Maillard反応——最近の進歩

並木満夫, 林 建樹*

食品, 生体成分の関与する反応で非酵素的に進行するものの代表的なものに Maillard 反応があり, その研究の歴史は古い. しかし, 褐変化などの化学的側面はもちろん, 安全性や老化との関連など, 古くても新しい側面が常に導き出されてきている. 単純な反応系のように, 実に複雑で意外な反応や生成物が明らかにされてきた. 酵素による反応の精細巧緻に比すれば自由奔放というべきだろうか. 最近の話題に注目してみよう.

1912 年に, Louis Maillard が糖とアミノ酸の混合液を加熱すると著しい褐変化が起こることについて初めて報告⁽¹⁾して以来, この反応は Maillard (マヤール) 反応と呼ばれている**. この反応が単に食品を褐変させるということだけであれば,それほど大きな問題ではなかったかもしれない. しかし, やがてこれが一方ではアミノ酸, タンパク質やアミン類と, 他方では還元糖をはじめとする各種カルボニル化合物という, 共に食品系はもとより生体系でも最も普遍的に存在し, かつ基本的に重要な成分の間において非酵素的に生理条件下でも起こる反応であること, しかもそれが食品の嗜好性, 栄養性, 安全性に大きな役割をもち, さらに生体内でも種々の機能に大きな影響をもつ非常に重要な反応であることがわかってきた.

このようなことから, Maillard 反応はつねに食品科学の中心的課題の一つとされ, いろいろな面から膨大な数の研究が行なわれており, また最近生体タンパク質についてこの面からの研究も盛んになってきた. このような情勢から, この反応をテーマとする国際シンポジウムが国際食品科学工学連盟の後援の下に 1979 年 9 月スウェーデンで開催された. その大きな成果は一冊の本として発表されている⁽³⁾. ついで, 第 2 回の会議が 1982 年 3 月にラスベガスで米国化学会の主催で開かれ,

その時の発表論文題目は川村により紹介されている⁽²⁾. 第 1 回に比べてヨーロッパと日本からの参加が少なくやや物足りないところもあったが, 主な論文はまとめられてアメリカ化学会から最近刊行されている⁽⁴⁾.

筆者らは, いずれのシンポジウムにも出席する機会を与えたので, そこで発表された研究を中心に Maillard 反応に関する研究の最近の動向を紹介したい. ここで, Maillard 反応は広く食品・生体系におけるアミノカルボニル反応と解釈し, 関連する課題を上記シンポジウムの項目に準じて分類し (表 1), これに従って述べることにする.

表 1 食品・生体系におけるアミノカルボニル反応 (Maillard 反応) とその影響

反 応 物	研究分野	具体的課題
アミノ酸 タンパク質	I) 化学	褐変化機構 着色物質の化学
アミン類 アンモニア		
+	II) 食品加工	フレーバーの形成 褐変化抑制 物性変化 抗酸化
還元糖		
	III) 栄養生理	アミノ酸の損失 消化性低下 微生物への影響
脂肪酸 ポリフェノール アスコルビン酸 の酸化生成物	IV) 安全性	毒性物質 変異原の生成と抑制
その他 カルボニル 化合物	V) 生体内反応	糖尿病疾患 老化その他

* Mitsuo NAMIKI, Tateki HAYASHI, 名古屋大学農学部

** 彼とこの発見の周辺のことは, 最近川村によって詳しく紹介されている⁽²⁾ので参照されたい. Maillard 反応はこれまで一般にメイラード反応といわれてきたが, マヤールというほうがよいという.

基礎的研究

Maillard 反応はまず、アミノ基のカルボニル炭素への求核反応による縮合であるが、縮合した糖もアミノ酸もいずれも 2 次的な反応を起こし易い分子であるので、脱水、異性化、開裂、環化、重合などが起こるため生成物も多種多様となり、褐変化したメラノイジンも幅広い分子量をもち、その構造は複雑で未だほとんど明らかにされていない。

この反応機構についての研究もこれまで多く行なわれたが、1953 年 Hodge によって褐変物質生成前までの機構がまとめられ提出された⁽⁵⁾。その優れた業績は広く一般に認められており、どの食品化学の教科書にも必ず載せられているので、ここではその概略のみを図 1 に示した。これは、その後多少の追加修飾はあっても、30 年を経た今日まで、ほとんど書き換えられていない。この Maillard 反応の機構などに関する基礎研究は、わが国で最も盛んであって、最近欧米では特にあげるべき研究はみられない。

1. 糖の開裂を含む新しい初期反応機構

Maillard 反応の機構の解明のために反応中間体をそのまま、または誘導体として分離同定することは欠かせない研究手段である。しかし、この反応は非常に複雑に進行するので、普通的手段で反応系から取り出して分離同定できる生成物は場合によると褐変反応の主流から外れたやや安定な形になったものであり、活性の高い中間生成物は分離同定が困難で確認できない可能性が高い。そこで、その機構解明には、最近の機器分析を導入して不安定中間体をとらえたりする新しい研究手段が必要となる。

筆者らは、この反応生成物の抗酸化性に関連してフリーラジカル化学の観点から ESR, NMR などを用いてその反応の初期経過について研究を進めた。その

図 1 Maillard 反応の主要経路
(Hodge, 1953)

結果、糖-アミノ化合物を水またはアルコール系で加熱した場合、褐変の始まる以前の初期段階の反応液に、特徴的な超微細構造スペクトルをもつ ESR シグナルの観測に成功し、新しいラジカル化合物の生成を見いだした (図 2)⁽⁶⁾。

このラジカル化合物は、メラノイジンにあるラジカルとは異なるもので、反応系のアミノ化合物

図 2 グルコースと α -または β -アラニン (各 3 M, 蒸留水中) の反応によるフリーラジカルの生成および褐変の時間経過と ESR スペクトル
—○— フリーラジカル, —△— 褐変, ---- メラノイジンラジカル

図 3 糖とアミノ化合物の反応によるフリーラジカルの生成および糖の開裂生成物の生成経路

の違いによりスペクトルが異なっていた^{*}。それらの超微細構造を解析した結果、Nにアミノ化合物の残基をもつピラジンカチオンラジカルであることがわかった⁽⁷⁾。その構造からみて、これは糖のC₂フラグメントとアミノ化合物が縮合したものであると推定され、したがって、ラジカルの生成に先行して糖がC₂に開裂する可能性が考えられた。従来、糖の開裂反応は反応中期のジカルボニル化合物生成以後と考えられていたが、このラジカルはシッフ塩基からは生成するが、アマドリ生成物からは生成しないので、アマドリ化合物生成以前から少なくとも同時期に生成しているものと推定された。

そこで、糖とアミノ酸またはアミンの反応のごく初期で未だラジカルが検出されない段階の反応液について調べてみると、そこにはアスコルビン酸などの添加で直ちにフリーラジカルを与える中間生成物、すなわちラジカル前駆体が存在することがわかった⁽⁸⁾。この物質は、分離同定によって

glyoxal dialkylimine (C₂ イミン) であることがわかり、C₂分子の生成が確認された^(9,10)。このC₂イミンの生成経路については、まず糖のシッフ塩基が逆アルドール縮合によってグリコールアルデ

図 4 グルコースと *t*-ブチルアミン (各 1M, エタノール系) の反応によるフリーラジカルおよびその前駆体の生成と反応液の還元力の増加
還元力 (a): Tillman の試薬による, (b): ポーラログラフィーによる。

^{*} 図2の(1)と(2)の吸収線の数はいずれも25本と19本であり、アミノ基がβとαで異なっている。

ヒドのエナミノールを生成し、さらに酸化やアミンの縮合によって C_2 イミンを与えるものと考えられる (図 3)⁽¹⁰⁾.

糖-アミノ化合物の反応系では、ラジカル前駆体の減少に伴ってラジカルが生成するが、この生成には反応液の還元力の増加が関係していた (図 4). これは、 C_2 イミンまで行った前駆体が C_2 イミン生成の逆方向に反応し、加水分解、還元を経て C_2 エナミノールを与え、2 分子で縮合してピラジンラジカルを与えることがわかった (図 3 の下段の式). なお、この C_2 イミンを中間体とするラジカル生成反応は、主にアミン系で考えられ、アミノ酸系では C_2 エナミノールから直接ラジカルを与えるものと考えられる.

ここで非常に興味あることは、一般にきわめて不安定と考えられているフリーラジカルが、この Maillard 反応液で意外に安定なものとして検出されたことである. これはおそらく、反応中に生成する酸化性物質と還元性物質の微妙なバランスの上に、あたかもキノン、ハイドロキノンの中間ラジカルの如くに存在するためと考えられる.

なお、筆者らは、最近糖とアミンの反応系で、糖が C_3 に開裂した生成物 methylglyoxal dialkylimine も確認している⁽¹¹⁾. メチルグリオキザールは、以前からこの反応系で生成するといわれていたが、確認されていなかった. ただ、その生成機構については不明な点が多く、従来考えられていたよりも早い時期に生成する可能性も考えられる.

以上の結果でとくに重要なことは、Maillard 反応の key step というべきアマドリ転位の起こる以前において糖が開裂し、非常に活性の高い低分子化合物を与えるという、従来まったく考えられていなかった新しい褐変反応経路を推定したことであって、今回の会議でも非常に注目をあびた⁽¹²⁾. Maillard 反応全体におけるこの経路の意義については、未だ充分解明されていないが、少なくとも中性、アルカリ条件下における初期褐変化には重要な役割をなしていると考えられる.

2. ジカルボニル化合物の生成機構

反応中期では、アマドリ化合物から 1,2 エナミノールや 2,3 エンジオールを与え、各々のルートでジカルボニル化合物が生成し、閉環や開裂反応、ストレッカー分解を伴う反応が起こるとされている⁽¹³⁾. このうち 1,2 エノール化反応は、中間の 3-デオキシヘキソソソソも確認されており⁽¹⁴⁾, 確かであるが、2,3 エノール化反応は、中間のジカルボニル化合物も同定されておらず不明な点が多かった. Feather⁽¹⁵⁾ は、5 単糖の Maillard 反応で生成し、牛肉フレーバーの一つとして知られている 4-hydroxy-5-methyl-3(H)-furanone (1) の生成機構に関して糖の C-1 を ^{14}C でラベルしたもので検討したところ、 ^{14}C は 1 のメチル基に入ることを明らかにし、2,3 エノール化反応が存在することを証明した. さらに、エノール化における pH 効果も調べており、酸性下では 1,2 エノール化が、中性下では 2,3 エノール化が優先することを明らかにした.

この反応中期には、ピロールやフラン誘導体が生成することはよく知られているが、Olsson ら⁽¹⁶⁾は、これがさらに重合した生成物をメチルアミン系から得ている. また、Baltes ら⁽¹⁷⁾は、グルコースと *p*-chloroaniline の反応生成物を詳細に検討し、多数のフルフラールやピロールアルデヒドのシッフ塩基を得ている. しかし、これらの生成物はいずれも無色であり、褐変反応やフレーバー生成反応における意義は不明である.

3. 褐変中間体

反応中期で得られた種々の生成物が複雑に重合してメラノイジンを与えると考えられているが、その機構はまったく不明であった. 最近、反応生成物として黄色などの着色物質が知られてきた.

Ledl ら⁽¹⁸⁾は、キシロースとメチルアミンの反応系から黄色物質 **2a** と **2b** を得ている. これらは、**1** とフルフラールあるいは *N*-メチルピロールアルデヒドの反応によって生成したものである. アミノ酸系でも類似の生成物を得ており、キシロース-グリシン系ではオレンジ色生成物 (**2c**) が確認されている. また、さらに重合した **3a-c** も

明らかにされている。

1 の C-2 メチレンは活性が高く、種々のカルボニル化合物と容易に反応するが、C-4 エノールもまた反応し、黄色物質 (4) を与える⁽¹⁹⁾。

これらの着色物質は 5 単糖からの生成物であるが、6 単糖からも、黄色から濃い黄色の生成物であるピランやアセチルホルモリン誘導体 (5, 6, 7) が得られている⁽²⁰⁾。

一方、ジカルボニル糖の一種である酸化型アスコルビン酸とアミノ酸の反応でも速やかに褐変が起るが、この場合にはまず中間体として赤色色素 (8) が生成し⁽²¹⁾、ついで黄色物質 (9) を経て褐変化へ進むことが最近筆者らによって明らかにされた⁽²²⁾。

4. メラノイジンの構造

この反応の最終生成物であるメラノイジンは、もちろん一定の化合物ではないにしても、その構造についてはほとんど知見がなかった。最近、Kato ら⁽²³⁾は、その構造解明のためにパイロリシスや過マンガン酸酸化などとともにいくつかの有機化学的研究を行ない、これに基づいてメラノイジンの可能な構造を提示している。すなわち、グ

ルコースやキシロースと *n*-ブチルアミンまたはアンモニア系の非透析メラノイジンについて、元素分析、アセチル化および過沃素酸酸化などを行なって脱水量、OH 基およびカルボニル基の量を求め、これらの値を満足するものとして次式のよ

うに、3-デオキシオシュロースのシッフ塩基やエナミンが重合した形のものを示した。なお、メラノイジンの構造として従来ピロールやフラン化合物の重合したものの可能性も考えられていたが、彼らは、水に可溶なメラノイジンでは、これらは主要なものではないとしている。さらに反応が進んで水に不溶なメラノイジンになれば、これらの複素化合物も考慮する必要がある。

Olsson ら⁽¹⁶⁾は、メラノイジンの ¹³C-NMR ではオレフィンや芳香環は検出されないので、ピロールやフラン化合物は重要でないとしており、

Kato らの構造を支持している。

食品加工上の役割

タンパク質食品をはじめとする各種食品の加工保蔵中における Maillard 反応による品質変化については、褐変化から始まって物性変化とか、栄養生理的な影響とか一般に品質劣化が多い。それらに対する品質制御の立場から食品加工技術的研究も多く行なわれ、興味ある成果が得られている^(24~27)。ここでは、この反応を品質向上に積極的に利用するものとして、香気の生成と抗酸化能の発現の問題をとりあげて説明したい。

1. 香 気

これまで、多くの食品を加熱処理することによって生成する香気成分が Maillard 反応によることが推定され、それらの成分については GC-MS の進歩とともに膨大な数の化合物が分離され、同定されてきた。しかし、食品の特徴的なフレーバーは必ずしもいくつかの同定された生成物の再構成でできるものとはいえず、むしろモデル系での反応条件を選出することによって食品の場合と同様なフレーバーを生成させる研究が盛んに行なわれており、すでにかなり実用化されている。

一般のアミノ酸と糖のモデル系で生成する香気成分は、O-およびN-複素環化合物、アルデヒド類などに分けられる⁽²⁸⁾。O-複素環化合物は糖のカaramel化反応でも生成し、多種類の化合物が知られており、これらはメチルジカルボニル中間体を経て生成する。N-複素環化合物のうち代表的なものとして、 α -ジカルボニル化合物とアミノ酸のストレッカー分解を経て生成し、焙焼香気的重要成分であるピラジン類が非常に多数報告されている。また、プロリン系からは変わった構造のN-複素環化合物が多数同定されている。含硫アミノ酸系の生成物としては、チアゾール類やチオフェン類がよく知られており、後者は、1 と硫化水素の反応で生成することが明らかにされている。また、硫化水素を含むモデル系でも研究されており、数多くの生成物が確認されている。これらモデル系の生成物については、最近 Shibamoto に

よってまとめられている⁽²⁹⁾。

肉やコーヒーなどの複雑なフレーバーをモデル系で生成させ、利用することについては特許が多くあり、報文は最近あまりみられないが、実用化の研究は進んでいるようである。国際シンポジウムでもフレーバーの報告は少なかったが、Tressel ら⁽³⁰⁾はコーヒーのフレーバー生成物をモデル系から得ることを試みており、グルコース-プロリン系からは、アルキルピロール、ピリジン、N-アセチルピロリジン類を含む100種類以上の生成物を同定している。ヒドロキシプロリン系では、N-アルキル、N-アシル、N-フルフリルピロール類などを同定している。フルフラール-システイン-メチオニン系では、多数のフランやベンゾフラン、含硫化合物を得ており、これらのかんりの化合物がコーヒーフレーバーに含まれるとしている。また、Maillard 反応に関係する肉のフレーバー研究の解説もシンポジウムにあり⁽³¹⁾、パネルテストによってフレーバー前駆体を追求する新しい研究例が紹介されている。

2. 抗酸化性

Maillard 反応生成物が油脂の酸敗抑制作用をもつことが Franke⁽³²⁾ によって見いだされて以来、モデル系から食品系にわたって多くの研究があり、特に1960~70年代にわたってわが国で盛んに研究されてきた。しかし、元来、油脂の酸化に関与する因子は多く、Maillard 反応の生成物も反応条件によって変わるので、その抗酸化性も大きく変動する。どのような対象にどのような条件で生成したものが有効かについて、一応の知見は得られているが、必ずしも一定の生成物が常に有効とはいえない。一般に、リジン、ヒスチジン、アルギニンのような塩基性アミノ酸とキシロースのように褐変しやすい糖との系がよく、褐変化と並行して抗酸化能も上がるようであるが、反応時間経過でピークを示して低下する。これらのアミノ酸がなぜよいのか、どのような生成物が有効なのかは、メラノイジンの構造も不明なので機作も明らかでない。

Yamaguchi ら⁽³³⁾は、Gly-Xyl 系のメラノイジ

ンについてゲル濾過や PPC などを用いて活性区分の分別精製を試み、一応単一区分である程度比活性の高いものを得たが(分子量約 4,500)、それも全体の効果の一部であり、構造も機作も不明であった。最近、Lingnert ら^(34,35)も His-Xyl 系のメラノイジンについて透析、電気泳動などにより分別精製を試み、結局長時間透析して内液に出た沈殿を分別して一応強い活性を示す物質を分離し、分子式などを調べているが、これも全体の活性の一部にすぎず、比活性もそれほど高くない。ただ、彼らは、筆者らの研究のフリーラジカルに注目し、反応物の分離精製を除酸素下で行なって各区分の ESR シグナルの強さを抗酸化性と比較検討し、両者は一応相関しているという(図 5)。このラジカルは筆者らの見いだした反応初期のラジカル生成物とは異なるものであろうが、やや不安定であり^(35,36)、従来からメラノイジンに存在が知られているものとも違うかもしれない。筆者らも以前、メラノイジンのラジカルと抗酸化性を報告したことがあるが、必ずしも相関性が得られなかった。メラノイジンの作用機作については過酸化化物との反応が考えられている⁽³⁷⁾が、このラジカル化学の面からさらに研究する必要がある。

Maillard 反応と抗酸化性の関係は複雑で、必ずしも長時間加熱して得たメラノイジンが有効とは限らない。Lingnert⁽³⁴⁾の実験でも、クッキーにおける抗酸化性が、His-Xyl 系でのメラノイジンを加えた時よりも、それぞれをドウに混ぜて焼いた場合のほうが有効であった。一方、ソーセージにおける試験では、メラノイジン添加のほうが有効であったという。クッキーの場合も食品中

図 5 ヒスチジン-グルコース系で生成したメラノイジンの分画物の抗酸化力と ESR シグナルの強さ

Maillard 反応が起こるためと考えられるが、はたしてその複合系中でどれほどの量がメラノイジンを形成するのかを考えると、その有効性は簡単には考えられない。一方、ソーセージの場合には含有するヘムが酸化促進すると考えられ、それらとの相互作用が有効性と関係するのかも知れない。

糖-アミノ酸系以外の各種アミノカルボニル反応系でも、高い抗酸化性を示すものがいろいろ知られている。筆者らは最近、酸化型アスコルビン酸(DHA)とトリプトファンのアルコール中での反応系に強い抗酸化性がみられることを認めた⁽³⁸⁾。この系も速やかな褐変が抗酸化性の生成に伴うが、短時間加熱の反応系から褐変物質でない有効物質の分離同定を試み、無色の有効物質を単離し、その化学構造を明らかにすることに成功した。それは、DHA-Trp が 1 分子ずつで縮合し、カルボリン環をもった新化合物であった。こ

の物質は、かなり温和な条件でも生成する可能性がある。ただこの場合も、褐変区分にも強い抗酸化性がみられる。メラノイジンにおける着色と抗酸化性の問題は、実用上のこともあり、さらに研究すべきことであろう。

なお、抗酸化性とは直接関係ないが、Eriksson⁽³⁹⁾は、上記の His-Glc 系のメラノイジンの中でフリーラジカルをもち抗酸化性の強かった区分が、*B. subtilis* の試験で強い抗菌性を示したという。

栄養生理的影響

食品や飼料を加熱乾燥などの処理をすると、しばしばある種のアミノ酸の有効性が失われ、タンパク質の生物価や消化性が低下することが知られているが、特にこれが糖の共存下で大きくなることから、Maillard 反応の関与として注目されてきた。この影響には関係する要因が非常に多く、

特にタンパク質の種類、糖の含量、水分、加熱条件などにより大きく変動し、また試験する動物によってもかなり違ってくる。一応考えられる原因を大別すると、次のようになる^(40,41)。

- 1) リジンなどのアミノ酸残基の糖による修飾
- 2) 架橋結合の生成によるタンパク利用率の低下
- 3) 以上のこと、および酵素、腸内細菌への影響などを含めた消化吸収性の低下

1) の段階は、主にリジンの ϵ -アミノ残基と糖との Maillard 反応で、弱い加熱ではもちろん、室温貯蔵の条件でもみられる。始めはシッフ塩基型であるが、アマドリ化合物型に変わる。前者は容易に加水分解されて有効リジンを与えるが、後者は動物ではほとんど利用されないといわれ、しばしば有効性の制限因子として問題になる。リジンの有効性は最終的にはヒナやラットの動物試験による評価となるが、食品系における定量分析が必要である。それには、発色試薬との反応によるものなどの化学的方法と、微生物や原虫類を用いる生物的方法など、いろいろあるが、それらがはたして生物的有效リジン量とよく相関した値を示すかどうかが問題となり、操作上の問題も含めて詳細な比較検討が行なわれている^(42,43)。化学的方法については、従来からの fluoro dinitrobenzene (FDNB) 法が標準的なものであるが、アマドリ化合物の NH-と一部反応して価が高く出る可能性があり、また測定時間が長くなる。また、Orange-12 による色素結合法でも、予めリジン残基をプロピオン酸でブロックする時にアマドリ化合物に一部入る問題があるなど、それぞれの長所、欠点についての指摘がなされている。

さて、リジンのアマドリ化合物についての栄養的評価については、それが遊離リジンの場合とタンパク質中にある場合とか、動物の種類の違いとか、種々の面から研究されている。結局、微生物検定に使う *E. coli* 変異株には利用されるが、ラットではほとんど（リジンの 10% 以下）利用されない。腸内細菌の作用を含めて腸内で吸収は受けませんが、他の遊離リジンの吸収を阻げることもないという。タンパク質中にある場合は、一部腸

表 2 市販乳製品におけるリジンの損失 (%)

生乳	0
凍結乾燥牛乳	0
低温殺菌牛乳 (74°C, 40 秒)	0~2
高温瞬間殺菌牛乳 (135~150°C, 2~3 秒)	0~3
噴霧乾燥粉乳	0~3
加糖練乳	0~3
滅菌牛乳	8~12
ローラ乾燥粉乳 (前濃縮なし)	10~15
無糖練乳	15~20
ローラ乾燥粉乳 (旧式)	20~30

内細菌などの影響をうけるためか吸収されるようである。その他、毒性や変異原性はみられない。こういったところが現在の見解である^(40,44)。

タンパク性食品の加熱が温度、時間共に苛酷な条件になった場合には、新しい架橋結合などができて消化性が低下する。リジンのみならずトリプトファン、シスチン、メチオニンなどの損失も問題となる。ここで生成したメラノイジンの影響も問題となり、これについては、Honma⁽⁴⁵⁾、Öste⁽¹⁶⁾その他の研究がある。結局、非透析性の高分子メラノイジンは酵素類にもあまり影響なく、ラットに投与してもほとんど消化吸収されず、長期間投与しても栄養上問題となる影響はなかったという。低分子区分のメラノイジンのほうはタンパク質の消化吸収を遅らせる作用がみられ、アミノペプチダーゼNとかトリプシンなどへの阻害作用がみられたという⁽⁴⁶⁾。なお、Chichester らは、糖を加えて保存し褐変化した卵白のアルブミンを1年間投与した場合、腎臓、肝臓の肥大がみられたと報告している⁽⁴⁷⁾。

さて、以上のようなことが食品や飼料で問題とされる時には、実際の食物の成分的構成や処理条件などを十分考慮して、制限因子になるアミノ酸などのことを判断することが必要であろう。加熱加工処理が問題となる食品の例の一つはミルクの濃縮や乾燥である。この場合のリジンの損失（表2）は、旧式の工程ではかなり大きいですが、最近の改良された加工法では非常に少なくなっている⁽⁴⁰⁾。

変異原の生成

発がんの原因の大半は環境因子によるといわれているが、がんの中で肺がんなどを除くと、大半の臓器がんには食物因子が関係してくる⁽⁴⁸⁾。

近年、発がん性と密接な関係にある変異原性を簡単に、かつ感度よく検出する微生物検定法が Ames^{(49)*} や賀田⁽⁵⁰⁾によって開発されて以来、あらゆる環境物質について変異原性が調べられている。環境から食物系への影響として農薬、排気ガスその他の汚染や添加物などいろいろな因子も問題となっているが、それら工業薬品がこの40年ほどで急激に増大している割には消化器系のがんが増えていない。そこで、古来の調理法を含めて食物系で生成する発がん因子が改めて問題とされた。その例としては、すでに強力な発がん物質である *N*-ニトロソアミン類がよく知られている。また、焦げた部分のタール中には有名なベンズピレン (Bzap) 類の存在も考えられる。

Nagao ら⁽⁵¹⁾は魚や肉の焦げた部分を、Comnener ら⁽⁵²⁾はハンバーグなどのひき肉食品を 150～200℃ に加熱したものを、それぞれ Ames 法で調べ、いずれも強い変異原性がみられることを示した。それらの中にはその作用を説明するほどに Bzap は存在しないし、またニトロソアミン類は Ames 法ではほとんど活性を示さないの、新しい変異原の生成が問題となった。その頃、タバコのタール中の変異原を調べていた Yoshida らは、アミノ酸タンパク質の焙焼物の塩基性区分が TA 98 で強い変異原性を示すことを認め⁽⁵³⁾、ついで Sugimura らはトリプトファン、グルタミン酸の焙焼物中から強力な変異原として Trp P-1, Trp P-2, Glu P-1, Glu P-2 (図 6) を分離同定した⁽⁵⁴⁾。さらに、これらはタンパク質の焙焼物中からも分離されたが、その量はわずかで、むしろ amino- α -carbolines のほうが多く生成することがわかった⁽⁵⁵⁾。いずれにしても、これらには強い変異原性があり、食物系における重要な発がん因子の可能性が大きいとして一時大いに騒がれた。

しかし、その後これらの発がん性は強くないらしいことと、種々の共存物質によって不活性化されること、そして何よりもタンパク質を 500℃ に加熱した時にごく微量生成するだけであることな

どから、普通の調理食物系の変異原としてはあまり問題にならないことがわかってきた。また、特に Maillard 反応との直接の関係は薄い。

ところが、Yoshida は牛肉やそのエキスを含有されるクレアチンとグルコースを 150℃、1 時間という調理的な条件で反応させた場合に強い変異原性を示すこと、さらにクレアチン、アルギニン、リジンなどのアミノ酸-グルコース水系の反応物の塩基性区分に強い変異原性がみられることを示した⁽⁵⁶⁾。同じ頃 Kasai ら⁽⁵⁹⁾と Weisburger ら⁽⁵⁸⁾は、魚や肉の焦げた部分から活性物質として IQ, MeIQ (図 6) を分離同定した。これらは、TA 100 には弱いが特に TA 98 (+S 9) で史上最高ともいふべき強力な変異原性を示した。それらの特徴的な構造から、クレアチン-糖系での強い活性生成との関連が考えられた。

これらの結果から、食品成分間の Maillard 反応による変異原生成が俄かに注目されてきた。すでに第 1 回のシンポジウムで Aeschbacher らが初期的な研究を報告したが⁽⁵⁹⁾、その後大村ら⁽⁶⁰⁾、

図 6 アミノ酸、タンパク質の焙焼により生成する変異原物質

* サルモネラ菌の変異株を使い変異原による復帰変異を指標として変異原性を測る方法で、以下の研究には主に TA 98 株と TA 100 株が使用され、代謝活性化の有無 (S 9 mix の+または-) において試験されている。

Shibamoto ら^(29,61), Stich ら⁽⁶²⁾その他により、各種糖-アミノ酸系について調べられている。活性はアミノ酸の種類と試験法によって異なるが、かなり多様な活性物質が生成するものと推定されている。その中で同定された主なものは、5-HMF (Glc-Phe 系), ϵ -(2-formyl-5-hydroxy methyl) pyrrol-1-yl-norleucine (Glc-Lys 系), 2-methyl thiazolidine (Glc-Cyst 系) などがある。その他アルキル置換ピラジン, イミダゾール, ピリミジン類にも変異原性が認められたという。しかし、これらの既知生成物は Ames 法での活性も弱く、あまり問題になりそうにない。

ここで特に注目すべき問題は、強力な変異原の IQ 類の生成機構である。Jägerstad⁽⁶³⁾は、牛肉をフライパンで 180°C, 3 分加熱したものの外殻部分の塩基性区分が TA 98 (+S9) で強い変異原性を示し、この場合褐変化はより長時間や高温での加熱で増大したが、変異原性のほうはむしろ低下した。ついで、糖の含量の少ない牛肉と、それに糖を加えたもの、さらにクレアチンを加えたものについて比較してみると、それらの添加で活性が明らかに増えた。そこで、IQ の化学構造が

らの生成過程も考えて、Glc-Creatine-Ala または Gly (エチレングリコール-水系) をモデル系として選び、130°C に加熱してみると、TA 98 に強い活性を示すことがわかった。さらに、Maillard 反応で生成する 2-メチルまたは 2,5-ジメチルピラジンをこの系に加えてみると、活性は一層強くなった。そこで彼は、図 7 のような経路を IQ の生成過程として提案している。この研究は興味があるが、実験の再現性が問題であり、変異原の生成機構もそれほど簡単ではなさそうである。

変異原の生成と Maillard 反応の関係で、もう一つ問題となることは、Maillard 反応中間生成物と亜硝酸との反応による N-ニトロソ化合物の生成である⁽⁶¹⁾。亜硝酸は添加物のみならず自然に食品系に存在し、酸性条件下で特に 2 級アミンと反応してニトロソアミン類を生成することはよく知られており、また最近では C-ニトロ、ニトロソ化による変異原生成も問題となっている。Maillard 反応ではアモドリ化合物はじめ多くの 2 級アミン化合物が生成するので、当然ニトロソ化が問題となる。事実、Heyn ら⁽⁶⁴⁾は、アモドリ化合物の N-ニトロソ誘導体が生成することを示したが、これは Ames 法で活性はなかった。その他、糖-アミノ酸-亜硝酸の系を加熱したものから含窒素環状化合物のニトロソ誘導体が得られており、特にリジンの系からは動物に発がん性のある N-nitrosopiperidine が、またシステインあるいはシステアミンの系からは変異原性のある N-nitrosothiazolidine が得られている。後者は加熱ベーコンの中からも分離されているが、発がん性については不明である。なお、亜硝酸の役割について付言すれば、先の Trp P-1, P-2 などは亜硝酸との処理で完全に失活することがわかった。ただし、IQ の場合にはその効果はないという。

以上の変異原性はほとんど Ames 法で調べられているが、この試験で陽性の物質が食品関連の天然物などにもかなり知られている。変異原性と発がん性とはかなり高い相関性があるというが、この試験で強い活性を示しても発がん性が認められないものもある。また、モデル系で生成しても食品系では共存物質などにより生成しない場合や

図 7 IQ 類の生成機構の推定式 (Jägerstad ら⁽⁶³⁾)

不活化されるものもある。安全性に関わる問題は、総合的で十分な研究による評価をまって判断し対策をとるべきであり、慎重な取り扱いが必要である^(65, 66)。

In vivo^(67, 68)

前述のように、Maillard が最初に糖-アミノ酸系における褐変化を見いだした時、すでにこの反応は糖尿病などの場合に生体内でも起こりうることを指摘していた。しかし、実際にそれが見いだされ注目されたのは、それから 50 年以上もたってからのことであった。Rhabar⁽⁶⁸⁾は、糖尿病患者のヘモグロビン (Hb) では電気泳動で分かれる HbA_{1c} というフラクションが異常に増えることを見いだした。この部分は正常では Hb 全体の 3~4% であるが、糖尿病の場合には 7~8% から時には 20% にも達することがある。この HbA_{1c} は Hb と糖とを温存することにより生成することがわかり、Maillard 反応によるものと認められた。

さらに、³H ラベル NaBH₄ による還元後に加水分解または過ヨウ素酸酸化する方法により構造を調べたところ、これが主に Hb の β 鎖の N 末端のバリンに糖が 1-amino-1-deoxy fructose, すなわち アマドリ化合物として付いたものであることが明らかにされた⁽⁶⁹⁾。その後、このような Hb のグルコシル化は Hb の主要部分である HbA₀ にも起こり、特に糖尿病の場合に増えること、それは主にリジンの ε-アミノ基に起こるもので、糖濃度に依存したまったく非酵素的反応で生成することがわかった。

さらに、同様なグルコシル化は、水晶体とか結締組織のコラーゲンやエラスチンなどの代謝回転の遅いタンパク質はじめ血清タンパク質その他にもみられ、特に糖尿病患者の場合に著しく増えて、この病気の特徴的各種障害と密接な関係があるらしいことがわかってきた。

特に生後変わらない水晶体タンパク質におけるグリコシル化は、白内障に関係することが示された。すなわち、ヒトの水晶体には糖尿病や老人になるほどグルコースやグルコース-6-P が増える

こと、そのアマドリ生成物が存在すること、リジンの損失が大きく、白内障の場合には 20% にも及ぶことなどが明らかにされた。また、ラットの水晶体と ¹⁴C ラベルした各種の糖とを生理的条件下で温存した時にタンパク質内の糖のとり込みがみられ、その速度は、キシロース>ガラクトース≒グルコース-6-P>グルコース>フルクトースであった。これは、一般の Maillard 反応による褐変化ともほぼ一致し、また糖尿病ラットを用いて白内障の起こり易さを調べた結果、キシロース>ガラクトース>グルコースであったこともよく一致していた⁽⁶⁷⁾。

さらに、水晶体にみられる黄濁化が Maillard 反応による褐変化によるものであろうといわれている。Mornier⁽⁶⁷⁾は、トリ水晶体タンパク質とグルコースまたはグルコース-6-P を 37°C で 10 カ月温存したものと、一方重症の糖尿病患者の白内障の水晶体をホモジネートし遠沈して得た黄色物質とを、共にアルキル化、酵素分解などの処理をして蛍光スペクトルを比較検討した。図 8 に示したように、糖と処理をした水晶体タンパク質には、360, 400, 470 nm に新しい吸収極大をもつ蛍光スペクトルがみられるが、それとまったく同じ特徴的スペクトルが白内障のタンパク質においてもみられることがわかった。この吸収は若い正常人の水晶体ではまったく認められない。彼はさらに、老人や白内障の人の水晶体には非 S-S 架橋結合が多いこと、これに Maillard 反応が関係している可能性を示している。すなわち、トリの水晶体を用いて調べたところ、そうした結合が対照ではゼロであるものが、グルコースまたはグルコース-6-P と温存したものはそれぞれ全タンパク質の 5%, 17% が非 S-S 架橋結合による重合体になるという。

この他、糖尿病、特に若年性糖尿病患者では腱や皮膚のコラーゲン中にグリコシル化が起こり、ペプシン難分解部分が増えることや、糖尿病ラットの大動脈のコラーゲンにもグリコシル化と架橋結合の増大がみられることなどが知られている。なお、コラーゲンの架橋結合には、リジン、ヒドロキシリジン残基の関与したいくつかの型の異常

図8 ヒトおよびトリの水晶体タンパク質分解物の螢光励起光スペクトル

A：トリの水晶体タンパク質の褐変生成物。(a)対照，(b)5mm グルコースまたは(c)5mm グルコース-6-リン酸と37℃で10ヵ月放置

B：ヒトの水晶体タンパク質。(d)糖尿病患者，(e)正常の若者

結合が知られており，それらは必ずしも糖-アミノ酸の反応ではないが，一種のアミノカルボニル反応によるものと考えられている⁽⁷⁰⁾。ともかく，糖尿病にみられる諸現象は，動脈硬化，関節変形，腎臓中の青色螢光物質の増大することも含めて，老化によって起こる典型的な現象であり，それらが共通してグリコシル化に参与している可能性が大きいことから，老化に関する研究の一環としても Maillard 反応は問題となる。

その他，低分子生体成分のアミノカルボニル反応として糖とトリプタミン，およびセロトニンのアマドリ生成物の生理作用に関する研究⁽⁷¹⁾があり，また糖以外のより活性の高い低分子カルボニル化合物のタンパク質との反応とその生理的影響などが種々報告されている⁽⁷²⁾。たとえば，アルコ

ールの酸化で生じたアセトアルデヒドのヘモグロビンとの反応，不飽和脂肪酸の酸化生成物のマロンアルデヒドのアミノ化合物との反応による変異原性とか，老化物質といわれる lipofuscin 生成⁽⁷³⁾への関与も大きな関心がもたれている。また最近，10- α -hydroxy estrone や cortisol がタンパク質と付加物を作り，これが全身狼瘡性紅斑症などを引き起こすといわれている。

このような低分子カルボニル化合物の反応にはまだ種々の作用があり，*in vivo* におけるアミノカルボニル反応の役割については化学と生理学とをつなぐ研究を今後一層発展させる必要があろう。

*

以上，Maillard 反応の研究の最近の動向について2回の国際シンポジウムを中心に述べたが，この他にも国内外の研究があり，また関連分野は広汎にわたるので，この限られた誌面では紹介しえなかったことも多い。この反応は今後とも食品科学の中心的課題であるとともに，生理化学など生体レベルでも重要な問題としてみますます注目されよう。いずれにしても，その発展には化学と生物の広い分野にまたがる研究者の協力による推進が必要である。次回の国際シンポジウムは1985年に日本で開かれ，広く食品の生体系のアミノカルボニル反応の問題がとりあげられる予定である。この機会に国内外の研究交流と協力が一層盛んになり，この関連分野がさらに新しい展開をとげることが期待される。

文 献

- 1) L. C. Maillard : *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 154, 66 (1912).
- 2) 川村信一郎：農化誌，56，1199 (1982).
- 3) C. Eriksson (ed.) : "Maillard Reaction in Food", *prog. Food Nutr. Sci.*, 5 (No.1~6), 1~501, Pergamon Press, 1981.
- 4) G. Waller & M. E. Feather (eds.) : "The Maillard Reaction in Foods and Nutrition", ACS Symposium Series, 215, American Chemical Society, 1983.
- 5) J. E. Hodge : *J. Agric. Food Chem.*, 1, 928 (1953).
- 6) M. Namiki & T. Hayashi : *J. Agric. Food Chem.*, 23, 487 (1975).
- 7) T. Hayashi, Y. Ohta & M. Namiki : *J. Agric. Food Chem.*, 25, 1282 (1977).
- 8) T. Hayashi & M. Namiki : *Agric. Biol. Chem.*, 45, 933 (1981).
- 9) T. Hayashi & M. Namiki : *Agric. Biol. Chem.*, 44,

- 2575 (1980).
- 10) M. Namiki & T. Hayashi : ACS Symposium Series, 215, 1983.
- 11) 間瀬禎子, 林 建樹, 並木満夫 : 昭和58年度日本農芸化学会大会講演 (仙台).
- 12) H. E. Nursten : *Food Chem.*, 6, 263 (1980) ; Prof. Feeney and Prof. Waller, 私信.
- 13) J. E. Hodge : "The Chemistry and Physiology of Flavor", Mack The Avi Pub. Co., Conn., U.S.A., 1967, p. 465.
- 14) H. Kato : *Bull. Agric. Chem. Soc.*, 24, 1 (1960).
- 15) M. S. Feather : *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 37 (1981).
- 16) K. Olsson, P. A. Pernemalm & O. Theander : *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 47 (1981).
- 17) W. Baltes *et al.* : *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 137 (1981).
- 18) F. Ledl & T. Severin : *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 65 (1981).
- 19) R. O'Reilly & H. E. Nursten : ACS Symposium Series, 215, 1983.
- 20) F. Ledl & T. Severin : *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 175, 262 (1982).
- 21) T. Kurata, M. Fujimaki & Y. Sakurai : *Agric. Biol. Chem.*, 37, 1471 (1973).
- 22) T. Hayashi, Y. Hoshii & M. Namiki : *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1003 (1983).
- 23) H. Kato & H. Tsuchida : *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 147 (1981).
- 24) K. Watanabe, Y. Sato & Y. Katao : *J. Fd. Process. Preser.*, 3, 263 (1980) ; Y. Kato, K. Watanabe & Y. Sato, *J. Fd Sci.*, 46, 1835 (1981).
- 25) T. P. Labuza & M. Saltmarch : *J. Fd. Sci.*, 47, 92 (1981) ; M. Saltmarch, M. Vagnini-Ferrari & T. P. Labuza : *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 331 (1981).
- 26) P. A. Finot, R. Deutsch & E. Bujard : *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 345 (1981).
- 27) K. Eichner & W. Wolf : ACS Symposium Series, 215, 1983.
- 28) J. E. Hodge, F. D. Mills & B. E. Fisher : *Cereal Science Today*, 17, 34 (1972).
- 29) T. Shibamoto : ACS Symposium Series, 215, 1983.
- 30) R. Tressl *et al.* : *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 71 (1981).
- 31) M. E. Bailey : ACS Symposium Series, 215, 1983.
- 32) C. Franzke & H. Iwansky : *Deut. Lebensm.-Rundschau*, 50, 251 (1954).
- 33) N. Yamaguchi, Y. Koyam & M. Fujimaki : *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 429 (1981).
- 34) H. Lingnert & C. E. Eriksson : *ibid.*, 5, 453 (1981) ; *J. Fd Process. Preser.* 4, 161, 173, 219, 235 (1980).
- 35) H. Lingnert, C. E. Eriksson & G. R. Waller : ACS Symposium Series, 215, 1983.
- 36) H. Lingnert & G. R. Waller : *J. Agric Food Chem.*, 31, 27 (1983).
- 37) K. Eichner, *Prog. Food. Nutr. Sci.*, 5, 441 (1981)
- 38) M. Namiki, A. Shigeta & T. Hayashi : *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1199, 1207 (1982).
- 39) H. Einarsson, B. G. Snygg & C. Enksson : ACS Symposium Series, 215 (1983).
- 40) J. Mauron : *Prog. Food. Nutr. Sci.*, 5, 5 (1981).
- 41) J. E. Knipell : *ibid.*, 5, 177 (1981).
- 42) R. F. Hurrell & K. J. Carpenter : *ibid.*, 5, 159 (1981).
- 43) H. F. Erbersdodler & T. R. Anderson : ACS Symposium Series, 215, 1983.
- 44) P. A. Finot & E. Magnenat : *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 193 (1981).
- 45) S. Honma & M. Fujimaki : *ibid.*, 5, 209 (1981).
- 46) R. Öste, I. Bjork, A. Sjostrom : ACS Symposium Series, 215, 1983.
- 47) T-C Lee, M. Kimiagar, S. J. Pintauro & C. O. Chichester : *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 243 (1981).
- 48) W. Barnes, N. E. Spingarn, C. Garvie-Gould, L. L. Vuolo, Y. Y. Wang, & J. H. Weisburger : ACS Symposium Series, 215, 1983.
- 49) B. N. Ames, W. E. Durston, E. Yamazaki & F. D. Lee : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 2281 (1973).
- 50) T. Kada : *Mutation Res.*, 38, 340 (1976).
- 51) M. Nagao, M. Honda, Y. Seino, T. Yahagi, T. Kawachi & T. Sugimura : *Cancer Lett.*, 2, 335 (1977).
- 52) B. Commoner, A. J. Vithayathil, P. Dolara, S. Nair, P. Madyasha & G. C. Cuca : *Science*, 201, 913 (1978).
- 53) T. Matsumoto, D. Yoshida, S. Mizusaki & H. Okamoto : *Mutation Res.*, 56, 281 (1978).
- 54) T. Sugimura, T. Kawachi, M. Nagao, T. Yahagi, Y. Seino, T. Okamoto, K. Shudo, T. Kosuge, K. Tsuji, K. Wakabayashi, Y. Iitaka, & A. Itai : *Proc. Japan Acad.*, 53, 58 (1977).
- 55) D. Yoshida, H. Nishigata & T. Matsumoto : *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1769 (1979).
- 56) D. Yoshida & H. Okamoto : *Agric. Biol. Chem.*, 44, 2521 (1980).
- 57) H. Kasai, S. Nishimura, K. Wakabayashi, M. Nagao & T. Sugimura : *Proc. Jap. Acad.*, 56, 382 (1980).
- 58) N. E. Spingarn, H. Kasai, L. L. Vuolo, S. Nishimura, Z. Yamaiyumi, T. Sugimura, T. Matsushima, J. H. Weisburger : *Cancer Lett.*, 9, 177 (1980).
- 59) H. U. Aeschbacher, CH. Chappius, M. Manganel & R. Aeschbach : *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 279 (1981).
- 60) H. Ohmura, N. Jahan, K. Shinohara & H. Murakami : ACS Symposium Series, 215, 1983.
- 61) T. Shibamoto : *Food Technol.*, 36 (3), 59 (1982).
- 62) W. Powrie, C. H. Wu, M. P. Rosin & H. F. Stich : *J. Food Sci.*, 46, 1433 (1981).
- 63) M. Jägerstad, A. L. Reutersward, R. Öste, A. Dahlqvist, K. Olsson S. Grvas & T. Nyhammar : ACS Symposium Series, 215, 1983.
- 64) K. Heyns, S. Roper, H. Roper & B. Meyer : *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 18, 878 (1979).
- 65) 並木満夫, 大沢俊彦 : 変異原と毒性, 4, 32 (1981).
- 66) 賀田恒夫 : 変異原と毒性, 4, 45 (1981) ; 環境変異原研究, 3, 29 (1981).
- 67) V. M. Monnier & A. Cerami : ACS Symposium Series, 215, 1983 ; *Science*, 211, 491 (1981) ; *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 315 (1981).
- 68) S. Rahbar : *Clin. Chem. Acta*, 22, 296 (1968) ; *Texas Rep. Biol. and Med.*, 40, 373 (1980~1981).
- 69) R. J. Koenig, S. Blobstein & A. Cerami : *J. Biol. Chem.*, 252, 2992 (1977).
- 70) 藤本大三郎 : 日皮会誌, 89, 51 (1979) ; 生化学, 54, 314 (1982).
- 71) L. Mester, L. Szabados and M. Mester : ACS Symposium Series, 215, 1983 ; *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 295 (1981).
- 72) B. W. Tucker, V. Riddle & J. Liston : ACS Symposium Series, 215, 1983.
- 73) A. L. Tappel : "Free Radical in Biology", Vol. 4, ed. by W. A. Plyer, Academic Press, 1980, p. 1.