総合農学研究所

2016 年度　研究所コアプロジェクト報告書

プロジェクト名：東海大学オリジナル機能性食品素材の創出

永井　竜児、安田　伸、小野　政輝、荒木　朋洋、松田　靖、村田　達郎、小松　春喜、多賀　直彦、本田　憲昭

1) 農学部バイオサイエンス学科、2) 農学部応用植物科学科、3)農学部農学教育実習場

Ⅰ．緒言

現在、我が国では、糖尿病、動脈硬化、高血圧や脂質異常症などの生活習慣病の患者が急増している。これらの疾患は、ほとんど自覚症状が無いままに進行し、糖尿病合併症をはじめ、腎疾患や心臓疾患、血管疾患ならびに脳疾患を引き起こす要因となる。そのため、生活習慣病罹患者の増加に伴い発生する医療費の増加が緊急な社会問題となっている。生活習慣病の発症は生活スタイルに起因していることから、日常生活における予防が有効な手段である。さらに、病態の発症が診断されてから開始される薬物治療では、さらなる病態の伸展を遅延はできても十分に改善することは難しいことからも生活習慣病への対処は予防が最も重要であると考えられる。

これまで農学部では、様々な機能性食材の育種や天然物から成分の単離、食品等の抗酸化、抗炎症、抗糖化などの機能性について検討を行ってきた。しかし、多くの食品素材の中からヒトにおいて効果の高い機能性成分を効率的に見出すためには、素材の選抜から臨床試験までを一貫して行うシステムが必要となる。そこで、本研究所ではこれまで各研究者が個別に行っていた試験を統計的にまとめ、食材の有効性を試験管実験のみの評価だけでなく動物及びヒトによる試験で効果の実証を行う体制を整備した (Fig. 1)。

これまでに、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置（LC-MS/MS）を中心とした機器分析による Advanced Glycation End-products (AGEs) の測定系ならびに抗酸化能 (ORAC) 法を開発した。さらに、これらの手法を用いてトマト、イグサ、マンゴスチン、トチュウ、ヤーコン、スイゼンジノリ、ブラックベリー、サツマイモ、モリンガの機能性について研究を行ってきた。また、機能性の高い品種の作出を目的としたラズベリーの品種開発も行って

いる。

以上の研究成果として、複数の植物において機能性を有する新規化合物の構造が決定され、スイゼンジノリおよびサラシアでは動物実験によって生体における AGEs 生成抑制効果が明らかとなった。さらに、マンゴスチンではヒト介入試験を行い、ヒトが摂食した際の AGEs 生成抑制効果を実証した。また、ラズベリーにおいては、種間交雑により暖地でも栽培可能な有用品種の作出に成功した。

今年度は新たな植物種としてブラックベリー、ハリアサガオ、ブラジルヤラッパ、ゲンノショウコについての研究を行った。さらに、昨年度に引続きヤーコンとラズベリーの機能性を検討したので、これらの結果を報告する。

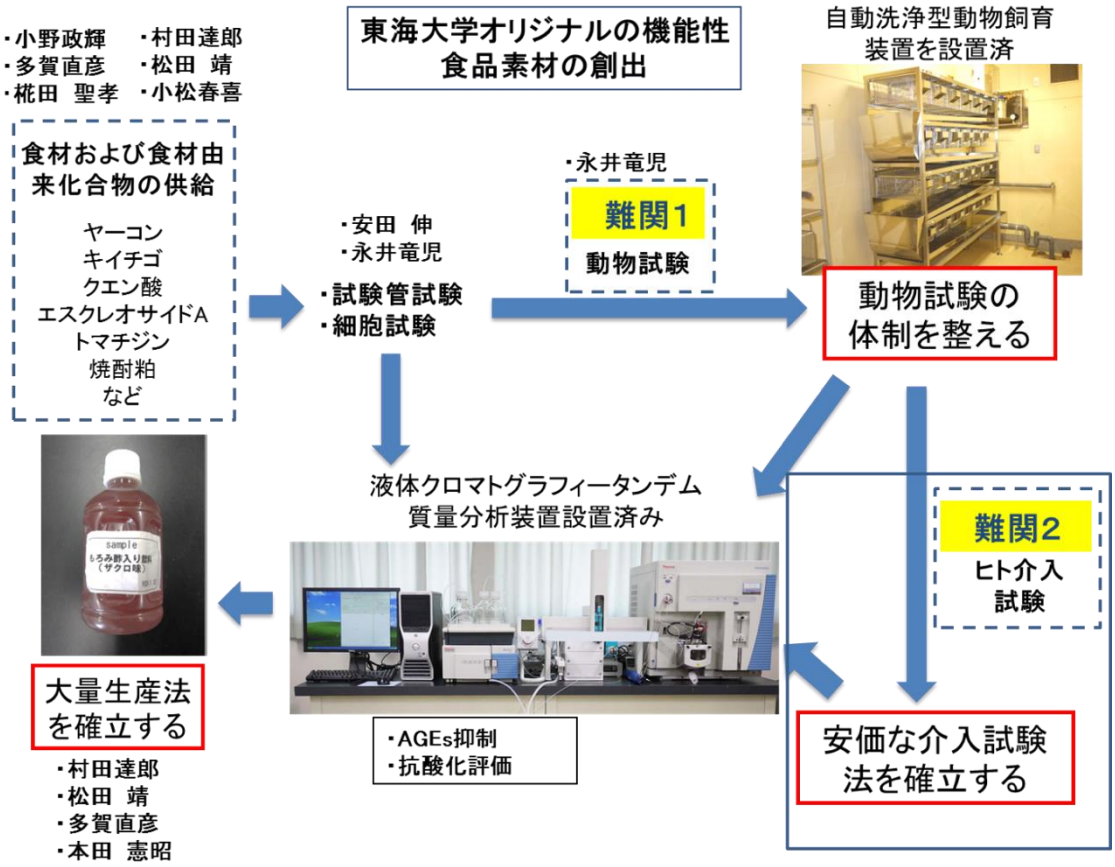


Fig. 1. プロジェクトにおける役割分担

Ⅱ．機能性成分の測定

前年度までにトマトやイグサ、スイゼンジノリなどの機能性を有すると考えられる植物において、成分の単離・構造決定ならびに抗酸化や抗糖化作用などについて検討してきた。今年度は、新たに (1) ブラックベリー、(2) ハリアサガオ、(3) ブラジルヤラッパに含まれる有効成分の単離・構造決定ならびに機能性の評価を行った。さらに、(4) Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 法を用いて様々な分類群の植物より単離された化合物におけるAGEs生成抑制効果の検討を行った。また、昨年に引き続き、(5)ヤーコンの抗酸化・抗炎症評価、(6)ラズベリーの品種改良および機能性についての検討を行った。

1. ブラックベリー

ブラックベリー (*Rubus fructicosus* L.) は、生食する他、ジャムなどに加工して用いられる。今回、新たな機能性成分を見出すために、ジャム製造時に排出されるブラックベリーの種子成分について研究を進めた。本年度の成果として、メタノール抽出物から高速液体クロマトグラフィーを含む各種クロマトグラフィーを用いて２種の新規 (Fig. 2. **1,2**) を含む４種のウルサン型トリテルペノイド (Fig. 2. **1–4**) を単離した。さらに、それらの構造を質量分析と核磁気共鳴スペクトル等の機器分析ならびに化学反応を用いて決定した。これらの中でイソプロピリデン基を有する３種 (Fig. 2. **1–3**)は、ヒト白血病株 HL-60 に対する増殖抑制活性を有することを明らにした。

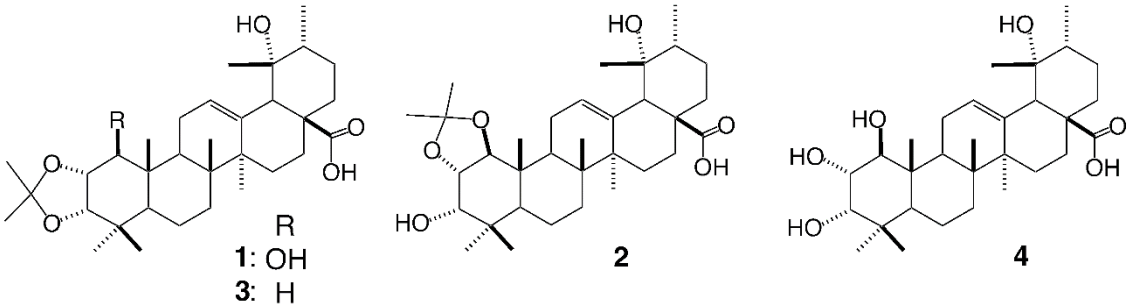
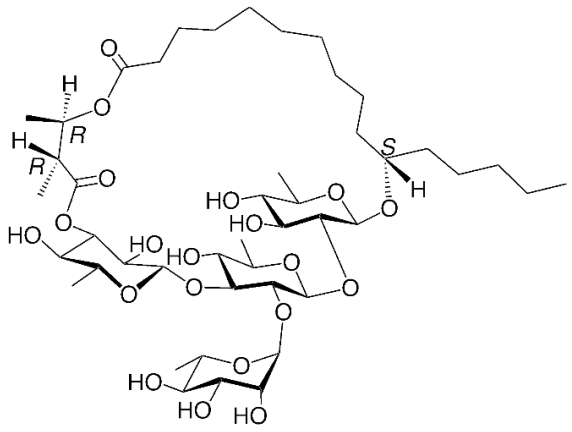


Fig. 2. **1-4** の構造

2. ハリアサガオ

ハリアサガオ (*Ipomoea muricata* (L.) Jacq.) の種子は、瀉下、抗炎症、ならびに解熱の目的で利用される。本種子の抽出物より、１種の新規化合物 (Fig. 3) を単離し、その構造を各種機器分析ならびにアルカリ加水分解生成物の同定により決定した。本化合物は、アグリコンと単糖の間に１個の有機酸が挿入されて、大環状ラクトン構造を形成した新タイプの樹脂配糖体であった。



5

Fig 3. **5** の構造

3. ブラジルヤラッパ

ブラジルヤラッパ (*Ipomoea operculata* (Gomes) Mart.) の根は、瀉下剤として利用される。本生薬の樹脂配糖体画分をメタノール中 In (III) chloride 処理後、分離して 4 種の新規化合物を得た。さらに、それらの構造を各種機器分析ならびに部分アルカリ加水分解等を用いて決定した(Fig. 4)。

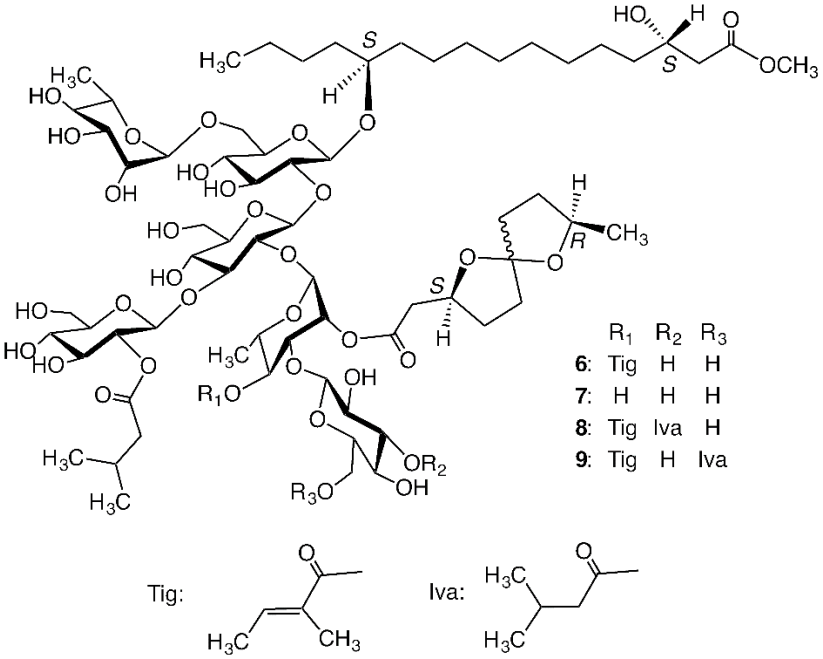


Fig 4. **6-9** の構造

4. ゲンノショウコ

様々な生活習慣病や老化関連疾患との関与が明らかとなっている AGEs の生成抑制化合物探索の一環として、フウロソウ科フウロソウ属の多年草であるゲンノショウコ (*Geranium thunbergii*) の評価を行った。ゲンノショウコは健胃整腸剤として用いられており、これまでに抗酸化作用、抗菌作用、抗ガン作用、抗肥満作用等を有することが報告されている。今回は 2 種の AGEs 構造である N^{ε}-(carboxymethyl)lysine (CML) および N^{ω}-(carboxymethyl)larginine (CMA) を標的とし、それぞれの構造に特異的なモノクローナル抗体を用いて検出を行った。その結果、メタノールおよび

アセトン抽出物おいて CML および CMA の高い生成抑制効果が認められた (Fig. 5)。ゲンノショウコはタンニンを豊富に含有し、特に geraniin を主成分として含むことから、タンニン様成分には AGEs 生成を抑制する作用があると推察される。今後、AGEs 生成抑制メカニズムの解明や動物における投与実験を行っていくことで、生体でも有効な AGEs 生成抑制化合物を明らかにできると考えられる。

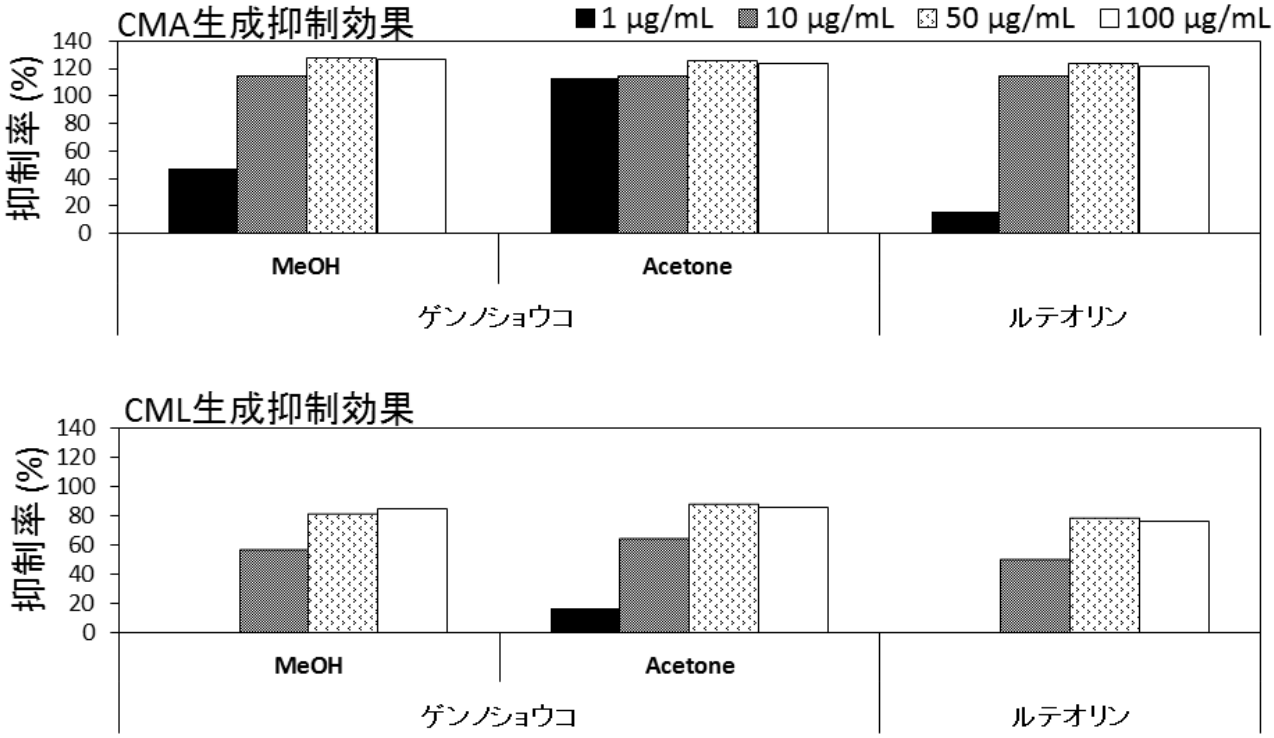


Fig. 5. ELISA 法によるゲンノショウコ抽出物の CMA および CML 生成抑制率。リボースとゼラチンの混合液に各抽出物を添加し、37℃で 7 日間インキュベートして評価を行った。AGEs 生成抑制化合物のコントロールとしては、ルテオリンを使用した。

5. ヤーコン

ヤーコン (*Smallanthus sonchifolius*) は、キク科スマランサス属の一種で、南米アンデス山脈地方原産の多年生草木である。豊富なポリフェノールを含む健康食品素材として知られており、地域によっては糖尿病や消化/腎障害を患う人々のための民間薬としても使用されている。しかし、現在の日本においては食材としての利用が極めて少ないことから、機能性食品としての利用法の開発が必要であると考え、研究を進めている。本年度はヤーコンの新たな機能性として、葉における抗炎症作用について評価を行った。ヤーコン茶葉熱水抽出物のリポキシゲナーゼ活性阻害作用を測定した結果、濃度依存的な阻害作用が認められた (IC_{50} 値　39.5 μg/ml) (Fig. 6)。さらに RAW264.7 マウスマクロファージ様細胞の NO 産生に及ぼす影響を調べた結果、毒性を示さない範囲で濃度依存的な抑制作用が明らかとなった (IC_{50} 値 35.4 μg/ml) (Fig. 7)。一方で、明瞭な NO 消去作用は示さなかった (Fig. 8)。

以上の結果から、ヤーコン茶葉熱水抽出物はリポキシゲナーゼ活性抑制作用を機序とする抗炎症作用を有することが明らかとなった。今後、NO 産生抑制メカニズムの解明、有効成分の分離同定や定量、分子レベルでの評価、生体レベルでの評価など、更なる検証を行うことで科学的根拠に基づいた新たな機能性が明らかとなり、機能性食品としての利用が可能になると考えられる。

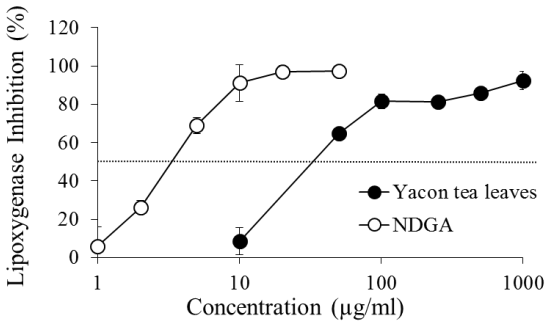


Fig. 6. ヤーコン茶熱水抽出物のリポキシゲナーゼに及ぼす濃度依存的効果　図中のデータは平均値±標準偏差 (n=4)。NDGA (nordihydroguaiaretic acid の略称) はポジティブコントロール。

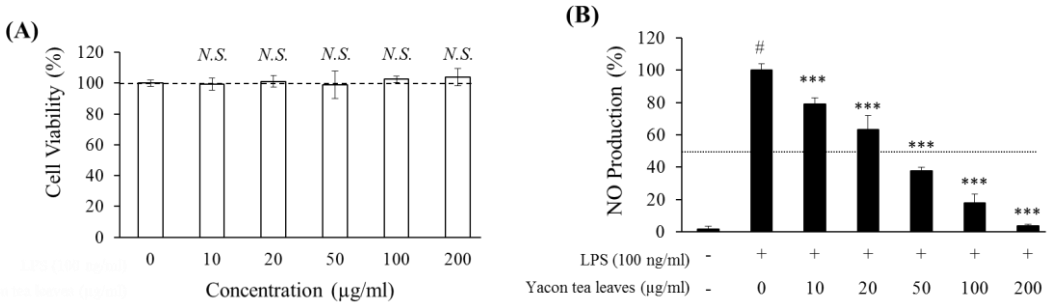


Fig. 7. ヤーコン茶葉の熱水抽出物の細胞生存率 (A) および RAW264.7 マウスマクロファージ様細胞の LPS 誘導の NO 産生に及ぼす阻害作用 (A) においては、細胞を異なる濃度のヤーコン茶場抽出物とともに 24 時間培養。細胞生存率は Cell-counting kit-8 を用いて測定。(B) においては、細胞を異なる濃度のヤーコン茶葉熱水抽出物とともに 100 ng/ml の LPS 共存下で 24 時間培養。培養上清を回収し、Griess 法により NO 量を測定。図中のデータは平均値±標準偏差 (n=4)。未処理の細胞 (control) に対して#$p < 0.001$、LPS 処理細胞に対して*$p < 0.001$ で有意差を判定。(A) における *N.S.*は有意差無し。NO は nitric oxide、LPS は lipopolysaccharide の略称。

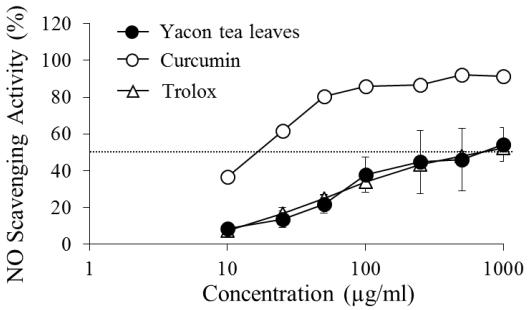


Fig. 8. ヤーコン茶熱水抽出物の NO 消去活性測定における濃度依存的効果　図中のデータは平均値±標準偏差 (n=4) 。クルクミンとトロロックスはポジティブコントロール。NO は nitric oxide の略称。

6. ラズベリー

バラ科キイチゴ属に含まれるラズベリーは、古くから果実が食用として利用されており、豊富なポリフェノール等を含むことから、近年では機能性食品としての利用も期待されている。しかし日本においては、夏季に多雨で高温な気候条件となるため西南暖地での栽培が困難とされてきた。そこで、本研究所ではこれまで暖地でも栽培容易な刺無しラズベリー品種の作出を目標に、品種改良を試みてきた。その結果、既存のラズベリー品種と比較して果実品質に遜色なく、樹勢が強く，刺が無く、極めて豊産であるという特徴を有する系統として BC1 No.2 を見出した。これまでに本系統の増殖手法の検討を行い、挿し木は困難であるが、組織培養による早生分枝によって増殖が可能であることなどが明らかとなっている。そこで本年度は BC1No.2 果実の機能性を評価する目的で、果実中のアントシアニン含量、総ポリフェノール含量、抗酸

化活性 (DPPH ラジカル消去能、ABTS カチオンラジカル消去能、H-ORAC 分析法) および AGEs 生成抑制効果を測定し、両親、F1 および他の BC1 系統と比較した。

その結果、BC1 系統の全アントシアニン含量 (Fig. 9A) は、No.2 が少なかったものの、いずれも F1 と同程度であった。また、アントシアニンの組成については、片親の野生種であるナワシロイチゴ (以下ナワシロと表記) とは異なり、4 系統ともにもう一方の片親である'ワインダーベイレッド' (以下ワインダーと表記) 同様の 4 種類のアントシアニンが含有されていることが示された。総ポリフェノール含量 (Fig. 9B) は、BC1 系統間で異なり、100g F.W.当たりの没食子酸当量として、No.1 が最も高く、No.2 では最も少なかったが、いずれも'ワインダー'と同程度の値を示した。また、抗酸化活性 (Fig. 10) については、DPPH 法、ABTS 法および ORAC 法でほぼ同様の傾向が示され、片親に用いたナワシロが有意に高く、BC1 系統は 'ワインダー'と同様か若干の高値を示した。また、100%メタノールを用いて抽出した粗抽出物について、抗 AGEs 抗体を用いた ELISA 法による AGEs 生成抑制効果の評価を行った。その結果 (Fig. 11)、すべての種および系統において 50 および 100 µg/mg の添加条件で AGEs 生成抑制効果が確認された。

本年度行った機能性検討の結果から、BC1No.2 は片親とした野生種のナワシロのように抗酸化活性は高くなかったものの、栽培品種とはほぼ同様かやや高い値を示すことが明らかになった。また、野生種と同程度の AGEs 生成抑制効果を有することが示された。本系統は、刺無しで栽培しやすく極めて豊産であることから、本学農学部の特徴ある農産物として今後の品種登録と栽培普及が期待される。しかしながら、本系統の果実は軟化し易いため、収穫期の早晩による果実品質の違いや早期収穫の可能性などについてさらなる検討が必要である。

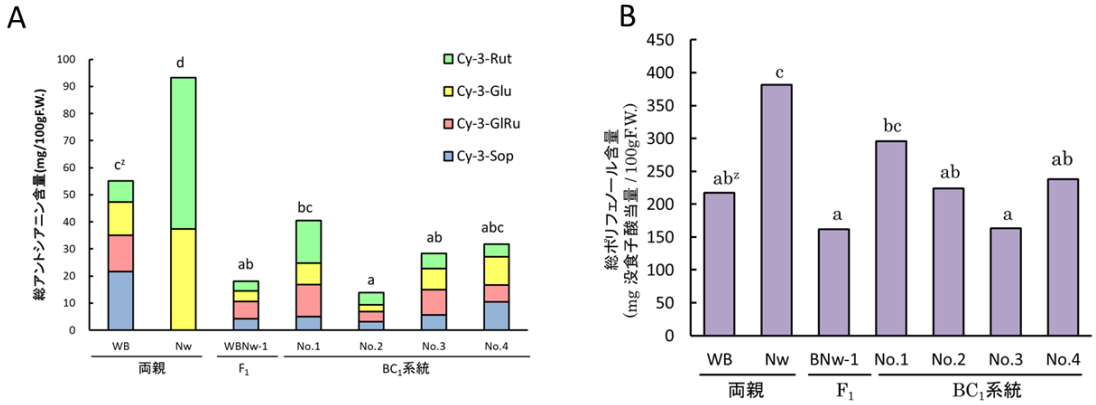


Fig. 9. 'ワインダー (WB)'×ナワシロ F_1(WBNw-1) と BC_1 系統およびその両親における A : 総アントシアニン含量とその組成、B : 総ポリフェノール含量。[z]Tukey の多重検定により、異なる英文字間に有意差 (5%) があることを示す

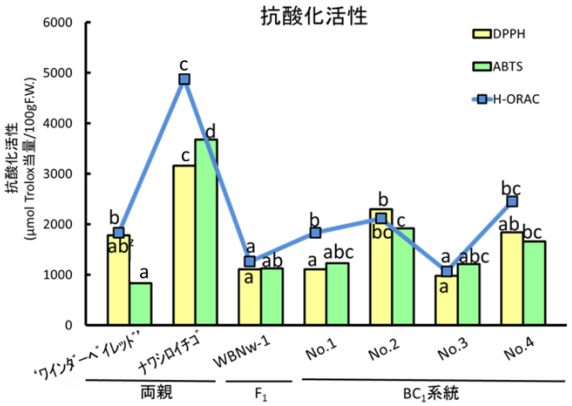


Fig. 10. 'ワインダー'×ナワシロ F_1(WBNw-1) と BC_1 系統およびその両親における抗酸化活性。[z]Tukey の多重検定により、異なる英文字間に有意差 (5%) があることを示す

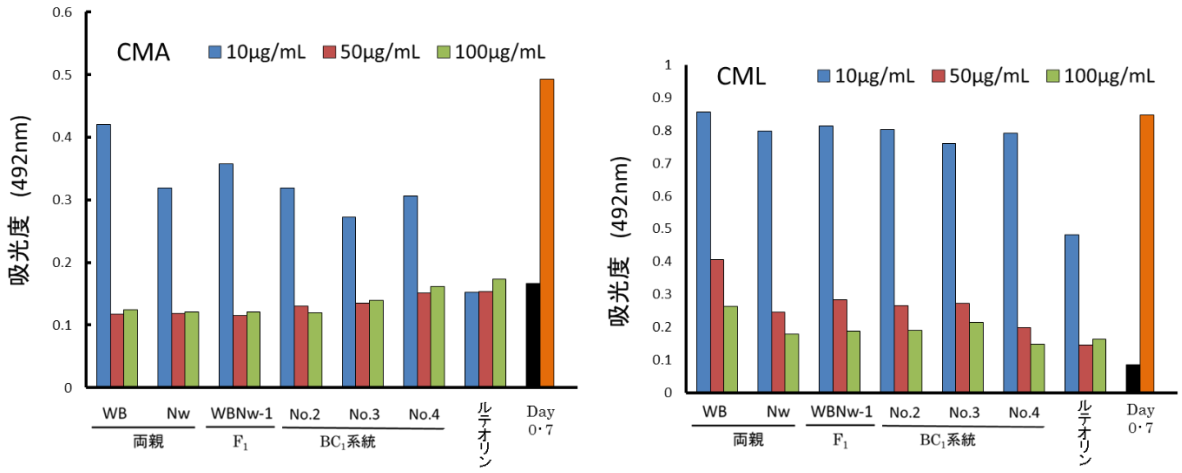


Fig. 11. ELISA 法による‘ワインダー (WB)’×ナワシロ F_1(WBNw-1) と BC_1(No.2～4) 系統およびその両親の CML および CMA 生成抑制能の評価。リボースとゼラチンの混合液を Blank、混合液を 37℃で 7 日間インキュベートしたものを Control とした。ルテオリン (10 μg/ml) は AGEs 生成抑制化合物のコントロールとして使用した。

Ⅳ. 総括

本年度は薬用および食用として利用されてきた 6 種の植物種および植物群において機能性に関する評価を行った。その結果、ハリアサガオ、ブラジルヤラッパおよびブラックベリーにおいて新規化合物の構造が明らかとなり、ブラックベリー由来の化合物においては、ヒトの白血病細胞に対する増殖抑制作用を有することが明らかとなった。さらに、前年度から引き続き機能性の評価を行っているヤーコンやラズベリーに関しては、ヤーコンにおける NO 産生抑制作用やリポキシゲナーゼ活性阻害作用が明らかとなった他、ラズベリーでは品種改良によって選抜された系統における機能性の評価を行った。その結果、選抜された系統は従来の品種に比べ抗酸化および抗糖化作用が高いことが明らかとなり、本系統が栽培の容易さと豊産の特性を持った高機能性を有する品種であることが示された。

以上のように本年度は、機能性を有する植物の選抜や品種改良から機能性評価までを一貫して行うことによって各研究者が個別に行う研究では困難であった多くの成果を得ることができた。しかしながら、多数の植物の中から目的の機能性を有する種を特定することや、品種改良には多くの時間が必要であったことから、今年度機能性を検証した複数の植物において生体での効果を検証するまでには至っていない。そのため、今後も動物実験や臨床試験を行い、生体において効果の明らかな機能性素材の開発をさらに進めていく予定である。

Ｖ．業績

研究成果

[著書]

1. 荒木朋洋，安田伸，多賀直彦，本田憲昭，松田靖，村田達郎，芝田猛，椛田聖孝 (2016.6)循環型醸造と機能性食品．でん粉と食品（日本応用糖質科学会九州支部）41, 1-7.（講演、（総説））

[学会発表]

1. 安田伸，井越敬司．シェーブル（ヤギ乳）チーズの抗酸化作用．第 18 回全国山羊サミット in 阿蘇．第 18 回全国山羊サミット in 阿蘇実行委員会　全国山羊ネットワーク．(阿蘇プラザホテル，熊本県) III. 山羊乳の加工.セッション．一般発表．講演要旨集 p69-71. 2016 年 11 月．
2. Murata T, Matsuura A, Abe J, Yasuda S, Pradhan R. Prospects of rice insect pest control under the environementally friendly farming in Japan. The First International Conference on Hybridized Agriculture. (Sojo University, Kumamoto, Japan), Oct, 2016.
3. Sugahara S, Ono M, Igoshi K, Yasuda S. Inhibitory effect of 4-methylumbelliferyl sulfate on superoxide anion radical generation assays. The First International Conference on Hybridized Agriculture. (Sojo University, Kumamoto, Japan), Oct. 2016.
4. Ueda Y, Matsuda Y, Murata T, Ono M, Kabata K, Igoshi K, Yasuda S. Comparison of phenolic parameters and inhibitory effects of yacon leaves from different varieties on carbohydrate digestive enzymes. The First International Conference on Hybridized Agriculture. (Sojo University, Kumamoto, Japan), Oct. 2016.
5. Taga N, Kabata K, Murata T, Shibata T, Araki T, Yasuda S., Matsuda Y, Honda K. Research on zero emission brewing with purple-colored sweet potato. P22-15, Abstracts p50. The First International Conference on Hybridized Agriculture. (Sojo University, Kumamoto, Japan), Oct. 22, 2016.
6. 越智大起，上田裕人，岩下小太郎，多賀直彦，本田憲昭，村田達郎，松田靖，芝田猛，荒木朋洋，椛田聖孝，小野政輝，井越敬司，安田伸．ムラサキイモ焼酎粕液分の Diaion HP20 カラムによる分画と各画分の抗酸化活性の評価．日本農芸化学会 2016 年度西日本支部大会 (長崎大学文京キャンパス，長崎県) 2016 年 9 月．
7. 匂坂晃爾，菅原進太郎，上田裕人，小松春喜，小野政輝，井越敬司，安田伸．食用ホオズキ果実抽出物の ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) 法に基づく調製、総ポリフェノール含量および総抗酸化能の測定．日本農芸化学会 2016 年度西日本支部大会 (長崎大学文京キャンパス，長崎県) 2016 年 9 月．
8. 徳永祐希，菅原進太郎，大川瑛梨子，小野政輝，黒木勝久，榊原陽一，水光正仁，安田伸．解熱鎮痛薬 acetaminophen 由来代謝物の活性酸素消去作用．日本農芸化学会 2016 年度西日本支部大会 (長崎大学文京キャンパス，長崎県) 2016 年 9 月．
9. 小野政輝，武富早希，柿木優一，安田伸，大川雅史，金城順英，吉満斉，野原稔弘，ハリアサガオ種子の新樹脂配糖体 muricatin IX に関する研究．日本生薬学

会第 36 回年会 (富山国際会議場, 富山県) 2016 年 9 月.

10. 菅原進太郎, 福原久美子, 小野政輝, 井越敬司, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, 安田伸. 1-または2-naphthol とその硫酸体の抗酸化作用および細胞毒性の比較評価. 2016 年度 (第 20 回) 生物機能研究会 (フェニックス・シーガイア・リゾート　コテージ・ヒムカ, 宮崎県) 2016 年 7 月.
11. 徳永祐希, 菅原進太郎, 大川瑛梨子, 小野政輝, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, 安田伸. 解熱鎮痛薬 acetaminophen 由来の代謝物による酸化バランス調節作用. 2016 年度 (第 20 回) 生物機能研究会 (フェニックス・シーガイア・リゾート　コテージ・ヒムカ, 宮崎県) 2016 年 7 月.
12. 須川日加里, 松田志織, 白河潤一, 木下奨, 古澤知里, 荒川翔太郎, 椛田聖孝, 永井竜児. スイゼンジノリ摂食は 1 型糖尿病マウスの水晶体 CML 生成を抑制する. 第 26 回日本メイラード学会年会（つくば国際会議場, 茨城県) 2016 年 11 月.
13. 白河潤一, 荒川翔太郎, 田川智也, 後藤憲太郎, 及川成永, 小林正和, 永井竜児. STZ 誘発糖尿病ラットに対するサラシア抽出物の糖尿病改善効果の評価. 第 31 回日本糖尿病合併症学会 (仙台国際センター, 宮城県) 2016 年 10 月.
14. 白河潤一, 荒川翔太郎, 田川智也, 後藤憲太郎, 及川成永, 小林正和, 永井竜児. STZ 誘発糖尿病ラットにおけるサラシア抽出物の糖尿病改善効果. 第 12 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム (熊本大学, 熊本)　2016 年 8 月.
15. 須川日加里, 松田志織, 白河潤一, 木下奨, 荒川翔太郎, 椛田聖孝, 永井竜児. スイゼンジノリ摂食による 1 型糖尿病マウスの水晶体中 CML 蓄積抑制効果について. 第 12 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム (熊本大学, 熊本) 2016 年 8 月.
16. 木下奨, 古澤知里, 大野礼一, 須川日加里, 白河潤一, 永井竜児. AGEs 生成抑制効果を有する天然物のスクリーニング. 第 70 回日本栄養・食糧学会大会 (武庫川女子大学, 兵庫) 2016 年 5 月.
17. 金子博, 森元大樹, 執行みさと, 大和田大樹, 國武久登, 小松春喜. ラズベリー‘ワインダーベイレッド’とナワシロイチゴの戻し交雑より得られた BC1No.2 の繁殖. 園芸学会平成 28 年度秋季大会 (名城大学, 名古屋) 2016 年 9 月.

[論文]

1. 上田裕人, 菅原進太郎, 松田靖, 村田達郎, 黒田泰弘, 星良和, 椛田聖孝, 小野政輝, 井越敬司, 安田伸.ヤーコン茶葉熱水抽出物の *in vitro* でのα-グルコシダーゼおよびα-アミラーゼ阻害作用. 東海大学先進生命科学研究所紀要, 1, 33-37. (2017)
2. 白河潤一, 大野礼一, 木下奨, 須川日加里, 市丸健太, 星良和, 永井竜児. 植物における AGEs 生成抑制化合物の探索−モウセンゴケ属植物の AGEs 生成抑制効果−. 東海大学先進生命科学研究所紀要, 1, 46-49. (2017)
3. 上田裕人, 菅原進太郎, 松田靖, 村田達郎, 黒田泰弘, 星良和, 椛田聖孝, 小野

政輝, 井越敬司, 安田伸. ヤーコン茶葉熱水抽出物のリポキシゲナーゼに対する阻害作用および RAW264.7 マウス由来マクロファージ様細胞を用いた NO 産生抑制作用. 東海大学紀要農学部 36, 37-43. (2017)

4. Nishimura T, Kabata K, Koike A, Ono M, Igoshi K, Yasuda S. *In vitro* anti-inflammatory effects of edible *igusa* soft rush (*Juncus effusus* L.) on lipoxygenase, hyaluronidase, and cellular nitric oxide generation assays: Comparison with *matcha* green tea (*Camellia sinensis* L.). *Food Sci Technol Res.* **22**, 395-406. (2016)
5. Ono M, Oda S, Yasuda S, Mineno T, Okawa M, Kinjo J, Miyashita H, Yoshimitsu H, Nohara T, Miyahara K. Acylated glycosidic acid methyl esters generated from the convolvulin fraction of *Rhizoma Jalapae Braziliensis* by treatment with indium(III) chloride in methanol. *Chem Pharm Bull* **65**, 107-111. (2017)
6. Ono M, Taketomi S, Kakiki Y, Yasuda S, Okawa M, Kinjo J, Yoshimitsu H, Nohara T. A new resin glycoside, muricatin IX, from the seeds of *Ipomoea muricata*. *Chem Pharm Bull* **64**, 1408-1410. (2016)
7. Ono M, Yasuda S, Nishi K, Yamamoto K, Fuchizaki S, Higuchi S, Komatsu H, Okawa M, Kinjo J, Yoshimitsu H, Nohara T. Two new triterpenoids from the seeds of blackberry (*Rubus Fructicosus*). *Nat Prod Res* **30**, 904-911. (2016)
8. Shirakawa J, Arakawa S, Tagawa T, Gotoh K, Oikawa N, Ohno R, Shinagawa M, Hatano K, Sugawa H, Ichimaru K, Kinoshita S, Furusawa C, Yamanaka M, Kobayashi M, Masuda S, Nagai M, Nagai R. *Salacia chinensis* L. extract ameliorates abnormal glucose metabolism and improves the bone strength and accumulation of AGEs in type 1 diabetic rats. *Food Funct*., **7**(6), 2508-2515. (2016)
9. Sugawa H, Ohno R, Shirakawa J, Nakajima A, Kanagawa A, Hirata T, Ikeda T, Moroishi N, Nagai M, Nagai R. *Eucommia ulmoides* extracts prevent the formation of advanced glycation end products. *Food Funct*., **7**(6), 2566-2573. (2016)
10. Nagai R, Shirakawa J, Ohno R, Hatano K, Sugawa H, Arakawa S, Ichimaru K, Kinoshita S, Sakata N, Nagai M. Antibody-based detection of advanced glycation end-products: promises vs. limitations. *Glycoconj J*., **33**(4), 545-552. (2016)