

Online edition: ISSN 2188-3610 Print edition: ISSN 2188-3602 Received: January 3, 2021 Accepted: January 26, 2021 Published online: March 31, 2021 doi:10.24659/gsr.8.1_1

Original article

Antiglycative effect of black galangal, *Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker (Zingiberaceae)

Masayuki Yagi ¹⁾, Kayoko Inoue ²⁾, Yasuo Sato ²⁾, Kaori Ishizaki ¹⁾, Chieko Sakiyama ¹⁾, Yoshikazu Yonei ¹⁾

- 1) Anti-Aging Medical Research Center and Glycative Stress Research Center, Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan
- 2) Rene Co. Ltd., Osaka, Japan

Glycative Stress Research 2021; 8 (1): 1-7 (c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文:日本語翻訳版)

黒ガリンガルの抗糖化作用

八木雅之1)、井上佳如子2)、佐藤恭男2)、石崎香1)、﨑山智恵子1)、米井嘉一1)

1) 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 2) 株式会社レーネ

抄録

糖化ストレス (glycative stress) による体内での糖化最終生成物(advanced glycation endproducts; AGEs)の蓄積は、老化や生活習慣病の発症要因となる。体の糖化ストレス抑制は抗糖化と呼ばれ、食後高血糖の抑制、糖化反応の抑制、AGEsの分解排泄などがある。既に野菜やハーブなどの植物素材は糖化反応抑制作用(antiglycative effect)を有することが知られている。このうちショウガ科植物(Zingiberaceae)の一種である黒ガリンガル(black galangal;Kaempferia parviflora Wall. Ex. Baker; KP)の根茎は蛍光性 AGEs 生成抑制作用を有し、その作用成分としてポリメトキシフラボノイド(polymethoxy flavonoid;PMF)や親水性成分の関与が報告されている。本研究ではKPの抗糖化素材としての更なる可能性検証を目的に、KP根茎中の親水性成分に着目して、糖化反応抑制作用とAGEs 分解作用を評価した。試料にはKP根茎乾燥粉末の80°C熱水抽出液を使用した。糖化反応抑制作用はヒト血清アルブミン(human serum albumin;HSA)-グルコース糖化反応モデル系におけるKP抽出液のAGEs および糖化反応中間体生成抑制作用を検証した。AGEs 分解作用はAGEs 架橋切断作用モデル系における、KP抽出液のAGEs 架橋切断作用と酸化蛋白分解酵素(oxidized protein hydrolase;OPH)活性増強作用を検証した。KP抽出液には蛍光性AGEs、ペントシジン(pentosidine)、CML(N^c -carboxymethyllysine)および糖化反応中間体である 3-デオキシグルコソン(3-deoxyglucosone;3DG)、グリオキサール(glyoxal;GO)、メチルグリオキサール(methylglyoxal;MGO)生成抑制作用が認め

連絡先: 教授 八木雅之 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 〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3 TEL&FAX:0774-65-6394 e-mail:myagi@mail.doshisha.ac.jp 共著者: 井上佳如子 tmkayoko@miracle.ocn.ne.jp; 佐藤恭男 ceo.gran@gmail.com; 石崎 香 ko-sei12@mail.doshisha.ac.jp; 崎山智恵子 csakiyam@mail.doshisha.ac.jp; 米井嘉一 yyonei@mail.doshisha.ac.jp られた。またKP抽出液のAGEs分解作用はAGEs架橋切断作用とOPH活性増強作用が共に認められた。KPは経路の異なる多種類のAGEs生成を抑制すると共にAGEs分解に作用し、抗糖化素材として体内のAGEs蓄積量を低下させる可能性があった。

KEY WORDS: 糖化最終生成物、糖化反応抑制、ペントシジン、カルボキシメチルリジン (CML)、AGEs 架橋切断、酸化蛋白分解酵素

はじめに

蛋白とグルコースが非酵素的に結合すると、糖化最終 生成物 (advanced glycation end products; AGEs) が生成 する。生体内でのAGEs蓄積は老化や生活習慣病の発症 要因となる。これらは糖化ストレスと呼ばれる。一方、生 体内の糖化ストレス抑制は抗糖化と呼ばれる。抗糖化に は食後高血糖の抑制、糖化反応の抑制、AGEsの分解排泄 などがある^{1,2)}。既にアミノグアニジン (aminoguanidine; AG) はAGEs生成阻害作用を有し、腎症、網膜症、神経 障害に対する予防・進展抑制作用が報告されている^{3,4)}。 しかしAGには貧血、肝障害、ビタミンB6欠乏症などの 副作用があり、実用化されていない。既に茶・ハーブ ティー 5 、野菜・ハーブ 6 、フルーツ 7 、ヨーグルト 8 な どの食品素材は糖化反応抑制作用を有することが報告 されている。またAGEsの分解に作用する可能性があ る物質にはN-フェナシルチアゾリウムブロミド(Nphenacylthiazolium bromide; PTB) が報告されている⁹⁾。 PTBはAGEs化蛋白の架橋構造の一種であるαジケトン 構造を切断する。同様の作用はロスマリン酸(rosmarinic acid) 10)、エラジタンニン類11)、フラボノイド12) に認めら れている。また生体内酵素の一種である酸化蛋白分解酵 素 (oxidized protein hydrolase; OPH) はAGEs化蛋白を 分解することが報告されている¹³⁾。さらに多種類のハー ブ抽出液はOPH活性増強作用を有する¹⁴⁾。

既にショウガ (Zingiber officinale Roscoe) には糖化反応抑制作用が報告されている 15,16)。さらにショウガ科植物 (Zingiberaceae) の一種である黒ガリンガル (black galangal; Kaempferia parviflora Wall. Ex. Baker; KP) の根茎は糖化ストレス抑制作用として、食後高血糖抑制作用 17 、蛍光性 AGEs 生成抑制作用 18,19) を有することが報告されている。KP根茎の蛍光性 AGEs 生成抑制作用は本植物種の特徴成分であるポリメトキシフラボノイド (polymethoxy flavonoid; PMF) および親水性成分の関与が報告されている 20)。

本研究ではKPの抗糖化素材としての可能性検証を目的に、KP根茎中の親水性成分に着目し、KP根茎粉末熱水抽出液の糖化反応抑制作用とAGEs分解作用を評価した。

材料と方法

1) 試薬

実験に使用した試薬は以下のメーカーから購入して使用 した。ヒト血清アルブミン (human serum albumins; HSA, lyophilized powder, ≥ 96 %, agarose gel electrophoresis). 40%メチルグリオキサール (40% methylglyoxal solution; MGO)、N-フェナシルチアゾリウムブロミド (Nphenacylthiazolium bromide; PPD) は Sigma - Aldrich Japan (東京都目黒区)。アミノグアニジン (aminoguanidine hydrochloride; AG)、エピガロカテキンガレート (epigallocatechin gallate; EGCg)、2,3-ジアミノナフタレン (2,3-diaminonaphthalene; DAN)、40% グリオキサール 溶液 (40% glyoxal solution; GO)、1-フェニル-1,2-プロ パンジオン (1-phenyl-1, 2-propanedione; PPD)、ルブソ シド (rubusoside; Ru) は富士フィルム和光純薬工業 (大 阪府大阪市)。3-デオキシグルコソン(3-deoxyglucosone; 3DG) は同仁化学研究所 (熊本県上益城郡)。acylaminoacid releasing enzyme (AARE) はタカラバイオ (滋賀県 草津市)。 L-acetyl-L-alanine p-nitroanilide (AAPA) は BachemBubendorf, Switzerland) \circ CircuLex CML/ N^{ε} -(Carboxymethyl) Lysine) ELISA KitはMBL (愛知県名古 屋市)。その他の試薬は特級またはHPLCグレードのもの を富士フィルム和光純薬工業またはナカライテスク(京都 府京都市) から購入して使用した。

2) Kaempferia parviflora (KP) の根茎試料と 抽出条件

試料には日本国内でサプリメント製品として販売されている KP根茎の乾燥粉末を使用した。KP粉末は株式会社レーネから提供を受けた。乾燥粉末試料は $40\,mL$ の精製水と粉末 $2\,g$ を混合して抽出した。熱水抽出条件は混合液を $80\,^{\circ}$ Cに設定したウォーターバス中で $60\,$ 分間インキュベートとした。得られた抽出液は $2,500\,$ rpm ($800\times g$)で $10\,$ 分間遠心分離した後、さらに濾過して得られた溶液を試料溶液とした。試料溶液の固形分濃度は、 $5\,mL$ をアルミトレイに入れた後、 $120\,^{\circ}$ Cで1時間乾燥蒸発させた後、蒸発残分を秤量して算出した。

3) HSA-グルコース糖化反応モデル

糖化反応抑制作用の検証はHSA-グルコース糖化反応系モデルを使用した $^{21)}$ 。本モデルは試料溶液、0.1 mol/Lリン酸緩衝液(pH7.4)、40 mg/mL HSA、2.0 mol/L グルコース水溶液、蒸留水を1:5:2:1:1 の割合で混合した溶液;(A)、Aのグルコース溶液の代わりに精製水を添加した溶液;(B)、Aの試料溶液の代わりに精製水を添加した溶液;(C)、Aのグルコース溶液の代わりに精製水を添加した溶液;(D)を作成し、 60° Cで40 時間インキュベートした。インキュベート後の反応液中のAGEs および糖化反応中間体量を測定した。糖化反応抑制作用のポジティブコントロールにはAGまたはEGCgを使用した。

4) AGEsの測定

蛍光性 AGEs は既報 ²¹⁾ に従い、糖化反応液 200 μLを 黒色のマイクロプレートに入れ、AGEs由来蛍光 (励起 波長 370 nm/蛍光波長 440 nm) を測定した。ペントシ ジンは既報 ²²⁾ に従い、糖化反応液 50 μLと6 N塩酸を混 合して 110 °C で 18 時間加水分解後、HPLCにより測定 した。CMLは糖化反応液 30 μLを CircuLex CML/N^ε-(Carboxymethyl) lysine ELISA Kitを使用して測定した。

5) 糖化反応中間体の測定

糖化反応中間体は3DG、GO、MGOを既報^{23,24)}に従い、糖化反応液200μLを過塩素酸で除蛋白後、アルカリ条件下でDANを添加してラベル化後、HPLCで測定した。

6) 糖化反応抑制作用の算出

糖化反応抑制作用は既報²¹⁾ に従い、AGEs および糖化 反応中間体の生成阻害率(%)を次式によって算出した。

生成阻害率 (%) = $\{1 - (A - B)/(C - D)\} \times 100$

さらに試料 3 濃度の生成阻害率から 50 % 生成阻害濃度 (50 % inhibitory concentration; IC_{50} ; mg/mL) を算出した $2^{1,25}$ 。 IC_{50} は値が小さいほど糖化反応抑制作用が強いことを示している。

7) AGEs架橋切断作用

AGEs架橋切断作用は既報 9,12)に従い、試料溶液、10 mmol/L PPD、0.2 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.4) を 5:1: 4 の割合で混合し、37 °Cで 8 時間反応させた後、さらに 0.7 N塩酸を添加して反応停止後、PPDから切断された安息香酸量を HPLCで測定した。 AGEs 架橋切断作用のポジティブコントロールには PTBを使用した。 AGEs 架橋切断作用は AGEs 架橋 モデル物質である PPDの α ジケトン構造が切断されると、1 molの PPD から 1 molの安息香酸が生成することから、以下に示した式で架橋切断率を算出した。

架橋切断率 (%) = $\{(A-B)/C\} \times 100$

A;反応液中の安息香酸量,B;サンプル中の安息香酸量,C;反応に供したPPD量

8) OPH活性增強作用

OPH活性増強作用は既報 14) を参考に AAREをOPHとして、試料溶液、0.025 U/mL OPH、0.025 mol/L AAPA、0.12 mol/L Tris-塩酸緩衝液(pH 7.4) を 1:1:2:21 の割合で混合し、37 °C で 1時間反応させた後に AAPAから遊離した p-nitroaniline (pNA) 量を 405 nm で測定した;(S)。OPH活性測定のリファレンスには、前記混合液中に添加する試料溶液の代わりに蒸留水を添加して測定した;(R)。OPH活性増強作用は、ポジティブコントロールにRu、ネガティブコントロールにEGCgを使用した。OPH活性化率(%)はリファレンス反応で反応開始直後(0分)からの 60 分間に生成した pNA量を 100 %として、以下の式で算出した。

OPH活性化率 (%)={(S60-S0)/(R60-R0)} x 100

S; 試料溶液添加反応液のpNA濃度,R; リファレンス反応液のpNA濃度

60;60分後,0;反応直後(0分)

統計解析

測定値は平均値 ± 標準偏差で示した。測定値の比較にはテューキーの多重比較検定 (Tukey's test)を用いた。統計解析結果は危険率5%未満を有意とした。

結果

AGEs生成抑制作用

KP抽出液の蛍光性 AGEs、CML生成抑制作用は濃度依存性が認められた(Fig.1)。 KPの固形分濃度 0.79 mg/mLの生成阻害率は蛍光性 AGEsが79.9%、ペントシジンが52.0%、CMLが98.8%を示した。 IC_{50} 値は蛍光性 AGEsが0.078 mg/mL、ペントシジンが0.292 mg/mL、CMLが0.031 mg/mLであった($Table\ 1$)。 KP抽出液の IC_{50} 値は AGと比較して、蛍光性 AGEsが0.65 倍、CMLが0.28倍であった。KPのペントシジン生成阻害率は抽出液濃度 0.0079~0.79 mg/mLにおいて42.7~52.0%を示したが、濃度依存性が認められなかった。ペントシジンの IC_{50} 値は KP抽出液が EGCgよりも21.3倍大きかった。

糖化反応中間体生成抑制作用

KP抽出液の3DG、GO生成抑制作用は濃度依存性が認められた(Fig. 2)。KPの固形分濃度0.79 mg/mLの生成阻害率は3DGが89.4%、GOが88.2%を示した。

IC₅₀値は3DGが0.028 mg/mL、GOが0.038 mg/mLであった($Table\ 1$)。KP抽出液のIC₅₀値はAGと比較して、3DGが0.22倍、GOが0.38倍であった。KPのMGO生成阻害率は抽出液濃度 $0.0079\sim0.79$ mg/mLにおいて99%以上の強い作用を示した。

AGEs架橋切断作用

AGEs架橋切断作用はKP抽出液濃度 $0.13\sim3.94$ mg/mLにおいて濃度依存性が認められた (Fig.3)。KP抽出液濃度 3.94 mg/mLの切断率は6.81%で、ポジティブコント

ロールとして使用した 5 mmol/mL PTB (切断率 25.5%) の 0.27 倍であった。

OPH活性增強作用

OPH活性増強作用はKP抽出液濃度 0.315 mg/mLにおいて 203.3%を示した ($Table\ 2$)。この作用はポジティブコントロールとして使用した 0.04 mg/mL Ru (作用率 210.2%)の 0.97倍、ネガティブコントロールとしで使用した 0.04 mg/mL EGCg (作用率 17.7%)の 11.5倍であった。

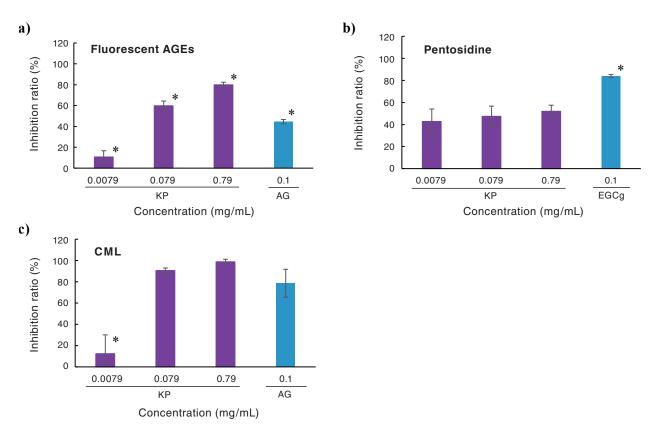


Fig. 1. Inhibitory activity of KP extract on AGE formation.

a) Fluorescent AGEs, b) Pentosidine, c) CML. Results are expressed as mean \pm standard deviation, n = 3, *p < 0.05 by Tukey's test. KP, Kaempferia parviflora rhizome extract; AG, aminoguanidine; AGEs, advanced glycation end products; CML, N^{ε} -(carboxymethyl)lysine.

Table 1. Inhibitory activity of KP extract on AGEs and intermediate formation.

Index for anti-glycative effect	KP IC50 (mg/mL)	Aminoguanidine IC 50 (mg/mL)	EGCg IC 50 (mg/mL)
Fluorencet AGEs	0.078	0.120	_
Pentosidine	0.292	_	0.014
CML	0.031	0.114	_
3DG	0.028	0.126	_
GO	0.038	0.117	_
MGO	< 0.010	< 0.010	-

KP, Kaempferia parviflora rhizome extract; EGCg, epigallocatechin gallate; AGEs, advanced glycation end products; CML, N^{ε} -(carboxymethyl)lysine; 3DG, 3-deoxyglucosone; GO, glyoxal; MGO, methylglyoxal.

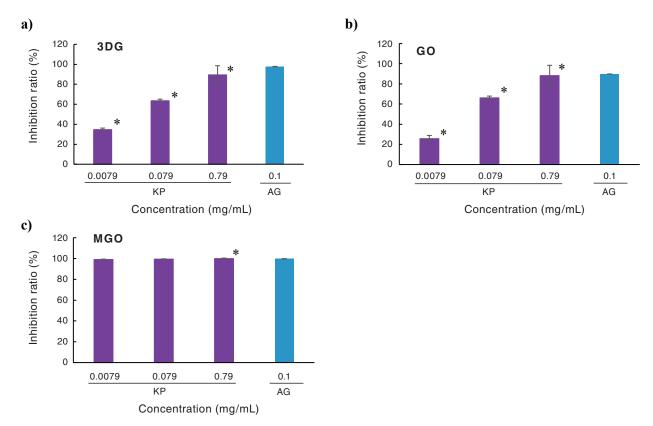


Fig. 2. Inhibitory activity of KP extract on intermediate of AGE formation.

a) 3DG, b) GO, c) MGO. Results are expressed as mean \pm standard deviation, n = 3, *; p < 0.05 by Tukey' s test. KP, *Kaempferia parviflora* rhizome extract; AG, aminoguanidine; EGCg, epigallocatechin gallate; AGEs, advanced glycation end products; 3DG, 3-deoxyglucosone; GO, glyoxal; MGO, methylglyoxal.

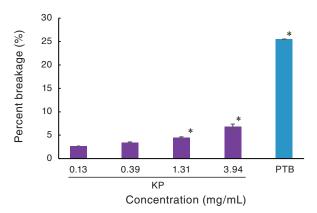


Fig. 3. AGE cross-link breaking activity.

Results are expressed as mean \pm standard deviation, n = 3, * p < 0.05 by Tukey' s test. KP, *Kaempferia parviflora* rhizome extract; PTB, 5 mmol/L *N*-phenacylthiazolium bromide.

Table 2. OPH enhance activity.

Sample	Concentration (mg/mL)	Percent enhancement (%)
KP	0.315	203.3 ± 19.4 *
Rubusoside (positive control)	0.040	210.2 ± 27.2 *
EGCg (negative control)	0.040	17.7 ± 3.2 *
Ref (water)	_	100

Results are expressed as mean \pm standard deviation, n = 3, * p < 0.05 by Tukey's test. KP, Kaempferia parviflora rhizome extract; EGCg, epigallocatechin gallate; OPH, oxidized protein hydrolase; Ref, reference,

考察

KPの糖化反応抑制作用

KP根茎粉末熱水抽出液の糖化反応抑制作用の検証を目 的に、蛍光性AGEs、ペントシジン、CML、3DG、GO、 MGOの生成阻害率を測定した。その結果、KP抽出液の 糖化反応生成抑制作用は全ての測定項目において認めら れた。またKP抽出液の蛍光性AGEs、CML、3DG、 MGO生成抑制作用のIC50はポジティブコントロールと して使用したAGと同等以上であった。AGは糖化反応中 間体などのカルボニル基をブロックすることでAGEsの生 成を抑制する³⁾。糖尿病性腎症患者がAGを1日あたり150 mgまたは300 mg、42ヶ月間連続摂取した臨床試験では、 21ヶ月後までAGEs生成抑制による尿中蛋白排泄量低減 が認められた。しかし以降は300 mg摂取群に有用性が認 められなくなった⁴⁾。生体内における糖化反応は多経路で あり、その過程で生成する糖化反応中間体、AGEsは多種 類ある26)。このため生体内の糖化反応を抑制するには多 種類のAGEsや糖化反応中間体の生成を抑制する必要が ある²⁷⁾。既にドクダミ、カモミール、セイヨウサンザシ、 ブドウ葉の混合ハーブエキスは、多経路の糖化反応を多 種類の成分で抑制することが、in vitroやヒト臨床試験で 検証されている²⁷⁻³⁰⁾。KP抽出液の糖化反応抑制作用は生 成経路の異なる多種類のAGEs生成を抑制したことから 混合ハーブエキスと同様の作用を有する可能性がある。

既にKPの含水エタノール抽出エキスは蛍光性AGEs 生成抑制作用を有し、その作用成分としてPMFが報告されている¹⁸⁾。我々は糖化反応抑制作用成分の解析を目的に、KPの根茎試料10種類の蛍光性AGEs生成抑制作用を比較するとともに、KPに含まれるポリメトキシフラボン(PMF)との関連性について検証した²⁰⁾。この結果、蛍光性AGEs生成抑制作用はPMF含有量が少ない熱水抽出液が、PMFを多く含む70%エタノール抽出液よりも強かった。本研究ではKPの熱水抽出液に蛍光性AGEs生成抑制作用だけでなく、ペントシジン、CML、3DG、GO、MGOの生成抑制作用が認められた。KPの糖化反応抑制作用はPMFなどの疎水性成分より、水溶性成分の関与が大きい可能性がある。

KPのAGEs分解作用

KP根茎粉末熱水抽出液のAGEs分解作用の検証を目的に、AGEs架橋切断率、OPH活性化率を測定した。その結果、KP抽出液にはAGEs架橋切断作用、OPH活性増強作用が認められた。

本試験でポジティブコントロールに使用した PTB は PPDを分解して安息香酸を生成することからAGEs化した蛋白架橋を切断する可能性が示されている 9,31)。また PTB はラット動脈壁のAGEsを減少させた 32)。AGEs 架橋 切断作用は様々な植物成分に報告されている $^{11-13}$)。これらと同様の作用をする KP抽出液には同様の作用物質が含まれる可能性がある。一方、PTBのラットへの投与試験

では、尾コラーゲンのAGEs架橋の低下が認められなかったとの報告もある 33)。AGEs架橋切断作用モデルで検証された成分によるAGEs分解の可能性については、更なる検証が必要である。

OPHは古くからAcyl、Formyl、Acetyl化など、修飾蛋白のN末端修飾基を分解し、遊離する作用を有する生体内酵素として報告されている³⁴。さらにOPHにはAGEs化蛋白を分解することが報告されている¹³。またOPHとプロテアソームは老化蛋白の分解に協調して作用することも推定されている³⁵。OPHの活性を増強させる作用成分には多種類のハーブ抽出液が報告されている¹⁴。さらにハーブのOPH活性増強作用は素材の使用部位によって違いがあり、葉よりも根や種子で強い。本研究で使用したKPは根茎であり、ハーブが有する作用部位との関連する可能性がある。OPHは肝臓、脳、血液中にも存在する生体内酵素である。これらのことよりKPは糖化を含む生体内の老化蛋白の分解に関与する可能性がある。

結語

KPの抗糖化素材としての可能性検証を目的に、KP根茎乾燥粉末の80°C熱水抽出液の糖化反応抑制作用とAGEs分解作用を検証した。KP抽出液には蛍光性AGEs、ペントシジン、CMLおよび糖化反応中間体である3DG、GO、MGO生成抑制作用が認められた。またKP抽出液のAGEs分解作用はAGEs架橋切断作用とOPH活性増強作用が共に認められた。KPは経路の異なる多種類のAGEs生成を抑制すると共にAGEsを分解し、抗糖化素材として体内のAGEs蓄積量低減に作用する可能性があった。

利益相反申告

本研究の実施にあたり株式会社レーネより研究費の支援を受けた。

謝辞

本研究結果の一部は第16回日本抗加齢医学会(2016年6月10日、横浜)、第18回糖化ストレス研究会(2019年8月31日、京都)で発表した。

参考文献

- 1) Ichihasi M, Yagi M, Nomoto K, et al. Glycation stress and photo-aging in skin. *Anti-Aging Med*. 2011; 8: 23-29.
- Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging: 1. What is glycative stress? Glycative Stress Res. 2016; 3: 152-155.
- Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, et al. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein crosslinking. *Science*. 1986; 232: 1629-1632.
- Bolton WK, Cattran 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.
- Hori M, Yagi Y, Nomoto K, et al. Inhibition of advanced glycation end product formation by herbal teas and its relation to anti-skin aging. *Anti-Aging Med*. 2012; 9: 135-148
- 6) 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 Res. 2015; 2: 22-34.
- Parengkuan L, Yagi M, Matsushima M, et al. Anti-glycation activity of various fruits. Anti-Aging Med. 2013; 10: 70-76.
- 8) Tanaka Y, Yagi M, Takabe W, et al. Anti-glycative effect of yogurt: Prevention of advanced glycation end product formation. *Glycative Stress Res*. 2017; 4: 025-031.
- Vasan S, Zhang X, Zhang X. et al. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. 1996; Nature. 382: 275-278.
- 10) Drickamer K. Breaking the curse of the AGEs. *Nature*. 1996; 382: 211-212.
- 11) Jean D, Pouligon M, Dalle C. Evaluation in vitro of AGEcrosslinks breaking ability of rosmarinic acid. Glycative Stress Res. 2015; 2: 204-207.
- 12) Yagi M, Mitsuhashi R, Watanabe A, et al. Cleaving effect of pomegranate (*Punica granatum*) extract on crosslink derived from advanced glycation endproducts. *Glycative Stress Res*. 2015; 2: 58-66.
- 13) Yagi M, Ishigami M, Mori R, et al. Reduction effect of oxidized protein hydrolase (OPH) on advanced glycation endproducts and OPH-like activity in human stratum corneum. *Glycative Stress Res.* 2017; 4: 184-191.
- 14) Ishizaki K, Yagi M, Sakiyama C, et al. Influence on the oxidized protein hydrolase (OPH) activity of herbal tea extract. *Glycative Stress Res*. 2020; 7: 22-28.
- 15) Zhu Y, Zhao Y, Wang P, et al. Bioactive ginger constituents alleviate protein glycation by trapping methylglyoxal. *Chem Res Toxicol*. 2015; 28: 1842-1849.
- 16) Huang Q, Wang P, Zhu Y, et al. Additive capacity of [6]-shogaol and epicatechin to trap methylglyoxal. *J Agric Food Chem.* 2017; 65: 8356-8362.
- 17) Yagi M, Hayashi S, Ishizaki K, et al. Inhibitory effect of *Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker (Zingiberaceae) rhizome on postprandial hyperglycemia. *Glycative Stress Res*. 2019; 6: 126-134.
- 18) Nakata A, Koike Y, Matsui H, et al. Potent SIRT1 enzyme-stimulating and anti-glycation activity of polymethoxyflavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Nat Prod Commun*. 2014; 9: 1291-1294.
- 19) Shimada N, Nakata N, Yang J, et al. Evaluation of the safety and efficacy of *Kaempferia parviflora* extract (SIRTMAX®) in human: A randomized doubleblind, placebo-controlled crossover clinical study. *Jpn Pharmacol Ther*. 2015; 43: 997-1005.

- 20) Yagi M, Tateiwa Y, Inoue K, et al. Antiglycative effect of Kaempferia parviflora Wall. Ex. Baker (Zingiberaceae): Prevention of advanced glycation end product formation. Glycative Stress Res. 2018; 5: 163-170.
- 21) 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 Med*. 2012; 9: 125-134.
- 22) Yagi M, Isshiki K, Takabe W, et al. Measurement of pentosidine in human plasma by the high performance liquid chromatography. *Glycative Stress Res.* 2018; 5: 119-128.
- 23) Kusunoki H, Miyata S, Ohara T, et al. Relation between serum 3-deoxyglucosone and development of diabetic microangiopathy. *Diabetes Care*. 2003; 26: 1889-1894.
- 24) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging: 2. The Evaluation of Glycative Stress: Measurement of blood glucose, glycated proteins and intermediates. *Glycative Stress Res.* 2016; 3: 205-209.
- 25) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging. 4: The evaluation of glycative Stress: Evaluation for anti-glycative effect. *Glycative Stress Res*. 2017; 4: 87-92.
- 26) Takeuchi M, Yamagishi S. Involvement of toxic AGEs (TAGE) in the pathogenesis of diabetic vascular complications and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2009; 16: 845-858.
- 27) Yonei Y, Yagi M, Hibino S, et al. Herbal extracts inhibit Maillard reaction, and reduce chronic diabetic complications risk in streptozotocin-induced diabetic rats. *Anti-Aging Med.* 2008; 5: 93-98.
- 28) Yonei Y, Miyazaki R, Takahashi Y, et al. Anti-glycation effect of mixed herbal extract in individuals with prediabetes mellitus: A double-blind, placebo-controlled, parallel group study. *Anti-Aging Med.* 2010; 7: 26-35.
- 29) Kubo M, Yagi M, Kawai H, et al. Anti-glycation effects of mixed-herb-extracts in diabetes and pre-diabetes. *J Clin Biochem Nutr.* 2008; 43 (Suppl): 66-69.
- 30) Kawai H, Shoshihara M, Kawakami H, et al. Anti-glycation and skin beautification properties from ingestion of mixed herb extract: A placebo-controlled, double-blind, randomized, parallel-group study. Glycative Stress Res. 2016; 3: 236-245.
- 31) Aldini G, Vistoli G, Stefek M, et al. Molecular strategies to prevent, inhibit, and degrade advanced glycoxidation and advanced lipoxidation end products. *Free Radical Research*. 2013; 47(Suppl. 1): 93-137.
- 32) Cooper ME, Thallas V, Forbes J, et al. The cross-link breaker, N-phenacylthiazolium bromide prevents vascular advanced glycation end-product accumulation. *Diabetologia*. 2000; 43: 660-664.
- 33) Yang S, Litchfield JE, Baynes JW. AGE-breakers cleave model compounds, but do not break Maillard crosslinks in skin and tail collagen from diabetic rats. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 412: 42-46.
- 34) Fujino T, Kojima M, Beppu M, et al. Identification of the cleavage sites of oxidized protein that are susceptible to oxidized protein hydrolase (OPH) in the primary and tertiary structures of the protein. *J Biochem*. 2000; 127: 1087-1093.
- 35) Shimizu K, Kiuchi Y, Ando K, et al. Coordination of oxidized protein hydrolase and the proteasome in the clearance of cytotoxic denatured proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 324: 140-146.