(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2010 年 11 月 18 日(18.11.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/131660 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/057974

(22) 国際出願日: 2010 年 5 月 11 日(11.05.2010)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2009-114572 2009 年 5 月 11 日(11.05.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 栄研化学株式会社(EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1108408 東京都台東区台東４－１９－９ Tokyo (JP). 大塚製薬株式会社(OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1018535 東京都千代田区神田司町２丁目９番地 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 峰川 貴之(MINEKAWA, Takayuki) [JP/JP]; 〒3240036 栃木県大田原市下石上１３８１－３ 栄研化学株式会社 那須工場内 Tochigi (JP). 新留 久美子(SHINDOME, Kumiko) [JP/JP]; 〒3240036 栃木県大田原市下石上１３８１－３ 栄研化学株式会社 那須工場内 Tochigi (JP). 阿部 克司(ABE, Katsushi) [JP/JP]; 〒3240036 栃木県大田原市下石上１３８１－３ 栄研化学株式会社 那須工場内 Tochigi (JP). 大熊 博(OKUMA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒3240036 栃木県大田原市下石上１３８１－３ 栄研化学株式会社 那須工場内 Tochigi (JP). 安藤 知英子(ANDO, Chieko) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町１－７－１ 大塚製薬株式会社内 Osaka (JP). 阿比留 康弘(ABIRU, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町１－７－１ 大塚製薬株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(Saegusa & Partners); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町１－７－１ 北浜ＴＮＫビル Osaka (JP).

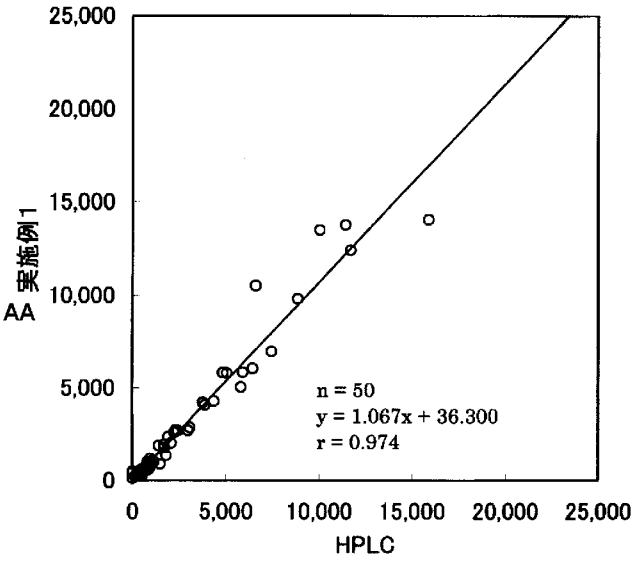
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) **Title**: METHOD FOR MEASUREMENT OF EQUOL IN BIOLOGICAL SAMPLE BY IMMUNOASSAY, KIT FOR THE MEASUREMENT, AND METHOD FOR DETERMINATION OF EQUOL PRODUCTION ABILITY OF SUBJECT

(54) 発明の名称 : 生体試料中のエクオールを免疫法により測定する方法、その測定のためのキット、および被験者のエクオール産生能を判定する方法

[図1]



AA EXAMPLE 1

(57) **Abstract**: Disclosed are: a method for measuring equol in a biological sample by an immunoassay; a kit for the measurement; and a method for determining the equol production ability of a subject. The measurement method is characterized by using S-equol as at least one antigen selected from the group consisting of a standard antigen to be used for the production of a calibration curve and a labeling antigen that competes with equol in the biological sample. The kit is characterized by including S-equol as at least one antigen selected from the group consisting of the standard antigen and the labeling antigen. The determination method is characterized by comprising a step of measuring equol in a biological sample derived from a subject who has ingested soybean isoflavone by an immunoassay using S-equol as at least one antigen selected from the group consisting of the standard antigen and the labeling antigen and a step of determining the equol production ability of the subject based on the measurement value of equol obtained in the previous step.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2010/131660 A1

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

本発明の目的は、生体試料中のエクオールを免疫法により測定する方法、その測定のためのキット、および被験者のエクオール産生能を判定する方法を提供することである。 本発明の測定方法は、検量線の作成に使用する標準抗原および生体試料中のエクオールと競合する標識化抗原からなる群より選択される少なくとも一方の抗原にＳ－エクオールを用いることを特徴とする。本発明のキットは、該標準抗原および該標識化抗原からなる群より選択される少なくとも一方の抗原にＳ－エクオールを含むことを特徴とする。本発明の判定方法は、該標準抗原および該標識化抗原からなる群より選択される少なくとも一方の抗原にＳ－エクオールを用いた免疫法により、大豆イソフラボンを摂食させた被験者由来の生体試料中のエクオールを測定する工程、および該工程で得られたエクオールの測定値に基づいて、被験者のエクオール産生能を判定する工程を含む。

明　細　書

発明の名称 ：

生体試料中のエクオールを免疫法により測定する方法、その測定のためのキット、および被験者のエクオール産生能を判定する方法

技術分野

[0001] 本発明は、生体試料中のエクオールを免疫法により測定する方法、その測定のためのキット、および被験者のエクオール産生能を判定する方法に関する。

背景技術

[0002] 大豆中に含まれるイソフラボンが、乳癌、前立腺癌等に対する予防効果（抗エストロゲン効果）を有すること、および更年期障害、閉経後の骨粗鬆症・高脂血症・高血圧症等に対して改善効果（エストロゲン様効果）を有することは、広く知られている。

[0003] 最近になって、大豆イソフラボンによる直接の臨床効果に加え、該大豆イソフラボンに代わって大豆イソフラボンの活性代謝物であるエクオールが、臨床応用における有効性の鍵を握ると報告されている。すなわち、乳癌、前立腺癌、更年期障害および閉経後の骨粗鬆症に対して、エクオールが有効である旨の報告が種々見られている。

[0004] また、エクオールは、腸内細菌によって生成されるため、腸内の菌叢によりその生成量に違いがあり、個人差が存在することが報告されている。それゆえ、大豆加工品を摂取しても所望の抗エストロゲン効果、エストロゲン様効果が期待できないヒトが存在することは否めない。

[0005] その後、エクオールを効率的に産生する乳酸菌が単離・同定され（特許文献１）、該乳酸菌製剤を経口摂取して乳酸菌を腸内に到達あるいは定着させることにより、エクオールの体内への効率的な取り込みが期待される。この時、例えば尿、血液、糞便等のエクオールを測定することにより、該乳酸菌の腸内への到達あるいは定着の有無を確認することが可能となる。

[0006] このエクオールの測定法としては、血液試料では液体クロマトグラフ質量分析装置あるいはガスクロマトグラフ質量分析計を用い、尿試料では高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）法等の機器分析を用いる方法が知られているが、より簡便な測定法が期待されている。

[0007] また、イムノアッセイによるエクオールの測定法としては、時間分解蛍光イムノアッセイ法を用いたＬａｂｍａｓｔｅｒ ＴＲ－ＦＩＡ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｒｅａｇｅｎｔｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔ ｏｆ Ｅｑｕｏｌ（ＬＡＢＭＡＳＴＥＲ ＤＩＡＧＮＯＳＴＩＣ社）が市販されている（非特許文献１）。

[0008] 一方、エクオールには、Ｓ－エクオールおよびＲ－エクオールの二種類の光学異性体の存在が知られている。この中、エクオールの前駆物質であるダイゼインの腸内細菌による代謝産物はＳ－エクオールに限られる。また、エストロゲン受容体との結合もＳ－エクオールの方がはるかに強い（非特許文献２）。

[0009] すなわち、生体内での存在の指標となる血液試料および尿試料に含まれるエクオールはＳ－エクオールであり、Ｓ－エクオールを特異的に測定することが有用である。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：特開２００６－２９６４３４号公報

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Ｅ．Ｂｒｏｕｗｅｒｓら、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｓｔｅｒｏｉｄ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ＆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、２００３年、８４巻、ｐ．５７７－５８８

非特許文献2：Ｋ．Ｄ．Ｒ．Ｓｅｔｃｈｅｌｌら、Ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ、２００５年、８１巻、ｐ．１０７２－１０７９

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明は、免疫法、すなわちイムノアッセイを用いたエクオールの測定法において、Ｓ－エクオールを特異的に、かつ精確に測定する方法を構築することを目的とする。また、本発明は、免疫法を用いたエクオールの濃度の測定において、Ｓ－エクオールを特異的且つ精確に測定できるキットを構築することを目的とする。更に、本発明は、被験者のエクオール産生能を判定する方法を構築することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0013] イムノアッセイの性能を大きく左右するものとして、試料中の測定対象物とその結合対との反応から濃度を求める際の標準物質や競合反応を用いる際の競合物質と測定対象物との同一性もしくは類似性が挙げられる。

[0014] そこで、測定値を求めるための検量線を作成するための標準物質にＳ－エクオールを用いることにより、測定値の精確性が向上した。

[0015] また、競合免疫反応を用いたイムノアッセイにおいて、競合反応物に標識化したＳ－エクオールを用いることにより非特異反応を抑制し、Ｓ－エクオールおよびＲ－エクオールの混合物を用いたときに比べて精確に測定できる範囲が拡大した。

[0016] 本発明は、この知見に基づき、さらに研究を重ねた結果完成されたものである。

[0017] すなわち、本発明は以下の構成からなる。

項１．生体試料中のエクオールを免疫法により測定する方法であって、検量線の作成に使用する標準抗原および生体試料中のエクオールと競合する標識化抗原からなる群より選択される少なくとも一方の抗原として、Ｓ－エクオールを用いることを特徴とする方法。

項２．Ｓ－エクオールに対する交差性を１００％とした場合、ダイゼインに対する交差性が１０％以下、ゲニステインに対する交差性が１０％以下、グリシテインに対する交差性が１０％以下、ジヒドロダイゼインに対する交差

性が２０％以下、およびデヒドロエクオールに対する交差性が２０％以下である抗エクオール抗体を一次抗体として使用する、項１に記載の方法。

項３．前記標識化抗原の標識物が、酵素、放射性同位体、色素、蛍光物質、ラテックスおよび金属コロイドからなる群より選択される少なくとも１種である、項１に記載の方法。

項４．前記免疫法が、ＥＬＩＳＡ法、ラジオイムノアッセイ法およびイムノクロマト法からなる群より選択される少なくとも１種である、項１に記載の方法。

項５．前記生体試料が、尿および血液からなる群より選択される少なくとも１種である、項１に記載の方法。

項６．前記生体試料中のエクオールの抱合体が脱抱合処理されることなく測定されることを特徴とする、項１に記載の方法。

項７．生体試料中のエクオールを免疫法により測定するためのキットであって、検量線の作成に使用する標準抗原および試料中のエクオールと競合する標識化抗原からなる群より選択される少なくとも一方の抗原として、Ｓ－エクオールを含むことを特徴とする、キット。

項８．更に、Ｓ－エクオールに対する交差性を１００％とした場合、ダイゼインに対する交差性が１０％以下、ゲニステインに対する交差性が１０％以下、グリシテインに対する交差性が１０％以下、ジヒドロダイゼインに対する交差性が２０％以下、およびデヒドロエクオールに対する交差性が２０％以下である抗エクオール抗体を一次抗体として含む、項７に記載のキット。

項９．前記免疫法が、ＥＬＩＳＡ法、ラジオイムノアッセイ法およびイムノクロマト法からなる群より選択される少なくとも１種である、項７に記載のキット。

項１０．前記生体試料が、尿および血液からなる群より選択される少なくとも１種である、項７に記載のキット。

項１１．被験者のエクオール産生能を判定する方法であって、

（１）検量線の作成に使用する標準抗原および生体試料中のエクオールと競

合する標識化抗原からなる群より選択される少なくとも一方の抗原としてＳ－エクオールを用いた免疫法により、大豆イソフラボンを摂食させた被験者由来の生体試料中のエクオールを測定する工程、および

（２）前記工程（１）で得られたエクオールの測定値に基づいて、被験者のエクオール産生能を判定する工程、

を含む判定方法。

項１２．前記工程（１）において、生体試料中のエクオールの抱合体が脱抱合処理されることなく測定されることを特徴とする、項１１に記載の判定方法。

発明の効果

[0018] 本発明の測定方法を実施することにより、生体試料中のエクオールをイムノアッセイによって測定する方法において、非特異反応を抑制し、精確な測定結果が得られる。また、本発明のキットによれば、該方法を、一層簡便に実施することができる。また、本発明の判定方法によれば、被験者がエクオール産生能を有するか否かを精確且つ簡便に判定することができる。

[0019] また、本発明により測定されるエクオール濃度は、ＨＰＬＣ法により測定されるエクオール濃度と高い相関性を示す。また、本発明によれば、その検出時間も３時間程度であり、７２時間、受託だと約２週間を要するＨＰＬＣ法と比較して、迅速にエクオール濃度を測定できる。また、本発明のキットは、ＨＰＬＣ法と比較して非常に安価であるにもかかわらず、ＨＰＬＣ法と同等の検出感度が得られる。

[0020] 更に、本発明によれば、被験者のエクオール産生能の有無およびその程度を精確、簡便、迅速且つ特異性が高く把握できることから、該測定結果および判定結果に基づき、エクオール産生能の欠如に関連する疾患（例えば、乳癌、前立腺癌、更年期障害、閉経後の骨粗鬆症・高脂血症・高血圧症等）の発症可能性や症状の程度を把握することが可能になり、該疾患の予防や改善方策を適切に施すことが可能になる。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]図１はＨＰＬＣ法および実施例１で測定した結果の相関図である。図中、縦軸はＥＬＩＳＡ法により得られた値を示し、横軸はＨＰＬＣ法により得られた値を示し、単位はいずれもｎｇ／ｍｌである。

[図2]図２はＨＰＬＣ法および実施例２で測定した結果の相関図である。図中、縦軸はＥＬＩＳＡ法により得られた値を示し、横軸はＨＰＬＣ法により得られた値を示し、単位はいずれもｎｇ／ｍｌである。

[図3]図３はＨＰＬＣ法および実施例３で測定した結果の相関図である。図中、縦軸はＥＬＩＳＡ法により得られた値を示し、横軸はＨＰＬＣ法により得られた値を示し、単位はいずれもｎｇ／ｍｌである。

[図4]図４はＨＰＬＣ法および比較例で測定した結果の相関図である。図中、縦軸はＥＬＩＳＡ法により得られた値を示し、横軸はＨＰＬＣ法により得られた値を示し、単位はいずれもｎｇ／ｍｌである。

[図5]図５は、ＥＬＩＳＡ法における競合法のモデル図である。

[図6]図６はＬＣ／ＭＳ／ＭＳおよび試験例３に記載の本発明の免疫測定法でエクオール濃度を測定した結果の相関図である。

[図7]図７はＨＰＬＣ法を用いて測定した尿中のダイゼイン濃度を示す。

[図8]図８はＥＱＬ　ＥＬＩＳＡとＬｏｇ　Ｅ／Ｄ　ｒａｔｉｏとのプロットを示す。

発明を実施するための形態

[0022] 以下、本発明について説明する。

１．生体試料中のエクオールを免疫法により測定する方法

本発明の、生体試料中のエクオールの濃度を免疫法により測定する方法（以下、これを免疫測定法と記載する場合がある）は、検量線の作成に使用する標準抗原および生体試料中のエクオールと競合する標識化抗原からなる群より選択される少なくとも一方の抗原に、Ｓ－エクオールを用いることを特徴とする。本発明の免疫測定法について、以下、説明する。

[0023] Ｓ－エクオールに対する抗体作製のための免疫抗原

本発明の測定対象であるエクオールは低分子のハプテン抗原であるため、

それ自体では免疫原性を有していない。そのため、免疫測定法に用いる抗体を得るためには、エクオールと抗原支持物質との結合体を合成し、免疫抗原を作製することが好ましい。

[0024] 前記抗原支持物質としては、前記免疫抗原を作製できる限り制限されないが、高分子物質（分子量１万以上、好ましくは５万～１００万）が好ましく、その中でもタンパク質が好ましい。好ましいタンパク質の例として、抗体、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、カゼイン、ゼラチン、フェリチン等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

[0025] また、ハプテン抗原と抗原支持物質とを結合させる方法は、これらが結合できる限り制限されないが、共有結合が好ましい。

[0026] 共有結合の場合、例えば、抗原支持物質としてタンパク質を用いる場合は、Ｎ－ヒドロキシサクシイミド活性化エステル法により、ハプテン抗原に導入したサクシイミド基とタンパク質又は糖タンパク質のアミノ基とを反応させ、ハプテン抗原と抗原支持物質とを結合させることができる。また、この場合、他の方法として、グルタール法等が例示される。

[0027] さらに、ハプテン抗原と抗原支持物質との結合に際し、ハプテン抗原と抗原支持物質の間の距離を拡げるために、ハプテン抗原にスペーサー化合物を導入してから抗原支持物質と結合させることにより、抗体との親和性、抗体の特異性に変化を与えることができる。

[0028] スペーサー化合物の例としては、スペーサー化合物を介してハプテン抗原と抗原支持物質を結合できるものであれば制限されず、また、前記抗体との親和性、抗体の特異性に変化を与えることができるものであれば制限されないが、カルボキシメチルエーテル（ＣＭＥ）、カルボキシプロピルエーテル（ＣＰＥ）、カルボキシブチルエーテル（ＣＢＥ）、カルボキシフェニルエーテル（ＣＰｈＥ）等が例示され、好ましくはＣＭＥが挙げられる。

[0029] スペーサー化合物を介してハプテン抗原と抗原支持物質が結合された例としては、後述のエクオール－ＣＭＥ－タンパク質が例示でき、このほかにもエクオール－ＣＰＥ－タンパク質、エクオール－ＣＢＥ－タンパク質、エク

オールーＣＰｈＥータンパク質等が例示される。エクオールーＣＭＥータンパク質は後述の実施例のようにしてようにして作製でき、このほかのスペーサー化合物を備えた免疫抗原は、使用するスペーサーの種類に応じて、当業者により適宜作製することができる。

[0030] 標識化ハプテン抗原

抗体の存在を検出する標識化ハプテン抗原については、前記抗原支持物質の代わりに標識物を用いることにより、同様に作製することができ、ハプテン抗原と標識物の間にスペーサー化合物を導入することにより、検出する抗体との親和性を調整することができる。

[0031] 標識物としては、抗原抗体反応を妨げないことを限度として、従来公知の標識物が使用できる。標識物として、酵素、放射性同位体、色素、蛍光物質、ラテックス、金属コロイド、ユーロピウム、アクリジニウム等が例示され、好ましくは、酵素、放射性同位体、色素、蛍光物質、ラテックスおよび金属コロイドからなる群から選択される。また、酵素としてはパーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ等；放射性同位体としては^{125}Ｉ等；色素としてはシアニン系色素等；蛍光物質としてはＦＩＴＣ、ｃｙ３、ｃｙ５等；ラテックスとしてはポリスチレンラテックス、磁性ラテックス等；金属コロイドとしては金、銀、白金等が例示される。これらの標識物の中でも、高感度の検出を容易にできるという利点から、好ましくは酵素、更に好ましくはパーオキシダーゼ、特に好ましくは西洋ワサビパーオキシダーゼが例示される。

[0032] また、ハプテン抗原と標識物の結合に使用されるスペーサー化合物としては、カルボキシメチルエーテル（ＣＭＥ）、カルボキシプロピルエーテル（ＣＰＥ）、カルボキシブチルエーテル（ＣＢＥ）、カルボキシフェニルエーテル（ＣＰｈＥ）等が例示され、好ましくはＣＰＥが挙げられる。

[0033] 抗体：一次抗体

本発明に用いる一次抗体は、エクオールに特異的に結合できる限り制限されず、ポリクローナル抗体を用いてもよく、モノクローナル抗体を用いても

よい。また、エクオールとの特異性を維持する限り、その抗体断片を一次抗体として使用してもよい。また、一次抗体として、抗血清を使用することもできる。

[0034] 免疫測定法に用いる一次抗体は、公知の方法を実施することにより作製することができる。例えば、該一次抗体は、以下のようにして作製できるが、作製方法は以下の例に限定されない。

[0035] すなわち、ポリクローナル抗体は、エクオールと抗原支持物質を結合させた免疫抗原とＦｒｅｕｎｄ’ｓ ｃｏｍｐｌｅｔｅ ａｄｊｕｖａｎｔを混和して免疫剤を調製し、調製した免疫剤を定期的にウサギ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、モルモット、ニワトリ等の皮下および／または皮内に複数回注射した後に得られる抗血清を精製または希釈等することで調製できる。免疫抗原としては前述のものが例示でき、アジュバントの使用は必須ではないが、アジュバントを使用しておくことが望ましい。抗血清は、従来公知の方法に従い採取することにより作製できる。本発明に用いる一次抗体として、好ましくは、ウサギ抗血清が使用される。

[0036] モノクローナル抗体は、エクオールと抗原支持物質を結合させた免疫抗原とＦｒｅｕｎｄ’ｓ ｃｏｍｐｌｅｔｅ ａｄｊｕｖａｎｔを混和して免疫剤を調製し、調製した免疫剤を定期的にマウス、ラット等の皮下および／または皮内に複数回注射した後に前記免疫抗原を単独で静脈内または腹腔内注射し、数日後に摘出した脾臓より調製した脾細胞とミエローマ細胞を融合して融合細胞を選択培養する。

[0037] 増殖した融合細胞をクローン化培養し、エクオールに特異的に結合するＩｇＧ抗体を産生する細胞株を選定する。選定した細胞株を培養して得られる培養上清を精製または希釈等することで測定に用いるモノクローナル抗体を調製できる。ポリクローナル抗体と同様に、免疫抗原としては前述のものが例示でき、アジュバントの使用は必須ではないが、アジュバントを使用しておくことが望ましい。

[0038] 本発明で使用される一次抗体は、Ｓ－エクオールに対する特異性が高く、

他の構造類似のイソフラボンに対しては交差性が低いことが望ましい。とりわけ、ダイゼイン、ジヒドロダイゼインおよびデヒドロエクオールは、生体試料中のエクオールの誤検出要因となるため、これらの化合物に対する交差性が低い一次抗体を使用することが望ましい。具体的には、本発明で使用される一次抗体として、Ｓ－エクオールに対する交差性を１００％とした場合、ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン、ジヒドロダイゼイン、及びデヒドロエクオールに対する交差性が、下記範囲を充足していることが望ましい：

ダイゼインに対する交差性：１０％以下、好ましくは１％以下、更に好ましくは０．１％以下；

ゲニステインに対する交差性：１０％以下、好ましくは１％以下、更に好ましくは０．１％以下；

グリシテインに対する交差性：１０％以下、好ましくは１％以下、更に好ましくは０．１％以下；

ジヒドロダイゼインに対する交差性：２０％以下、好ましくは５％以下、更に好ましくは１．１％以下；及び

デヒドロエクオールに対する交差性：２０％以下、好ましくは５％以下、更に好ましくは１％以下。

[0039] 上記交差性は、次のように説明できる。すなわち、上記交差性は、標識化されたＳ－エクオールの抗エクオール抗体への結合を２０％反応阻害できる各イソフラボン類等の濃度（IC_{20}）に対する、標識化されたＳ－エクオールの抗エクオール抗体への結合を２０％反応阻害できる標識化されていないＳ－エクオールの濃度（IC_{20}）の割合（％）を示す。より具体的には、標識化されたＳ－エクオール単独での抗体への結合を１００とした場合、該標識化されたＳ－エクオールと標識化されていないＳ－エクオールとの競合反応において、該標識化されたＳ－エクオールの抗体への結合が８０となったときの、該標識化されていないＳ－エクオールの濃度を求める。同様に、標識化されていない各々のイソフラボン類等について、該標識化されたＳ－エ

クオールとの競合反応を行い、該標識化されたＳ－エクオールの抗体への結合が８０となったときの、各々のイソフラボン類等の濃度を求める。

[0040] このようにして得られた、標識化されていないＳ－エクオールの濃度（IC_{20}）と、各々のイソフラボン類等の濃度（IC_{20}）の比をパーセント表示したものを交差性とする。これは、以下の式で表される。

交差性（%）＝（Ｓ－エクオールのIC_{20}／各々のイソフラボン類等のIC_{20}）×１００

[0041] ここで、該交差率は、ＥＬＩＳＡにおける競合法を用いて決定され、検量線の作成に使用する標準抗原および生体試料中のエクオールと競合する標識化抗原の抗原として、Ｓ－エクオールを用いて決定される。

[0042] また、該交差率の決定において使用される標識化されたＳ－エクオールの濃度は、競合法において、抗原を高感度に測定できる条件に適宜設定すればよい。標識物としては前述の酵素が例示できる。

[0043] より具体的には、例えば、該交差率は、後述の試験例２と同様の手順で決定される。

[0044] 上記のような特異性を備えた一次抗体を使用し、且つ標準抗原および／または生体試料中のエクオールと競合する標識化抗原としてＳ－エクオールを使用することによって、生体試料中のエクオールをより高精度に検出することが可能になる。

[0045] 抗体：二次抗体

本発明に使用する二次抗体は、上記一次抗体に対して特異的に結合する抗体であり、該二次抗体は公知の方法に従い作製できる。

[0046] 一次抗体としてウサギ抗体またはウサギ抗血清を使用する場合、二次抗体として好ましくはヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体が使用される。

[0047] また、ビオチン－アビジン／ストレプトアビジンの結合を利用してもよく、この場合には、例えばビオチン化一次抗体を作製して、該ビオチンと、固相に固定化したアビジン／ストレプトアビジンとを結合させればよい。

[0048] 標準抗原、及び生体試料中のエクオールと競合する標識化抗原

また、本発明において、前記した方法により作製した抗体を用いて生体試料中のエクオーンを測定するときに、検量線の作成に使用する標準抗原および／または試料中のエクオーンと競合する標識化抗原に、Ｓ－エクオーンを用いることにより、精確なエクオーンの測定値を得ることが可能となる。すなわち、本発明では、検量線の作成に使用する標準抗原および試料中のエクオーンと競合する標識化抗原の少なくとも一方にＳ－エクオーンが使用されるが、生体試料中のエクオーンの測定精度を高めるという観点から、検量線の作成に使用する標準抗原および試料中のエクオーンと競合する標識化抗原の双方にＳ－エクオーンを使用することが望ましい。

[0049] 上記標識化抗原の標識物としては、抗原抗体反応を妨げないことを限度として、従来公知の標識物が使用できる。標識物として、酵素、放射性同位体、色素、蛍光物質、ラテックス、金属コロイド、ユーロピウム、アクリジニウム等が例示され、好ましくは、酵素、放射性同位体、色素、蛍光物質、ラテックスおよび金属コロイドからなる群から選択される。また、酵素としてはパーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ等；放射性同位体としては^{125}Ｉ等；色素としてはシアニン系色素等；蛍光物質としてはＦＩＴＣ、ｃｙ３、ｃｙ５等；ラテックスとしてはポリスチレンラテックス、磁性ラテックス等；金属コロイドとしては金、銀、白金等が例示される。これらの標識物の中でも、高感度の検出を容易にできるという利点から、好ましくは酵素、更に好ましくはパーオキシダーゼ、特に好ましくは西洋ワサビパーオキシダーゼが例示される。

[0050] 抗原と標識物との結合を目的として、また該抗原と抗体との親和性等の調整を目的として、該抗原と標識物の間にスペーサー化合物を導入してもよい。抗原（Ｓ－エクオーン）と標識物の結合に使用されるスペーサー化合物としては、カルボキシメチルエーテル（ＣＭＥ）、カルボキシプロピルエーテル（ＣＰＥ）、カルボキシブチルエーテル（ＣＢＥ）、カルボキシフェニルエーテル（ＣＰｈＥ）等が例示され、好ましくはＣＰＥが挙げられる。

[0051] 生体試料

エクオールを測定する生体試料としては、動植物を含む生体に由来する試料であってエクオールの測定が求められるものである限り特に制限されないが、例えば、尿、血液（例えば血清の他、血漿）、便、組織抽出物、細胞抽出物、食材等が挙げられる。生体試料として、好ましくはヒト由来の生体試料であり、さらに好ましくはヒト由来の尿および血液であり、特に好ましくはヒト由来の尿である。

[0052] また、エクオールの測定に供される生体試料は、必要に応じて、希釈されていてもよい。

[0053] 生体試料を前処理（脱抱合）するための酵素

前記生体試料に含まれるエクオールは、通常、抱合体の形態で存在する。このため、該生体試料を抗原抗体反応に供する前に、エクオールを脱抱合させるための前処理に供してもよい。

[0054] 該脱抱合処理は、β－グルファターゼ（グルクロニダーゼ、サルファターゼ含有）、グルクロニダーゼ、サルファターゼ等の酵素を使用して行うことができる。より具体的には、脱抱合処理に使用される酵素液の好適な一例として、６％β－グルファターゼ、０．１Ｍ酢酸緩衝液（ｐＨ５．５）を主成分とする組成が例示される。

[0055] また、該脱抱合処理は、抗原抗体反応に先だって実施してもよく、また抗原抗体反応と同時に実施してもよい。該脱抱合処理の反応条件は、使用する酵素の種類や生体試料の種類等に応じて適宜設定されるが、通常、２５～５６℃で５分から一昼夜行われる。

[0056] 生体試料および／または標準抗原の希釈液

生体試料および標準抗原の希釈に使用される希釈液は、測定に悪影響を及ぼさない限り制限されず、一般的な免疫法において使用されている希釈液を使用することができる。本発明において使用される希釈液の好適な一例として、塩化ナトリウム、ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝液（ｐＨ７．５）を含有する混合溶液、１００％チャコール処理ヒト血清等が例示される。より具体的には、希釈液として、１５０ｍＭ塩化ナトリウム、１．０％ウシ血

清アルブミン含有０．１Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．５）の混合溶液が例示される。

[0057] エクオールの濃度を測定するための免疫法

次に、エクオールを測定するための免疫法の具体例を以下に示すが、本発明の本質はこれらの例により限定されるものではない。

[0058] 本発明において、エクオールを測定するための免疫法としては、前記抗原および抗体を利用した抗原抗体反応により、生体試料中のエクオールの濃度を測定できる限り制限されないが、例えば、ＥＬＩＳＡ法、ラジオイムノアッセイ法およびイムノクロマト法等が例示される。

[0059] 免疫法としてＥＬＩＳＡ（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）法を使用する場合、生体試料中のエクオールの測定は、従来公知のＥＬＩＳＡの手法に従い行えばよく、競合法、サンドイッチ法、直接法のいずれであってもよい。ＥＬＩＳＡ法として、好ましくは競合法である。参考として、ＥＬＩＳＡ法における競合法のモデルを、図５に示す。

[0060] 例えば、競合法を採用する場合、ＥＬＩＳＡ法による生体試料中のエクオールの測定は、例えば、二次抗体を予め固相化しておいたマイクロプレートのウェルに、生体試料、酵素標識した抗原（標識化抗原）および一次抗体を添加して反応させ、二次抗体－一次抗体－エクオールの結合体を形成させる。また、一次抗体は、生体試料および標識化抗原と同時に添加してもよく、別々に添加してもよい。反応後、洗浄液にてウェルを洗浄し、前記酵素に対応する基質を加えて反応させた後、反応停止液等により反応を停止させて吸光度を測定し、同様に標準抗原を測定した検量線から、試料中のエクオール濃度を算出する。

[0061] この場合、マイクロプレートは従来公知のものが使用でき、そのウェルの大きさや形状も、前記反応が実施される限り制限されない。また、二次抗体のウェルへの固相化は従来公知の方法により実施できる。また、基質も、該酵素に適した従来公知の基質を使用すればよい。

[0062] また、該競合法において、一次抗体、二次抗体、標識化抗原の添加量は、

当該方法により生体試料中のエクオーリンが精確に測定できる限り制限されず、一般的なＥＬＩＳＡ法の条件に従って適宜設定される。また、ＥＬＩＳＡ法以外の免疫法においても、同様に、一次抗体、二次抗体、標識化抗原の添加量は、従来公知の条件に従えばよく、適宜設定される。

[0063] ＥＬＩＳＡ法における各反応は、従来公知の条件に従い行えばよく、生体試料の種類やＥＬＩＳＡ法の方法等に応じて適宜設定される。例えば、競合法の場合であれば、二次抗体－一次抗体－エクオーリンの結合体を形成させるための抗原抗体反応は、通常、４～３７℃で５分から一昼夜行われる。

[0064] より具体的には、ＥＬＩＳＡ法（競合法）による尿中のエクオーリンの測定については、尿検体に検体希釈液を加えて希釈尿検体液を調製し、予めヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体（二次抗体）を固相化しておいたマイクロプレートのウェルに調製した希釈尿検体液、西洋ワサビパーオキシダーゼ標識エクオーリンおよび希釈した抗エクオーリンウサギ抗血清（一次抗体）を加えて一定時間反応させる。反応後、ウェルを洗浄して発色基質液を加えて一定時間反応させ、一定時間後に反応を停止させて吸光度を測定し、同様に標準抗原を測定した検量線から、試料中のエクオーリン濃度を算出する。

[0065] 抗血清を希釈するための緩衝液（抗血清希釈緩衝液）は、抗血清を好適に希釈でき且つ測定に悪影響を及ぼさない限り制限されない。本発明において使用される抗血清希釈緩衝液の好適な一例として、塩化ナトリウム、ウシ血清アルブミン、Ｔｗｅｅｎ２０含有りん酸緩衝液（ｐＨ７．５）等を含有する混合溶液が例示される。より具体的には、抗血清希釈緩衝液として、１５０ｍＭ塩化ナトリウム、０．５％ウシ血清アルブミン、０．０１％Ｔｗｅｅｎ２０含有０．１Ｍりん酸緩衝液（ｐＨ７．５）の混合溶液が例示される。該抗血清希釈緩衝液は競合法だけでなく、競合法以外のＥＬＩＳＡ法、更に種々の免疫法において使用できる。なお、Ｔｗｅｅｎは登録商標である。

[0066] ＲＩＡ（Radioimmunoassay）法による生体試料中のエクオーリンの測定についても従来公知の方法に従い行えばよく、標識物として放射性同位体を使用する以外は、前記ＥＬＩＳＡ法と同様にして実施できる。生体試料として尿

を、放射性同位体として^{125}Ｉを使用するＲＩＡ法として、以下が例示される。

[0067] 尿検体に検体希釈液を加えて希釈尿検体液を調製し、予めヤギ抗マウスＩｇＧ抗体を固相化しておいたマイクロプレートのウェルに調製した希釈尿検体液、^{125}Ｉ標識Ｓ－エクオールおよび希釈した抗エクオール抗体産生細胞培養上清を加えて一定時間反応させる。反応後、ウェルを洗浄した後にマイクロプレートのウェルの放射線活性を測定し、同様に標準抗原を測定した検量線から、試料中のエクオール濃度を算出する。

[0068] イムノクロマト（イムノクロマトグラフィー）法による生体試料中のエクオールの測定についても、従来公知の方法に従い行えばよい。生体試料として尿を、標識物として金コロイドを使用するイムノクロマト法として、以下の手法が例示される。即ち、尿検体に金コロイド標識抗エクオールマウスモノクローナル抗体を加えて希釈尿検体液を調製し、イムノクロマトストリップのサンプルパッド部に希釈尿検体液を滴下して一定時間反応させる。反応後、エクオールを固定化した捕捉部の金コロイド標識物による着色を測定し、同様に標準抗原を測定した検量線から、試料中のエクオール濃度を算出する。

[0069] また、生体試料中のエクオールを標識化した抗体を用いて測定する方法としては、抗原支持物質と結合したエクオールまたはその類似物を固相化し、蛍光物質で標識化した抗エクオールウサギポリクローナル抗体と生体試料を混合することにより、生体試料中の測定対象物質と競合して固相に結合した蛍光物質を洗浄した後に測定し、同様に標準抗原を測定した検量線から、試料中のエクオール濃度を算出する。

[0070] さらに、生体試料中のエクオールを標識化した抗体断片を用いて測定する方法として、オープンサンドイッチ法が知られている。この測定方法は、例えば、抗エクオールマウスモノクローナル抗体の軽鎖抗原結合部位断片と重鎖抗原結合部位断片を用いて生体中のエクオールを生体試料中のエクオールを挟み込んだ重合体を形成することによって測定できる。

[0071] 具体的には、軽鎖抗原結合部位断片を固相化し、アルカリフォスファターゼで標識化した重鎖抗原結合部位断片と生体試料を混合することにより、生体試料中のエクオールを介して固相に結合したアルカリフォスファターゼ活性を洗浄した後に測定し、同様に標準抗原を測定した検量線から、試料中のエクオール濃度を算出する。

[0072] また、軽鎖抗原結合部位断片と重鎖抗原結合部位断片に異なった蛍光物質で標識化し、生体試料中のエクオールを介して複合物を形成することにより生じる蛍光共鳴エネルギー移動現象を測定し、同様に標準抗原を測定した検量線から、試料中のエクオール濃度を算出することも可能である。

[0073] 本発明の好適な一態様としては、免疫法としてＥＬＩＳＡ法が挙げられ、さらに好ましくは、競合法によって行われるＥＬＩＳＡ法が挙げられ、特に好ましくは、検量線の作成に使用する標準抗原および試料中のエクオールと競合する標識化抗原の双方にＳ－エクオールを使用し、競合法によって行われるＥＬＩＳＡ法が挙げられる。

[0074] ２．生体試料中のエクオールの濃度を免疫法により測定するためのキット

本発明の、生体試料中のエクオールの濃度を免疫法により測定するためのキットは、検量線の作成に使用する標準抗原および試料中のエクオールと競合する標識化抗原からなる群より選択される少なくとも一方の抗原として、Ｓ－エクオールを含むことを特徴とする。本発明のキットは、更に、Ｓ－エクオールに特異的に結合する一次抗体を含んでもよい。

[0075] また、本発明のキットは、更に必要に応じて、生体試料および／または標準抗原の希釈液、試料中のＳ－エクオールの抱合体を脱抱合するための酵素液、二次抗体を固相化させたプレート、及び洗浄液からなる群より選択される少なくとも１種を含んでもよい。

[0076] 更に、本発明のキットは、採用する免疫法の種類に応じて、その他に必要とされる試薬が含まれていてもよい。例えば、競合法によって行われるＥＬＩＳＡ法に使用される場合には、更に標識化抗原の標識物に対する基質、標識物と基質の反応を停止させるための反応停止液、ならびに基質を溶解する

ための溶解液からなる群より選択される少なくとも１種を含んでもよい。

[0077] 更に、本発明のキットにおいて抗血清が使用される場合、該抗血清の希釈に使用される抗血清希釈緩衝液を含んでいても良い。

[0078] 以下、本発明のキットに備えさせ得る各試薬について説明する。

[0079] 標準抗原

標準抗原としては、前述のものが同様に使用できる。該標準抗原は、溶液の形態でキットに含まれていてもよい。例えば、標準抗原としてＳ－エクオールを使用する場合、Ｓ－エクオール、塩化ナトリウム、ウシ血清アルブミン含有りん酸緩衝液（ｐＨ７．５）を含有する標準エクオール溶液の形態にあってもよい。標準エクオール溶液として、例えば、８１０ｎｇ／ｍＬ Ｓ－エクオール、１５０ｍＭ塩化ナトリウム、０．１％ウシ血清アルブミン、０．１％含有０．０１Ｍりん酸緩衝液（ｐＨ７．５）が例示される。また、別の標準エクオール溶液として、Ｓ－エクオール及び１００％チャコール処理ヒト血清の混合溶液等が例示される。

[0080] 標識化抗原

標識化抗原としては、前述のものが同様に使用できる。好ましくはパーオキシダーゼ標識Ｓ－エクオールが、特に好ましくは西洋ワサビパーオキシダーゼ標識Ｓ－エクオールが例示される。

[0081] 標識物に対する基質

標識物に対する基質としては、従来公知の基質が使用でき、従来公知の標識物との組み合わせで使用される。例えば、西洋ワサビパーオキシダーゼの場合には、基質として過酸化水素が例示される。該基質は、後述する溶解液に溶解された後に使用されることが好ましい。

[0082] 溶解液

溶解液は、必要に応じて溶解することを目的として使用される。該溶解液は、基質を好適に溶解でき、かつ測定に悪影響を及ぼさない限り制限されず、従来公知の緩衝液が使用でき、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液等が例示される。該溶解液は、基質を予め含む形態で提供することができる。

[0083] 基質が前述の過酸化水素である場合には、溶解液に、ＯＰＤ（ｏ－フェニレンジアミン二塩酸塩）を溶解して基質液とする。好適な一態様としては、０．０５％過酸化水素水、２．２ｍｇ／ｍＬ　ＯＰＤ（ｏ－フェニレンジアミン二塩酸塩）含有５０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ５．５）の基質液が挙げられる。

[0084] 抗体：一次抗体

一次抗体としては、前述のものが同様に使用できる。好ましくは抗血清が使用され、更に好ましくはウサギ抗血清が使用される。該抗血清は、必要に応じて、後述する抗血清溶解緩衝液で希釈された後に使用される。該抗血清は、該抗血清希釈緩衝液で希釈された状態で、キットに含まれていてもよい。

[0085] 抗体：二次抗体

二次抗体としては、前述のものが同様に使用できる。一次抗体としてウサギ抗体またはウサギ抗血清を使用する場合、二次抗体として、好ましくはヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体が使用される。また、ＥＬＩＳＡ法における競合法を採用する場合には、二次抗体はマイクロプレートのウェルに固相化されていることが好ましい。該マイクロプレートは、従来公知のものが使用でき、固相化は従来公知の方法に従い実施すればよい。

[0086] 抗血清希釈緩衝液

抗血清希釈緩衝液は、前述の抗血清を必要に応じて希釈することを目的として使用される。該抗血清希釈緩衝液は、抗血清を好適に希釈でき且つ測定に悪影響を及ぼさない限り制限されず、前述のものが同様に使用できる。該抗血清希釈緩衝液は、抗血清を希釈した状態で、キットに含まれていてもよい。

[0087] 生体試料を前処理（脱抱合）するための酵素液

生体試料を前処理（脱抱合）するための酵素液としては、前述のものが同様に使用できる。

[0088] 生体試料および／または標準抗原の希釈液

生体試料（検体）および標準抗原の希釈液としては、前述のものが同様に使用できる。

[0089] 標識物質と基質の反応を停止させるための反応停止液

標識物質と基質の反応を停止させるための反応停止液は、これらの反応を停止させることができ、測定結果に影響を与えない限り制限されず、従来公知の反応停止液が使用できる。反応停止液として、硫酸、塩酸、硝酸等が例示される。

[0090] 洗浄液

洗浄液は、抗原抗体反応終了後、基質の分注前に、余分な生体試料および抗体等をウェル等から除去することを目的として使用される。該洗浄液は、好適に洗浄でき、かつ測定に悪影響を及ぼさない限り制限されず、従来公知の洗浄液が使用でき、そのままで使用されてもよく、精製水等で希釈して使用されてもよい。洗浄液として、精製水、界面活性剤を緩衝液で希釈した溶液等が例示される。

[0091] このほか、本発明のキットには、該キットを使用するプロトコールが記載された説明書、希釈用のプレート、プレートシールなども含むことができる。また、キットに含まれる前記溶液には、着色のため、更に色素が添加されていてもよい。

[0092] 本発明のキットが対象とする生体試料は、前述のものが挙げられる。また、該キットを用いて実施される免疫法も前述の方法が例示され、好ましくはＥＬＩＳＡ法であり、好ましくはＥＬＩＳＡ法の中でも競合法である。

[0093] 本キットにおける前記抗体、抗原、溶液等の含有量は、生体試料中のエクオール濃度が測定できる限り制限されず、前述の通り、ＥＬＩＳＡ法をはじめとする免疫法の一般的な条件に従って適宜設定される。

[0094] ３．被験者のエクオール産生能を判定する方法

本発明の被験者のエクオール産生能を判定する方法（以下、判定方法と記載する場合がある）は、（１）検量線の作成に使用する標準抗原および生体試料中のエクオールと競合する標識化抗原からなる群より選択される少なく

とも一方の抗原としてＳ－エクオールを用いた免疫法により、大豆イソフラボンを摂食させた被験者由来の生体試料中のエクオールを測定する工程、ならびに（２）前記工程（１）で得られたエクオールの測定値に基づいて、被験者のエクオール産生能を判定する工程を含む。以下に、本発明の判定方法について、工程毎に説明する。

[0095] 工程（１）

本工程（１）では、検量線の作成に使用する標準抗原および生体試料中のエクオールと競合する標識化抗原からなる群より選択される少なくとも一方の抗原にＳ－エクオールを用いた免疫法により、大豆イソフラボンを摂食させた被験者由来の生体試料中のエクオールを測定する。

[0096] 本工程（１）に供される生体試料は、大豆イソフラボンを摂食させた被験者由来の生体試料である。エクオールは大豆イソフラボンの活性代謝物であるため、大豆イソフラボンを摂取していない被験者は、エクオール産生能を有している場合であっても、エクオールが検出されないか、その測定値が非常に低い傾向を示す。そのため、被験者には、予め大豆イソフラボンを摂取させることが必要とされる。被験者に大豆イソフラボンを摂取させる量については、特に制限されないが、例えば大豆イソフラボンの総量が２０～７０ｍｇ、好ましくは２５～５０ｍｇ程度が例示される。また、大豆イソフラボンを摂取させる時期についても、特に制限されるものではないが、例えば、生体試料採取前の３日間毎日あるいは生体試料採取前６～２４時間、好ましくは生体試料採取前８～１２時間が例示される。被験者に摂取させる大豆イソフラボンは、豆乳、大豆イソフラボン錠、大豆バー、納豆、豆腐、大豆煮豆、枝豆、黒豆、テンペ等の大豆製品の形態の物が使用できる。

[0097] 本工程（１）に供される生体試料は、尿、血液（血清、血漿）、便等のいずれであってもよいが、好ましくは尿、血液であり、更に好ましくは尿である。

[0098] 本工程（１）における免疫法によるエクオールの測定は、前述する「１．生体試料中のエクオールを免疫法により測定する方法」に従って行われる。

[0099] 工程（２）

本第２工程では、前記工程（１）で得られたエクオールの測定値に基づいて、被験者のエクオール産生能を判定する。

[0100] 本工程（２）では、前記工程（１）においてエクオールが検出された生体試料の被験者は、エクオール産生能を有していると判定され、また前記工程（１）においてエクオールが検出されなかった生体試料の被験者は、エクオール産生能を有していないと判定される。

[0101] なお、本工程（２）では、エクオール産生能の有無の判定において誤判定を抑制するために、測定されたエクオールの濃度に対してカットオフ値未満であるか否かを判定することが望ましい。即ち、測定された生体試料のエクオールの濃度がカットオフ値未満であれば、該生体試料の被験者はエクオール産生能がないと判定され、測定された生体試料のエクオールの濃度がカットオフ値以上ならば、該生体試料の被験者はエクオール産生能があると判定される。カットオフ値は、次のようにして設定できる。

１．前記免疫法により生体試料中のエクオール濃度を測定する。

２．同一の生体試料中のダイゼイン濃度を測定する。該測定は、既存の測定法（ＨＰＬＣ法、ＧＣ－ＭＳ法など）を用いて測定する。

３．生体試料毎にダイゼイン濃度に対するエクオール濃度の対数比を算出する。

エクオールはダイゼインの代謝産物であるため、該対数値を算出することで、生体内でどの程度のエクオールが産生されているかを把握することができる。

４．ＨＰＬＣ法により、生体試料中のＳ－エクオール濃度及びダイゼインを測定する。

５．前記４の測定値に基づき、生体試料毎にダイゼイン濃度に対するエクオール濃度の対数比を算出する。

６．前記５で得られた対数比により設定される基準値と、前記３で得られた対数比とを比較し、前記３についてエクオール産生／非産生の結果に分類す

る。これに基づきエクオール非産生者／産生者の誤判定率が最も低くなるエクオール濃度を決定し、該濃度をカットオフ値とする。

[0102] 前記６について、具体的には、例えば、ＨＰＬＣ法から算出される対数比においてー１．７５未満がエクオール非産生者、ー１．７５以上ならばエクオール産生者と判断される場合には、該値（ー１．７５）を基準値とする（例えば、Setchell and Co, 2006）。そして、該基準値と前記３で得られた対数比とを照らし合わせて、同様に、ー１．７５未満であればエクオール非産生者、ー１．７５以上ならばエクオール産生者と分類する。そして、当該分類と前記１で測定したエクオール濃度を照らし合わせ、前記分類を基準として、エクオール非産生者／産生者の誤判定率が最も低くなるようエクオール濃度を決定し、この濃度をカットオフ値として設定する。

[0103] また、本工程（２）では、前記工程（１）において高濃度のエクオールが検出された生体試料の被験者については、エクオール産生能が高いと判定され、また前記第（１）工程において低濃度のエクオールが検出された生体試料の被験者は、エクオール産生能が低いと判定することもできる。

実施例

[0104] エクオールには、Ｓ－エクオールおよびＲ－エクオールの二種類の光学異性体の存在が知られており、生体内での存在は、前者のＳ－エクオールに限られる。それゆえ、測定方法としては、Ｓ－エクオールを特異的に、精確に測定することが求められる。そこで、競合免疫法による測定に影響を及ぼす標準抗原および標識化抗原を検討した。

[0105] 以下に評価を行った測定法およびその結果について説明する。

＜試験例１＞

・実施例１

標識化抗原および標準抗原にＳ－エクオールを用いた測定キットによる測定

１．生体試料

生体試料として、尿を使用した。生体試料数は５である。

[0106] ２．抗エクオールウサギ抗血清溶液の作製（一次抗体）

免疫抗原の合成

１００ｍｇのエクオールを４００μＬのＤＭＳＯに溶解し、５８μＬのＭｅｔｈｙｌ　Ｂｒｏｍｏａｃｅｔａｔｅおよび１４０ｍｇのK_2CO_3を加えて、２５℃で４時間反応させる。反応終了後に塩酸を用いて酸性に調整した後、酢酸エチルを用いて抽出を行い、脱水後に蒸発乾固した。

[0107] 続いて、展開溶媒としてクロロホルムメタノール（１９：１）を用いて薄層クロマトグラフィー（１．０５７１７、メルク　ジャパン社）上で展開分離し、１分子のエクオールに1分子のＣＭＥ（ｃａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌｅｔｈｅｒ）－ｍｅｔｈｙｌｅｓｔｅｒが導入された分画のみを回収した。

[0108] 回収した１分子ずつ結合したエクオール－ＣＭＥ－ｍｅｔｈｙｌｅｓｔｅｒに８Ｎの水酸化ナトリウムを加えて５０℃で２０分間加熱した。加熱後に塩酸を用いて酸性に調整した後、酢酸エチルを用いて抽出を行い、蒸発乾固してエクオール－ＣＭＥ－ａｃｉｄを得た。

[0109] 得られたエクオール－ＣＭＥ－ａｃｉｄの２ｍｇに、１．５ｍｇのＮ－ｈｙｄｒｏｘｙｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ（ＮＨＳ）、１．５ｍｇの水溶性カルボジイミド（ＷＳＣ）を加えて２０μＬのＤＭＳＯに溶解して２５℃で１時間反応させ、エクオール－ＣＭＥ－ＮＨＳを得た。

[0110] ２０ｍｇ／ｍＬのＢＳＡ溶液（ウシ血清アルブミン２０ｍｇを５０ｍＭ炭酸緩衝液（ｐＨ９．７）１ｍＬに溶解）２５０μＬに、エクオール－ＣＭＥ－ＮＨＳ（１０ｍｇ／ｍＬＤＭＦ溶液）１０μＬを添加して２５℃で３０分間反応させた。反応終了後にゲル濾過により未反応物を除き、エクオール－ＣＭＥ－ＢＳＡ抗原の原液とした。

[0111] 抗血清の作製

合成した免疫抗原エクオール－ＣＭＥ－ＢＳＡ（２．５ｍｇ／ｍＬ）とＦｒｅｕｎｄ’ｓ　ｃｏｍｐｌｅｔｅ　ａｄｊｕｖａｎｔを等量混和し、免疫剤を作製した。該免疫剤を用い、３週間毎に１ｍＬ／回をウサギの背部の数箇所に皮下注射した。免疫開始１２週目から３週間毎に採血を開始し、５回

の部分採血の後に全採血を実施した。採血した抗血清の抗体価を表１に示す。この全採血して得られた抗血清を抗血清希釈緩衝液で適宜希釈して以下の試験に使用した。

[0112] なお、ここでは、従来公知の方法により抗体が検出できる抗血清の最大希釈倍率を抗体価とした。該希釈は、後述の抗血清希釈緩衝液を用いて行った。

[0113] [表1]

採血毎の抗血清の抗体価

抗血清	採血１	採血２	採血３	採血４	採血５	採血６（全採）
No. 11	49,000	80,000	130,000	160,000	200,000	280,000

[0114] ３．ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体（二次抗体）および該抗体固相化プレートの作製

９６穴マイクロプレートの各ウェルに１０μｇ／ｍＬのヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体溶液を１００μＬ加える。４℃で２晩静置した後にヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体溶液を吸引除去した。

[0115] 吸引除去した９６穴マイクロプレートの各ウェルに０．５ｍｇ／ｍＬのウシ血清アルブミン溶液を３００μＬ加えた。４℃で１８時間静置した後に、ウシ血清アルブミン溶液を吸引除去し、真空乾燥してヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体固相化プレートとした。

[0116] ４．西洋ワサビパーオキシダーゼ標識Ｓ－エクオール（生体試料中のエクオールと競合する標識化抗原）の作製

１００ｍｇのＳ－エクオール（Ｓ－ｅｑｕｏｌ）を４００μＬのＤＭＳＯに溶解し、５８μＬの４－Ｂｒｏｍｏ－ｎ－ｂｕｔｙｌｉｃ Ａｃｉｄおよび１４０ｍｇのK_2CO_3を加えて、２５℃で４時間反応させる。反応終了後に塩酸を用いて酸性に調整した後、酢酸エチルを用いて抽出を行い、脱水後に蒸発乾固した。

[0117] 続いて、展開溶媒としてクロロホルムメタノール（１９：１）を用いて薄層クロマトグラフィー（１．０５７１７、メルク ジャパン社）上で展開分

離し、１分子のＳ－ｅｑｕｏｌに１分子のＣＰＥ（ｃａｒｂｏｘｙｐｒｏｐｙｌｅｔｈｅｒ）－ｍｅｔｈｙｌｅｓｔｅｒが導入された分画のみを回収した。

[0118] 回収した１分子ずつ結合したＳ－ｅｑｕｏｌ－ＣＰＥ－ｍｅｔｈｙｌｅｓｔｅｒに８Ｎの水酸化ナトリウムを加えて５０℃で２０分間加熱する。加熱後に塩酸を用いて酸性に調整した後、酢酸エチルを用いて抽出を行い、蒸発乾固してＳ－ｅｑｕｏｌ－ＣＰＥ－ａｃｉｄを得た。

[0119] 得られたＳ－ｅｑｕｏｌ－ＣＰＥ－ａｃｉｄの２ｍｇに、１．５ｍｇのＮ－ｈｙｄｒｏｘｙｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ（ＮＨＳ）、１．５ｍｇの水溶性カルボジイミド（ＷＳＣ）を加えて２０μＬのＤＭＳＯに溶解して２５℃で１時間反応させ、Ｓ－ｅｑｕｏｌ－ＣＰＥ－ＮＨＳを得た。

[0120] ２０ｍｇ／ｍＬのＨＲＰ溶液（西洋ワサビパーオキシダーゼ２０ｍｇを５０ｍＭ炭酸緩衝液（ｐＨ９．７）１ｍＬに溶解）２５０μＬに、Ｓ－ｅｑｕｏｌ－ＣＰＥ－ＮＨＳ （１０ｍｇ／ｍＬＤＭＦ溶液）１０μＬを添加して２５℃で３０分間反応させた。反応終了後にゲルろ過により未反応物を除き、西洋ワサビパーオキシダーゼ標識Ｓ－エクオール溶液の原液（標識化抗原液）とした。

[0121] ５．標準抗原

標準抗原として、Ｓ－エクオールを用いた。なお、０、３０、９０、２７０または８１０ｎｇ／ｍＬ Ｓ－エクオール及び１００％チャコール処理ヒト血清の混合溶液の標準エクオール溶液を使用した。

[0122] ６．生体試料希釈液、標準抗原希釈液

生体試料（検体）および標準抗原の希釈液として、１００％チャコール処理ヒト血清（ＳＥＲＡＣＯＮ ＩＩ：ＣＤ ＩＮＴＥＲＧＥＮ社）を用いた。

[0123] ７．抗血清希釈緩衝液の組成

１５０ｍＭ塩化ナトリウム、０．５％ウシ血清アルブミン、０．０１％Ｔｗｅｅｎ２０含有０．１Ｍりん酸緩衝液（ｐＨ７．５）を抗血清希釈緩衝液

とした。なお、Ｔｗｅｅｎは登録商標である。

[0124] ８．洗浄液の組成

１００ｍＭ塩化ナトリウム、０．０２５％Ｔｗｅｅｎ２０含有０．３ｍＭりん酸緩衝液（ｐＨ７．５）を洗浄液とした。

[0125] ９．酵素液の組成

６％β－グルファターゼ（株式会社日本バイオテスト研究所製）含有０．１Ｍ酢酸緩衝液（ｐＨ５．５）を酵素液とした。

[0126] １０．基質

０．０５％過酸化水素水、２．２ｍｇ／ｍＬ　ＯＰＤ（ｏ－フェニレンジアミン二塩酸塩）含有５０ｍＭくえん酸緩衝液（ｐＨ５．５）を基質（基質液）とした。

[0127] １１．反応停止液

３Ｎ硫酸を反応停止液とした。

[0128] １２．生体試料を用いたエクオールの測定

尿検体２０μＬに検体希釈液２００μＬを加えて、１１倍希釈尿検体を調製した。抗ウサギＩｇＧヤギ抗体固相化プレートのウェルに、１１倍希釈尿検体２０μＬ、酵素及び標識化抗原の混合液５０μＬ（標識化抗原液１に対して、酵素液１０）を加え、攪拌後に２５℃で３０分間静置した。その後、抗エクオールウサギ抗血清溶液５０μＬを加え、攪拌後に２５℃で１時間静置した。

[0129] ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体固相化プレートのウェルから反応溶液を除去した後に洗浄液を用いて３回ウェルを洗浄した。洗浄後、ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体固相化プレートのウェルに基質を１００μＬ加え、２５℃で３０分間静置した。その後、ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体固相化プレートのウェルに反応停止液を１００μＬ加え、波長４９０ｎｍの吸光度を測定し、同様に測定した標準希釈液を用いて作製した標準抗原の希釈系列から得られる検量線から、試料中のエクオール濃度を算出した。

[0130] ・実施例２

標識化抗原にＳ－エクオールを用いた測定キットによる測定

実施例１の中より、「標準抗原」をＳ－エクオールからエクオール（Ｓ－エクオールおよびＲ－エクオールの混合物）に変更した他は、実施例１と同様に実施した。

[0131] ・実施例３

標準抗原にＳ－エクオールを用いた測定キットによる測定

実施例１の中より、「西洋ワサビパーオキシダーゼ標識Ｓ－エクオールの作製」を以下のようにＳ－エクオールからエクオール（Ｓ－エクオールおよびＲ－エクオールの混合物）に変更した他は、実施例１と同様に実施した。

[0132] 西洋ワサビパーオキシダーゼ標識エクオールの作製

１００ｍｇのエクオール（Ｅｑｕｏｌ）を４００μＬのＤＭＳＯに溶解し、５８μＬの４－Ｂｒｏｍｏ－ｎ－ｂｕｔｙｌｉｃ　Ａｃｉｄおよび１４０ｍｇのK_2CO_3を加えて、２５℃で４時間反応させる。反応終了後に塩酸を用いて酸性に調整した後、酢酸エチルを用いて抽出を行い、脱水後に蒸発乾固した。

[0133] 続いて、展開溶媒としてクロロホルムメタノール（１９：１）を用いて薄層クロマトグラフィー（１．０５７１７、メルク　ジャパン社）上で展開分離し、１分子のＥｑｕｏｌに１分子のＣＰＥ（ｃａｒｂｏｘｙｐｒｏｐｙｌｅｔｈｅｒ）－ｍｅｔｈｙｌｅｓｔｅｒが導入された分画のみを回収した。

[0134] 回収した１分子ずつ結合したＥｑｕｏｌ－ＣＰＥ－ｍｅｔｈｙｌｅｓｔｅｒに８Ｎの水酸化ナトリウムを加えて５０℃で２０分間加熱する。加熱後に塩酸を用いて酸性に調整した後、酢酸エチルを用いて抽出を行い、蒸発乾固してＥｑｕｏｌ－ＣＰＥ－ａｃｉｄを得た。

[0135] 得られたＥｑｕｏｌ－ＣＰＥ－ａｃｉｄの２ｍｇに、１．５ｍｇのＮ－ｈｙｄｒｏｘｙｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ（ＮＨＳ）、１．５ｍｇの水溶性カルボジイミド（ＷＳＣ）を加えて２０μＬのＤＭＳＯに溶解して２５℃で１時間反応させ、Ｅｑｕｏｌ－ＣＰＥ－ＮＨＳを得た。

[0136] ２０ｍｇ／ｍＬのＨＲＰ溶液（西洋ワサビパーオキシダーゼ２０ｍｇを５

０ｍＭ炭酸緩衝液（ｐＨ９．７）１ｍＬに溶解）２５０μＬに、Ｅｑｕｏｌ－ＣＰＥ－ＮＨＳ　（１０ｍｇ／ｍＬＤＭＦ溶液）１０μＬを添加して２５℃で３０分間反応させる。反応終了後にゲルろ過により未反応物を除き、西洋ワサビパーオキシダーゼ標識エクオール溶液の原液とした。

[0137] ・比較例

標識化抗原および標準抗原にエクオールを用いた測定キットによる測定

実施例１の中より、「標準抗原」のＳ－エクオールを実施例２に記載のエクオールに、「西洋ワサビパーオキシダーゼ標識Ｓ－エクオールの作製」のＳ－エクオールを実施例３に記載のエクオールに変更した他は、実施例１と同様に実施した。

[0138] ・実施例４

ＨＰＬＣ法との測定値の比較（パネル検体）

ＨＰＬＣ法によりエクオール濃度既知の尿試料５検体について、実施例１、実施例２、実施例３および比較例により測定した結果を表２に示し、ＨＰＬＣ法による測定値を１００％とした各測定値の比を表３に示す。

[0139] [表2]

尿試料５検体の測定値（ng/mL）

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

[0140]

[表3]

尿試料５検体の測定値のＨＰＬＣ法との比（%）

	実施例１	実施例２	実施例３	比較例
尿検体 A	１０７	１３０	１５９	８２
尿検体 B	９６	１２３	１０４	５１
尿検体 C	９９	１２６	１３４	６０
尿検体 D	８９	１１２	９２	３９
尿検体 E	９１	１０６	９８	３９

[0141] 比較例による測定結果とＨＰＬＣ法による測定結果の比が３９～８２%であるのに比べ、実施例１、実施例２および実施例３では、各々、８９～１０７%、１０６～１３０%および９２～１５９%と、標準抗原および／または標識化抗原にＳ－エクオールを用いることにより、ＨＰＬＣ法との測定値の乖離が収束した。

[0142] ・実施例５

ＨＰＬＣ法との相関（測定値）

ＨＰＬＣ法によりエクオール濃度既知の尿試料５０検体について、実施例１、実施例２、実施例３および比較例と同様にして測定した結果とＨＰＬＣ法による測定結果との相関図を、各々、図１、図２、図３および図４に示す。該尿試料は、前日に大豆イソフラボン摂取（イソフラボンアグリコンとして２６ｍｇ）させ、早朝第一尿を使用した

比較例による測定結果では、相関係数ｒ＝０．９７３と相関性が高いものの、回帰式の傾きが０．６６４とＨＰＬＣ法での測定値の半分近くになっている。

[0143] 一方、実施例１による測定結果では、相関係数ｒ＝０．９７４と相関性が高く、回帰式の傾きが１．０６７とＨＰＬＣ法と同等であった。それゆえ、

実施例１は比較例に比べて精確性が高まったと判断された。

[0144] なお、実施例２による測定結果では、相関係数ｒ＝０．９８７と相関性が高いものの、回帰式の傾きが１．５９４とＨＰＬＣ法での測定値より高くなっている。

[0145] なお、実施例３による測定結果では、相関係数ｒ＝０．９７３と相関性が高いものの、回帰式の傾きが１．７１２とＨＰＬＣ法での測定値より高くなっている。グラフ（図３）を見ると、測定結果のばらつきが大きく、特に高値での測定値の乖離が認められた。

[0146] ＜試験例２＞

交差反応性

本試験例では、ＥＬＩＳＡ法における競合法を採用し、且つ、標準抗原および標識化抗原にＳ－エクオールを用いた場合の、一次抗体の交差反応性について調べた。具体的には、以下のようにして交差反応性について調べた。

[0147] １．試料

後述の表４に示す各々のイソフラボン類等を１００%チャコール処理ヒト血清で溶解し、試料とした。

[0148] ２．一次抗体

一次抗体として、実施例１と同様に、抗エクオールウサギ抗血清を使用した。該抗血清は、後述の抗血清希釈緩衝液で適宜希釈して試験に使用した。

[0149] ３．二次抗体

二次抗体として、実施例１と同様に、ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体を使用した。該抗体は、実施例１と同様に固相化させて、ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体固相化プレートとした。

[0150] ４．生体試料中のエクオールと競合する標識化抗原

標識化抗原として、実施例１と同様に、西洋ワサビパーオキシダーゼ標識Ｓ－エクオールを使用した。

[0151] ５．標準抗原

標準抗原として、実施例１と同様に、Ｓ－エクオールを用いた。なお、０

、３０、９０、２７０および８１０ｎｇ／ｍＬ　Ｓ－エクオール及び１００％チャコール処理ヒト血清の混合溶液の標準エクオール溶液を使用した。

[0152] ６．試料および標準抗原希釈液

試料および標準抗原の希釈液として、１００％チャコール処理ヒト血清を用いた。

[0153] ７．抗血清希釈緩衝液

１５０ｍＭ塩化ナトリウム、０．５％ウシ血清アルブミン、０．０１％Ｔｗｅｅｎ２０含有０．１Ｍりん酸緩衝液（ｐＨ７．５）を抗血清希釈緩衝液とした。

[0154] ８．洗浄液

洗浄液として、１００ｍＭ塩化ナトリウム、０．０２５％Ｔｗｅｅｎ２０含有０．３ｍＭりん酸緩衝液（ｐＨ７．５）を使用した。

[0155] ９．酵素液

酵素液として、６％β－グルファターゼ（株式会社日本バイオテスト研究所製）含有０．１Ｍ酢酸緩衝液（ｐＨ５．５）を使用した。

[0156] １０．基質

基質（基質液）として、０．０５％過酸化水素水、２．２ｍｇ／ｍＬ　ＯＰＤ（ｏ－フェニレンジアミン二塩酸塩）含有５０ｍＭくえん酸緩衝液（ｐＨ５．５）を使用した。

[0157] １１．反応停止液

反応停止液として、３Ｎ硫酸を使用した。

[0158] １２．交差反応性の検討手順

各々のイソフラボン類等及び標識化されていないＳ－エクオールの濃度希釈系列を調製し、各イソフラボン類等及び標識化されていないＳ－エクオールについて、それぞれ濃度０から過剰量を加えたときの競合反応おける吸光度を測定した。ここで得られた各測定値を、標準抗原（Ｓ－エクオール）の希釈系列から得られる検量線と照らし合わせ、算出された各値に基づき反応阻害を比較して、標識化されたＳ－エクオールの抗エクオール抗体への結合

を２０％反応阻害する各イソフラボン類等の濃度及び標識化されていないＳ－エクオールの濃度（IC_{20}）を決定した。

[0159] 該競合反応は、実施例１同様の手順で、ＥＬＩＳＡにおける競合法を用いて行った。また、標識物として、西洋ワサビパーオキシダーゼを使用した。

[0160] このようにして得られた、各々のイソフラボン類等の濃度と、標識化されていないＳ－エクオールの濃度の比をパーセント表示したものを交差性とした。これは、以下の式で表される。

交差性（％）＝（Ｓ－エクオールのIC_{20}／各々のイソフラボン類等のIC_{20}）×１００

[0161] 結果を表４に示す。

[0162] [表4]

イソフラボン類等	交差率
S-Equol	100.00%
R-Equol	13.24%
Daidzein	0.08%
Genistein	0.05%
Glycitein	0.03%
Glycitin	0.02%
Estradiol	0.01%
Daidzin	0.06%
Genistin	0.06%
Biochanin A	0.11%
Formononetin	0.21%
Dihydrodaizein	1.03%
Apigenin	0.00%
Luteolin	0.00%
Dehydroequol	0.33%

[0163] 該結果から、この一次抗体の交差反応性は、Ｓ－エクオールとの交差性１００％に対し、Ｒ－エクオールとの交差性が１３．２４％、エクオールの代謝前のダイゼインとの交差性が０．０８％、ジヒドロダイゼインとの交差性が１．０３％、デヒドロエクオールとの交差性が０．３３％、ダイジンとの交差性が０．０６％であり、このほかの各種物質に対しても交差性が著しく低いことがわかる。これは、本発明の方法、更に本発明のキットによれば、

Ｓ－エクオールを特異的に検出、測定できることを意味する。

[0164] また、例えば従来公知のLABMASTER社のキットLabmaster Equol TR-FIAでは、ダイゼインとの交差率が０．８％であり（http://labmaster.fi/products/tr-fia-kits/equol-tr-fia.htm参照）、その交差性は本キットの１０倍である。また、Labmaster Equol TR-FIAにおけるデヒドロエクオールとの交差率は４２．３％、ジヒドロダイゼインとの交差率も４．０％であり、本キットは従来公知のキットより特異性が著しく高いといえる。

[0165] また、これまでに、モノクローナル抗体を使った論文（Duncan C.S. Talbot, et al. Clinical Chemistry 53: 748-756, 2007）ではダイゼインに対する交差率が＜０．０４％という報告があり、本発明では、一次抗体として抗血清を使用しているにもかかわらず、モノクローナル抗体と同等の特異性を得ることができたことが分かる。

[0166] ＜試験例３＞

液体クロマトグラフ／タンデム質量分析装置（ＬＣ／ＭＳ／ＭＳ）との相関性

本試験例では、ＥＬＩＳＡ法における競合法を採用し、且つ、標準抗原および標識化抗原にＳ－エクオールを用いた場合の、ＬＣ／ＭＳ／ＭＳ法との相関性を調べた。具体的には以下のようにして相関性を調べた。

[0167] １．生体試料

生体試料として、イソフラボン摂取前および摂取後の血清（男性１０名）を使用した。

[0168] ２．一次抗体

一次抗体として、実施例１と同様の、抗エクオールウサギ抗血清を使用した。該抗血清は、後述の抗血清希釈緩衝液で適宜希釈して試験に使用した。

[0169] ３．二次抗体

二次抗体として、実施例１と同様の、ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体を使用した。該抗体は、実施例１と同様に固相化させて、ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体固相化プレートとした。

[0170] ４．生体試料中のエクオールと競合する標識化抗原

標識化抗原として、実施例１と同様の、西洋ワサビパーオキシダーゼ標識Ｓ－エクオール及び標識化抗原液を使用した。

[0171] ５．標準抗原

標準抗原として、実施例１と同様に、Ｓ－エクオールを用いた。なお、８１０ｎｇ／ｍＬ　Ｓ－エクオールを標準抗原希釈液で適宜希釈して、標準エクオール溶液とした。

[0172] ６．標準抗原希釈液

標準抗原の希釈液として、１００％チャコール処理ヒト血清を用いた。

[0173] ７．抗血清希釈緩衝液

１５０ｍＭ塩化ナトリウム、０．５％ウシ血清アルブミン、０．０１％Ｔｗｅｅｎ２０含有０．１Ｍりん酸緩衝液（ｐＨ７．５）を抗血清希釈緩衝液とした。

[0174] ８．洗浄液

洗浄液として、１００ｍＭ塩化ナトリウム、０．０２５％Ｔｗｅｅｎ２０含有０．３ｍＭりん酸緩衝液（ｐＨ７．５）を使用した。

[0175] ９．酵素液

酵素液として、６％β－グルファターゼ（株式会社日本バイオテスト研究所製）含有０．１Ｍ酢酸緩衝液（ｐＨ５．５）を酵素液とした。

[0176] １０．基質

０．０５％過酸化水素水、２．２ｍｇ／ｍＬ　ＯＰＤ（ｏ－フェニレンジアミン二塩酸塩）含有５０ｍＭくえん酸緩衝液（ｐＨ５．５）を基質（基質液）とした。

[0177] １１．反応停止液

３Ｎ硫酸を反応停止液とした。

[0178] １２．エクオール濃度の測定手順

ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体固相化プレートのウェルに、血清検体２０μＬ、酵素及び標識化抗原の混合液５０μＬ（標識化抗原液１に対して酵素液１０

）を加え、攪拌後に２５℃で３０分静置する。その後、抗エクオールウサギ抗血清溶液５０μＬを加え、攪拌後に２５℃で１時間静置した。

[0179] ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体固相化プレートのウェルから反応溶液を除去した後に洗浄液を用いて３回ウェルを洗浄した。洗浄後、ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体固相化プレートのウェルに基質を１００μＬ加え、２５℃で３０分間静置した。その後、ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体固相化プレートのウェルに反応停止液を１００μＬ加え、波長４９０ｎｍの吸光度を測定し、同様に測定した標準希釈液を用いて作製した標準抗原の希釈系列から得られる検量線から、試料中のエクオール濃度を算出した。

[0180] また、液体クロマトグラフ／タンデム質量分析装置（ＬＣ／ＭＳ／ＭＳ）を用いて、同一の生体試料のエクオール濃度を測定した。得られた結果を比較した。これらの相関性を表５および図６に示す。

[0181] [表5]

	LCMSMS (ng/mL)	ELISA (ng/mL)
血清検体１	3.5	1.0
血清検体２	2.8	2.0
血清検体３	21.0	7.8
血清検体４	35.6	17.9
血清検体５	50.9	19.0
血清検体６	49.5	22.8
血清検体７	63.9	24.9
血清検体８	55.9	19.2
血清検体９	78.7	30.2
血清検体１０	121.9	56.3
相関係数		0.984

[0182] 表５から、実施例４による血清検体の測定結果における絶対値は、ＬＣ／ＭＳ／ＭＳの半分弱と低いが、表５から、これらの相関係数は０．９８４と高いことが分かる。

[0183] ＜試験例４＞

Ｓ－エクオール産生者／非産生者の判定１（カットオフ値の設定）

本試験例では、以下のようにしてカットオフ値を設定した。

[0184] 尿検体は、前日の夕食時に大豆イソフラボン摂取（イソフラボンアグリコンとして約２５ｍｇ）させ、摂取６時間以降の早朝第一尿を使用した。対象者数は、２４４名（男性：７６名、女性；１６８名）であり、生体試料数は４３２であった。

[0185] ダイゼイン（ＤＺＮ）濃度の測定結果を図７に示した。ＤＺＮ濃度は、ＨＰＬＣ法を用いて測定した。イソフラボンを前日摂取することによって早朝第一尿で十分量のＤＺＮが尿中に検出されたことから、Ｓ－エクオール産生者／非産生者の判定が可能と判断した。

[0186] 次に、ＥＬＩＳＡ法にて、尿中エクオール（ＥＱＬ）濃度（ＥＱＬ ＥＬＩＳＡ）を測定した。検出限界は３３０ｎｇ／ｍｌであった。同時に、ＨＰＬＣ法での結果に基づき、ＤＺＮ濃度に対するＥＱＬ濃度の対数比（Ｌｏｇ Ｅ／Ｄ ｒａｔｉｏ）を算出した。図８に、ＥＱＬ ＥＬＩＳＡとＬｏｇ Ｅ／Ｄ ｒａｔｉｏとのプロット図を示した。なお、Ｌｏｇ Ｅ／Ｄ ｒａｔｉｏは、－１．７５（Kenneth D.R. Stechell and Sindey J. cole, J. Nutr. 136:2188-2193, August 2006)を基準値とし、－１．７５以上をＳ－エクオール産生者、－１．７５未満を非産生者と判断した。

[0187] これに基づき、エクオール産生者／非産生者の誤判定率が最も低くなるエクオール濃度、すなわちカットオフ値を検討した。検討結果を表６に示す。なお、ＨＰＬＣ法において、産生者と判断された生体試料数は３７７、非産生者と判断された生体試料数は５５であった。

[0188]

[表6]

Cut off値 (ng/ml)	① 非産生者が産生者と判定される誤判定 非産生者検体数:55		② 産生者が非産生者と判定される誤判定 産生者検体数:377		誤判定合計 総検体数:432	
	検体数	誤判定率 (%)	検体数	誤判定率 (%)	検体数	合計誤判定率 (%)
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

[0189] 表６から、エクオール濃度が８００ｎｇ／ｍｌの場合に、エクオール産生者／非産生者の誤判定率が最も低くなった。従って、この場合、カットオフ値は８００ｎｇ／ｍｌと設定された。

[0190] ＜試験例５＞

Ｓ－エクオール産生者／非産生者の判定２（カットオフ値の設定）

試験例４と同様にして、Ｓ－エクオール産生者か非産生者かの判定基準となるカットオフ値を設定した。

[0191] なお、免疫測定法における生体試料数は７１３である。また、検出限界以下の値を「０」とした。検討結果を表７に示す。

[0192]

[表7]

Cut off値 (ng/ml)	① 非産生者が産生者と判定される誤判定 非産生者検体数:337		② 産生者が非産生者と判定される誤判定 産生者検体数:376		誤判定合計 総検体数:713	
	検体数	誤判定率 (%)	検体数	誤判定率 (%)	検体数	合計誤判定率 (%)
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

[0193] 表７から、エクオール濃度が６５０ｎｇ／ｍｌの場合に、エクオール産生者／非産生者の誤判定率が最も低くなった。従って、この場合、カットオフ値は６５０ｎｇ／ｍｌと設定された。

[0194] ＜試験例６＞

Ｓ－エクオール産生者／非産生者の判定３

試験例４と同様にして、Ｓ－エクオール産生者か非産生者かの判定基準となるカットオフ値を設定した。

[0195] なお、免疫測定法における生体試料数は１１８である。検討結果を表８に示す。

[0196]

[表8]

Cut off値 (ng/ml)	① 非産生者が産生者と判定される誤判定 非産生者検体数:55		② 産生者が非産生者と判定される誤判定 産生者検体数:63		誤判定合計 総検体数:118	
	検体数	誤判定率 (%)	検体数	誤判定率 (%)	検体数	合計誤判定率 (%)
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

[0197] 表８から、エクオール濃度が１０００ｎｇ／ｍｌの場合に、エクオール産生者／非産生者の誤判定率が最も低くなった。従って、この場合、カットオフ値は１０００ｎｇ／ｍｌと設定された。

産業上の利用可能性

[0198] 抗エストロゲン効果、エストロゲン様効果を期待して、大豆加工品を摂取する際に、尿中、血液中のエクオール濃度を測定することにより、その効果の有無が判断されるが、エクオールを精確に測定するためにＨＰＬＣ法等の機器分析を用いる方法では、多検体処理には時間と手間がかかり、日常の測定には適さない。

[0199] しかし、本発明により、尿中、血液中のエクオールを短時間で、しかも精確に測定することが可能となり、エクオールを産生する安全な乳酸菌製剤の投与の効果の判断も含め、大豆加工品の摂取の効果を類推することが可能となる。

請求の範囲

[請求項1] 生体試料中のエクオールを免疫法により測定する方法であって、検量線の作成に使用する標準抗原および生体試料中のエクオールと競合する標識化抗原からなる群より選択される少なくとも一方の抗原として、Ｓ－エクオールを用いることを特徴とする方法。

[請求項2] Ｓ－エクオールに対する交差性を１００％とした場合、ダイゼインに対する交差性が１０％以下、ゲニステインに対する交差性が１０％以下、グリシテインに対する交差性が１０％以下、ジヒドロダイゼインに対する交差性が２０％以下、およびデヒドロエクオールに対する交差性が２０％以下である抗エクオール抗体を一次抗体として使用する、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記標識化抗原の標識物が、酵素、放射性同位体、色素、蛍光物質、ラテックスおよび金属コロイドからなる群より選択される少なくとも１種である、請求項１に記載の方法。

[請求項4] 前記免疫法が、ＥＬＩＳＡ法、ラジオイムノアッセイ法およびイムノクロマト法からなる群より選択される少なくとも１種である、請求項１に記載の方法。

[請求項5] 前記生体試料が、尿および血液からなる群より選択される少なくとも１種である、請求項１に記載の方法。

[請求項6] 前記生体試料中のエクオールの抱合体が脱抱合処理されることなく測定されることを特徴とする、請求項１に記載の方法。

[請求項7] 生体試料中のエクオールを免疫法により測定するためのキットであって、検量線の作成に使用する標準抗原および試料中のエクオールと競合する標識化抗原からなる群より選択される少なくとも一方の抗原として、Ｓ－エクオールを含むことを特徴とする、キット。

[請求項8] 更に、Ｓ－エクオールに対する交差性を１００％とした場合、ダイゼインに対する交差性が１０％以下、ゲニステインに対する交差性が１０％以下、グリシテインに対する交差性が１０％以下、ジヒドロダ

イゼインに対する交差性が２０％以下、およびデヒドロエクオールに対する交差性が２０％以下である抗エクオール抗体を一次抗体として含む、請求項７に記載のキット。

[請求項9] 前記免疫法が、ＥＬＩＳＡ法、ラジオイムノアッセイ法およびイムノクロマト法からなる群より選択される少なくとも１種である、請求項７に記載のキット。

[請求項10] 前記生体試料が、尿および血液からなる群より選択される少なくとも１種である、請求項７に記載のキット。

[請求項11] 被験者のエクオール産生能を判定する方法であって、

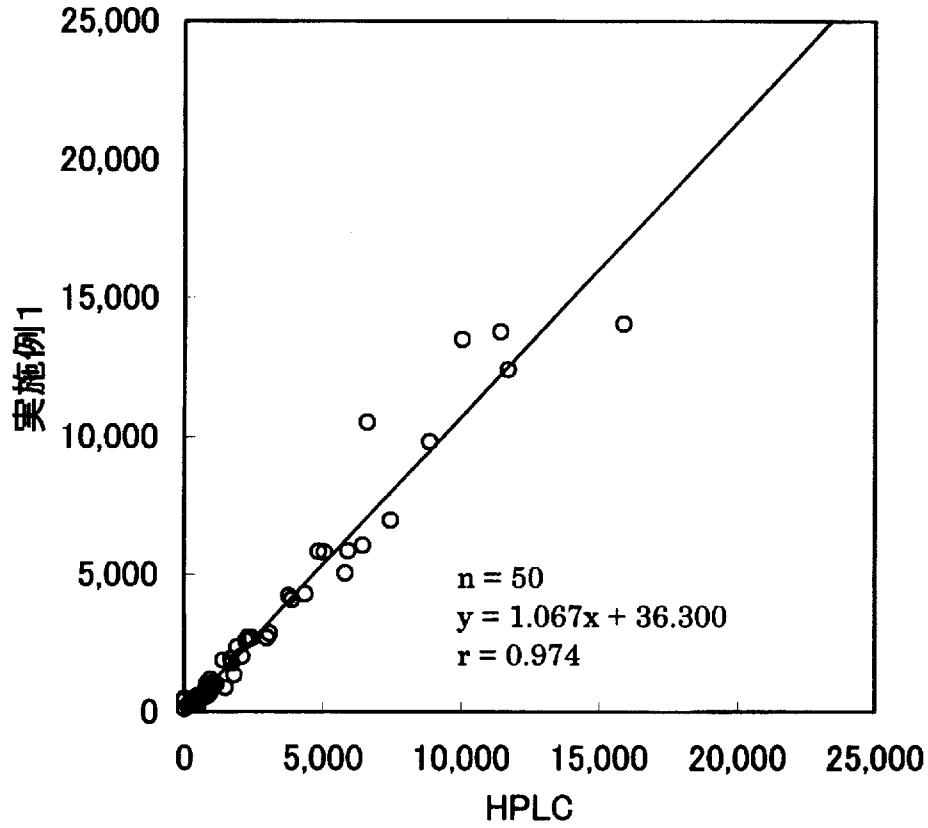
（１）検量線の作成に使用する標準抗原および生体試料中のエクオールと競合する標識化抗原からなる群より選択される少なくとも一方の抗原としてＳ－エクオールを用いた免疫法により、大豆イソフラボンを摂食させた被験者由来の生体試料中のエクオールを測定する工程、および

（２）前記工程（１）で得られたエクオールの測定値に基づいて、被験者のエクオール産生能を判定する工程、

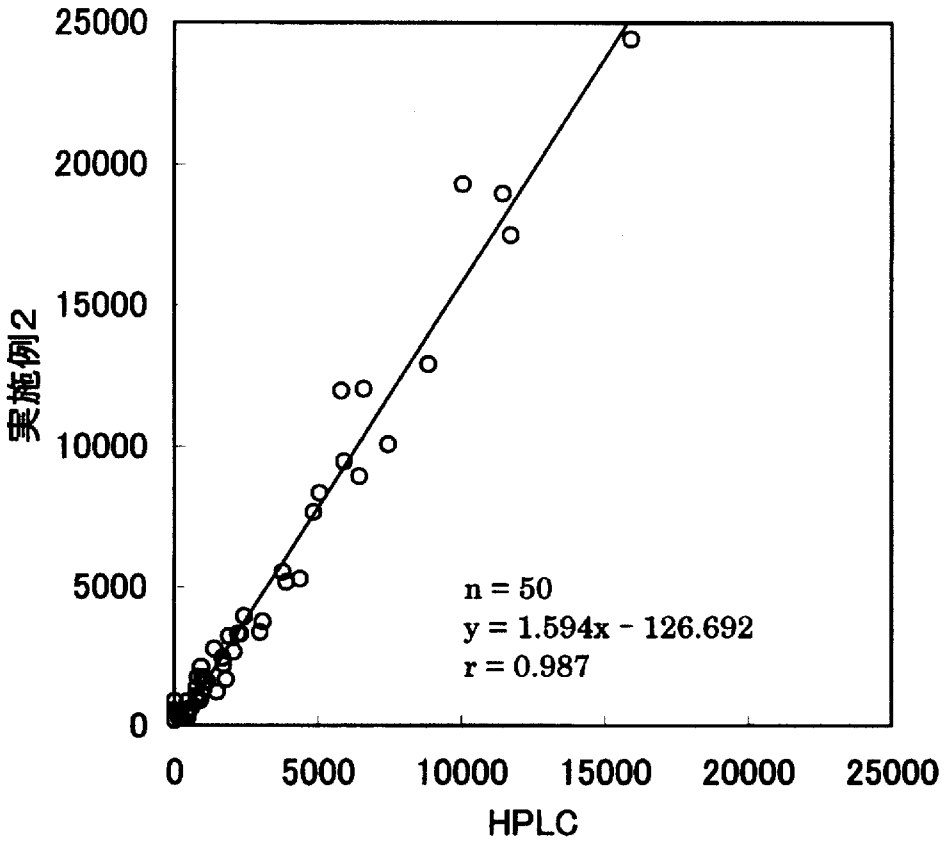
を含む判定方法。

[請求項12] 前記工程（１）において、生体試料中のエクオールの抱合体が脱抱合処理されることなく測定されることを特徴とする、請求項１１に記載の判定方法。

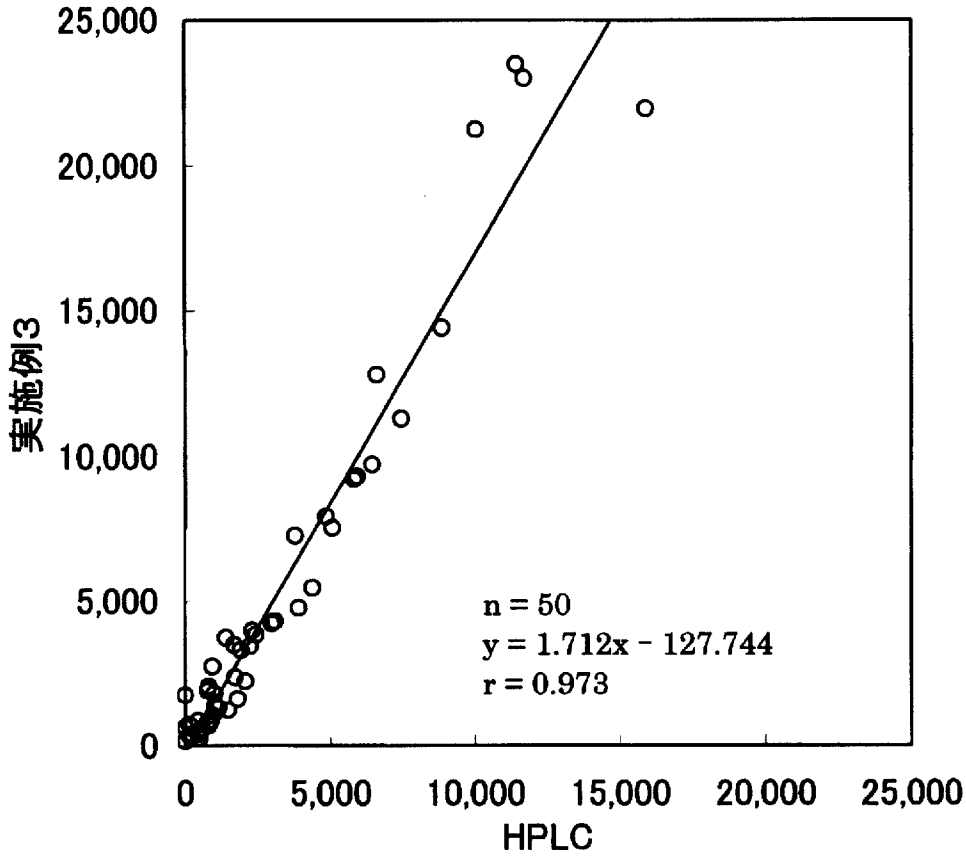
[図1]


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

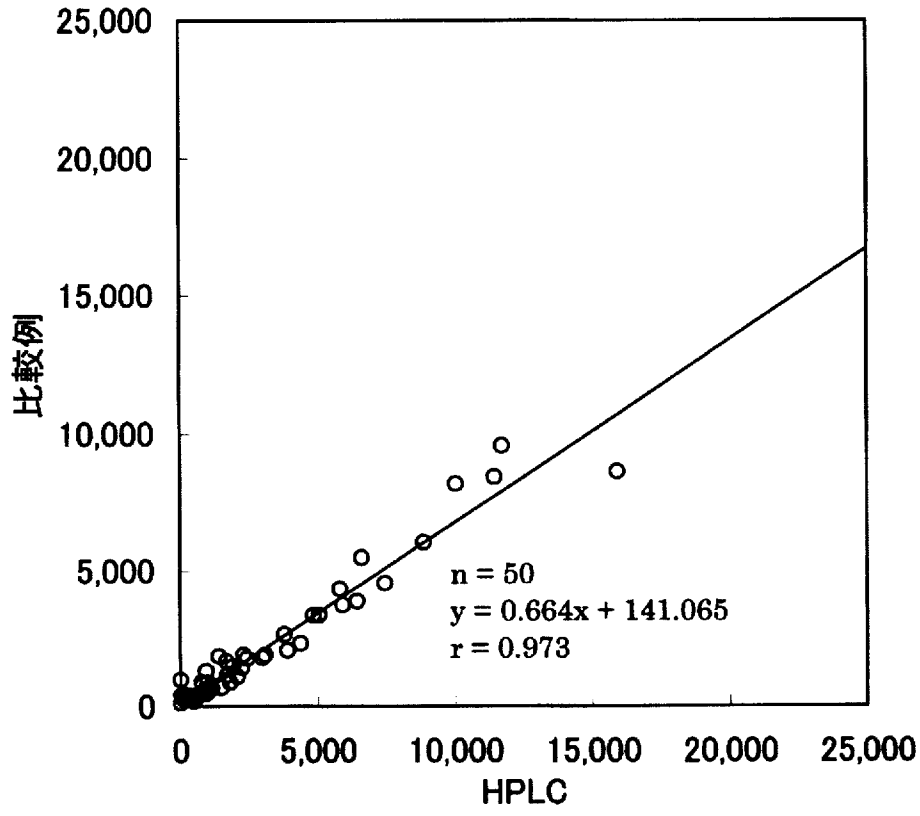
[図2]


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

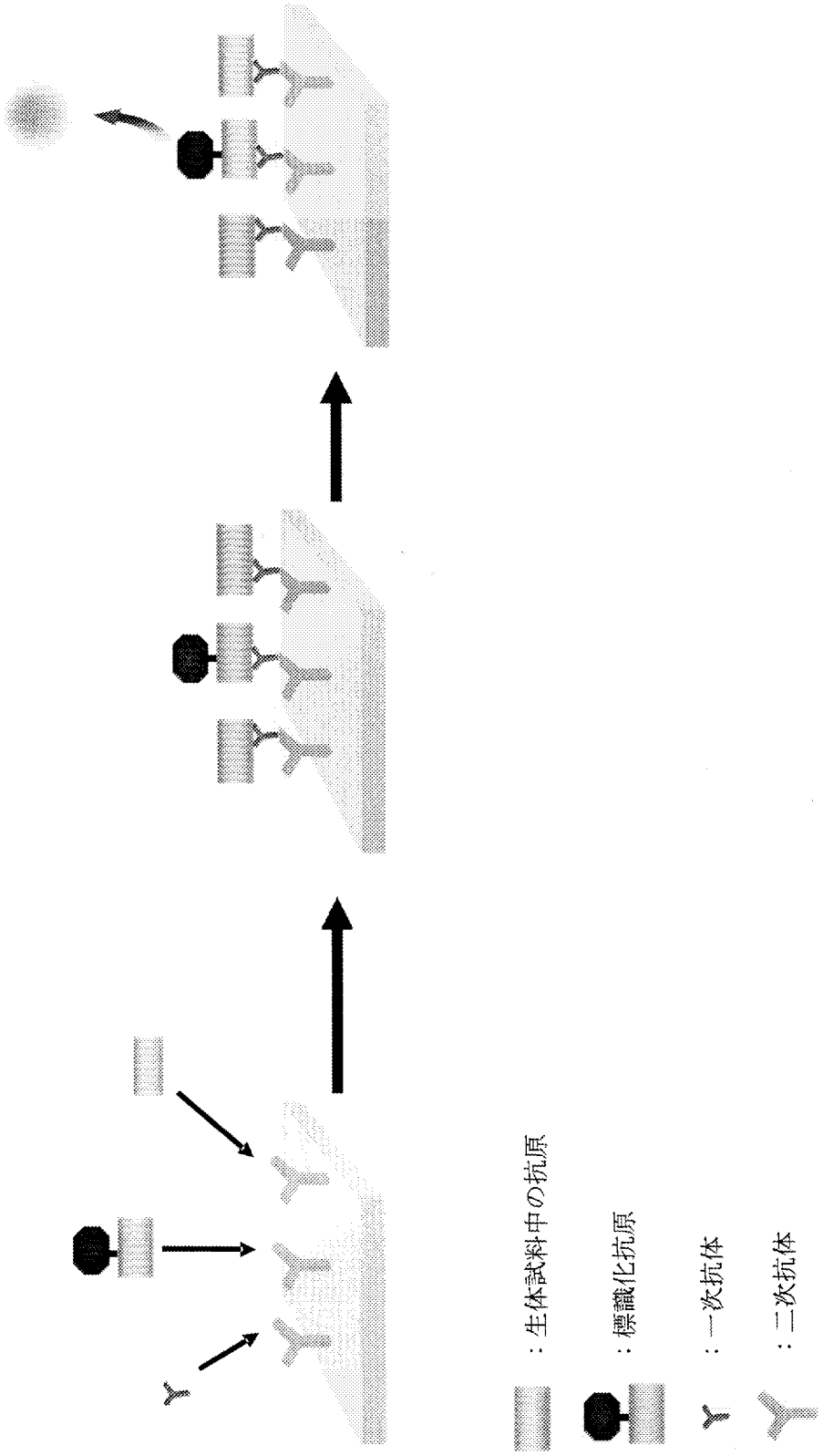
[図3]


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

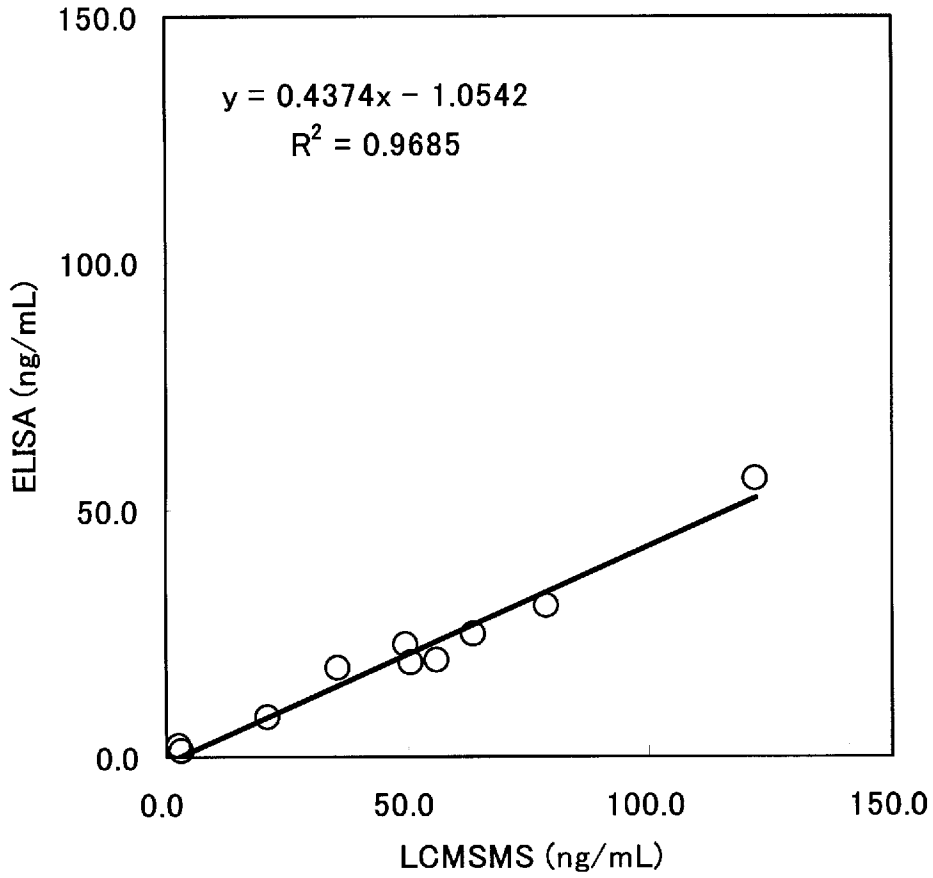
[図4]


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

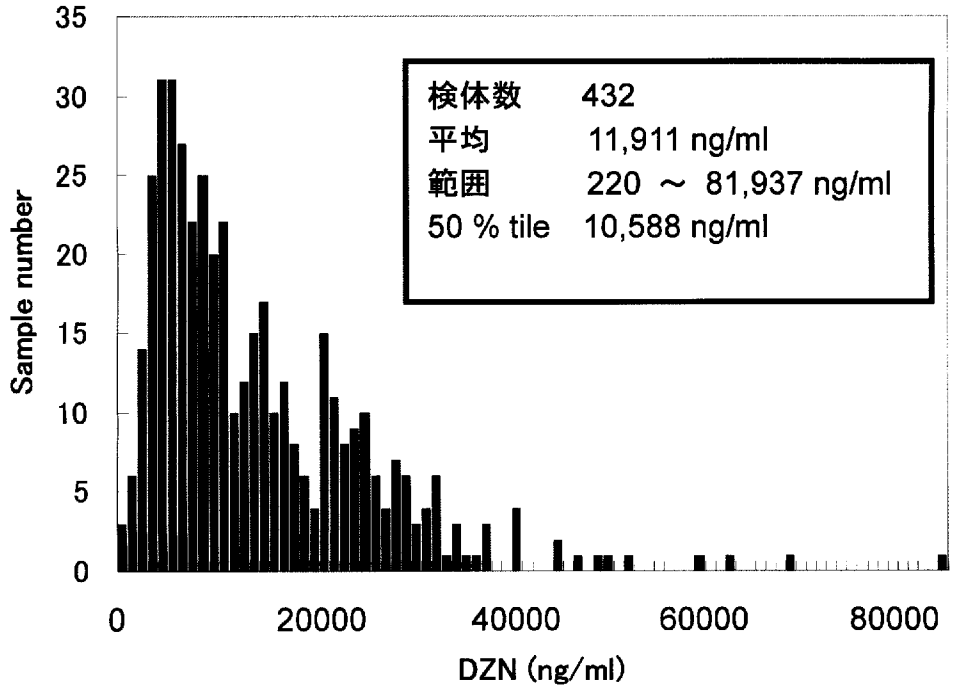
[図5]



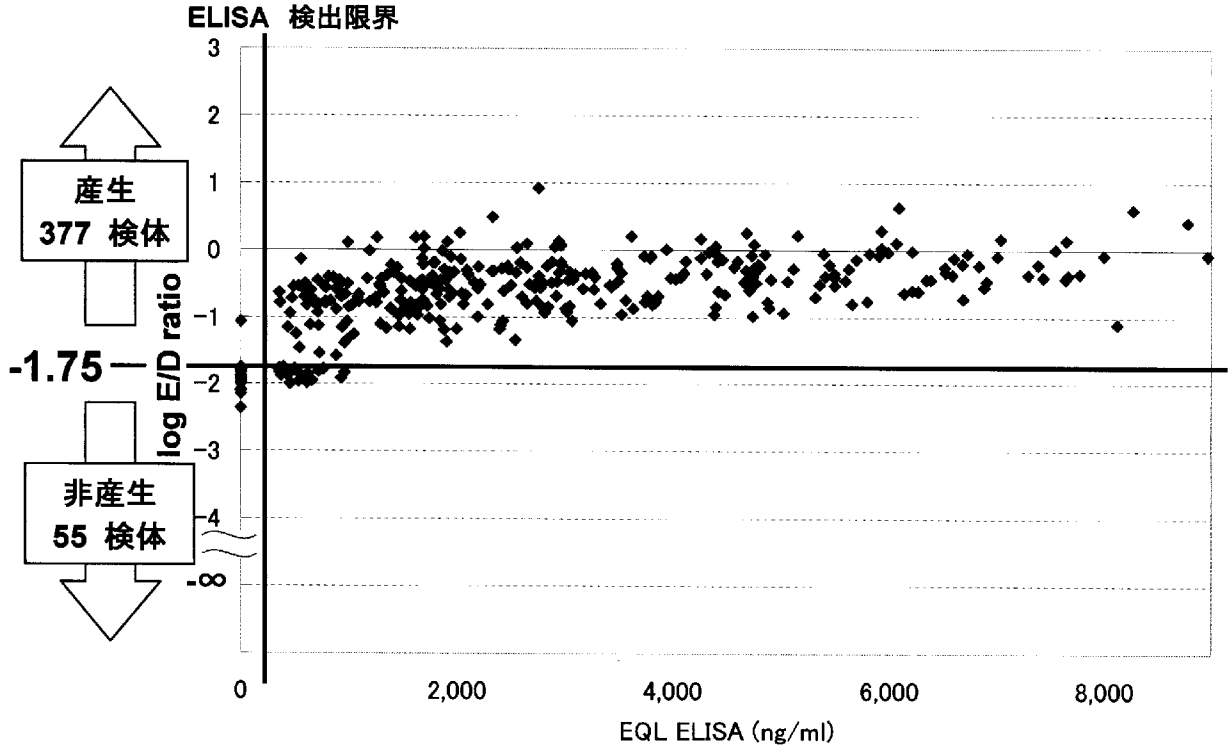
[図6]


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)

[図7]


検体数 432
平均 11,911 ng/ml
範囲 220 ～ 81,937 ng/ml
50 % tile 10,588 ng/ml
Sample number
35
30
25
20
15
10
5
0
0
20000
40000
60000
80000
DZN (ng/ml)

[図8]


ELISA 検出限界
産生
377 検体
非産生
55 検体
-1.75
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)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/057974

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/53(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Elke Brouwers et al., "Time-resolved fluoroimmunoassay for equol in plasma and urine", The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2003, Volume 84, Issue 5, pp. 577-588	1-10
Y	Duncan C.S. Talbot et al., "Monoclonal Antibody-Based Time-Resolved Fluorescence Immunoassays for Daidzein, Genistein, and Equol in Blood and Urine: Application to the Isoheart Intervention Study", Clinical Chemistry, 2007, Vol. 53, pp. 748-756	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 June, 2010 (01.06.10)	15 June, 2010 (15.06.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/057974

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SUZUKI, "Ranso Tekishutsu Rat ni Okeru S-tai Equol no Estrogen-yo Sayo", Dai 61 Kai The Japanese Society of Nutrition and Food science Taikai Koen Yoshishu, 2007, pages 250, 4K-6P	1-10
A	JP 2006-242602 A (Gifu Prefecture), 14 September 2006 (14.09.2006), entire text; all drawings	1-10
A	JP 2006-504409 A (Children's Hospital Medical Center), 09 February 2006 (09.02.2006), entire text; all drawings	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2010/057974

JP 2006-242602 A	2006.09.14	(Family: none)	
JP 2006-504409 A	2006.02.09	AU 2003259220 A1	2004.02.09
		AU 2003259220 B2	2009.01.08
		AU 2003286781 A1	2004.05.25
		AU 2003286781 B2	2009.05.21
		AU 2005239984 A1	2005.11.17
		BR 0313182 A	2007.07.24
		CA 2492754 A1	2004.01.29
		CA 2504682 A1	2004.05.13
		CA 2564399 A1	2005.11.17
		CN 1681386 A	2005.10.12
		EP 1545206 A2	2005.06.29
		EP 1569636 A2	2005.09.07
		EP 1569636 A4	2007.07.04
		EP 1740191 A1	2007.01.10
		EP 1740191 A4	2008.07.30
		JP 2006-508942 A	2006.03.16
		JP 2007-534751 A	2007.11.29
		US 2004/235758 A1	2004.11.25
		US 7396855 B2	2008.07.08
		US 2004/147594 A1	2004.07.29
		US 2005/245492 A1	2005.11.03
		US 2006/122262 A1	2006.06.08
		US 2007/043108 A1	2007.02.22
		US 2009/018185 A1	2009.01.15
		US 2010/076071 A1	2010.03.25
		US 2010/087519 A1	2010.04.08
		US 2010/120705 A1	2010.05.13
		WO 2004/009035 A2	2004.01.29
		WO 2004/039327 A2	2004.05.13
		WO 2005/107770 A1	2005.11.17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/057974

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 11, 12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The "step of determining the equol production ability of a subject" in the inventions of claims 11 and 12 involves a step of determining the health condition of a human body or the like. Therefore, the inventions of claims 11 and 12 pertain to a method for the diagnosis of a human body.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０５７９７４

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/53(2006.01)i

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１０年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	Elke Brouwers et al., "Time-resolved fluoroimmunoassay for equol in plasma and urine", The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2003, Volume 84, Issue 5, pp. 577-588	１－１０
Y	Duncan C.S. Talbot et al., "Monoclonal Antibody-Based Time-Resolved Fluorescence Immunoassays for Daidzein, Genistein, and Equol in Blood and Urine: Application to the Isoheart Intervention Study", Clinical Chemistry, 2007, Vol. 53, pp. 748-756	１－１０

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー

「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０１．０６．２０１０	１５．０６．２０１０

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　２Ｊ　３８０７
廣田　健介
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２５２

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Ｙ	鈴木，卵巣摘出ラットにおけるＳ体エクオールのエストロゲン様作用，第６１回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集，2007，p. 250 4K-6P	１－１０
Ａ	JP 2006-242602 A（岐阜県）2006.09.14、全文、全図	１－１０
Ａ	JP 2006-504409 A（チルドレンズ　ホスピタル　メディカル　センター）2006.02.09、全文、全図	１－１０

国際調査報告

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０５７９７４

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1．☑ 請求項　１１，１２　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項１１，１２に係る発明の「被験者のエクオール産生能を判定する工程」は、人間の健康状態等について判断する工程を含むものであるから、請求項１１，１２に係る発明は人間を診断する方法に該当する。

2．☐ 請求項　　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3．☐ 請求項　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

2．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０５７９７４

JP 2006-242602 A	2006.09.14	（ファミリーなし）	
JP 2006-504409 A	2006.02.09	AU 2003259220 A1	2004.02.09
		AU 2003259220 B2	2009.01.08
		AU 2003286781 A1	2004.05.25
		AU 2003286781 B2	2009.05.21
		AU 2005239984 A1	2005.11.17
		BR 0313182 A	2007.07.24
		CA 2492754 A1	2004.01.29
		CA 2504682 A1	2004.05.13
		CA 2564399 A1	2005.11.17
		CN 1681386 A	2005.10.12
		EP 1545206 A2	2005.06.29
		EP 1569636 A2	2005.09.07
		EP 1569636 A4	2007.07.04
		EP 1740191 A1	2007.01.10
		EP 1740191 A4	2008.07.30
		JP 2006-508942 A	2006.03.16
		JP 2007-534751 A	2007.11.29
		US 2004/235758 A1	2004.11.25
		US 7396855 B2	2008.07.08
		US 2004/147594 A1	2004.07.29
		US 2005/245492 A1	2005.11.03
		US 2006/122262 A1	2006.06.08
		US 2007/043108 A1	2007.02.22
		US 2009/018185 A1	2009.01.15
		US 2010/076071 A1	2010.03.25
		US 2010/087519 A1	2010.04.08
		US 2010/120705 A1	2010.05.13
		WO 2004/009035 A2	2004.01.29
		WO 2004/039327 A2	2004.05.13
		WO 2005/107770 A1	2005.11.17