

冠動脈壁における Advanced Glycosylation Endproducts (AGEs) の免疫組織化学的検討

奈良県立医科大学第2病理学教室

中村 義行

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF ADVANCED GLYCOSYLATION ENDPRODUCTS (AGEs) IN CORONARY ARTERIES

YOSHIYUKI NAKAMURA

Second Department of Pathology, Nara Medical University

Received November 29, 1995

Abstract: Advanced glycosylation endproducts (AGEs) accumulate on long-lived extracellular matrix proteins and have been implicated in the micro- and macrovascular complications of diabetes mellitus. Recently developed anti-AGE antibodies were used in an immunohistochemical analysis of coronary arteries obtained from non-insulin dependent diabetic and nondiabetic patients. In the case of diabetes, the incidence of AGEs reactivity is higher in the older group than in the younger group. In the case of nondiabetes, however, there is no difference in the incidence of AGEs reactivity between the two groups. Duration of diabetes mellitus is significantly longer in the AGEs positive group than in the negative group. On the other hand, there is no difference in HbA_{1c} between the AGEs positive and negative groups. Incidence of coronary calcification and degree of coronary stenosis is higher in the AGEs positive group than in the negative group. These data support the role of advanced glycosylation in progressive coronary calcification and coronary stenosis associated with diabetes mellitus.

Index Terms

advanced glycosylation endproducts (AGEs), immunohistochemistry, coronary artery, diabetes mellitus

緒 言

糖尿病患者では非糖尿病患者に比較して動脈硬化が早期から発症し、また冠動脈疾患の発生率も高度であることが知られている^{1),2)}。最近、糖化最終段階産物(Advanced glycosylation endproducts; AGEs)が糖尿病血管合併症の発現に関与することが報告されるようになった³⁾⁻⁵⁾。蛋白質は非酵素的に血中グルコースと化学反応し、糖化されることによって特有の蛍光を発生し、互いに架橋を形成して不可逆的になる。AGEsは長期間に存在する細胞外基質蛋白に蓄積し、糖尿病の大血管およ

び小血管合併症に関与する可能性がある。これまで、*in vivo*においてAGEsの特異的な検出法がなかったため、AGEsの病理組織学的特徴についての報告は未だ少ない。構造的には

2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole(FFI), 5-hydroxy-methyl-1-alkyl-pyrrole-2-carbaldehyde(pyrraline), imidazo[4,5-b]pyridinium(pentosidine)などがAGEsの本態ではないかと考えられてきたが、現在では生体内において、これらの物質はAGEsの一部分に過ぎないと考えられている⁶⁾⁻¹²⁾。最近、*in vitro*において生理的条件下で合成したAGEsを用いて、AGEsに特

異的なモノクローナルおよびポリクローナル抗体が作成された¹³⁾⁻¹⁵⁾。この抗体は、*in vivo* で形成された AGEs についても特異的に認識し、異なる蛋白質に形成される AGEs の抗原決定基を共通に認識するという特徴を持つ。このように、抗 AGEs 抗体はコラーゲン、ヘモグロビン、血清蛋白、脂質及び LDL のアポ蛋白 B に形成される AGEs を同定および測定するために用いられるようになった^{13),16),17)}。最近、糖尿病合併症および加齢に伴う変化に対する AGEs の影響を評価するため、あるいは糖化阻害剤である aminoguanidine の効果を判定するために AGE イムノアッセイを用いた研究が行われている^{16),17)}。

今回、著者は糖尿病患者における冠動脈硬化に対する AGEs の関与を解明するために、抗 AGEs 抗体を用いてインスリン非依存性糖尿病剖検例および非糖尿病剖検例から得られた冠動脈標本に対して免疫組織学的検討を行い、病理組織学的検討および臨床検査値との比較を行った。

材料及び方法

1) 対象

対象は 1988 年から 1993 年の間に当大学病理学教室において病理解剖を施行され、肉眼的に 25 % 以上の冠動脈狭窄が認められた剖検心 134 例であり、男性 82 例、女性 52 例、平均年齢が 64 歳であった。生前にインスリン療法あるいは経口糖尿病薬治療を受けていた例を糖尿病群とし、それ以外を非糖尿病群とした。また、さらに症例を 65 歳未満群と、65 歳以上群にわけ、対象を計 4 群に分類した。それぞれの群により得られた冠動脈の最狭窄部分を切り出し、薄切標本を作製した。

2) 実験試薬

ウシ血清蛋白および RNase (Sigma Chemical, St. Louis, USA) 50 mg/ml を 500 mmol/l のグルコースとともに sodium phosphate buffer (pH 7.4) 下で無菌的に 12 週間、37°C で反応させ AGE-BSA および AGE-RNase を作成した。Makita らの方法¹³⁾により、AGE-BSA および AGE-RNase を家兎に免疫することにより、抗 AGE-BSA 抗体および抗 AGE-RNase 抗体を作成した。

3) 免疫組織化学

標本を 10 % ホルマリン固定後、パラフィン包埋した後 3~4 mm に薄切した。これらの標本を脱パラフィン後 0.05 % Protease-K (E. Merck, Darmstadt, Germany) を加えた 10 mmol/l Phosphate buffer saline (PBS: pH 7.4) 中で 37°C、30 分間 incubate した。次に、標本を PBS で洗浄後、0.3 % 過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシダーゼを阻害した。非特異的な結

合を阻害するために PBS で 3 回洗浄後 20 % 正常ヤギ血清 (Vector Labs., Burlingame, USA) を加え、室温で 10 分間反応させた。一次抗体として抗 AGE-RNase 家兎抗体を PBS で 100 倍希釈し、標本を 4°C、over night で反応させた。また、抗 RNase 抗体を control 抗体として同様に標本を 4°C、over night で反応させた。PBS で 3 回洗浄後、50 倍希釈のペルオキシダーゼ標識抗家兎 IgG ヤギ抗体 (Cappel, West Chester, USA) を 2 次抗体として、室温 2 時間反応させた。PBS で洗浄後、0.02 % 3, 3'-diaminodenzidine tetrahydrochloride (Sigma Chemical) を加えた Tris-HCl buffer (pH 7.6) で発色させた。counter staining として Meyer の Hematoxylin を用いた。対照実験として AGEs 染色陽性標本で、AGE-BSA を用いて抗 AGEs 抗体を吸収した後に同様の実験を行い、陰性の結果を得た。

4) AGEs 染色と臨床データおよび冠動脈病理形態像との関係

糖尿病症例を AGEs 染色陽性群と陰性群に分け、両群間の糖尿病罹患年数および HbA_{1c} の平均値を比較した。糖尿病罹患年数は経口糖尿病薬あるいはインスリン治療を開始してから病理解剖するまでの年数を用い、HbA_{1c} は病理解剖前 1 週間以内の値を採用した。さらに冠動脈の形態学的特徴を検討するため、全症例を抗 AGEs 染色陽性群と陰性群に分類し、両群間での冠動脈石灰化例数の比較および冠動脈狭窄率の平均値の比較を行った。冠動脈狭窄率は病理組織標本をカラーイメージプロセッサ (SPICCA II, Nippon Avionics, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

5) 統計方法

群間の比率の検定には χ^2 検定を用い、平均値の差の検定には対応のない Student's t-test を用いた。

結 果

① AGEs 染色態度

インスリン非依存性糖尿病患者 (72 歳男性、糖尿病罹患歴 13 年) から得られた冠動脈の粥状硬化巣を用いて AGEs 染色態度を検索した結果では、HE 染色で、細胞基質の沈着、リンパ球浸潤、コレステロール結晶、石灰化を特徴とする粥状硬化巣と内膜肥厚による血管の著明な狭窄が認められる。冠動脈内膜は不整に肥厚し、断裂が認められる (Fig. 1)。抗 AGEs 抗体による免疫染色では、粥状硬化巣内に AGEs の局在が認められ、粥状硬化巣全体に AGEs が認められるが、特にコレステロール結晶周囲および石灰化部周囲で染色性が高度であった (Fig. 2)。対照実験として、AGEs 染色陽性であった組織標本を用

いて、抗 AGEs 抗体を AGEs 物質で完全に吸収し、遠沈後の上清で同様の実験を行うと染色陰性であった。また、もうひとつの対照実験として、抗 RNase 抗体および AGEs のキャリア蛋白に対する抗体を用いて再び同様の実験を行なったが、染色は陰性であった (Fig. 3)。以上から、本研究で使用した抗 AGEs 抗体の特異性が確認された。

②糖尿病の有無および年齢と AGEs 染色との関係

対象の 134 例の糖尿病患者から得た組織標本中 46 例で AGEs 染色が陽性であった。AGEs 染色陽性例は、糖尿病群で 56 例中 28 例 (50.0%) で、非糖尿病群で 78 例中 18 例 (23.1%) であり、糖尿病群では非糖尿病群に比

して有意に AGEs 染色陽性例が多かった。65 歳以上の糖尿病群では他の 3 群に比して、AGEs 染色陽性例が多かった。糖尿病群では、65 歳未満群に比して、65 歳以上群で AGEs 染色陽性例が多かったが、非糖尿病群では、年齢による有意差は認められなかった (Table 1)。

③糖尿病に関する臨床検査値と AGEs 染色との関係

糖尿病罹患歴は、AGEs 染色陽性群において平均 19.8 ± 12.2 年、AGEs 染色陰性群において平均 8.6 ± 5.8 年であり、陽性群で有意に長期であった。一方、HbA_{1c} 値は、AGEs 染色陽性群で 9.2 ± 0.5%、AGEs 染色陰性群で 9.0 ± 0.6% であり、有意の差は認められなかった (Fig. 4)。

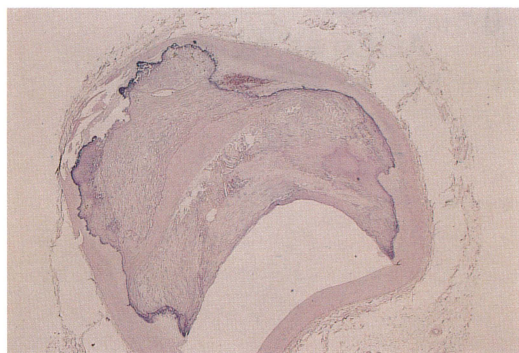


Fig. 1. Transverse section of left anterior descending coronary artery obtained from a 72-year-old non-insulin dependent diabetic patient (duration of diabetes, 13 years). Hematoxylin and eosin stain (×10).

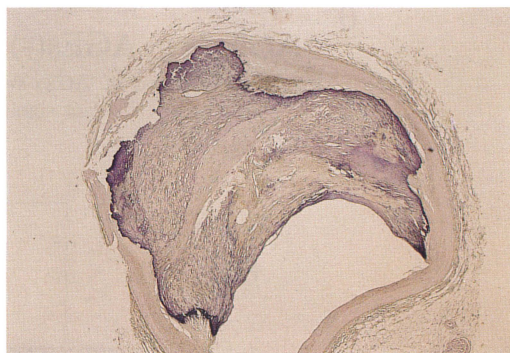


Fig. 3. A consecutive section stained with control rabbit antibody (anti-RNase). Sections stained with anti-AGE-RNase antibody that had been preincubated with the antigen AGE-BSA showed the same level of background staining as in Fig. 3.

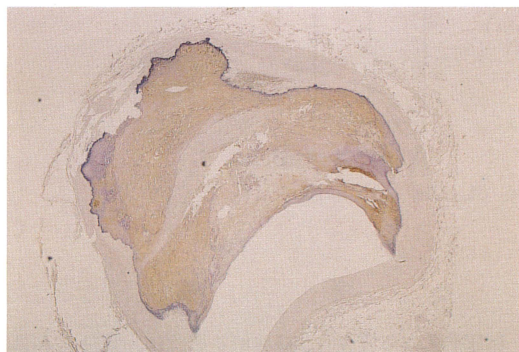


Fig. 2. Immunohistochemical staining of AGEs in a consecutive section (×10). The specimen was stained with rabbit antibody against AGEs (anti-AGEs-RNase), followed by peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG, as described in Materials and Methods.

Table 1. Comparison of AGEs reactivity on age between diabetic and non-diabetic patients.

Age (yrs.)	<65	≥65	Total
Diabetes (-)	8/46 (17.4%)	10/32 (31.3%)	18/78 (23.1%)
Diabetes (+)	8/24 (33.3%)	20/32 (62.5%)	28/56 (50.0%)

** p < 0.01

Table 2. Comparison of calcification frequency between AGEs positive and negative group.

	Calcification
AGE (-) group	7/88 (8.0%)
AGE (+) group	36/46 (78.3%)

** p < 0.01

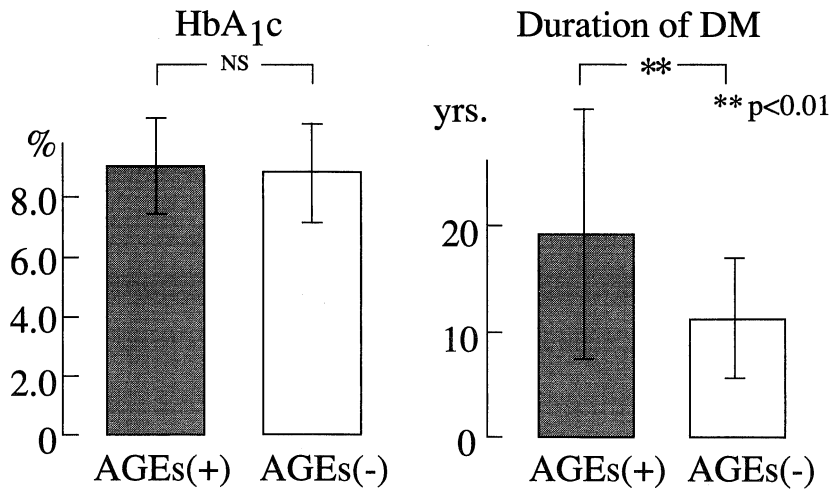


Fig. 4. Comparison of AGEs reactivity on HbA_{1c} and duration of diabetes. (NS=not significant)

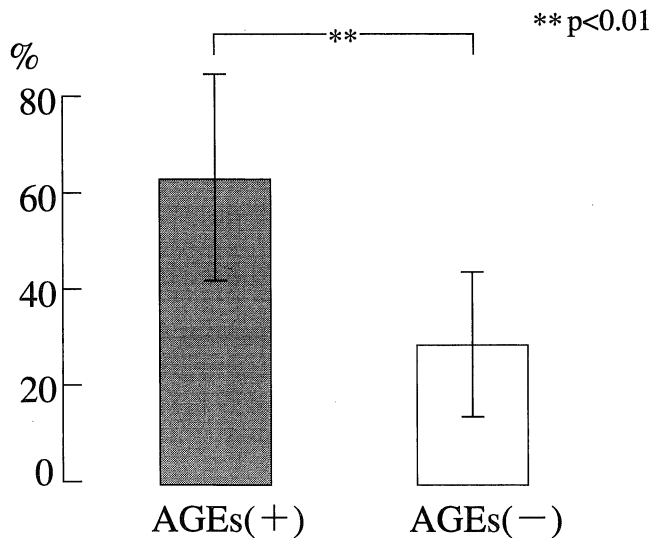


Fig. 5. Stenotic proportion of the coronary arteries

④冠動脈狭窄率および石灰化と AGEs 染色との関係

AGEs 染色陽性群における冠動脈狭窄率は平均 63.1 ± 21.7 %, 石灰化例は 46 例中 36 例(78.3 %)であった。一方, AGEs 染色陰性群における冠動脈狭窄率は平均 33.1 ± 14.7 %, 石灰化例は 88 例中 7 例(8.0 %)であり, AGEs 染色陽性群では陰性群に比して, 冠動脈狭窄率が高率であり, また冠動脈石灰化例が有意に多かった (Table 2, Fig. 5).

考 察

糖尿病による慢性的な高血糖状態では, 蛋白の AGE 化が進行しやすい³⁾⁻⁵⁾. 蛋白は AGE 化されると新たな構造的, 機能的特徴を持つようになる. AGEs が徐々に結合組織のコラーゲンと架橋を形成するため, 高齢になるに従って動脈や結合組織の弾性が低下するが, この変化は糖尿病例では, 非糖尿病例に比して早期から発症する¹⁸⁾. AGEs の受容体はマクロファージ, 腎糸球体メサンギウム細胞および血管内皮細胞表面に存在するが, AGEs は

マクロファージの遊走を惹起し、AGEsは受容体を介してマクロファージに貪食されると、ある種のサイトカインが放出されて組織の再構築が起こると考えられている¹⁹⁾。AGEsが血管内皮細胞の受容体に結合すると、血管透過性が亢進し、抗凝固因子thrombomodulin発現のdown regulationが起こり、procoagulant tissue factorの細胞膜発現が亢進される²⁰⁾。AGE化された蛋白は、直接EDRF(endothelial-derived relaxing factor)を不活化することによって糖尿病性の血管障害を引き起こす²¹⁾。最近、Advanced glycosylationの阻害剤であるaminoguanidineが長期の高血糖状態による様々な糖尿病合併症を予防することが報告されている²²⁾⁻²⁵⁾。従って、AGEsは糖尿病の合併症である大血管および小血管の障害形成の中心的役割を果たし、糖尿病性網膜症・神経症あるいは動脈硬化症の重要な原因のひとつであると考えられる。

動脈壁において、AGEsは血管透過性を亢進させ、また、窒素酸化物活性を不活性化させてサイトカインの分泌を促進させる^{19),20)}。糖尿病患者において早期に起こる血管病変には、血管壁透過性の異常、プロコアグラント活性の亢進および内皮依存性血管拡張などが挙げられる^{1),21),26)-28)}。血清蛋白やリポ蛋白は動脈基底膜および中膜の肥厚を促進するが、高齢になるに従って、脂肪斑や内皮の破綻が出現する。これらの変化は内膜肥厚および粥状硬化巣の形成に引き続き発生する。

AGEsはまず、細胞外で蛋白と結合し、次に基底膜や基質蛋白に蓄積する。血管壁においても、コラーゲンと結合したAGEsは血漿蛋白と架橋を形成するか、あるいは血漿蛋白を捕捉して窒素酸化物を不活化し、また特定の細胞膜受容体と反応してサイトカインや成長因子の分泌を促進する^{18),19),21),29)}。

血漿LDLも蛋白と同様に糖化を受け、糖尿病患者においてその増加が認められる。AGEsがLDLに結合すると、LDLは酸化を受ける¹⁶⁾。この修飾されたLDLは組織中のマクロファージに貪食され、さらにそのマクロファージは脂質を含んだ泡沫細胞となって動脈硬化血管に蓄積する³⁾。このように、蛋白質および脂質の糖化が糖尿病患者における動脈硬化に影響を与えていることが知られるようになった。最近の研究で、LDLの成分であるリン脂質とアポ蛋白の両方ともにAGE化されることが報告され¹⁵⁾、このことから、AGEsは動脈硬化の発現および進展に影響を与えていると思われる。血清LDLの解析で、糖尿病患者のAGE化リン脂質は非糖尿病患者の4倍、AGE化アポ蛋白は同様に2倍と高値である¹⁶⁾。AGE化リン脂質はLDLを酸化し、マクロファージのスカベ

ンジャー受容体により除去されることによって動脈硬化を促進する²⁾。糖尿病患者において、酸化LDLの増加が認められることから、AGEsがLDLの酸化を亢進している可能性があると考えられる¹⁶⁾。

本研究において、インスリン非依存性糖尿病患者、および非糖尿病患者から得た冠動脈を材料とし、抗AGEs抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。予備実験から、プロテアーゼKで前処理した標本において、染色性が最も良好であった。これは、高齢者や糖尿病患者において、結合織の架橋に蛋白と結合したAGEsが関与しているという報告があり^{5),18),30)}、プロテアーゼを用いて結合蛋白を分解することによって、AGEsと抗AGEs抗体との結合性が亢進するためと考えられる。AGEsは冠動脈の粥状硬化巣部分全体で陽性であり、特に細胞外蛋白質沈着の部分および石灰化部周囲で染色性が高度であった。動脈粥状硬化では動脈壁に蛋白および硝子化物質が沈着することが特徴的であり¹⁾、粥状硬化部におけるAGEsの局在様式はAGEsが緩徐に形成されて細胞外基蛋白の機能を変化させるという説と一致する^{10),13),18)}。AGEsの組織への集積には二つの可能性があり、ひとつは局所で糖化が起きてAGEsが形成されるという可能性で、もう一つはAGE化された血清蛋白が捕捉されるという可能性であるが^{5),30)}、おそらくは両方の過程ともに存在すると思われる。蛋白質よりもリン脂質のほうがAGE化されやすいことが知られており、このことから動脈粥状硬化内で存在するAGEsはAGE化脂質によるものである可能性が高い¹⁶⁾。内膜下にAGE化された脂質が増加すると、蛋白の沈着と架橋形成が亢進し、マクロファージおよび単球走化性が刺激され、EDRFの血管拡張作用が非活性化される^{19),21),29),30),31)}。また、AGE化された脂質はマクロファージや内皮細胞に存在するAGEs特異的受容体系を刺激する作用を持ち³²⁾、それに続いて血管透過性の亢進や局所のサイトカインおよび成長因子の刺激を引き起こす^{19),20)}。

AGEsの多様な病理学的作用を考えると、AGEsが動脈粥状硬化巣内に存在することを確認し得たことにより、糖尿病性血管症にadvanced glycosylationが重要な役割を果たすと考えられ、また、血管壁AGEsを免疫組織化学的に解析することにより糖尿病および非糖尿病患者の血管病変の進行を予防する上でaminoguanidineなどのadvanced glycosylation阻害薬の効果を判定できると考えられる。

結 語

糖尿病患者における冠動脈硬化に対するAGEsの関

与を解明するために、抗 AGEs 抗体を用いてインスリン非依存性糖尿病剖検例および非糖尿病剖検例から得られた冠動脈に対して免疫組織学的検討を行い、さらに臨床検査成績との関連を検討し以下の結果を得た。

1. 冠動脈粥状硬化巣に AGEs の局在が認められ、特に細胞外蛋白質沈着の部分および石灰化部周囲に高度の染色性が認められた。

2. AGEs の冠動脈における局在は非糖尿病群に比して糖尿病群で高率に認められた。

3. 糖尿病群における AGEs 染色陽性率は、65 歳未満群に比して 65 歳以上群で高率であった。しかし、非糖尿病群では両群間で差がなかった。

4. 糖尿病罹病期間は、AGEs 陰性群に比して陽性群で長期であった。一方、HbA_{1c} 値は両群間で差がなかった。

5. 冠動脈石灰化率および狭窄率は、AGEs 染色陰性群に比して陽性群で高かった。

以上の成績から冠動脈において、AGEs と糖尿病罹病期間には密接な関係があり、粥状硬化の発生と進展に AGEs が関与することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました奈良県立医科大学第 2 病理学教室日浅義雄教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、論文の御校閲、御助言を賜りました第 1 内科学教室土肥和紘教授ならびに第 1 病理学教室市島國雄教授に深謝いたします。更に、直接御指導いただきました坂口泰弘第 1 内科学教室助手に感謝するとともに研究を御援助下さった堀井康弘博士(現星和台クリニック院長)および第 1 内科学教室心臓病理グループ諸兄に感謝の意を表します。

本論文の一部は第 57 回日本循環器学会総会(1993 年, 千葉), 第 58 回日本循環器学会総会(1994 年, 東京)および第 91 回日本内科学会総会(1994 年, 新潟)において発表した。

文 献

- 1) **Bryfogle, J. W. and Bradley, R. F.** : The vascular complications of diabetes mellitus. A clinical study. *Diabetes* **6** : 159-167, 1957.
- 2) **Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J.C. and Witztum, J. L.** : Beyond cholesterol. Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenesis. *N. Engl. J. Med.* **320** : 915-924, 1989.
- 3) **Brownlee, M., Cerami, A. and Vlassara, H.** : Advanced glycosylation endproducts in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med.* **318** : 1315-1321, 1988.
- 4) **Njoroge, F. G. and Monnier, V. M.** : The chemistry of the Maillard reaction under physiological conditions: a review. *Prog. Clin. Biol. Res.* **304** : 85-107, 1989.
- 5) **Bucala, R. and Cerami, A.** : Advanced glycosylation: chemistry, biology and implications for diabetes and aging. *Adv. Pharmacol.* **23** : 1-34, 1992.
- 6) **Pongor, S., Ulrich, P. C., Bencsath, F. A. and Cerami, A.** : Aging of proteins: isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **81** : 2684-2688, 1984.
- 7) **Njoroge, F. G., Sayre, L. M. and Monnier, V. M.** : Detection of D-glucose-derived pyrrole compounds during Maillard reaction under physiological conditions. *Carbohydrate Res.* **167** : 211-220, 1987.
- 8) **Farmar, J., Ulrich, P. and Cerami, A.** : Novel pyrroles from sulfite-inhibited Maillard reactions: insight into the mechanism of inhibition. *J. Org. Chem.* **53** : 2346-2349, 1988.
- 9) **Ahmed, M. U., Thorpe, S. R. and Baynes, J. W.** : Identification of carboxymethyllysine as a degradation product of fructosyllysine in glycosylated protein. *J. Biol. Chem.* **261** : 4889-4894, 1986.
- 10) **Sell, D. R., Lapolla, A., Odetti, P., Fogarty, J. and Monnier, V. M.** : Pentosidine formation in skin correlates with severity of complications in individuals with long-standing IDDM. *Diabetes* **41** : 1286-1292, 1992.
- 11) **Chang, J. C. F., Ulrich, P. C., Bucala, R. and Cerami, A.** : Detection of an advanced glycosylation product bound to protein *in situ*. *J. Biol. Chem.* **260** : 7970-7974, 1985.
- 12) **Smith, P. R., Somani, H. H., Thornalley, P., Benn, J. and Sonksen P. H.** : Evidence against the formation of 2-amino-6-(2-formyl-5-hydroxymethyl-pyrrol-1-yl)-hexanoic acid ("pyrraline") as an early-stage product or

- advanced glycation end product in non-enzymic protein glycation. *Clin. Sci.* **84** : 87-93, 1993.
- 13) **Makita, Z., Vlassara, H., Cerami, A. and Bucala, R.** : Immunochemical detection of advanced glycosylation end-products *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **267** : 5133-5138, 1992.
 - 14) **Nakayama, H., Taneda, S., Kuwajima, S., Aoki, S., Kuroda, Y., Misawa, K. and Nakagawa, S.** : Production and characterization of antibodies to advanced glycation products on proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162** : 740-745, 1989.
 - 15) **Horiuchi, S., Araki, N. and Morino, Y.** : Immunochemical approach to characterize advanced glycation endproducts of the Maillard reaction. *J. Biol. Chem.* **266** : 7329-7332, 1991.
 - 16) **Bucala, R., Makita, Z., Koschinsky, T., Cerami, A. and Vlassara, H.** : Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 6434-6438, 1993.
 - 17) **Makita, Z., Vlassara, H., Rayfield, E., Cartwright, K., Friedman, E., Rodby, R., Cerami, A. and Bucala, R.** : Hemoglobin-AGE: a circulating marker of advanced glycosylation. *Science* **258** : 651-653, 1992.
 - 18) **Monnier, V. M., Kohn, R. R. and Cerami, A.** : Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 583-587, 1984.
 - 19) **Kirstein, M., Brett, J., Radoff, S., Ogawa, S., Stern, D. and Vlassara, H.** : Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 9010-9014, 1990.
 - 20) **Esposito, C., Gerlach, H., Brett, J., Stern, D. and Vlassara, H.** : Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J. Exp. Med.* **170** : 1387-1407, 1989.
 - 21) **Bucala, R., Tracey, K. J. and Cerami, A.** : Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. *J. Clin. Invest.* **87** : 432-438, 1991.
 - 22) **Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, T., Ulrich, P. and Cerami, A.** : Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein. *Science* **232** : 1629-1632, 1986.
 - 23) **Soulis-Loparota, T., Cooper, M., Papazoglou, D., Clarke, B. and Jerums, G.** : Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetes* **40** : 1328-1334, 1991.
 - 24) **Hammes, H. P., Martin, S., Federlin, K., Geisen, K. and Brownlee, M.** : Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 11555-11558, 1991.
 - 25) **Kihara, M., Schmelzer, J. D., Poduslo, J. F., Curran, G. L., Nickander, K. K. and Low, P. A.** : Aminoguanidine effects on nerve blood flow, vascular permeability, electro-physiology, and oxygen free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 6107-6111, 1991.
 - 26) **Osterby, R.** : Basement membrane morphology in diabetes mellitus. *in* Ellenberg and Rifkin's *Diabetes Mellitus: Theory and Practice* (Rifkin, H. and Porte, D., eds.). p221-233, 1990.
 - 27) **Bern M.** : Platelet functions in diabetes mellitus. *Diabetes* **27** : 342-350, 1978.
 - 28) **de Tejada, I. S., Goldstein, I., Azadzi, K., Krane, R. J. and Cohen, R. J. R.** : Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle in diabetic men with impotence. *N. Engl. J. Med.* **320** : 1025-1030, 1989.
 - 29) **Hogan, M., Cerami, A. and Bucala, R.** : Advanced glycosylation endproducts block the anti-proliferative effect of nitric oxide. Role in the vascular and renal complications of diabetes mellitus. *J. Clin. Inves.* **90** : 1110-1115, 1992.
 - 30) **Brownlee, M., Vlassara, H. and Cerami, A.** : Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low density lipoprotein. *Diabetes* **34** : 938-941, 1985.
 - 31) **Vlassara, H., Fuh, H., Makiata, Z., Krungkrai, S., Cerami, A. and Bucala, R.** : Exogenous advanced glycosylation end products induce com-

- plex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 12043-12047, 1992.
- 32) **Vlassara, H., Brownlee, M. and Cerami, A.** : High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 5588-5592, 1985.