

低鉄飼料投与ラットにおけるマンガンの臓器蓄積

由上文子, 津本真也, 齊悦, 細見亮太,
福永健治, 吉田宗弘

(関西大学化学生命工学部栄養化学・食品化学研究室*)

(受付 2017年9月1日, 受理 2017年10月4日)

Accumulation of Manganese in Organs of Rats Fed a Low Iron Diet

Ayako YUKAMI, Shin'ya TSUMOTO, Yue Qi, Ryota HOSOMI,

Kenji FUKUNAGA and Munehiro YOSHIDA

*Laboratory of Food and Nutritional Sciences, Faculty of Chemistry,
Materials and Bioengineering, Kansai University**

Summary

Manganese (Mn) concentration in organs of rats fed a low iron (Fe) diets was examined. Male 4-week-old Wistar rats were divided into 4 groups. In experiment 1, one group was fed AIN93G diet (Fe, 35 $\mu\text{g/g}$; Mn, 10 $\mu\text{g/g}$) and other 3 groups were fed a low Fe diet (Fe, 10 $\mu\text{g/g}$; Mn, 10 $\mu\text{g/g}$), a low Mn diet (Fe, 35 $\mu\text{g/g}$; Mn, 0.45 $\mu\text{g/g}$) or the low Fe diet with low Mn (Fe, 10 $\mu\text{g/g}$; Mn, 0.45 $\mu\text{g/g}$) for 4 weeks. In experiment 2, one group was fed AIN93G diet (Fe, 35 $\mu\text{g/g}$; Mn, 10 $\mu\text{g/g}$) and other 3 groups were fed the low Fe diet (Fe, 10 $\mu\text{g/g}$; Mn, 10 $\mu\text{g/g}$), a high Mn diet (Fe, 35 $\mu\text{g/g}$; Mn, 40 $\mu\text{g/g}$) or the low Fe diet with high Mn (Fe, 10 $\mu\text{g/g}$; Mn, 40 $\mu\text{g/g}$) for 4 weeks. The low Mn diets decreased Mn in liver, kidney, spleen, brain and femur. The high Mn diet did not elevate Mn in liver, kidney and spleen; only brain Mn was increased. When rats were fed the diets containing low (0.45 $\mu\text{g/g}$) or normal level of Mn (10 $\mu\text{g/g}$), the low Fe diets increased Mn in the all organs. However, rats were fed the diets containing high Mn (40 $\mu\text{g/g}$), only liver Mn was increased by the low Fe diets. When rats were fed the diets containing normal level of Fe (35 $\mu\text{g/g}$), the high Mn diet decreased Fe in the liver and brain. These results indicate that effect of a low Fe status on tissue Mn accumulation was dependent to Mn intake; the effect is remarkable in the case of a low Mn intake, but the effect is not obvious in the case of a high Mn intake.

マンガンはアルギナーゼやマンガンスーパーオキシドジスムターゼ (MnSOD) などの酵素にとって活性発現に必須の構成要素である¹⁾。なかでも MnSOD をノックアウトした実験動物が致死であることから、マンガンは高等動物にとって必須の微量元素であると理解されている²⁾。マンガンは穀物、豆類、野菜類などに豊富に含まれているため、動物性食品ではなく植物性食品が供給源となっている³⁾。このため、一般成人のマンガン摂取量が 3~4 mg/日であるのに対して⁴⁾、菜食主義者のマンガン摂取量は 10 mg/日前後に達すると報告されている⁴⁻⁶⁾。

このようにマンガンは栄養上必須の元素であるが、マンガニオンに活性酸素産生増加を介したアポトーシスを惹起する性質があるため⁷⁾、組織に過剰に蓄積した場合には重篤な疾患を引き起こすことがある。とくに脳への過剰蓄積は、マンガン脳症とも呼ばれる中枢神経障害を起こすこ

とが知られている⁸⁾。また原因不明の神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) にマンガンが関わる可能性も指摘されている⁹⁾。食事に含まれるマンガンの消化管吸収率が数%未満であるため¹⁰⁾、ヒトのマンガン中毒は、鉱山、金属精錬、金属加工などの職場においてマンガンを含む粉塵を吸入した事例が多い^{8,11)}。しかし、高濃度のマンガンに汚染された井戸水を飲用したために発生したマンガン中毒も報告されている¹¹⁾。一方、1日摂取量の約3分の1に相当する 1.1 mg/日のマンガンを添加した高カロリー輸液を用いた中心静脈栄養療法を3ヶ月実施した症例では、脳の MRI 画像に大脳基底核へのマンガン蓄積を示唆する所見などが認められている^{12,13)}。したがって、マンガンが 1 mg/日以上吸収されれば中毒につながるリスクがあるといえる。

二価鉄イオンを小腸粘膜細胞に取り込むさいの担体であ

*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

る Divalent metal transporter 1 (DMT1) はマンガンイオンにも作用することが知られている¹⁴⁾。鉄の摂取量が少ない状況では DMT1 の発現量が増加するため、食事中マンガンの吸収量が増加する¹⁵⁾。事実、鉄欠乏性貧血の小児においては、全血のマンガンの濃度が上昇することが知られている¹⁶⁾。このことは、鉄欠乏性貧血を伴う疾患の場合にはマンガンの中毒に注意する必要があることを示している。本研究では、鉄およびマンガンの含有量の異なる飼料を投与したときの臓器中マンガンの濃度を観察し、鉄欠乏がマンガンの中毒を引き起こす要因になるのかを考察した。あわせて、マンガンの過剰投与の鉄吸収に及ぼす影響についても検討した。

実験方法

1. 実験動物の飼育

実験 1：4 週齢の Wistar 系雄ラット 24 匹（体重、85.2 ± 3.8（平均値 ± 標準偏差）g）を 6 匹ずつ 4 群に分け、1 つの群（対照（C1）群）には鉄をクエン酸第二鉄として 35 μg/g、マンガンを炭酸マンガンを 10 μg/g 含有する AIN93G 飼料¹⁷⁾を与えた。他の 3 つの群は、順に低鉄（LF1）群、低マンガンの（LM）群、低鉄低マンガンの（LFLM）群とし、それぞれ、AIN93G の鉄濃度を 10 μg/g まで減じた低鉄飼料、AIN93G 飼料のミネラル配合から炭酸マンガンを除去した低マンガンの飼料（マンガンの濃度、0.45 μg/g）、低鉄低マンガンの飼料を与えた。実験飼料投与開始 4 週間後、すべてのラットをイソフルランで麻酔処理し、肝臓、腎臓、脾臓、脳、および大腿骨を摘出した。

実験 2：4 週齢の Wistar 系雄ラット 24 匹（体重、84.1 ± 4.8（平均値 ± 標準偏差）g）を 6 匹ずつ 4 群に分け、1 つの群（対照（C2）群）には AIN93G 飼料を与えた。他の 3 つの群は、順に低鉄（LF2）群、高マンガンの（HM）群、低鉄高マンガンの（LFHM）群とし、それぞれ、実験 1 と同じ低鉄飼料、AIN93G 飼料の炭酸マンガンを増量してマンガンの濃度を 40 μg/g とした高マンガンの飼料、低鉄高マンガンの飼料を与えた。実験飼料投与開始 4 週間後、すべてのラットを処理し、肝臓、腎臓、脾臓、および脳を摘出した。

なお、以上の動物実験は関西大学化学生命工学部動物実

験委員会の承認のもとに実施した。

2. 摘出臓器の分析

摘出した臓器は生理食塩水で十分に洗浄後、秤量し、肝臓は約 1 g、腎臓は片方すべて、脾臓、脳、大腿骨は摘出したものすべてを 30 mL ケルダールフラスコに入れ、濃硝酸を約 10 mL 加えて、固形物が無くなるまで加熱した。加熱終了後、純水で適宜希釈し、鉄およびマンガンの測定用の試料溶液とした。試料溶液中の鉄は原子吸光度計（島津 AA-7000）、マンガンは誘導結合プラズマ質量分析器（ICPMS、島津 ICPM8500）で定量した。ICPMS におけるマンガンの分析質量数は 55 とし、内部標準にはロジウム（質量数 103）を用いた。なお、臓器中鉄とマンガンの値は臓器グラム当たりの含量で示した。

3. 統計解析

分析値に及ぼす飼料中鉄濃度とマンガンの濃度の影響は、二元配置分散分析（Two-way ANOVA）を用いて検討した。飼料中鉄濃度とマンガンの濃度の交互作用が有意（ $p < 0.05$ ）の場合、Turkey-Kramer の多重比較を用いて実験群間の平均値の差を検定した。以上の統計解析には、統計プログラムパッケージである StatView-J（ver. 5.0）を用いた。

結果

1. 実験 1

飼育期間終了後の各群ラットの体重および臓器重量には差がなかった（24 匹すべての体重の平均値 ± 標準偏差、290 ± 6.3 g）。

実験飼料投与開始 4 週間後の各群ラットの臓器中鉄濃度を Table 1 にまとめた。低鉄飼料の投与は、測定したすべての臓器において、マンガンの投与水準とは無関係に、鉄濃度を有意（ $p < 0.05$ ）に低下させた。一方、低マンガンの飼料の投与は、臓器ごとに異なる結果を与えた。脳では、鉄投与水準とは無関係に、低マンガンの飼料投与によって鉄濃度が増加した。これに対して、腎臓では、低マンガンの飼料を投与すると、鉄投与とは無関係に有意（ $p < 0.05$ ）に低

Table 1 Iron contents in various organs of rats in Experiment 1

Group	Dietary level		Iron content (μg/g)				
	Iron	Manganese	Liver	Kidney	Spleen	Brain	Femur
C1	Adequate	Adequate	111.8 ± 5.4	61.2 ± 2.1	159 ± 14	16.7 ± 1.2	52.1 ± 7.2
LF1	Low	Adequate	29.2 ± 2.2	32.8 ± 2.7	80 ± 4	13.7 ± 0.9	20.4 ± 1.0
LM	Adequate	Low	115.5 ± 10.8	48.7 ± 4.7	172 ± 12	19.8 ± 0.7	47.9 ± 4.0
LFLM	Low	Low	27.4 ± 3.2	31.4 ± 2.5	78 ± 7	15.3 ± 0.7	21.4 ± 2.0
Two way ANOVA							
Dietary iron level			$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
Dietary manganese level			NS	$p = 0.041$	NS	$p = 0.019$	NS
Iron x manganese			NS	NS	NS	NS	NS

Values are means ± SEM (n = 6).

い鉄濃度が認められた。また、肝臓、脾臓、大腿骨鉄濃度においては低マンガン飼料投与の影響を認めなかった。

実験1における各群ラットの臓器中マンガン濃度を Table 2 にまとめた。低マンガン飼料の投与は、いずれの臓器においても、鉄投与水準とは無関係に、マンガン濃度を有意に ($p < 0.05$) 低下させた。一方、低鉄飼料の投与は、マンガン投与水準とは無関係に、腎臓、脾臓、大腿骨のマンガン濃度を増加させた。しかし、肝臓では、低鉄飼料投与による臓器中マンガン濃度の増加は、低マンガン飼料を与えた LFLM 群にのみ認められた。また、脳のマンガン濃度には低鉄飼料投与の影響は明確でなかった。

2. 実験 2

実験2における各群ラットの臓器中鉄濃度を Table 3 にまとめた。実験1と同様に、低鉄飼料の投与は、測定したすべての臓器において、マンガン投与水準とは無関係に、鉄濃度を有意 ($p < 0.05$) に低下させた。一方、高マンガン飼料の投与は、鉄投与水準が適正 (35 $\mu\text{g/g}$) な場合に臓器中鉄濃度を低下させる傾向を示し、とくに肝臓と脳では AIN93G 飼料を与えた C2 群と高マンガン飼料を与えた HM 群との間に有意差 ($p < 0.05$) を認めた。しかし、鉄投与水準が低い場合には、いずれの臓器においても、鉄濃度に対する高マンガン飼料投与の影響は明確でなかった。

実験2における各群ラットの臓器中マンガン濃度を

Table 4 にまとめた。高マンガン飼料の投与によって臓器中マンガン濃度が有意 ($p < 0.05$) に上昇したのは脳の HM 群のみであり、他では認められなかった。一方、低鉄飼料投与は、マンガン投与水準とは無関係に肝臓のマンガン濃度を有意 ($p < 0.05$) に上昇させた。しかし、脳では、マンガン投与水準が対照 (C2) 群と同じ 10 $\mu\text{g/g}$ である LF2 群においてのみ、低鉄飼料投与によってマンガン濃度が増加した。また、腎臓と脾臓では、鉄投与水準の違いは臓器マンガン濃度に影響を与えなかった。

考 察

今回の研究で用いた低マンガン飼料、AIN93G 飼料、高マンガン飼料のマンガン濃度は、それぞれ 0.45、10、40 $\mu\text{g/g}$ である。AIN93G 飼料からのマンガン摂取量を栄養上適正なものと考え、低マンガン飼料はその 20 分の 1 未満、高マンガン飼料は約 4 倍量となる。一般的な日本人のマンガン摂取量が 3 ~ 4 mg/日、菜食主義者のマンガン摂取量が 10 mg/日近くに及ぶこと³⁻⁶⁾ を考えると、今回の低マンガン飼料は日常の食生活では起こり得ないほどの低マンガン摂取、高マンガン飼料は日常のマンガン摂取の上限にはほぼ匹敵するものと解釈できる。実験1において、低マンガン飼料の投与はすべての臓器においてマンガン濃度を低下させた (Table 2) が、実験2においては、

Table 2 Manganese contents in various organs of rats in Experiment 1

Group	Dietary level		Manganese content (ng/g)				
	Iron	Manganese	Liver	Kidney	Spleen	Brain	Femur
C1	Adequate	Adequate	2374 \pm 66 ^c	1196 \pm 21	380 \pm 23	399 \pm 19	508 \pm 50
LF1	Low	Adequate	2473 \pm 135 ^c	1309 \pm 19	417 \pm 7	390 \pm 10	668 \pm 41
LM	Adequate	Low	679 \pm 37 ^a	769 \pm 74	294 \pm 9	293 \pm 15	282 \pm 30
LFLM	Low	Low	1420 \pm 89 ^b	931 \pm 23	379 \pm 19	328 \pm 6	458 \pm 44
Two way ANOVA							
Dietary iron level			$p < 0.001$	$p = 0.003$	$p = 0.001$	NS	$p < 0.001$
Dietary manganese level			$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p = 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
Iron x manganese			$p = 0.002$	NS	NS	NS	NS

Values are means \pm SEM (n = 6).

^{a, b, c} Values in the same column not sharing a common superscript differ significantly ($p < 0.05$).

Table 3 Iron contents in various organs of rats in Experiment 2

Group	Dietary level		Iron content ($\mu\text{g/g}$)			
	Iron	Manganese	Liver	Kidney	Spleen	Brain
C2	Adequate	Adequate	116.9 \pm 13.8 ^c	61.4 \pm 4.0 ^b	177.3 \pm 13.1	14.2 \pm 0.3 ^c
LF2	Low	Adequate	18.9 \pm 1.4 ^a	28.5 \pm 0.9 ^a	67.2 \pm 3.0	10.7 \pm 0.3 ^a
HM	Adequate	High	67.8 \pm 5.9 ^b	55.3 \pm 2.1 ^b	140.8 \pm 14.6	12.9 \pm 0.4 ^b
LFHM	Low	High	22.3 \pm 0.5 ^a	33.0 \pm 0.6 ^a	73.7 \pm 3.9	11.4 \pm 0.2 ^a
Two way ANOVA						
Dietary iron level			$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p = 0.001$	$p < 0.001$
Dietary manganese level			$p = 0.006$	NS	NS	NS
Iron x manganese			$p = 0.002$	$p = 0.033$	NS	$p = 0.007$

Values are means \pm SEM (n = 6).

^{a, b, c} Values in the same column not sharing a common superscript differ significantly ($p < 0.05$).

Table 4 Manganese contents in various organs of rats in Experiment 2

Group	Dietary level		Manganese content (ng/g)			
	Iron	Manganese	Liver	Kidney	Spleen	Brain
C2	Adequate	Adequate	2208 ± 78	892 ± 48	216 ± 9	458 ± 6 ^a
LF2	Low	Adequate	2602 ± 54	919 ± 32	218 ± 9	523 ± 8 ^b
HM	Adequate	High	2345 ± 56	800 ± 43	206 ± 14	511 ± 13 ^b
LFHM	Low	High	2779 ± 117	934 ± 65	232 ± 2	528 ± 8 ^b
Two way ANOVA						
Dietary iron level			<i>p</i> < 0.001	NS	NS	<i>p</i> = 0.002
Dietary manganese level			NS	NS	NS	<i>p</i> = 0.005
Iron x manganese			NS	NS	NS	<i>p</i> = 0.015

Values are means ± SEM (n = 6).

^{a, b} Values in the same column not sharing a common superscript differ significantly (*p* < 0.05).

高マンガン飼料を投与しても肝臓、腎臓、脾臓では有意なマンガン濃度が認められなかった (Table 4)。このことから、日常のマンガン摂取の範囲であれば、臓器のマンガン濃度は大きく変化しないと考えることができる。ただし、脳では、鉄充足時に高マンガン飼料投与によってマンガン濃度が約 1 割増加していた。マンガンの脳蓄積が神経変性疾患の原因になることから^{7,8,11)}、菜食主義者のように日常的に食事摂取基準の上限量近くのマンガンを摂取し続けるケースは注意が必要かもしれない。

消化管における二価鉄の吸収に関わる DMT1 にマンガンを結合することから、鉄摂取量の減少に伴って DMT1 の発現量が増加すると、マンガン吸収量が増加して、体内のマンガンの増加することが指摘されている¹⁴⁻¹⁶⁾。今回の研究において、低鉄飼料の投与は、低マンガン飼料を投与していた場合には、脳以外の臓器でマンガン濃度を上昇させ (Table 2)、マンガン濃度が適正な AIN93G 飼料を投与していた場合には、実験 1 では腎臓、脾臓、大腿骨 (Table 2)、実験 2 では実験 1 で増加していなかった肝臓と脳のみでマンガン濃度を上昇させた (Table 4)。また、高マンガン飼料を投与していた場合に、低鉄飼料でマンガン濃度が上昇したのは肝臓のみだった (Table 4)。これらのことは、鉄の摂取量が少ない条件下においてマンガン吸収量の増加は確かに生じているが、この吸収量の増加が臓器マンガン濃度に及ぼす影響は、マンガン摂取量が少ない場合には大きい、マンガン摂取量そのものが多い時には小さいことを意味している。したがって、日常のマンガン摂取量の範囲であれば、鉄の摂取量が少ないことによってマンガン吸収量が増加したとしても毒性学的な意味を持つ可能性は低いと判断できる。

今回の研究において、マンガン摂取量の増減は臓器の鉄濃度を変動させていた。この中で、低マンガン摂取の影響は臓器ごとに低下と上昇の双方があり (Table 1)、再検討を要すると思われるが、高マンガン摂取は、鉄摂取が適正な場合には、いずれの臓器においても鉄濃度を低下させる傾向があり、鉄摂取が少ない場合には鉄濃度に影響を与えなかった (Table 3)。高マンガン飼料では、飼料中の鉄濃度が 35 µg/g、マンガン濃度が 40 µg/g でほぼ同水準であ

る。おそらく、DMT1 との結合において、鉄とマンガンの拮抗したことにより、結果として鉄の吸収量が減少したと思われる。鉄の摂取量が少ない場合に高マンガン摂取の影響が生じないのは、①鉄摂取量の減少に伴って DMT1 の発現量が増加しているため、マンガンによる拮抗阻害の影響が小さくなったこと、②低鉄摂取によって臓器鉄濃度がすでに十分に低下しており、マンガンによる鉄吸収量の減少が反映されにくい状況であったこと、の 2 つが関わると思われる。

マンガンは植物性食品に多く含まれており、植物性食品に偏った食事では摂取量が多くなる²⁻⁴⁾。このような食事では、鉄の摂取量が数値の上で十分であったとしても、マンガンのために鉄の吸収量が減少し、結果として鉄の摂取量の少ない食事をとったのと同じことになる。菜食主義者では鉄の摂取が十分であるにもかかわらず鉄欠乏が認められるとの報告があるが¹⁸⁾、菜食に伴うマンガンの多量摂取が関わっているのかもしれない。

参考文献

- 1) Brock AA, Chapman SA, Ulman EA, Wu G (1994) Dietary manganese deficiency decreases rat hepatic arginase activity. *J Nutr* 124: 340-344.
- 2) Huang TT, Carlson EJ, Kozy HM, Mantha S, Goodman SI, Ursel PC, Epstein CJ (2001) Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic Biol Med* 31: 1101-1110.
- 3) 吉田宗弘 (2013) マンガン, ヨウ素, セレン, クロム, モリブデン. 食品中の微量元素 — 必須元素から放射性核種まで —, 51-67, 日本食品衛生協会, 東京.
- 4) 菱田 明, 佐々木 敏 (監修) (2014), マンガン. 日本人の食事摂取基準 厚生労働省「日本人の食事摂取基準 (2015 年版)」策定検討会報告書, 303-305, 第一出版, 東京.
- 5) Gibson RS (1994) Content and bioavailability of trace elements in vegetarian diets. *Am J Clin Nutr*

- 59: 1223S–1232S.
- 6) Yoshida M, Ôgi N, Iwashita Y (2011) Estimation of mineral and trace element intake in vegans living in Japan by chemical analysis of duplicate diets. *Health* 3: 672–676.
 - 7) Zhang K, Zhu Y, Wang X, Zhao X, Li S, Teng X. (2017) Excess Manganese-Induced Apoptosis in Chicken Cerebrums and Embryonic Neurocytes. *Biol Trace Elem Res* *in press* (online 2017 Mar 30, DOI 10.1007/s12011-017-0992-4).
 - 8) Apaydin M, Erbas O, Taskiran D. (2016) Protection by Edaravone, a Radical Scavenger, against Manganese-Induced Neurotoxicity in Rats. *J Biochem Mol Toxicol* 30: 217–223.
 - 9) Kihara T, Sakurai I, Yoshida S, Wakayama Ikuro, Takamiya K, Okumura R, Inuma Y, Iwai K, Kajimoto Y, Hiwatani Y, Kohmoto J, Okamoto K, Kokubo Y, Kuzuhara S (2015) Neutron activation analysis of scalp hair from ALS patients and residents in the Kii Peninsula, Japan. *Biol Trace Elem Res* 164: 36–42.
 - 10) Finley JW, Caton JS, Zhou Z and Davison KL (1997) A surgical model for determination of true absorption and biliary excretion of manganese in conscious swine fed commercial diets. *J Nutr* 127: 2334–2341.
 - 11) Kondakis XG, Makris N, Leotsinidis M, Prinou M, Papapetropoulos T. (1989) Possible health effects of high manganese concentration in drinking water. *Arch Environ Health* 44: 175–178.
 - 12) Ejima A, Imamura T, Nakamura S, Saito H, Matsumoto K, Momono S (1992) Manganese intoxication during total parenteral nutrition. *Lancet* 339: 426–427.
 - 13) Nagatomo S, Umehara F, Hanada K, Nobuhara Y, Takenaga S, Arimura K, Osame M (1999) Manganese intoxication during total parenteral nutrition: report of two cases and review of the literature. *J Neurol Sci* 162: 102–105.
 - 14) Au C, Benedetto A, Aschner M (2008) Manganese transport in eukaryotes: the role of DMT1. *Neurotoxicology* 29: 569–576.
 - 15) Zhang H, Gilbert ER, Pan S, Zhang K, Ding X, Wang J, Zeng Q, Bai S (2016) Dietary iron concentration influences serum concentrations of manganese in rats consuming organic or inorganic sources of manganese. *Br J Nutr* 115: 585–593.
 - 16) Smith EA, Newland P, Bestwick KG, Ahmed N (2013) Increased whole blood manganese concentrations observed in children with iron deficiency anaemia. *J Trace Elem Med Biol* 27: 65–69.
 - 17) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993) AIN-93 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.
 - 18) Waldmann A, Koschizke JW, Leitzmann C, Hahn A (2004) Dietary iron intake and iron status of German female vegans: results of the German vegan study. *Ann Nutr Metab* 48: 103–108.