

## \*高脂肪食飼育ラットの脂質代謝におよぼす ショウガ粉末の影響

谷 由美子・国松 己歳\*

Effect of Ginger (*Zingiber Officinale*) on Lipid Metabolism in Rats  
Fed a High-Fat Plus High-Cholesterol Diet

Yumiko TANI and Mitoshi KUNIMATSU

### 緒 言

ショウガ (*Zingiber Officinale*) は熱帯アジア原産で、古くから香辛料や生薬として利用されてきた。その辛味成分はジンゲロール、ショウガオール、ジンゲロンであり消炎鎮痛、解熱、殺菌、整腸、新陳代謝亢進作用<sup>1, 2)</sup>などの生理作用が知られている。辛味成分の化学構造はバニリルケトンの基本骨格に直鎖アルデヒドがアルドール縮合したものである。これはトウガラシの辛味成分のカプサイシンと化学構造が類似していて、いずれもバニリル基をもっている (Fig 1)。トウガラシの生理作用として、体熱産生、脂質代謝亢進、食欲増進、抗酸化、発汗作用など<sup>3)</sup>多くが知られている。そして脂質代謝改善作用については、血清コレステロール低下<sup>4-6)</sup>、血清トリグリセリドの低下<sup>4, 6-8)</sup>、肝臓トリグリセリドの低下<sup>8)</sup>などの報告があり、その機構は副腎からのアドレナリンの分泌の増加によることが明らかになっている<sup>9)</sup>。著者らも前回トウガラシの脂溶性分画による血清脂質の改善、肝臓総脂質の低下、アセチルCoAカルボキシラーゼ (ACC) および脂肪酸合成酵素 (FAS) 活性の低下などを認めた<sup>10)</sup>。従って、化学構造が類似しているショウガの辛味成分についても、同様の脂質代謝改善効果が期待される。しかしショウガ抽出物による血清<sup>11-14)</sup>および肝臓コレステロール<sup>13, 14)</sup>の低下作用については報告があるが、詳細な研究は少ない。

そこで本研究において、血清および肝臓脂質ならびに脂質代謝系酵素活性におよぼすショウガ粉末の添加量の影響を検討した。また歯磨き粉やソースなど調味料に添加されているショウガのヘキササン抽出物の作用についても検討した。

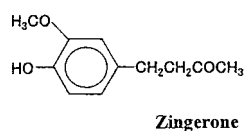
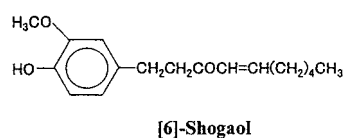
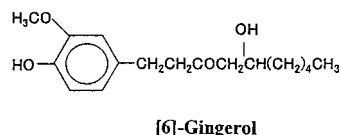
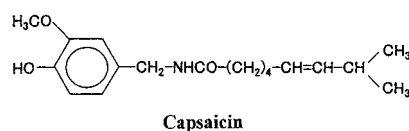


Fig 1 Chemical structure of major ginger phenolics and capsaicin

\*名古屋市立大学医学部生化学2

## 実験方法

### 1. 動物飼育法

9週齢(体重260~290g)のWistar系雄ラット(日本エスエルシー1)24匹を用い、対照群、0.5%ショウガ群(以下0.5%群と略記)、1.5%ショウガ群(以下1.5%群と略記)、ショウガ抽出物群(以下抽出物群と略記)の4群にわけ各群6匹とした。ラットは購入後3日間1日本クレア製の粉末飼料(CE-2)で予備飼育した後、対照群にはTable 1に示したコレステロール添加高脂肪食を投与し、0.5%群、1.5%群は対照群の飼料に各々ショウガ粉末(ライオン1製)を0.5%、1.5%加え、コーンスターチで100%に調整した飼料を、そして抽出物群は対照群の飼料にショウガ抽出物を0.021%加えた飼料(ショウガ粉末1%に相当)を与えて、ペアフィーディングで8週間飼育した。飲水は各群とも自由摂取とした。

ショウガ粉末は、中国山東省産の黄色大ショウガを熱風乾燥したものを使用し、ショウガ抽出物はこの粉末をヘキササン抽出したもので、収量は2.13%、ショウガオール698ppm、ジンゲロール530ppm(HPLC法)含有していた。

飼育環境および方法は前報<sup>10)</sup>と同様である。飼育終了後一夜絶食させ、エーテル麻酔下で解剖採血し、肝臓、腹腔脂肪(腎臓周囲および後腹壁脂肪)、副睾丸周囲脂肪(睾丸、副睾丸周囲脂肪)を摘出して重量を測定し、体重比率で示した。血清の総コレステロール(以下T-cholと略記)、HDL-コレステロール(以下HDL-cholと略記)、トリグリセリド(以下TGと略記)を測定し、動脈硬化指数 $[(T\text{-chol} - \text{HDL-chol}) / \text{HDL-chol}]$ を算出した。肝臓は総脂質(以下TLと略記)、Chol、TGおよび脂肪酸合成酵素活性(以下FASと略記)、アセチルCoAカルボキシラーゼ活性(以下ACCと略記)、肝トリグリセリドリパーゼ活性(以下HTGLと略記)の測定に供した。また腹腔脂肪組織のリポタンパク質リパーゼ活性(以下LPLと略記)も測定した。糞はコレステロール排泄量の測定に用いた。

### 2. 血清脂質の分析

測定法は前報<sup>15)</sup>と同様である。

### 3. 肝臓脂質の分析

測定法は前報<sup>15)</sup>と同様である。

### 4. 肝臓の脂質代謝系酵素活性の測定

FASはNepokroeff et al.<sup>16)</sup>および仲佐ら<sup>17)</sup>の方法に準じて、ACC[EC 6.4.1.2.]はTanabe et al.<sup>18)</sup>および仲佐ら<sup>17)</sup>の方法に準じて、HTGL[EC 3.1.1.3.]はMorimoto et al.の方法<sup>19)</sup>で、いずれも前報<sup>10, 15)</sup>と同様に行った。

Table 1 Composition of control diet.

Ingredient	(%)
Corn starch <sup>1)</sup>	51.75
Casein <sup>1)</sup>	20
Lard <sup>2)</sup>	20
Cellulose <sup>1)</sup>	2
Mineral mixture <sup>3)</sup>	4
Vitamin mixture(AIN-76) <sup>4)</sup>	1
Cholesterol <sup>5)</sup>	1
Sodium cholate <sup>5)</sup>	0.25

1) Japan CLEA Co., Tokyo.

2) Yoneyama Reagent Industries Co., Osaka.

3) This is identical to Harper's mixture<sup>26)</sup>.

4) Oriental Yeast Co., Tokyo.

5) Kanto Chemical Co., Tokyo.

## 5. 脂肪組織のリポタンパク質リパーゼ活性の測定

LPL [ EC 3.1.1.34 ] はMasunoら<sup>20)</sup>の方法で測定した。すなわち脂肪組織に同量のアンモニア・ヘパリン緩衝液 (pH8.2) を加えて、37℃ で軽くホモジナイズしてその上清を酵素液とした。トリオレイン、3%BSA (牛血清アルブミン) 含有トリス塩酸緩衝液 (pH8.2)、不活性化した絶食ラット血清 (アポC- 源) からなる混合基質を37℃ で20分間活性化し、これに酵素液を加えて37℃ で60分間反応させた。生成した脂肪酸をクロロホルム・ヘプタン・メタノール混液 (98:98:4) で抽出し、これに銅試薬を加えて錯塩とした後バソクプロイン法で測定した。酵素活性は60分間に生成するオレイン酸の $\mu\text{Eq}$ で示した。酵素液のタンパク質濃度はいずれもPierce製のBCA protein assay reagentを使用して測定した。

## 6. 糞中コレステロールの測定

Zak-Henly法<sup>21)</sup>で前報<sup>15)</sup>と同様に測定した。

## 7. 統計処理

データはANOVAとDuncanのMultiple range testにより群間の有意差 ( $p < 0.05$ ) 検定を行った。

## 実 験 結 果

### 1. 体重増加率、腹腔脂肪率、副睾丸周囲脂肪率におよぼすショウガ投与の影響

各群間で平均飼料摂取量は差がなかったが、体重増加率は対照群に比べて試験群はいずれも有意に低下し、抽出物群が最も低値を示した。腹腔脂肪率は対照群に比べて1.5%群と抽出物群で低下し、副睾丸周囲脂肪率も有意差はなかったが同様の傾向を示した (Table 2)。

### 2. 血清脂質におよぼすショウガ投与の影響

Table 3 に示したとおり、対照群に比べていずれの試験群もT-choI, TG, 動脈硬化指数が低下し、HDL-choIは上昇してショウガ投与によって血清脂質の改善が認められた。特に抽出物群の改善が著しく、ショウガの投与量と血清脂質レベルとの関連は認められなかった。

### 3. 肝臓脂質および糞中コレステロール排泄率におよぼすショウガ投与の影響

対照群に比べていずれの試験群もTLおよびCholが増加し、TGは0.5%群のみ増加した (Table 4)。糞中コレステロール排泄率は群間に差がなかった (Table 5)。

Table 2 Effects of ginger on food intake, body weight gain and abdominal adipose tissue rate.

Group	Food intake (g/day)	Body weight gain <sup>1)</sup> (%)	Perirenal fat tissue <sup>2)</sup> (%)	Epididymal fat tissue <sup>2)</sup> (%)
Control	17.8 ± 0.3 a	181 ± 9 a	1.8 ± 0.4 a	1.6 ± 0.2 ab
0.5% ginger	17.6 ± 0.8 a	159 ± 1 b	1.5 ± 0.3 ab	1.7 ± 0.3 a
1.5% ginge	17.6 ± 0.6 a	154 ± 6 b	1.1 ± 0.2 b	1.2 ± 0.2 b
Ginger extract	17.6 ± 0.2 a	143 ± 3 c	1.1 ± 0.3 b	1.3 ± 0.1 ab

Each value is the mean ± SE for 6 rats. 1) Expressed as % of the initial weight.

2) Rate to the final body weight. Values in the same column without common superscript letter are significantly different a  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

Table 3 Effects of ginger on serum lipids concentration.

Group	Total-cholesterol (mg/dl)	HDL-cholesterol (mg/dl)	Arteriosclerosis index <sup>1)</sup>	Triglycerides (mg/dl)
Control	118.7 ± 12.4 a	23.3 ± 3.2 a	4.3 ± 1.3 a	47.2 ± 4.7 a
0.5% ginger	102.4 ± 14.2 b	29.2 ± 4.3 b	2.4 ± 0.7 b	42.1 ± 2.5 b
1.5% ginger	94.0 ± 9.4 bc	30.9 ± 1.9 b	2.1 ± 0.3 b	40.7 ± 2.2 b
Ginger extract	81.6 ± 6.9 c	32.8 ± 5.3 b	1.6 ± 0.4 b	26.1 ± 1.3 c

1) (Total cholesterol - HDL cholesterol)/HDL cholesterol.

Each value is the mean ± SE for 6 rats. Values in the same column without common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

Table 4 Effects of ginger on liver lipids content.

Group	Total lipid (g/100g)	Cholesterol (g/100g)	Triglyceride (g/100g)
Control	29.4 ± 1.9 a	9.5 ± 0.4 a	6.6 ± 1.1 a
0.5% ginger	33.1 ± 2.2 b	11.1 ± 0.7 b	10.3 ± 0.7 b
1.5% ginger	32.1 ± 1.1 b	14.9 ± 0.5 c	6.2 ± 0.6 a
Ginger extract	32.5 ± 2.1 b	13.4 ± 0.8 d	6.5 ± 0.6 a

Each value is the mean ± SE for 6 rats.

Values in the same column without common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

Table 5 Effects of ginger on feces weight and excretion of cholesterol to feces.

Group	Feces (g/3 days)	Cholesterol excretion rate (%)
Control	3.6 ± 0.2 a	48.0 ± 2.1 a
0.5% ginger	3.6 ± 0.3 a	47.4 ± 2.2 a
1.5% ginger	3.4 ± 0.7 a	45.0 ± 1.1 a
Ginger extract	3.5 ± 0.3 a	48.1 ± 4.0 a

Each value is the mean ± SE for 6 rats.

Values in the same column without common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

#### 4. 脂質代謝系酵素活性におよぼすショウガ投与の影響

脂肪酸合成系酵素のACCとFASの測定結果をTable 6に示した。対照群に比べて0.5%群はACCは上昇しFASは低下、1.5%群はいずれも差がなく、抽出物群はACCは低下しFASは上昇してショウガ投与による明らかな影響はみられなかった。

HTGLは活性化にアポC- を必要とせず、また高濃度の塩やプロタミンで活性が抑制されな

Table 6 Effects of ginger on the activities of FAS, ACC and HTGL in liver.

Group	ACC (unit/mg protein) × 10 <sup>-2</sup>	FAS (unit/mg protein) × 10 <sup>-3</sup>	HTGL (μ Eq/mg protein) × 10 <sup>-2</sup>
Control	5.9 ± 0.5 a	1.6 ± 0.2 a	10.1 ± 2.1 a
0.5% ginger	6.9 ± 0.4 b	1.2 ± 0.2 b	8.4 ± 0.8 b
1.5% ginger	5.5 ± 0.5 a	1.7 ± 0.1 a	4.4 ± 1.6 c
Ginger extract	4.9 ± 0.3 c	2.1 ± 0.1 c	5.9 ± 1.1 c

Each value is the mean ± SE for 6 rats. Values in the same column without common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Abbreviations : ACC, acetyl CoA carboxylase : FAS, fatty acid synthetase : HTGL, hepatic triglyceride lipase.

Table 7 Effects of ginger on the activity of LPL in fat tissue.

Group	LPL (μ Eq/fat tissue)	LPL (μ Eq/mg protein)
Control	15.3 ± 4.4 a	0.12 ± 0.02 a
0.5% ginger	6.7 ± 2.1 b	0.32 ± 0.09 b
1.5% ginger	3.5 ± 0.9 b	0.17 ± 0.04 ac
Ginger extract	3.1 ± 1.7 b	0.24 ± 0.09 bc

Each value is the mean ± SE for 6 rats. Values in the same column without common superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Abbreviations : LPL, lipoprotein lipase.

いなどLPLと相違した点があるが、血中のTGを取り込んで分解する作用はLPLと類似している。この酵素活性が試験群でいずれも低下した (Table 6)。

脂肪組織のLPLの総脂肪組織当たりは、試験群でいずれも低下し、タンパク質当たりでは0.5%群と抽出物群は上昇し、1.5%群は上昇傾向がみられた (Table 7)。

## 考 察

ショウガは多くの薬効をもつため古くから漢方薬の原料として使用されてきた。そしてその薬効の作用機構については、セロトニンの作用抑制による嘔吐の阻止<sup>2)</sup>やトロンボキサン、プロスタグランジンの作用抑制による鎮痛、抗炎症、解熱<sup>22)</sup>などが知られている。しかしショウガの辛味成分であるジンゲロール、ショウガオール、ジンゲロンの化学構造が、脂質代謝改善作用のよく知られているトウガラシの辛味成分であるカプサイシンと類似しているにもかかわらず、脂質代謝への影響があまり明らかにされていない。また、一般にヒトの摂取形態である食品としてのショウガについての報告はほとんどなく、ショウガ抽出物の作用についての研究が主である。そこで本研究ではショウガの乾燥粉末ならびにヘキサン抽出物をラットに投与して、脂質代謝におよぼす影響を検討した。

飼育はペアフィーディングで行ったため、平均飼料摂取量は群間に差がなかったが、いずれの試験群も体重増加率は低下し、腹腔脂肪率は低下または低下傾向を示し、副睾丸周囲脂肪率も低下傾向を示してショウガ投与によって脂肪の蓄積抑制による減量効果が認められた。Kawada et al.<sup>23)</sup>がジングロン投与によって、カプサイシンよりレベルは低いがエピネフリンの分泌亢進を認めていることから、脂肪組織からの脂肪の動員が促進したものと思われる。

ショウガ抽出物投与による血中T-cholの低下作用については報告が多く<sup>11-14)</sup>本研究も同様の結果となった。Tanabeら<sup>12)</sup>は、ショウガ主成分によるChol生合成の抑制を、Srinivasanら<sup>24)</sup>はショウガ粉末投与によるCholの胆汁酸への異化亢進とともにChol生合成の亢進を報告している。ショウガの消化液分泌促進作用は古くから知られているが、それとともに胆汁の排出も亢進し<sup>22)</sup>、これが血中Chol低下に関連していると思われる。糞中へのChol排泄率は、本研究においてはショウガ投与によって影響されなかったが、Sharmaら<sup>13)</sup>は排泄率の上昇を認めている。しかし彼らはウサギを使用し、ショウガ抽出物を本研究の約40倍くらい(純度が同じとすると)与えているため結果が相違したものと思われる。血中脂質については、ショウガ投与によってHDL-cholは上昇してT-chol、TGおよび動脈硬化指数が低下し、明らかに動脈硬化抑制効果がみられた。その作用とショウガの投与量の関連は認められなかったが、抽出物群が最も改善効果が著しかった。ジングロンは投与1時間後に96.5%吸収されることが知られており<sup>25)</sup>、抽出物群はヘキサン抽出物をショウガ粉末に換算して1%と同等の量を添加したのだが、ショウガ粉末より吸収率が高かったことも考えられる。

ショウガ投与による脂肪酸合成系(ACC, FAS)への影響はみられなかったが、HTGLが低下、すなわち血中TGの肝臓への取り込みが低下した。一方ショウガ投与によって肝臓のTL, Cholは増加したことから、肝臓からの脂質の搬出が抑制されたことが推察される。これはトウガラシの辛味成分であるカプサイシンが肝臓脂質の放出を促進する<sup>8)</sup>ことと相違する。脂肪組織のLPLは総脂肪組織当たりではショウガ投与によって低下した。このことが腹腔脂肪率の低下に関連していると思われる。HTGL、脂肪組織のLPLの低下にもかかわらず血清TGがショウガ投与によって低下したことは、カプサイシン<sup>8)</sup>と同様に骨格筋のLPL活性の亢進が推察される。

ショウガ投与によって、カプサイシンと同様に血中脂質の明らかな改善作用が認められたが、ショウガ粉末の投与量との関連はみられなかった。一方肝臓脂質に蓄積傾向がみられ、その原因の検討が今後の課題である。

## 要 約

9週齢のWistar系雄ラット24匹を対照群(コレステロール添加高脂肪食)、0.5%ショウガ群、1.5%ショウガ群、ショウガ抽出物群の4群に分け、ペアフィーディングで8週間飼育した。試験群は対照群の飼料にショウガ粉末を0.5%、1.5%およびショウガのヘキサン抽出物を0.021%(ショウガ粉末1%に相当)添加した飼料を投与した。飼育終了後解剖して血清および肝臓脂質の定量、肝臓の脂肪酸合成系酵素活性、脂肪組織のリポタンパク質リパーゼ活性を測定した。

- 1) 対照群に比べて試験群で体重増加率が低下し、腹腔脂肪率、副睾丸周囲脂肪率も低下または低下傾向がみられた。
- 2) 対照群に比べて試験群で、血清総コレステロール、トリグリセリド、動脈硬化指数が低下、HDL-コレステロールは上昇して血清脂質の改善が認められたが、ショウガ投与量との関連はみられなかった。

- 3) ショウガの投与によって肝臓の脂肪酸合成系は影響されなかったが、血清トリグリセリドの肝臓および脂肪組織への取り込みは低下した。
- 4) ショウガ投与によって肝臓脂質の蓄積傾向が認められ、その原因を検討する必要がある。

## 文 献

- 1) 吉川雅之：薬用食物にみる生理作用 ショウガ，食品と科学，41，40 - 43 (1999)
- 2) Stephen Fulder，寺西のぶ子訳：ショウガは効く，p111，106，晶文社(1999)
- 3) 岩井和夫，渡辺達夫：辛味成分の生理作用，トウガラシ 辛味の科学，p148 - 228，幸書房(2000)
- 4) Monsereenusorn Y：Subchronic toxicity studies of capsaicin and capsicum in rats. *Res. Commun Chem Pathol Pharmacol*，41，95 - 110 (1983)
- 5) Ki P, Negulesco J A and Murnane M：Decreased total serum, myocardial and aortic cholesterol levels following capsaicin treatment. *IRCS Med Sci Libr Compend*，10，446 - 447 (1982)
- 6) Negulesco J A, Lohse C L, Hrabovsky E E, Boggs M T and Davis D H：Dihydrocapsaicin (DC) protects against serum hyperlipidemia in guinea pigs fed a cholesterol-enriched diet. *Artery*，16，174 - 188 (1989)
- 7) Kawada T, Hagihara K and Iwai K：Effects of capsaicin on lipid metabolism in rats fed a high fat diet., *J Nutr*，116，1272 - 1278 (1986)
- 8) Srinivasan M R and Satyanarayana M N：Effect of capsaicin on skeletal muscle lipoprotein lipase in rats fed high fat diet. *Indian J Exp Biol*，27，910 - 912 (1989)
- 9) Watanabe T, Kawada T, Yamamoto M and Iwai K：Capsaicin, a pungent principle of hot red pepper, evokes catecholamine secretion from the adrenal medulla of anaesthetized rats. *Biochem Bioshys Res Commun*，142，259 - 264 (1987)
- 10) 谷由美子，国松己蔵：トウガラシの脂溶性分画によるコレステロール添加高脂肪食飼育ラットの脂質代謝改善作用，名古屋女子大学紀要(家政・自然編)，48，35 - 41 (2002)
- 11) Fuhrman B, Rosenblat M, Hayek T, Coleman R and Aviram M：Ginger extract consumption reduces plasma cholesterol, inhibits LDL oxidation and attenuates development of atherosclerosis in atherosclerotic, apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr*，130，1124 - 1131 (2000)
- 12) Tanabe M, Chen Y-D, Saito K and Kano Y：Cholesterol biosynthesis inhibitory component from *Zingiber officinale* Roscoe. *Chem Pharm Bull*，41，710 - 713 (1993)
- 13) Sharma I, Gusain D and Dixit V P：Hypolipidaemic and antiatherosclerotic effects of *Zingiber officinale* in cholesterol fed rabbits. *Phytotherapy Res*，10，517 - 518 (1996)
- 14) Bhandari U, Sharma J N and Zafar R：The protective action of ethanolic ginger (*Zingiber officinale*) extract in cholesterol fed rabbits. *J Ethnopharmacology*，61，167 - 171 (1998)
- 15) 辻原命子，谷由美子：高脂肪高コレステロール食飼育ラットの脂質代謝におよぼすユッカサニンおよびコンニャク精粉の影響，栄養食糧学会誌，51，157 - 163 (1998)
- 16) Nepokroeff C M, Lakshmanan M R and Porter J W：Fatty acid synthase from rat liver：Method in *Enzymology* (Lowenstein J M ed) Vol 35, p37-44, Academic Press (1975)
- 17) 仲佐輝子，山口真由美，沖中靖，目鳥幸一，高橋周士：高脂肪高コレステロール食投与ラットの血漿および肝臓中の脂質におよぼす杜仲茶抽出物の影響，日本農芸化学会誌，69，1491 - 1498 (1995)
- 18) Tanabe T, Nakanishi S, Hashimoto T, Ogiwara H, Nikawa J and Numa S：Acetyl-CoA carboxylase from rat liver：Methods in *Znzymology* (Lowenstein J M ed) Vol71, p5 - 16, Academic Press (1981)
- 19) Morimoto C, Tsujita T and Okuda H：Norepinephrine-induced lipolysis in rat fat cells from visceral and subcutaneous sites：role of hormone- sensitive lipase and lipid droplets. *J Lipid Res*，38，132 - 138 (1997)

- 20) Masuno H, Blanchette-Mackie E J, Chernick S S and Scow R O : Synthesis of inactive nonsecretable high mannose- type lipoprotein lipase by cultured brown adipocytes of combined lipase -deficient cld/cld mice. *J Biol Chem* , **265** , 1628 - 1638 ( 1990 )
- 21) 上田英夫：臨床検査法，p398，杏林書院（1969）
- 22) 大澤俊彦，井上宏生：スパイスには病気を防ぐこれだけの効果があった，p39，64 廣濟堂出版（1999）
- 23) Kawada T, Sakabe S, Watanabe T, Yamamoto M and Iwai K : Some pungent principles of spices cause the adrenal medulla to secrete catecholamine in anesthetized rats. *Proc Soc Exp Biol Med* , **188** , 229 - 233 ( 1988 )
- 24) Srinivasan K and Sambaiah K : The effect of spices on cholesterol 7 -hydroxylase activity and on serum and hepatic cholesterol levels in the rat. *Internat J Vit Nutr Res* , **61** , 364 - 369 ( 1991 )
- 25) 岩井和夫，中谷延二：香辛料成分の食品機能，p104，光生館（1989）
- 26) Harper A E : Amino acid balance and imbalance, . Dietary levels of protein and amino acid imbalance. *J Nutr* , **68** , 405 - 418 ( 1959 )