

糖尿病マウス（NSY）に対する国産ハチミツの影響

平成 28 年 5 月 12 日受付

谷 村 圭 哉¹⁾

谷 田 彩 花¹⁾

田 中 美 子²⁾

佐々木 大 樹³⁾

松 本 耕 三^{1,2,3)}

¹⁾ 京都産業大学総合生命科学部動物生命医科学科

²⁾ 京都産業大学ミツバチ産業科学研究センター

³⁾ 京都産業大学生物工学研究科

要 旨

これまでにハチミツが血糖値をあまり上昇させないという報告や、砂糖と比較して体重をあまり増加させないという報告がされている。しかし、その真偽やメカニズムについては、まだ明らかにされていない。本研究は、肥満性2型糖尿病動物を用い、ハチミツが糖尿病に与える影響とそのメカニズムを解明することを目的としている。

本研究では、肥満性糖尿病マウスを用い、ハチミツと各種糖を長期間投与し、血糖値、インスリン値を測定し、糖尿病に及ぼすハチミツの影響を調べ、さらにその影響に関与する遺伝子の探索を行った。

各種糖を投与した結果、ハチミツ群では、グルコース群やスクロース群に対して体重や脂肪量が増加していなかった。また、投与4週間後、12週間後の経口糖負荷試験（Oral sugar tolerance test (OSTT)）では、グルコース投与群やスクロース投与群に対し、ハチミツ投与群は相対的に低い血糖値を示した。血中脂肪関連物質に関しては、遊離脂肪酸において、ハチミツ群で他の群と比較して有意な減少が認められた。血中インスリン濃度を測定したところ、各種糖投与60分後において、ハチミツ投与群はPBS投与群、グルコース投与群と比較して有意に低い値を示した。ハチミツの影響をさらに調べるために、肝臓においてインスリンシグナル経路について調べてみたが、影響は見られなかった。そのため、肝臓において脂質代謝に関わるタンパクについて調べたところ、AMPK-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化がPBS群とハチミツ群では高くなっていた。

本研究において、NSYマウスへのハチミツは、スクロースの投与と比較して体重や血糖値の上昇を抑え、血中遊離脂肪酸濃度を減少させることが確認された。そして、その要因の一つ

として、ハチミツは AMPK のリン酸化を亢進させていると考えられる結果を得た。

キーワード：ハチミツ、糖尿病、血糖値、遊離脂肪酸、NSY マウス

序 論

2 型糖尿病は代表的な慢性疾患の一つである。そしてその患者数は増加し続けており、2025 年にはその人口は 3 億 3,300 万人に達すると言われている¹⁾。2 型糖尿病患者は先進諸国、発展途上国問わず増加している。2 型糖尿病患者増加の原因として、経済成長に伴う生活習慣の変化が運動量減少を導きその結果、肥満患者が増加することが上げられる^{1,2)}。現在の糖尿病の治療法は、運動療法、食事療法、そして投薬からなる。そして、食事療法では、砂糖等の糖が大きく制限される。もちろん一般に糖分の塊と考えられがちなハチミツも敬遠されている。しかし、それでは、患者の生活の質は大幅に制限させられることにつながりかねない。

血糖値をあまり上昇させない糖として、フルクトースが挙げられる。グルコースと比較して、フルクトースは消化管での吸収が緩やかなため、血糖値をあまり上げないと考えられている³⁾。そのため、フルクトースは糖尿病患者に適した糖に思われる。しかし、フルクトースは体重の増加、インスリン抵抗性、耐糖能障害を引き起こすという報告がある⁴⁾。一方、ハチミツは、血糖値をあまり上昇させないという報告や、砂糖と比較して体重が増加しにくいという報告がある⁵⁾。それが確かならば、砂糖の代用品としてハチミツを糖尿病患者に使用することができるかもしれない。

ハチミツは、ミツバチの唾液に含まれるインベルターゼの作用により蜜の中のスクロースがフルクトースとグルコースに分解され生成される。従って、ハチミツを構成している主な糖は、フルクトースとグルコースであり、その点ではスクロースと似ている。しかし、ハチミツは花の種類によりその成分比が異なる。その他に微量のビタミンやミネラルを含んでいる。ハチミツが血糖値を上昇させないメカニズムや、他の糖に比べ体重を増加させないメカニズムについてはまだ、明らかにされていない。

本研究は、肥満性 2 型糖尿病動物を用い、ハチミツが糖尿病にどのような影響を及ぼしているかを調べ、そのメカニズムの一端を見いだすことを目的とする。そのために、今回、加齢に伴いインスリン抵抗性や高血糖を示し、2 型糖尿病を発症する NSY マウスへのハチミツと各種糖の長期投与による影響を比較検討した。

方 法

1. 実験動物

実験には8週齢の肥満性糖尿病マウスであるNSY（日本SLC）と正常コントロールとして8週齢のC3H/HeJマウス（日本SLC）を購入して用いた。なお実験には全て雄マウスが使われた。全てのマウスはSpecific Pathogen Free (SPF) 環境下で温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ 、12時間昼夜サイクル（7時点灯、19時消灯）にて飼育し、 γ 線滅菌飼料および飲料水は自由摂取とした。マウスは投与する糖（Glucose、Sucrose、Honey）ごとにそれぞれ6~7匹の3グループを作った。さらに、コントロールとしてNSYマウスに1×PBSを投与する群と正常コントロールのC3Hマウスにも1×PBSを投与し、合計5グループを作った。また、週に1度体重と1週間の給餌量の測定をした。本実験は京都産業大学動物実験委員会のガイドラインに従って動物実験を実施した。

2. 各種糖（Glucose, Sucrose, Honey（菜の花））の投与

ハチミツは菜の花のハチミツ（青森産）を用いた。ハチミツは1×PBSで25%ハチミツ溶液を作り、 $0.45\mu\text{m}$ のフィルター（ミリポア）で除菌濾過した。グルコースやスクロースも同様に1×PBSを用いて25%溶液を作り、 $0.45\mu\text{m}$ のフィルター（ミリポア）で除菌濾過した。この溶液を1日1回（5日/週）経口ゾンデを用いて強制経口投与した。投与量は 2g/kg になるように調整した。ハチミツのみ 2g/kg に調整してさらにその1.2倍量を経口投与した。また、コントロールとしてNSYマウスとC3Hマウスに1×PBSを 2g/kg 経口投与した。投与は4週間行った後、再び12週間行った。

3. 経口各種糖負荷試験（Oral Sugar Tolerance Test: OSTT）

各種糖の投与前と投与開始から1、4、8、12週間後に無麻酔下にてOSTTを行った。ただしPBSを投与しているNSYマウスについてはOSTTは行わなかった。それ以外の個体については一晩の絶食後、経口的に各種糖を 2g/Kg 投与した。ただし、ハチミツ投与群においては 2g/Kg の1.2倍量を経口的に投与した。

なお、各種糖投与の空腹時血液をマウス尾部より採血してグルテスT Neoセンサー（三和科学）により空腹時血糖を測定した。これを0分値として各種糖の経口投与後、30分おきに120分まで尾部より採血し血糖値を測定した。また、0分~120分までの総血糖値（Area under the glucose curve: AUC）は所定の台形式より計算した。

4. 腹腔インスリン負荷試験（Intraperitoneal Insulin Tolerance Test: ipITT）

各種糖の投与開始から4、6週間後に無麻酔下にてITTを行った。インスリン負荷試験は投

与群の全ての個体に、0.5U/Kgのインスリンを腹腔投与した。

なお、インスリンの投与前にマウスの尾部より採血してグルテスト Neo センサーにより空腹時血糖を測定した。これを0分値としてインスリンの投与後、30分おきに120分まで尾部より採血し血糖値を測定した。あるいは、15分おきに60分まで血糖値を測定した。また、0分~120分間での総血糖値 (Area under glucose curve: AUC) を所定の台形式より計算した。

5. 血清および臓器の採取

NSY マウスへの各種糖の投与14週目に、1晩絶食させ血清および臓器の採取を行った。最初に各種糖を2g/Kg経口投与した。ただし、ハチミツ投与群のみ最初の糖の投与量は1.2倍量投与した。C3Hと1×PBS投与群にはグルコースを投与した。

なお、各種糖の投与前にマウスの尾部より採血してグルテスト Neo センサーにより空腹時血糖を測定した。さらに、ヘマトクリット管1本分を尾部より採血した。また、60分後も同様に麻酔をかける前に血糖値の測定とヘマトクリット管1本分の採血をした。

投与後60分で10倍希釈したソムノペンチルを65mg/Kg腹腔投与して、麻酔後、後大静脈より全採血し安楽死させた。麻酔の効きが悪い場合はイソフルランを吸わせ追加麻酔をした。

マウスの後大静脈より採取した血液は、60分程静置後、12,000rpm 5分24℃で遠心し、採れた血清を-80℃で保存した。その後、肝臓、副睾丸脂肪、後腹膜脂肪、腸間膜脂肪、骨格筋を採取し、各脂肪についてはそれぞれの重量を測定した。また、肝臓、副睾丸脂肪、骨格筋から約0.5gを採取し、ジルコニアビーズ0.5φ (TOMY:ZB-50) 入りのIsogen II (日本ゼオン社) 溶液1.0mlに入れ、Bead Smash12細胞破碎機 (和研薬) にて4,000rpm、10秒ホモジナイズ後、-80℃で保存した。ただし、骨格筋のみ40秒間ホモジナイズした。

また、タンパク実験用として肝臓と骨格筋は1.5ml エッペンドルフチューブに採取した分の臓器を入れ、そのまま-80℃で保存した。

6. 血清の生化学的検査

血中の遊離脂肪酸 (NEFA)、総コレステロール (TCHO)、中性脂肪 (TG) は、比色法を用いて、NEFA-C テスト (和光)、コレステロール E テスト (和光)、トリグリセライド E テスト (和光) を用いて測定した。遊離脂肪酸は、試料と2種類の発色試薬を順番に加え攪拌後、各37℃で10分間インキュベートした後、分光光度計を用いて吸光度 (550nm) を測定した。総コレステロール、中性脂肪は、試料と発色試薬を混合し、37℃で5分間インキュベート後、分光光度計で吸光度 (600nm) を測定した。それぞれ標準液と吸光度の値から検量線を作製し、サンプル濃度を算出した。

7. インスリン測定

血中インスリン濃度はELISAキット(SIBAYAGI)を用いて測定した。ELISA用の96ウェルプレート、試薬類を十分に室温(20~25℃)に戻した(2時間程度)。その後、濃縮洗浄液の希釈として室温化した蒸留水で10倍希釈した。次に、標準溶液の希釈を室温化した緩衝液で2倍の段階希釈をした。これは、8連チューブを用い、1本目に緩衝液190μl、残りの7本には100μlずつ入れ、インスリン標準溶液を1列目に10μl入れ、よくピペティングしてそこから100μlとり、次の列に移すことを繰り返して行った。ただし、最後の列には標準溶液は入れず、緩衝液のみとした。

次に、室温化した緩衝液でビオチン結合インスリン抗体を4,000倍希釈した。なお、4,000倍希釈の際、2段階希釈を行ったため、1段階目で40倍希釈し、2段階目でそれをさらに100倍希釈し、4,000倍希釈液を作製した。そして、凍結しておいた血清を氷上で融解し、全量30μl以上のものはそのままの濃度で、30μl以下のものは緩衝液で2倍希釈し、サンプルを調整した。測定はデュプリケートで行った。その後、抗体固相化96ウェルプレートを先ほどの希釈した洗浄液で5~6回洗浄した。洗浄後、100μlのビオチン結合抗インスリン抗体を抗体固相化96ウェルプレートに撒いた。次に、標準インスリン溶液と調整しておいたサンプルを10μlずつ入れて、攪拌後、室温(20~25℃)、2時間静置して反応させた。

2時間の反応の終わる30分程前に、室温化した緩衝液でペルオキシダーゼ・アビジン結合物を2,000倍希釈した。なお、2,000倍希釈の際、1段階目で20倍希釈し、2段階目でそれをさらに100倍希釈し、2,000倍希釈液を作製した。

2時間の反応後、抗体固相化96ウェルプレートを5~6回洗浄し、希釈しておいたペルオキシダーゼ・アビジン結合物を100μlずつ撒き、攪拌後、室温(20~25℃)、30分間静置して反応させた。30分後、抗体固相化96ウェルプレートを5~6回洗浄し、発色液(TMB)を100μlずつ撒き、攪拌後、室温(20~25℃)、30分間静置して反応させた。30分後、洗浄せずに反応停止液(1M H₂SO₄)を100μl加え、攪拌した。その後、吸光度測定(主波長450nm、副波長600~650nm)を行った。

8. Total RNA抽出と濃度測定

Isogen II溶液内の各凍結臓器(肝臓・副睾丸脂肪・骨格筋)を37℃で溶かし、そこに0.4mlの滅菌蒸留水を入れた後、15秒間激しく振り、室温で15分間静置した。その後、15分、12,000rpm、4℃で遠心した。遠心後、上清を1.0mlとり、5μlのP-Bromoanisoleを入れ、15秒間振り、室温で5分間静置した。その後、10分、12,000rpm、4℃で遠心した。遠心後、上清を900μlとり、75%エタノールを0.4ml入れ、転倒混和した後、室温で10分間静置した。その後、8分、12,000rpm、4℃で遠心した。遠心後、サンプルをデカントし、75%エタノールを0.5ml入れ、3分、8,000rpm、4℃で遠心した。遠心後、再びサンプルをデカントし、75

%エタノールを 0.5ml 入れ、3 分、8,000rpm、4℃ で遠心した。その後、デカントし、沈殿を約 15 分間風乾させた。その後、EDTA を 100 μ l ずつ入れ、10 分間静置した。10 分後、それぞれの RNA 濃度を測定した。

9. ホルムアルデヒド変性ゲル電気泳動

抽出した Total RNA がインタクトであることを確認するために、変性ゲルを用いた電気泳動を行った。100ml のビーカーに蒸留水 36ml とアガロース S (日本ジーン社) を 0.75g 入れ、攪拌した (2 枚分)。その後、電子レンジ 200W で加熱し溶解させ、65℃ まで冷ました。温度が下がったら、ドラフト内で 10 \times MOPS バッファーを 5.0ml とホルムアルデヒド 9.0ml を攪拌しながら加えた。その後、ゲルトレイに流し込み、30 分から 40 分間静置しゲルを作製した。ゲルが冷え、固まった後、ゲルと 1 \times MOPS を泳動層にいれ 50V で 15 分間のプレ泳動を行った。

RNA サンプル調整液の作製として RNA 1 サンプルにつき、10 \times MOPS 2.0 μ l、ホルムアルデヒド 4.0 μ l、ホルムアミド 10.0 μ l、0.2mg/ml エチジウムブロマイド (50 倍希釈) 1.0 μ l の計 17 μ l の試薬調整を行った。作製した RNA 調整液に、濃度が 600 から 1,000ng/ μ l になるように RNA を入れ、65℃ で 15 分間熱変性させた。変性後、サンプルに BPB 1.0 μ l とローディングバッファー 2.0 μ l をそれぞれ入れ、プレ泳動後のゲルに 10 μ l ずつ入れた。そして、50V で 60 分間泳動し、60 分後 UV トランスイルミネーターを用いて、バンドパターンを確認した。

10. cDNA の作製

抽出した Total RNA を cDNA とするため、PrimeScript RT reagent Kit [Perfect Real Time] (TAKARA BIO 社) を用いて逆転写 PCR を行った。試料と 4 種類の試料をプロトコールに従い順番に混ぜ、PCR (37℃ 15 分、85℃ 5 秒) を行った。なお逆転写の際の使用 RNA は 500ng/ μ l になるように調整した。

11. RT-PCR

NSY マウスの各組織での遺伝子発現量をみるために、定量 PCR である Real Time PCR を行った。蛍光色素として SYBR green を使用し、SYBR Premix Ex Taq II (TAKARA BIO 社) を用いた。Real Time PCR には、Step One Plus (Applied Biosystems 社) を用い、反応条件は 95℃ 30 秒 1cycle、95℃ 5 秒、60℃ 30 秒 40cycle で検量線法にて行った。相対比較の為のハウスキーピング遺伝子は Gapdh (TAKARA BIO 社) を使用し、プライマー毎の PCR 産物の増幅速度から得られる値を Gapdh の値で割ることによって標準化し、相対的な鋳型 mRNA 量を計算した。

12. Western blot

組織破砕液を遠心し、上清を 15% SDS-PAGE を用いて電気泳動を行った。分離されたタンパクは、ポリビニル 2 フッ化 (PVDF) メンブレンシート (Immobilon-P, Millipore Co., Billerica, USA) に転写した。メンブレンは、5% nonfat dry milk/0.1% Tween 20 in PBS を用いてブロックキミングした。洗浄後、メンブレンを 5% nonfat dry milk/0.1% Tween 20 in PBS 条件下で各種抗体を反応させた。使用した抗体は以下の通りであった：Akt (pan) (C67E7) (#4691 Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan)、Phospho-Akt (Ser473) (#4060 Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan)、GSK3 β (D5C5Z) (#12456 Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan)、Phospho-GSK-3 β (Ser9) (D85E12) (#5558 Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan)、FoxO1 (C29H4) (#2880 Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan)、Phospho-FoxO1 (Ser256) (#9461 Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan)、Fatty-Acid-Synthase (C20G5) (#3180 Cell Signaling Technology Tokyo, Japan)、Acetyl-CoA-Carboxylase (C83B10) (#3676 Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan)、AMPK (D63G4) (#5832 Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan)、Phospho-AMPK α (Thr172) (D79.5E) (#4188 Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan)、Glut4 (1F8) (#2213 Cell Signaling Technology Tokyo, Japan)、 β -actin (GTX 629630, GeneTex Tnc., Los Angeles, USA) を用いてインキュベートを行った。抗原抗体複合体は、peroxidase conjugated secondary antibody (SC-3873, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, USA and 474-1806, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Washington, DC, USA) を用いて検出した。バンドは、Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Berkeley, USA) を用いて解析した。

13. 統計解析

全ての結果の比較は平均値 \pm SE で示した。2 群の比較は Student-t テストを、3 群以上の比較には ANOVA を用い、Fisher の PLSD 法で検定した。

結 果

1. ハチミツの体重と腹腔脂肪への影響

NSY マウスへの各種糖の投与による体重の推移を図 1 (a) に示した。コントロール群 (PBS)、グルコース、ハチミツ群の間で有意な差は見られなかった。一方、スクロース群とハチミツ投与群において、有意差が認められ、ハチミツ投与群はスクロース群と比較して有意に低い体重を示した。また、21 週齢での 1 日あたりの給餌量を図 1 (b) に示した。給餌量については、1 \times PBS 群と比較して C3H、グルコース、スクロース群で有意な増加が見られた。しかし、ハチミツ群との比較ではどのグループにおいても有意な差は見られなかった。

図 1 (c) には各種糖投与群毎の各脂肪重量の比較を示した。副睪丸脂肪と腸間膜脂肪の重

量においては有意な違いは認められなかった。しかし、後腹膜脂肪において、ハチミツ群と比較してスクロース群で有意な増加が見られた ($P=0.029$)。また、合計脂肪重量においてもハチミツ群とスクロース群を比較して、スクロース群で有意な増加が認められた ($P=0.039$)。

2. OGTT によるハチミツの血糖値に及ぼす影響

図 2 (a) に各種糖の連続投与を開始して 1 週間後に行った各種糖負荷試験 (OSTT) の結果を示した。この時、NSY マウスは 16 週齢、C3H マウスは 19 週齢だった。図 2 (a) より、30 分値と 60 分値 ($P=0.00014$, $P=0.0084$) において、ハチミツ群と比較して、グルコース群で血糖値の有意な上昇が見られた。しかし、90 分値で有意な差はなくなった。また、ハチミツ投与群とスクロース投与群においてはどの時点においても有意な違いは認められなかった。図 2 (b) には、各種糖の連続投与開始から 4 週間後に行った OSTT の結果を示した。図 2 (a) と同様に、30 分値と 60 分値でグルコース群において有意な血糖値の上昇が見られた (それぞれ $P=0.00096$, $P=0.0032$)。一方で、スクロース群とハチミツ群において有意な違いは無いが、投与 1 週間後では 60 分値以降ハチミツの血糖値の方がスクロースの血糖値よりも高かったことに対し、投与 4 週間後では 0 分値から 120 分値の全ての時点でハチミツ群の血糖値の方が低い値を示した。

続いて、4 週間の投与後 3 週間無処置の期間において OSTT を行ったときの結果を図 3 (a) に示した。これまでの結果と同様にグルコース群において 30 分値と 60 分値で血糖値の有意な増加が見られた (それぞれ $P=0.00086$, $P=0.015$)。さらに、0 分値においても有意な増加が見られた ($P=0.0015$)。また、スクロース群において、有意差は無いが、60 分値以降の血糖値はハチミツ群の血糖値よりも低い値を示すという結果になった。この時を投与 0 週目として、投与開始から 4 週間後に行った OSTT の結果を図 3 (b) に示した。ハチミツ群と比較してグルコース群において、30 分値と 60 分値に加え 90 分値においても有意な増加が見られた (それぞれ $P=0.0000013$, $P=0.00000033$, $P=0.0016$)。さらに、スクロース群においても 30 分値と 60 分値と 120 分値において、ハチミツ群と比較して、有意な血糖値の上昇を示した (それぞれ $P=0.0044$, $P=0.0096$, $P=0.042$)。さらに投与を続け、投与開始から 12 週間後に行った OSTT の結果を図 3 (c) に示した。グルコース群においてはこれまでの結果と同様に、高い血糖値を示し、30 分値、60 分値、90 分値において有意な増加を示した (それぞれ $P=0.000018$, $P=0.000081$, $P=0.015$)。一方で、スクロース群においては、投与 4 週間後では 30 分値と 90 分値にも有意な違いが認められたが、投与 12 週間後ではその時点における有意な違いは認められなかった。しかし、60 分値においてはスクロースの血糖値の有意な上昇が認められた ($P=0.025$)。

ハチミツ群とスクロース群の間で最も有意な違いが多く認められた NSY マウス 26 週齢、各種糖投与開始から 4 週間後に行われた OSTT から計算された AUC を図 4 に示した。AUC

においてもハチミツ群と比較してグルコース群、スクロース群、C3H群に有意な違いが認められた（それぞれ $P=0.0000016$ 、 $P=0.012$ 、 $P=0.0015$ ）。

3. ITT によるハチミツのインスリン抵抗性への影響

図5にはNSYマウス38週齢、C3Hマウス31週齢、各種糖投与開始から6週間後に行われたインスリン負荷試験（ITT）の結果を示した。ITTでは、NSYマウスの全ての群において、インスリン投与後15分で血糖値が増加し、インスリン抵抗性を示した。しかし、NSYマウス同士で比較して、どの群においても有意な違いは認められなかった。

4. ハチミツ最終投与後の血糖値とインスリン値

各臓器の採取前に測定した空腹時と糖負荷60分後のマウスの血糖値を図6(a)に示した。空腹時では各群間で有意な違いは認められなかった。しかし、糖負荷60分後では、ハチミツとの比較において、1×PBS、グルコース、スクロース投与群と有意な違いが見られた（それぞれ $P=0.0015$ 、 $P=0.000057$ 、 $P=0.0016$ ）。さらに、ハチミツ群と正常コントロールとしているC3H群を比較して、0分値でも60分値においても有意な違いは認められなかった。これにより、ハチミツ投与群の血糖値は正常マウスの血糖値とほぼ同じ値を示すということがわかった。この時のインスリン分泌量を図6(b)に示した。空腹時のインスリン分泌では各群で有意な違いは認められなかったが、各種糖投与後60分においては、血糖値の上昇に対応するようにインスリン分泌量の上昇を示した。ハチミツ群と有意差のあった1×PBS群とグルコース群においては、同様に有意な増加を示した（それぞれ $P=0.013$ 、 $P=0.0088$ ）。また、スクロース群においては有意ではないが増加傾向を示した。さらに、インスリン分泌量においても、ハチミツ群とC3H群において有意な違いは示さないという結果になった。

5. 血清成分の解析

各種糖を投与して60分後の各血中脂肪関連物質（遊離脂肪酸、中性脂肪、総コレステロール）の濃度の比較を図7(a)(b)(c)に示した。(a)より、遊離脂肪酸において、ハチミツ群と比較してPBS、グルコース、スクロースの遊離脂肪酸は有意な増加を示した（それぞれ $P=0.008$ 、 0.045 、 0.014 ）。また、C3Hはハチミツ群と比較して有意な減少を示した（ $P=0.035$ ）。(b)(c)のトリグリセライドやコレステロールにおいてはハチミツ群と比較して、NSYマウスでは有意な違いは認められなかった。しかし、そのどちらにおいてもNSYマウスではハチミツ投与群の血中濃度が最も低い値を示すという結果になった。

6. 遺伝子発現の比較

ハチミツ投与により高血糖状態が緩和した要因を遺伝子発現からアプローチする為に各グループの肝臓において関連遺伝子の発現量を比較した。その結果を図8に示した。結果はPBS投与群の遺伝子発現量を定量化し、他のグループと比べることにより比較した。Pparg1において、PBS投与群と比較してスクロースとハチミツ群は有意に高い発現を示した（それぞれ $P=0.024$ 、 $P=0.0019$ ）。しかし、それ意外の遺伝子について有意な違いは認められなかった。

また、同様に脂肪組織において関連遺伝子の発現量を比較した。その結果を図9に示した。結果はPBS投与群の遺伝子発現量を定量化し他のグループと比較した。脂肪組織での関連遺伝子として5つの遺伝子の発現量を比較したが、そのどれにおいても各群間で有意な違いは認められなかった。

7. Western blot 解析

ハチミツがグルコースやスクロースほど血糖値を上昇させなかったことから、肝臓において、Aktシグナル経路について調べた。その結果を図9に示した。糖新生抑制に関与しているFoxO1のリン酸化を調べてみたところ、スクロース投与群と比較して、PBS投与群、ハチミツ投与群は、それぞれ有意に低い値を示した。（それぞれ $P=0.0011$ 、 $P=0.0036$ ）。また、グリコーゲン合成に関与しているGSK3 β のリン酸化を調べると、グルコース投与群とスクロース投与群と比較して、PBS投与群、ハチミツ投与群はそれぞれ、有意に低い値を示した（vsグルコースそれぞれ $P=0.0045$ 、 $P=0.012$ ）（vsスクロースそれぞれ $P=0.023$ 、 $P=0.028$ ）。Aktのリン酸化については、有意差がみられなかった。これらの結果より、ハチミツはAktシグナル経路に影響していないと考えられる。

インスリンシグナル経路に影響がなかったために、肝臓において、脂質代謝に関わるタンパクについて調べた。結果を図10に示した。脂肪酸合成に関与するFasについて調べた結果、ハチミツ投与群とスクロース投与群の間に有意差はみられなかった（図11）。しかし、同様に脂肪酸合成に関与するACCのタンパク量を測定したところ、PBS投与群、グルコース投与群と比較して、ハチミツ投与群において有意な増加がみられた（ $P=0.015$ 、 $P=0.029$ ）。糖新生の抑制、脂肪酸酸化亢進、脂質合成抑制に関わるAMPKのリン酸化について調べた結果、グルコース投与群、スクロース投与群と比較して、PBS投与群とハチミツ投与群において有意な増加がみられた（vsグルコース $P=0.017$ 、 $P=0.027$ ）（vsスクロース $P=0.017$ 、 $P=0.027$ ）。

骨格筋のメンブレンにおいてGlut4のタンパク量について調べた。結果を図12に示した。Glut4のタンパク量に各群間に有意差はみられなかった。

考 察

各種糖投与後の体重変化をみるとスクロース投与群が最も体重が増加していた。また、スクロース群は、後腹膜脂肪重量と総脂肪重量において最も高い値を示した。これらより、スクロースは脂肪量を増加させ、その結果として、インスリン抵抗性や高血糖を誘導すると考えられる。一方、ハチミツは、スクロースほど体重や脂肪重量が増加しなかった。一般的なハチミツの組成は、フルクトース 35%、グルコース 38%、水分 18%、オリゴ糖 6%、その他 3% である。フルクトースとグルコースの割合がほぼ等しいことから、スクロースと大きく異なる点はその他の成分であると考えられる。そのため、ハチミツに含まれるビタミンなどの微量物質が体重増加を抑えている可能性が考えられる。

各種糖を 12 週間連続投与した後に OSTT を行うと、ハチミツ投与群がスクロース投与群と比較して、有意に低い血糖値を示した。この結果より、ハチミツはスクロースと比較し耐糖能障害を起こしにくいと考えられる。この原因としても、ハチミツに含まれるビタミンなどの微量物質が耐糖能障害を阻害していると考えられる。

OSTT において、ハチミツは他の糖ほど血糖値を上昇させなかった。しかし、投与 6 週後に行った ITT では、各種糖投与群の間に有意差はみられなかった。そのため、ハチミツがスクロースほど耐糖能障害を引き起こさなかった要因に、インスリン抵抗性は関係しないと考えられる。

連続投与 14 週間後にインスリン分泌量を測定すると、ハチミツ投与群では、有意にインスリン分泌量が減少するという結果になった。これより、ハチミツ投与群ではインスリン感受性が一部保たれており、他の群でインスリン感受性が障害されていると考えることができる。しかし、ITT では、有意な違いは認められなかったことから、ITT 後の 8 週間の投与でインスリン感受性になんらかの影響があったのかもしれない。

血中脂肪関連物質に関しては、ハチミツ投与群において遊離脂肪酸が有意に減少していた。このことから、ハチミツには遊離脂肪酸を減らす効果があるのではないかと考えられる。遊離脂肪酸の増加は、グルコースの取り込みの阻害やインスリン抵抗性を引き起こすことが知られている⁶⁾。そのため、ハチミツ投与群において、耐糖能障害が抑えられていた要因の一つとして、遊離脂肪酸の減少が関係しているのかもしれない。

ハチミツの糖尿病に対する効果をより解明するために遺伝子発現を比較した。肝臓において、遺伝子発現を比較すると、ハチミツ投与群とスクロース群で Pparg1 の発現が有意に高まっていた。Pparg1 が活性化すると、インスリン抵抗性の改善やグルコース取り込みの増加が起きることが知られている⁷⁾。しかし、今回の実験では、ハチミツ投与群だけでなく、スクロース投与群でも Pparg1 が活性化していたことから、ハチミツの持つ耐糖能障害抑制効果に Pparg1 の活性化は関係ないかもしれない。脂肪組織における遺伝子発現については、有意差がみら

れなかった。

ハチミツがグルコースやスクロースほど血糖値を上昇させなかったメカニズムを解明するために、各糖類でのタンパク量及びリン酸化による発現を比較した。ハチミツがインスリン経路を改善するという報告があったため、インスリンシグナル経路について調べた⁸⁾。Akt のリン酸化について調べたが、各種糖間に有意差はみられなかった。また、Akt の下流にある FoxO1、GSK3 β のリン酸化において、スクロース投与群と比較すると、ハチミツ投与群は低い値を示した。GSK3 β と FoxO1 がリン酸化されると、グリコーゲン合成と糖新生抑制が起き、血糖値が低下することが知られている^{9,10)}。しかし、今回の実験において、ハチミツ投与群でこれらのタンパクのリン酸化は亢進していなかった。そのため本研究では、ハチミツはインスリンシグナルに影響しないと考えられる。

インスリンシグナルパスウェイに影響がみられなかったため、肝臓における脂肪酸合成に関わるタンパクのタンパク量及びリン酸化による発現を比較した。ACC のタンパク量において、スクロース投与群と比較して、ハチミツ投与群に有意な増加がみられた。ACC は脂肪酸合成を引き起こすため、ハチミツ群において、脂肪酸合成が亢進しているように見える。しかし、ハチミツ投与群では、他の糖投与群と比較して、遊離脂肪酸が減少している。そのため、今回の実験において、ハチミツ投与群の ACC のタンパク量が増加した要因は分からなかった。AMPK のリン酸化を比較した結果、グルコース投与群やスクロース投与群と比較して、ハチミツ投与群は有意に増加していた。AMPK がリン酸化されると、糖新生の抑制、脂肪酸酸化亢進、脂質合成抑制が生じることが知られている¹¹⁾。そのため、ハチミツ投与群でみられた血糖値の低下と遊離脂肪酸の減少は、AMPK のリン酸化の増加が関与している可能性がある。

まとめると、今回の実験でハチミツはスクロースとの比較において、体重増加の抑制、血糖値上昇の抑制、血中遊離脂肪酸の減少作用があることが確認された。そして、遺伝子の発現量や、タンパク量及びリン酸化による発現を比較した結果、ハチミツ投与群では、AMPK のリン酸化が高くなっていた。これより、ハチミツ投与群で血糖値上昇や血中遊離脂肪酸が抑えられた原因の1つとして AMPK のリン酸化亢進が考えられる。しかし、糖尿病へのハチミツの影響については、まだ明らかにされていないことが多いことから、さらに他の糖尿病モデル動物を利用し詳細に調べる必要がある。

参考文献

- 1) Whiting DR et al. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Dec; 94(3): 311–21. doi: 10.1016/j.diabres. 2011.10.029. Epub 2011 Nov 12.
- 2) Al-Quwaidhi AJ et al. Comparison of type 2 diabetes prevalence estimates in Saudi Arabia from a

- validated Markov model against the International Diabetes Federation and other modelling studies. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014 Mar; 103(3):496–503. doi: 10.1016/j.diabres.2013.12.036. Epub 2014 Jan 3.
- 3) Bahrani M et al. Effects of natural honey consumption in diabetic patients: an 8-week randomized clinical trial. *Int J Food Sci Nutr.* 2009 Nov; 60(7): 618–26. doi: 10.3109/09637480801990389.
 - 4) Nemoseck TM et al. Honey promotes lower weight gain, adiposity, and triglycerides than sucrose in rats. *Nutr Res.* 2011 Jan; 31(1): 55–60. doi: 10.1016/j.nutres.2010.11.002.
 - 5) Boden G et al. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes.* 2005 Dec; 54(12): 3458–65.
 - 6) Janani, C. et al. PPAR gamma gene a review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.* Volume 9, Issue 1, January-March 2015, Pages 46–50
 - 7) Omotayo O. et al. Honey–A Novel Antidiabetic Agent. *Int J Biol Sci.* 2012; 8(6): 913–934 Published online 2012 Jul 7. doi: [10.7150/ijbs.3697](https://doi.org/10.7150/ijbs.3697)
 - 8) Welsh GI & Proud CG. Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem J.* 1993 Sep 15; 294 (Pt 3): 625–9.
 - 9) Guo S. Molecular Basis of Insulin Resistance: The Role of IRS and Foxo1 in the Control of Diabetes Mellitus and Its Complications. *Drug Discov Today Dis Mech.* 2013 Jun 1; 10(1–2): e27–e33.
 - 10) Ben Djoudi Ouadda A et al. Increased hepatic lipogenesis in insulin resistance and Type 2 diabetes is associated with AMPK signalling pathway up-regulation in *Psammomys obesus*. *Biosci Rep.* 2009 Jun 15 ; 29(5): 283–92. doi: 10.1042/BSR20080141.
 - 11) Coughlan, KA et al. AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2014; 7: 241–253. Published online 2014 Jun 24. doi: [10.2147/DMSO.S43731](https://doi.org/10.2147/DMSO.S43731)

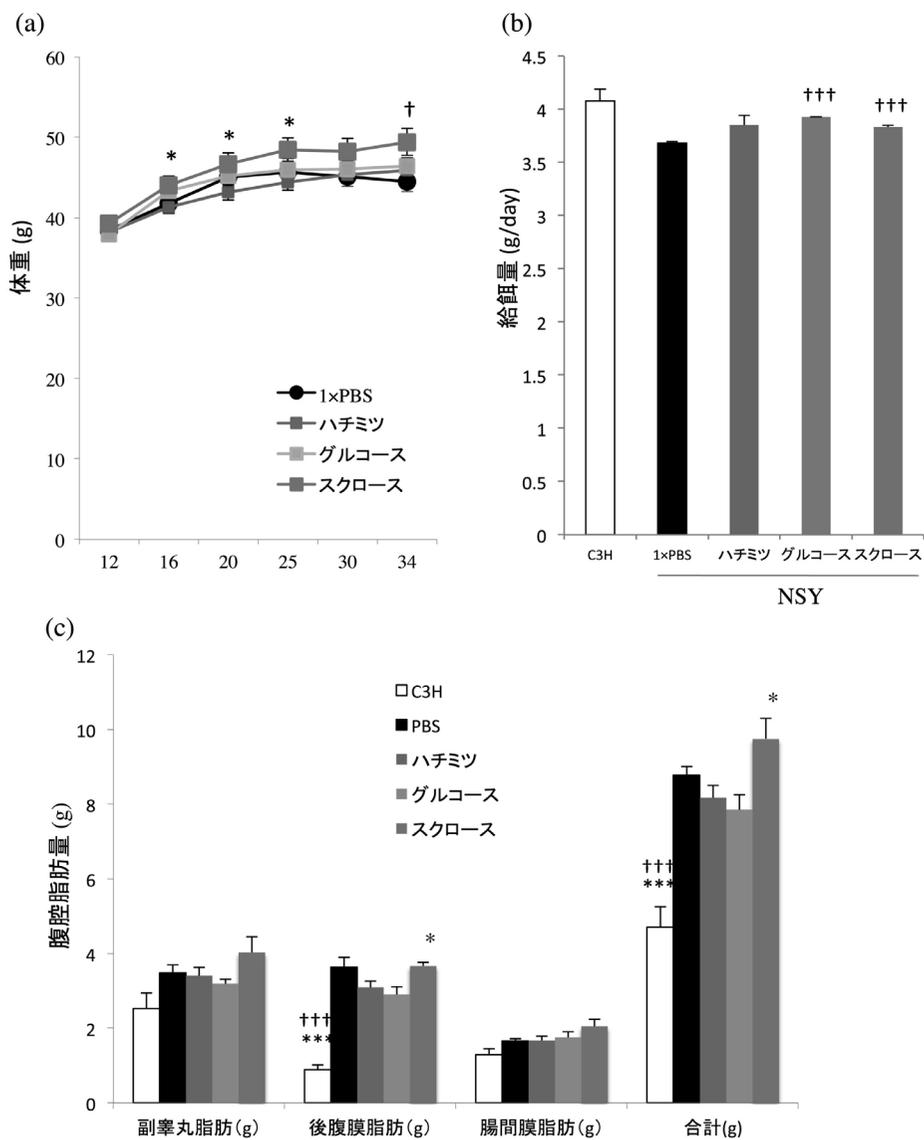


図1 体重、脂肪量と糖。a)糖投与と体重推移。b)摂餌量。c)腹腔脂肪含量。

* : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$ vs. ハチミツ

† : $p < 0.05$, ††† : $p < 0.001$ vs. PBS

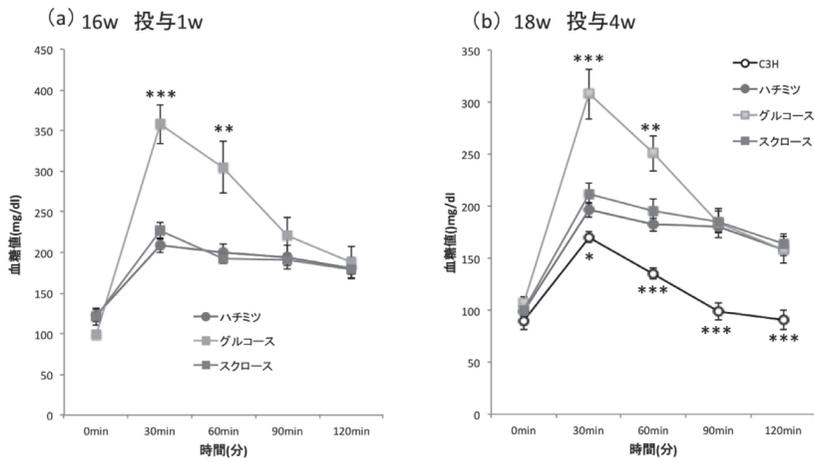


図2 NSY マウスにおける各種糖投与 1 週間後の OSTT の結果 (a)。NSY マウスと C3H マウスにおける各種糖投与 4 週間後の OSTT の結果 (b)。白の丸が C3H、赤の丸がハチミツ、緑の四角がグルコース、灰色の四角がスクロースを表す。
* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs. ハチミツ
† : $p < 0.05$, †† : $p < 0.01$, ††† : $p < 0.001$ vs. PBS

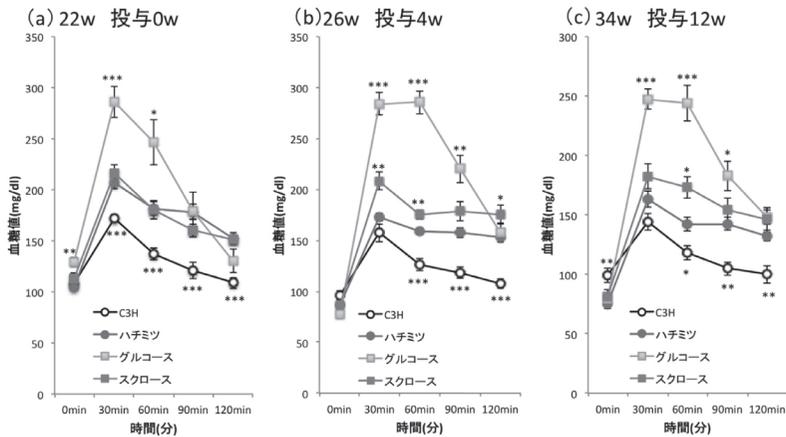


図3 NSY マウスと C3H マウスにおける各種糖投与 0 週後 (a) と 4 週後 (b) と 12 週後 (c) の OSTT の結果。白の丸が C3H、赤い丸がハチミツ、緑の四角がグルコース、灰色の四角がスクロースを表す。
* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs. ハチミツ
† : $p < 0.05$, †† : $p < 0.01$, ††† : $p < 0.001$ vs. PBS

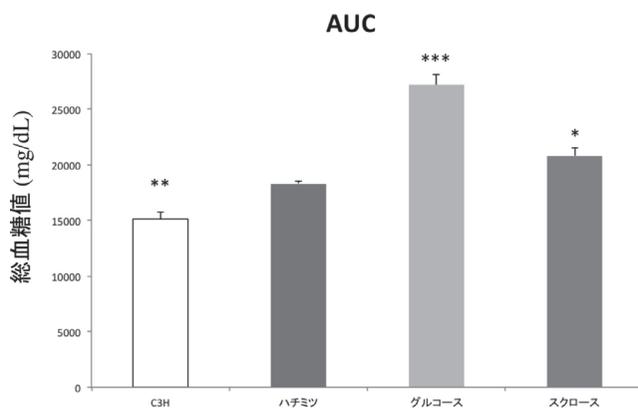


図 4 NSY マウス (26 週齢) と C3H マウス (29 週齢) において、各種糖投与開始から 4 週後に行った OSTT の AUC。白が C3H、赤がハチミツ、緑がグルコース、灰色がスクロースを表す。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs. ハチミツ

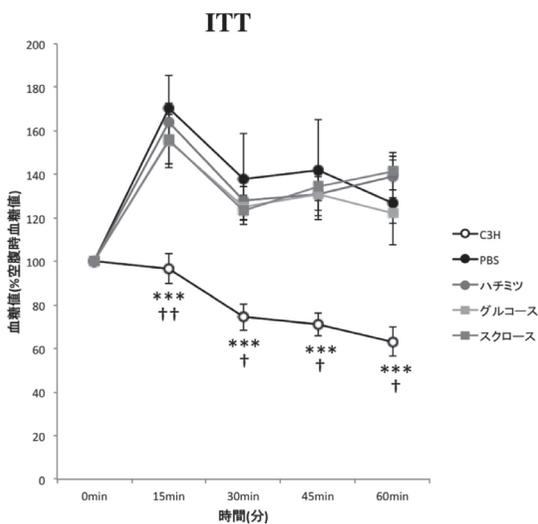


図 5 NSY マウスと C3H マウスにおける各種糖投与 6 週間後の ITT の結果。白の丸が C3H、黒の丸が PBS、赤い丸がハチミツ、緑の四角がグルコース、灰色の四角がスクロースを表す。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs. ハチミツ

† : $p < 0.05$, †† : $p < 0.01$, ††† : $p < 0.001$ vs. PBS

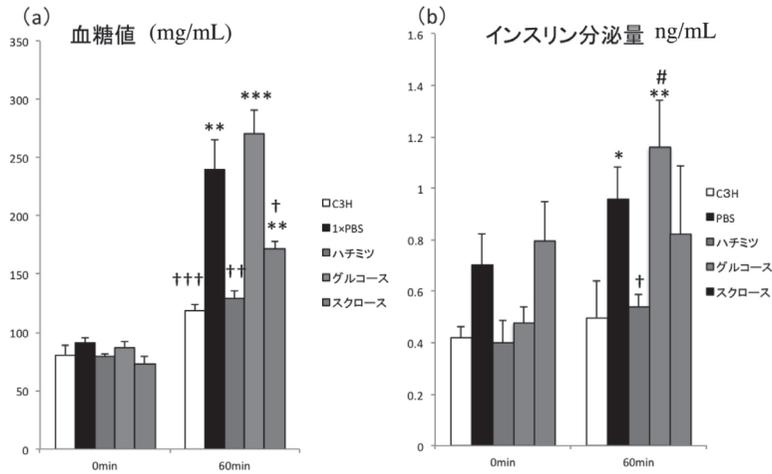


図6 NSY マウス (36 週齢) と C3H マウス (39 週齢) において各種糖投与を開始から 14 週間後に行った空腹時と各種糖負荷後 60 分の血糖値 (a) とインスリン分泌量 (b)。白が C3H、黒が PBS、赤がハチミツ、緑がグルコース、灰色がスクロースを表す。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs. ハチミツ
 † : $p < 0.05$, †† : $p < 0.01$, ††† : $p < 0.001$ vs. PBS
 # : $p < 0.05$, ## : $p < 0.01$, ### : $p < 0.001$ vs. C3H

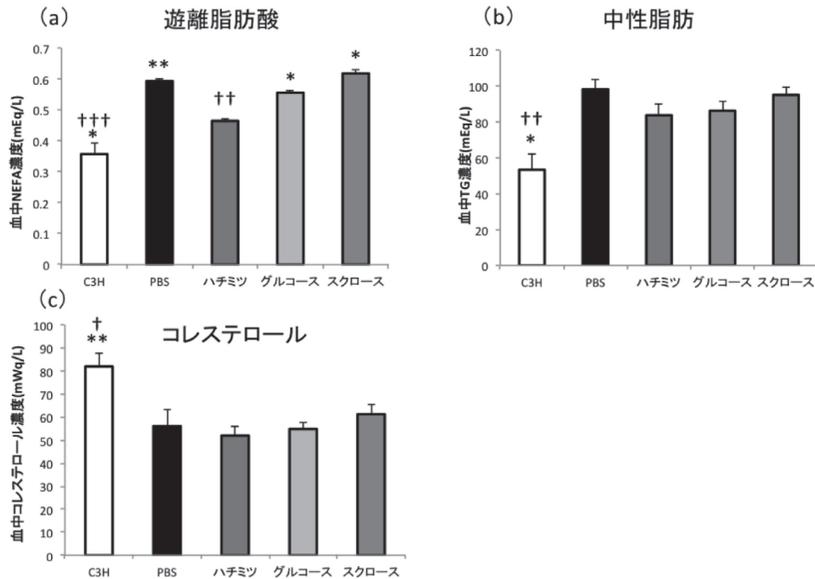


図7 NSY マウス (36 週齢) と C3H (39 週齢) の血中遊離脂肪酸 (a)、中性脂肪 (b)、コレステロール (c) の比較。白が C3H、黒が PBS、赤がハチミツ、緑がグルコース、灰色がスクロースを表す。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs. ハチミツ
 † : $p < 0.05$, †† : $p < 0.01$, ††† : $p < 0.001$ vs. PBS

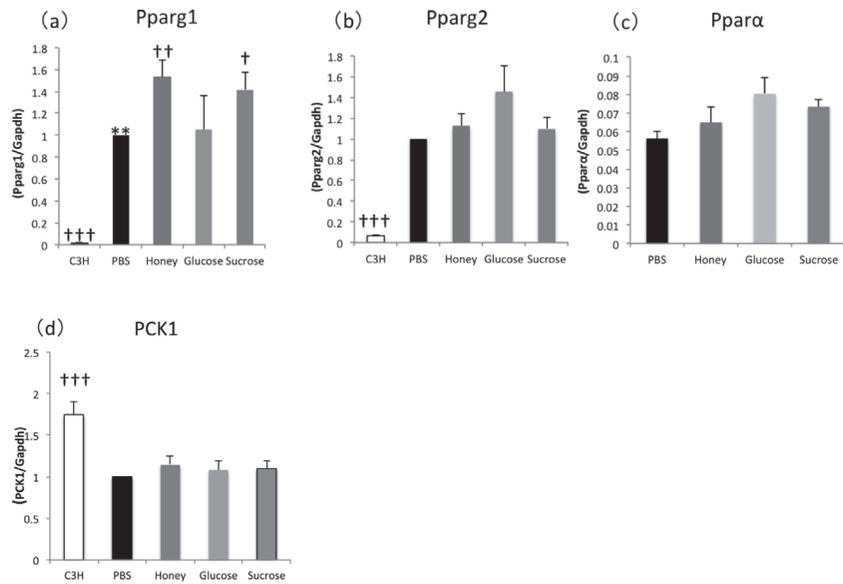


図8 NSY マウス (36 週齢) と C3H (39 週齢) の肝臓での遺伝子発現の比較。白が C3H、黒が PBS、赤がハチミツ、緑がグルコース、灰色がスクロースを表す。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs. ハチミツ

† : $p < 0.05$, †† : $p < 0.01$, ††† : $p < 0.001$ vs. PBS

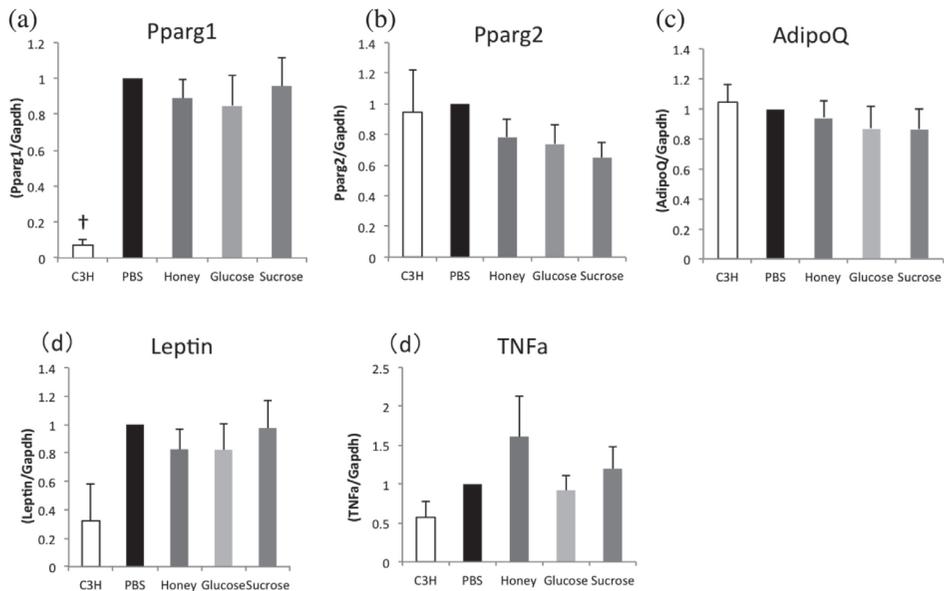


図9 NSY マウス (36 週齢) と C3H マウス (39 週齢) の脂肪組織での遺伝子発現の比較。白が C3H、黒が PBS、赤がハチミツ、緑がグルコース、灰色がスクロースを表す。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs. ハチミツ

† : $p < 0.05$, †† : $p < 0.01$, ††† : $p < 0.001$ vs. PB

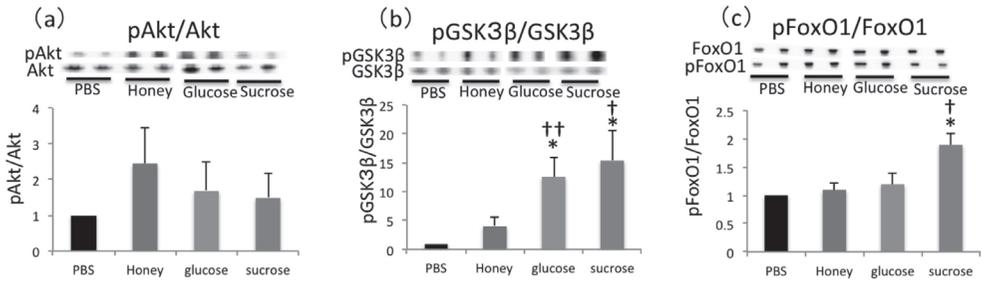


図 10 NSY マウス (36 週齢) と C3H マウス (39 週齢) の肝臓におけるタンパク量及びリン酸化による発現の比較。白が C3H、黒が PBS、赤がハチミツ、緑がグルコース、灰色がスクロースを表す。
 * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs. ハチミツ
 † : $p < 0.05$, †† : $p < 0.01$, ††† : $p < 0.001$ vs. PBS

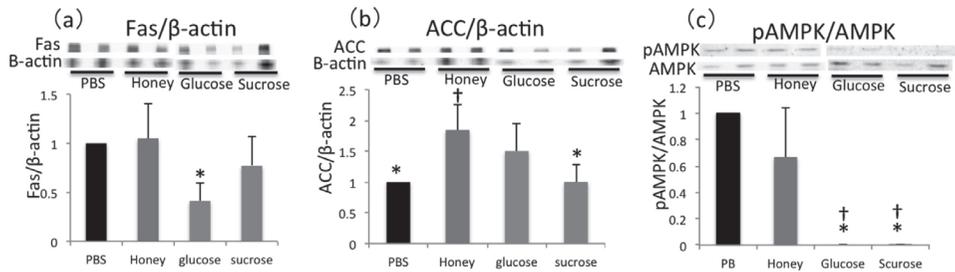


図 11 NSY マウス (36 週齢) の肝臓におけるタンパク量及びリン酸化による発現の比較。黒が PBS、赤がハチミツ、緑がグルコース、灰色がスクロースを表す。
 * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs. ハチミツ
 † : $p < 0.05$, †† : $p < 0.01$, ††† : $p < 0.001$ vs. PBS

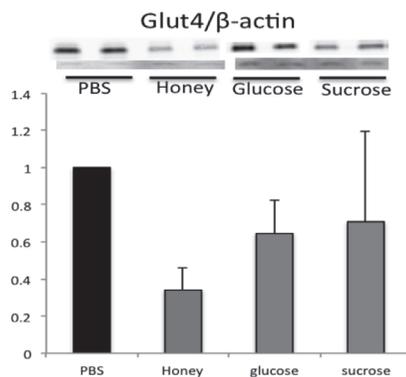


図 12 NSY マウス (36 週齢) の骨格筋におけるタンパク量及びリン酸化による発現の比較。黒が PBS、赤がハチミツ、緑がグルコース、灰色がスクロースを表す。
 * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs. ハチミツ
 † : $p < 0.05$, †† : $p < 0.01$, ††† : $p < 0.001$ vs. PBS

Effect on body weight and plasma glucose by administration of Japanese natural honey in NSY diabetic mice

Keiya TANIMURA
Ayaka TANIDA
Yoshiko TANAKA
Daiki SASAKI
Kozo MATSUMOTO

Abstract

Objective: We investigated whether Japanese natural honey is effective on body weight reduction and hyperglycemia in NSY diabetic mice.

Methods: Male NSY and C3H mice were used. NSY mice were divided into several groups according to sugar species. The oral sugar tolerance test (OSTT) was performed in overnight fasting on 4 weeks, and 12 weeks after first administration of honey and sugars. One week later after the end of OSTT, tissues were dissected for extraction of RNAs and proteins. mRNA and protein levels were determined using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and Western blotting, respectively.

Results: We found that both the body weight and the blood glucose levels were significantly lower in honey treated mice than in sucrose treated mice. The sensitivity to insulin was higher in honey treated group than in sucrose group. The serum NEFA level was significantly lower in the honey treated group. pAmpk protein levels in the livers were also increased in honey treated group than in sucrose treated group.

Conclusion: Honey improves hyperglycemia by suppressing gluconeogenesis and glycogenolysis in the livers.

Keywords : Japanese honey, diabetes, blood glucose, body weight, NSY mice