妊娠期・授乳期の母親ラット，仔ラットに対する ゲニステインとダイゼイン投与における生体影響の相違

東 泉 裕 子^{*1}，梅 木 美 樹^{*2}，石 見 佳 子^{*3}，池 上 幸 江^{*4}

^{*1} 聖徳大学人文学部，^{*2} 大分大学教育福祉科学部，^{*3} 独立行政法人国立健康・栄養研究所，

^{*4} 大妻女子大学家政学部

Different Effects of the Soy Isoflavones, Genistein and Daidzein, on Pregnant and Lactating Rats and Their Offspring

Yuko Tousen^{*1}, Miki Umeki^{*2}, Yoshiko Ishimi^{*3} and Sachie Ikegami^{*4}

^{*1} Department of Human Life and Culture, Seitoku University ;

^{*2} Faculty of Education and Welfare Science, Oita University ;

^{*3} National Institute of Health and Nutrition ;

^{*4} Department of Home Economics, Otsuma Women's University

The objects of the present study were to confirm the safety and compare the effects of the soy isoflavones, genistein and daidzein, on rat dams and their offspring. Sprague-Dawley rats were fed with a control diet or diet containing 0.50g/kg of genistein or daidzein during pregnancy and the lactation period until postnatal day 12. The body weight of the dams fed with the daidzein diet was significantly suppressed during pregnancy and lactation, and the litter weight of the daidzein group was significantly lower at birth compared to the control group and genistein group. The body weight of the offspring during lactation and after weaning was also significantly suppressed in the daidzein group. On the other hand, the body and wet organ weights, dry weight of the femur and anogenital distance in the offspring were not affected by exposure to genistein or daidzein.

Equol was found in the stomach milk and serum of the suckling pups in the daidzein group. The possibility is suggested that equol might have contributed to the obvious effects observed in the daidzein group.

Jpn. J. Nutr. Diet., 64 (3) 161 ~ 172 (2006)

Key words : soy isoflavone, genistein, daidzein, equol, transfer

緒 言

大豆イソフラボン¹⁾は人の健康に有効であることが数多く報告されている¹⁾。その主成分であるゲニステイン，ダイゼインへの関心は近年世界中で高まっている。それらの物質はエストロゲンレセプター (ER) に対して強い親和性をもつことから，エストロゲン様の活性をもつことが知られている^{2, 3)}。そのため大豆イソフラボンは乳癌，前立腺癌，骨粗鬆症などホルモン依存性疾患のホルモン交換療法に有効であり，大豆製品を多く摂取するアジア地域ではそれらの疾病率が低いことが報告されている^{4~7)}。

一方で，イソフラボンはエストロゲン様作用をもつことから内分泌攪乱化学物質としての作用も懸念されている。とくにホルモン感受性が強く，発達の著しい胎児期・授乳期において，母親を介した仔へのイソフラボン

移行に関しては問題となっている。妊娠動物へのエストロゲン投与は，妊娠時の母親の体重増加量，飼料摂取量の低下を起こし，それらの結果として出生数，出生時体重の低下など妊娠へ有害な影響を引き起こすことが報告されている⁸⁾。また大豆を摂取した母親ラットの母乳を与えられた乳仔ラットでは，その仔の思春期や成長後での影響が観察されている⁹⁾。

他方，甲状腺腫と甲状腺機能低下症は，大豆を基にした乳児用ミルクを摂取した乳児で報告されており¹⁰⁾，さらに生まれて間もない時期での大豆摂取もまた自己免疫甲状腺障害の進行と関係しているとの報告もある¹¹⁾。しかし，母親とその乳児の甲状腺へのイソフラボンの影響を観察した報告は少ない。

また，多くの論文において様々な投与量で，母乳，経口投与，乳仔への皮下注射などの方法でゲニステインを

キーワード：大豆イソフラボン，ゲニステイン，ダイゼイン，エクオール，移行

(連絡先：東泉裕子 〒271-8555 松戸市岩瀬550 聖徳大学人文学部生活文化学科食品衛生学研究室 電話 047-365-1111

FAX 047-363-1401 E-mail tousen@seitoku.ac.jp)

投与したときの影響が報告されているが¹²⁻¹⁴⁾、それらの結果は論文間において一貫していない。さらに、ゲニステイン、ダイゼインの影響比較は卵巣摘出モデル動物を用いて骨代謝について報告されているが¹⁵⁾、妊娠動物やその仔を用いた生体影響での比較はほとんどされていない。

すでに我々は大豆イソフラボン混合物（イソフラボン含量33.3%；ゲニステイン14.9%，ダイゼイン16.4%，グリシチン2.03%）を妊娠ラットに投与した実験において、母親ラットでは体重減少と肝臓の肥大を観察している（投稿中）。さらに出産数の減少傾向と吸収された胎仔の増加傾向がみられた。また、母親ラットと乳仔ラットにおいて甲状腺ホルモン濃度への影響も観察された。大豆に含まれるイソフラボンの主成分としてはゲニステインとダイゼインが知られている。しかし、これらの結果は純粋なゲニステインを用いた同様の実験では観察されなかった（投稿中）。そこで大豆イソフラボン混合物投与により観察された生体影響は、ダイゼインが原因である可能性が考えられる。

ダイゼインのERへの親和性はゲニステインより低く、内分泌攪乱作用は低いと考えられてきた。他方、ダイゼインの代謝産物であるエクオールがERに対して強い結合親和力をもつことが近年示唆されている¹⁶⁾。従って、血清中のエクオール濃度を知ることは、ダイゼインのエストロゲン様活性による生体影響を明らかにするために重要である。しかし、妊娠中および授乳期間中での母親ラットの飼料摂取による仔ラットへのダイゼイン、

エクオールの移行を観察した報告は少ない。

本研究は母親ラットとその母親から産まれた仔ラットにおいて、大豆イソフラボンの主成分であるゲニステイン、ダイゼインを含む飼料の投与による生体影響の相違を比較し、それらの安全性を確認することを目的として実験を行った。

Table 1 Composition of experimental diets¹

Constituent	(g/kg diet)		
	Control diet	Genistein diet	Daidzein diet
Cornstarch	529.5	529.0	529.0
Sucrose	100	100	100
Casein	200	200	200
Corn oil	70	70	70
Cellulose	50	50	50
Mineral mix	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10
L-Cystine	3	3	3
Cholin bitartrate	2.5	2.5	2.5
Tert-butyl hydroquinone	0.014	0.014	0.014
Genistein ²	—	0.51	—
Daidzein ²	—	—	0.52

¹ Prepared according to AIN-93G formulation.

² Genistein and daidzein (Fujicco Co., Ltd., Kobe) were mixed at a level 0.50g/kg as based on their purities.

Table 2 Body weights of dams fed the control diet or the diet containing genistein or daidzein 0.50g /kg during pregnancy, and the number and body weight of their pups at parturition¹

Group	Control group	Genistein group	Daidzein group
Dams			
<i>n</i>	4	4	4
Body weight (g) of the pregnancy day 5	250.9 ± 20.2	249.0 ± 16.9	248.0 ± 12.3
Body weight (g) of the pregnancy day 20	393.4 ± 21.6 ^a	386.9 ± 23.7 ^a	312.8 ± 37.4 ^b
Pups			
Total number	15.0 ± 1.6	14.8 ± 1.7	14.0 ± 2.0
Male number	7.8 ± 2.2	8.2 ± 1.7	8.0 ± 1.5
Female number	7.3 ± 2.8	6.5 ± 3.4	6.0 ± 2.2
Total litter weight ² (g)	97.1 ± 6.0 ^a	93.8 ± 6.8 ^a	69.1 ± 10.7 ^b
Weight/Number (g)	6.50 ± 0.36 ^a	6.39 ± 0.49 ^a	4.94 ± 0.36 ^b

¹ All values are means ± SD (standard deviation).

letter are significantly different at $p < 0.05$.

^{a, b} Values not sharing a superscript

² Total litter weight was evaluated by analysis of covariance with total number as a covariance ($p < 0.05$).

方 法

1. 動物

妊娠5日目のSprague-Dawley系雌ラットを日本クレア株式会社（東京）から購入し、プラスチックのケージに1匹ずつ分けて飼育した。離乳後の仔ラットはステンレスのケージで個別に飼育した。ラットは母、仔とも温度（23±1℃）、湿度（50±5%）、12時間の明暗サイクルで管理された動物室で飼育した。母親ラット、離乳後の仔ラットともに飼料、蒸留水を自由摂取とした。すべての動物は「実験動物の飼養および保管に関する基準」（昭和55年3月総理府告示第6号）に従い取り扱った。

2. 飼料と成分

妊娠ラットは購入後よりイソフラボンレベル0 g/kgのコントロール食、またはゲニステイン0.50g/kg、ダイゼイン0.50g/kgの飼料を摂取させた。飼料はAIN-93Gを基本としたが、大豆油はコーン油に変えた¹⁷⁾。飼料組成はTable 1に示した。すべての飼料成分はオリエンタル酵母工業株式会社（東京）から、ゲニステイン（純度98.04%）、ダイゼイン（純度96.15%）はフジッコ株式会社（神戸）から購入した。

3. 実験デザイン

妊娠ラット12匹は、コントロール群（C群）、ゲニステイン群（G群）、ダイゼイン群（D群）の3群に体重が均一となるように4匹ずつ割り当てた。出産日に仔ラットの数をそれぞれの親に対し雌5匹、雄5匹の計10匹とし、各群合計40匹にそろえた。母親ラットは出産後12日目までは各群それぞれの飼料を摂取していたが、13日目からすべての群の飼料をコントロール食に変えた。仔ラットは生後21日目までは母親ラットと同じケージで飼育したが、それ以降は飼料（コントロール食）を与えて個別に飼育した。仔ラットは生後4、15、34日目に母親ラット1匹につき雌1匹、雄1匹（各群雌4匹、雄4匹、各群雌雄合計8匹）を、母親ラットは出産後21日目の離乳日に屠殺した。なお、解剖する仔ラットは各群から無作為に選定した。解剖時にはそれぞれジエチルエーテル麻酔下で心臓採血を行い、各臓器は摘出後重量を測定した。心臓より採血した血液は遠心分離（4℃、3,000rpm、20分）した後、分析に使用するまで-40℃で保存した。

4. 測定法

（1）仔ラットの anogenital distance

仔ラットの性成熟を評価するために anogenital distance（AGD）を測定し、C群とイソフラボン食群（G群、D群）とを比較した。AGDとは身体を伸ばしていない自然な状態での生殖器官の結節基底から肛門に最も近い縁部の長さであり、生後4、15日目に測定した。

（2）大腿骨乾燥重量

Fig. 1 Changes in body weight of dams fed the control diet or diet containing genistein or daidzein 0.50g/kg during pregnancy and lactation¹.

¹ The pregnancy period was from pregnancy day 5 to pregnancy day 21. The lactation period was from lactation day 1 to lactation day 21 after parturition.

² Dams in the control group were not exposed to isoflavones and, dams of genistein and daidzein groups were exposed to a 0.50g genistein/kg, and a 0.50g daidzein/kg diets during pregnancy and lactation, respectively.

仔ラットは解剖時に左大腿骨を摘出し、付着した筋肉および軟骨を完全に除去した後、凍結乾燥後に乾燥重量を求めた。

（3）仔ラットの血清中および胃内容物中のイソフラボン分析

血清中のゲニステイン、ダイゼイン、エクオール濃度はGamacheとAcworthらの方法¹⁸⁾で測定した。仔ラットの胃内容物はその0.5gを0.1M酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）1mlとホモジナイズし、その溶液0.5gを血清と同様の方法で処理し分析に用いた。試料溶液は分析セル（検出器1：300mV、検出器2：600mV）（Coulochem III, ESA, MA）、ガードセル（+600mV）のついた電気化学検出器を備えた高速液体クロマトグラフシステム（HPLC）（Shimazu 10ADシリーズ）に注入した。分離条件は以下の通りである。

Table 3 Food intake and food efficiency in dams fed the control diet or diet containing genistein or daidzein 0.50g/kg during pregnancy and lactation¹

(g)			
Group	Control group (n = 4)	Genistein group (n = 4)	Daidzein group (n = 4)
Food intake ²			
Pregnancy period			
16 days	329.7 ± 25.1 ^a	318.1 ± 17.0 ^a	221.0 ± 49.1 ^b
Lactation period			
First 12 days	411.7 ± 15.9 ^a	419.9 ± 23.2 ^a	325.7 ± 39.9 ^b
Last 9 days	388.9 ± 18.8 ^a	375.3 ± 11.4 ^{a, b}	351.1 ± 18.7 ^b
Food efficiency [Body weight gain (g) /food intake (g)]			
Pregnancy period			
16 days	0.424 ± 0.030 ^a	0.434 ± 0.017 ^a	0.284 ± 0.061 ^b

¹ All values are means ± SD (standard deviation). ^{a, b} Values not sharing a superscript letter are significantly different at $p < 0.05$.

² Food intake of dams during pregnancy and lactation was evaluated by analysis of covariance with body weight of dams as a covariance ($p < 0.05$).

Table 4 Organ weights of dams fed the control diet or diet containing genistein or daidzein 0.50g/kg during pregnancy and lactation at day 21 after parturition¹

(g/100g body weight)			
Group	Control group (n = 4)	Genistein group (n = 4)	Daidzein group (n = 4)
Liver	4.51 ± 0.59 ^{a, b}	4.27 ± 0.22 ^a	5.05 ± 0.25 ^b
Kidney	0.684 ± 0.024	0.690 ± 0.051	0.674 ± 0.033
Spleen	0.205 ± 0.018	0.195 ± 0.011	0.212 ± 0.028
Thymus	0.064 ± 0.010	0.056 ± 0.011	0.046 ± 0.017
Perirenal fat	0.322 ± 0.144	0.284 ± 0.173	0.105 ± 0.042
Ovary	0.045 ± 0.008 ^{a, b}	0.051 ± 0.007 ^a	0.031 ± 0.010 ^b
Uterus	0.116 ± 0.019 ^a	0.170 ± 0.028 ^b	0.108 ± 0.018 ^a

¹ All values are means ± SD (standard deviation). ^{a, b} Values not sharing a superscript letter are significantly different at $p < 0.05$.

カラム；Nova-Pac C18 (waters, 3.9 × 150mm), カラム温度；40℃, 移動相；50mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.8)：メタノール：アセトニトリル = 50：35：15 (V/V/V), 流速：0.65ml/min。

(4) 血清甲状腺ホルモン分析

血清中の甲状腺ホルモン triiodothyronine (T₃), thyroxine (T₄), thyroid stimulating hormone (TSH) 濃度の測定は測定会社 (株式会社エスアールエル, 東京) に依頼した。

(5) 統計処理

データは平均 ± 標準偏差で表した。飼料からのイソフラボン投与を因子とし, 一元配置の分散分析を行った。群間での有意差検定には Duncan の多重比較法を用いた ($p < 0.05$)。 “1匹の母親ラットが出産した仔ラット全体

重量” に関しては, “1匹の母親ラットが出産した仔ラット雌雄合計数” を共変量とし, 共分散分析で差を検定した ($p < 0.05$)。 “仔ラットの飼料摂取量” と “体重増加量”, また “AGD” と “体重” の関係を回帰分析によって調べた。 “仔ラットの飼料摂取量” と “体重増加量”, また “AGD” と “体重” の間において回帰直線が0であるか, 回帰の有意性が仮定できなかった場合は分析を中断し, 群間ごとの比較を一元配置の分散分析により行った。 0でない場合 “体重” を共変量とし, 共分散分析により平均傾斜を比較した。 また経時的な体重変化については仔を雌雄に分け Huynh and Feldt (1976) の方法に従い自由度を調整し, 反復測定分析を行った ($p < 0.05$)。 統計分析はSPSSパッケージ (SPSS for Windows ver. 11.0) により行った。

Table 5 Body and organ weights, anogenital distance, and dry weight of the femur in suckling pups of dams fed the control diet or diet containing genistein or daidzein 0.50g/kg during pregnancy and lactation on PND¹ 4²

Group	Control group	Genistein group	Daidzein group
Number of suckling pups	40	40	40
Body weight of suckling pups (g)	10.6 ± 0.6 ^a	10.5 ± 0.9 ^a	8.2 ± 0.5 ^b
Male			
<i>n</i>	4	4	4
Anogenital distance ³ (mm)	6.03 ± 0.46 ^a	5.38 ± 0.14 ^b	4.27 ± 0.16 ^c
Organ weight (g/100g body weight)			
Liver	3.82 ± 0.27	3.85 ± 0.21	3.49 ± 0.40
Kidney	1.16 ± 0.04	1.12 ± 0.09	1.20 ± 0.10
Spleen	0.411 ± 0.048	0.354 ± 0.087	0.347 ± 0.067
Thymus	0.160 ± 0.016	0.196 ± 0.035	0.167 ± 0.073
Perirenal fat	0.112 ± 0.048 ^{a, b}	0.138 ± 0.030 ^a	0.081 ± 0.013 ^b
Testis	0.224 ± 0.039	0.193 ± 0.012	0.239 ± 0.046
Dry weight of left femur (g/100g body weight)	0.068 ± 0.013	0.059 ± 0.002	0.057 ± 0.005
Female			
<i>n</i>	4	4	4
Anogenital distance (mm)	3.06 ± 0.32 ^a	2.81 ± 0.34 ^a	1.79 ± 0.07 ^b
Organ weight (g/100g body weight)			
Liver	3.84 ± 0.25	3.76 ± 0.36	3.61 ± 0.21
Kidney	1.18 ± 0.06	1.10 ± 0.08	1.01 ± 0.14
Spleen	0.352 ± 0.061	0.377 ± 0.111	0.284 ± 0.105
Thymus	0.143 ± 0.018	0.163 ± 0.040	0.144 ± 0.045
Perirenal fat	0.028 ± 0.017	0.035 ± 0.024	0.024 ± 0.011
Uterus	0.037 ± 0.026	0.063 ± 0.015	0.048 ± 0.003
Dry weight of left femur (g/100g body weight)	0.070 ± 0.006 ^a	0.060 ± 0.002 ^{a, b}	0.055 ± 0.009 ^b

¹ The day of birth was designated as PND (postnatal day) 1.
² All values are means ± SD (standard deviation). ^{a, b, c} Values not sharing a super-script letter are significantly different at *p* < 0.05.
³ If the parallelism could not be assumed between anogenital distance and body weight, anogenital distance was not done covariance analysis, and it was evaluated by one-way analysis of variance (*p* < 0.05).

結 果

1. 出産結果
出産日前日の母親ラットの体重はD群が他の2群よりも低値を示した (Table 2)。一方、1匹の母親ラットが出産した仔ラットの数では雌雄別、雌雄合計数とも群間で差はなかった。しかし、1匹の母親ラットが出産した仔ラット全体の体重ではD群が低値を示し、1匹の母親ラットが出産した仔ラット1匹の平均体重においてもD群で有意に低値を示した。

2. 母親ラットの体重変化
母親ラットでは妊娠期、授乳期どちらにおいてもC群、G群と比較しD群で体重増加が抑制された (Fig. 1)。母

親ラットの妊娠期、授乳期の飼料摂取量、妊娠期の飼料効率においてもD群が他の2群よりも低値を示した (Table 3)。授乳期の飼料効率は群間で有意差はなかった (データは示していない)。さらに妊娠期および授乳期における母親ラットの飼料摂取量を、母親ラットの体重を共変量とし共分散分析で検定 (*p* < 0.05) したところ、群間での有意差は認められなかった。従って、D群の体重増加抑制は飼料摂取量の低下と飼料効率の低下によるものである。

出産21日目 (離乳日) の母親ラットの肝臓重量は、D群がG群と比較し高値を示した (Table 4)。また、D群の卵巣重量はC群と比較し低い傾向 (*p* = 0.053) を示

Table 6 Body and organ weights, anogenital distance, and dry weight of the femur in offspring of dams fed the control diet or diet containing genistein or daidzein 0.50g/kg during pregnancy and lactation on PND¹ 15²

Group	Control group	Genistein group	Daidzein group
Number of suckling pups	32	32	32
Body weight of suckling pups (g)	41.3 ± 3.3 ^a	41.8 ± 1.8 ^a	33.2 ± 2.7 ^b
Male			
<i>n</i>	4	4	4
Anogenital distance ³ (mm)	11.0 ± 1.0 ^{a, b}	11.8 ± 0.7 ^a	10.0 ± 1.0 ^b
Organ weight (g/100g body weight)			
Liver	2.91 ± 0.04	2.70 ± 0.13	2.74 ± 0.15
Kidney	1.035 ± 0.098	0.946 ± 0.089	0.928 ± 0.044
Spleen	0.352 ± 0.021	0.348 ± 0.066	0.356 ± 0.082
Thymus	0.303 ± 0.214	0.298 ± 0.055	0.308 ± 0.042
Perirenal fat	0.418 ± 0.017 ^a	0.452 ± 0.027 ^a	0.295 ± 0.083 ^b
Testis	0.348 ± 0.024	0.333 ± 0.022	0.448 ± 0.115
Dry weight of left femur (g/100g body weight)	0.098 ± 0.002 ^a	0.099 ± 0.002 ^{a, b}	0.102 ± 0.004 ^b
Female			
<i>n</i>	4	4	4
Anogenital distance (mm)	6.90 ± 0.74 ^a	7.80 ± 0.29 ^b	6.22 ± 0.36 ^a
Organ weight (g/100g body weight)			
Liver	2.90 ± 0.23	2.91 ± 0.04	2.75 ± 0.03
Kidney	1.044 ± 0.063 ^a	0.994 ± 0.065 ^b	0.931 ± 0.061 ^b
Spleen	0.336 ± 0.017	0.349 ± 0.048	0.388 ± 0.062
Thymus	0.308 ± 0.051	0.350 ± 0.044	0.327 ± 0.062
Perirenal fat	0.378 ± 0.077	0.336 ± 0.043	0.299 ± 0.096
Uterus	0.080 ± 0.008	0.087 ± 0.006	0.085 ± 0.009
Dry weight of left femur (g/100g body weight)	0.098 ± 0.003	0.100 ± 0.005	0.104 ± 0.004

¹ The day of birth was designated as PND (postnatal day) 1.
² All values are means ± SD (standard deviation). ^{a, b} Values not sharing a super-script letter are significantly different at *p* < 0.05.
³ If the parallelism could not be assumed between anogenital distance and body weight, anogenital distance was not done covariance analysis, and it was evaluated by one-way analysis of variance (*p* < 0.05).

し、G群ではC群、D群と比較し子宮重量は高値を示した。

3. 仔ラットの成長

生後4日目の仔ラットでは、D群は他の群に比べて体重が低値を示し、AGDが短くなった。また、大腿骨乾燥重量はD群の雌が低値を示した (Table 5)。

生後15日目の仔ラットでもD群の体重が低値を示し、雄においては後腹壁脂肪相対重量でも低値を示したが、雌において有意差はなかった (Table 6)。一方、骨乾燥重量は雄のD群ではC群と比較し高値を示した。雄のAGDはD群においてG群と比較すると短くなったが、C群と比較するとG群、D群とも差は認められなかった。

雌のAGDはC群、D群と比較しG群で有意に長くなった。雌の腎臓重量はC群と比較しG群、D群が低値を示したが、それ以外の臓器に関して差はみられなかった。

離乳後の仔ラットの体重増加はD群では他の2群と比較し抑制された (Table 5, 6)。離乳後 (生後21～34日目) の仔ラットの飼料摂取量は、D群が他の2群と比べ低値を示したが、飼料効率では群間で差はみられなかった (Table 7)。

生後34日目の仔ラットでもC群、G群と比較し、D群において体重が低値を示した (Table 8)。雌において脾臓重量がC群と比較しD群で高値を示したが、その他の臓器重量、大腿骨乾燥重量ではC群、G群、D群の間で

Table 7 Food intake and food efficiency in pups of dams fed the control diet or diet containing genistein or daidzein 0.50g/kg during pregnancy and lactation after weaning^{1,2}

Group	Control group (n = 8)	Genistein group (n = 8)	Daidzein group (n = 8)
Food intake ³ for 14 days (g) (Post weaning)	173.3 ± 4.8 ^a	171.5 ± 7.3 ^a	158.9 ± 5.3 ^b
Food efficiency [Body weight gain (g)/food intake (g)]	0.513 ± 0.034	0.458 ± 0.035	0.500 ± 0.050

¹ All values are means ± SD (standard deviation). ^{a, b} Values not sharing a superscript letter are significantly different at *p* < 0.05.

² All pups were fed the control diet after weaning until sacrificed.

³ If the parallelism could not be assumed between food intake and body weight gain, food intake was not done covariance analysis, and it was evaluated by one-way analysis of variance (*p* < 0.05).

Table 8 Body and organs weights, and dry weight of the femur in pups of dams fed the control diet or diet containing genistein or daidzein 0.50g/kg during pregnancy and lactation on PND¹ 34²

Group	Control group	Genistein group	Daidzein group
Number of weaning rats	8	8	8
Body weight of weaning rats (g)	148.7 ± 4.8 ^a	146.1 ± 5.9 ^a	133.1 ± 3.2 ^b
Male			
<i>n</i>	4	4	4
Organ weight (g/100g body weight)			
Liver	5.00 ± 0.21	4.73 ± 0.23	4.66 ± 0.23
Kidney	0.978 ± 0.034	0.963 ± 0.041	0.935 ± 0.063
Spleen	0.354 ± 0.099	0.332 ± 0.033	0.405 ± 0.036
Thymus	0.328 ± 0.029	0.314 ± 0.021	0.362 ± 0.040
Perirenal fat	0.649 ± 0.058	0.590 ± 0.069	0.636 ± 0.274
Testis	0.920 ± 0.034	0.938 ± 0.112	0.918 ± 0.026
Dry weight of left femur (g/100g body weight)	0.142 ± 0.008	0.153 ± 0.003	0.150 ± 0.012
Female			
<i>n</i>	4	4	4
Organ weight (g/100g body weight)			
Liver	4.77 ± 0.45	4.97 ± 0.24	4.72 ± 0.45
Kidney	0.934 ± 0.075	0.955 ± 0.041	0.914 ± 0.064
Spleen	0.330 ± 0.048 ^a	0.325 ± 0.023 ^a	0.401 ± 0.036 ^b
Thymus	0.328 ± 0.070	0.361 ± 0.057	0.351 ± 0.041
Perirenal fat	0.604 ± 0.071	0.520 ± 0.106	0.504 ± 0.144
Ovary	0.045 ± 0.005	0.047 ± 0.006	0.049 ± 0.029
Uterus	0.136 ± 0.050	0.124 ± 0.011	0.129 ± 0.027
Dry weight of left femur (g/100g body weight)	0.141 ± 0.007	0.143 ± 0.006	0.139 ± 0.004

¹ The day of birth was designated as PND (postnatal day) 1.

² All values are means ± SD (standard deviation). ^{a, b} Values not sharing a superscript letter are significantly different at *p* < 0.05.

Table 9 Concentrations of genistein, daidzein and equol in the serum and stomach contents of suckling pups of dams fed the control diet or diet containing genistein or daidzein 0.50g/kg during pregnancy and lactation¹

Group	Control group	Genistein group	Daidzein group
PND ² 4			
<i>n</i>	8	8	7
Serum			
Genistein (nmol/ml)	N. D. ³	N. D.	N. D.
Daidzein (nmol/ml)	N. D.	N. D.	N. D.
Equol (nmol/ml)	N. D.	N. D.	0.069 ± 0.018
Stomach contents			
Genistein (nmol/g)	N. D.	0.272 ± 0.017	N. D.
Daidzein (nmol/g)	N. D.	N. D.	1.12 ± 0.32
Equol (nmol/g)	N. D.	N. D.	1.88 ± 0.52
PND 15			
<i>n</i>	8	8	7
Serum			
Genistein (nmol/ml)	N. D.	N. D.	N. D.
Daidzein (nmol/ml)	N. D.	N. D.	0.59 ± 0.02
Equol (nmol/ml)	N. D.	N. D.	1.28 ± 0.35
Stomach content			
Genistein (nmol/g)	N. D.	2.04 ± 2.00	N. D.
Daidzein (nmol/g)	N. D.	N. D.	5.29 ± 1.34
Equol (nmol/g)	N. D.	N. D.	12.54 ± 8.81

¹ All values are means ± SD (standard deviation).

² The day of birth was designated as PND (postnatal day) 1.

³ Not detected.

差はみられなかった。

4. 仔ラットの血清中および胃内容物中のイソフラボン濃度

生後4日目の仔ラットでは、D群の血清中においてのみエクオールが検出された (Table 9)。生後4日目の仔ラット胃内容物中では、D群でダイゼイン、エクオール、G群でゲニステインが検出された。生後15日目の仔ラットの血清中では、D群においてダイゼイン、エクオールが検出された。生後15日目の仔ラット胃内容物中では、G群においてはゲニステインが検出され、D群ではダイゼイン、エクオールが検出された。生後20日目の仔ラット胃内容物中および血清中、出産後20日目の母親ラットの血清中イソフラボン濃度を測定したが、ゲニステイン、ダイゼイン、エクオールのいずれも検出できなかった (データは示していない)。

5. 母親ラット、仔ラットの血清甲状腺ホルモン濃度

母親ラットの血清中のT₄濃度はG群においてC群と比較し高値を示したが、T₃、TSHでは差がなかった (Table 10)。生後34日目の仔ラットにおいてはT₃、T₄、TSHのいずれもG群、D群でC群との間に有意差はみられなかった。

考 察

本実験では妊娠期・授乳期に飼料からゲニステイン、ダイゼインを摂取した母親ラットにおける妊娠への影響、またその母親ラットから産まれた仔ラットの成長に及ぼすゲニステインとダイゼインの影響の違いを観察した。あわせて、母乳のみを摂取している仔ラットの胃内容物および血清中のゲニステイン、ダイゼインとその代謝産物であるエクオール濃度を測定した。

飼料を介してダイゼイン投与を行った母親ラットとその仔ラットにおいて体重増加が抑制された (Fig. 1, Table 5, 6, 8)。この結果よりダイゼインとゲニステインでは生体影響が違うことが示された。とくにダイゼイン摂取による飼料摂取量の低下が体重抑制の要因となっていた。一方、母乳を介してダイゼインを摂取した仔ラットの胃内容物および血清中にダイゼインの代謝産物であるエクオールが検出された。これにより、代謝産物であるエクオールが母乳を介して母親から乳仔へ移行していることが観察された。

本実験では飼料1kgあたりにゲニステイン、ダイゼインそれぞれ500mgを混合し、母親ラットの飼料摂取を介して乳仔ラットへゲニステイン、ダイゼインを投与し

Table 10 Concentrations of triiodothyronine (T₃), thyroxine (T₄) and thyroid stimulating hormone (TSH) in the serum of dams fed the control diet or diet containing genistein or daidzein 0.50g/kg during pregnancy and lactation and their suckling pups¹

Group	Control group	Genistein group	Daidzein group
Dam			
<i>n</i>	4	4	4
T ₃ (ng/ml)	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.08
T ₄ (μ g/ml)	4.13 ± 0.30 ^a	4.90 ± 0.61 ^b	4.65 ± 0.25 ^{a, b}
TSH (ng/ml)	5.90 ± 1.81	6.03 ± 0.85	5.10 ± 0.94
Pups PND ² 34			
Male			
<i>n</i>	4	4	4
T ₃ (ng/ml)	1.18 ± 0.05	1.15 ± 0.06	1.20 ± 0.00
T ₄ (μ g/ml)	6.03 ± 1.32	5.05 ± 0.42	5.53 ± 0.34
TSH (ng/ml)	6.00 ± 0.38	5.53 ± 0.83	5.83 ± 1.52
Female			
<i>n</i>	4	4	4
T ₃ (ng/ml)	1.20 ± 0.10	1.23 ± 0.06	1.23 ± 0.10
T ₄ (μ g/ml)	5.20 ± 0.70	5.77 ± 0.75	6.15 ± 0.62
TSH (ng/ml)	5.90 ± 0.75	5.70 ± 1.45	5.10 ± 1.74

¹ All values are means ± SD (standard deviation). ^{a, b} Values not sharing a superscript letter are significantly different at *p* < 0.05.

² The day of birth was designated as PND (postnatal day) 1.

ているものである。Fritzらの報告では、ゲニステイン 250mg/kgを含む飼料を摂取した母親ラットでは、出産後7日目の血清ゲニステイン濃度は418nMであるのに対し、仔ラットの胃内容物では4,439nM、血清では726nMと高濃度であった¹⁹⁾。また、Lamartiniereらの実験では、ダイゼイン 1,000mg/kgを含む飼料を摂取した母親ラットの血中のダイゼイン、エクオール濃度はそれぞれダイゼイン 407 ± 174nM、エクオール 4,462 ± 1,551nMであった²⁰⁾。さらにこの報告では、生後7日目の仔ラットの血中ダイゼイン、エクオール濃度はそれぞれ 2,427 ± 527nM、107 ± 45nMであり、仔ラットの胃内容物中では 7,583 ± 2,189nM、1,700 ± 148nMであった。我々の実験において生後15日目の仔ラット血清ゲニステイン、ダイゼイン、エクオール濃度はD群でダイゼイン 592 ± 17nM、エクオール 1,278 ± 350nMであった。ゲニステインが最大血中濃度に達するのはおよそ投与8時間後、ダイゼインでは6時間後であり、その後、腸肝循環を経由し代謝、排泄される^{21, 22)}。本実験のゲニステイン、ダイゼイン、エクオール濃度はFritzやLamartiniereらの報告と比較すると値が低い。これは、本実験においてはゲニステイン、ダイゼインを生後13日目までしか投与していないため、投与後時間が経過し、血中濃度が低下していたためと思われる。他方、仔ラッ

ト胃内容物中のゲニステイン、ダイゼイン、エクオール濃度は血清イソフラボン濃度のおよそ10倍の高濃度が検出され、とくにエクオールは高濃度であった。さらに、エストロゲンが脂肪組織の代謝、蓄積、分布に関係しているとの報告がある²³⁾。本実験の母親ラット、仔ラットどちらにおいても後腹壁脂肪相対重量がC群と比較し、D群で低い傾向であった (Table 4, 5, 6, 8)。そこで、今回、D群において観察された体重増加抑制はダイゼインのみの影響ではなく、エストロゲン様の強い生理活性をもったエクオールによる影響の可能性も考えられる。さらに、臓器重量の結果から体重全体の差は考えにくい。そのことより、D群では筋肉重量増加が少なかった可能性も考えられる。

ホルモンレベルを変化させうる食事成分は、母親と子供の両方にとってホルモン感受性の強い妊娠期間においてその安全性は重要な問題である。一方で、妊娠動物へのエストロゲン投与は妊娠に影響を与えることが知られている。それらの影響は妊娠時の体重増加量の低下を生じ、その結果、出生数、一腹の胎児数、出生時体重の低下を生じることが報告されている⁸⁾。本実験において、ダイゼインを摂取した母親ラットでの体重増加抑制は飼料摂取量の低下、さらに飼料効率の低下によるものであった。Delclosらは、妊娠7日目の母親ラットにゲニス

テイン1,250ppmの飼料を投与したところ、出産前の母親ラットにおいて体重と飼料摂取量が減少し、さらに母親ラット1匹から生まれてきた仔ラット全体の体重、匹数が減少したが、625ppmではそれらの影響が生じなかったことを報告した²⁴⁾。我々の実験に用いたゲニステイン、ダイゼイン濃度は500ppmであり、ゲニステインではそのような影響は観察されなかった。これは以前我々が行った実験結果とも一致している。

他方、仔ラットのAGD、臓器重量、大腿骨乾燥重量において生後4, 15, 34日目にC群と比較しD群で差が観察されたが、いずれも一貫した影響ではなかった (Table 5, 6, 8)。一方、仔ラットの体重に関しては授乳期間中から離乳後の成長期において、一貫してD群でC群、G群と比較し体重増加が抑制されていた。しかし、D群の体重増加は他の群とほぼ平行であり数日の遅れを示すだけである。従って、授乳期間において決定的あるいは不可逆的な障害を生じたわけではない。母親ラットへダイゼイン1,000ppmの飼料を投与した場合、雌の仔ラットにおいて授乳期から成長後の生後50日目まで一貫して体重増加が抑制されたことをLamartiniereらが報告しており²⁰⁾、我々の結果と一致している。また、ゲニステインを生後間もない仔ラットに12.5mg/kg経口投与した結果、思春期後の仔ラットにおいて体重増加が抑制されたことをNagaoらが報告している²⁵⁾。しかし、我々の実験においてはゲニステインを投与した母親ラットから産まれた仔ラットでは体重増加抑制は観察されなかった。

今回我々の実験において飼料中のゲニステインとダイゼインを同濃度で投与したにもかかわらず、母親ラットと仔ラットの両方において異なる影響が観察された。ゲニステインとダイゼインのERに対する親和性はER α , β のいずれにおいてもダイゼインよりもゲニステインが強く、特にゲニステインのER β に対する親和性が強いことが報告されている³⁾。一方、エクオールのERに対する親和性はゲニステインより強いことが報告されている²⁶⁾。ゲニステイン、ダイゼインの生体影響の違いは代謝物の違いも含めたERへの親和性による可能性が考えられるが、詳細は不明である。

本実験において、飼料によるゲニステイン、ダイゼイン投与は母親ラットの甲状腺ホルモン T_4 濃度を上昇させた (Table 10)。しかし、仔ラットにおいての影響は観察されなかった。これまで大豆摂取と甲状腺機能低下との関係が示唆されているが、甲状腺腫に影響する大豆成分は明らかになっていない。Kimuraら、Doergeらの報告によると、甲状腺腫はエストロゲン活性から独立しており、ヨウ素不足は大豆の抗甲状腺作用を増加させ、ヨウ素の補給は予防作用があることが示唆されている²⁷⁾。

²⁸⁾。一方で、Changらは500ppmのゲニステイン投与を20週間行ったラットにおいて、ゲニステイン摂取量の増加に伴いthyroid peroxidase (TPO) 活性が用量に依存して減少しているが、血清甲状腺ホルモンレベル(T_3 , T_4 , TSH)、甲状腺重量、組織病理変化ではゲニステイン投与の影響はみられなかったと報告した²⁹⁾。従って、TPO活性が大豆イソフラボン摂取に伴って減少したとしても、残っている活性は甲状腺機能の恒常性を維持するのに十分であることを示唆している。本研究の結果においても大豆イソフラボンの主成分であるゲニステインやダイゼインはラットの母親や仔の甲状腺ホルモンに強い影響を示さなかった。

本実験においての投与量は体重当たりで比較すると日本人のゲニステイン平均摂取量³⁰⁾の200倍近い量を摂取していることになり、そのままヒトに当てはめることは適切ではない。しかし、Unferらは閉経後女性に1日150mgのイソフラボンを5年間摂取させたところ、子宮内膜増殖が発生したことを報告している³¹⁾。現在、大豆イソフラボンが関与するほとんどの特定保健用食品の1日摂取目安量は大豆イソフラボンとして40mgである。しかし、サプリメントの中には1錠に大豆イソフラボン25mgを含む商品も販売されており³²⁾、それらを摂取することで特定保健用食品の1日摂取目安量を越える可能性がある。大豆イソフラボンを含む特定保健用食品やサプリメントは主に骨の改善を目的とし、閉経後の女性を対象である。他方、「Natural Medicines Comprehensive Database」では妊婦や乳児・幼児はサプリメントからの摂取はさけ、食品から大豆イソフラボンを摂取するべきであると記述している³³⁾。我々の研究結果は大豆イソフラボンの妊娠期、授乳期の安全性を考えるためには、さらにそのメカニズムも含めて詳細に研究する必要性を示している。今後、大豆イソフラボンの安全で有効な摂取量範囲を明らかにすることが求められている。

要 約

本研究は母親ラットとその母親から産まれた仔ラットに対して、大豆イソフラボンの主成分であるゲニステイン、ダイゼイン (0.50g/kg diet) を含む飼料の投与による生体影響の相違を比較検討し、それらの安全性を確認することを目的として実験を行った。母親ラットではゲニステイン、ダイゼイン投与による妊娠、出産に対する影響を、仔ラットでは成長への影響をそれぞれ観察した。さらに母乳のみを摂取している仔ラットの胃内容物および血清中のゲニステイン、ダイゼイン、エクオール濃度を測定した。

1. 母親ラットへの飼料からのダイゼイン投与により母親ラットの飼料摂取量、飼料効率が低下し、体重増加が

抑制された。さらに1匹の母親ラットが出産した仔ラット全体重量でもD群が低値を示した。ゲニステイン投与ではダイゼイン投与と同様の影響は観察されず、ゲニステインとダイゼインでは生体影響が異なることが示された。

2. 母乳を介してダイゼインを摂取した仔ラットで体重増加が抑制された。仔ラットの臓器重量, AGD, 大腿骨乾燥重量では授乳期から成長期において一貫した影響は観察されなかった。

3. 母親ラット, 仔ラットへのゲニステイン, ダイゼイン投与は甲状腺ホルモン濃度に明らかな影響を示さなかった。

4. 母乳を介してダイゼインを摂取した仔ラットの胃内容物および血清中に, ダイゼインの代謝産物であるエクオールが多量に検出された。これにより, ダイゼインの作用の一部はエクオールの強い生理作用を含む可能性が示唆された。

5. ダイゼイン投与により観察された体重増加抑制を除いて, 母親ラット, 仔ラットのどちらにおいても特に健康上の不都合は観察されなかった。

謝 辞

本研究は厚生科学研究費生活安全総合科学研究事業の助成によって行った。

文 献

- 1) Setchell, K.D. : Phytoestrogens : the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones, *Am. J. Clin. Nutr.*, **68**, 1333S-1346S (1998)
- 2) Casanova, M., You, L., Gaido, K.W., Archibeque-Engle, S., Janszen, D.B. and Heck, H.A. : Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro, *Toxicol. Sci.*, **51**, 236-244 (1999)
- 3) Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van, P.T., van, B. and Gustafsson, J.A. : Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta, *Endocrinology*, **13**, 4252-4263 (1998)
- 4) Magee, P.J. and Rowland, I.R. : Phyto-oestrogens, their mechanism of action : current evidence for a role in breast and prostate cancer, *Br. J. Nutr.*, **91**, 513-531 (2004)
- 5) Arjmandi, B.H., Birnbaum, R., Goyal, N.V., Getlinger, M.J., Juma, S., Alekel, L., Hasler, C.M., Drum,

M.L., Hollis, B.W. and Kukreja, S.C. : Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rat is related to its isoflavone content, *Am. J. Clin. Nutr.*, **68**, 1364S-1368S (1998)

6) Greendale, G.A., FitzGerald, G., Huang, M.H., Sternfeld, B., Gold, E., Seeman, T., Sherman, S. and Sowers, M. : Dietary soy isoflavones and bone mineral density : results from the study of women's health across the nation, *Am. J. Epidemiol.*, **155**, 746-754 (2002)

7) Adlercreutz, H., Hamalainen, E., Gorbach, S. and Goldin, B. : Dietary phyto-oestrogens and the menopause in Japan, *Lancet*, **16**, 1233 (1992)

8) Zimmerman, S.A., Clevenger, W.R., Brimhall, B.B. and Bradshaw, W.S. : Diethylstilbestrol-induced perinatal lethality in the rat. II. perturbation of parturition, *Biol. Reprod.*, **44**, 583-589 (1991)

9) Roberts, D., Veeramachaneni, D.N., Schlaff, W.D. and Awoniyi, C.A. : Effects of chronic dietary exposure to genistein, a phytoestrogen, during various stages of development on reproductive hormones and spermatogenesis in rats, *Endocrine*, **13**, 281-286 (2000)

10) Hydovitz, J.D. : Occurrence of goiter in an infant on a soy diet, *N. Engl. J. Med.*, **18**, 351-353 (1960)

11) Fort, P., Moses, N., Fasano, M., Goldberg, T. and Lifshitz, F. : Breast and soy-formula feedings in early infancy and the prevalence of autoimmune thyroid disease in children, *J. Am. Coll. Nutr.*, **9**, 164-167 (1990)

12) Flynn, K.M., Ferguson, S.A., Delclos, K.B. and Newbold, R.R. : Effects of genistein exposure on sexually dimorphic behaviors in rats, *Toxicol. Sci.*, **55**, 311-319 (2000)

13) Kang, K.S., Che, J.H. and Lee, Y.S. : Lack of adverse effects in the F1 offspring maternally exposed to genistein at human intake dose level, *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 43-51 (2002)

14) Faber, K.A. and Hughes, C.L. Jr. : Dose-response characteristics of neonatal exposure to genistein on pituitary responsiveness to gonadotropin releasing hormone and volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) in postpubertal castrated female rats, *Reprod. Toxicol.*, **7**, 35-39 (1993)

15) Picherit, C., Coxam, V., Bennetau-Pelissero, C., Kati-Coulibaly, S., Davicco, M.J., Lebecque, P. and Barlet, J.P. : Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats,

J. Nutr., **130**, 1675–1681 (2000)

16) Setchell, K.D., Brown, N.M. and Lydeking-Olsen, E. : The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones, *J. Nutr.*, **132**, 3577–3584 (2002)

17) Reeves, P.G., Nielsen, F.H. and Fahey, G.C. Jr. : AIN-93G purified diets for laboratory rodents : final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, *J. Nutr.*, **123**, 1939–1951 (1993)

18) Gamache, P.H. and Acworth, I.N. : Analysis of phytoestrogens and polyphenols in plasma, tissue, and urine using HPLC with coulometric array detection, *Proc. Soc. Ex. Biol. Med.*, **217**, 274–280 (1998)

19) Fritz, W.A., Coward, L., Wang, J. and Lamartiniere, C.A. : Dietary genistein : perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat, *Carcinogenesis*, **19**, 2151–2158 (1998)

20) Lamartiniere, C.A., Wang, J., Smith-Johnson, M. and Eltoum, I.E. : Daidzein : bioavailability, potential for reproductive toxicity, and breast cancer chemoprevention in female rats, *Toxicol. Sci.*, **65**, 228–238 (2002)

21) Doerge, D.R., Twaddle, N.C., Banks, E.P., Jefferson, W.N. and Newbold, R.R. : Pharmacokinetic analysis in serum of genistein administered subcutaneously to neonatal mice, *Cancer Lett.*, **184**, 21–27 (2002)

22) Setchell, K.D., Brown, N.M., Desai, P., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B.E., Brashear, W.T., Kirschner, A.S., Cassidy, A. and Heubi, J.E. : Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements, *J. Nutr.*, **131**, 1362S–1375S (2001)

23) Mayes, J.S. and Watson, G.H. : Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity, *Obes. Rev.*, **5**, 197–216 (2004)

24) Delclos, K.B., Bucci, T.J., Lomax, L.G., Latendresse, J.R., Warbritton, A., Weis, C.C. and

Newbold, R.R. : Effects of dietary genistein exposure during development on male and female SD (Sprague-Dawley) rats, *Reprod. Toxicol.*, **15**, 647–663 (2001)

25) Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usami, K. and Ono, H. : Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein, *Reprod. Toxicol.*, **15**, 399–411 (2001)

26) Breinholt, V. and Larsen, J.C. : Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay, *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 622–629 (1998)

27) Kimura, S., Suwa, J., Ito, M. and Sato, H. : Development of malignant goiter by defatted soybean with iodine-free diet in rats, *Gan*, **67**, 763–765 (1976)

28) Doerge, D.R. and Sheehan, D.M. : Goitrogenic and estrogenic activity of soy isoflavones, *Environ. Health Perspect.*, **110**, 349–353 (2002)

29) Chang, H.C. and Doerge, D.R. : Dietary genistein inactivates rat thyroid peroxidase in vivo without an apparent hypothyroid effect, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **168**, 244–252 (2000)

30) Somekawa, Y., Chiguchi, M., Ishibashi, T. and Aso, T. : Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipid, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women, *Obstet Gynecol.*, **97**, 109–115 (2001)

31) Unfer, V., Casini, M.L., Costabile, L., Mignosa, M., Gerli, S. and Renzo, G.C. : Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens : a randomized, double-blind, placebo-controlled study, *Fertil Steril.*, **82**, 145–148 (2004)

32) Franke, A.A., Hankin, J.H., Yu, M.C., Maskarinec, G., Low, S.H. and Custer, L.J. : Isoflavone levels in soy foods consumed by multiethnic populations in Singapore and Hawaii, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 977–986 (1999)

33) Jellin, J.M. : Natural Medicines Comprehensive Database : Soy, Safety, Children, Pregnancy, Lactation (2005) Pharmacist's Letter, Stockton

(受付：平成17年6月17日，受理：平成17年12月17日)