

## Royal Jelly 長期投与による Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットのインスリン抵抗性改善作用

野村政孝,<sup>a</sup> 圓尾奈緒美,<sup>a</sup> 座間味義人,<sup>a</sup> 高取真吾,<sup>b</sup> 土井志真,<sup>c</sup> 川崎博己<sup>\*,a</sup>

### Effect of Long-term Treatment with Royal Jelly on Insulin Resistance in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats

Masataka NOMURA,<sup>a</sup> Naomi MARUO,<sup>a</sup> Yoshito ZAMAMI,<sup>a</sup>  
Shingo TAKATORI,<sup>b</sup> Shima DOI,<sup>c</sup> and Hiromu KAWASAKI<sup>\*,a</sup>

<sup>a</sup>Department of Clinical Pharmaceutical Science, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama City 700-8530, Japan, <sup>b</sup>Department of Pharmacology, Shujitsu University School of Pharmacy, 1-6-1 Nishigawara, Okayama City 703-8516, Japan, and <sup>c</sup>Department of Research and Development, Yamada Apiculture Center, Inc., 194 Ichiba, Kagamino-cho, Tomata-gun, Okayama 708-0393, Japan

(Received July 19, 2007; Accepted July 23, 2007)

Royal jelly (RJ) is known to have abundant nutritional properties and a variety of biological activities. To investigate the effects of RJ on insulin resistance, 10-week-old Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, a type 2 diabetic model, were treated for 4 weeks with RJ (10, 30, and 300 mg/kg, *p.o.*). RJ treatment tended to decrease systolic blood pressure and significantly decreased serum levels of insulin and the Homeostasis Model Assessment ratio, an index of insulin resistance. In isolated and perfused mesenteric vascular beds of OLETF rats, RJ treatment resulted in significant reduction of the sympathetic nerve-mediated vasoconstrictor response to periarterial nerve stimulation (PNS) and potentiation of the calcitonin gene-related peptide (CGRP) nerve-mediated vasodilator response to PNS, compared with that in untreated OLETF rats. However, RJ treatment did not significantly affect norepinephrine-induced vasoconstriction and CGRP-induced vasodilation. These results suggest that RJ could be an effective and functional food to prevent the development of insulin resistance.

**Key words**—royal jelly; insulin resistance; Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats; periarterial nerve function

## 緒 言

Royal jelly (RJ) はミツバチの中で働き蜂の下咽頭腺等から分泌される乳白色のクリーム状物質で、女王蜂となる幼虫にのみ与えられるものである。RJには3大栄養素であるタンパク質、炭水化物、脂質を始めとして、人の健康に不可欠な必須アミノ酸のすべてを含むアミノ酸を主体に、各種ビタミン、ミネラルなど約40種類もの成分が豊富にバランスよく含まれている。<sup>1)</sup> RJの成分について、これまでに多くの生理活性物質が見出されている。そのなかで、RJがアンジオテンシン変換酵素 (ACE)

阻害作用,<sup>2)</sup> 及びインスリン様作用<sup>2,3)</sup>を有するという報告がされている。このことはRJが肥満、高血圧、耐糖能異常などを示すインスリン抵抗性を改善させる可能性を示唆する。

そこで本研究では、2型糖尿病のモデル動物であるOLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラットを用いて、RJを長期間経口投与し、RJ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、OLETFラット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RJの影響については、ほとんど知られていないので、RJ長期投与におけるこれら機能変化についても検討した。

## 材 料 と 方 法

**1. 実験動物** 実験には、OLETFラット (大塚製薬より提供) を用い、4週齢より飼育を開始し

<sup>a</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科臨床薬学分野,  
<sup>b</sup>就実大学薬学部薬効解析学, <sup>c</sup>榊山田養蜂場本社研究開発部

\*e-mail: kawasaki@pheasant.pharm.okayama-u.ac.jp

た。動物は、ポリプロピレン不透明ケージ (W220 × L320 × H135 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) 及び飲料水は自由に与えた。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; AM8:00, 消灯; PM8:00) に設定した。本研究は岡山大学動物実験ガイドラインにしたがって実施した。

**2. RJ 長期投与プロトコール** OLETF ラット10週齢に4週間RJを経口投与した。RJは酵素処理RJ粉末 (山田養蜂場より提供) を用いた (Lot No. 020605)。RJは水で希釈し、10, 30 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、Controlとして、2 ml/kg の容量で水道水を経口投与した。

**3. 収縮期血圧、血液検査値及び空腹時血糖値の測定** 血圧の測定は尾動脈の収縮期血圧を非観血的血圧測定装置 (Unicom 社製) を用い、tail cuff plethysmograph 法にて2週間毎に測定した。血液検査及び空腹時血糖値の測定は、12時間絶食後、ジエチルエーテル軽麻酔下、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テストリップS (ベーリンガー・マンハイム社製) 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、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)、血清中トリグリセリド値はトリグリセリドE-テストワコー (和光純薬) を用いて測定した。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。<sup>4)</sup>

**4. 摘出腸間膜動脈血管床標本の灌流** ラットを pentobarbital-Na の腹腔内投与により麻酔して開腹後、Kawasaki らの方法<sup>5)</sup>に従ってラット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 (組成; NaCl 120 mM, KCl 5.0 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25.0 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, EDTA-2Na 0.027 mM, CaCl<sub>2</sub> 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毎摘出した。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。標本を灌流装置に装着後、Krebs 液をペリスタポンプ (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) を表面灌流した。Krebs 液にはあらかじめ95% O<sub>2</sub> 及び5% CO<sub>2</sub> 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おいて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。

**5. 実験プロトコール** Krebs 液の灌流開始30分後、灌流圧が安定したのを確認し、経壁電気刺激 (PNS; 4, 8, 12 Hz) 及び norepinephrine (NE) (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 μM), methoxamine (7 μM) を含む Krebs 液を灌流し、灌流圧を一定レベルまで上昇させたのち、PNS (2, 4, 8 Hz) 及び rat CGRP (25, 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。NE, 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 μl/12 s) した。実験の最後に papaverine (100 μM; 大日本製薬) を灌流し、最大弛緩を測定した。

血管反応性の変化は、血管収縮反応では灌流圧の上昇分 ( $\Delta$  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。

**6. 統計学的解析** 得られた実験値は平均値 ± 標準誤差 (mean ± S.E.) で表した。得られた結果は、F 検定及び一元配置分散分析 (ANOVA) を行ったのち、Tukey の多重比較検定法を用いて統計学的に解析した。危険率5%未満を有意差ありと判定した。

## 結 果

1. 体重、飲水量及び摂食量に及ぼす RJ 長期投与の影響 OLETF ラットの体重は加齢と共に増加したが、体重、飲水量及び摂食量は RJ 投与による有意な変化は認められなかった(データ未表示).

2. 血液検査値及び収縮期血圧に及ぼす RJ 長期投与の影響

2-1. 血糖値、血清中インスリン値および HOMA-R 値に及ぼす影響 Figure 1 には RJ 投与前と 4 週間投与終了時の血糖値、血清中インスリン値の変化及び HOMA-R 値を示した. RJ 投与前 10 週齢時における血糖値は、Control 群 (RJ 非投与群)  $125.64 \pm 7.52$  mg/dl, RJ 10 mg/kg 投与群  $109.50 \pm 4.03$  mg/dl, RJ 30 mg/kg 投与群  $130.11 \pm 7.34$  mg/dl, RJ 300 mg/kg 投与群  $137.92 \pm 8.11$  mg/dl であった. また RJ 投与により、空腹時血糖値には有意な変化がみられなかった (Fig. 1(A)).

RJ 投与前 10 週齢時における血清中インスリン値は、Control 群  $0.98 \pm 0.22$  ng/ml, RJ 10 mg/kg 投与群  $1.05 \pm 0.31$  ng/ml, RJ 30 mg/kg 投与群  $1.03 \pm 0.23$  ng/ml, RJ 300 mg/kg 投与群  $1.01 \pm 0.33$  ng/ml であった. Control 群では、加齢に従って、血清中インスリン値は著明に上昇し、高インスリン血症となった. また RJ 投与群において血清中インスリン値は、RJ の用量に依存して低下し、300 mg/kg 投与群で Control 群に比較して有意な低下がみられた (Fig. 1(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、Control の OLETF ラットでは上昇した. HOMA-R 値は RJ 投与量に依存して低下し、RJ 300 mg/kg 投与群において Control 群 (14 週齢) に比べて有意に小さい値を示した.

2-2. 血清中トリグリセリド値に及ぼす影響 Figure 2 に RJ 投与中の血清中トリグリセリド値の推移を示した. RJ 投与前 10 週齢時における血清中トリグリセリド値は、Control 群  $117.45 \pm 9.21$  mg/dl, RJ 10 mg/kg 群  $116.90 \pm 6.59$  mg/dl, RJ 30 mg/kg 群  $136.43 \pm 4.39$  mg/dl, RJ 300 mg/kg 群  $101.91 \pm 2.39$  mg/dl であった. Control 群の血清中トリグリセリド値は 12 週及び 14 週齢で軽度の増加がみられたが有意な差は認められなかった. RJ 10 及び

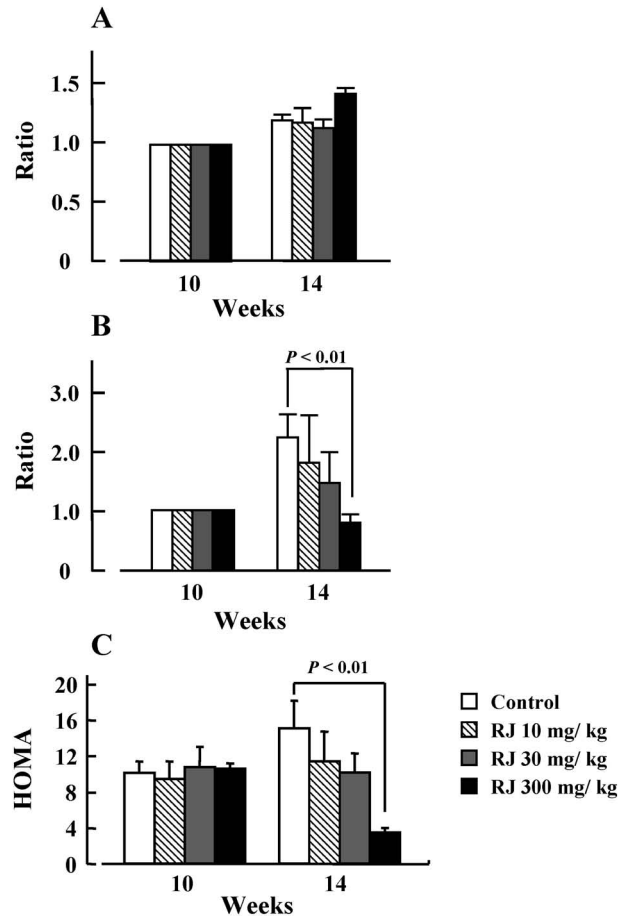


Fig. 1. Effect of 4-Week Treatment with Royal Jelly (RJ) on Fasting Blood Glucose (A), Fasting Serum Insulin Level (B) and the Index of Insulin Resistance (plasma glucose  $\times$  plasma insulin/22.5) (Homeostasis Model Assessment-ratio; HOMA-R) (C) at 10 and 14 Weeks in OLETF Rats

Values at 14 week in A and B indicate as ratio over 10 week-old rats. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 6-8 experiments.

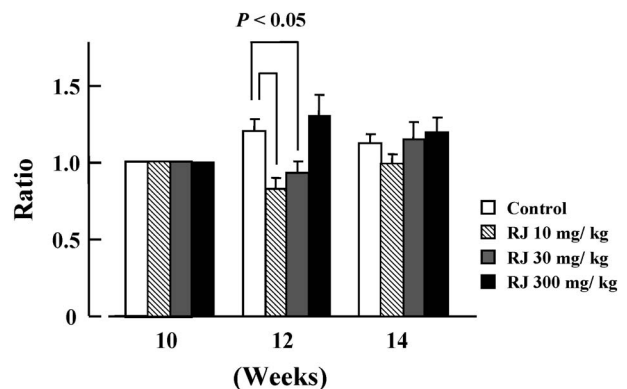


Fig. 2. Effect of 4-Week Treatment with Royal Jelly (RJ) on Serum Triglyceride during the Experimental Period in OLETF Rats

Values at 12 and 14 week indicate as ratio over 10 week-old rats. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 6-8 experiments.

30 mg/kg 投与群において、投与後 2 週間において Control 群と比較して有意に低い値を示した。しかし、投与 4 週間の 14 週齢時では有意な変化は認められなかった。RJ 300 mg/kg 投与群では Control 群と同程度の値を示した (Fig. 3)。

**2-3. 収縮期血圧に及ぼす影響** RJ 投与前から 4 週間投与終了時の収縮期血圧の変化を Fig. 3 に示した。Control 群では加齢とともに血圧上昇が観察された。また、RJ 10 及び 30 mg/kg 投与群では Control 群と同様の血圧の上昇を示した。一方、RJ 300 mg/kg 投与群においては、投与開始 2 週間では有意な変化はみられなかったが、Control 群と比較して低い値を示す傾向がみられた。

### 3. 血管反応性に及ぼす RJ 長期投与の影響

**3-1. 交感神経性収縮反応の変化** 静止緊張下の OLETF ラット腸間膜動脈灌流標本において PNS (4–12 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 (NE) の血管収縮によることが確認されている。<sup>5)</sup> 外因性に与えた NE 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。<sup>5)</sup> RJ 4 週間投与を行った OLETF ラット腸間膜動脈灌流標本における交感神経性の血管収縮反応の変化を Fig. 4 に示した。PNS (4–12 Hz) による収縮反応は RJ 10 及び 30 mg/kg 投与群においては Control 群の反応と比べてほとんど変化はみられなかった。RJ 300 mg/kg 投与群では、PNS 12 Hz による反応が Control 群に比べて有意に小さかった。一方、外因性に与えた NE 注入によ

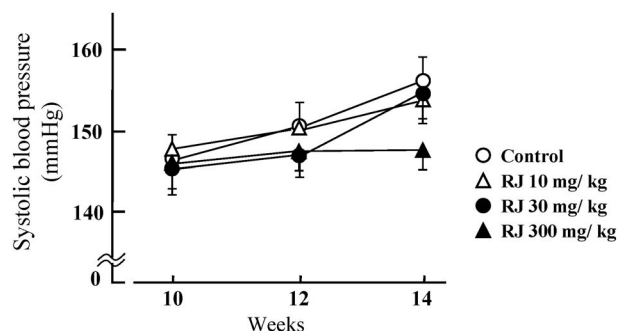


Fig. 3. Effect of 4-Week Treatment with Royal Jelly (RJ) on Systolic Blood Pressure during the Experimental Period in OLETF Rats

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 6–8 experiments.

る収縮反応は Control 群と比較して、RJ 投与群で有意な変化はなかった。

**3-2. CGRP 神経性弛緩反応の変化** 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 (2–8 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。<sup>6)</sup> RJ 4 週間投与を行った OLETF ラット腸間膜動脈灌流標本における CGRP 神経性の血管弛緩反応の変化を Fig. 5 に示した。PNS による弛緩反応は 10 mg/kg 投与群においてのみ Control 群と比較して有意に大きい反応を示したが、他の用量では有意な変化は認められなかった。一方、

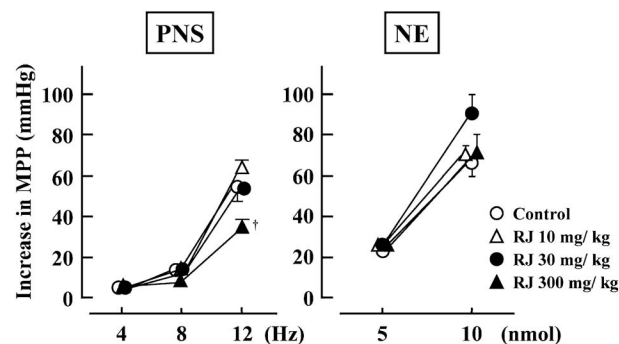


Fig. 4. Effect of 4-Week Treatment with Royal Jelly (RJ) on Vasoconstrictor Responses to Periarterial Nerve Stimulation (PNS) or Norepinephrine (NE) Injection in Perfused Mesenteric Vascular Beds with Resting Tone in OLETF Rats

Each value represents mean  $\pm$  S.E. of 5–8 experiments. <sup>†</sup> $p < 0.05$  vs. control.

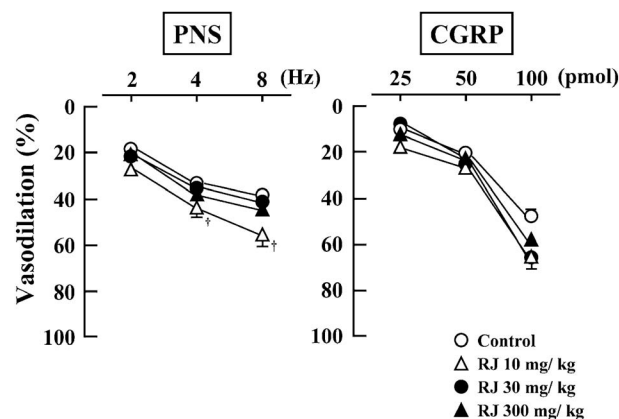


Fig. 5. Effect of 4-Week Treatment with Royal Jelly (RJ) on Vasodilator Responses to Periarterial Nerve Stimulation (PNS) or CGRP Injection in Perfused Mesenteric Vascular Beds with Active Tone in OLETF Rats

Each value represents mean  $\pm$  S.E. of 5–8 experiments. <sup>†</sup> $p < 0.05$  vs. control.

外因性に CGRP を注入しても同様な弛緩反応が観察されるが、この反応は血管平滑筋上の CGRP<sub>1</sub> 受容体を介した反応である。<sup>6)</sup> この弛緩反応は、Control 群と比較して、RJ 投与群で有意な変化はなかった。

## 考 察

近年、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インスリン抵抗性が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その概念は広がりつつある。OLETF ラットは、肥満を伴う 2 型糖尿病のモデル動物として開発され、<sup>7)</sup> 加齢により、血清中インスリン値は上昇し、高インスリン血症及びインスリン抵抗性を示すことが報告されている。<sup>8)</sup> 本研究においても、10 週齢の Control 群を 4 週間飼育すると血清中インスリン値は約 2 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く、また、インスリン抵抗性の指標である HOMA-R 値も上昇がみられるため、この時期の OLETF ラットではインスリン抵抗性が起こっていると考えられる。OLETF ラットに RJ を長期投与すると、血清中インスリン値は RJ 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 HOMA-R 値も RJ の用量依存性に低下し、Control 群に比べて低い値を示した。これらの結果は、RJ 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。

RJ は腸管内で膵リパーゼによる脂肪分解を阻害してカイロミクロンを減少させることにより、血清中の中性脂肪を低下させることが報告されている。<sup>9)</sup> 本研究において OLETF ラットに RJ 10 及び 30 mg/kg を 2 週間投与すると血清中のトリグリセリド値は Control 群と比較して有意に低い値を示した。一方、投与 4 週間の 14 週齢時では血清脂質低下作用は消失し、Control 群とほぼ同じ値にまで回復した。これは RJ 自体に脂質糖質が多く含まれており、長い投与期間では脂質が蓄積し、RJ の脂質低下作用を相殺したと考えられる。事実、高用量の 300 mg/kg 投与群では脂質低下作用はみられず、逆にトリグリセリド値は Control 群より高い値を示している。このような現象は既に報告されており、RJ には至適用量があることが示唆されている。<sup>10,11)</sup>

一方、OLETF ラットでは加齢に従い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関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、<sup>12)</sup> 腎臓尿細管でのナトリウム再吸収促進作用、<sup>13)</sup> 血管平滑筋細胞増殖作用<sup>14)</sup>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 OLETF ラットでは高インスリン血症となっているため、血圧が上昇したと推察される。RJ 10 及び 30 mg/kg 投与群における血圧値は Control 群と同様の血圧値を示したが、高用量の RJ 300 mg/kg 投与群においては、Control 群と比較して低い値を示す傾向がみられた。高用量の RJ 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、RJ 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。

静止緊張下の OLETF ラット腸間膜動脈灌流標本において、RJ 300 mg/kg 投与群標本では、交感神経性収縮反応 (PNS 12 Hz) が Control 群の反応に比較して有意に小さかった。一方、外因性に与えた NE 注入による収縮反応は Control 群と比較して、RJ 投与群で有意な変化はなかった。したがって、RJ 投与群ラットにおいて、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 NE 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 OLETF ラットにおいて、加齢に伴い血管周囲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 (データ未発表)。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いる。<sup>15)</sup> これらのことから、高インスリン血症を示す OLETF ラットでは、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。OLETF ラットの高インスリン血症に伴い亢進する交感神経に対して、RJ はインスリン抵抗性を改善することで交感神経機能を抑制したのではないかと考えられる。

一方、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標本では、PNS (2-8 Hz) により CGRP 神経性の血管弛緩反応が出現する。<sup>6)</sup> CGRP 神経性弛緩反応は 10 mg/kg 投与群においてのみ Control 群と比較して有意に大きい反応を示したが、他の用量では有意な変化は認められなかった。

一方、外因性 CGRP 注入による CGRP<sub>1</sub> 受容体を介した弛緩反応は、Control 群と比較して、RJ 投与群で有意な変化はなかった。以上の結果、RJ 投与群ラットにおいて、血管平滑筋上の CGRP<sub>1</sub> 受容体の感受性は変化せず、CGRP 神経からの CGRP の遊離が促進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 OLETF ラットにおいて、その進行に伴い CGRP 神経機能の減弱が起きていることを明らかにしている(データ未発表)。RJ はインスリン抵抗性に伴い低下する CGRP 神経機能に対してインスリン抵抗性を改善することで防御的に作用し、CGRP 神経機能に対して促進的に働く可能性が示唆される。以上、RJ はインスリン抵抗性の改善効果を通して血管周囲神経機能変化も改善し、これらの作用が相まって血圧を低下させたと考えられる。

## 結 論

2 型糖尿病のモデルである OLETF ラットに RJ の 4 週間経口投与を行った。その結果、血清中インスリン値及び HOMA-R 値は RJ の用量に依存して低下し、血圧は RJ の高用量で低下傾向を示した。また、OLETF ラット腸間膜動脈灌流標本を用いた血管周囲神経機能の変化に対しては、OLETF ラットのインスリン抵抗性の進行に伴う交感神経機能の亢進と CGRP 神経機能の減弱を有意に改善した。以上の結果より、RJ 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) Matsuka M., *Honeybee Sci.*, **1**(1), 31-41 (1980).
- 2) Okuda H., Kameda K., Moerimoto C., Matsuura Y., Chiaki M., Ming J., *Honeybee Sci.*, **19**(1), 9-14 (1998).
- 3) Kramer K. J., Tager H. S., Childs C. N., Speirs R. D., *J. Insect Physiol.*, **23**(2), 293-295 (1977).
- 4) Matthews D. R., Hosker J. P., Rudenski A. S., Naylor B. A., Treacher D. F., Turner R. C., *Diabetologia*, **28**(7), 412-419 (1985).
- 5) Kawasaki H., Nuki C., Saito A., Takasaki K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **252**, 403-419 (1990).
- 6) Kawasaki H., Takasaki K., Saito A., Goto K., *Nature*, **335**(6186), 164-167 (1988).
- 7) Kawano K., Hirashima T., Mori S., Saitoh Y., Kurosumi M., *Diabetes*, **41**(11), 1422-1428 (1992).
- 8) Hirashima T., Man Z. W., Mori S., Kawano K., *Diabetes Front.*, **9**(4), 477-480 (1998).
- 9) Li-Kun H., Kawashima M., Takaku T., Kimura Y., Okuda H., *Nippon Taishitugaku Zasshi*, **63**(1-2), 78-82 (2001).
- 10) Tamura T., Fujii A., Kuboyama N., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **89**, 73-80 (1987).
- 11) Fujii A., *Honeybee Sci.*, **16**(3), 97-105 (1995).
- 12) Lembo G., Napoli R., Capaldo B., Rendina V., Iaccarino G., Volpe M., Trimarco B., Sacca L., *J. Clin. Invest.*, **90**(1), 24-29 (1992).
- 13) Rocchini A. P., Katch V., Kveselis D., Moorehead C., Martin M., Lampman R., Gregory M., *Hypertension*, **14**(4), 367-374 (1989).
- 14) Hsueh W. A., Law R. E., *Am. J. Cardiol.*, **84**(1), 21-24 (1999).
- 15) Rowe J. W., Young J. B., Minaker K. L., Stevens A. L., Pallotta J., Landsberg L., *Diabetes*, **30**(3), 219-225 (1981).