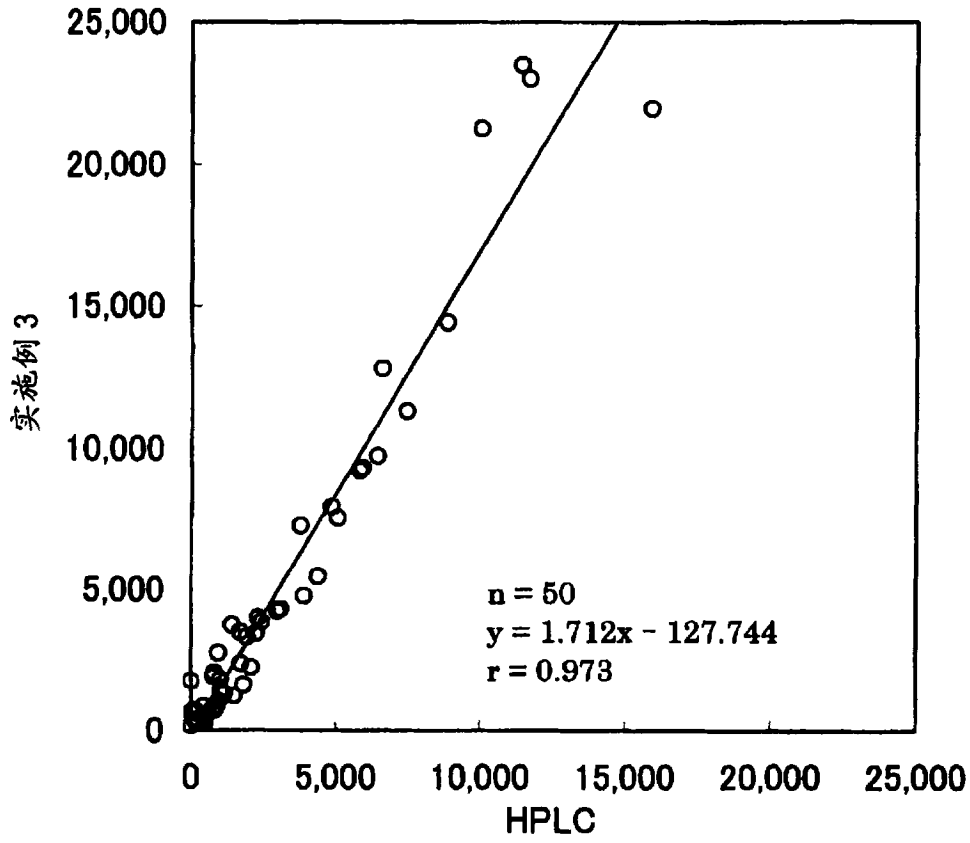

25,000
20,000
15,000
10,000
5,000
0
实施例 3
n = 50
y = 1.712x - 127.744
r = 0.973
0
5,000
10,000
15,000
20,000
25,000
HPLC

图 3

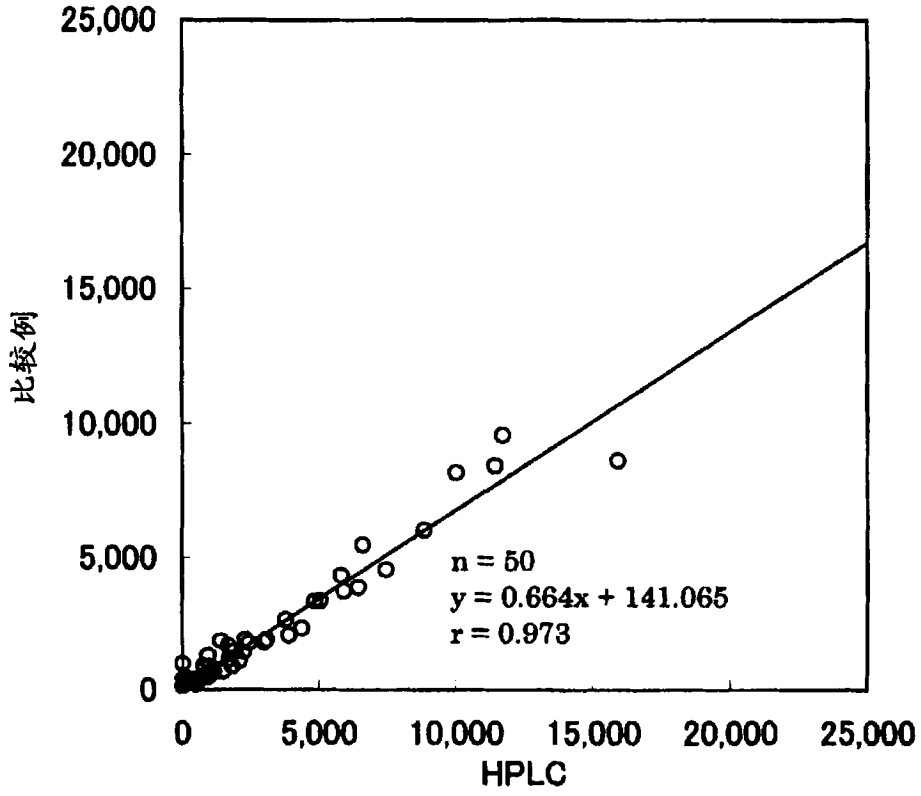

25,000
20,000
15,000
10,000
5,000
0
比较例
n = 50
y = 0.664x + 141.065
r = 0.973
0
5,000
10,000
15,000
20,000
25,000
HPLC

图 4

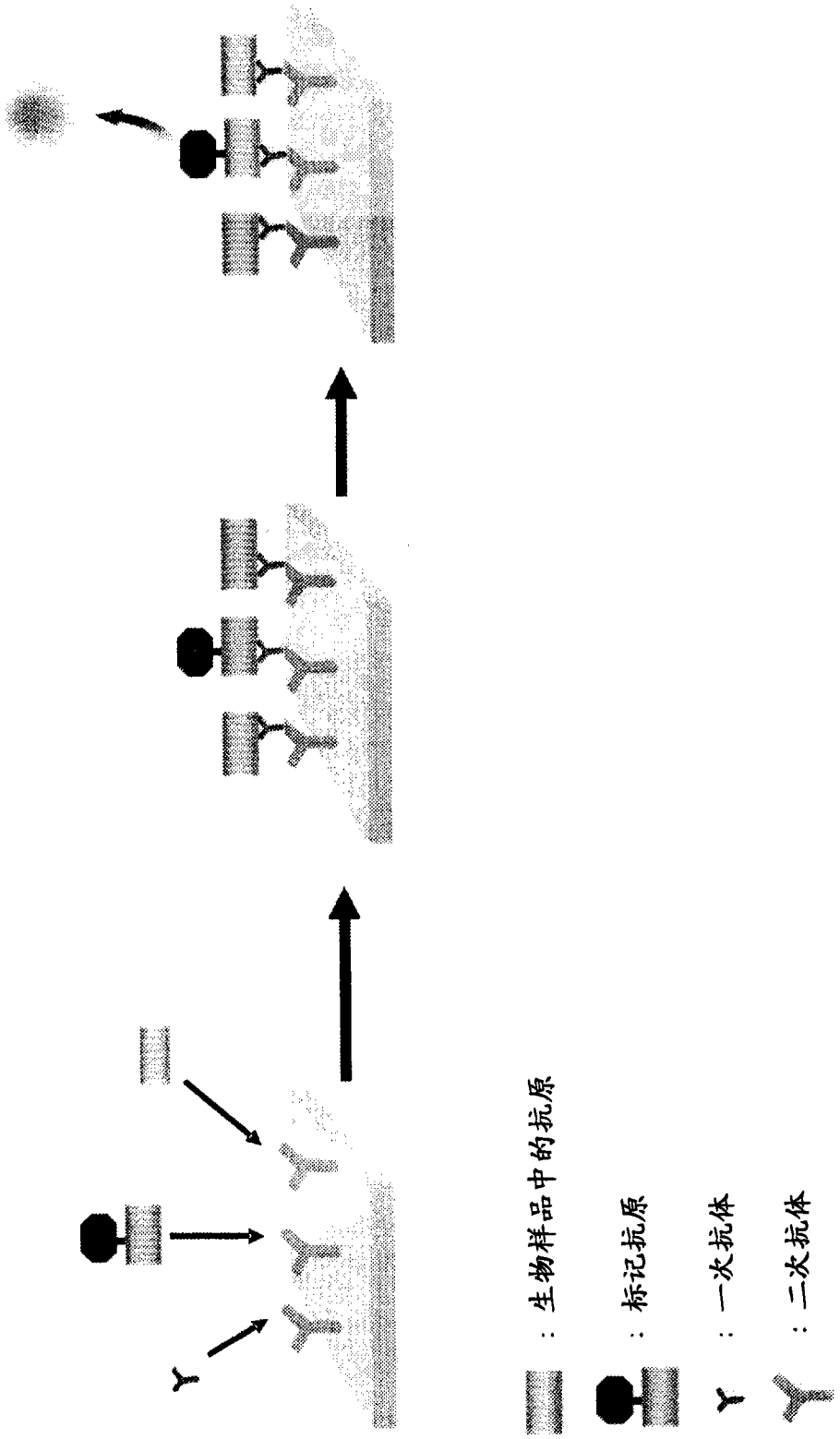


图 5

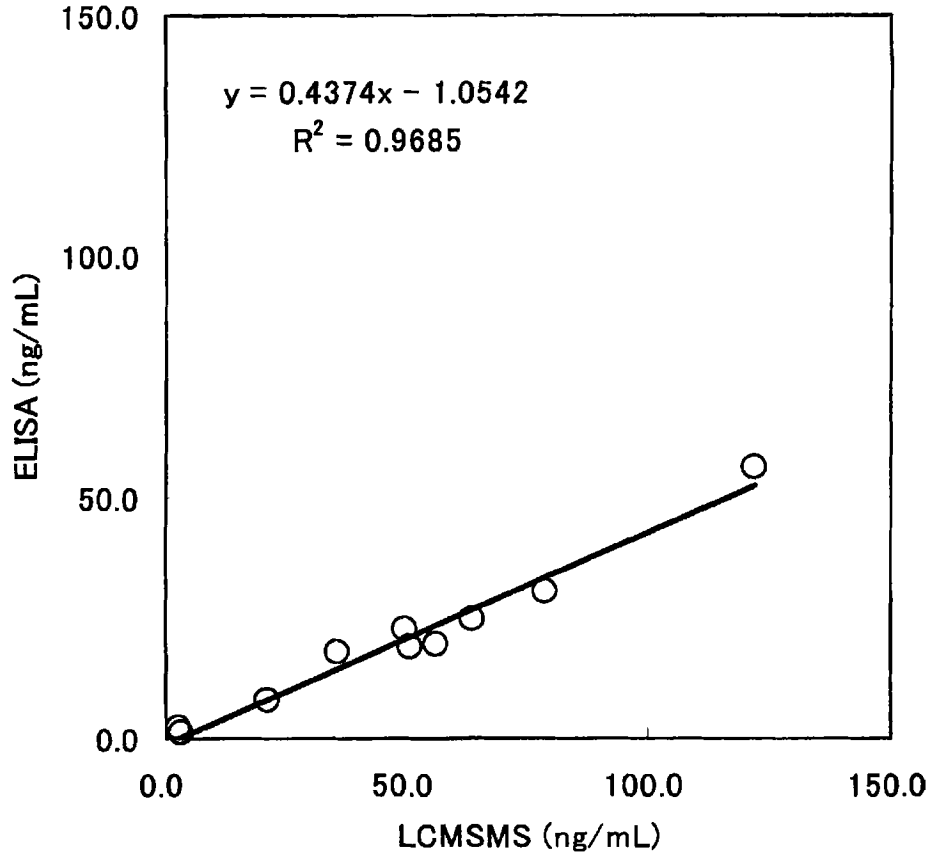

y = 0.4374x - 1.0542
R2 = 0.9685
150.0
100.0
50.0
0.0
ELISA (ng/mL)
0.0
50.0
100.0
150.0
LCMSMS (ng/mL)

图 6

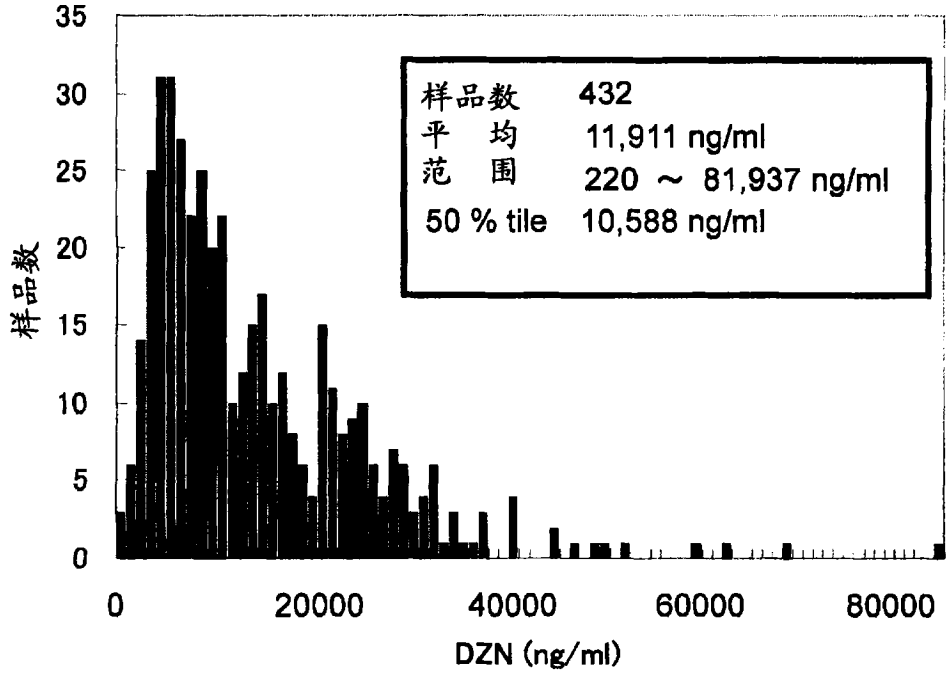

样品数 432
平 均 11,911 ng/ml
范 围 220 ～ 81,937 ng/ml
50 % tile 10,588 ng/ml
35
30
25
20
15
10
5
0
样品数
0
20000
40000
60000
80000
DZN (ng/ml)

图 7

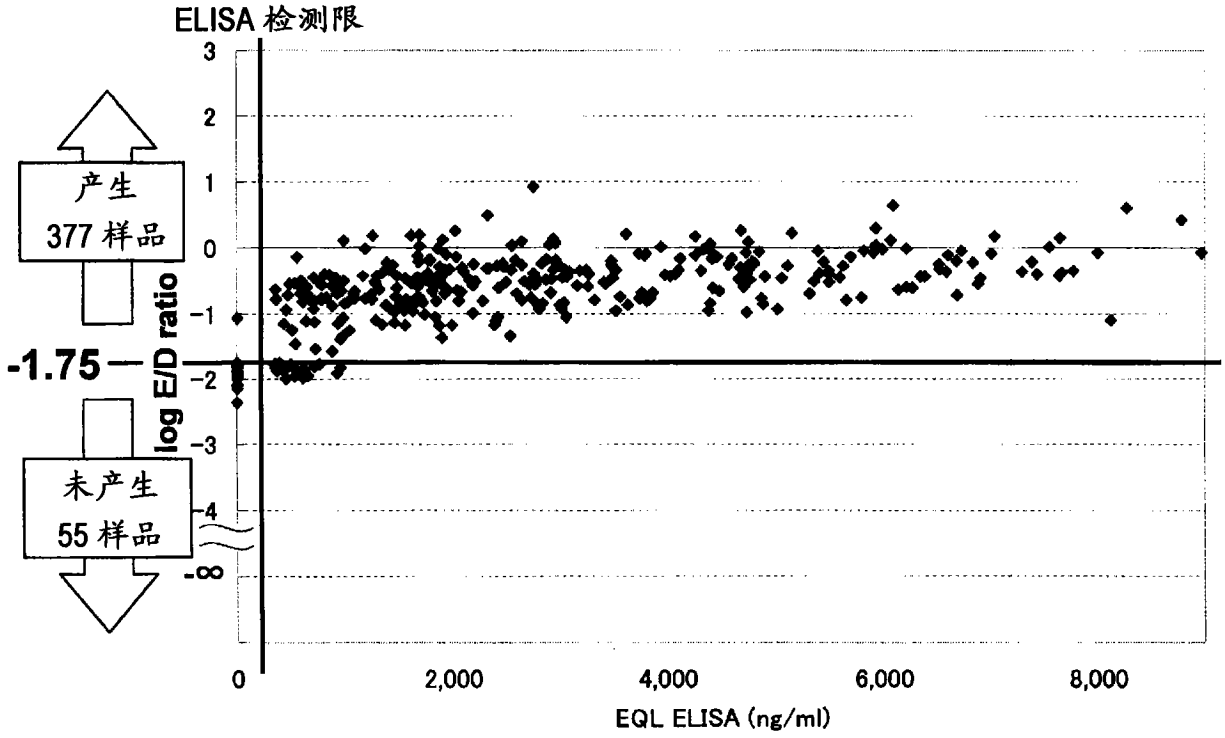

ELISA 检测限
产生
377 样品
-1.75
未产生
55 样品
log E/D ratio
3
2
1
0
-1
-2
-3
-4
-∞
0
2,000
4,000
6,000
8,000
EQL ELISA (ng/ml)

图 8