

フルクトース負荷インスリン抵抗性モデル（ラット）における Propolis による
インスリン抵抗性改善作用座間味義人,^a 高取真吾,^b 小山敏広,^a 合田光寛,^a
岩谷有希子,^a 土井志真,^c 川崎博己*,^a

Effect of Propolis on Insulin Resistance in Fructose-drinking Rats

Yoshito ZAMAMI,^a Shingo TAKATORI,^b Toshihiro KOYAMA,^a Mitsuhiro GODA,^a
Yukiko IWATANI,^a Shima DOI,^c and Hiromu KAWASAKI*,^a

^aDepartment of Clinical Pharmaceutical Science, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama City 700-8530, Japan, ^bPharmacology Department, Discovery Research Laboratories, Nippon Shinyaku Co., Ltd, 14 Nishinosho-Monguchi-cho, Minami-ku, Kyoto 601-8550, Japan, and ^cDepartment of Research and Development, Yamada Apiculture Center, Inc., 194 Ichiba, Kagamino-cho, Tomata-gun, Okayama 708-0393, Japan

(Received June 27, 2007; Accepted August 8, 2007)

Propolis, a honeybee product, contains a variety of biologically active substances. The present study was designed to investigate the effects of propolis on insulin resistance induced by fructose-drinking rats (FDR; type 2 diabetic animal model). Male Wistar rats (6 weeks old) received 15% fructose solution in drinking water for 8 weeks. FDR showed significant increases in plasma levels of insulin, Homeostasis Model Assessment ratio (HOMA-R, an index of insulin resistance), body weight, and systolic blood pressure but not blood glucose levels, when compared with control rats. Brazilian propolis extract (100 and 300 mg/kg, *p.o.*) treatment for 8 weeks significantly decreased the plasma level of insulin, HOMA-R, and body weight, increased plasma triglyceride levels without affecting blood glucose and total cholesterol levels, and tended to decrease systolic blood pressure. In isolated and perfused mesenteric vascular beds of FDR, propolis treatment resulted in a significant reduction of sympathetic nerve-mediated vasoconstrictor response to periarterial nerve stimulation (PNS; 8 Hz) and tended to increase the calcitonin gene-related peptide (CGRP) nerve-mediated vasodilator response to PNS, compared with those in untreated FDR. However, propolis treatment did not significantly affect norepinephrine-induced vasoconstriction and CGRP-induced vasodilation. These results suggest that propolis could be an effective functional food to prevent the development of insulin resistance.

Key words—propolis; fructose-drinking rat; insulin resistance; periarterial nerve function

緒 言

Propolis は、ミツバチが隙間を埋めて外敵から巣を守るために植物の新芽や樹脂から作る物質で、抗菌作用や抗炎症作用等の各種の生理活性作用を有している。Propolis にはフラボノイドのほか、ブラジル産に特徴的な桂皮酸誘導体（アルテピリン C, *p*-クマル酸など）を始め、各種ビタミン類、ミネラルなど人の健康維持に役立つ有用成分が豊富に含まれている。¹⁻⁴ これらの成分には、抗菌活性,⁵ 抗腫瘍活性,⁶ 抗炎症作用,⁷ 抗酸化作用⁸ などの生理活性

作用が見い出されている。また近年、propolis が糖負荷した正常動物及び病態モデル動物において血糖降下作用^{9,10} 及び血圧低下作用^{11,12} を有するという報告がされている。このことは propolis が肥満、高血圧、耐糖能異常を改善させる可能性を示唆する。

そこで本研究では、インスリン抵抗性モデルラットであるフルクトース飲料水負荷ラット（Fructose drinking rat; FDR）を用いて、propolis を長期間経口投与し、propolis のインスリン抵抗性に及ぼす影響について検討した。またインスリン抵抗性の状態では、循環調節系になんらかの異常が生じていると考えられているので、全身循環への関与が大きいと考えられている腸間膜動脈床を用いて、FDR における血管反応性及び血管周囲神経機能変化に及ぼす

^a岡山大学大学院医歯薬学総合研究科臨床薬学分野, ^b日本新薬株式会社創薬研究所, ^c山田養蜂場本社 研究開発部
*e-mail: Kawasaki@pheasant.pharm.okayama-u.ac.jp

propolis の影響についても検討した。

材 料 と 方 法

1. 実験動物 実験には、Wistar 系雄性ラット (清水実験材料より購入) を用い、6 週齢より飼育を開始し、8 週間 15%フルクトース溶液を自由に飲水させた。また control 群には代わりに水道水を飲水させた。動物は、ポリプロピレン不透明ケージ (W 220×L 320×H 135 mm; 夏目製作所製) 内に 3 匹ずつ飼育し、餌 (オリエンタル酵母工業株) は自由に与えた。飼育室は、相対湿度を 40–50%、室温を 20–25°C に維持し、12 時間の明暗サイクル (点灯; AM 8:00, 消灯; PM 8:00) に設定した。本研究は岡山大学動物実験ガイドラインに従って実施した。

2. Propolis 長期投与プロトコール 6 週齢 Wistar 系雄性ラットに 15%フルクトース溶液を自由に飲水させると同時に 8 週間 propolis を経口投与した。Propolis は 50%propolis エキス末 (株山田養蜂場より提供, Lot No. 060901, ブラジル産) を用い、corn oil に溶解させ、propolis エキス 100 及び 300 mg/kg の投与用溶液を作成した。この溶液を 1 日 1 回、エーテル軽麻酔下で 2 ml/kg の容量で経口ゾンデを用いて、強制経口投与した。またコントロールとして、control 群には水道水を、溶媒投与 FDR 群には溶媒の corn oil 溶液をそれぞれ 2 ml/kg の容量で経口投与した。

3. 摂食量、飲水量及び体重の測定 飼育期間中、2–3 日毎に摂食量及び飲水量を測定し、8 週間の総摂食量及び総飲水量を算出した。また体重は 1 週間に 1 回測定した。

4. 血液検査値及び空腹時血糖値の測定 血液検査及び空腹時血糖値の測定は、12 時間絶食後、エーテル軽麻酔下、心臓穿刺を行い約 0.8 ml 採血し、一滴は直ちにアドバンテージ II (ロシュ・ダイアグノティクス社製) にて血糖値を測定した。残りは約 1 時間後に遠心処理し、血清サンプルとして -80°C で保存し、血清中におけるインスリン値、コレステロール値及びトリグリセリド値の測定に用いた。血清中インスリン値はインスリン測定キット (生化学工業) を使用し、固相化インスリンモノクローナル抗体とモルモットインスリン抗体を用いた EIA サンドイッチ法にて測定した。また血清中コ

レステロール値及び血清中トリグリセリド値の測定にはコレステロール E-テストワコー (和光純薬) 及びトリグリセリド E-テストワコー (和光純薬) を使用し酵素法で測定した。Propolis の作用は投与前 (6 週齢) の値に対する投与後 (14 週齢) の値の比で評価した。またインスリン抵抗性の指標である Homeostasis Model Assessment ratio (HOMA-R) は $\text{plasma glucose (mmol/l)} \times \text{insulin } (\mu\text{U/ml}) / 22.5$ の式で算出した。¹³⁾

5. 収縮期血圧の測定 ラットを無麻酔下に 37°C に保温した容器に入れ、尾動脈の収縮期血圧はラット・マウス用非観血的血圧測定装置 (Unicom 社) を用い、tail cuff plethysmograph 法にて測定した。

6. 摘出腸間膜動脈血管床標本の灌流実験 14 週齢における control (無処置群)、溶媒投与 FDR 及び propolis 投与 FDR を pentobarbital-Na で腹腔内投与により麻酔後開腹し、Kawasaki らの方法¹⁴⁾ で腸間膜動脈血管床を摘出し、灌流標本とした。上腸間膜動脈内へポリエチレン製カニューレを挿入し、Krebs-Ringer bicarbonate 液 (Krebs 液) (組成; NaCl 120 mM, KCl 5.0 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, EDTA-2Na 0.027 mM, CaCl₂ 2.4 mM, Glucose 11.0 mM; pH 7.4) を注入して血管床内の血液を除去したのち、腸間膜動脈血管床を腸管と共に摘出した。摘出した血管床は 4 本の主動脈を残し、それ以外の動脈は結紮後切断し、4 本の主動脈からでる動脈分岐を腸管側近くで切り離して、腸間膜動脈血管床の灌流標本とした。標本を灌流装置設置後、Krebs 液を peristaltic pump (AC-2120, ATTO 製) で一定流量 (5 ml/min) 灌流した。また、標本の乾燥を防ぐため、Krebs 液 (0.5 ml/min) を標本外に表面灌流した。Krebs 液にはあらかじめ 95%O₂, 5%CO₂ の混合ガスを飽和させ、37°C に保温したガラス製蛇管内を通過させた。標本とポンプの間に置いた圧トランスジューサー (TP-200T, 日本光電製) にて灌流圧を測定し、灌流圧の変化を血管緊張度変化として、記録計 (model U-228, Pantos 社製) 上に記録した。

7. 灌流実験プロトコール 摘出腸間膜動脈血管床を Krebs 液にて灌流開始 30 分後、灌流圧が安定したのを確認し、経壁電気刺激 (PNS) (8, 12 Hz) 及び norepinephrine (5, 10 nmol; 第一三共)

の注入を行い、血管収縮反応を測定した。その後、guanethidine (5 μ M) と methoxamine (7 μ M) を含む Krebs 液を灌流し、灌流圧を 100 mmHg 程度まで上昇させたのち、PNS (1, 2, 4 Hz) 及び rat CGRP (50, 100 pmol; ペプチド研究所) を注入し、血管拡張反応を測定した。PNS は上腸間膜動脈付近においたリング状の白金電極を介して電気刺激装置 (SEN-3301, 日本光電製) により行った。Norepinephrine 及び CGRP の注入は infusion pump (model 975, HARVARD 製) を用いて上腸間膜動脈内に挿入したカニューレ付近の灌流液中に直接注入 (注入速度 100 μ l/12 s) した。実験の最後に papaverine (100 μ M; 大日本住友製薬) を灌流し、最大拡張反応を測定した。

血管反応性の変化は、血管収縮反応では灌流圧の上昇分 (Δ mmHg) で示し、血管弛緩反応では、papaverine による最大弛緩反応を 100% としたときの弛緩率 (%) で評価した。

8. 統計学的解析 得られた実験値は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.) で表した。得られた結果は、2 群間比較の場合は対応のない Student's *t* 検定を用いて、多群間の比較では、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Tukey の多重比較検定法を用いて統計学的処理を行い、危険率 5% 未満を有意差ありと判定した。

結 果

1. 摂食量、飲水量及び体重に及ぼす propolis 長期投与の影響 Table 1 に飼育期間中における総飲水量及び総摂食量を示した。溶媒投与 FDR 群の総摂食量は control 群に比べて有意に低い値を示したが、propolis 投与群の総摂食量との間に有意な変化は認められなかった。また、溶媒投与 FDR 群の総飲水量は control 群に比べて有意に高い値を示したが、propolis 投与群の総飲水量との間に有意な変化は認められなかった (Table 1)。

Figure 1 には、control 群、溶媒投与 FDR 及び propolis 投与 FDR 群における体重の変化を示した。溶媒投与 FDR 群の体重は control 群に比べて有意に高い値を示した。一方、propolis 投与 FDR 群の体重は propolis 投与用量に依存して低下し、propolis 300 mg/kg 投与 FDR 群の体重は control 群と同程度であった。

Table 1. Total Food Intake and Fluid Intake during the Experiment in Fructose-drinking Rats (FDR)

	Total food intake (g)	Total fluid intake (ml)
Control	850 \pm 11	1150 \pm 20
FDR + Vehicle	645 \pm 20*	1455 \pm 23**
FDR + Propolis 100 mg/kg	695 \pm 20*	1390 \pm 25**
FDR + Propolis 300 mg/kg	700 \pm 20*	1510 \pm 15**

Control and FDR received normal water and 15% fructose solution as a drinking water for 8 weeks, respectively. Propolis at doses of 100 and 300 mg/kg was administered *p.o.* for 8 weeks. Each value represents the mean \pm S.E. of 6 experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control.

2. 血液検査値に及ぼす propolis 長期投与の影響

2-1. 血糖値、血清中インスリン値及び HOMA-R 値に及ぼす影響 Figure 2 に各処置前に対する 8 週間処置終了時の血糖値と血清中インスリン値の比及び HOMA-R 値の変化を示した。フルクトース負荷前 6 週齢時における血糖値は、control 群 83 \pm 7 mg/dl, 溶媒投与 FDR 群 80 \pm 4 mg/dl, propolis 100 mg/kg 投与 FDR 群 89 \pm 6 mg/dl, propolis 300 mg/kg 投与 FDR 群 82 \pm 5 mg/dl であった。Control 群及び溶媒投与 FDR 群における 8 週間後の血糖値は軽度の上昇がみられたが、有意差は認められなかった。さらに、propolis 投与 FDR 群における血糖値も溶媒投与 FDR 群の値と比較して同程度であり、有意差はみられなかった (Fig. 2(A))。

フルクトース負荷前 6 週齢時における血清中インスリン値は、control 群 0.31 \pm 0.02 ng/ml, 溶媒投与 FDR 群 0.28 \pm 0.01 ng/ml, propolis 100 mg/kg 投与 FDR 群 0.31 \pm 0.03 ng/mL, propolis 300 mg/kg 投与 FDR 群 0.31 \pm 0.03 ng/ml であった。溶媒投与 FDR 群では 15% フルクトース溶液の 8 週間飲水により、血清中インスリン値は 14 週齢 control 群の約 4 倍、負荷前 6 週齢群の約 7 倍に上昇し、高インスリン血症を示した。Propolis 投与により、血清中インスリン値は propolis の用量に依存して低下し、300 mg/kg 投与 FDR 群では溶媒投与 FDR に比較して有意な低下がみられ、control 群の値と同程度であった (Fig. 2(B))。

インスリン抵抗性の指標である HOMA-R 値は Fig. 1(C) に示したように、溶媒投与 FDR 群ではフルクトース負荷前に比較して約 5 倍、14 週齢の control 群に比較して約 3 倍程度上昇した。Propolis 投与 FDR 群における HOMA-R は propolis 投与

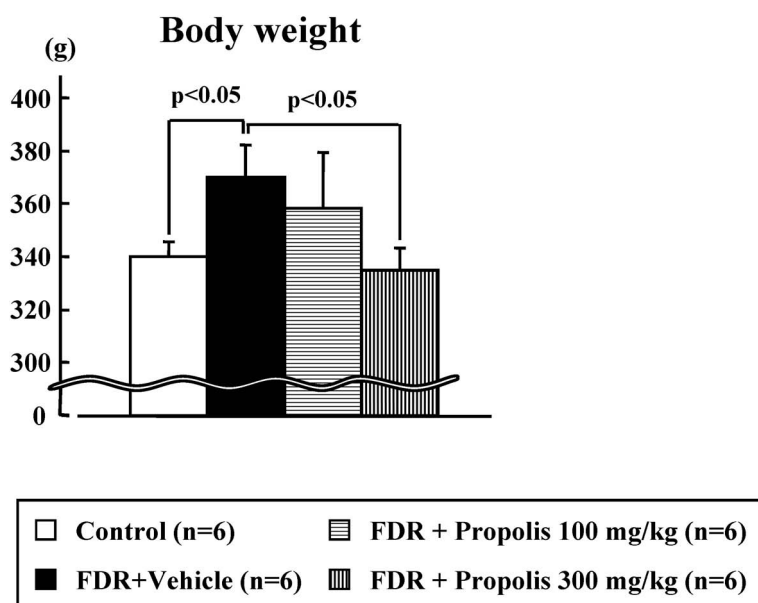


Fig. 1. Effect of 8-week Treatment with Propolis on Body Weight in Fructose-drinking Rats (FDR)

Control and FDR received normal water and 15% fructose solution as a drinking water for 8 weeks, respectively. Propolis at doses of 100 and 300 mg/kg was administered *p.o.* for 8 weeks. Each value represents the mean \pm S.E. of 6 experiments.

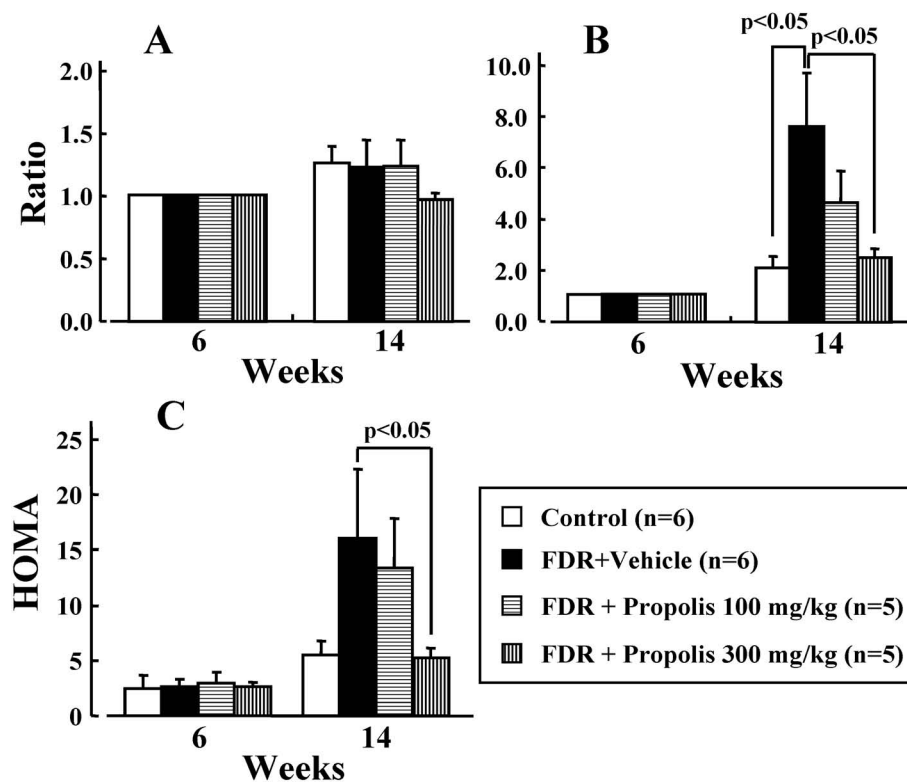


Fig. 2. Effect of 8-week Treatment with Propolis on Fasting Blood Glucose (A), Fasting Serum Insulin Level (B) and the Index of Insulin Resistance (plasma glucose \times insulin/22.5) (Homeostasis Model Assessment; HOMA) (C) in Fructose-drinking Rats (FDR)

Control and FDR were received normal water and 15% fructose solution as a drinking water for 8 weeks, respectively. Propolis at doses of 100 and 300 mg/kg was administered *p.o.* for 8 weeks. The vertical scale in A and B indicates the fold increase over the value in the 6 week-old rat. Each value represents the mean \pm S.E. of 5-6 experiments.

量に依存して低下し, propolis 300 mg/kg 投与 FDR 群において溶媒投与 FDR 群に比べて有意に小さい値を示し, control 群とほぼ同程度の値となった (Fig. 2(C)).

2-2. 血清中総コレステロール値及びトリグリセリド値に及ぼす影響 Propolis 投与による血清中総コレステロール値の変化を Fig. 3(A)に, トリグリセリド値の変化を Fig. 3(B)に示した. フルクトース負荷前 6 週齢時における血清中コレステロール値は, control 群 90 ± 2 mg/ml, 溶媒投与 FDR 群 91 ± 8 mg/ml, propolis 100 mg/kg 投与 FDR 群 92 ± 4 mg/ml, propolis 300 mg/kg 投与 FDR 群 93 ± 6 mg/ml であった. Propolis 投与後 8 週間における, 総コレステロール値は control 群及び溶媒投与群 FDR の値と比較して同程度であり, 有意差はみられなかった.

フルクトース負荷前 6 週齢時における血中トリグリセリド値は, control 群 72 ± 7 mg/ml, 溶媒投与 FDR 群 61 ± 4 mg/ml, propolis 100 mg/kg 投与 FDR 群 51 ± 1 mg/ml, propolis 300 mg/kg 投与 FDR 群 54 ± 6 mg/ml であった. 14 週齢時における溶媒投与 FDR 群の血中トリグリセリド値は control 群に比較して有意に高い値を示した. Propolis 投与群の血中トリグリセリド値は control 群及び溶媒投与 FDR 群と比較して高い値を示す傾向がみられた

が, 有意差は認められなかった.

3. 収縮期血圧に及ぼす propolis 長期投与の影響 Propolis 投与前と 8 週間投与終了時の収縮期血圧の変化を Fig. 4 に示した. 溶媒投与 FDR 群では 15% フルクトース溶液の 8 週間飲水により, 血圧は control 群に比べて有意に高い値を示した. Propolis 300 mg/kg 投与 FDR 群の血圧は, 溶媒投与 FDR 群と比較して低い値を示す傾向がみられたが, 有意差は認められなかった.

4. 腸間膜動脈における血管反応性の変化

4-1. 交感神経機能に及ぼす propolis 長期投与の影響 静止緊張下のラット腸間膜動脈灌流標本において PNS (8, 12 Hz) を行うと刺激頻度に依存した灌流圧上昇が観察される. この反応は血管周囲交感神経刺激により遊離された norepinephrine の血管収縮によることが確認されている.¹⁵⁾ 外因性に与えた norepinephrine 注入によっても同様な収縮反応が観察されるが, 血管平滑筋上の $\alpha 1$ アドレナリン受容体を介した反応である.¹⁵⁾ Control 及び FDR 標本における交感神経性の血管収縮反応の測定結果を Fig. 5 に示した. 溶媒投与 FDR 標本における PNS による交感神経性の収縮反応は control 標本の反応に比べて有意に高い値を示した. また propolis 300 mg/kg 投与標本における PNS による収縮反応は溶媒投与 FDR 標本における反応に比較して小さ

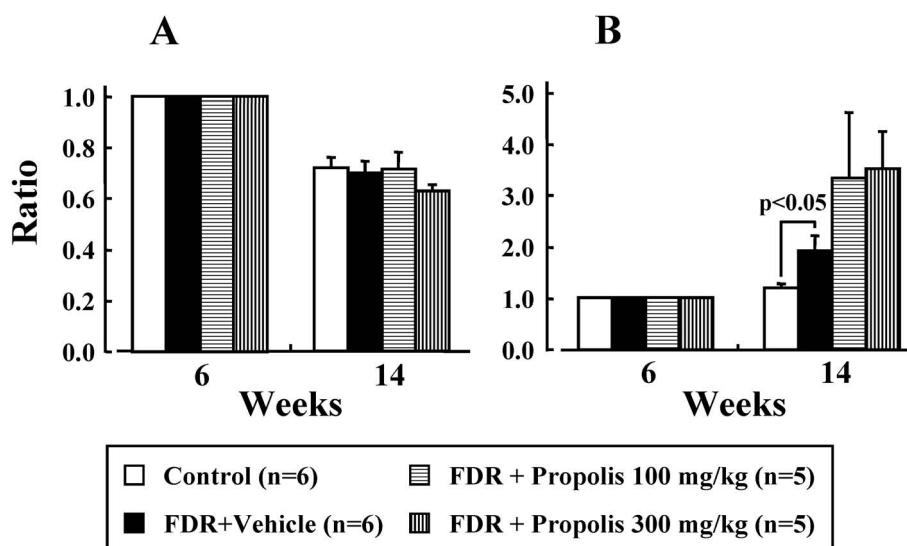


Fig. 3. Effect of 8-week Treatment with Propolis on Fasting Serum Total Cholesterol (A) and Fasting Serum Triglyceride (B) in Fructose-drinking Rats (FDR)

Control and FDR received normal water and 15% fructose solution as a drinking water for 8 weeks, respectively. Propolis at doses of 100 and 300 mg/kg was administered *p.o.* for 8 weeks. The vertical scale indicates the fold increase over the value in the 6 week-old rat. Each value represents the mean \pm S.E. of 5-6 experiments.

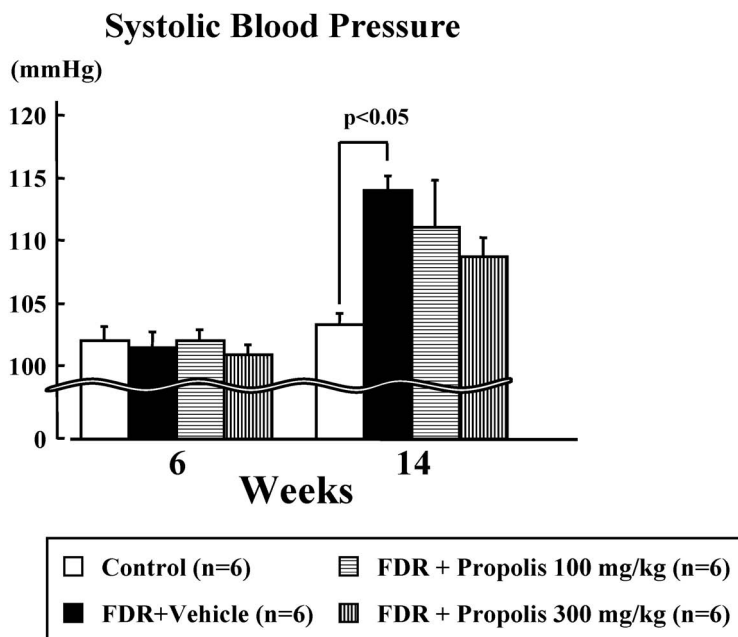


Fig. 4. Effect of 8-week Treatment with Propolis on Systolic Blood Pressure in Fructose-drinking Rats (FDR)

Control and FDR received normal water and 15% fructose solution as a drinking water for 8 weeks, respectively. Propolis at doses of 100 and 300 mg/kg was administered *p.o.* for 8 weeks. Each value represents the mean \pm S.E. of 6 experiments.

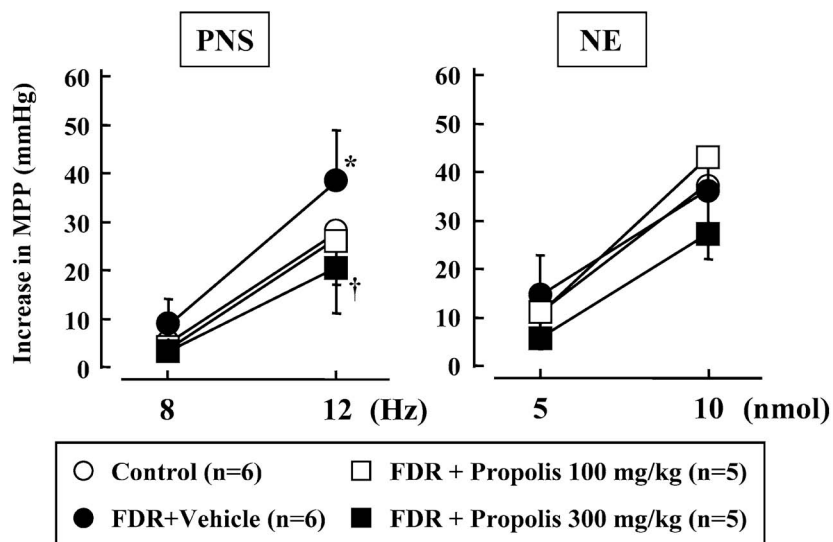


Fig. 5. Effect of 8-week Treatment with Propolis on Vasoconstrictor Responses to Periarterial Nerve Stimulation (PNS) or Norepinephrine (NE) Injection in Perfused Mesenteric Vascular Beds with Resting Tone in Fructose-drinking Rats (FDR)

Control and FDR received normal water and 15% fructose solution as a drinking water for 8 weeks, respectively. Propolis at doses of 100 and 300 mg/kg was administered *p.o.* for 8 weeks. Each value represents mean \pm S.E. of 5-6 experiments. * $p < 0.05$ vs. control. † $p < 0.05$ vs. FDR + Vehicle. MPP: mean perfusion pressure.

な値を示し、有意差が認められた。一方、propolis 投与標本における外因性に与えた norepinephrine 注入による収縮反応は、control 標本及び溶媒投与 FDR 標本と比較して有意な変化はみられなかった。

4-2. CGRP 神経機能に及ぼす propolis 長期投与の影響 交感神経遮断下に標本の血管を緊張させ灌流圧を上昇させた状態で、PNS (1-4 Hz) を行

うと、頻度依存性の灌流圧低下が観察される。この反応は血管周囲 CGRP 神経を介した血管弛緩反応であることが確認されている。¹⁴⁾ Control 及び FDR における CGRP 神経性の血管弛緩反応の測定結果を Fig. 6 に示した。溶媒投与 FDR 標本における PNS による弛緩反応は control 標本の反応に比べて小さくなる傾向がみられたが、有意差は認められな

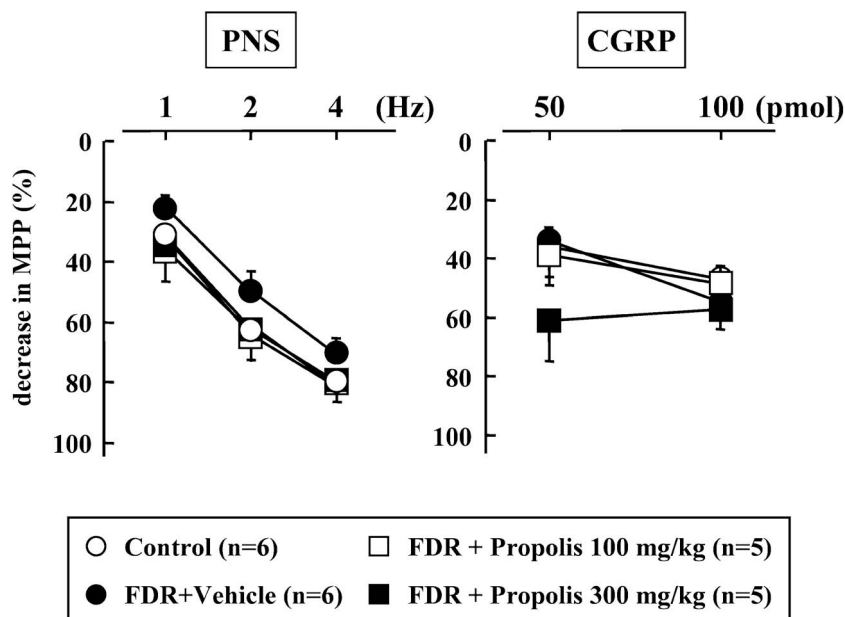


Fig. 6. Effect of 8-week Treatment with Propolis on Vasodilator Responses to Periarterial Nerve Stimulation (PNS) or CGRP Injection in Perfused Mesenteric Vascular Beds with Active Tone in Fructose-drinking Rats (FDR)

Control and FDR received normal water and 15% fructose solution as a drinking water for 8 weeks, respectively. Propolis at doses of 100 and 300 mg/kg was administered *p.o.* for 8 weeks. Each value represents mean \pm S.E. of 5–6 experiments. MPP: mean perfusion pressure.

かった。Propolis 投与 FDR 標本における PNS による弛緩反応は control 標本と同程度であった。また、Fig. 6 に示したように CGRP 注入による弛緩反応において、propolis 投与 FDR 標本の反応は溶媒投与 FDR 標本の反応と比較して有意な変化はみられなかった。

考 察

近年、インスリン抵抗性は糖尿病だけでなく肥満、脂質代謝異常、高血圧など多くの疾患で認められることが明らかとなり、循環器疾患の危険因子としての概念が広がりつつある。インスリン抵抗性を示す実験動物モデルには様々なものが報告されており、大別して自然発症モデルと後天的発症モデルがある。このうち、後天的発症モデルの1つであるフルクトース飲料水負荷ラット (fructose-drinking rat, FDR) は、ラットをフルクトース飲料水にて飼育することにより作成される。¹⁶⁾ われわれはこれまで FDR が空腹時血清中インスリン値の上昇及び高血圧を示すことを明らかにしている。¹⁷⁾ 本研究においても、Wistar 系雄性ラットにフルクトース溶液を 8 週間飲水させると絶食時の血清中インスリン値は約 3 倍に上昇し、高インスリン血症が認められた。しかし、血糖値は軽度の上昇がみられるものの

有意な変化ではないため、また、インスリン抵抗性の指標である HOMA-R 値も control 群に比較して約 3 倍の上昇がみられるので、この時期の FDR ではインスリン抵抗性が起こっていると考えられる。

インスリン抵抗性モデルの FDR に propolis を長期投与すると、血清中インスリン値は propolis の投与用量に従って低下し、高インスリン血症を抑制した。さらにインスリン抵抗性の指標である HOMA-R 値も propolis の用量依存性に低下し、溶媒投与 FDR 群に比べて低い値を示した。これらの結果から propolis の長期投与はインスリン抵抗性発症を抑制する可能性が示唆される。

溶媒投与 FDR では、総摂食量の有意な減少と総飲水量の有意な増加がみられ、16 週齢時において溶媒投与 FDR 群の体重は control 群に比べて有意に高い値を示した。この現象は糖の過剰摂取によるためと考えられる。一方、propolis 投与 FDR 群では溶媒投与群 FDR で観察された体重増加が抑制され、propolis 300 mg/kg 投与 FDR 群の体重は control 群と同程度であった。しかし、propolis 投与 FDR 群における総摂食量と総飲水量は溶媒投与 FDR 群との間に有意な変化がみられなかったため、propolis によって食欲等が低下した結果、体重が減少したとは考えられない。肥満はインスリン抵抗性

の惹起に關与する^{18,19)}と報告されているので、propolis による体重増加抑制作用は前述した propolis による血清中インスリン値の低下作用に寄与している可能性も考えられる。このような propolis による体重増加抑制作用は報告されていないが、propolis と同様にミツバチによって作られる RoyalJelly には肥満を予防することが知られている。²⁰⁾したがって、ミツバチによって作られる物質である propolis には肥満抑制作用がある可能性が示唆される。

Propolis 投与 FDR 群において血清中総コレステロールは control 群及び溶媒投与 FDR 群の値と比較して同程度であり、有意差はみられなかった。しかし、血清中トリグリセリド値は propolis 投与 FDR 群において control 群より高い値を示した。Propolis は血中の中性脂肪を低下させることが報告されているが、¹⁰⁾本研究では全く逆の結果が得られた。これは propolis 自体にエタノールに可溶性脂質が多く含まれているため脂質低下作用が相殺された可能性が推察される。しかし、詳細な機序は不明であり、今後の検討が必要である。

溶媒投与 FDR 群では 16 週齢において血圧が血清中インスリン値と同様に上昇し高血圧を呈した。近年、インスリンは糖代謝だけでなく内因性血管作動物質として循環調節に關与している可能性が示唆され、インスリンによる交感神経活性亢進作用、²¹⁾腎臓尿管でのナトリウム再吸収促進作用、²²⁾血管平滑筋細胞増殖作用²³⁾などが血圧上昇に寄与している可能性が報告されている。したがって今回用いた FDR では高インスリン血症となっているためインスリンによる血圧上昇機序が作用して高血圧になったと推察される。Propolis 100 mg/kg 投与 FDR 群における血圧値は溶媒投与 FDR 群と同様の血圧値を示したが、高用量の propolis 300 mg/kg 投与 FDR 群においては、溶媒投与 FDR 群と比較して低い値を示す傾向がみられた。高用量の propolis 投与では血清中インスリンの低下作用が認められているので、propolis による血圧上昇抑制作用は高インスリン血症の改善によって起こったと考えられる。一方、FDR では内皮依存性の弛緩反応が減弱しているとの報告がある。²⁴⁾また、propolis は高血圧自然発症ラット (SHR) に長期間投与することにより内皮依存性の弛緩反応を増強し、降圧効果を示す

ことが報告されている。¹¹⁾したがって propolis は内皮細胞依存性の弛緩反応を増大させ直接的にインスリン抵抗性に伴う血圧上昇を抑制する可能性も否定できない。

静止緊張下のラット腸間膜動脈灌流標本において、溶媒投与 FDR 群では、交感神経性収縮反応 (PNS 12 Hz) が control 群の反応と比較して有意に大きかった。また、溶媒投与 FDR 群においての交感神経性収縮反応の増大は propolis 300 mg/kg 投与 FDR 群では有意に抑制された。一方、propolis 投与 FDR 群における外因性 norepinephrine 注入による収縮反応は溶媒投与 FDR 群の反応と同程度であり、有意な変化はなかった。本実験では norepinephrine 遊離量を測定していないが、血管反応と遊離量を比較した研究では、外因性 norepinephrine の反応が同程度の場合、PNS 反応が大きいと、伝達物質の遊離量が大きいことが確認されている。²⁵⁾したがって、propolis 投与 FDR 群において、血管平滑筋上の $\alpha 1$ アドレナリン受容体の感受性は変化せず、交感神経からの norepinephrine の遊離が抑制されていることが考えられる。われわれは、インスリン抵抗性を示す FDR において、インスリン抵抗性の進行に伴い交感神経の亢進が起こっていることを明らかにしている。¹⁷⁾また、インスリンの作用として、交感神経活動亢進作用が知られており、^{26,27)}高インスリン血症を示す FDR では、インスリンにより交感神経活動が亢進している可能性が考えられる。したがって、propolis は FDR におけるインスリン抵抗性に伴い亢進する交感神経機能に対して抑制的に働くことが示唆される。

一方、交感神経遮断下に摘出腸間膜動脈血管を緊張させ灌流圧を上昇させた標本において、溶媒投与 FDR 群では、CGRP 神経性弛緩反応が control 群の反応と比較して小さくなる傾向が認められた。しかし、propolis 投与群 FDR における PNS による弛緩反応は control 群と同程度であった。一方、外因性 CGRP 注入による CGRP₁ 受容体を介した弛緩反応は、溶媒投与 FDR 群の反応と比較して、propolis 投与 FDR 群の反応と有意な変化はみられなかった。したがって、propolis 長期投与は、血管平滑筋上の CGRP₁ 受容体の感受性は変化させず、CGRP 神経からの CGRP の遊離を促進していると推察できる。われわれはインスリン抵抗性を示す

FDR において, CGRP 神経機能の減弱が起こっていることも明らかにしている.¹⁷⁾ Propolis はインスリン抵抗性に伴い低下する CGRP 神経機能に対して防御的に作用し, 神経機能に対して促進的に働く可能性が示唆される。

結 論

インスリン抵抗性モデルである FDR に propolis を 8 週間経口投与した。その結果, 体重, 血清中インスリン値及びインスリン抵抗性指数 HOMA-R 値は有意に低下し, 血圧は propolis の高用量で低下傾向を示した。また, 腸間膜動脈灌流標本を用いての腸間膜動脈に分布する血管周囲神経機能に対しての検討から, propolis は FDR におけるインスリン抵抗性の進行に伴う交感神経機能の亢進及び CGRP 神経機能の減弱を改善した。以上の結果より, propolis はインスリン抵抗性を改善する作用を持つ可能性が示唆され, インスリン抵抗性に有効な機能性食品となり得ると考えられる。

REFERENCES

- 1) Takino Y., Mochida S., *Honeybee Sci.*, **3**, 145–152 (1982).
- 2) Kumazawa S., Tazawa S., Noro T., *Honeybee Sci.*, **21**, 164–168 (2000).
- 3) Marcucci M. C., *Apidologie*, **23**(2), 293–295 (1995).
- 4) Banskota A. H., Tezuka Y., Kadota S., *Phytother. Res.*, **15**(7), 561–571 (2001).
- 5) Bankova V., Christov R., Kujumgiev A., Marcucci M. C., Popov S., *Z. Naturforsch. [C]*, **50**(3–4), 167–172 (1995).
- 6) Padmavathi R., Senthilnathan P., Sakthisekaran D., *Comp. Biochem. Physiol. C, Pharmacol. Toxicol.*, **143**(3), 349–354 (2006).
- 7) Borrelli F., Maffia P., Pinto L., Ianaro A., Russo A., Capasso F., Ialenti A., *Fitoterapia*, **73**, S53–63 (2002).
- 8) Okutan H., Ozcelik N., Yilmaz H. R., Uz E., *Clin. Biochem.*, **38**(2), 191–196 (2005).
- 9) Matsui T., Ebuchi S., Fujise T., Abesundara K. J., Doi S., Yamada H., Matsumoto K., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**(11), 1797–1803 (2004).
- 10) Fuliang H. U., Hepburn H. R., Xuan H., Chen M., Daya S., Radloff S. E., *Pharmacol. Res.*, **51**(2), 147–152 (2005).
- 11) Kubota Y., Umegaki K., Kobayashi K., Tanaka N., Kagota S., Nakamura K., Kunitomo M., Shinozuka K., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **31**, S29–30 (2004).
- 12) Mishima S., Yoshida C., Akino S., Sakamoto T., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**(10), 1909–1914 (2005).
- 13) Matthews D. R., Hosker J. P., Rudenski A. S., Naylor B. A., Treacher D. F., Turner R. C., *Diabetologia*, **28**(7), 412–419 (1985).
- 14) Kawasaki H., Takasaki K., Saito A., Goto K., *Nature*, **335**(6186), 164–167 (1988).
- 15) Kawasaki H., Nuki C., Saito A., Takasaki K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **252**, 403–419 (1990).
- 16) Suzuki M., Nomura C., Odaka H., Ikeda H., *Jpn. J. Pharmacol.*, **74**(4), 297–302 (1997).
- 17) Takatori S., Zamami Y., Mio M., Kurosaki Y., Kawasaki H., *Hypertens. Res.*, **29**(5), 361–368 (2006).
- 18) Kusminski C. M., McTernan P. G., Kumar S., *Clin. Sci. (Lond)*, **109**(3), 243–256 (2005).
- 19) Owecki M., Sowinski J., *Pol. Merkur. Lekarski*, **20**(117), 355–357 (2006).
- 20) Li-Kun H., Kawashima M., Takaku T., Kimura Y., Okuda H., *Nippon Taishitugaku Zasshi*, **63**(1–2), 78–82 (2001).
- 21) Lembo G., Napoli R., Capaldo B., Rendina V., Iaccarino G., Volpe M., Trimarco B., Sacca L., *J. Clin. Invest.*, **90**(1), 24–29 (1992).
- 22) Rocchini A. P., Katch V., Kveselis D., Moorehead C., Martin M., Lampman R., Gregory M., *Hypertension*, **14**(4), 367–374 (1989).
- 23) Hsueh W. A., Law R. E., *Am. J. Cardiol.*, **84**(1), 21–24 (1999).
- 24) Kamata K., Yamashita K., *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **103**(2), 195–210 (1999).
- 25) von Kugelgen I., Starke K., *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.*, **344**(4), 419–429 (1991).
- 26) Rowe J. W., Young J. B., Minaker K. L., Stevens A. L., Pallotta J., Landsberg L., *Diabetes*, **30**(3), 219–225 (1981).
- 27) Takatori S., Mizote M., Zamami Y., Kurosaki Y., Kawasaki H., *Br. J. Pharmacol.*, **140**(6), 1137–1145 (2003).