

総説

グリケーションと老化

永井竜児・海野雄加・堀内正公

熊本大学大学院医学薬学研究部病態生化学分野

Biological Significance of Glycation in Aging

Ryoji Nagai, Yuka Unno and Seikoh Horiuchi

Department of Biochemistry, Kumamoto University Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences

Summary Accumulation of advanced glycation end-products (AGE) of the Maillard reaction in tissue proteins increases with the pathogenesis of diabetic complications and atherosclerosis. This strongly suggests an association of AGE for the development of age-related disorders. Since this reaction proceeds non-enzymatically (almost all of the proteins are in accordance with reducing sugar concentration and the half-life of each protein), it is different from enzymatic post-translational modification such as phosphorylation and acetylation of some specific proteins. Although the formation of Amadori products, relatively stable intermediates of the reaction, is reversible, the formation of AGE is an irreversible reaction, indicating that AGE-formation causes the irreversible denaturation of proteins *in vivo*. The AGE research originally began in the field of food chemistry and has expanded to *in vivo* study since 1990 because of the development of polyclonal and monoclonal antibodies against AGE-modified proteins. These immunochemical approaches have greatly contributed to understanding the biological significance of AGE in the pathogenesis of age-enhanced diseases. Furthermore, several AGE inhibitors have shown promise in model systems for inhibiting both the Maillard reaction and the development of diabetic complications.

Key words: AGE, diabetic complication, atherosclerosis, aging, aldehydes

1. はじめに

糖尿病合併症・動脈硬化症などの老化に伴う病態で、蛋白の糖化反応後期生成物である AGE (Advanced Glycation End-product) が注目されている。本反応はグリケーション (glycation), あるいは発見者の名前に由来してメイラード反応と呼ばれているが、酵素的・可逆的に進行する特定蛋白のリン酸化やアセチル化とは根本的に異なり、非酵素的に、なおかつ、糖濃度及び個々の蛋白の寿命に依存して、ほぼ全ての生体蛋白に進行する翻訳後修飾反応の一つである。また、本反応の前期中間体であるアマドリ転位物は比較的安定であるが、その生成は可逆反応であるのに対して、後期反応である AGE の生成は不可逆的な反応である。したがって、一度ある種の蛋白に AGE 化が進行すると、その蛋白は不可逆的な修飾・変性を受けたことになる。1990 年代に入り、AGE を特異的に認識する抗体 (抗 AGE 抗体) を用いた免疫学的解析によって、AGE が糖尿病合併症・動脈硬化症などの老化及び、

老化を基盤とした病態と密接な関連があることが明らかとなった。現在では、生体における AGE 生成を阻害することによって、糖尿病合併症を抑制する試みがさかんに研究されており、既にいくつかの阻害剤の有効性が確認されている。本稿では、AGE 生成機構および、老化によって促進される病態とグリケーションとの関与について述べたい。

2. グリケーションとは

当初、蛋白の糖化反応 (グリケーション) は食品の加工、貯蔵する際に起こる褐変反応として広く食品化学者の間で研究が行われてきたが、1975 年にヘモグロビン β 鎖の N 末端バリン残基にグルコースが結合したアマドリ転位物である HbA1c が生体から同定され、さらに、1980 年代に入り後期生成物である AGE の特徴の一つである蛍光性物質 (excitation: 370 nm, emission: 440 nm) が、脳硬膜のコラーゲンに加齢に伴って蓄積すること、また、糖尿病患者は健常人よりも有意に高値であることが示され、生体での

グリケーションが注目されるに至った¹⁾。その後、抗AGE抗体を用いた免疫学的検出法が報告され、AGEが加齢に伴ってヒト水晶体蛋白に蓄積し²⁾、また、糖尿病性腎症及び慢性腎不全の腎臓³⁾、粥状動脈硬化病変部⁴⁻⁶⁾などに顕著なAGE蓄積が確認され、AGEが老化及び、老化を基盤とした病態と密接な関連があることが明らかとなってきた。

上述のごとく、グリケーションの最も特徴的な点として、糖による蛋白の翻訳後修飾が非酵素的に、なおかつ、不可逆的に進行すること、さらに、蛋白の種類よりも、存在する時間(寿命)に依存して本反応が進行することがあげられる。実際、グリケーションを受けている生体蛋白は多数存在する。血液蛋白では、糖尿病の臨床マーカーとして測定されているHbA1cや糖化アルブミンのみならず、LDLやHDL、また、寿命が120日と長い赤血球の膜蛋白もグリケーションを受けているが、それらの大半が前期中間体であるアマドリ転位物である。アマドリ転位物は活性酸素種の発生源となるが(図1)、自らも活性酸素種によって酸化され、主要なAGE構造体と知られるN^ε-(carboxymethyl)lysine(CML)などに変化する。CMLは糖尿病との関与のみならず、肺線維症の肺泡マクロファージ⁷⁾、家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS)の神経細胞内⁸⁾など、酸化ストレスの関与が示唆されて

いる病態でも蓄積が亢進していることが確認されている。また、当初、生体におけるグリケーションは主としてグルコースと蛋白との長期的な反応によって進行すると考えられていたが、本反応の進行に伴って生成するglyoxalや3-deoxyglucosone、また、後に詳述する解糖経路や炎症部位より酵素的に産生されるmethylglyoxalやglycolaldehyde(GA)などの反応性の高いアルデヒド類から、短期間に生体蛋白がAGE化する経路も明らかとなってきた(図1)。さらに、AGE修飾を受けた蛋白(以下AGE蛋白)は、血管内皮細胞やマクロファージなどの細胞膜表面に発現するAGE受容体に作用して、様々な細胞現象を惹起することも知られている。例えば、AGE蛋白は*in vitro*で網膜血管内皮細胞と反応し、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を産生し、血管新生を促進することから、AGEは糖尿病性増殖網膜症の発症因子の一つと考えられている⁹⁾。現在までに、酸化LDL受容体であるSR-A(scavenger receptor type A)¹⁰⁾、CD36¹¹⁾、LOX-1¹²⁾、HDL受容体であるSR-BI(scavenger receptor class B type I)¹³⁾、その他megalin¹⁴⁾、RAGE(receptor for AGE)¹⁵⁾がAGE受容体として機能することが報告されている。したがって、生体の病変局所に蓄積したAGE構造体は単なる蓄積物ではなく、AGE受容体を介して糖尿病性の血

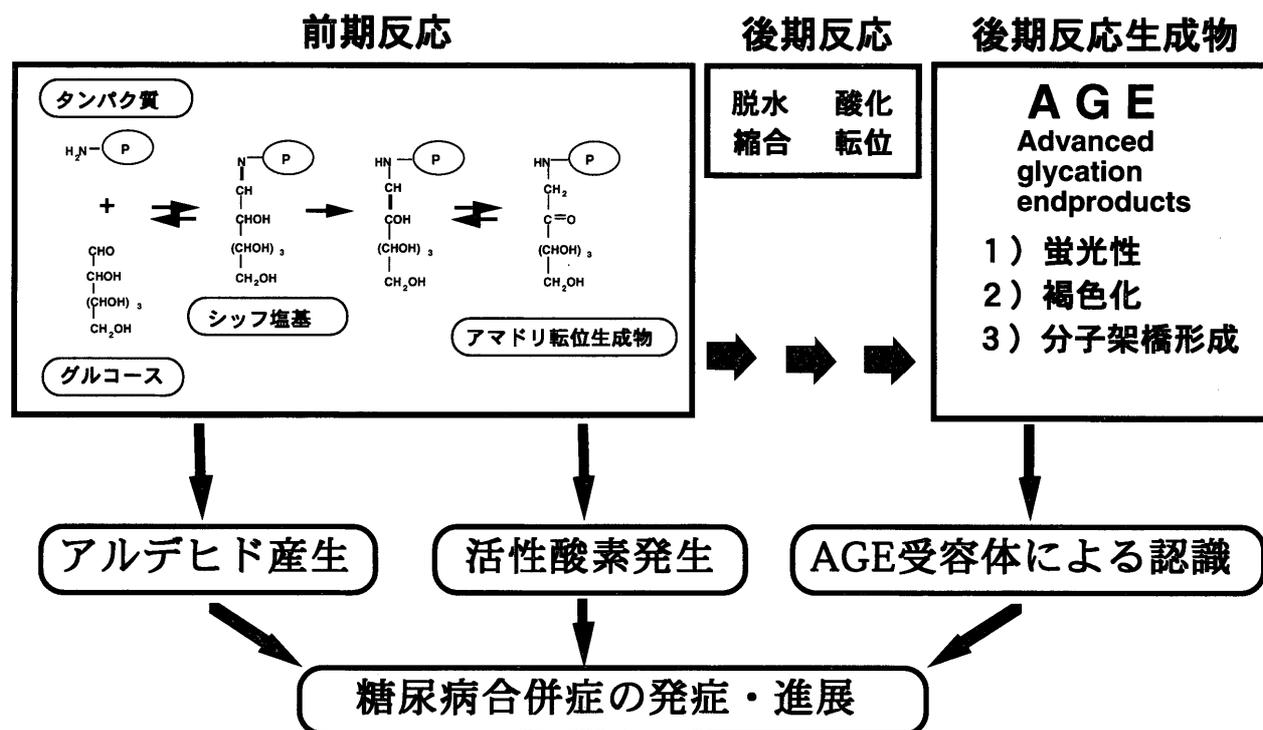


図1 メイラード反応

管合併症の増悪因子として作用している可能性も考えられている (図1)。

3. AGE 生成経路

グリケーションは還元糖のアルデヒド基と蛋白のアミノ基との非酵素的な反応が初期段階であるため、グルコースに限らずアルデヒド基を有する物質であれば同様な反応が進行する。たとえば、グルコースの自己酸化によって生成する glyoxal, シッフ塩基に由来する GA, シッフ塩基及びアマドリ転位物の分解で生成する methylglyoxal, 3-deoxyglucosone 及び glucosone など、本反応中に生成されるグルコース以外のアルデヒド中間体^{16,17)}によって蛋白の AGE 化が進行する経路が注目されている。さらに, methylglyoxal は細胞内で解糖系およびポリオール経路からも生成し, 例えば, I型糖尿病患者の血中 methylglyoxal 含量は正常者の6倍, 硝子体では2倍程度増加していることが報告されている¹⁸⁾。また, 活性化されたリンパ球系細胞はミエロペルオキシダーゼの発現を介して GA を産生し, さらに GA はリジンと不可逆的に反応して AGE 構造体である GA-pyridine を生成する。GA-pyridine は動脈硬化巣の泡沫化マクロファージ内に顕著に蓄積していることから¹⁹⁾, 動脈

硬化の進展には GA による蛋白の修飾が関与していると考えられる。したがって, 蛋白の AGE 化を誘導するアルデヒドの産生には非酵素的経路及び酵素的経路が存在し, 特に後者は高血糖のみならず, 様々な炎症反応でも促進されることが考えられる (図2)。実際, 動脈硬化病巣での AGE 蓄積は末期腎疾患で促進しており, 特に, AGE の蓄積レベルは透析期間に相関するのに対して糖尿病の罹患期間とは相関性を示さないことが明らかとなっている²⁰⁾。本結果は, 生体での AGE 蓄積は, 単なる高血糖状態のみを反映しているのではなく, 炎症反応等によってアルデヒドの酵素的産生経路が亢進し, 生体蛋白が AGE 化を受ける経路の重要性を示唆している。

また, グリケーション, あるいは炎症を伴う病態から発生した活性酸素によって, LDL をはじめ生体各所に存在する脂質からも, 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), malondialdehyde (MDA), acrolein や glyoxal など, 蛋白を修飾する作用の高い毒性アルデヒドが生成することが報告されている。例えば HNE は蛋白のリジン, ヒスチジン, システインと反応して付加体を生成する。さらに, グルコースの自己酸化同様, 不飽和脂肪酸 (PUFA) の酸化反応によって生成した glyoxal からも蛋白の CML 化が進行する。つ

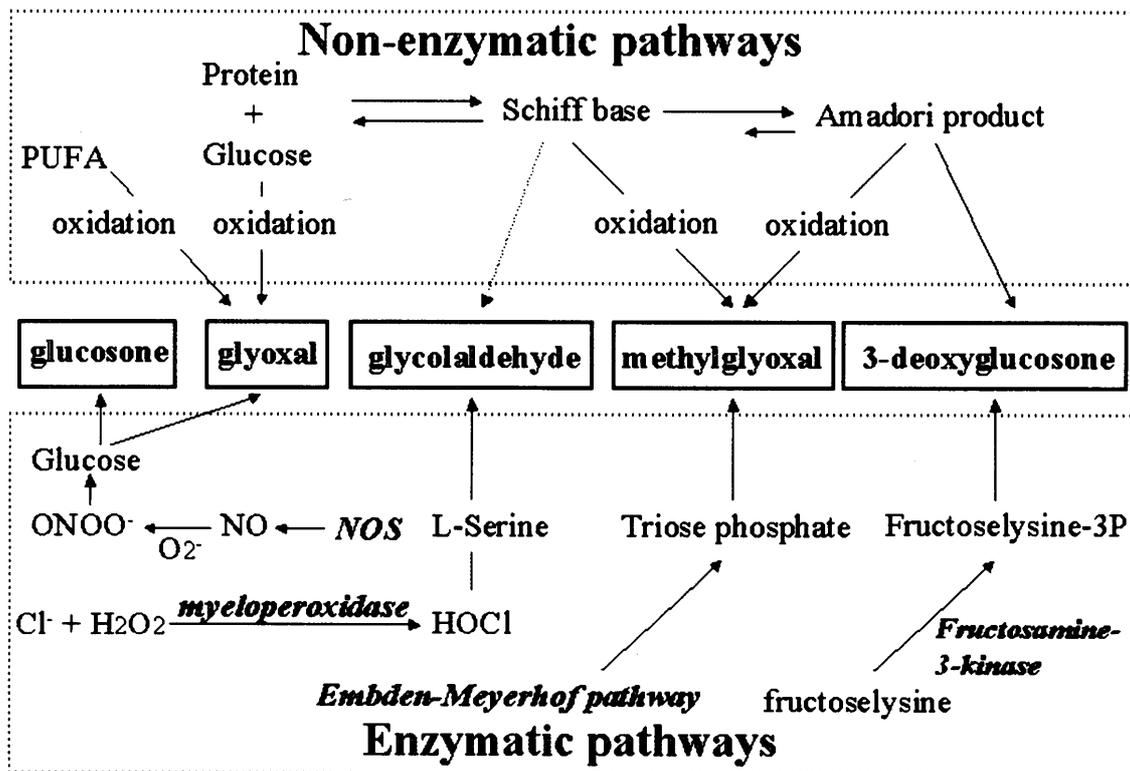


図2 AGE 生成に関与する中間体アルデヒドの産生経路

まり、LDLや細胞膜が酸化する反応（脂質過酸化反応）と蛋白が糖化する反応（グリケーション）は、以前は全く別な現象として捉えられてきたが、活性酸素の関与および、アルデヒドによる蛋白の修飾という点において、共通した側面を持ち合わせていることが明らかとなってきた。実際、ストレプトゾトシンで糖尿病を誘発したラットの腹大動脈コラーゲンにおけるCMLの蓄積量は、MDA及びHNEの蓄積量と高い正の相関性があることも明らかとなっている²¹⁾。

4. グリケーションと活性酸素

アマドリ転位物は、活性酸素によって酸化されてAGE化する反面、活性酸素の発生源でもあることが知られている。例えば、高血糖状態ではLDLの糖化が促進されるが、糖尿病患者より得たLDLは健常者より得たものに比較して銅による酸化修飾を受けやすいが²²⁾、これはアマドリ転位物から発生した $O_2^{\cdot-}$ が関与していると考えられる。また、メイラード反応による糖尿病合併症の発症機構については、血管弛緩因子として知られる一酸化窒素(NO)との関与も考えられる。血管内皮細胞におけるNO合成酵素の転写調節にはインスリンが関与しており、インスリン欠乏下ではNO合成酵素活性が低下していることが知られている²³⁾。さらに、炎症細胞、あるいはアマドリ転位物から発生した $O_2^{\cdot-}$ はNOと迅速に反応してNOを消去する。したがって、インスリン欠乏による持続的な高血糖状態は、①メイラード反応の亢進による $O_2^{\cdot-}$ の産生増加、② $O_2^{\cdot-}$ によるNO分解の亢進、③NO産生の減少による血管拡張能の異常が誘発される。また、NOと $O_2^{\cdot-}$ の反応によってより酸化能の強いペルオキシナイトライト(ONOO⁻)が生成するが、ONOO⁻によって脂質の過酸化反応が更に促進されるとともに、ONOO⁻はアマドリ転位物に作用してCMLを生成する経路も明らかとなっている²⁴⁾。

現在まで、およそ30種程のAGE構造体が同定されているが、中でもCMLは酸加水分解にも安定であり、抗CML抗体を用いて容易に検出されることから、生体試料より頻繁に測定が行われている。CMLは、①アマドリ転位物の開裂、②シッフ塩基の開裂、③グルコースの自己酸化によってglyoxalを介した経路、さらには④脂質の過酸化反応から生成するglyoxalを介して生成することも明らかとなっているが、いずれの経路においてもCMLの生成には酸化反応が必須であることから、CMLは生体における酸化反応のマ

ーカーとして捉えられている^{25,26)}。

5. グリケーションと老化

現在提唱されている主な老化仮説としてプログラム説、エラー破局説、蛋白の翻訳後修飾説などがあげられるが、これらはそれぞれ独立した原因ではなく、他の因子とも密接に関与していると考えられており、グリケーションは後者二つの仮説に直接あてはまる。さらに、時間の経過に依存した自然老化に対して、ウェルナー症候群(Werner syndrome)、ハッチンソン-ギルフォード症候群(Hutchinson-Gilford syndrome)といった病的に老化が促進される早期老化症があることから、老化の過程は必ずしも生物学的な時間(加齢)を単純に反映するものではなく、遺伝因子や環境因子に影響されうるものであることを意味している。特に、糖尿病性網膜症・腎症・神経症、虚血性心疾患、脳血管障害などの直接の原因は、持続する高血糖状態による細小血管および大血管に対する血管障害であるが、「血管の老化」自体が最大の病因であると考えられる。AGEが糖尿病合併症・動脈硬化症などの、血管の老化を基盤とした病態と密接な関連があることは先に述べたが、次に、赤血球及び皮膚コラーゲンについて、老化に伴うAGEの蓄積について述べたい。

赤血球は寿命がおよそ120日と、血中成分では比較的長寿命である。われわれは、ヒト血液から密度勾配遠心法によって、若い赤血球(young erythrocyte)と老化した赤血球(senescent erythrocyte)を分離した結果、senescent erythrocyteの膜蛋白にはCMLが顕著に蓄積していることを明らかにした(図3)²⁷⁾。

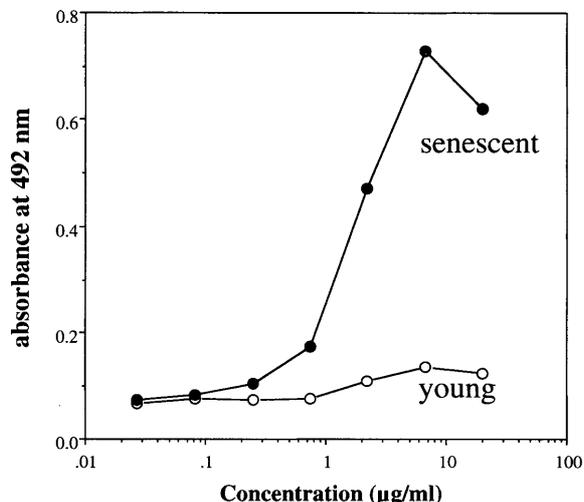


図3 赤血球膜蛋白における加齢に伴うCML蓄積率の変化

本結果は、同一個体から得られた赤血球でも、存在した時間（加齢）の差によって、蛋白のAGE化に差があることを意味している。また、太陽光に含まれる紫外線の作用によって、皮膚の老化が促進される病態（日光性弾性線維症）が報告されているが、同じ個体でも紫外線の非露光部に比較して露光部では、特にエラスチンから形成される弾性線維にCMLの蓄積が顕著に増加していることが明らかとなっている²⁸⁾。現時点では、CMLが蓄積した結果としてエラスチンの産生が増加したのか、あるいはエラスチンの産生が増加した結果としてCML蓄積が促進したのかは明らかではないが、エラスチン分子のCML化は、分子の不可逆的な修飾・変性であることから、本現象は皮膚コラーゲンの代謝に何らかの影響を及ぼしている可能性が十分に考えられる。

6. AGE 自己抗体について

加齢に伴って、あるいは糖尿病合併症などの発症に伴って生体に蓄積したAGEが抗原となり、AGEに対する自己抗体が産生されることが知られている。われわれは、ストレプトゾトシンでラットに糖尿病を誘発し、AGEに対する自己抗体の産生率を検討した結果、正常ラットでは変化が認められないのに対して、糖尿病ラットでは糖尿病の罹患期間に比例してAGE自己抗体の産生が増加することを明らかにしている（図4）²⁹⁾。さらに、ヒトにおいても自己抗体価は健康人に比べて糖尿病患者で上昇し、さらに腎症を併発した糖尿病患者では、微量アルブミン尿、持続性蛋白尿、透析治療と病状の悪化とともに顕著な上昇が認められている。特に、持続性蛋白尿および透析治療を必要と

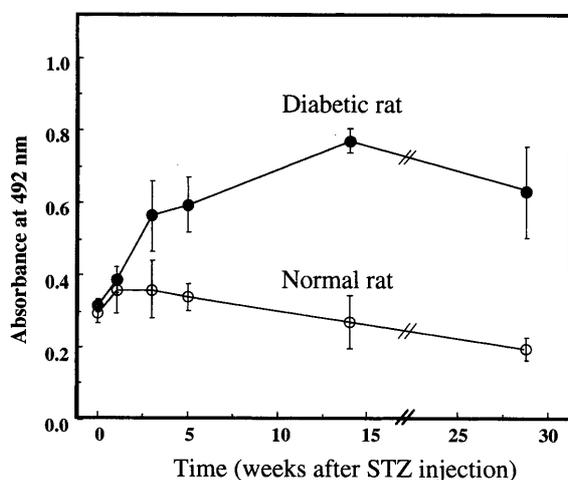


図4 AGEに対する自己抗体産生の変化

する糖尿病患者では、腎症を伴わない糖尿病患者に比較して有意なAGE自己抗体の上昇が認められており、腎症の発症とAGE自己抗体に高い相関性が示されている²⁹⁾。本結果は、糖尿病を伴わない慢性腎症患者においてAGE含量が増加している²⁰⁾という報告とも一致している。したがって、AGE自己抗体が主に糖尿病性腎症や慢性腎不全に対する臨床マーカーとして有用である可能性が示唆されるが、AGE自己抗体の除去が腎症の予防及び治療に貢献できるかは今後の検討課題である。

7. AGE 測定法とその問題点

以前より行われているAGEの定量法として、その蛍光性と褐色性に基づいた吸光度計や蛍光光度計を用いた比色定量法がある。また、ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリーや高速液体クロマトグラフィーを用いたAGEの定量法があるが、これらはAGE含量を正確に測定できるという利点があるのに対して、測定試料に対して数段階の前処理が必要であること、さらに組織内のAGE局在を明確にできないなどの欠点がある。一方、抗AGE抗体を用いた免疫学的測定では、一般に操作が簡便であり、一度に大量の試料の測定が可能である等の利点を有する。したがって、実際のAGE測定に当たっては、機器分析法と免疫学的測定法の両者を目的に応じて使い分ける、もしくは併用することが重要である。特に、免疫学的測定法では、使用する抗AGE抗体の特異性、即ち、抗体が認識する「エピトープ構造」を明確にしておくことが必要条件である。AGEと病態発症のメカニズムを理解するには、AGEの生体内での局在及び、正確な定量法の開発が必要となるが、特に血液中のAGE測定は、血液採取の簡便さから、糖尿病合併症などの病態の診断マーカーとして期待されている。

蛋白上に生成したAGEを機器分析もしくは、抗AGE抗体を用いて定量する際に、測定する試料の可溶性を上げる目的で、アルカリ処理、プロテアーゼ処理および、加熱を伴うSDS処理といった前処理が行われることが多い。しかし、アマドリ転位物（フルクトサミン）をアルカリ処理するとCMLが生成することが明らかとなっている³⁰⁾。同様に、アマドリ蛋白（たとえば糖化ヒト血清アルブミン）に40分間加熱処理を行うと、80°C以上でCML生成が検出され、さらに、100°Cによる加熱処理では、加熱5分でCMLが生成し、その後経時的に増加することも明らかとなっ

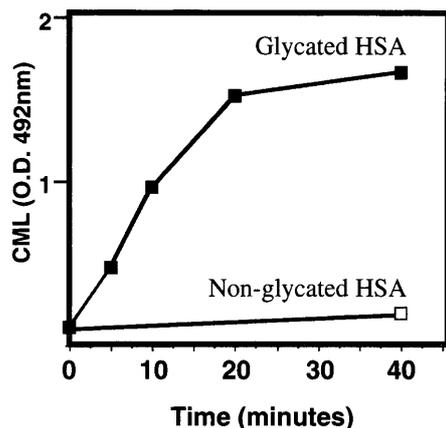


図5 加熱処理に伴う糖化蛋白のCML生成

ている(図5)³¹⁾。本結果は、アルブミン等の血中蛋白の糖化率を、アルカリ処理や加熱処理によってCMLとして簡便に測定できる可能性を示唆するとともに、生体試料中に含まれるAGEを測定する場合は、試料を前処理する条件に十分注意する必要があることを意味している。即ち、測定対象になっているAGE構造体が試料の前処置に対して安定であるか、あるいは、前処置によって人工産物として新たにAGE構造体が生成する可能性が無いかを明確にする必要がある。

8. おわりに

AGEが加齢に依存して生体に蓄積し、さらに、糖尿病合併症などの発症に伴って蓄積が促進することが明らかとなってきた。しかし、生体内で加齢あるいは病態の発症によって「如何なるAGE構造体が蓄積しているのか」、また「蓄積したAGEは病態の発症に如何に関与しているのか」に関する情報は依然として断片的である。したがって、今後、簡便で再現性に富んだ機器分析法並びに免疫学的手法によるAGE測定法の確立が必須であるとともに、生体におけるAGE生成経路を解析することによって、加齢に依存した病態の予防・治療に対して基礎的な情報を提供できるものと期待されている。

文 献

- 1) Monnier VM, Kohn RR, Cerami A: Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 583-587, 1984
- 2) Araki N, Ueno N, Chakrabarti B, et al: Immunohistochemical evidence for the presence of advanced glycation end products in human lens proteins and its positive correlation with aging. *J Biol Chem* **267**: 10211-10214, 1992
- 3) Makino H, Shikata K, Hironaka K, et al: Ultrastructure of nonenzymatically glycosylated mesangial matrix in diabetic nephropathy. *Kidney Int* **48**: 517-526, 1995
- 4) Kume S, Takeya M, Mori T, et al: Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *Am J Pathol* **147**: 654-667, 1995
- 5) Sakata N, Imanaga Y, Meng J, et al: Immunohistochemical localization of different epitopes of advanced glycation end products in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* **141**: 61-75, 1998
- 6) Sakata N, Imanaga Y, Meng J, et al: Increased advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis* **142**: 67-77, 1999
- 7) Matsuse T, Ohga E, Teramoto S, et al: Immunohistochemical localisation of advanced glycation end products in pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol* **51**: 515-519, 1998
- 8) Shibata N, Hirano A, Kato S, et al: Advanced glycation endproducts are deposited in neuronal hyaline inclusions: a study on familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. *Acta Neuropathol* **97**: 240-246, 1999
- 9) Murata T, Nagai R, Ishibashi T, et al: The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. *Diabetologia* **40**: 764-769, 1997
- 10) Nagai R, Matsumoto K, Ling X, et al: Glycolaldehyde, a reactive intermediate for advanced glycation end products, plays an important role in the generation of an active ligand for the macrophage scavenger receptor. *Diabetes* **49**: 1714-1723, 2000
- 11) Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, et al: CD 36, a member of class B scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products (AGE). *J Biol Chem* **276**: 3195-3202, 2001
- 12) Jono T, Miyazaki A, Nagai R, et al: Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE). *FEBS Lett* **30**: 170-174, 2002
- 13) Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A, et al: Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J Biol Chem* **276**: 13348-13355, 2001
- 14) Saito A, Nagai R, Tanuma A, et al: Role of megalin in endocytosis of advanced glycation end products: implications for a novel protein binding to both megalin and advanced glycation end products. *J Am Soc Nephrol* **14**: 1123-1131, 2003
- 15) Neeper M, Schmidt AM, Brett J, et al: Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* **267**: 14998-15004, 1992
- 16) Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS: Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* **344** Pt 1: 109-116, 1999
- 17) 永井竜児, 堀内正公: 糖尿病による酸化ストレス. *Complication* **5**: 166-175, 2000

- 18) Mclellan AC, Thornalley PJ, Benn J, Sonksen PH: Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci* **87**: 21-29, 1994
- 19) Nagai R, Hayashi CM, Xia L, et al: Identification in human atherosclerotic lesions of GA-pyridine, a novel structure derived from glycolaldehyde-modified proteins. *J Biol Chem* **277**: 48905-48912, 2002
- 20) Sakata N, Imanaga Y, Meng J, et al: Increased advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis* **142**: 67-77, 1999
- 21) Meng J, Sakata N, Takebayashi S, et al: Glycooxidation in aortic collagen from STZ-induced diabetic rats and its relevance to vascular damage. *Atherosclerosis* **136**: 355-365, 1998
- 22) Bowie A, Owens D, Collins P, et al: Glycosylated low density lipoprotein is more sensitive to oxidation: implications for the diabetic patient? *Atherosclerosis* **102**: 63-67, 1993
- 23) Aljada A, Dandona P: Effect of insulin on human aortic endothelial nitric oxide synthase. *Metabolism* **49**: 147-150, 2000
- 24) Nagai R, Unno Y, Hayashi MC, et al: Peroxynitrite induces formation of N^ε-(carboxymethyl)lysine by the cleavage of Amadori product and generation of glucosone and glyoxal from glucose: Novel pathways for protein modification by peroxynitrite. *Diabetes* **51**: 2833-2839, 2002
- 25) 永井竜児, 堀内正公: グリケーション. *Diabetes Frontier* **8**: 270-275, 1997
- 26) Nagai R, Ikeda K, Higashi T, et al: Hydroxyl radical mediates N^ε-(carboxymethyl)lysine formation from Amadori product. *Biochem Biophys Res Commun* **234**: 167-172, 1997
- 27) Ando K, Beppu M, Kikugawa K, et al: Membrane proteins of human erythrocytes are modified by advanced glycation end products (AGEs) during aging in the circulation. *Biochem Biophys Res Commun* **258**: 123-127, 1999
- 28) Mizutani K, Ono T, Ikeda K, et al: Photo-enhanced modification of human skin elastin in actinic elastosis by N^ε-(carboxymethyl)lysine, one of the glycooxidation products of the Maillard reaction. *J Invest Dermatol* **108**: 797-802, 1997
- 29) Shibayama R, Araki N, Nagai R, Horiuchi S: Autoantibody against N^ε-(carboxymethyl)lysine: an advanced glycation end product of the Maillard reaction. *Diabetes* **48**: 1842-1849, 1999
- 30) Nagai R, Ikeda K, Kawasaki Y, et al: Conversion of Amadori product of Maillard reaction to N^ε-(carboxymethyl)lysine in alkaline condition. *FEBS Lett* **425**: 355-360, 1998
- 31) Hayashi CM, Nagai R, Miyazaki K, et al: Conversion of Amadori products of the Maillard reaction to N^ε-(carboxymethyl)lysine by short-term heating: Possible detection of artifacts by immunohistochemistry. *Lab Invest* **82**: 795-808, 2002