

卵白アルブミン免疫マウスを用いたgenisteinのアレルギー抑制機構の解明

酒井 徹^{*1,2}・小木曾真理²・満屋香織²・小松龍史¹・山本 茂²

¹大阪府立大学総合リハビリテーション学部 ²徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

Effect of Genistein on the Antigen-Specific Immune Responses in Mice

Tohru SAKAI^{1,2}, Mari KOGISO², Kaori MITSUYA²,
Tatsushi KOMATSU¹ and Shigeru YAMAMOTO²

¹Department of Clinical Nutrition, Osaka Prefecture University, Habikino 583-8555

²Institution of Health Bioscience, The University of Tokushima Graduate School,
Tokushima 770-8503

ABSTRACT

The isoflavone genistein is a phytoestrogen found in high levels in soy products that has been associated with decreased incidences of breast and prostate cancers. In this study, we examined effect of genistein on the antigen-specific immune responses in ovalbumin (OVA)-immunized BALB/c mice. Groups of mice were exposed to vehicle or genistein by gavage. The doses of genistein used were 4 and 20 mg/kg body/day. OVA-specific proliferative responses, IFN- γ and IL-4 productions were decreased in genistein administered mice compared to those in control mice without decreasing responses to anti-CD3 mAb. OVA-specific IgG1, IgG2a and IgG2b productions were also decreased in genistein administered mice. However, genistein administration did not influence the TNP-Ficoll-specific IgM and IgG levels. These findings suggest that genistein suppresses antigen-specific immune responses by suppressing the induction of antigen-specific T cells. Moreover, treatment with ICI 182, 780 decreased OVA-specific proliferative responses, but genistein did not suppress these responses synergistically in ICI 182, 780 treated mice. The mechanism for the suppression of T cell induction by genistein is responsible for the competition with endogenous 17 β -estradiol for estrogen receptors. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 63-70, 2005.

Key words : genistein, mice, estrogen receptor, antigen, T cell

*〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15

大豆は良質なたん白質および脂質に富み、日本人の食生活を代表する食品である¹⁾。多くの疫学的研究、*in vivo*および*in vitro*での研究から大豆イソフラボンは乳がん、前立腺がんの発症抑制^{2,3)}、骨粗鬆症予防および更年期障害の緩和⁴⁾などに効果があるとされている。疫学的な例としては、日本をはじめとするアジアの国々は欧米諸国と比較して大豆製品を多く摂取し、乳がんや前立腺がんの発症率および死亡率が低いことが明らかになっている^{2,5,6)}。大豆イソフラボンには、genistein, daidzein, glyciteinの3種類のアグリコンとそれぞれの配糖体およびそれらのマロニル化配糖体、アセチル化配糖体の12種類がある⁷⁾。大豆イソフラボンは食品中では配糖体として存在しているものが多いが、腸内細菌によってアグリコンに代謝され吸収される⁸⁾。大豆イソフラボンはステロイド骨格を有さないが、立体的に構造がエストロゲンの一種である17 β -estradiol (E₂) に類似していることからエストロゲンレセプター (ER) に親和性を示し、その結果エストロゲン様作用もしくは抗エストロゲン作用を示すと考えられ⁹⁾、フィトエストロゲン (植物エストロゲン) とも呼ばれている⁷⁾。

genisteinおよびその誘導体は大豆中の含有量が高く、エストロゲン様活性やその他の生理機能も強い⁷⁾。genisteinの免疫機能への影響は、細胞性免疫^{10~12)}および液性免疫^{10,13,14)}の両方で報告されている。また、抗炎症作用¹⁴⁾、卵巣摘出マウスにおける胸腺萎縮¹³⁾なども報告されている。しかしながら、genisteinが抗原特異的応答に及ぼす影響およびその作用機序についての報告は少ない。そこで本研究ではgenisteinが抗原特異的T細胞およびB細胞応答に及ぼす影響およびその機序の検討を行った。

実験方法

実験デザイン

7週齢の雌BALB/cマウスを、0 (コントロール)、4 および20 mg/kg/day genistein投与群に分け、5日間予備飼育した。その後35日間連続的に、0、4 および20 mg/kg/day となるように調製したgenistein溶液0.2 mLを、ゾンデにて1日1回経口的に強制投与を行った。genistein投与開始日を0日として、7日および21日に卵白アルブミン (OVA) またはTNP-Ficolによる免疫を施した。

リンパ球増殖反応

OVAをウシ胎仔血清入りRPMI-1640培地で400 μ g/mLに調整し、96-wellプレートに100 μ Lずつ加えた。これ

に1ウェルにつき5 $\times$ 10⁶ cells/mLに調整した細胞浮遊液を100 μ L加えた。抗マウスCD3刺激の場合は、プレートに抗マウスCD3 mAb (2 μ g/mL) を固相化し細胞を加えた。それらを5% CO₂, 37 $^{\circ}$ Cの条件下で72時間培養し、培養終了の20時間前に [³H]Thymidine deoxyribose ([³H]TdR) (0.5 μ Ci/10 μ L) を入れた。培養終了後、細胞培養液をセルハーベスター (Packard Instrument Co. Inc.) を用いてガラスフィルター上に吸着させ、DNAに取り込まれた [³H]TdRの放射活性をマトリックスペータカウンタ (Packard Instrument Co. Inc.) で測定した。

IFN- γ およびIL-4産生

ウシ胎仔血清入りRPMI-1640培地で400 μ g/mLに調整したOVA溶液250 μ Lに1 $\times$ 10⁷ cells/mLに調整した細胞浮遊液250 μ Lを加え、24-wellプレートにて3日間培養を行った。抗マウスCD3 mAbによる刺激では、まずPBSにて2 μ g/mLに調整した抗マウスCD3 mAbを300 μ Lずつ24-wellプレートに入れ、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートし固相化を行い、OVA刺激の場合と同様に細胞を加えた。それらを5% CO₂, 37 $^{\circ}$ Cの条件下で72時間培養を行い、培養終了後、培養上清を回収し、Mouse IFN- γ およびIL-4 ELISA kit (eBioscience) を用いてIFN- γ およびIL-4産生量を測定した。

抗原特異的抗体産生

OVAまたはTNP-BSAをcoating bufferにて10 μ g/mLに調整し、ELISAプレートに100 μ L/well入れ、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。各ウェルを0.05% Tween 20を含んだPBS溶液 (PBS-T) で3回洗浄し、1% BSAを含むPBS-Tを200 μ L/well入れ、室温で2時間静置し、ブロッキングを行った。3回洗浄した後、PBS-Tで段階希釈した血清100 μ Lをそれぞれウェルに入れ、室温で2時間静置した。各ウェルを3回洗浄した後、1% BSAを含むPBS-Tで1,000倍希釈したアルカリフォスファターゼ (AP) 標識抗マウスIgG1, IgG2a, IgG2b, IgGまたはIgMを100 μ L/well加え、室温で2時間静置した。IgE測定では、1% BSAを含むPBS-Tで1,000倍希釈したビオチン標識抗マウスIgE (Becton Dickinson Co.) を100 μ L/well加え、室温で1時間静置した後、各ウェルを3回洗浄し、1% BSAを含むPBS-Tで3,000倍希釈したストレプトアビジン標識APを100 μ L/well加え1時間室温で静置した。各ウェルを5回洗浄し、p-nitrophenyl phosphate (SIGMA) を10% ジエタノールアミンバッファーに溶解した溶液 (1 mg/mL) を100 μ L/well加えて発色させた。その後100 μ Lの3 N NaOHで反応を止め、405 nmの波長にて吸光度を測定した。

樹状細胞 (DC) の抗原提示機能

樹状細胞はCD11cマイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を用い標識を行い, MACS LSカラムによってDCを単離した. また, CD4⁺ T細胞は, DO11.10マウスの脾細胞よりCD4⁺ T細胞単離キット (Miltenyi Biotec) を使用して単離を行った. 96-wellプレートにCD4⁺ T細胞 2×10^5 cells/50 μ LおよびDC 5×10^4 cells/50 μ Lを入れた. 刺激物としてウシ胎仔血清入りRPMI-1640培地で2 μ g/mLに調製したOVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド, 400 μ g/mLに調製したOVA, またはウシ胎仔血清入りRPMI-1640培地100 μ Lを入れ, 5% CO₂, 37°C条件下で48時間培養した. 培養終了の12時間前に [³H]TdR (0.5 μ Ci/10 μ L) を1ウェルにつき10 μ Lずつ加え, CD4⁺ T細胞のDNA合成を測定した.

CD4⁺CD25⁺ T細胞の細胞増殖抑制機能

CD4⁺CD25⁺ T細胞単離キット (Miltenyi Biotec) の細胞精製プロトコルに基づき, MACS LDおよびMSカラムを用いてCD4⁺CD25⁺ T細胞およびCD4⁺CD25⁻ T細胞を単離した. コントロール群または20 mg/kg/day genistein投与群から単離したCD4⁺CD25⁺ T細胞を96-wellプレートに 5×10^4 cells/50 μ L, 2.5×10^4 cells/50 μ L, 1.25×10^4 cells/50 μ L, 0.625×10^4 cells/50 μ L, 0.3125×10^4 cells/50 μ Lまたは0 cells/50 μ L入れ, これにコントロール群より単離したCD4⁺CD25⁻ T細胞 5×10^4 cells/50 μ Lおよびアクセサリ細胞を 1×10^5 cells/100 μ Lを加えた. 抗マウスCD3 mAbを含むウシ胎仔血清入りRPMI-1640培地 (10 μ g/mL) を10 μ L/well加え, 5% CO₂, 37°Cの条件下で72時間培養した. 培養終了の12時間前に [³H]TdR (0.5 μ Ci/10 μ L) を1ウェルにつき10 μ Lずつ入れた.

エストロゲンレセプター阻害剤投与

ICIをエタノールにて50 mMの濃度に溶解し, -20°Cで保存した. ICI投与日に, ICIストック溶液を60°Cに保温したコーン油と混合して6.5 mMの濃度に調整し, これをマウス1匹当りに100 μ L皮下注射した. ICI非投与群では, ICI投与群と等量のエタノールを含むコーン油100 μ Lを同様に皮下注射した. ICIおよびコントロール溶液の投与は4日毎に行った.

統計処理

データは全て平均値±標準偏差で示した. 有意水準の検定は, 一元配置分散分析を行い, 有意水準5%で有意差が認められたものに対してScheffe testを行った. 検定はすべてStatView Version 5.0 (SAS Institute Inc.) を用いて行った.

結 果

抗原特異的T細胞応答に対するgenisteinの影響

OVA特異的なT細胞応答を観察すると, genistein投与量依存的にリンパ球増殖反応が低下し, genistein 20 mg/kg/day投与群ではコントロール群と比較して有意に低下した ($P < 0.05$). 一方, 抗CD3 mAbで刺激を行い, T細胞応答を観察した場合, genisteinの投与による増殖反応の低下は認められなかった (Fig. 1). OVA特異的なT細胞によるサイトカイン産生を測定したところ, 1型ヘルパーT細胞が産生するIFN- γ , 2型ヘルパーT細胞が産生するIL-4の両者において, genisteinの投与量依存的にサイトカイン産生量が低下する傾向が見られた (Fig. 2). IFN- γ 産生においてはgenistein 20 mg/kg/day投与群でコントロール群と比較して有意に低下した ($P < 0.05$). 一方, 抗CD3 mAbで刺激を行った場合はIFN- γ , IL-4ともgenisteinの投与による産生抑制は認められず, IL-4に関しては, 逆に産生量の増加が認められた ($P < 0.05$).

抗原特異的B細胞応答に対するgenisteinの影響

genistein投与マウスにおけるOVA特異的なIgG1, IgG2a, IgG2bおよびIgE量を測定した (Fig. 3). コントロール群と比較して, genistein 4 mg/kg/dayおよび20 mg/kg/day投与群では, IgG1の産生量が有意に低下し (それぞれ $P < 0.05$, $P < 0.01$), IgG2a, IgG2bの産生量も低下する傾向が見られた. 一方, IgEについてはgenistein投与による影響が認められなかった.

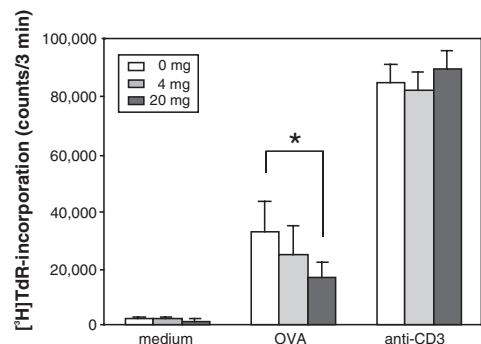


Fig. 1. Proliferative response of splenocytes upon stimulation with OVA in BALB/c mice administered with genistein. Spleen cells were stimulated with OVA or plate-bound anti-CD3 mAb. After 48 hr incubation, DNA synthesis was determined by measuring incorporated ³H-TdR. The values are means $\pm$ SD. * $P < 0.05$ compared with the control.

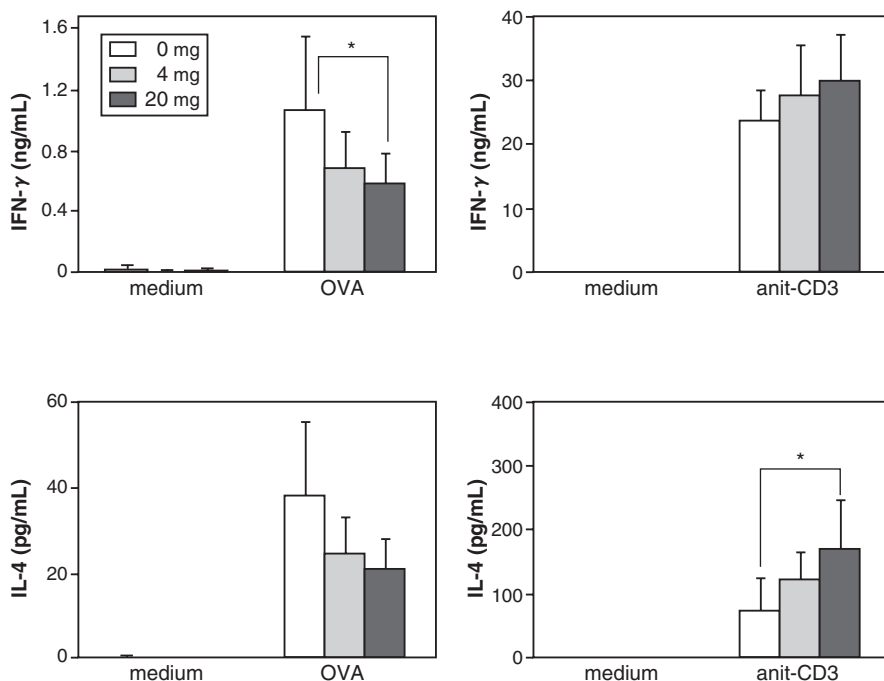


Fig. 2. Cytokine productions from splenocytes in BALB/c mice administered with genistein. Spleen cells were stimulated with OVA or plate-bound anti-CD3 mAb. After 48 hr, supernatants were collected and contents of IFN- γ and IL-4 were determined by ELISA as described in the Materials and Methods. The values are means $\pm$ SD. * $P < 0.05$ compared with the control.

胸腺非依存性抗原 (TI) に対する特異抗体に対する genistein の影響

genistein 投与群における OVA 特異的抗体産生低下 (Fig. 3) の原因が, genistein による抗原特異的 T 細胞の分化誘導抑制に伴うものなのか, または genistein が B 細胞に直接的に作用したことによるのかを明らかにする目的で, TI 抗原である TNP-Ficoll で免疫を施し, genistein 投与マウスにおける TNP 特異的抗体産生を測定した (Fig. 4). IgM, IgG の両者とも genistein 投与開始日を 0 日として, 14 日において genistein 投与群で産生量が上昇し, 25 日に低下したが, OVA 特異的抗体産生低下が認められた 35 日においては 3 群間で差が認められなかった. これより, genistein は B 細胞に直接的に作用して抗体産生を抑制していないことが示唆された.

DC に対する genistein の影響

抗原特異的 T 細胞の誘導において, 最初に, 抗原提示細胞による T 細胞への抗原提示が起こる. そこで genistein 投与による抗原提示細胞の機能への影響について検討を行った. genistein 投与および非投与 BALB/c マウスから単離した DC を, DO11.10 マウスから

単離した CD4⁺ T 細胞と共に OVA₃₂₃₋₃₃₉ または OVA 存在下で 48 時間培養し, [³H]TdR の細胞への取り込みを測定した. また, genistein が DC のプロセッシングの過程に影響を及ぼしているかを明らかにする目的で OVA₃₂₃₋₃₃₉ および OVA を加えて培養を行ったが, どちらの刺激においても 3 群間で CD4⁺ T 細胞の活性化に伴う [³H]TdR の細胞への取り込みに差が認められなかった (Fig. 5).

CD4⁺CD25⁺ T 細胞に対する genistein の影響

genistein が抑制性 T 細胞である CD4⁺CD25⁺ T 細胞機能に及ぼす影響について検討を行った. 28 日間 20 mg/kg/day genistein を投与した BALB/c マウスの脾臓より単離した CD4⁺CD25⁺ T 細胞, CD4⁺CD25⁻ T 細胞の割合をフローサイトメトリーによって解析したが, いずれの細胞群においても genistein 投与群とコントロール群で有意な差は認められなかった (data not shown). さらに, コントロール群または genistein 投与群から単離した CD4⁺CD25⁺ T 細胞を, コントロール群より単離した CD4⁺CD25⁻ T 細胞, アクセサリー細胞および抗 CD3 mAb と共に培養し, リンパ球増殖反応を測定した. genistein 投与群とコントロール群の両

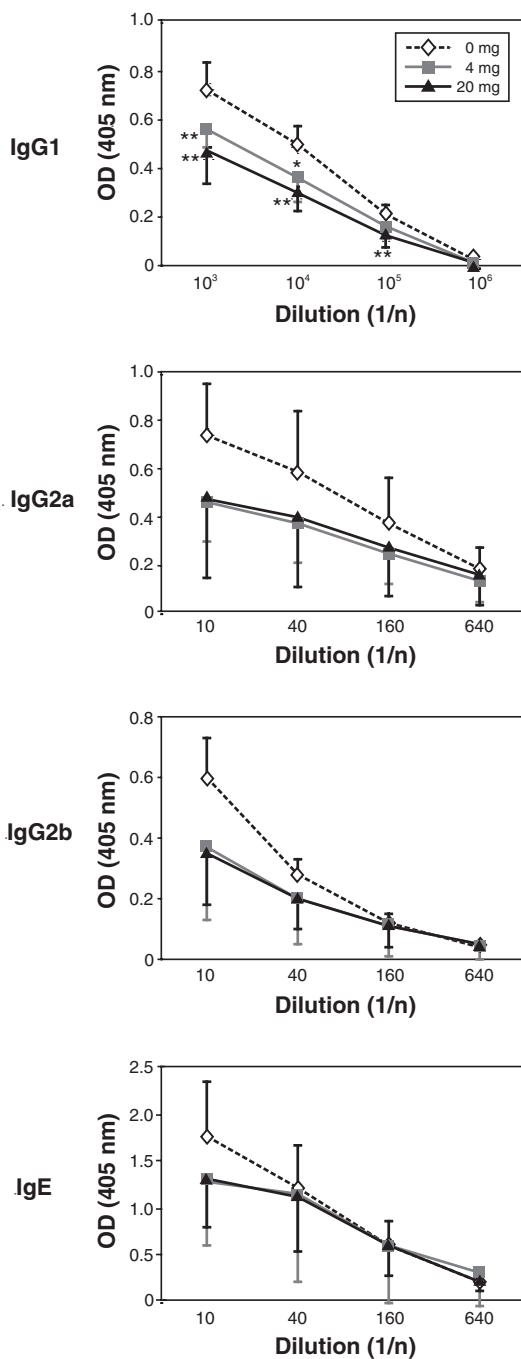


Fig. 3. OVA-specific antibody production in BALB/c mice administered with genistein. Sera were obtained from each mouse and levels of OVA-specific Igs were determined by ELISA as described in the Materials and Methods. The values are means $\pm$ SD. * P <0.05 and ** P <0.01 compared with the control.

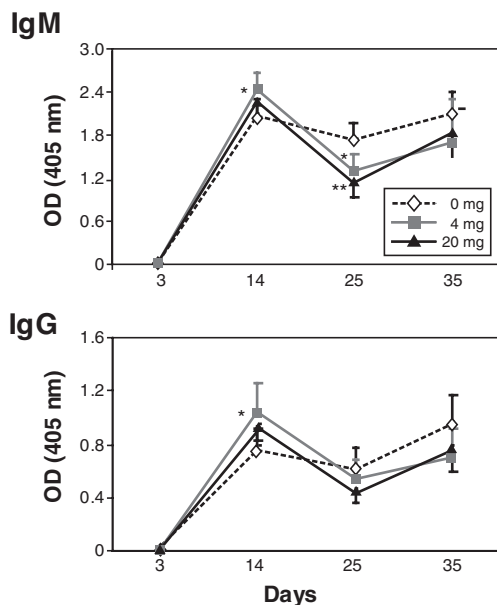


Fig. 4. TNP-Ficoll-specific antibody production in BALB/c mice administered with genistein. Sera were obtained on 3, 14, 25 and 35 days after immunization. The levels of TNP-specific Igs were determined by ELISA. The values are means $\pm$ SD. * P <0.05 and ** P <0.01 compared with the control.

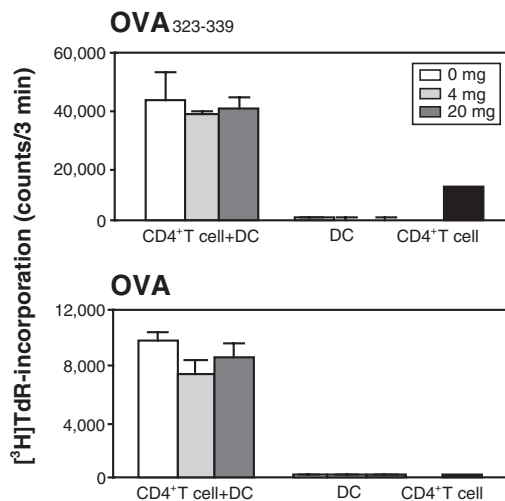


Fig. 5. Antigen-presenting ability of DCs from genistein-treated BALB/c mice. DCs from control or genistein-treated mice were cultured with DO11.10 mouse CD4⁺ T cells. After 48 hr incubation, DNA synthesis was determined by measuring incorporated ³H-TdR. The values are means $\pm$ SD of triplicate observation.

者において加えるCD4⁺CD25⁺ T細胞量の数に依存して増殖反応が低下したが、2群間で差は認められなかった (Fig. 6)。

genisteinの抗原特異的免疫誘導におけるエストロゲンレセプター阻害剤の影響

genisteinは構造がエストロゲンに類似していることから、各細胞に対する作用にはERの関与が考えられる。そこで、ICI投与マウスにおける抗原特異的T細胞の分化誘導を観察し、ERに対するgenisteinの作用を検討した。genistein 0 mg/kg/day・ICI非投与群と比較してgenistein 0 mg/kg/day・ICI投与群における増殖反応が有意に低下した ($P<0.05$) ことから、内因性エストロゲンはOVA特異的なT細胞誘導の維持に関わっていることが推察された (Fig. 7)。genistein 20 mg/kg/day・ICI投与群でも増殖反応が低下したが、低下の程度はgenistein 0 mg/kg/day・ICI投与群とほぼ変わらないことから、genisteinがERに結合し、エストロゲンに対して拮抗的に働いたことが推察された。

考 察

本研究では、ヒトが摂取しうるgenistein量における免疫機能への影響をマウスで検討するために、genistein投与量を4および20 mg/kg/dayに設定した。日本人の推定上大豆イソフラボン摂取量は27.8 mg/day (genistein 13.48 mg/day) と算定されている¹⁵⁾。また、大豆ベースの乳児食を与えられた乳児は6~11 mg/kg/dayの大豆イソフラボンを摂取している計算になり¹⁶⁾、大豆ベースの乳児食を与えられた乳児では、細胞性および液性免疫低下が示唆されている¹³⁾。卵巣摘出マウスに8 mg/kgのgenisteinを注射し経時的に血中genistein濃度を測定したところ、投与2時間後まで、大豆ベースの乳児食を与えられたヒト乳児と同程度の濃度を維持していた¹³⁾。本研究は、健康なヒトにおけるgenisteinの免疫機能への影響をマウスの系で観察することを目的とするため、卵巣摘出は行わなかった。

Yellayiらは、genisteinの皮下投与を行ったスカシガイヘモシアニン (KLH) 免疫マウスにおいて、KLH特異的IgG産生が低下したことを報告している¹³⁾。また、2型コラーゲンを免疫し関節炎を誘導したマウスにgenisteinを投与すると、誘導される関節炎の軽減および2型コラーゲンに対する自己抗体レベルが低下する¹⁴⁾という報告もある。これらの報告より抗原特異的抗体産生に対してgenisteinが抑制的な作用を及ぼすことが示されている。しかしながら、T細胞応答を含めた抗体産生に至るgenisteinの作用機序については十分には

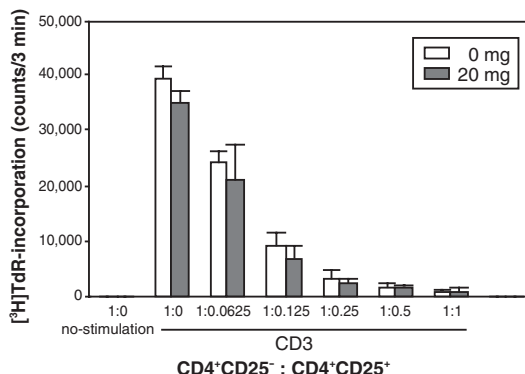


Fig. 6. Suppressive activity of CD4⁺CD25⁺ T cells from genistein-treated BALB/c mice. CD4⁺CD25⁺ T cells from control or genistein-treated mice were cultured with CD4⁺CD25⁺ T cells and T cell-depleted splenocytes. After 48 hr incubation, DNA synthesis was determined by measuring incorporated ³H-TdR. The values are means $\pm$ SD of triplicate observation.

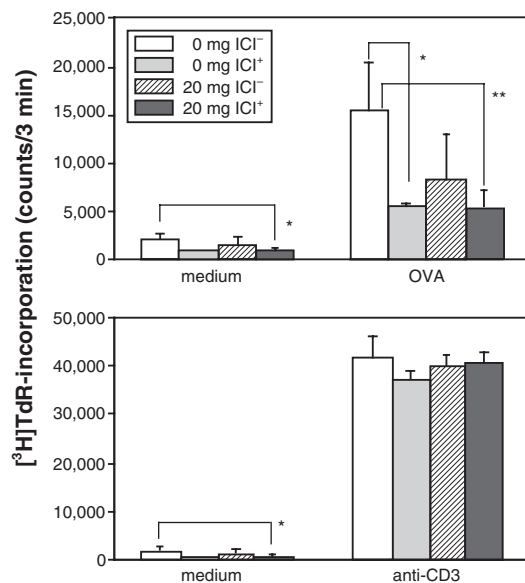


Fig. 7. Proliferative response of splenocytes upon stimulation with OVA in BALB/c mice treated with genistein and/or ICI. DNA synthesis was determined by measuring incorporated ³H-TdR. The values are means $\pm$ SD of triplicate observation. * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ compared with the control.

解明されていない。そこで本研究ではgenisteinが抗原特異的応答に及ぼす影響およびそのメカニズムの検討を行った。

最初に、抗原特異的T細胞およびB細胞応答に対するgenisteinの影響を検討した。OVA存在下におけるリンパ球増殖反応 (Fig. 1) およびサイトカイン産生 (IL-4 およびIFN- γ) (Fig. 2) はgenisteinの投与量依存的に低下した。一方、抗CD3 mAb存在下においては低下が認められなかった。これより、genisteinは直接的にT細胞機能を低下させるのではなく、抗原特異的T細胞の分化誘導を抑制することが示唆された。

次に、genistein投与群におけるOVA特異的抗体産生低下が、genisteinによる抗原特異的T細胞の分化誘導抑制に伴うものなのか、またはgenisteinがB細胞に直接的に作用したことによるのかを明らかにする目的で、抗体産生にT細胞の補助作用が必要ないTI抗原 (TNP) で免疫し、TNP特異的抗体産生を測定した。その結果、TNP特異的抗体産生には影響が認められなかったため、genisteinはB細胞に直接的に作用していないことが示唆された (Fig. 4)。これより、*in vivo*において、genisteinの投与により、T細胞からのサイトカイン産生が低下し、それに伴い、抗体産生も低下することが示唆された。

genisteinの各細胞に対する作用としては、構造がエ

ストロゲンに類似していることからERを介したエストロゲン様作用、エストロゲンとの拮抗作用、そしてチロシンキナーゼ阻害作用が考えられる。ICIはER α およびER β に結合するエストロゲンアンタゴニストである¹⁷⁾。そこでICI投与下における抗原特異的T細胞の分化誘導を観察することによって、genisteinのERに対する作用について検討を行った。その結果、まず明らかになったのは、ICI投与マウスでは特異免疫の誘導が著しく抑制されており、エストロゲンは抗原特異的なT細胞誘導の維持に関与していることであった。genistein投与マウスにおけるT細胞応答はICI投与マウスと同程度であり、両者の投与によってもICIまたはgenistein投与による抑制を増強させる影響が認められなかったことより、genisteinは免疫細胞上のERにおいて、エストロゲンと拮抗的に作用することが示唆された (Fig. 7)。17 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素はエストロゲンの代謝に関与する酵素であるが、genisteinはこの酵素活性の抑制作用をもつ¹⁸⁾。またgenisteinは、活性化エストロゲンを減らす性ホルモン結合グロブリンの産生を刺激する¹⁹⁾。genisteinのこれらの作用によって活性化エストロゲンレベルが低下した結果、エストロゲンによる抗原特異的なT細胞誘導維持能が低下したという可能性も考えられる。

要 約

大豆イソフラボンには、骨粗鬆症予防、乳がんおよび前立腺がんの発症抑制等の効果があるとされ、大豆イソフラボンを含む健康食品の開発が進んでいる。大豆イソフラボンの中でもgenisteinとその誘導体は、大豆中の含有量が高く、また生理活性が強い。genisteinの免疫機能への影響およびその詳細なメカニズムについては不明な点が多い。そのため本研究ではgenisteinの抗原特異的免疫応答およびその機序について検討を行った。genisteinを35日間経口投与した卵白アルブミン (OVA) 免疫BALB/cマウスの脾細胞を用いて、OVA刺激によるリンパ球増殖反応およびサイトカイン産生 (IFN- γ 、IL-4) を測定したところ、いずれもgenisteinの投与量依存的に低下した。一方、抗CD3 mAb刺激ではこれらの低下は認められなかった。これより、genisteinは直接的にT細胞機能を低下させるのではなく、抗原特異的T細胞の分化誘導を抑制することが示唆された。また、OVA特異的IgG2aおよびIgG1産生も同様にgenistein投与群で低下した。しかしながら胸腺非依存性抗原免疫マウスにおいては特異抗体産生にgenistein投与による影響が認められなかった。そのためgenistein投与によるOVA特異的抗体産生低下はgenisteinがB細胞に直接作用したのではなく、OVA特異的T細胞の分化誘導の抑制が関与していることが示唆された。さらに抗原特異的T細胞の誘導に関わる細胞群である樹状細胞およびCD4⁺CD25⁺ T細胞機能について検討したが、それら細胞にはgenisteinの影響が認められなかった。エストロゲンレセプター阻害剤をOVA免疫マウスに投与するとgenistein投与マウスと同様に抗原特異的T細胞の誘導が抑制され、両者を投与したマウスでもその反応抑制の程度は同程度であった。そのためgenisteinの特異免疫誘導抑制はエストロゲンと拮抗的に作用することが関与していることが示唆された。

文 献

- 1) 山内文男, 大久保一良 (1992): 大豆の科学. 朝倉書店, 東京.
- 2) Barnes S (1998): Evolution of the health benefits of soy isoflavones. *Proc Soc Exp Biol Med*, **217**, 386-392.
- 3) Hoffman R (1995): Potent inhibition of breast cancer cell lines by the isoflavonoid genistein: comparison with genistein. *Biochem Biophys Res Commun*, **211**, 600-606.
- 4) Suthar AC, Banavalikar MM and Biyani MK (2001): Pharmacological activities of genistein, an isoflavone from soy (*Glycine max*): part II-anti-cholesterol activity, effects on osteoporosis & menopausal symptoms. *Indian J Exp Biol*, **39**, 520-525.
- 5) Messina MJ, Persky V, Setchell KD and Barnes S (1994): Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer*, **21**, 113-131.
- 6) Adlercreutz H (1990): Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, **201**, 3-23.
- 7) 家森幸男, 太田静行, 渡邊 昌 (2001): 大豆イソフラボン. 幸書房, 東京.
- 8) Davenport H (1982): Physiology of the digestive tract. Year Book Medical Publishers. Chicago.
- 9) Miksicek RJ (1994): Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **49**, 153-160.
- 10) Guo TL, White KL Jr, Brown RD, Delclos KB, Newbold RR, Weis C, Germolec DR and McCay JA (2002): modulates splenic natural killer cell activity, antibody-forming cell response, and phenotypic marker expression in F(0) and F(1) generations of Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, **181**, 219-227.
- 11) Yellayi S, Zakroczymski MA, Selvaraj V, Valli VE, V Ghanta, Helferich WG and Cooke PS (2003): The phytoestrogen genistein suppresses cell-mediated immunity in mice. *J Endocrinol*, **176**, 267-274.
- 12) Guo TL, McCay JA, Zhang LX, Brown RD, You L, Karrow NA, Germolec DR and White KL Jr (2001): Genistein modulates immune responses and increases host resistance to B16F10 tumor in adult female B6C3F1 mice. *J Nutr*, **131**, 3251-3258.
- 13) Yellayi S, Naaz A, Szewczykowski MA, Sato T, Woods JA, Chang J, Segre M, Allred CD, Helferich WG and Cooke PS (2002): The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: a human health concern? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7616-7621.
- 14) Verdrengh M, Jonsson IM, Holmdahl R and Tarkowski A (2003): Genistein as an anti-inflammatory agent. *Inflamm Res*, **52**, 341-346.
- 15) Nakamura Y, Tsuji S and Tonogai Y (2000): Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. *J AOAC Int*, **83**, 635-650.
- 16) Setchell KD, Zimmer-Nechemias L, Cai J and Heubi JE (1998): Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am J Clin Nutr*, **68**, 1453S-1461S.
- 17) Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS and Lubahn DB (1997): A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*, **390**, 509-512.
- 18) Evans BA, Griffiths K and Morton MS (1995): Inhibition of 5 α -reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *J Endocrinol*, **147**, 295-302.
- 19) Mousavi Y and Adlercreutz H (1993): Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture. *Steroids*, **58**, 301-304.