

疎水性吸着樹脂処理大豆ペプチド画分の肝臓トリグリセリド低下作用

美浪まゆみ・窄野昌信・福田亘博*

宮崎大学農学部

Studies on Liver Triglyceride-lowering Action of Soyapeptide Prepared by Using Hydrophobic Adsorbent Resin Column

Mayumi MINAMI, Masanobu SAKONO and Nobuhiro FUKUDA

Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Miyazaki 889-2192

ABSTRACT

In previous studies, we have demonstrated a potent hypolipidemic effect of both LD3 (hydrolyzate of soy protein isolate obtained by digestion with fungus protease) and F5 (prepared by using hydrophobic adsorbent resin column). In the present studies, we have attempted to clarify the active components occurring in the LD3 and F5 and to elucidate the mechanism responsible for the observed reduction, using primary rat hepatocytes. When the hydrolyzates of casein, LD3 and F5 were incubated with primary hepatocytes, followed by addition of [^{14}C]oleate as an exogenous fatty acid substrate (experiment 1), the incorporation of oleate into the medium lipids, but not into cellular lipids, was significantly lowered in the groups of LD3-D (enzyme hydrolyzate of LD3) and F5-D (enzyme hydrolyzate of F5) in a dose-dependent manner; the extent of lowering activity being greater in F5-D than in LD3-D. This lowering activity was not true for casein hydrolyzate. Although the effects on lipid synthesis of addition of three types of di-peptides, which may be absorbable from the intestine into the blood stream, were not consistent in experiment 2 and 4, it nevertheless appeared to have some beneficial effects on lipid synthesis. In the third experiment, we examined the effects of isoflavone and saponin on the incorporation of radiolabelled oleate into lipids. The results showed that there was a dose-dependent reduction in incorporation of oleate into the cell and/or medium lipids, especially the triglycerides, in the cells incubated with isoflavone and saponin, respectively. In the fourth experiment, we further examined the effects of combinations of di-peptide with isoflavone or saponin on the incorporation of [^{14}C]oleate into lipids, and found that under certain conditions there was an additional effect of this combination of di-

*〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1

peptide with the isoflavone or saponin in terms of the reduced synthesis of lipids, especially triglycerides, as compared to those of either di-peptide, isoflavone or saponin alone. On the other hand, there was an increased incorporation of radiolabelled oleate into water soluble fraction (ketone body). These results suggest that serum and liver lipid-lowering effect of LD3 or F5 is in part due to the combinational effect of di-peptide and/or other components such as isoflavone, flavone and saponin the mechanism responsible for the observed lowering effect is attributed to an altered metabolism of fatty acid between oxidation and esterification in the liver. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 90-97, 2004.

Key words: liver triglyceride-lowering action, soy peptide, rat, hepatocyte

食の欧米化は、動脈硬化症、肥満症や糖尿病などの生活習慣病を多発させることから、食生活の改善、とくに動物性食品を控え、植物性食品を摂取することが推奨されている。一般に、代表的な植物性食品である大豆たん白質は、動物性食品であるカゼインなどに比べて生活習慣病の指標となる血清コレステロール、血圧、血糖値などを改善することが報告されている。

これまでに著者らは、分離大豆たん白質 (SPI) から調製した大豆ペプチドであるLD3やF5がラット血清および肝臓におけるトリグリセリド濃度を顕著に低下させることから、高脂血症や脂肪肝の改善に有効である可能性を報告した¹⁾。先の報告では、SPIから酵素処理と遠心により調製した水溶性の高い大豆ペプチド画分LD3とさらに疎水性吸着樹脂処理して得られた親水性ペプチド画分F5をラットに摂取させた結果、とくにF5画分には強い血清および肝臓トリグリセリド (TG) 濃度低下作用を有することを明らかにした。

本研究では、親水性ペプチド画分 (LD3およびF5) のもつ血清および肝臓TG濃度低下作用を引き起こす成分の検索とその機序を解明する目的で、ラット初代肝細胞培養系を用いて検討した。

実験方法

実験動物

実験動物として、九動株式会社 (熊本) より購入したSprague-Dawley (SD) 系雄ラット (7週齢、体重200 g前後) を用いた。約一週間の予備飼育を行なった後、体重が250 gに達したものを実験に用いた。

肝細胞の単離および培養法

体重250 gに達したSD系雄ラットを用い、ネブタール麻酔下、常法により肝実質細胞を単離した。Fetal bovine serum (FBS) を10%含むWilliam's E培地を用いて細胞数が 5×10^5 個/mLになるように調製

し、コラーゲンコートディッシュに播き、24時間preincubateした。

ついで、5%FBS培地に換え、下記の試験物質をそれぞれ添加し、24時間さらに培養した。ついで肝細胞培地を無血清培地に換え、試験物質と脂質代謝を追跡するための $[1-^{14}\text{C}]$ オレイン酸をディッシュあたり0.25 μCi (2.4 mCi/mmol) を同時に添加し、さらに5時間培養した。培養終了後、培地は直ちに脂質画分を抽出、分析した。一方、細胞は回収し、分析に供するまで -80°C で保存した。

なお、培地は、William's E培地にインスリン、デキサメタゾン、ストレプトマイシン、ペニシリン、ニコチンアミド、およびL-グルタミンを添加して用いた。

試験物質の添加

実験1～4において、以下のように各試験物質を添加した。実験1では、Casein, LD3およびF5の人工消化物 (Casein-D, LD3-DおよびF5-D) をそれぞれ水溶液として1または2 mg/mLとなるよう培地に添加した。実験2では、分離大豆たん白質 (SPI) を消化酵素処理して得られた人工消化物中の腸管吸収性ジペプチド (Lys-Phe, Phe-AlaおよびPhe-Gly)²⁾を、それぞれ2, 20, 200 $\mu\text{g/mL}$ となるように直接培地に添加した。実験3では、イソフラボン素材である高純度イソフラボン精製品およびソヤフラボンHGをそれぞれ4, 20, 40 および8, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$ となるよう培地に添加した。また、サポニン素材であるソイヘルスSAは20, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ となるよう添加した。これらすべての物質はジメチルスルオキシド (DMSO) に溶解して調製した。コントロール群にはDMSOのみを添加した。実験4では、実験2で用いたジペプチド (Lys-Phe, Phe-AlaおよびPhe-Gly) をそれぞれ20または200 $\mu\text{g/mL}$ となるよう直接培地に添加した。

たん白質酵素消化物の調製

Casein, SPIを微生物プロテアーゼ処理して得られる

低分子ペプチド (LD3) およびLD3を疎水性樹脂処理して得られる親水性ペプチド (F5) は10倍量の脱イオン水に溶解した。ついで、ペプシン (4時間, pH 1.2, 37℃), トリプシンおよびキモトリプシン (4時間, pH 6.8, 37℃) で順次反応させた。なお, 酵素:基質=1:100 (w/w) となるように調製した。反応終了後, 反応液は, 沸騰水中 (98℃, 10分) で酵素を失活させた後, 冷却遠心分離 (8,500×g) した上清を採取し, ろ紙 (No. 1, Toyo Roshi) で濾過した後, 凍結乾燥したものを酵素消化物として実験に用いた。

脂質の抽出および放射能活性の測定

細胞および培地中の総脂質の抽出は, Folchらの方法により行った³⁾。上層 (水およびメタノール層) 中の放射能活性は, 一定量を取りINSTA-GELを用いて直接液体シンチレーションカウンター (LSC) で測定した。下層 (クロロホルム層) は, 濃縮後一定量を薄層クロマトグラフィー (TLC) により各脂質画分に分離した後, それぞれLSCで測定した。

細胞毒性試験

細胞の生存状態をMTT (3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) を用いて判定した。すなわち, LD3およびF5が細胞生存に及ぼす影響を調べるために, 肝細胞を96 wellプレートに播いて培養した。培養後MTTを培地中1 g/Lとなるように添加し, さらに2時間培養した。反応終了後, 培地を廃棄してジメチルスルオキシド (DMSO) を100 μ L添加し, 5分間振して反応を停止させた。吸光度はマイクロプレートリーダーを用いて490 nmにおける吸光度で測定した。

統計処理

データは平均値±標準誤差で示した。また, 各群間の平均値の有意差は, 実験1はTukey-Kramerで, またその他の実験はDunnettにより検定した。

結 果

培養系に各試験物質を添加した肝細胞のMTT活性は, 無添加の肝細胞に比べ, すべての実験において明確な差異は観察されなかった。このことは, 本実験で添加した各試験物質による細胞毒性および細胞の生存状態に及ぼす影響はなく, 以下に示す種々のパラメータの変化が各試験物質により引き起こされていることを示唆している。

Fig. 1 (実験1) に, カゼイン, LD3およびF5を酵素消化した調製物 (Casein-D, LD3-DおよびF5-D) を初代肝細胞に添加した場合の 14 Cオレイン酸の脂質画分への取り込みを示した。細胞内の総エステル化脂質および各脂質への取り込みに各群間で明確な差異は観察されなかった。一方, 培地総エステル化脂質への取り込みは, LD3-DおよびF5-Dの添加量に依存して低下傾向を示し, とくに, 低下は2 mg/mL添加群で有意であった。これらの総エステル化脂質への取り込み低下は, おもにトリグリセリドへの低下に基づくものであった。モノ, ジグリセリド, リン脂質およびコレステロールエステルへの取り込みに各群間で明確な差異は観察されなかった。なお, 低下の程度はF5-D群で最も顕著であった。一方, カゼインの酵素消化物を添加した場合, このような応答は観察されなかった。これ

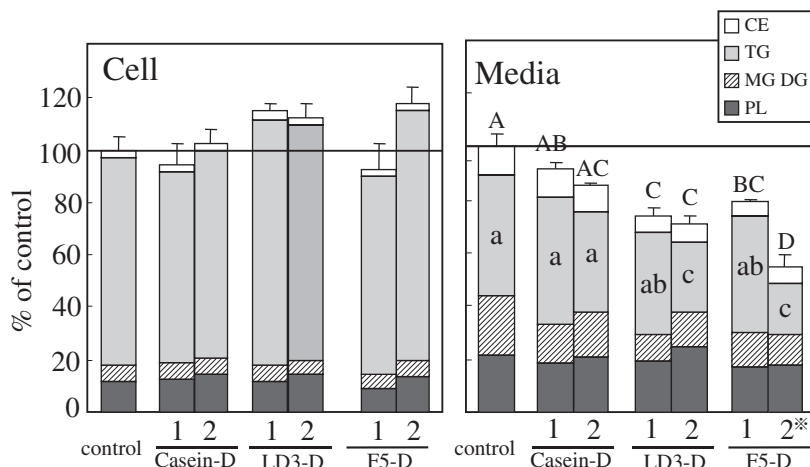


Fig. 1. Incorporation of 14 Coleic acid into lipids. Data are mean $\pm$ SE for 6 dishes. Bars with different capital letters are significantly different at $P<0.05$ within total lipids. Bars with different small letters are significantly different at $P<0.05$ within TG fraction. *mg/mL

らの結果は、LD3およびF5の酵素消化物には、肝細胞におけるエステル化脂質の合成あるいはこれら脂質の細胞外への分泌を抑制する物質が存在する可能性が示された。

Fig. 2 (実験2) に、SPIを摂取後、消化され、体内に取り込まれる可能性が報告されているジペプチド (Lys-Phe, Phe-Ala, Phe-Gly) を添加した場合の細胞および培地脂質への ^{14}C オレイン酸のエステル化脂質への取り込みを示した。総エステル化脂質への取り込みは、細胞中および培地中脂質とともにコントロール群に比べ各添加群で明確な影響は観察されなかった。

Fig. 3 (実験3) に、イソフラボンまたはサポニン を添加した場合のエステル化脂質への ^{14}C オレイン酸

の取り込みを示した。細胞中の総エステル化脂質への取り込みは、コントロール群に比べ高純度イソフラボン精製品 $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ 添加群およびソヤフラボンHG $80\text{ }\mu\text{g/mL}$ 添加群で有意に低下した。この低下は、おもにTG画分への取り込み低下によるものであった。一方、培地中の総エステル化脂質への取り込みは、コントロール群に比べ各群で低下する傾向を示し、高純度イソフラボン精製品群およびソイヘルスSA群で濃度依存的に低下した。

Fig. 4-1 (実験4) にジペプチドおよび高純度イソフラボン精製品を同時に添加した場合のエステル化脂質への ^{14}C オレイン酸の取り込みを示した。細胞中の総エステル化脂質への取り込みは、ジペプチドおよび

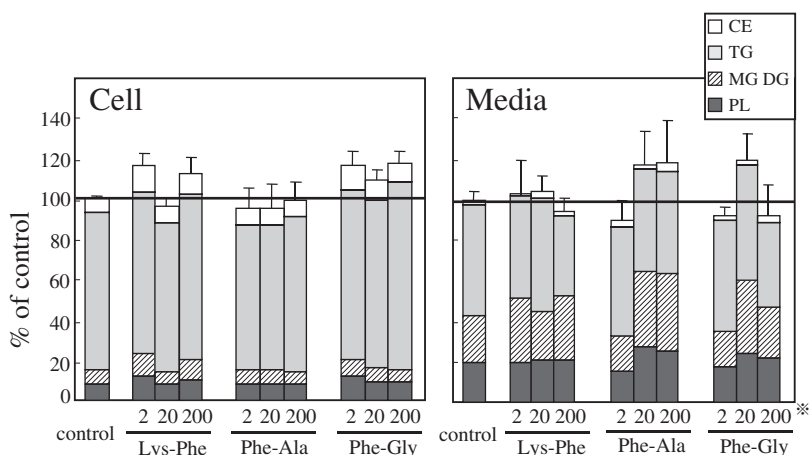


Fig. 2. Incorporation of ^{14}C oleic acid into lipids. Data are mean $\pm$ SE for 3 dishes. $\mu\text{g/mL}$

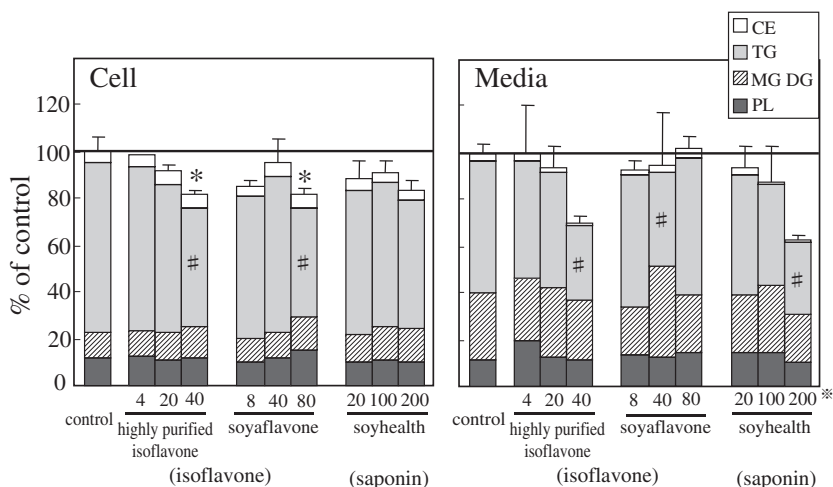


Fig. 3. Incorporation of ^{14}C oleic acid into lipids. Data are mean $\pm$ SE for 3 dishes. $*P<0.05$, vs. control group within total lipids. $\#P<0.05$, vs. control group within TG fraction. $\mu\text{g/mL}$

高純度イソフラボン単独で添加した場合低下傾向を示した。これらの低下傾向は、ジペプチドと高純度イソフラボンを同時に添加した場合いずれも有意であった。一方、培地中の総エステル化脂質への取り込みは、3種類のジペプチド200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の添加あるいはイソフラボン単独添加40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でコントロール群に比べいずれも有意に低下した。さらに、3種類のペプチドとイソフラボンを同時に添加した場合、イソフラボン単独に比べジペプチド200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加群でさらに低下する傾向を示した。

Fig. 4-2 (実験4) にジペプチドとサポニンを主成分とするソイヘルスの肝臓脂質代謝に及ぼす影響を調

べた。ジペプチドあるいはソイヘルス単独の添加は、細胞中の総エステル化脂質への取り込みをいずれも低下させる傾向を示し、とくにソイヘルス200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ およびソイヘルスにPhe-Ala20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を同時添加した場合、その低下は有意であった。一方、培地中の総エステル化脂質への取り込みは、コントロール群に比べ他のすべての群で有意に低下した。低下の程度は、ソイヘルス添加群およびこれにペプチドを同時に添加した群で顕著であった。しかしながら、ソイヘルス添加にジペプチドを増加させて添加した場合、さらなる取り込み減小は必ずしも観察されなかった。一方、水+メタノール層への ^{14}C オレイン酸の取り込み (Fig. 4-3)

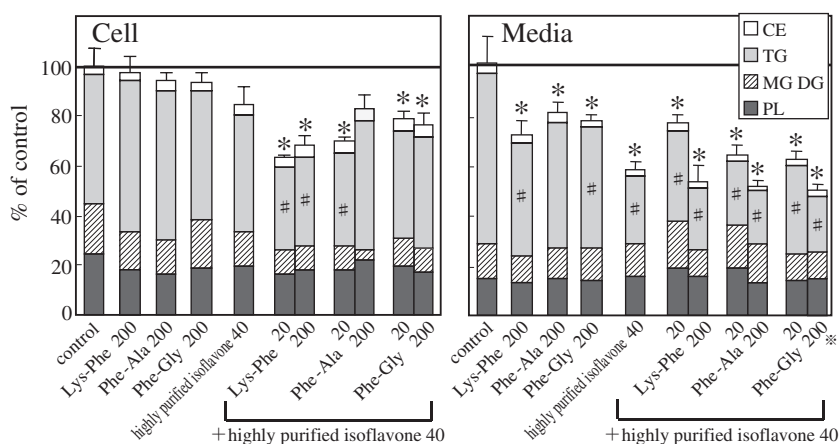


Fig. 4-1. Incorporation of ^{14}C oleic acid into lipids. Data are mean $\pm$ SE for 3 dishes. * $P<0.05$, vs. control group within total lipids. # $P<0.05$, vs. control group within TG fraction. ** $\mu\text{g}/\text{mL}$

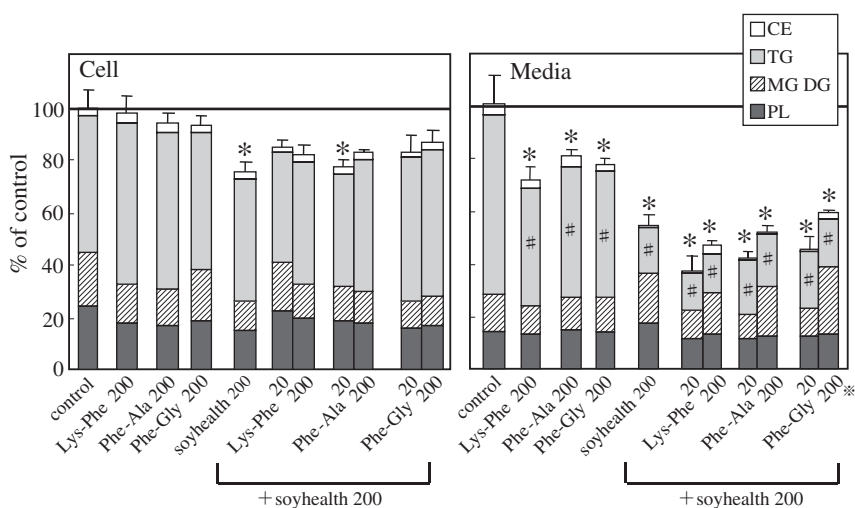


Fig. 4-2. Incorporation of ^{14}C oleic acid into lipids. Data are mean $\pm$ SE for 3 dishes. * $P<0.05$, vs. control group within total lipids. # $P<0.05$, vs. control group within TG fraction. ** $\mu\text{g}/\text{mL}$

は、コントロール群に比ベイスフラボン群、ソイヘル
ス群およびペプチドとの組み合わせで有意に増加した。

考 察

先に、SPIから調整したペプチド画分 (LD3) およ
びLD3を疎水性吸着樹脂で処理し、調製したペプチド
画分 (F5) をラットに2週間摂取させた場合、血清お
よび肝臓脂質、とくにトリグリセリド濃度はカゼイン
群に比べ有意に低下することを報告した¹⁾。本研究で
は、このようなLD3あるいはF5による脂質代謝改善作
用がこれらの試料中に含まれるペプチド、イソフラボン
あるいはサポニンによるものであるかを初代肝細胞
培養系で調べた。

脂質代謝の変化は、外因性脂肪酸として[1-¹⁴C]オレ
イン酸を用い、細胞あるいは培地中のエステル化脂質
への取り込みを指標として測定した。本培養条件下に
おいて、初代肝細胞培養中に添加したオレイン酸のコ
ントロール群の脂質画分への取り込みは、常に一定で
あり、またMTT活性にはコントロール群と試験物質
添加群との間で差異は観察されなかったことから、肝
細胞は正常に機能しているものと判断され、さらには
試験物質の脂質代謝に及ぼす影響は、コントロール群
と比較できるものと考えられた。

まず、実験1では、ラット初代肝細胞培養系に
Casein, 親水性ペプチド画分 (LD3およびF5) の酵素
消化物 (Casein-D, LD3-DおよびF5-D) を添加し、
[¹⁴C]オレイン酸の各脂質画分への取り込みを比較し
た。その結果、細胞中総エステル化脂質への[¹⁴C]オレ
イン酸の取り込みに及ぼすこれらの物質の影響は観察

されなかった。一方、培地中総エステル化脂質への取
り込みは、LD3-DおよびF5-Dを添加することにより低
下した。低下の程度はF5-D群でより大であった。さ
らに、この低下はおもに培地中のエステル化脂質の大
部分を占めるTG画分への[¹⁴C]オレイン酸の取り込み
低下に基づくものであった。これらの結果は、先に報
告したLD3あるいはF5の血清TG濃度低下作用の機序
は、肝臓からの脂質分泌の低下による可能性が考えら
れた。なお、培養系に未処理のLD3およびF5を添加し
て同様に培養した場合、無添加のコントロール群と比
較してこのような現象は観察されなかった (データ未
掲載)。したがって、これらの作用は、LD3あるいは
F5の人工消化物中に存在するアミノ酸、ペプチドある
いはその他の成分により引き起こされている可能性が
考えられた。

SPI中の成分のうち、血清TG濃度低下作用を有する
成分として大豆イソフラボンが挙げられており⁴⁾、SPI
の脂質濃度低下作用はペプチドあるいはイソフラボン
による可能性が考えられる。また、サポニンも脂質代
謝に影響を及ぼすことが報告されている^{5,6)}。そこで、
実験2ではSPIを消化管プロテアーゼ処理して得られ
た人工消化物のうち腸管吸収性のあるジペプチドを用
い、また実験3では大豆イソフラボンまたはサポニン
を用いて、各脂質画分への[¹⁴C]オレイン酸の取り込み
に及ぼす影響について検討した。ジペプチドを添加し
た場合、細胞あるいは培地のエステル化脂質への[¹⁴C]
オレイン酸の取り込みは、実験2ではコントロール群
に比べ差異は観察されなかったが、実験4では低下す
る傾向が観察された。一方、イソフラボンまたはサポ
ニンを添加した場合、比較的高濃度の添加で総エステ

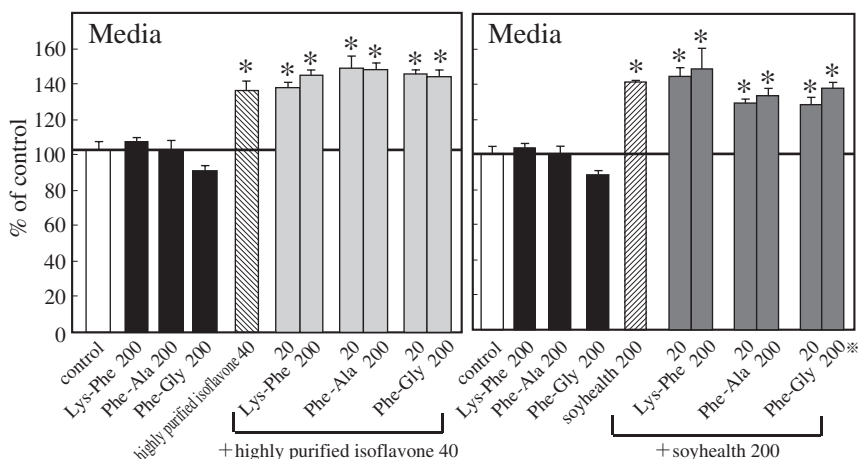


Fig.4-3. Incorporation of [¹⁴C]oleic acid into upper-layer. Data are mean $\pm$ SE for 3 dishes. * P <0.05, vs. control group. ※ μ g/mL

ル化脂質への ^{14}C オレイン酸の取り込みは顕著に減少した。この低下は、エステル化脂質の大部分を占めるTG画分への ^{14}C オレイン酸の取り込み減少に伴うものであった。

最後に、実験2で用いたジペプチドと、実験3で用いたイソフラボンまたはサポニンと同時に添加し、これらの組み合わせが ^{14}C オレイン酸の各脂質画分への取り込みにどのように影響するかを検討した(実験4)。その結果、細胞中の総エステル化脂質への ^{14}C オレイン酸の取り込みは、コントロール群に比べ、ジペプチドとイソフラボンとの組み合わせにより有意に減少した。この減少は、イソフラボン単独の場合より顕著であった。培地中でもまた、コントロール群に比べジペプチドとイソフラボンとの組み合わせにより有意に減少した。なお、この低下はイソフラボン単独の場合と同程度であった。一方、ジペプチドとサポニンの組み合わせは、ジペプチドとイソフラボンとの組み合わせで観察された応答に比べ軽度であった。このジペプチドとサポニンの組み合わせにおける軽度の応答は、おそらく用いた試験物質の純度の違いによる可能性が考えられることから、さらに高純度のサポニンをを用いた実験が必要であろう。

一方、肝細胞に取り込まれたオレイン酸はエステル化系へ代謝される他、ケトン体へ酸化されることが知られている。本実験では、直接ケトン体を測定していないが、Folchらの方法による脂質抽出時にメタノール+水層に存在することことから、本上層の放射能活性を測定した。その結果、 ^{14}C オレイン酸のメタノール+水層への取り込みは、イソフラボンまたはサポニンを添加することにより約40%増加した。これらの観

察は、イソフラボンあるいはサポニンが外因性脂肪酸の酸化系への代謝を亢進させることを示唆している。

大豆に含まれる成分の生理機能、とくにイソフラボンに関する研究は、骨代謝に及ぼす影響⁷⁾、抗がん作用⁸⁾やエストロゲン様作用⁹⁾などが知られているが、脂質代謝に及ぼす影響は必ずしも明確でない。一方、大豆サポニンは、血清脂質改善作用、血清コレステロール低下作用などが報告されている。したがって、現時点ではこれらの成分による脂質代謝の変化がどのような機序により引き起こされているか不明であるが、おそらくSPIあるいはSPIから調製した種々の大豆ペプチド中には、共存物としてこれらのイソフラボンあるいはサポニンが存在しており、これらの大豆ペプチド調製品をラットに摂取させた場合、これらの組み合わせが血清および肝臓脂質代謝改善能につながるものと考えられる。さらなる詳細な実験が必要であろう。また、今回の実験では、イソフラボンとサポニンは数種類の配糖体を含むものを添加した。一般に、配糖体は消化管において糖部分は水解された後アグリコンとして吸収され、生理活性を発揮するものと考えられることから、各アグリコンを分離したもので検討する必要があるであろう。

以上のように、親水性ペプチド画分(LD3およびF5)の血清・肝臓TG濃度低下作用は、肝細胞における外因性脂肪酸のエステル化脂質への取り込みの減少と酸化系への代謝亢進により引き起こされている可能性が示された。また、これらの作用はペプチドとイソフラボン・サポニンによる共同作用である可能性が示された。

要 約

本研究では、親水性ペプチド画分に見られる肝臓トリグリセリド(TG)濃度低下作用に関し、その作用機構および作用物質の解明を調べる目的で実験を行った。ラット初代肝細胞培養系を用い、試験物質とともに外因性脂肪酸として ^{14}C オレイン酸を加え培養し、細胞あるいは培地の各脂質画分、とくにTGへの放射能活性の取り込みを調べた。まず、消化酵素(ペプシン、キモトリプシンおよびトリプシン処理)でLD3およびF5を処理し、凍結乾燥粉末を培養系に添加した。その結果、 ^{14}C オレイン酸の培地中のTGへの取り込みは、コントロール群に比べ、LD3-DおよびF5-D群で減少した。とくに、総エステル化脂質への取り込みは、濃度依存的な減少を示した。なお、カゼインの酵素消化物についても同様に検討したが、コントロールとの間に差異は観察されなかった。ついで、分離大豆たん白質の酵素消化物に存在し、腸間膜を透過し易いジペプチド(Lys-Phe, Phe-AlaおよびPhe-Gly)について検討したが、実験4では培地総エステル化脂質、とくにTGへの取り込みは有意に減少した。さらに、高純度イソフラボン精製品、ソヤフラボンHG、サポニンを主成分とするソイヘルスSAについて検討した結果、 ^{14}C オレイン酸の培地中のエステル化脂質、とくにTGへの取り込みは、コントロール群に比べ、高純度イソフラボン群、およびソイヘルスSA群で減少

した。最後に3種類のジペプチドと高純度イソフラボンあるいはサポニンの組み合わせの影響を調べた。その結果、細胞あるいは培地脂質画分への ^{14}C オレイン酸の取り込みは、有意ではないが、イソフラボンあるいはサポニン単独で観察されるTG合成の抑制をさらに促進させるようであった。以上のことから、LD3あるいはF5で観察された肝臓TG濃度低下作用は、肝細胞における脂肪酸のエステル化系への取り込み減小と酸化系への代謝亢進により引き起こされている可能性が示され、さらに作用物質としてジペプチドとイソフラボンあるいはサポニンとの協力作用による可能性が考えられた。

文 献

- 1) 倉山貴行, 窄野昌信, 福田亘博 (2003): 水溶性大豆ペプチド画分の肝臓脂肪酸代謝改善作用—肝臓および血清トリグリセリド濃度低下作用—. 大豆たん白質研究, **6**, 83-87.
- 2) 松井利郎 (2003): 7Sグロブリンからの血圧低下ペプチドSVYの高度生成とその生理機能評価. 大豆たん白質研究, **6**, 73-77.
- 3) Folch J, Lees M and Sloane-Stanley GH (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, **226**, 497-509.
- 4) Peluso MR, Winters TA, Shanahan MF and Banz WJ (2000): A cooperative interaction between soy protein and its isoflavone-enriched fraction lowers hepatic lipids in male obese Zucker rats and reduces blood platelet sensitivity in male Sprague-Dawley rats. *J Nutr*, **130**, 2333-2342.
- 5) 有地 滋, 戸田静男 (1982): 大豆サポニンの血清脂質に対する効果. 基礎と臨床, **16**, 135.
- 6) 大久保一良, 高橋勝美 (1982): 大豆配糖体成分の化学と生理作用. 食品と開発, **17**, 30.
- 7) Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, Onoe Y, Sato T, Uchiyama Y, Ito M, Wang X, Suda T and Ikegami S (1999): Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology*, **140**, 1893-1900.
- 8) Wietrzyk J, Boratynski J, Grynkiewicz G, Ryszynski C and Opolski A (2001): Antiatherogenic and antitumor effects *in vivo* of genistein applied alone or combined with cyclophosphamide. *Anticancer Res*, **21**, 3893-3896.
- 9) Kumar NB, Cantor A, Allen K, Riccardi D and Cox CE (2002): The specific role of isoflavones on estrogen metabolism in premenopausal women. *Cancer*, **94**, 1166-1174.