特別企画 健康増進の食品微生物学

● Food Microbiology for Health Promotion

プロバイオティクスの臨床応用

Clinical Application of Probiotics

高木 陽光

Akimitsu TAKAGI

(Yakult Central Institute, Yakult Honsha Co., Ltd., 5-11 Izumi, Kunitachi-shi, Tokyo, 186-8650)

1. はじめに

「国民の健康寿命が延伸する社会」の構築が重要政策として示されているが、食品微生物は、この大きな課題の実現に向けて、さまざまな形で利用できるものと期待される。食品微生物の中にはプロバイオティクスと呼ばれる集団がある。プロバイオティクスの定義として、「腸内フローラ（細菌叢）のバランスを改善することによりヒトに有益な作用をもたらす生きた微生物」が広く受け入れられている。プロバイオティクスによる疾患予防効果が臨床試験で確認され、その作用機序が示されつつある。筆者の所属組織では、「予防医学」と、腸を丈夫にすることが健康で長生きにつながる「健腸長寿」の理念の下で、種々の研究を実践している。それらの中から、腸内フローラの形成に関わる研究や、代表的なプロバイオティクスである *Lactobacillus casei* Shirota（乳酸菌シロタ株: LcS）を用いた臨床研究を中心に、その一部を紹介する。

2. 腸内フローラと健康

ヒトの腸内には1,000種、100兆個の腸内細菌が常在しており、高度に制御された生態系（腸内フローラ、腸内細菌叢、消化管マイクロバイオーム）を形成していることから、ヒトは腸内細菌と共生しているといえる。近年、さまざまな疾患で腸内フローラの異常（dysbiosis）を伴うことが明らかになりつつあることから、消化管の生態系の健全な状態が心身の健康につながると考えられつつある。腸内フローラを構成する細菌の中で、食品微生物として利用されている代表的なものには、乳酸菌（*Lactobacillus* 属）やビフィズス菌（*Bifidobacterium* 属）が知られている。

胎内は無菌環境であるが、新生児は出生直後から環境中の微生物に曝露され、細菌が腸内に定着する。母乳栄養児の腸内フローラにおいて、ビフィズス菌は優勢である。新生児の腸内に定着するビフィズス菌の由来については、母親の腸内フローラや母乳が伝播するものと考え

られてきたが、母から子への菌株の伝播は実証されていなかった。牧野らは、母親と新生児の糞便からビフィズス菌を単離し、各菌株の遺伝子配列の解析により菌株間の同一性を、遺伝子配列が一致するかを解読することで、ビフィズス菌の母子伝播を菌株レベルで検証した¹⁴⁾。その結果、自然分娩で出産した母子において、出産前の母親とそれぞれの乳児の糞便から同一系統のビフィズス菌株が分離された。これらの中には、出生直後から3か月後まで経時的に検出された菌株も認められた。これに反して、帝王切開で出産した母子ではビフィズス菌の母子伝播は観察されなかった。帝王切開で出生した新生児では、ビフィズス菌の定着は自然分娩児より遅く、生後1か月を過ぎる頃に、菌数は少ないものの定着が観察された¹⁴⁾。これらの結果は、自然分娩の過程で母親のビフィズス菌が新生児に伝播して、腸内で増殖し定着することを示しており、母から子への菌株の伝播が実証された。

ところで、ビフィズス菌は母乳に多く含まれる乳糖やオリゴ糖などを資化して乳酸や酢酸を産生することから、腸内環境と健康の維持に重要と考えられている。また、新生児におけるビフィズス菌の早期定着は、生涯にわたる宿主の健康へ寄与することが指摘されているが、ビフィズス菌は加齢とともに減少する。したがって、腸内細菌であるビフィズス菌を食品微生物として産業利用し、摂取により腸内に補充する考えは合理的と考えられる。

3. プロバイオティクス、運動、免疫と上気道感染

プロバイオティクスの定義として、英国の微生物学者 Fuller が1989年に提唱した「腸内フローラのバランスを改善することによりヒトに有益な作用をもたらす生きた微生物」⁵⁾ が広く受け入れられている。また、「十分量を摂取したときに宿主に有益な効果を与える生きた微生物」(FAO/WHO)という定義も公表されている。近年、プロバイオティクスによる疾患予防効果が多数の臨床試験で確認され、その作用機序が示されつつある。

プロバイオティクスには、多くの乳酸菌が含まれている。そのようなプロバイオティクス菌株の一つである *Lactobacillus casei* Shirota（乳酸菌シロタ株: LcS）は、

80年以上の食経験があるプロバイオティクスであり、その作用機序が腸内環境あるいは宿主免疫系などにおいて実証されている。免疫系は、感染およびがんを含むさまざまな疾患を制御するうえで重要な役割を果たす。すなわち免疫機能の低下は、それらの疾患リスクを増大させる。ところで、アスリートには健康的な印象を伴うが、過度な運動の直後には一過性の免疫機能の低下（非自己細胞を傷害するナチュラルキラー（NK）細胞の活性低下）が知られており³⁾、また、マラソン大会の参加者においては、マラソンが上気道感染のリスクを上昇させることが報告されている¹⁹⁾。アスリートにおけるLcS含有発酵乳の継続飲用の上気道感染に対する効果が検討され⁶⁾、LcS群またはプラセボ群に無作為化されたアスリートに、二重盲検法で4か月間、LcS含有発酵乳またはプラセボを連日投与した結果、上気道感染の罹患率はLcS群で有意に低下した⁶⁾。

一方、高齢者では若齢者に比べて免疫機能が低下し、上気道感染のリスクが高まるが、LcS含有発酵乳の継続飲用により上気道感染の発症率の低下傾向や症状の緩和が観察されている^{4, 30)}。さらに、精神的なストレスが高いと予想される健常者の集団として30～49歳の内勤の会社員を対象に同様な試験を行ったところ、LcS含有発酵乳による上気道感染率の有意な低下が認められた²²⁾。この集団において、プラセボ群では上気道感染率が上昇した時期にNK活性が低下したものの、LcS群ではNK活性は低下せずに維持された²²⁾。これらの結果は、LcS含有発酵乳の飲用は、上気道感染の発症率の低下や症状の軽減に有効であることを支持している。

4. プロバイオティクスとストレスと脳腸相関

上述したアスリートにおける過度な運動は、身体にとってはストレスでもあり、ストレス関連物質の免疫機能への影響も指摘されている。日常生活で遭遇するさまざまなストレスは、身体機能の不調を引き起こす。ストレスに対する検討として、進級試験を控えた健常な医学部生を対象に、LcS含有発酵乳を飲用させる試験を行った²⁴⁾。試験日が近づく不安感の高まりと唾液中の cortisol（副腎皮質ホルモンで過剰なストレスにより多量に分泌される）の上昇を認めたが、LcSの飲用により唾液中 cortisol の上昇が有意に抑えられ、体調不良を訴える被験者数が減少した。非臨床の急性ストレスモデルにおいては、LcSの投与により血中 cortisol コレステロン（副腎皮質ホルモン）の上昇が抑制された。加えて、LcSの投与は胃の求心性迷走神経活動を活発化させ、脳の弧束核における c-Fos 陽性神経細胞を増加させた²⁴⁾。これらの結果は、プロバイオティクスが腸管神経を刺激して、その情報を脳に伝達し（脳腸相関）、精神的な安定を促す可能性を支持している。これらのエビデンスを基にLcSには、腸内環境の改善機能に加えて、本試験に用いられたLcSを含む飲料に対して、ストレスの緩和、睡

眠の質の向上について、機能性表示が認可された。

5. シンバイオティクスとバクテリアルトランスロケーションとがん

以前よりLcSの臨床効果は、がんや感染の領域で多く検討されている。消化器がん領域の手術後の感染予防においては近年、LcSにビフィズス菌や乳酸菌とビフィズス菌が資化する（プレバイオティクスと呼ぶ）難消化性ガラクトオリゴ糖を加えた混合物（シンバイオティクス）の投与による、術後の感染性合併症の軽減に関するエビデンスが蓄積され、周術期管理への臨床応用が始まっている¹³⁾。胆道がん患者における肝切除では、術後に一般治療の経腸栄養剤に併せて同シンバイオティクスが投与された¹⁰⁾。一般治療の単独群では患者の糞便中に感染症起因菌 (*Enterobacteriaceae*, *Candida*, *Pseudomonas aeruginosa*) の検出量の増加が検出されたが、一般治療に同シンバイオティクスの投与を併用した群では、その増加は有意に低減され、術後感染性合併症が有意に減少した¹⁰⁾。こうした、術後感染性合併症の低減作用は、術前から同シンバイオティクスを投与したほうが、より効果的であることが独立した試験で確認された²³⁾。一方、食道がん患者に対する術前化学療法（ドセタキセル、シスプラチン、5-FUの3剤併用）においては、化学療法開始時より前の期間から同シンバイオティクスを投与された群のほうが、院内処方での乳酸菌整腸剤を同期間に投与された対照群と比べて、腸球菌、ブドウ球菌、緑膿菌の検出が有意に低減しており、発熱性好中球減少症や下痢の発症が有意に減少した¹⁵⁾。同様な効果は、腹腔鏡下大腸手術においても検討され、糞便中の総有機酸、酢酸、pHと言った消化管内環境の改善も確認されている^{11, 12)}。術後感染症は、消化管バリア機能の破綻（リーキーガット）ならびにバクテリアルトランスロケーション(BT)により発症するが、LcSを含む同シンバイオティクスの作用機序として非臨床研究により、BTの予防ならびに腸管上皮のタイトジャンクションにおける細胞間接着因子 (Claudin-1, Occludin, ZO-1) の発現亢進が確認されている¹⁾。BTは2型糖尿病患者でも確認されており、LcS含有発酵乳あるいはプレバイオティクスであるガラクトオリゴ糖の飲用による改善が確認されている^{7, 21)}。したがって、腸内フローラによる腸内環境の保全が、腸管バリア機能の保持に重要な機能であると考えられる。

6. プロバイオティクスとがん

統計から、日本人の2人に1人ががんを発症する、3人に1人ががんで死亡する、と言われて久しい。がんの罹患率は一般的に加齢とともに増加するが、超高齢化社会に向かっている状況で、いかにしてがんを予防するか、根治治療を実現するか、発症しても適切な治療でがん共存するかは、大きな課題である。がんにおいては、より予防に直接的と考えられる発症や再発に関連する臨床

表1. がん患者を対象とした*L. casei* Shirotaの臨床試験*

がんの種類	研究の類別			(類別) 参考論文
	A*: 介入研究	B: 疫学研究	C: 作用機序研究	
膀胱がん	実施済み	実施済み	実施済み	(A) Aso Y., 1995. ¹⁸⁾ (A) Naito S., 2008. ¹⁹⁾ (B) Ohashi Y., 2002. ²⁰⁾
大腸がん	実施済み	未実施	実施中	(A) Ishikawa H., 2005. ²¹⁾
乳がん	未実施	実施済み	実施中	(B) Toi M., 2013. ²⁴⁾

*: 副作用の管理研究を除く, *: 切除後の再発予防試験.

エビデンスが蓄積されている(表1). 膀胱がんでは, 切除後の再発抑制におけるプラセボ対照試験²⁾ および抗がん剤との併用試験¹⁸⁾に加えて, 疫学研究としてケースコントロール(症例対照)研究が実施されている²⁰⁾. その症例対照研究では, LcSを含有する発酵乳飲料の習慣的な飲用に対して, 膀胱がんへの罹患を抑制する可能性が示されている²⁰⁾. 臨床において実践的と考えられる, 抗がん剤との併用試験では, 表在性膀胱がんと診断された患者を対象とした, 3年間の膀胱内の無再発率を主評価項目とした前向き無作為化比較試験が25施設共同で実施された¹⁸⁾. 経尿道的電気切除術(transurethral resection)を受け腫瘍を完全に切除された患者は, アントラサイクリン系抗がん剤のエピルビシン(epi-ADR)の膀胱内注入を術後治療として受けた. epi-ADRの単独治療群と, epi-ADR治療にLcSの経口摂取を加えた併用群における3年間の無再発率は, 前者が59.9%で後者が74.6%であり, 併用群で有意に高かった($p=0.0234$)¹⁸⁾.

大腸がん(結直腸腺腫性ポリープ)ではポリープ切除後の再発抑制が, 前向きコホート研究で示されている⁸⁾. 内視鏡でポリープを切除した患者にLcSの介入が行われ, 経過観察が実施された. 2年目の内視鏡検査では, 長径4 mm以上の腫瘍の発生率が介入により有意に抑制されていた. 4年目の検査では, 高異型度大腸がんの発症率は有意に抑制されており, LcS服用群が34.4%, 非服用群が45.2%であった⁸⁾. 服用による宿主免疫系への作用や, 腸内環境の改善など, 詳細な作用機序の解明が期待された.

欧米と比較して, 乳がんの発症率は日本を含むアジア地域では低い. その理由の一つには大豆に含まれるイソフラボンの摂取量と乳がんの発症の間に逆相関が見られることから³¹⁾, 当該地域で多い大豆の摂取量の乳がん抑制への関与が考えられており, 同様な逆相関は, 本邦におけるコホート研究でも示されている³²⁾. しかしながら, 本邦における乳がんの発症率は過去20年で急増している. 本邦の早期乳がんにおける症例対照研究が実施され, 大豆摂取を含む生活習慣や乳がん発症のリスク因子などが40~55歳の女性を対象として調査された²⁹⁾. その結果は, 大豆イソフラボンの摂取量の多少に分けて解析され, 大豆イソフラボンの摂取量が多い群ほど乳がん発症オッズ比は低く, 当該研究においても大豆摂取による乳がん予防の可能性が示された. 本研究では, 大豆摂取に加えて,

LcSを含む飲料の10歳からの習慣的な飲用についても調べられ, 摂取頻度が高い群(週4回以上)で最も発症率が低かった. 大豆イソフラボンの摂取量の多い群(43.75 mg以上)では発症リスクは51%低下し, LcSの摂取頻度が高い群では発症リスクが50%低下した. 興味深いことに, LcSおよび大豆イソフラボンを共に多く摂取していた集団の乳がん発症リスクが最も低値を示した(64%低下)²⁹⁾. この両者の併用効果については, 我々の実施した非臨床研究から, 両因子の異なる作用機序に起因するものと推察されたが⁹⁾, 詳細な作用機序の解明が乳がん予防の実践には必要と考えられる. ところで, 大豆イソフラボンの吸収には, 腸内細菌による基質の代謝(アグリコン化)が必須である. そこで, LcSで豆乳を発酵させた発酵豆乳を考案し上市した. その飲料を用いた健康な女性における単回飲用試験では, 摂取後のイソフラボンの血中濃度が豆乳より高いこと¹⁷⁾, 同様な反復飲用試験では, 腸内フローラの変容が確認された¹⁶⁾. 同じ処方準じて実験室で調製した発酵豆乳で我々は, 非臨床研究で乳がんの発症抑制を確認しており²⁶⁾, また, LcSの免疫系を介したがんの発症抑制も異なるモデルで確認している^{25,27,28)}.

がんの進行は患者を死に至らせるため, がんの早期発見と早期治療の重要性が指摘されて久しい. 近年は, がんの免疫チェックポイント機構が, がん治療において注目されているが, さまざまなアプローチにプロバイオティクスやシンバイオティクスを組み合わせることで, がん制御の精度を高めうると期待される.

7. おわりに

健康寿命の延伸にプロバイオティクスが寄与しうることについては, 臨床への応用が可能な科学的根拠を基盤とした産業利用がその鍵を握ると考えられる. 実験モデルとは異なり, ヒトという集団は地域差や個人差などの多様性に富んでいるが, 個人レベルにおいても腸内フローラは多様性に富んでいる. がんのような疾患においては同一の腫瘍組織の内部においても不均質性が高く, 制御を困難とする要因の一つとなっている. 現状では, 腸内フローラと健康との密接な関係が明らかにされつつあるが, 今後は, 集団に対するビッグデータ解析などにより, 健康に関する複数の要因の因果関係が明らかにされるものと期待される. プロバイオティクスが安全でありヒト

の健康に有用であることを誰もが享受できるよう、より深い作用機序への理解と有効性を支持する根拠の蓄積に向けて取り組んでいきたい。

参考文献

- Asahara, T., Takahashi, A., Yuki, N., Kaji, R., Takahashi, T. and Nomoto, K.: Protective effect of a synbiotic against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a murine infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 3041–3050 (2016).
- Aso, Y., Akaza, H., Kotake, T., Tsukamoto, T., Imai, K. and Naito, S.: Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. The BLP Study Group. *Eur. Urol.*, **27**, 104–109 (1995).
- Berk, L. S., Nieman, D. C., Youngberg, W. S., Arabatzis, K., Simpson-Westerberg, M., Lee, J. W., Tan, S. A. and Eby, W. C.: The effect of long endurance running on natural killer cells in marathoners. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **22**, 207–212 (1990).
- Fujita, R., Iimuro, S., Shinozaki, T., Sakamaki, K., Uemura, Y., Takeuchi, A., Matsuyama, Y. and Ohashi, Y.: Decreased duration of acute upper respiratory tract infections with daily intake of fermented milk: a multicenter, double-blinded, randomized comparative study in users of day care facilities for the elderly population. *Am. J. Infect. Control*, **41**, 1231–1235 (2013).
- Fuller, R.: Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 365–378 (1989).
- Gleeson, M., Bishop, N. C., Oliveira, M., Tauler, P.: Daily probiotic's (*Lactobacillus casei* Shirota) reduction of infection incidence in athletes. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.*, **21**, 55–64 (2011).
- Gonai, M., Shigehisa, A., Kigawa, I., Kurasaki, K., Chonan, O., et al.: Galacto-oligosaccharides ameliorate dysbiotic Bifidobacteriaceae decline in Japanese patients with type 2 diabetes. *Benef. Microbes*, **8**, 705–716 (2017).
- Ishikawa, H., Akedo, I., Otani, T., Suzuki, T., Nakamura, T., et al.: Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors. *Int. J. Cancer*, **116**, 762–767 (2005).
- Kaga, C., Takagi, A., Kano, M., Kado, S., Kato, I., et al.: *Lactobacillus casei* Shirota enhances the preventive efficacy of soymilk in chemically induced breast cancer. *Cancer Sci.*, **104**, 1508–1514 (2013).
- Kanazawa, H., Nagino, M., Kamiya, S., Komatsu, S., Mayumi, T., et al.: Synbiotics reduce postoperative infectious complications: a randomized controlled trial in biliary cancer patients undergoing hepatectomy. *Langenbecks Arch. Surg.*, **390**, 104–113 (2005).
- Komatsu, S., Sakamoto, E., Asahara, T., Nomoto, K. and Nagino, M.: Effects of synbiotics on ileal microbiota. *Indian J. Med. Res.*, **147**, 58–65 (2018).
- Komatsu, S., Sakamoto, E., Norimizu, S., Shingu, Y., Asahara, T., Nomoto, K. and Nagino, M.: Efficacy of perioperative synbiotics treatment for the prevention of surgical site infection after laparoscopic colorectal surgery: A randomized controlled trial. *Surg. Today*, **46**, 479–490 (2016).
- Komatsu, S., Yokoyama, Y. and Nagino, M.: Gut microbiota and bacterial translocation in digestive surgery: the impact of probiotics. *Langenbecks Arch. Surg.*, **402**, 401–416 (2017).
- Makino, H., Kushiro, A., Ishikawa, E., Kubota, H., Gawad, A., et al.: Mother-to-infant transmission of intestinal bifidobacterial strains has an impact on the early development of vaginally delivered infant's microbiota. *PLOS ONE*, **8**, e78331 (2013).
- Motoori, M., Yano, M., Miyata, H., Sugimura, K., Saito, T., et al.: Randomized study of the effect of synbiotics during neoadjuvant chemotherapy on adverse events in esophageal cancer patients. *Clin. Nutr.*, **36**, 93–99 (2017).
- Nagino, T., Kaga, C., Kano, M., Masuoka, N., Anbe, M., et al.: Effects of fermented soymilk with *Lactobacillus casei* Shirota on skin condition and the gut microbiota: a randomised clinical pilot trial. *Benef. Microbes*, **9**, 209–218 (2018).
- Nagino, T., Kano, M., Masuoka, N., Kaga, C., Anbe, M., et al.: Intake of a fermented soymilk beverage containing moderate levels of isoflavone aglycones enhances bioavailability of isoflavones in healthy premenopausal Japanese women: a double-blind, placebo-controlled, single-dose, crossover trial. *Biosci. Microbiota. Food Health*, **35**, 9–17 (2016).
- Naito, S., Koga, H., Yamaguchi, A., Fujimoto, N., Hasui, Y., Kuramoto, H., Iguchi, A., Kinukawa, N., and Kyushu University Urological Oncology Group.: Prevention of recurrence with epirubicin and *Lactobacillus casei* after transurethral resection of bladder cancer. *J. Urol.*, **179**, 485–490 (2008).
- Nieman, D. C., Johanssen, L.M., Lee, J. W. and Arabatzis, K.: Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. *J. Sports Med. Phys. Fitness*, **30**, 316–328 (1990).
- Ohashi, Y., Nakai, S., Tsukamoto, T., Masumori, N., Akaza, H., et al.: Habitual intake of lactic acid bacteria and risk reduction of bladder cancer. *Urol. Int.*, **68**, 273–280 (2002).
- Sato, J., Kanazawa, A., Azuma, K., Ikeda, F., Goto, H., et al.: Probiotic reduces bacterial translocation in type 2 diabetes mellitus: A randomised controlled study. *Sci. Rep.*, **7**, 12115 (2017).
- Shida, K., Sato, T., Iizuka, R., Hoshi, R., Watanabe, O., Igarashi, T., Miyazaki, K., Nanno, M. and Ishikawa, F.: Daily intake of fermented milk with *Lactobacillus casei* strain Shirota reduces the incidence and duration of upper respiratory tract infections in healthy middle-aged office workers. *Eur. J. Nutr.*, **56**, 45–53 (2017).
- Sugawara, G., Nagino, M., Nishio, H., Ebata, T., Takagi, K., Asahara, T., Nomoto, K. and Nimura, Y.: Perioperative synbiotic treatment to prevent postoperative infectious complications in biliary cancer surgery: A randomized controlled trial. *Ann. Surg.*, **244**, 706–714

- (2006).
- 24) Takada, M., Nishida, K., Kataoka-Kato, A., Gondo, Y., Ishikawa, H. et al.: Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota relieves stress-associated symptoms by modulating the gut-brain interaction in human and animal models. *Neurogastroenterol. Motil.*, **28**, 1027–1036 (2016).
 - 25) Takagi, A., Ikemura, H., Matsuzaki, T., Sato, M., Nomoto, K., Morotomi, M. and Yokokura, T.: Relationship between the *in vitro* response of dendritic cells to *Lactobacillus* and prevention of tumorigenesis in the mouse. *J. Gastroenterol.*, **43**, 661–669 (2008).
 - 26) Takagi, A., Kano, M. and Kaga, C.: Possibility of breast cancer prevention: use of soy isoflavones and fermented soy beverage produced using probiotics. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 10907–10920 (2015).
 - 27) Takagi, A., Matsuzaki, T., Sato, M., Nomoto, K., Morotomi, M. and Yokokura, T.: Enhancement of natural killer cytotoxicity delayed murine carcinogenesis by a probiotic microorganism. *Carcinogenesis*, **22**, 599–605 (2001).
 - 28) Takagi, A., Matsuzaki, T., Sato, M., Nomoto, K., Morotomi, M. and Yokokura, T.: Inhibitory effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on 3-methylcholanthrene-induced carcinogenesis in mice. *Med. Microbiol. Immunol.*, **188**, 111–116 (1999).
 - 29) Toi, M., Hirota, S., Tomotaki, A., Sato, N., Hozumi, Y., et al.: Probiotic beverage with Soy isoflavone consumption for breast Cancer prevention: A case-control study. *Curr. Nutr. Food Sci.*, **9**, 194–200 (2013).
 - 30) Van, Puyenbroeck, K., Hens, N., Coenen, S., Michiels, B., Beunckens, C., Molenberghs, G., Van, Royen, P. and Verhoeven, V.: Efficacy of daily intake of *Lactobacillus casei* Shirota on respiratory symptoms and influenza vaccination immune response: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in healthy elderly nursing home residents. *Am. J. Clin. Nutr.*, **95**, 1165–1171 (2012).
 - 31) Wu, A. H., Yu, M. C., Tseng, C. C. and Pike, M. C.: Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. *Br. J. Cancer*, **98**, 9–14 (2008).
 - 32) Yamamoto, S., Sobue, T., Kobayashi, M., Sasaki, S., Tsugane, S. and Japan Public Health Center-Based Prospective Study on Cancer Cardiovascular Diseases Group.: Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *J. Natl. Cancer Inst.*, **95**, 906–913 (2003).