

Original article

## ***In Vitro* Effects of *Geranium dielsianum* Extract on Glycative Stress**

Katsumi Takahashi<sup>1)</sup>, Keitaro Nomoto<sup>2)</sup>, Misaki Ito<sup>1)</sup>, Hiroko Morii<sup>1)</sup>,  
Wakako Takabe<sup>2)</sup>, Masayuki Yagi<sup>2)</sup>, Yoshikazu Yonei<sup>2)</sup>

1) TOWA CORPORATION Ltd., Tokyo, Japan

2) Anti-Aging Medical Research Center / Glycation Stress Research Center, Graduate School of Life and Medical Sciences,  
Doshisha University, Kyoto, Japan

Glycative Stress Research 2015; 2 (4): 208-216  
(c) Society for Glycation Stress Research

(原著論文)

## ***Geranium dielsianum* 抽出物の糖化ストレスに及ぼす *in Vitro* 作用**

高橋勝美<sup>1)</sup>、榎本慶太郎<sup>2)</sup>、井藤美咲<sup>1)</sup>、森井浩子<sup>1)</sup>、高部稚子<sup>2)</sup>、八木雅之<sup>2)</sup>、米井嘉一<sup>2)</sup>

1) TOWA CORPORATION 株式会社、東京

2) 同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター・糖化ストレス研究センター、京都

### 抄録

**【目的】** *Geranium dielsianum* (GD) は古くからその薬効が伝えられているが、その生理作用は十分に解明されていない。本研究では、GD 抽出物が糖化ストレスを軽減する可能性を模索するため、抗糖化の観点から機能性評価を行った。

**【方法】** GD 抽出物の  $\alpha$  グルコシダーゼ阻害活性評価のためスクラーゼ阻害およびマルターゼ阻害活性を評価した。また、グルコース/タイプ1コラーゲン *in vitro* 反応系において ELISA 法により  $N^{\epsilon}$ -(carboxymethyl) lysine (CML) 生成抑制活性を算出した。抗酸化能評価は Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) を評価した。

**【結果】** GD のスクラーゼ阻害活性は、抽出凍結乾燥物 99.7%、GD 抽出物製品 [GDE]; ミスカミスカ<sup>®</sup> 93.0%、IC<sub>50</sub> は抽出凍結乾燥物 0.027 mg/mL、GDE 0.028 mg/mL であった。GDE のマルターゼ阻害活性は 96.0%、IC<sub>50</sub> は 0.016 mg/mL であった。GDE の CML 抑制活性 (Col.) の IC<sub>50</sub> は 0.0065 mg/mL であり、陽性対照アミノグアニジンに比べ 24.6 倍強かった。GDE の ORAC 測定結果は  $5.1 \times 10^3 \mu\text{mol/g}$  であった。

**【結語】** 本研究より、GDE は食後血糖抑制作用、抗酸化作用、抗糖化作用を有することが *in vitro* 実験にて確認されたため、糖化ストレスを減らす食品として期待できると示唆された。

**KEY WORDS:** *Geranium dielsianum*, advanced glycation end products (AGEs), oxygen radical absorbance capacity (ORAC),  $\alpha$ -glucosidase,  $N^{\epsilon}$ -(carboxymethyl)lysine (CML)

## はじめに

*Geranium dielsianum*(GD)は、フウロソウ科(*Geraniaceae*)の双子葉多年生草本植物で、ペルーの中央アンデス山系の標高3,500 m以上の高地だけにしか生息しないとされ、古くから糖尿、のどの炎症、口内炎への効果、浄血作用等の薬効が伝えられ<sup>1)</sup>、ペルーではGDを煎じて健康茶として親しまれている。GD抽出物はミスカミスカ<sup>®</sup>として製品化されており、腸内環境改善作用<sup>2,3)</sup>が報告されている。

GD抽出物には $\alpha$ グルコシダーゼ阻害活性が報告されている<sup>4)</sup>。 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害活性は糖の $\alpha$ グリコシド結合を加水分解する反応を触媒する酵素であり、この働きを抑える事によって小腸から血液中へのグルコースの吸収を緩やかにできる。

血糖値が上昇した状態は、グルコースや果糖などの還元糖と蛋白が非酵素的に結合して糖化蛋白の生成(糖化反応)が促進される。糖化反応が進むと、糖化最終産物(advanced glycation end products; AGEs)が形成され、組織に沈着<sup>5,6)</sup>、さらにはReceptor for AGEs (RAGE)などの受容体に結合し<sup>7)</sup>、身体のような臓器、組織に障害を惹起する<sup>8)</sup>。これらを総合的に捉えた概念が糖化ストレスである<sup>9)</sup>。従って、血糖値の上昇を抑制するGD抽出物は糖化ストレスを軽減できる可能性がある。そこで本研究ではGD抽出物が糖化ストレスを軽減する可能性を模索するため、抗糖化の観点から機能性評価を行った。

## 方法

### 試料調整

本研究のフローチャートをFig. 1に示す。

試験品としてGDを含むペルー産の素材22種類を用いた。各試料を粉碎し、粉碎物に60%エタノールを加え、室温にて抽出した。抽出液を吸引ろ過し、得られた濾液をエバポレーター減圧濃縮後、凍結乾燥(FD)したものを実験試料とした。また、含水エタノールGD抽出物(GDE; 製品名ミスカミスカ<sup>®</sup>, TOWA CORPORATION株式会社製、東京)も用いた。陽性対照として、糖尿病治療薬グルコバイ錠(バイエル薬品 Bayer Yakuhin, Osaka, Japan)に含まれるアカルボース末(バイエル薬品)を使用した。

### $\alpha$ グルコシダーゼ阻害活性

$\alpha$ グルコシダーゼ阻害活性は、Wistar系雄性ラット(体重300~400 g)から粘膜部分を採取し調製した画分を粗酵素とし、グルコースCII-テストワコー(和光純薬工業 Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)発色試薬1.0 mLを加え、よく混合して37°Cで7分間反応させ、分光光度計(U-2900; Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan)で505 nmにて生成したグルコースを定量した。

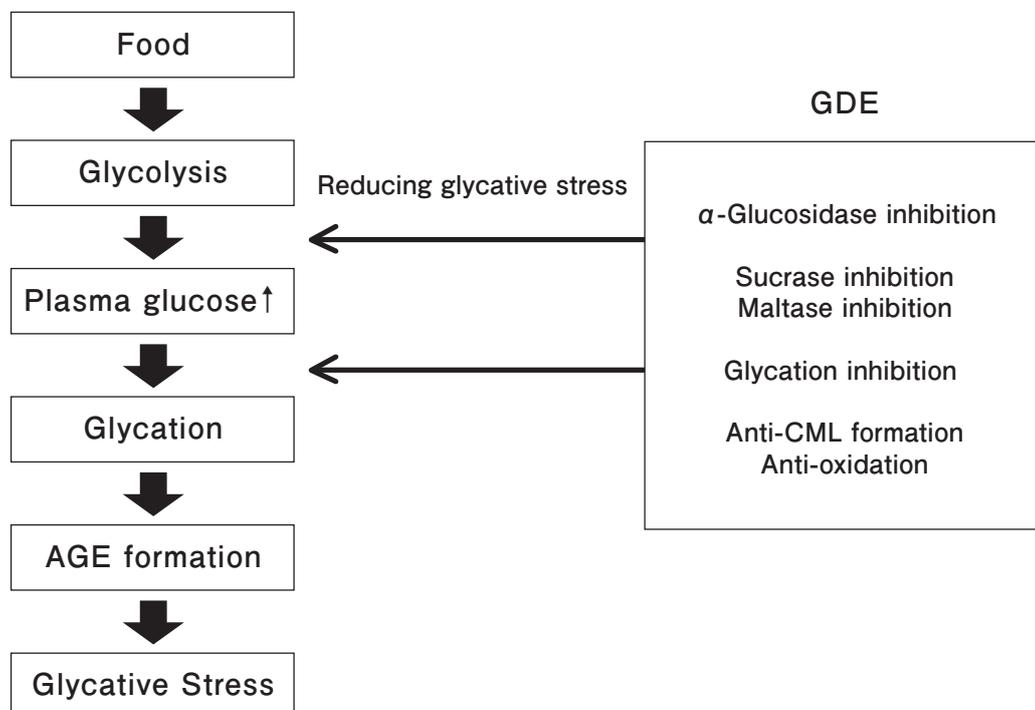


Fig. 1. Experimental flow chart of this study.  
GDE, *Geranium dielsianum* extract (MISKAMISKA<sup>®</sup>).

## 蛋白量測定

蛋白質定量には BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan) を用いた。試料は  $\alpha$  グルコシダーゼ粗酵素画分 (沈殿物) を 0.1 M マレイン酸緩衝液 500  $\mu$ L に溶解した液を蒸留水で 20 倍希釈した。BCA Protein Assay Reagent A : Reagent B = 50 : 1 に調製し、発色剤は 1 試料あたり 1 mL 添加した後 37°C で 30 分間保温し、室温にした後分光光度計 562 nm にて測定した。検量線は Albumin Standard (ウシ血清アルブミン bovine serum albumin: BSA) を用い、蒸留水で 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0 mg/mL に調製した。

## AGEs 生成阻害活性

### ・ CML 生成阻害

グルコース/コラーゲン *in vitro* 反応系を用いて AGEs の一つである  $N^{\epsilon}$ -(carboxymethyl) lysine (CML) の生成抑制活性を以下の方法で測定した。試験品を GDE、陽性対照としてアミノグアニジンを用いた<sup>10)</sup>。各試料 48.1 mg をはかり取り、4.8 mL の蒸留水に溶解した。この 10 mg/mL 溶液を原液として、0.05 ~ 3 mg/mL で 5 濃度の溶液を調製した。アミノグアニジンは 0.1 ~ 3 mg/mL で 4 濃度の溶液を準備した。0.05 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)、1.2 mg/mL コラーゲンタイプ I (ウシ真皮由来コラーゲン; ニッピ Nippi, Tokyo, Japan)、0.4 mol/L グルコース反応液中に、調製した各濃度の試料を 1/10 濃度になるように添加し、60°C で 10 日間インキュベートした。陰性対照としては、試料の代わりに蒸留水を添加したものを用いた。抗 CML 活性の測定にはインキュベート後の反応液を用いた<sup>11, 12)</sup>。

試料反応液中に生成した CML は、CircuLex CML/ $N^{\epsilon}$ -(carboxymethyl) lysine ELISA KIT (株式会社サイクレックス Cyclex, Nagano, Japan) による ELISA 法で定量した。CML 生成抑制活性として IC<sub>50</sub> (50% 生成阻害濃度: 固形分濃度あたり) を算出した。

## 抗酸化活性

GDE の抗酸化能評価のため Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) を実施した (財団法人日本食品分析センター Japan Food Research Laboratories, Tokyo, Japan)<sup>13)</sup>。試料を 50% エタノールで抽出し、2,2'-azobis-(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) と蛍光物質であるフルオレセインの混合液に添加し、励起光 485 nm 蛍光 520 nm の蛍光強度の衰退時間を経時的に測定し、得られた測定時間と蛍光強度のグラフから抗酸化力を評価した。なお、測定結果は 1  $\mu$ mol の Trolox が示す活性を単位とした。

## 結果

### $\alpha$ グルコシダーゼ阻害活性

#### ・スクラーゼ阻害

アカルボース以外の試料を最終濃度 0.1 mg/mL に調製し、スクリーニングした結果を示した (Fig. 2)。各試料の阻害率はアカルボース (0.000125 mg/mL) 38.0%; アカルボース (0.00025 mg/mL) 54.7%; アカルボース (0.0005 mg/mL) 69.8%; GDE (ミスカミスカ®) 93.0%; GD 99.7%; アブタ (Abuta [*Abuta grandifolia* (Mart.) Sandwith]) 30.2%; アチョーテ (Achiote [*Bixa orellana* L.]) 60.5%; アラヤン (Arrayan [*Myrtus communis* L.]) 70.3%; アルテミーサ (Artemisa [*Artemisia vulgaris*]) 5.9%; カラグアラ (Calaguala [*Polypodium calaguala*]) 12.7%; カツアバ (Catuaba [*Erythroxylum catuaba*]) 35.4%; カンチャラグア (Canchalagua [*Schkuhria pinnata*]) 16.8%; セドロロン (Cedron [*Aloysia triphylla*]) 13.6%; チュチュワシ (Chuchuhuasi [*Maytenus Macrocarpa*]) 23.9%; コーヒーベリー (Coffeeberry [*Coffea*]) 27.4%; コムフレイ (Comfrey [*Symphytum officinale* L.]) 4.0%; デイエンテ・デ・レオン (Diente de leon [*Taraxacum officinale* Weber]) 3.4%; フロールブランカ (Flor Blanca [*Buddleja incana*]) 16.0%; イエルバルイサ (Hierba Luisa [*Lippia triphylla*]) 18.1%; ウアマンピンタ (Huamanpinta [*Chuquiraga Spinoza*]) 50.5%; ワイルロー Colorado (Huayruro Colorado [*Ormosis coccinea* Jacq.]) 0.4%; イポルロ (Iporuro [*Alchornea castaneifolia*]) 57.3%; マルバ (Malva [*Malva sylvestris*]) 20.6%; マナユーパ (Manayupa [*Desmodium molliculum*]) 21.4%; ピンピネラ (Pimpinella [*Pimpinella anisum* L.]) 21.8% であった (Fig. 2)。

GDE ならびに GD の IC<sub>50</sub> はそれぞれ 0.028 mg/mL、0.027 mg/mL であった (Fig. 3)。なお、阻害率は、本実験の陽性対照アカルボース末の最終濃度 0.00025 mg/mL の時の測定結果を平均した阻害率 54.7% ですべて補正した値を採用した。アカルボースの IC<sub>50</sub> は 0.00025 mg/mL であった (Fig. 4)。

#### ・マルターゼ阻害

各試料のマルターゼ阻害活性は GDE 96.0%; アカルボース (0.00025 mg/mL) 60.5%; 桑の葉エキス 35.9%; (Fig. 5)。また、IC<sub>50</sub> は GDE 0.016 mg/mL; アカルボース 0.0001 mg/mL であった (Fig. 6, 7)。

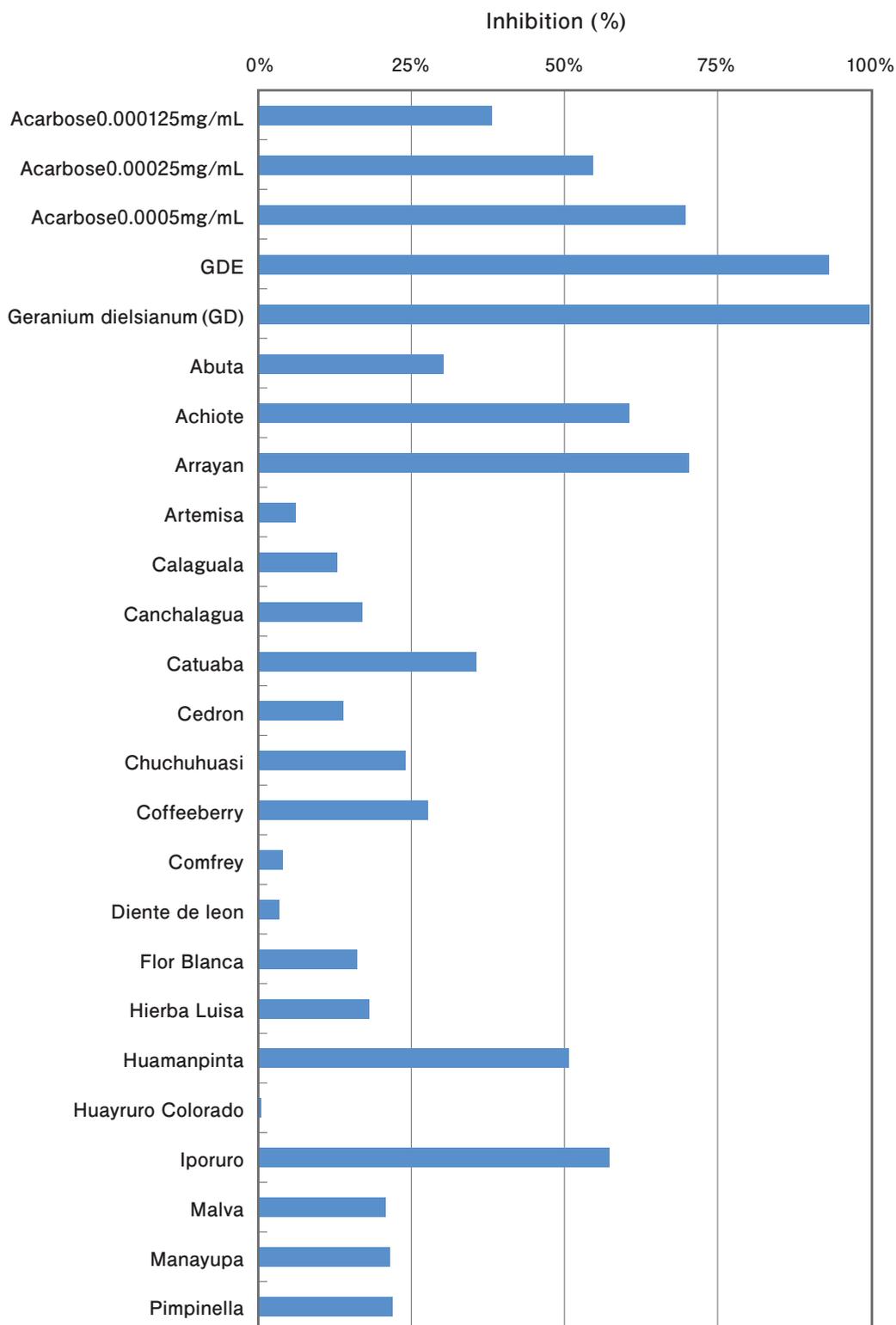
## AGEs 生成阻害活性

### ・ CML 生成抑制

GDE およびアミノグアニジンは濃度依存的に阻害率が増加し、CML 生成抑制活性を示した (Fig. 8, 9)。GDE の抗 CML 活性 (Col.) の IC<sub>50</sub> は 0.0065 mg/mL、アミノグアニジンの CML 生成抑制活性 (Col.) の IC<sub>50</sub> は 0.16 mg/mL であった。

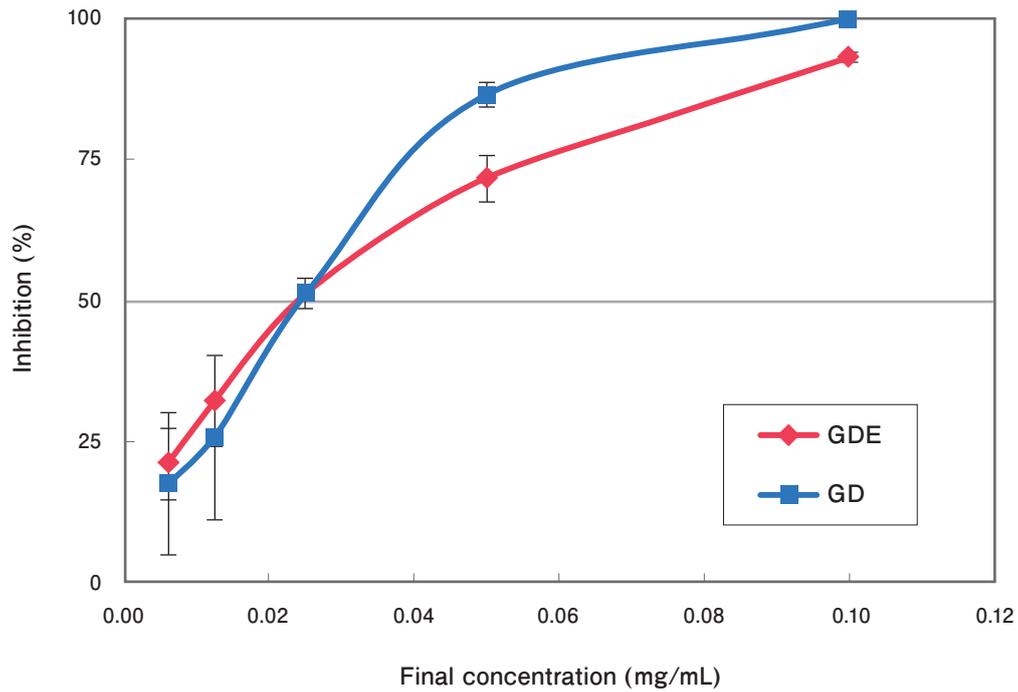
### ・抗酸化活性

GDE の ORAC 測定結果は  $5.1 \times 10^3 \mu\text{molTE/g}$  であった。



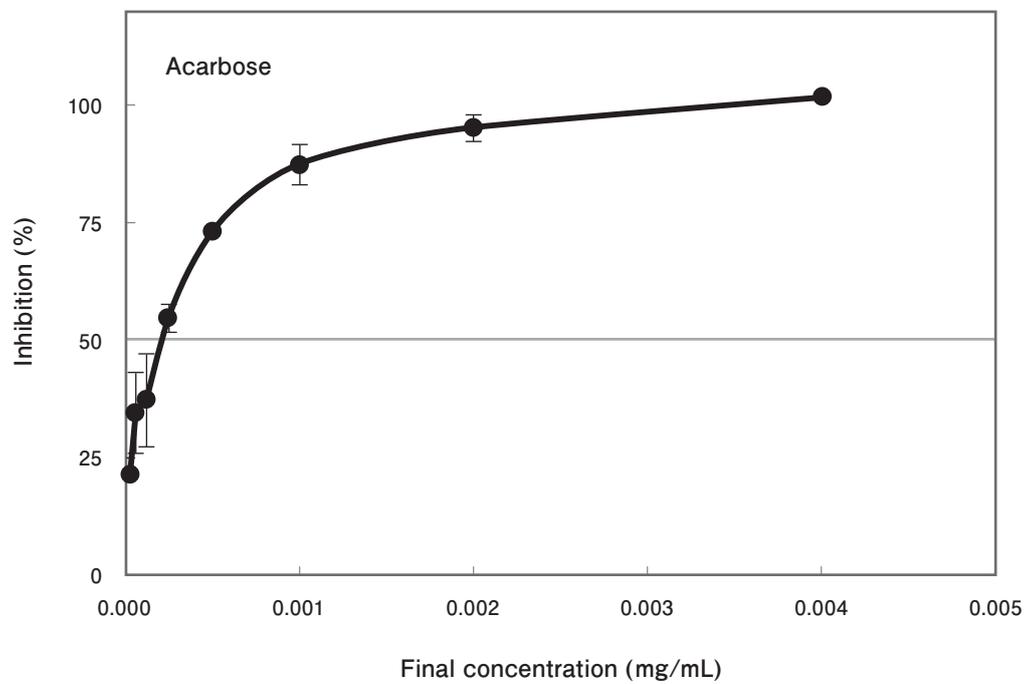
**Fig. 2.  $\alpha$ -Glucosidase (sucrase) inhibition activity of materials in Peru.**

Data are expressed as % inhibition. Test materials are extracted in 60% ethanol and freeze-dried. Measurement time; n = 1. GD, *Geranium dielsianum*; GDE, GD Extract (MISKAMISKA®).



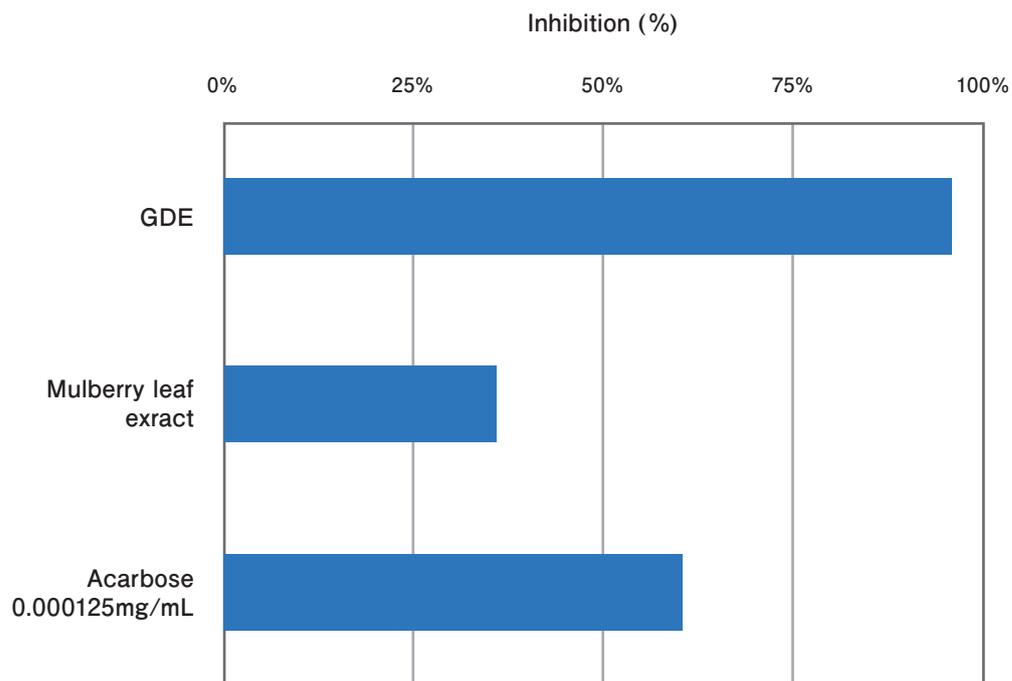
**Fig. 3. Sample doses and  $\alpha$ -Glucosidase (sucrase) inhibition.**

Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of % inhibition of the enzyme activity. IC<sub>50</sub>; 0.028 mg/mL in GDE, 0.027 mg/mL in GD. Measurement time; n = 3. IC<sub>50</sub>, 50% inhibition concentration; GD, *Geranium dielsianum*; GDE, GD Extract (MISKAMISKA<sup>®</sup>).



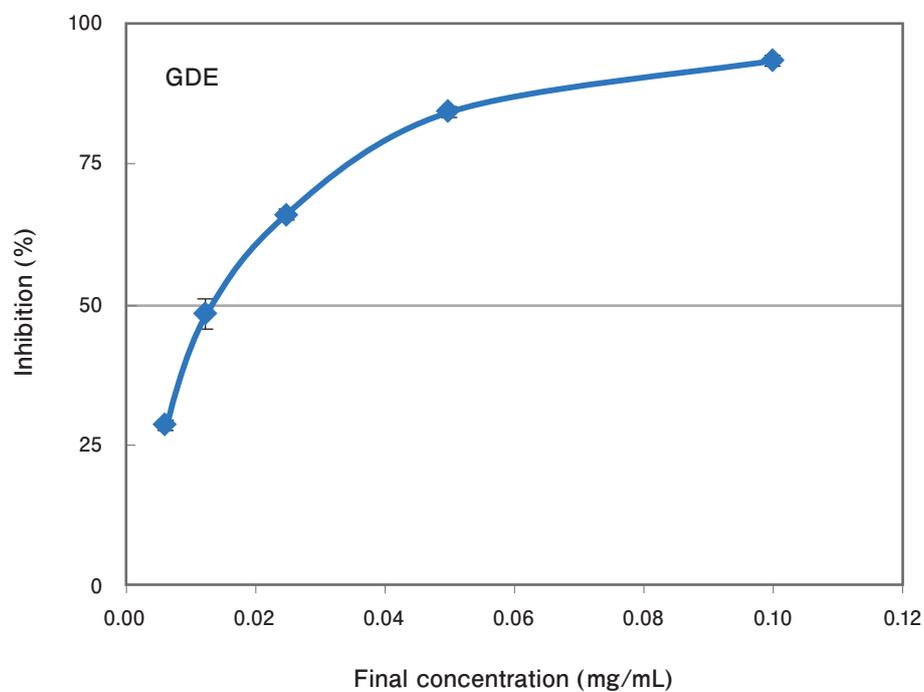
**Fig. 4. Sample doses and  $\alpha$ -Glucosidase (sucrase) inhibition by Acarbose.**

Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of % inhibition of the enzyme activity. IC<sub>50</sub>, 0.00025 mg/mL in Acarbose. Measurement time; n = 4. IC<sub>50</sub>, 50% inhibition concentration.



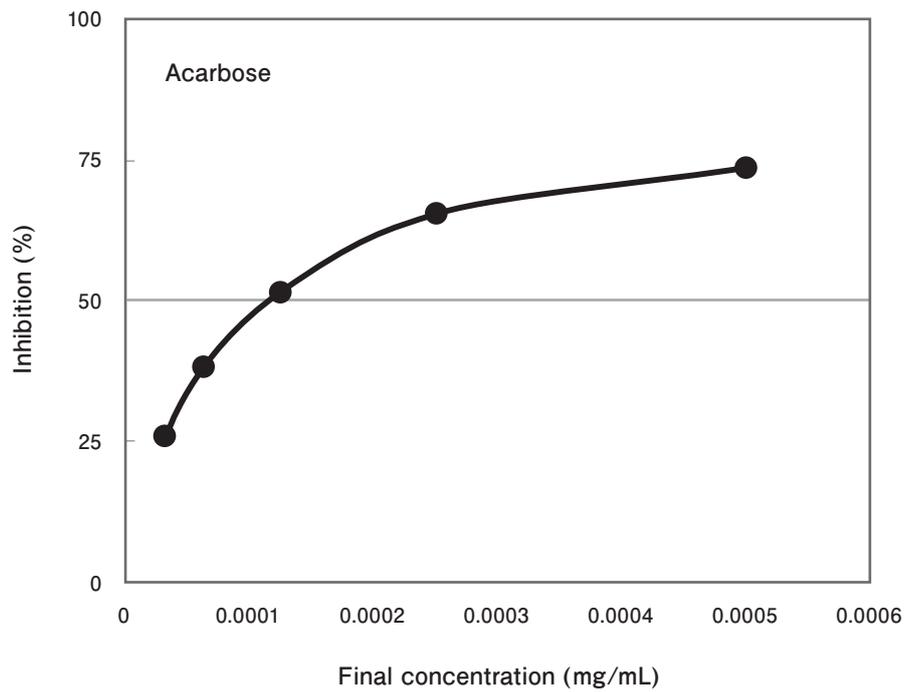
**Fig. 5.  $\alpha$ -Glucosidase (maltase) inhibition activity of materials.**

Data are expressed as % inhibition. Measurement time,  $n = 1$ . GDE, *Geranium dielsianum* extract (MISKAMISKA<sup>®</sup>).



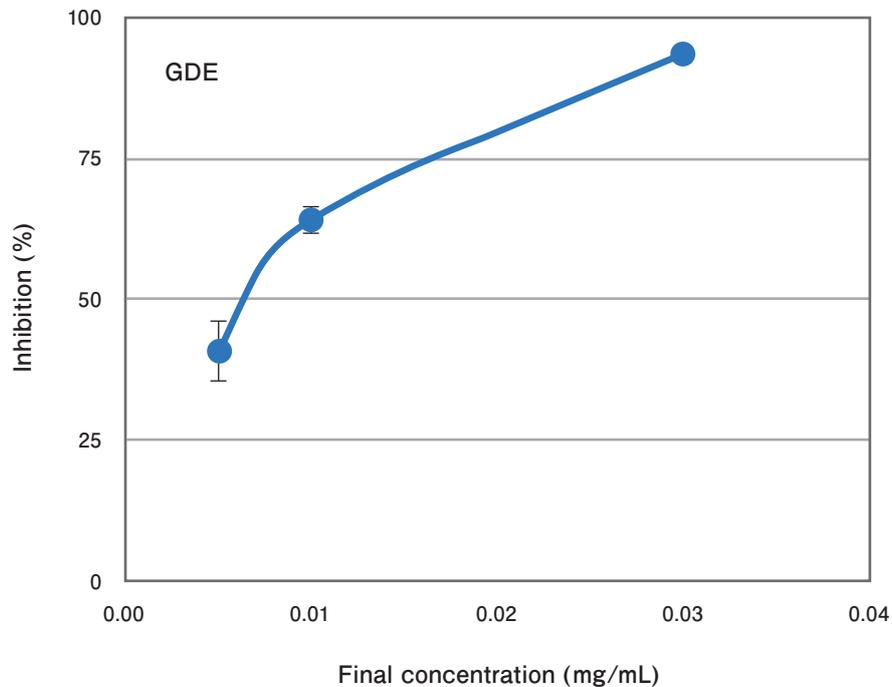
**Fig. 6. Sample doses of GDE and  $\alpha$ -Glucosidase (maltase) inhibition.**

Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of % inhibition of the enzyme activity. Measurement time,  $n = 3$ . IC<sub>50</sub> = 0.016 mg/mL. IC<sub>50</sub>, 50% inhibition concentration; GDE, *Geranium dielsianum* extract (MISKAMISKA<sup>®</sup>).



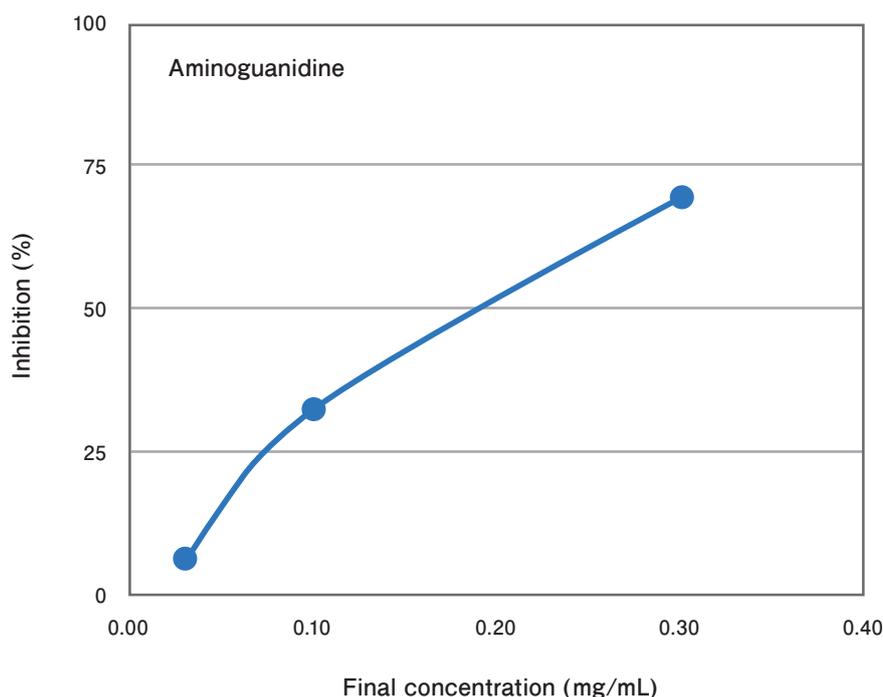
**Fig. 7. Sample doses of Acarbose and  $\alpha$ -Glucosidase (maltase) inhibition.**

Results are expressed as average values of % inhibition of the enzyme activity. Measurement time, n = 2. IC<sub>50</sub> = 0.0001 mg/mL. IC<sub>50</sub>, 50% inhibition concentration.



**Fig. 8. Effect of GDE on *in vitro* CML formation.**

Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of % inhibition of CML formation in *in vitro* reaction between glucose and type 1 collagen. Measurement time, n = 3. IC<sub>50</sub> = 0.0065 mg/mL. IC<sub>50</sub>, 50% inhibition concentration; GDE, GDE, *Geranium dielsianum* extract (MISKAMISKA<sup>®</sup>); CML, N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine.



**Fig. 9. Effect of aminoguanidine on *in vitro* CML formation.**

Data are expressed as average values of % inhibition of CML formation in *in vitro* reaction between glucose and type 1 collagen. Measurement time, n = 2. IC<sub>50</sub> = 0.16 mg/mL. IC<sub>50</sub>, 50% inhibition concentration; N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine.

## 考察

### α グルコシダーゼ阻害

本研究では、GD 抽出物の α グルコシダーゼ阻害活性評価および IC<sub>50</sub> を求めた。糖は数種類存在し、マルトース（麦芽糖）を加水分解して 2 分子のグルコースにするマルターゼ、ラクトース（乳糖）をグルコースとガラクトースに分解する酵素をガラクターゼ、スクロース（ショ糖）をグルコースとフルクトースに分解する酵素をスクラーゼというように、それぞれの糖を小腸粘膜上で分解する酵素が存在する。α グルコシダーゼはこれらの酵素の総称である。本研究ではスクラーゼ阻害及びマルターゼ阻害の 2 種類の阻害活性を測定した。その結果、スクリーニング検査にて GD および GDE は高いスクラーゼ阻害活性を有していた (Fig. 2)。また、GDE は高いマルターゼ阻害活性を有し、IC<sub>50</sub> は抗糖尿効果の期待できるサプリメントとして市場に出回っている桑の葉エキスより高い阻害活性を示した (Fig. 5)。先行研究では、GDE のメタノール抽出エキスが α グルコシダーゼ阻害活性作用、ヒアルロニダーゼ阻害活性作用、エラスターゼ阻害活性作用、コラゲナーゼ阻害活性作用を有することが、*in vitro* 試験によって報告されている<sup>4)</sup>。本研究では、GD 含水エタノール抽出エキスにも α グルコシダーゼ活性阻害作用を有することが分かった。

糖化ストレスを減らす機序の一つとして、食後高血糖を防ぐことが挙げられる<sup>14-16)</sup> (Fig. 1)。生体の蛋白質はグルコースなどの還元糖と非酵素・不可逆的に反応し（糖化反応）、様々な疾患や老化と関係する最終糖化生成物 AGEs を生成する<sup>17)</sup>。糖化反応は血中糖濃度が高いほど進行するため長時間の食後高血糖状態は糖化ストレスにさらされた状態である。現在、グレープフルーツの摂取<sup>14)</sup>、食物繊維を添加する<sup>15)</sup>、主食単独ではなく副菜と同時に食べる<sup>16)</sup>ことで食後高血糖を抑制できることが報告されている。

### AGEs 生成抑制活性

先行研究によると、様々な健康茶<sup>6)</sup>、フルーツ<sup>18)</sup>、野菜やハーブ<sup>19)</sup>、スパイス<sup>20)</sup>に抗糖化活性 (AGEs 生成抑制活性) が認められている。本研究では、α グルコシダーゼ阻害活性を有する GD が CML 生成抑制活性を有するか検討した。同活性の IC<sub>50</sub> を求めたところ、GDE の IC<sub>50</sub> は 0.0065 mg/mL、アミノグアニジンの IC<sub>50</sub> は 0.16 mg/mL であることから、GDE はアミノグアニジンより CML 生成抑制活性を有することがわかった (Fig. 7, 8)。

ORAC は野菜、果物など食品 1 g に対する酸素分子吸収能力 (oxygen radical absorption capacity) を示した値で

抗酸化能（活性酸素除去能）を表す。GDE の ORAC 値は  $5.1 \times 10^3 \mu\text{molTE/g}$  であり、野菜・果実の中で比較的高い ORAC 値を持つブルーベリー ( $57.7 \mu\text{molTE/g}$ )、レーズン ( $28.3 \mu\text{molTE/g}$ )、ブルーベリー ( $24.0 \mu\text{molTE/g}$ )、ブラックベリー ( $20.0 \mu\text{molTE/g}$ )、にんにく ( $19.4 \mu\text{molTE/g}$ )、ケール ( $17.7 \mu\text{molTE/g}$ )、赤ワイン ( $16.7 \mu\text{molTE/g}$ )、ほうれん草 ( $12.6 \mu\text{molTE/g}$ ) に比べて<sup>21)</sup>、きわめて強い活性酸素除去能を持っている。さらに、先行研究では、熱水抽出エキスも強力な抗酸化活性を有することが報告されている<sup>22)</sup>。このことから、GDE が持つ抗酸化能が抗糖化作用を補強していると考えられる。

CML はアマドリ化合物の酸化開裂および脂質の過酸化反応由来のグリオキサール (glyoxal; GO)、あるいは次亜塩素酸とセリンから生じるグリコールアルデヒドとリジン残基の反応により生成する<sup>23)</sup>。また、ヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) やスーパーオキシナイトライト ( $\text{ONOO}\cdot$ ) などの活性酸素種の存在により生成が促進される。CML 以外にもペントシジン<sup>24, 25)</sup> など生成に酸化反応が関与する AGEs が存在することから、GDE はこれらの AGEs 生成を抑制する可能性が高く、抗酸化は抗糖化を助けることで糖化ストレスを減らすことに繋がる。

CML は皮膚蓄積性 AGEs の代表であり、比較的代謝回転の速い表皮層にも存在する<sup>26)</sup>。皮膚に対する糖化ストレスとしては、AGEs 蓄積が最も大きく影響する<sup>9)</sup>。CML 化コラーゲンをヒト皮膚線維芽細胞に添加するとアポトーシ

スが誘導されるなど<sup>27)</sup>、加齢や各種疾患に関連する。従って、CML 生成抑制活性の強い GDE は新たな抗糖化食品としての期待が持てる。

## 結語

本研究より、GDE (ミスカミスカ®) は食後血糖抑制作用、抗酸化作用、抗糖化作用を有することが *in vitro* 試験にて確認され、糖化ストレスを減らす食品として期待できると示唆された。

## 謝辞

本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP (戦略的イノベーション創造プログラム研究課題番号 14533567) 「次世代農林水産業創造技術」(農研機構生研センター委託研究) によって実施された。

## 相反申告

本研究の一部は TOWA CORPORATION 株式会社より支援を受けた。

## 参考文献

- 1) Bussmann RW, Paniagua-Zambrana N, Chamorro MR, et al. Peril in the market-classification and dosage of species used as anti-diabetics in Lima, Peru. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2013; 9: 37.
- 2) Ikeda T, Tanaka Y, Yamamoto K, et al. *Geranium dielsianum* extract powder (MISKAMISKA™) improves the intestinal environment through alteration of microbiota and microbial metabolites in rats. *Journal of Functional Foods*. 2014; 11: 12-19.
- 3) Olthof MR, Hollman PC, Buijsman MN, et al. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J Nutr*. 2003; 133: 1806-1814.
- 4) Karato M, Yamaguchi K, Takei S, et al. Inhibitory effects of pasuchaca (*Geranium dielsianum*) extract on  $\alpha$ -glucosidase in mouse. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006; 70: 1482-484.
- 5) Nomoto K, Yagi M, Arita S, et al. A survey of fluorescence derived from advanced glycation end products in the skin of Japanese: Differences with age and measurement location. *Anti-Aging Medicine*. 2012; 9: 119-124.
- 6) Kamitani Y, Yagi M, Nomoto K, et al. Non-invasive collection of stratum corneum samples by a tape-stripping technique. *Anti-Aging Medicine*. 2013; 10: 55-59.
- 7) Nagai R, Jinno M, Ichihashi M, et al. Advanced glycation end products and their receptors as risk factors for aging. *Anti-Aging Medicine*. 2012; 9: 108-113.
- 8) Nagai R, Mori T, Yamamoto Y, et al. Significance of advanced glycation end products in aging-related disease. *Anti-Aging Medicine*. 2010; 7: 112-119.
- 9) Ichihashi M, Yagi M, Nomoto K, et al. Glycation stress and photo-aging in skin. *Anti-Aging Medicine*. 2011; 8: 23-29.
- 10) Bolton WK, Catran DC, Williams ME, et al. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*. 2004; 24: 32-40.
- 11) Hori M, Yagi M, Nomoto K, et al. Experimental models for advanced glycation end product formation using albumin, collagen, elastin, keratin and proteoglycan. *Anti-Aging Medicine*. 2012; 9: 125-134.
- 12) Hori M, Yagi M, Nomoto K, et al. Inhibition of advanced glycation end product formation by herbal teas and its relation to anti-skin aging. *Anti-Aging Medicine*. 2012; 9: 135-148.
- 13) Wu X, Beecher GR, Holden JM, et al. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J Agric Food Chem*. 2004; 52: 4026-4037.

- 14) Ogura M, Yagi M, Nomoto K, et al. Effect of grapefruit intake on postprandial plasma glucose. *Anti-Aging Medicine*. 2011; 8: 60-68.
- 15) Matsushima M, Yagi M, Hamada U, et al. Prevention of postprandial hyperglycemia by the combination of a staple food and a side dish. *Glycative Stress Research*. 2014; 1: 53-59.
- 16) Matsushima M, Yagi M, Hamada U, et al. Effects of choice of staple food and the addition of dietary fiber on changes in postprandial blood glucose level. *Glycative Stress Research*. 2014; 1: 46-52.
- 17) Takeuchi M, Yamagishi S. Involvement of toxic AGEs (TAGE) in the pathogenesis of diabetic vascular complications and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*. 2009; 16: 845-858.
- 18) Parengkuan L, Yagi M, Matsushima M, et al. Anti-glycation activity of various fruits. *Anti-Aging Medicine*. 2013; 10: 70-76.
- 19) Ishioka Y, Yagi M, Ogura M, et al. Antiglycation effect of various vegetables: Inhibition of advanced glycation end product formation in glucose and human serum albumin reaction system. *Glycative Stress Research*. 2015; 2: 22-34.
- 20) Moniruzzaman M, Parengkuan L, Yagi M, et al. Effect of proteins, sugars and extraction methods on the anti-glycation activity of spices. *Glycative Stress Research*. 2015; 2: 129-139.
- 21) Takebayashi J, Oki T, Chen J, et al. Estimated average daily intake of antioxidants from typical vegetables consumed in Japan: A preliminary study. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010; 70: 2137-2140.
- 22) Berłowski A, Zawada K, Wawer I, et al. Antioxidant properties of medicinal plants from Peru. *Food and Nutrition Sciences*. 2013; 4: 71-77.
- 23) Nagai R, Unno Y, Hayashi MC, et al. Peroxynitrite induces formation of *N*<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine by the cleavage of Amadori product and generation of glucosone and glyoxal from glucose: Novel pathways for protein modification by peroxynitrite. *Diabetes*. 2002; 51: 2833-2839.
- 24) Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem*. 1989; 264: 21597-21602.
- 25) Morales S, García-Salcedo JA, Muñoz-Torres M. Pentosidine: A new biomarker in diabetes mellitus complications. *Med Clin (Barc)*. 2011; 136: 298-302.
- 26) Mizutani K, Ono T, Ikeda K, et al. Photo-enhanced modification of human skin elastin in actinic elastosis by *N*<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine, one of the glycoxidation products of the Maillard reaction. *J Invest Dermatol*. 1997; 108: 797-802.
- 27) Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM, et al. Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem*. 2005; 280: 12087-12095.