

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年4月27日(27.04.2023)



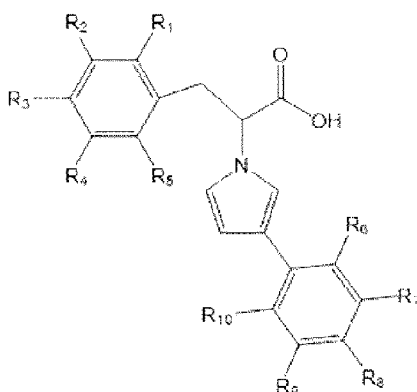
(10) 国際公開番号

WO 2023/067825 A1

- (51) 国際特許分類:
A01N 61/00 (2006.01) A61K 31/40 (2006.01)
A01N 43/36 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01) C07D 207/327 (2006.01)
A23L 3/3526 (2006.01) A61K 8/49 (2006.01)
A23L 3/3544 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/013264
- (22) 国際出願日: 2022年3月22日(22.03.2022)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2021-170957 2021年10月19日(19.10.2021) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人北海道大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者: 小関 成樹 (KOSEKI, Shigenobu); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 北岡 直樹(KITAOKA, Naoki); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 松浦 英幸(MATSUURA, Hideyuki); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP).
- (74) 代理人: 山尾 憲人, 外 (YAMAOKA, Norihito et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅田阪急ビルオフィスタワー 青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING NOVEL MELANOIDIN HAVING ANTIBACTERIAL ACTIVITY, AND APPLICATION FOR SAME

(54) 発明の名称: 抗菌活性を有する新規メラノイジンの製造方法とその応用



(57) Abstract: The present invention provides, inter alia: a method for producing an antibacterial composition, the method including producing a melanoidin by heating a reducing sugar selected from xylose or ribose, and an amino acid selected from phenylalanine or proline, and blending the melanoidin as an active ingredient; an antibacterial composition comprising a melanoidin produced as a reaction substrate from phenylalanine and xylose or ribose, and/or a melanoidin produced as a reaction substrate from proline and xylose or ribose; and an antibacterial composition comprising a compound represented by the given formula or a salt thereof. [In the formula, R₁ to R₁₀ each independently denote hydrogen (H) or a C1-5 branched or linear hydrocarbon group that may be saturated or unsaturated.]



WO 2023/067825 A1

MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(57) 要約：キシロースまたはリボースから選択される還元糖とフェニルアラニンまたはプロリンから選択されるアミノ酸とを加熱することによりメラノイジンを製造し、該メラノイジンを有効成分として配合することを含む抗菌組成物の製造方法、反応基質としてキシロースまたはリボースとフェニルアラニンから製造されるメラノイジンおよび/または反応基質としてキシロースまたはリボースとプロリンから製造されるメラノイジンを含む抗菌組成物、および下記式：[式中、 R_1 ないし R_{10} は、独立して、HまたはC 1-5の分枝鎖または直鎖状の飽和または不飽和炭化水素基である]で示される化合物またはその塩を含む抗菌組成物等が提供される。

明 細 書

発明の名称：

抗菌活性を有する新規メラノイジンの製造方法とその応用

技術分野

[0001] 本発明は、新規なメラノイジンの製造方法、およびメラノイジンを含む抗菌剤に関する。

背景技術

[0002] より安全な食生活を送るために、腐敗や食中毒の原因となる細菌の食品中での増殖を防ぐことが求められている。調理過程での加熱等による殺菌に加え、調理後の食品に侵入した細菌の増殖抑制のために食品のpH、水分活性の調整、冷蔵保存、冷凍保存、保存料や日持ち向上剤の添加等が行われている。保存料および日持ち向上剤に着目すると、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸カリウム、亜硝酸ナトリウム、ナイシン等が現在幅広い食品に対して用いられている。中でも乳酸菌から生成されるナイシンは低容量で幅広く抗菌活性を有していることから、世界中で多くの食品に用いられている。しかし、これらの保存料および日持ち向上剤は、それぞれ抗菌活性を示す菌種が異なることから、常に新たな抗菌物質が求められている。

[0003] 一方、メラノイジンの抗菌性に関しては古くは1950年代には既に示唆されており、以降、コーヒー、ビール、ストローワイン等に含まれるメラノイジンや、還元糖とアミノ酸から作成したモデルメラノイジン等、様々なメラノイジンによる抗菌活性に関する研究が行われている（非特許文献1、非特許文献2）。メラノイジンとは、アミノ酸、ペプチド、またはタンパク質のアミノ基と還元糖のカルボニル基と間で発生するメイラード反応の生成物の総称である。メイラード反応は、主に食品中で見られる化学反応であり、還元糖等のカルボニル化合物とアミノ酸等のアミンを反応基質として、熱によって縮合、脱水、重合等の過程を経て、最終生成物として褐色の重合体であるメラノイジンを生成する一連の重合反応である。生成された重合体であ

るメラノイジンは、内部に香気物質を含み、食品の風味に影響を与える物質として知られているが、その正確な構造および組成は未だ不明であり、それらに関する研究は現在も続いている。

[0004] しかし、メイラード反応の反応基質である還元糖とアミノ酸の種類は膨大で、その両者の組み合わせも膨大になることから、反応基質の組み合わせを変えることで生成されるメラノイジンの抗菌活性の有無や程度も変化すると、今までに、種々の還元糖とアミノ酸とを網羅的に組み合わせでメラノイジンを生成して抗菌活性を有するメラノイジンを探索した報告はない。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1 : Food Chemistry, Volume 111, Issue 4, 15 December 2008, pages 1069-1074

非特許文献2 : Biomedicines 2018, 6(3), 83; doi: 10.3390/biomedicines6030083

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明では、メイラード反応による生成物であるメラノイジンによる抗菌活性に注目し、抗菌活性を有する新たなメラノイジンの発見を目指して、種々の還元糖とアミノ酸とを網羅的に組み合わせでメラノイジンを生成して、抗菌活性を有するメラノイジンを探索し、反応系を確立することを目的とした。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、五炭糖のアルドースであるキシロースと、フェニルアラニンまたはプロリンとを用いたメイラード反応により、抗菌活性を有するメラノイジンが生成することを見出した。さらに、得られたメラノイジンに含まれる一つの化合物の構造を同定した。かくして、本発明を完成させた。

[0008] 本発明は、以下の態様を提供する。

[1] キシロースまたはリボースから選択される還元糖と、フェニルアラニンまたはプロリンから選択されるアミノ酸とを加熱することによってメラノイジンを製造すること、および

該メラノイジンを有効成分として配合することを含む、抗菌組成物の製造方法、

[2] キシロースとフェニルアラニンを反応させることを含み、製造されたメラノイジンが3-フェニル-2-(3-フェニル-1H-ピロール-1-イル)プロパン酸を含む、上記[1]記載の方法、

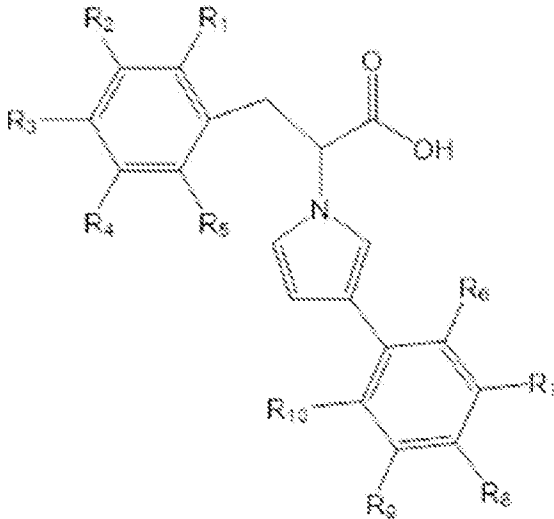
[3] 抗菌組成物が、*Listeria monocytogenes*、*Brevibacillus brevis*、*Bacillus cereus*、および*Salmonella Typhimurium*からなる群から選択される細菌に対して抗菌活性を示す、上記[1]または[2]記載の方法、

[4] 反応基質としてキシロースまたはリボースとフェニルアラニンから製造されるメラノイジン、および/または反応基質としてキシロースまたはリボースとプロリンから製造されるメラノイジンを含む、抗菌組成物、

[5] *Listeria monocytogenes*、*Brevibacillus brevis*、*Bacillus cereus*、および*Salmonella Typhimurium*からなる群から選択される細菌に対して抗菌活性を示す、上記[4]記載の抗菌組成物、

[6] 式：

[化1]



[式中、R₁ないしR₁₀は、独立して、H、またはC1-5の分枝鎖または直鎖状の飽和または不飽和炭化水素基である]

で示される化合物またはその塩を含む、抗菌組成物、

[7] 前記式で示される化合物が3-フェニル-2-(3-フェニル-1H-ピロール-1-イル)プロパン酸である、上記[6]記載の抗菌組成物、

[8] *Listeria monocytogenes*、*Brevibacillus brevis*、*Bacillus cereus*、および *Salmonella Typhimurium* からなる群から選択される細菌に対して抗菌活性を示す、上記[6]または[7]記載の抗菌組成物、

[9] キシロースとフェニルアラニンを反応基質としてメイラード反応を行うことを含む、3-フェニル-2-(3-フェニル-1H-ピロール-1-イル)プロパン酸の製造方法。

発明の効果

[0009] 本発明の方法によれば、高い抗菌活性を有するメラノイジンを製造することができる。かくして製造されたメラノイジンは、食品素材である還元糖とアミノ酸から生成されるため安全性が高く、飲食品、化粧品または医薬品の分野において抗菌剤として安全に使用することができる。また、本発明によ

れば、本発明の方法によって製造されたメラノイジンから同定された化合物を含む、高い抗菌活性を有する組成物が提供される。

[0010] さらに、本発明の抗菌組成物は、食品分野等で使用されている既存の保存料、例えば、ナイシン、安息香酸ナトリウム、およびソルビン酸カリウムと同等以上の抗菌活性を示す。さらに、本発明の抗菌組成物は、反応基質である還元糖とアミノ酸を溶解させた溶液を加熱するだけで製造可能であるため、生産性および再現性の面で有利であり、より簡便に製造および使用することが可能である。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]反応基質（還元糖およびアミノ酸）の違いが生成メラノイジンの *L. monocytogenes* に対する 25℃における増殖抑制効果に与える影響を示す。

[図2] *Brevibacillus brevis* に対する二種類のメラノイジンの 25℃における増殖抑制効果を示す。図中、○：キシロースとフェニルアラニンの組み合わせから生成したメラノイジン（メラノイジン Xylose-Phe）、×：キシロースとプロリンの組み合わせから生成したメラノイジン（メラノイジン Xylose-Pro）、△：メラノイジンの無添加（無添加）、を示す。

[図3] *Bacillus cereus* に対する二種類のメラノイジンの 25℃における細菌増殖抑制効果を示す。図中、○：メラノイジン Xylose-Phe、×：メラノイジン Xylose-Pro、△：無添加、を示す。

[図4] *Salmonella Typhimurium* に対する二種類のメラノイジンの 25℃における増殖抑制効果を示す。図中、○：メラノイジン Xylose-Phe、×：メラノイジン Xylose-Pro、△：無添加、を示す。

[図5] *Listeria monocytogenes* に対する二種類のメラノイジンおよびナイシンの 25℃における増殖抑制効果の比較を示す。図中

、○：メラノイジン Xylose-Phe、×：メラノイジン Xylose-Pro、◇：ナイシン 250 IU/mL、□：ナイシン 350 IU/mL、▽：ナイシン 400 IU/mL、△：無添加、を示す。

[図6]各種の添加物が牛井中の*Bacillus cereus*対数生菌数変化（25℃で3日間）に与える影響を示す。

[図7A]サンプルAの濃度ごとの*Bacillus cereus*に対する抗菌活性を示す。図中、●：コントロール、▼：4500 ppm、■：2250 ppm、×：1124 ppmを示す。横軸は、インキュベーション期間（日）を示す。縦軸は、生菌数を示す。

[図7B]サンプルBの濃度ごとの*Bacillus cereus*に対する抗菌活性を示す。図中、●：コントロール、▼：4500 ppm、■：2250 ppm、×：1124 ppmを示す。横軸は、インキュベーション期間（日）を示す。縦軸は、生菌数を示す。

[図8]メラノイジンから単離した物質の抗菌活性を示す。図中、●：コントロール、▼：単離物質の溶液、■：DMSOを示す。×は、検出限界（<10 CFU/mL）を示す。横軸は、インキュベーション期間（日）を示す。縦軸は、生菌数を示す。

[図9]サンプルAに含まれる抗菌化合物の化学構造（A）と鍵となるCOSYおよびHMBC相関（B）を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 1. メラノイジンの製造方法

本発明では、反応基質として、キシロースまたはリボースから選択される還元糖と、フェニルアラニンまたはプロリンから選択されるアミノ酸とをメイラード反応に付すことを含む、メラノイジンの製造方法が提供される。

[0013] メイラード反応の反応基質の還元糖として、五炭糖のアルドースであるキシロースおよびリボースが選択される。該還元糖は、D体またはL体のいずれであってもよい。メイラード反応の反応基質のアミノ酸として、フェニルアラニンおよびプロリンが選択される。該アミノ酸は、D体またはL体のい

ずれであってもよい。還元糖およびアミノ酸は、天然物由来のものであってもよく、または化学合成によって得たものであってもよい。反応に付す還元糖とアミノ酸の量は、メラノイジンが生成するかぎり特に限定されず、当業者によって適宜設定することができる。

[0014] メイラード反応は、反応基質として上記の還元糖およびアミノ酸を加熱処理に付すことによって行う。反応基質は、好ましくは水等の溶媒に溶解した溶液として、例えば水溶液として、加熱処理に付される。温度および時間などの加熱条件は、メラノイジンが生成するかぎり特に限定されず、当業者によって適宜設定することができる。例えば、高温であるほど短時間で反応が進むことから、できるだけ高温で反応させることが効率的である。限定するものではないが、例えば約100℃～約130℃、好ましくは約115℃～約125℃で、例えば約30～100分間、好ましくは約50～80分間反応させてもよい。例えば、オートクレーブなどを用いて高圧条件下で実施してもよい。

[0015] 本発明の方法によって製造されたメラノイジンは、腐敗や食中毒の原因となる細菌、特に、*Listeria monocytogenes*、*Brevibacillus brevis*、*Bacillus cereus*、および*Salmonella Typhimurium*に対して抗菌活性を有する。さらに、該メラノイジンは、既存の保存料、例えば、ソルビン酸カリウム、安息香酸ナトリウム、プロタミン（白子たんぱく抽出物）、プロピオン酸カルシウム、グリシン、ナイシン等と同等以上の抗菌活性を示す。

[0016] 本明細書において、「抗菌活性」は、細菌の増殖を抑制または阻害する活性を意味し、殺菌、滅菌および静菌活性を包含する。

[0017] 2. 抗菌組成物

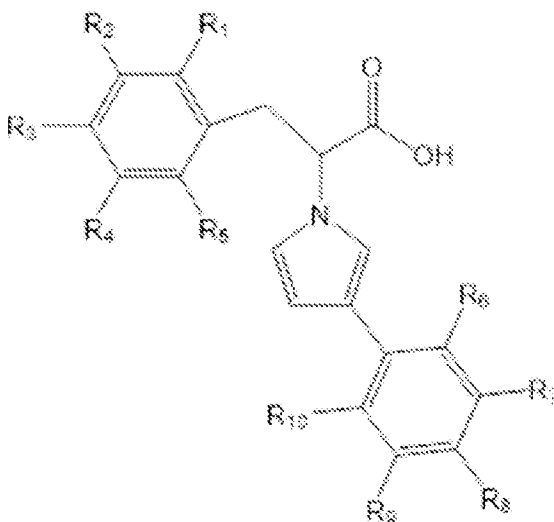
本発明では、上記したメイラード反応によって製造されたメラノイジンを有効成分として含む抗菌組成物が提供される。該抗菌組成物は、キシロースまたはリボースから選択される1種類の還元糖と、フェニルアラニンまたはプロリンから選択される1種類のアミノ酸とからなる1つの組み合わせから

製造されたメラノイジンのみを含んでいてもよく、あるいはキシロースまたはリボースから選択される還元糖とフェニルアラニンまたはプロリンから選択されるアミノ酸の2以上の組み合わせから製造された2種以上のメラノイジンを含んでいてもよい。例えば、本発明の抗菌組成物は、反応基質としてキシロースまたはリボースとフェニルアラニンから製造されたメラノイジン、および／または反応基質としてキシロースまたはリボースとプロリンから製造されたメラノイジンを含む。

[0018] 本発明の抗菌組成物に含まれるメラノイジンは、上記のメイラード反応後に得られる反応液中に含まれる状態であってもよく、または該反応液から分離したものであってもよい。該分離は常法によって行ってもよく、例えば、限定するものではないが、各種クロマトグラフィー法によって分離することができる。

[0019] 本発明ではさらに、上記メラノイジンのうち、反応基質としてキシロースおよびフェニルアラニンから製造されたメラノイジンに含まれる一化合物の化学構造を決定した。したがって、本発明のさらなる態様において、式1：

[化2]



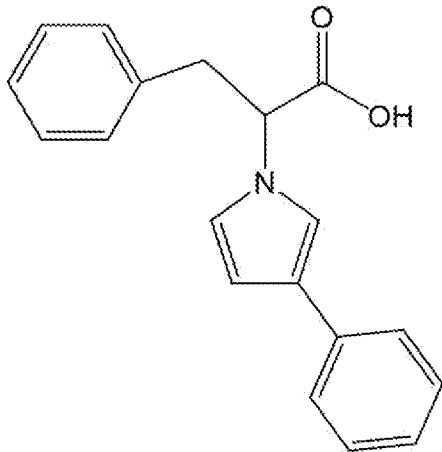
[式中、 R_1 ないし R_{10} は、独立して、H、またはC 1 - 5の分枝鎖または直鎖状の飽和または不飽和炭化水素基である]

で示される化合物またはその塩を含む、抗菌組成物が提供される。

[0020] C 1 - 5 の分枝鎖または直鎖状の飽和または不飽和炭化水素基の例としては、限定するものではないが、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、イソブチル、*tert*-ブチル等が挙げられる。上記炭化水素基は、置換されていてもよい。

[0021] 上記式 I で示される化合物の一例として、下記式 III :

[化3]



で示される 3-フェニル-2-(3-フェニル-1H-ピロール-1-イル)プロパン酸が挙げられる。したがって、本発明はさらに、3-フェニル-2-(3-フェニル-1H-ピロール-1-イル)プロパン酸またはその塩を含む抗菌組成物を提供する。

[0022] 上記式 I で示される化合物は、キシロースおよびフェニルアラニンを反応基質としてメイラード反応を行い、得られたメラノイジンから 3-フェニル-2-(3-フェニル-1H-ピロール-1-イル)プロパン酸を単離し、必要に応じて精製することによって得てもよく、または化学合成によって得てもよい。3-フェニル-2-(3-フェニル-1H-ピロール-1-イル)プロパン酸のメラノイジンからの単離および精製は、既知の方法によって行えばよく、例えば、各種クロマトグラフィー法等を利用することができる。かくして得られた 3-フェニル-2-(3-フェニル-1H-ピロール-1-イル)プロパン酸はさらに、常法により、式 I に包含される種々の化合物に変換してもよい。式 I で示される化合物の化学合成は、既知の方法によ

って実施することができる。例えば、3-フェニル-2-(3-フェニル-1H-ピロール-1-イル)プロパン酸は、Chemistry of Heterocyclic Compounds 2017, 53(5), 526-531に記載される方法にしたがって合成してもよい。

[0023] 上記式Iで示される化合物は、飲食品、化粧品または医薬品の分野において許容される塩の形態であってもよい。塩の例としては、限定するものではないが、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、臭化水素酸塩等の無機酸塩、酢酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸塩等の有機酸塩、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、亜鉛塩、銀塩、銅塩等の金属塩、またはアンモニウム塩等の無機塩基との塩、メチルアミン塩、トリエチルアミン塩、トリエタノールアミン塩等の有機塩基との塩等が挙げられる。このような塩は、当該分野で既知の方法によって調製することができる。

[0024] 本発明の抗菌組成物は、上記のメイラード反応によって得られたメラノイジンまたは式Iで示される化合物そのものであってもよく、またはこれらの有効成分以外の他の成分を含有していてもよい。かかる他の成分としては、限定するものではないが、例えば、水、アルコール、各種緩衝液等が挙げられ、抗菌組成物の使用目的に応じて適宜配合すればよい。抗菌組成物中における上記メラノイジンまたは化合物の含有量は、当業者によって適宜決定することができるが、特に限定されない。

[0025] 本発明の抗菌組成物は、飲食品、化粧品または医薬品の分野で利用可能ないずれの形態であってもよい。かかる形態の例は、限定するものではないが、固体（例えば粉末）、液体、または凍結乾燥形態が挙げられる。

[0026] 本発明の抗菌組成物は、飲食品、化粧品または医薬品の分野において、例えば、保存料、日持ち向上剤または防腐剤として使用することができる。本発明の抗菌組成物は、様々な飲食品、化粧品または医薬品に添加して使用することができるが、既存の保存料、日持ち向上剤または防腐剤と併用することもできる。本願明細書において、「添加」には、配合、噴霧、塗布および浸漬

も包含される。本発明の抗菌組成物を使用する飲食品の例としては、限定するものではないが、生鮮野菜・果物、鮮魚、弁当・惣菜類等の調理済み食品、各種の魚肉・畜肉加工品、野菜・果実の加工品、および飲料等が挙げられ、特にそのまま食される飲食品に好適に使用される。本発明の抗菌組成物を使用する化粧品の例としては、限定するものではないが、シャンプー、リンス、ローション、クリーム等が挙げられる。特に、本発明の抗菌組成物の有効成分がメラノイジンまたはメラノイジンに由来する化合物である場合、該有効成分が食品素材に由来するため、該抗菌組成物はより高い安全性を有する。

[0027] 本発明の抗菌組成物は、腐敗や食中毒の原因となる細菌、特に、*Listeria monocytogenes*、*Brevibacillus brevis*、*Bacillus cereus*、および*Salmonella Typhimurium*に対して抗菌活性を有する。さらに、本発明の抗菌組成物は、既存の保存料、例えば、ソルビン酸カリウム、安息香酸ナトリウム、プロタミン（白子たんぱく抽出物）、プロピオン酸カルシウム、グリシン、ナイシン等と同等以上の抗菌活性を示す。

[0028] したがって、さらなる態様において、本発明は、飲食品、化粧品または医薬品に本発明の抗菌組成物を添加することを含む、飲食品、化粧品または医薬品において細菌の増殖を抑制する方法を提供する。ここで、細菌の増殖抑制には、細菌の増殖阻害、殺菌および滅菌が包含される。抗菌組成物の添加量は、増殖抑制効果を奏するかぎり特に限定されず、当業者により適宜決定することができる。

実施例

[0029] 実施例 1：種々の反応基質を用いたメイラード反応およびメラノイジンの抗菌活性評価

(1) 供試材料

メイラード反応に用いる還元糖としてD-グルコースとD-キシロースの2種類を、アミノ酸としてL-アラニン、L-アルギニン、L-グルタミン

、L-ロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-スレオニン、L-バリン、L-セリン、L-トリプトファンの11種類を用いた。

[0030] 抗菌活性評価には以下の細菌を用いた。グラム陽性細菌として、*Bacillus cereus* (ATCC10987)、*Brevibacillus brevis* (NBRC100599)、*Lactobacillus fructivorans* (NBRC13954)、*Listeria monocytogenes* (ATCC19111)を用いた。グラム陰性細菌として、*Escherichia coli* (O157:H7, H1PH 12361)、*Salmonella Enteritidis* (RIMD1933001)、*Salmonella Typhimurium* (ATCC29630)を用いた。腸内細菌として、*Enterococcus faecalis* (ATCC47077)、*Escherichia coli* (ATCC 25922)、*Lactobacillus brevis* (JCM 1059)、*Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12221)を用いた。これらの細菌を液体培地中で増菌培養した細菌液を実験に用いた。

[0031] (2) メラノイジンの製造

還元糖とアミノ酸の組み合わせを変え、22種類のメラノイジンを製造した。同一メラノイジン濃度での抗菌活性比較をするために、先行研究に基づいて、420nm吸光度をメラノイジン濃度の指標として吸光度 3.5 ± 0.2 を本研究で用いるメラノイジン濃度と定めた。還元糖とアミノ酸を等モル濃度でpH7.0のリン酸緩衝液に溶解し、121℃、2気圧でオートクレーブを用いて60分間加熱した。加熱後のメラノイジン濃度が先述した濃度になるように、加熱前のモル濃度を調整した。

[0032] (3) 抗菌活性の評価

上記(2)で製造した22種類のメラノイジンの*Listeria monocytogenes* (以下、*L. monocytogenes*と略す)

に対する抗菌活性を比較した。評価のために細菌増殖に伴う光学濃度の変化を測定した。各メラノイジン（100 μ L）にTryptic Soy Broth液体培地（100 μ L）を加え、*L. monocytogenes* 溶液（ $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL）を添加し（20 μ L）して25°Cで培養した。マイクロプレートリーダー（BIO-RAD社製）を用いて各溶液の光学濃度（595 nm吸光度）を30分毎に24時間測定した。測定後、光学濃度の24時間培養後の変化量を求めた。培養試験は独立した実験を3回行った。対照実験として液体培地（100 μ L）を2倍希釈したものをを用いた。

[0033] メラノイジンの抗菌活性を評価した結果を図1に示す。本研究で用いた22種類のメラノイジンの中で最も*L. monocytogenes*に対する増殖抑制効果が高かった反応基質は、キシロースとフェニルアラニン、およびキシロースとプロリンの組み合わせであった。また、いずれのアミノ酸条件においても、D-グルコースよりD-キシロースを用いて製造したメラノイジンで*L. monocytogenes*の増殖はより顕著に抑制された。反応基質として使用する還元糖の違いによってメラノイジンの抗菌活性が変化したのは、還元糖によってメイラード反応の反応性が異なるためであると考えられる。

[0034] フェニルアラニンまたはプロリンを用いて製造したメラノイジンで最も抗菌活性が高かった理由は二点考えられる。一点目は、アミノ酸の構造にある。メラノイジンの抗菌活性のメカニズムとして細菌の細胞壁へのキレート効果が提唱されているが、一般にキレートは五員または六員環構造が安定することが知られている。したがって、フェニルアラニンが有する六員環構造、およびはプロリンが有する五員環構造が、これらの基質から製造されたメラノイジンに影響を与えている可能性がある。二点目はメラノイジン内のペプチドによる影響である。重合体であるメラノイジンにはアミノ酸がペプチド結合をしたペプチドが含まれているとの報告がある。また、微生物や昆虫等が生成したプロリンを豊富に含むペプチドやフェニルアラニンを含むペプチ

ドの中には抗菌活性を有するものがあるため、フェニルアラニンやプロリンから生成したメラノイジン内に生成されたペプチドが抗菌活性を有している可能性もある。以上のことから、キシロースとフェニルアラニン、およびキシロースとプロリンの組み合わせから生成したメラノイジンの抗菌性が最も高くなったと推測される。

[0035] (4) 抗菌活性範囲の特定

上記(2)で製造したメラノイジンのうち2種類のメラノイジン(反応基質として、キシロースとフェニルアラニンの組み合わせ、およびキシロースとプロリンの組み合わせを用いて製造されたメラノイジン;以下、それぞれ、「Xylose-Pheメラノイジン」および「Xylose-Proメラノイジン」と略す)を用い、それらが抗菌活性を示す細菌を特定した。上記(1)で培養した全ての細菌を対象に以下の測定を行った。2種類のメラノイジン(各500 μ L)にTryptic Soy Broth液体培地(500 μ L)を加え、細菌液(10⁵~10⁶CFU/mL)を20 μ L分注して25 $^{\circ}$ Cで48時間培養した。培養期間中12時間間隔でサンプルを抽出して生菌数(Colony forming unit: CFU/mL)を測定した。

[0036] その結果、上記の2種類のメラノイジンは、*L. monocytogenes*の他に、*Brevibacillus brevis*に対して高い抗菌活性を示し、その生菌数は48時間で減少し続けた(図2)。さらに、Xylose-Pheメラノイジンは*Bacillus cereus*に対して、Xylose-Proメラノイジンは*Salmonella Typhimurium*に対して、特に高い抗菌活性を示した(図3、図4)。しかしながら、Xylose-Proメラノイジンは*Bacillus cereus*に対して、25 $^{\circ}$ Cでの培養条件下で24時間後まで生菌数がわずかに増加しただけであり、無添加時と比べても、十分な増殖抑制を示した(図3)。また、Xylose-Pheメラノイジンは*Salmonella Typhimurium*に対して、25 $^{\circ}$ Cでの培養条件下で12時間後まで生菌

数を減少させ、さらに24時間後の時点で実験開始時の生菌数を維持しており、十分な増殖抑制を示した(図4)。このように2種類のメラノイジンで異なる抗菌活性を示したのは、先述したようにメラノイジン内にペプチドが生成されていると仮定したならば、生成されている抗菌ペプチドが異なるためであると考えられる。

[0037] その他の細菌に対しては2種類のメラノイジンはわずかに抗菌活性を示すか、全く抗菌活性を示さなかった。特に、4種類の腸内細菌およびその他の乳酸菌に対してメラノイジンが強い抗菌性を示さなかった理由は、それらの細菌がメラノイジン耐性を持つためと考えられる。人類は古くからメラノイジンを含む食品を製造し、日常的に食べているので、人類の腸内に生存している腸内細菌叢は高頻度でメラノイジンに曝露されてきた。そのため腸内細菌叢はメラノイジンに耐性を持つようになったと推測される。腸内細菌ではないが、*L. fructivorans*にも同様のことが言える。この細菌は佃煮や減塩醤油内でも生存できる細菌であり、塩分耐性があるとされている。しかし佃煮や醤油は共にメラノイジンを含む食品でもあるため、*L. fructivorans*も腸内細菌同様にメラノイジン耐性を獲得していると推測される。

[0038] (5) メラノイジンの性能評価

2種類のメラノイジン(Xylose-Pheメラノイジン、およびXylose-Proメラノイジン)を用い、その抗菌性を既存の保存料であるナイシンと比較した。ナイシン溶液を500、700、または800IU/mLで調整した。ここで、1IU(International Unit)は、0.25 μ gを示す。上記(3)と同様に、メラノイジンおよびナイシン溶液にTryptic Soy Broth液体培地を混合し、*L. monocytogenes*($10^5\sim 10^6$ CFU/mL)を20 μ L分注して、25 $^{\circ}$ Cで48時間培養した。培養期間中12時間間隔で生菌数(CFU/mL)を測定した。

[0039] ナイシンとメラノイジンの*L. monocytogenes*に対する抗菌

活性を比較した結果を図5に示した。ナイシン添加条件では添加後12時間の培養で生菌数の減少が見られたが、同様の生菌数減少はメラノイジン添加条件では見られず、48時間の培養期間中ほぼ一定の値を示した。また、250 IU/mL（洋菓子等の国内基準）および350 IU/mLナイシン添加条件では、12時間以降生菌数は増加し、48時間の測定時には生菌数はメラノイジン添加条件と同程度、あるいはそれ以上まで増加した。これらの結果より、本研究で用いた2種類のメラノイジンの*L. monocytogenes*に対する抗菌活性は、ナイシン250~350 IU/mL程度であるものの、その増殖抑制効果の持続性が示された。

[0040] 実施例2：食品中の食中毒細菌に対するメラノイジンの抗菌活性評価

本研究では、加熱加工工程においても生残する食中毒細菌の一つである*Bacillus cereus*（以下、*B. cereus*と略す）を対象として、加熱調理後の食品中におけるメラノイジンの細菌増殖抑制効果を、既存の保存料等との比較から明らかにした。

[0041] 1. 実験方法

(1) 供試細菌と材料

加工食品中から分離された*B. cereus*をTryptic Soy Broth液体培地中にて増菌培養して、 10^9 CFU/mLに調製した菌液を用いた。対象食品として煮込み調理過程での*B. cereus*の生残が懸念される牛丼を採用して、レトルト殺菌処理を施された牛丼の素から抽出したつゆを実験に用いた。供試つゆのpHは5.6、水分活性は0.977であった。

[0042] (2) メラノイジンの調製

pH7.0のリン酸緩衝液を溶媒として、D-キシロースとL-フェニルアラニンをそれぞれ40mM濃度に調製した後、混合してオートクレーブにて121℃、2気圧で1時間加熱した。加熱後、速やかに冷水で冷却した後、-30℃で24時間予備凍結し、凍結試料を真空凍結乾燥機内に静置して凍結乾燥により、粉末状のメラノイジンを調製した。

[0043] (3) 抗菌活性の比較

レトルト食品の牛丼の素のつゆ900 μ Lに、上記(2)で調製したメラノイジン粉末7.0mgと*B. cereus*の菌液100 μ Lを加え、25 $^{\circ}$ Cで3日間培養し、24時間毎に溶液中の生菌数を測定した。既存の保存料および日持ち向上剤とメラノイジンの抗菌活性を比較するために、現在、保存料および日持ち向上剤として一般的に用いられているグリシン、プロタミン(白子たんぱく抽出物)、プロピオン酸カルシウム、安息香酸ナトリウム、およびソルビン酸カリウムを、メラノイジンと同一の添加濃度に調製して、同様に*B. cereus*含有溶液中の生菌数を測定した。陰性対照として、何も添加しない場合の*B. cereus*含有溶液中の生菌数を測定した。

[0044] (4) 統計処理

同一保存期間における各種添加物の効果を評価するために、メラノイジンを含む6種類の添加物の抗菌活性の差をTukeyの多重比較法を用いて検定した。

[0045] 2. 結果と考察

結果を表1および図6に示す。これらの結果から明らかなように、メラノイジンを添加することで、25 $^{\circ}$ Cで保存した牛丼中の*B. cereus*の増殖を少なくとも3日間は初期菌数未満に抑制することができた。既存の保存料または日持ち向上剤を添加した場合の菌数と比較すると、メラノイジンを添加した場合の菌数はソルビン酸カリウムを添加した場合より少なく、安息香酸ナトリウムよりわずかに多かった(図6)。さらに、1日目と2日目についてはメラノイジンを添加した場合の菌数が最も少なかった(表1)。また、本研究では*B. cereus*の異なる2菌株(ATCC 10987、および食品製造工場からの分離株)を用いて実験を行なったが、いずれの菌株も同様の結果を示していたことから、菌株の違いによらずメラノイジンの抗菌活性が現われることが確認できた。

[0046] 25 $^{\circ}$ Cで保存した牛丼中の菌数をTukeyの多重比較法を用いた検定の結果、2日目以降は安息香酸ナトリウムを添加した場合と有意差がなく、3

日目はソルビン酸カリウムを添加した場合と有意差がなかったことから、メラノイジンの抗菌活性は安息香酸ナトリウムおよびソルビン酸カリウムと同等以上であるといえる（表1）。つまり、アミノ酸と還元糖を加熱するだけで調製できるメラノイジンが、既存の保存料等と同等以上の抗菌活性を有していることが明らかになった。安息香酸ナトリウムおよびソルビン酸カリウムは、どちらも食品への添加量が法で規制されている強力な保存料である。メラノイジンの抗菌活性がそれらの試薬と同等以上であることから、メラノイジンを利用することで食品素材由来の物質を用いた新たな食中毒防止および食品の腐敗抑制の手法開発の可能性が示唆された。

[0047] 表1. 各種添加物の添加による牛丼中の *Bacillus cereus* の 25℃における増殖に与える影響

[表1]

Storage period(day)	B.cereus (log CFU/mL)						
	Control	Melanoidin	Sodium benzoate	Potassium sorbate	Calcium propionate	Protamine	Glycine
0	6.02±0.03a	5.94±0.04a	5.89±0.03a	5.91±0.05a	5.98±0.02a	5.06±0.09b	5.97±0.03a
1	8.03±0.03a	4.63±0.06b	5.76±0.07c	5.59±0.04c	6.15±0.02d	6.10±0.07d	8.07±0.04a
2	7.94±0.02a	3.96±0.09b	4.20±0.11b	4.56±0.18c	6.77±0.08d	7.14±0.03e	7.94±0.03a
3	7.97±0.04a	3.58±0.25b	3.48±0.20b	3.97±0.13b	7.35±0.05c	7.21±0.12c	7.97±0.03a

表中の値は *B. cereus* の対数生菌数を平均値±標準偏差（n=3）で表している。アルファベットの違いは同一測定時点において有意差があることを表す。（P<0.05）

[0048] 実施例3：抗菌活性化合物の単離

メラノイジンは、メイラード反応中に形成されるメラノイジン中間体の種類と量は膨大であり、さらに、その化学構造は処理速度および処理時間等の条件にも依存するため、異なる部分構造の不均一な混合物であると考えられており、構造が不確かである。そのため、メラノイジンの抗菌活性のメカニズムも未だ明らかになっていない。本研究では、複合物質であるメラノイジンの、科学的な性質を利用した成分分離を繰り返し行い、抗菌活性を有する物質群を選抜し、選抜された物質群において抗菌活性を示す要因となってい

る化学構造を明らかにした。

[0049] Ⅰ. 抗菌活性を有する物質群の選抜

1. 実験方法

(1) 供試細菌と材料

Bacillus cereus (ATCC 10987) を *Tryptic Soy Agar* 寒天培地 (TSA) で 37℃ で 24 時間培養後、*Tryptic Soy Broth* 液体培地 (TSB) でさらに 37℃ で 24 時間増菌培養した。このようにして調製した菌液を以下の実験に用いた。

[0050] (2) メラノイジンの調製および分離

pH 7.0 のリン酸緩衝液を溶媒として、D-キシロースと L-フェニルアラニンをそれぞれ 40 mM 濃度に調製した後、混合してオートクレーブにて 121℃ で 1 時間加熱してメラノイジンを生成した。生成したメラノイジンを分液漏斗を用いて分離し、得られた酢酸エチル抽出物を、さらにシリカゲルクロマトグラフィーを用いて分離し、フラクションとした。このフラクションを薄層クロマトグラフィー (TLC) にかけて、印のでた 2 つのフラクション (サンプル A およびサンプル B) を得た。これらのサンプルは、試料原液中で 4500 ppm、2250 ppm、または 1124 ppm になるように濃度を調整して用いた。サンプルは、一度濃縮して溶媒を飛ばした後、純水に溶かして調製した。

[0051] (3) サンプルの抗菌活性

上記 (2) で調製した各濃度のサンプル 450 μ L と TSB 450 μ L とを混合したものに、上記 (1) で調製した *Bacillus cereus* の菌液を 100 μ L 加えて試料原液を調製し、25℃ で培養し、24 時間毎に溶液中の菌数を測定した。希釈した試料 100 μ L を TSA に塗布し、37℃ で 24 時間培養後 TSA 上に発生したコロニー数 (CFU) を測定したものを各測定時間の菌数とした。また、比較のために、コントロールとして、サンプル 450 μ L をペプトン水 450 μ L に置き換えたもので同様の操作を行った。

[0052] 2. 結果と考察

分離サンプルAおよびサンプルBの濃度ごとの抗菌活性の結果をそれぞれ、図7Aおよび図7Bに示す。サンプルAはどの濃度でも抗菌活性が見られ、4500ppmと2250ppmの場合の抗菌活性はほとんど同じくらいで、かなり強い抗菌活性を示していた(図7A)。さらに1124ppmでも生菌数は減り続けており、ある程度強い抗菌活性が見られた。それに対しサンプルBでは4500ppmの場合で少し抗菌活性が見られたが、それ以外の濃度ではサンプルBをペプトン水に置き換えた場合(コントロール)とほとんど生菌数は変わらず抗菌活性がほとんど見られなかった(図7B)。この結果から、メラノイジンの抗菌活性はサンプルA内の物質が強く影響していることが分かった。また、サンプルAにおいて4500ppmと2250ppmでの抗菌活性がほとんど変わらなかったことから、サンプルAの抗菌活性の能力は一定以上の濃度で限界に達する可能性がある。

[0053] 1.1. 抗菌活性化合物の単離

1. 実験方法

(1) 供試細菌と材料

Bacillus cereus (ATCC 10987) の冷凍ストックから白金耳でTryptic Soy Agar寒天培地(TSA)に塗布し、37℃で24時間培養後、Tryptic Soy Broth液体培地(TSB)でさらに24時間培養し、 10^9 CFU/mLに調製した。このようにして調製した菌液を以下の実験に用いた。

[0054] (2) メラノイジンの調製および分離

pH7.0のリン酸緩衝液を溶媒として、D-キシロースとL-フェニルアラニンそれぞれ40mM濃度に調製した後、混合してオートクレーブにて121℃で1時間加熱した。生成したメラノイジンの酢酸エチル抽出物をカラムクロマトグラフィー(溶媒 メタノール20% : クロロホルム80%)で抽出してサンプルAを得た。サンプルAをさらにカラムクロマトグラフィー(溶媒 酢酸エチル50% : トルエン50%)に付して、物質を単離し

た。この物質をDMSOと純水の混合溶媒に溶かして調製した溶液（サンプル）を、以下の実験に用いた。

[0055] (3) 菌数測定

サンプル450 μ LとTSB450 μ Lとを混合したものに、上記(1)で調製した*Bacillus cereus*の菌液100 μ Lを加えて試料原液を調製し、25 $^{\circ}$ Cで培養し、24時間毎に溶液中の菌数を測定した。試料原液を希釈した試料100 μ Lを寒天培地に塗布し、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養後、寒天平板上に発生したコロニー数(CFU)を測定したものを各測定時間の菌数とした。また、DMSOの抗菌活性の確認のために、サンプル450 μ Lを、試料原液中で上記(2)の単離物質と同濃度になるよう調節したDMSOと純水の混合溶液に置き換えたもので同様の操作を行った。さらに比較のために、コントロールとして、サンプル450 μ Lをペプトン水450 μ Lに置き換えたもので同様の操作を行った。

[0056] 2. 結果と考察

結果を図8に示す。単離物質の溶液はかなり強い抗菌活性を示したが、DMSOと水の混合溶液はペプトン水に置き換えたコントロールと同様に抗菌活性を示さなかった。このことから、メラノイジンから単離した物質は、抗菌活性を示すことが分かった。

[0057] 実施例4：抗菌化合物の化学構造の決定

実施例3で単離した化合物を各種機器分析に供し、化学構造の決定を行なった。その結果、FD-MS (Field Desorption-Mass Spectroscopy) 分析において、 m/z 291.13に強いシグナルが観測された。本シグナルの精密質量は、 m/z 291.1274であり、分子式は $C_{19}H_{17}NO_2$ (計算質量 291.1259) と推定された。さらに、 ^1H-NMR 、 $^{13}C-NMR$ 、COSY、HSQC、およびHMBCスペクトルにより、化合物の構造決定を行い、その化学構造を、3-フェニル-2-(3-フェニル-1H-ピロール-1-イル)プロパン酸と決定した(図9A)。 ^1H-NMR および $^{13}C-NMR$ スペクトルのシグナルの一覧を表2に示し、鍵となるCOS

YおよびHMBC相関を図9Bに示す。

[0058] 表2. サンプルAの ^1H -NMRと ^{13}C -NMRスペクトルデータ

[表2]

対応する化合物中の位置	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	171.7	-
2	62.6	4.02 (dd, J = 9.9, 5.8 Hz)
3	37.8	3.33 (dd, J = 14.3, 5.8 Hz), 3.40 (m)
4	137.3	-
5	129.0	7.16 (m)
6	128.7	7.20 (m)
7	126.7	7.13 (m)
8	128.7	7.20 (m)
9	129.0	7.16 (m)
1'	-	-
2'	117.7	7.27 (m)
3'	123.3	-
4'	105.7	6.35 (d, J = 2.9 Hz)
5'	122.0	6.82 (d, J = 2.9 Hz)
6'	135.8	-
7'	124.4	7.45 (d, J = 7.5 Hz)
8'	128.7	7.26 (t, J = 7.5 Hz)
9'	125.1	7.07 (t, J = 7.5 Hz)
10'	128.7	7.26 (t, J = 7.5 Hz)
11'	124.4	7.45 (d, J = 7.5 Hz)

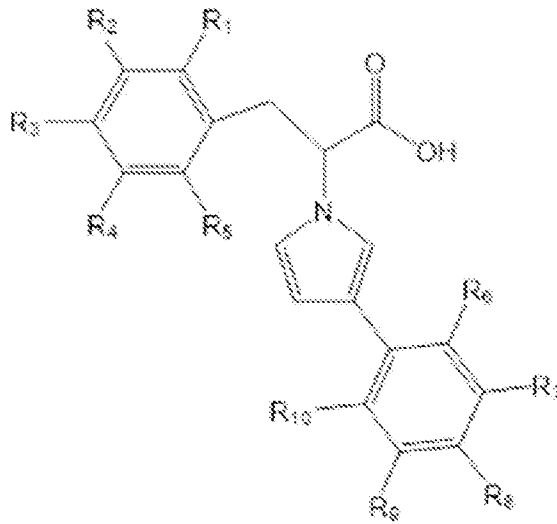
産業上の利用可能性

[0059] 本発明の抗菌組成物、および本発の製造方法によって製造されるメラノイジンは、飲食品、化粧品および医薬品等の分野において日持ち向上剤、保存料または防腐剤等として安全に使用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] キシロースまたはリボースから選択される還元糖と、フェニルアラニンまたはプロリンから選択されるアミノ酸とを加熱することによってメラノイジンを製造すること、および
該メラノイジンを有効成分として配合すること
を含む、抗菌組成物の製造方法。
- [請求項2] キシロースとフェニルアラニンを反応させることを含み、製造されたメラノイジンが3-フェニル-2-(3-フェニル-1H-ピロール-1-イル)プロパン酸を含む、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 抗菌組成物が、*Listeria monocytogenes*、*Brevibacillus brevis*、*Bacillus cereus*、および*Salmonella Typhimurium*からなる群から選択される細菌に対して抗菌活性を示す、請求項1または2記載の方法。
- [請求項4] 反応基質としてキシロースまたはリボースとフェニルアラニンから製造されるメラノイジン、および／または反応基質としてキシロースまたはリボースとプロリンから製造されるメラノイジンを含む、抗菌組成物。
- [請求項5] *Listeria monocytogenes*、*Brevibacillus brevis*、*Bacillus cereus*、および*Salmonella Typhimurium*からなる群から選択される細菌に対して抗菌活性を示す、請求項4記載の抗菌組成物。
- [請求項6] 式：

[化1]



[式中、R₁ないしR₁₀は、独立して、H、またはC 1 - 5 の分枝鎖または直鎖状の飽和または不飽和炭化水素基である]

で示される化合物またはその塩を含む、抗菌組成物。

[請求項7]

前記式で示される化合物が3-フェニル-2-(3-フェニル-1H-ピロール-1-イル)プロパン酸である、請求項6記載の抗菌組成物。

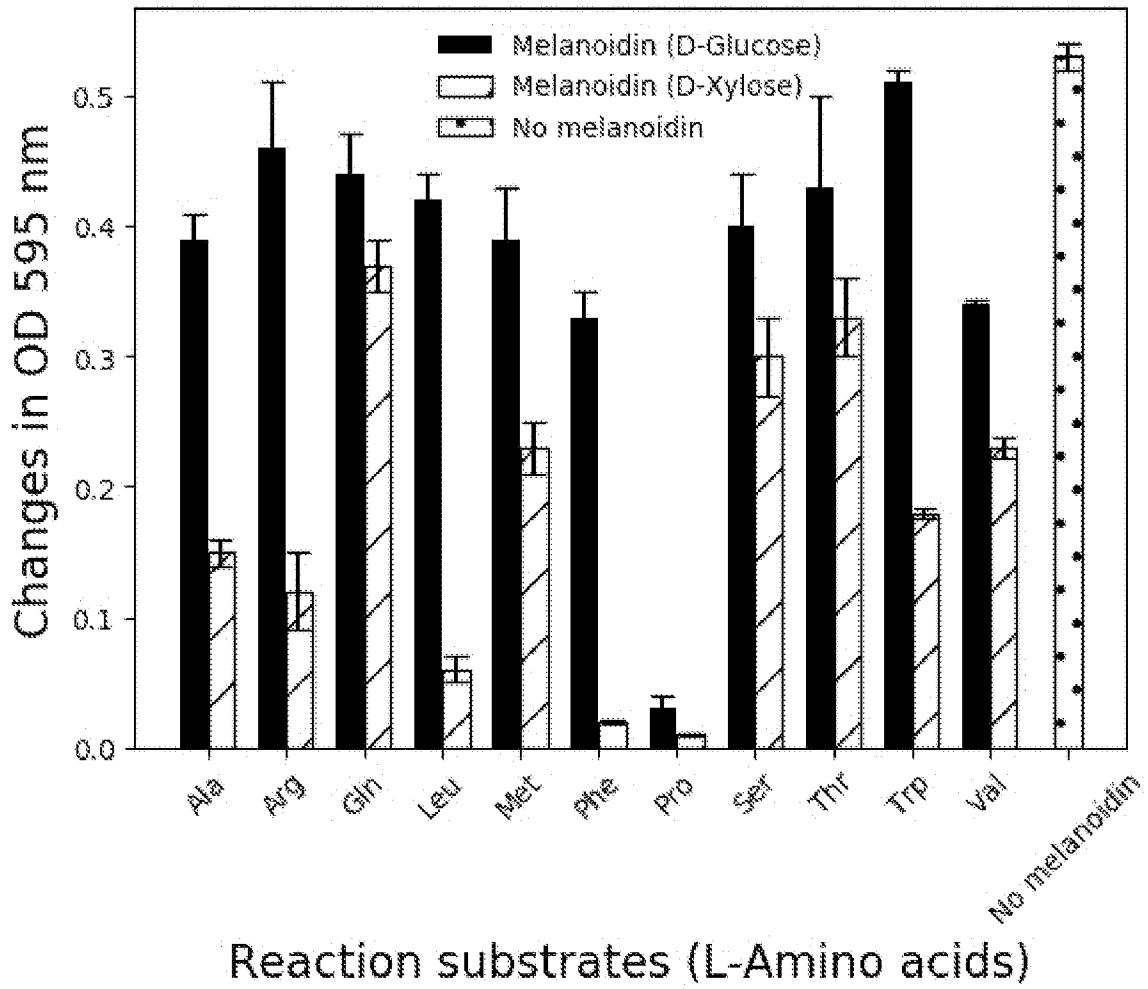
[請求項8]

Listeria monocytogenes、*Brevibacillus brevis*、*Bacillus cereus*、および*Salmonella Typhimurium*からなる群から選択される細菌に対して抗菌活性を示す、請求項6または7記載の抗菌組成物。

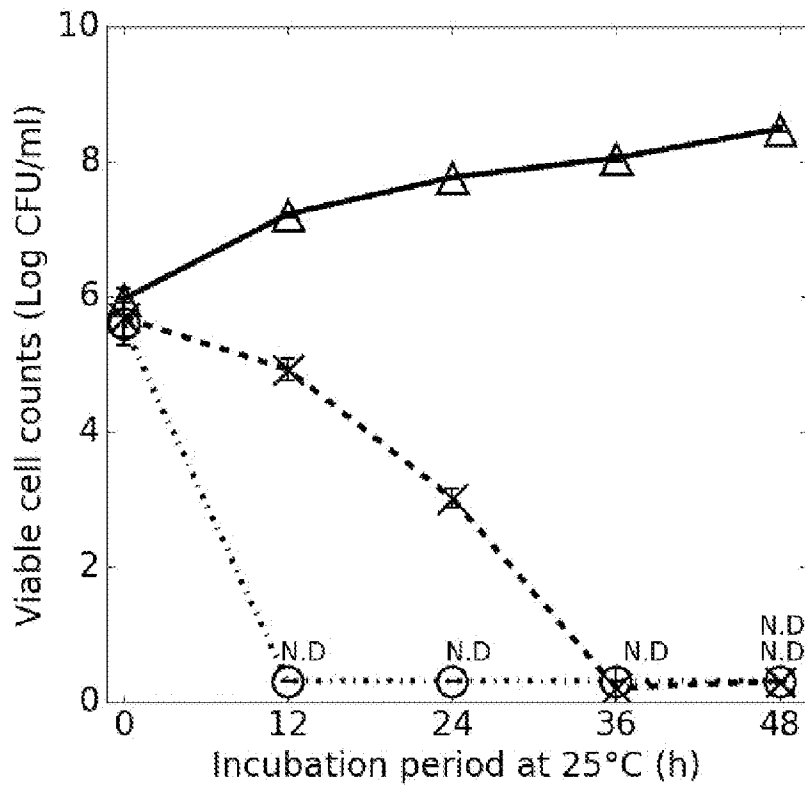
[請求項9]

キシロースとフェニルアラニンを反応基質としてメイラード反応を行うことを含む、3-フェニル-2-(3-フェニル-1H-ピロール-1-イル)プロパン酸の製造方法。

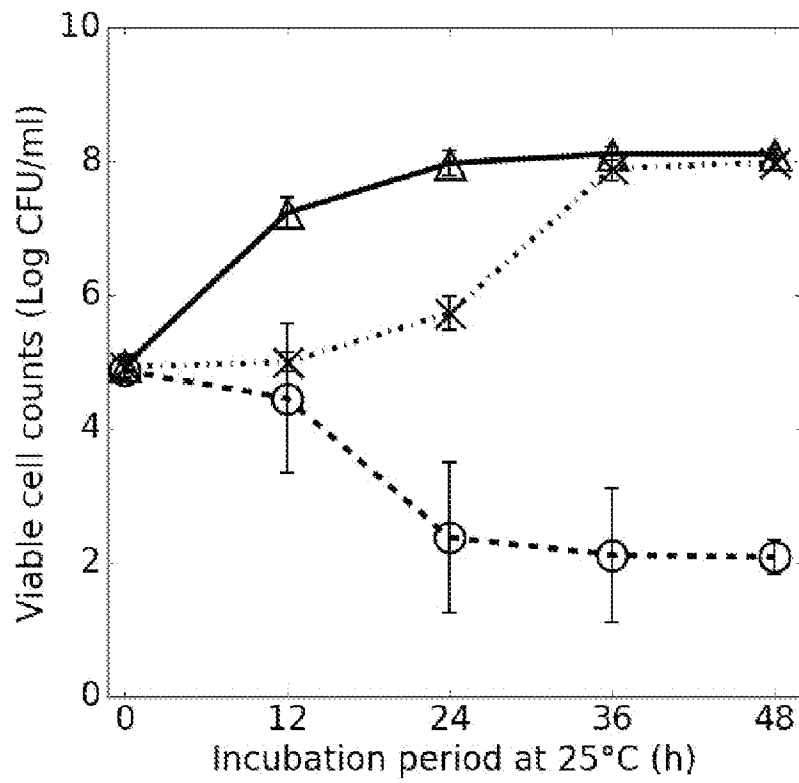
[Fig 1]



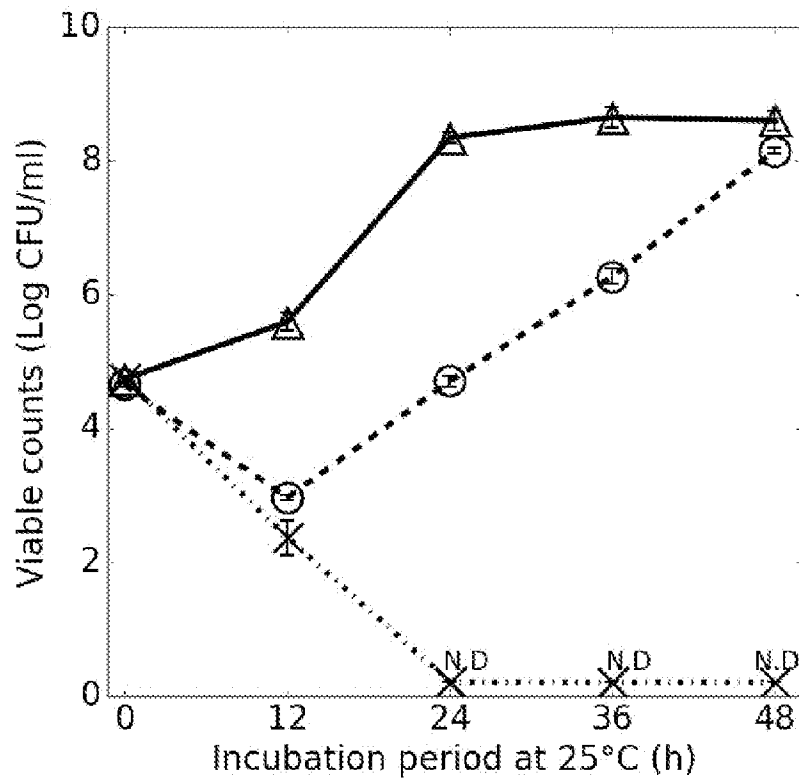
[Fig 2]



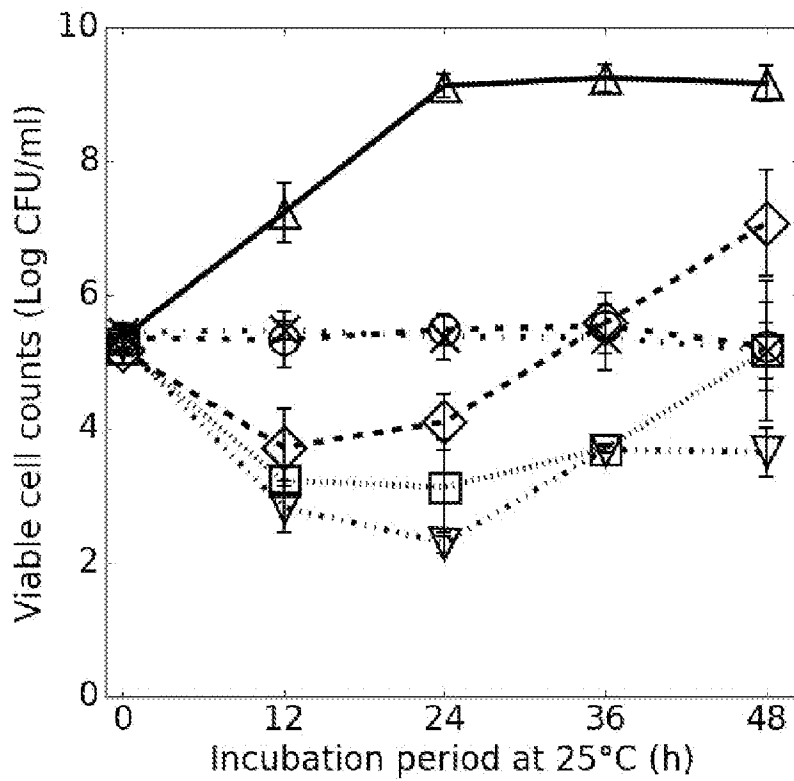
[圖3]



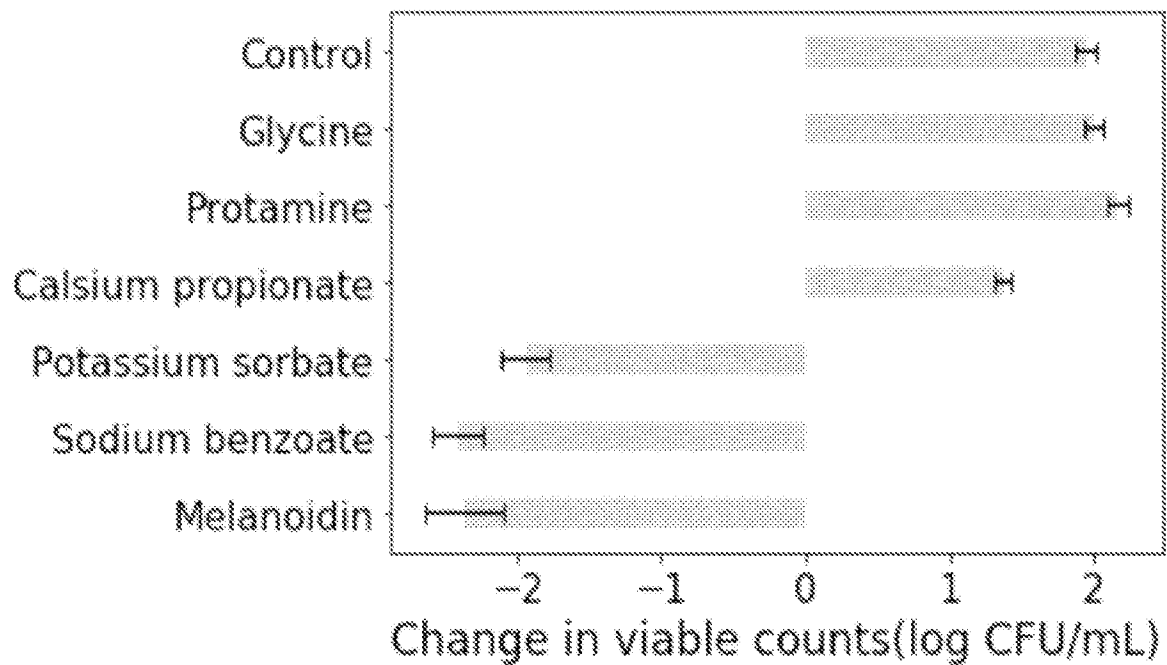
[圖4]



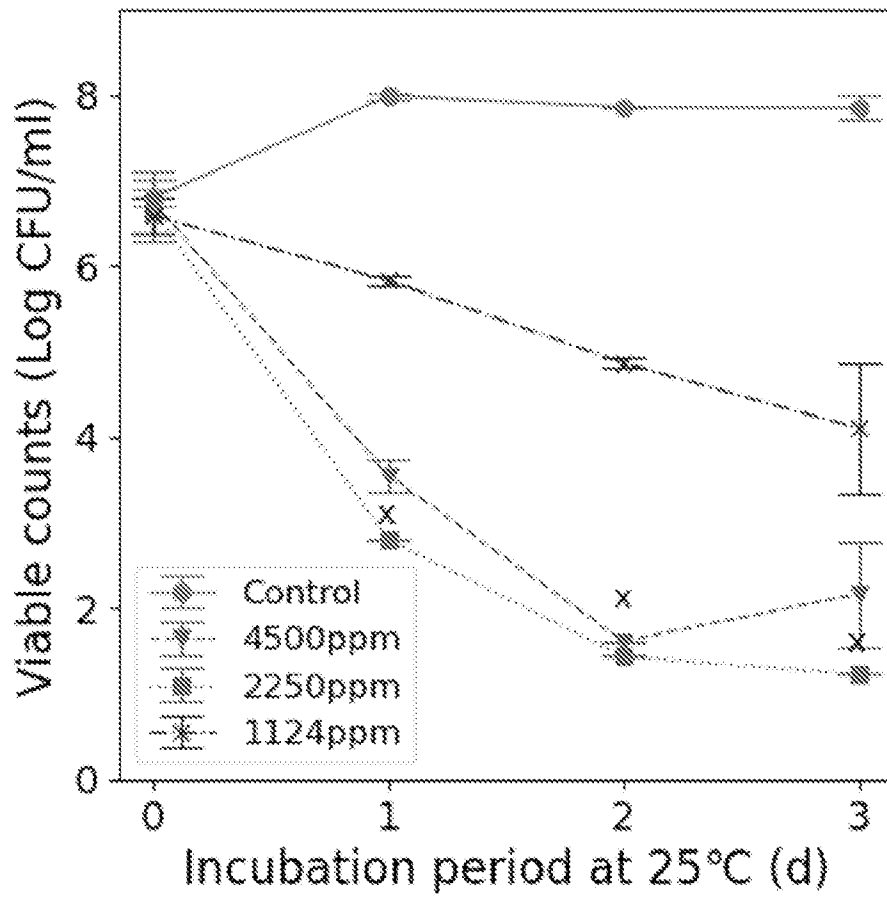
[5]



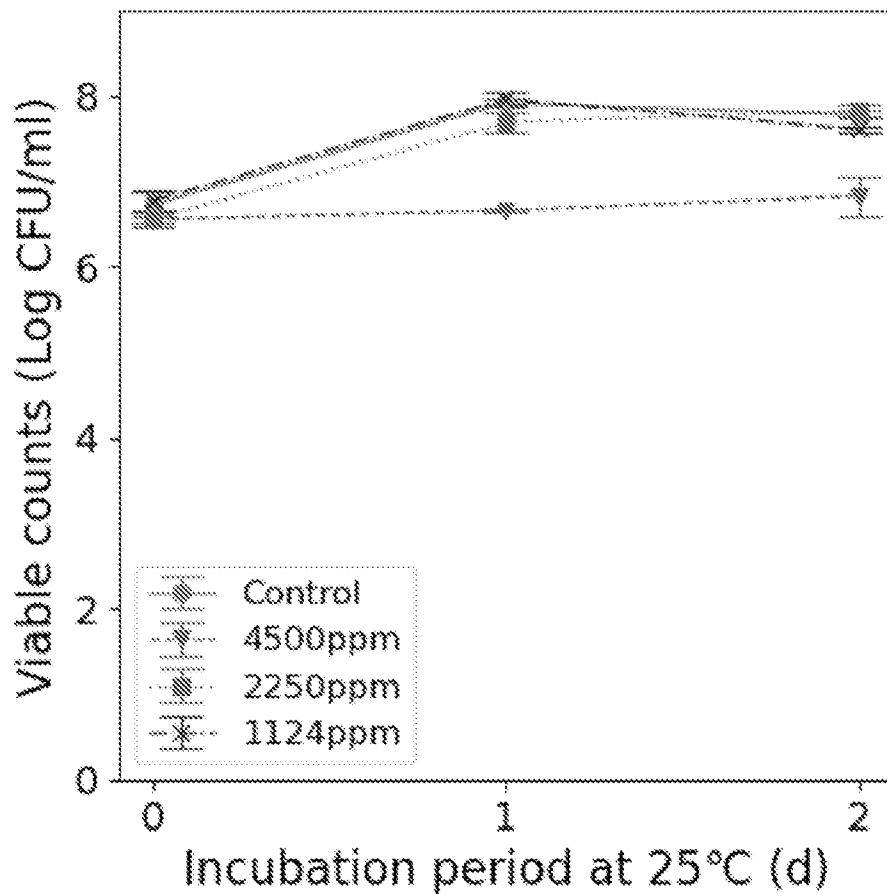
[6]



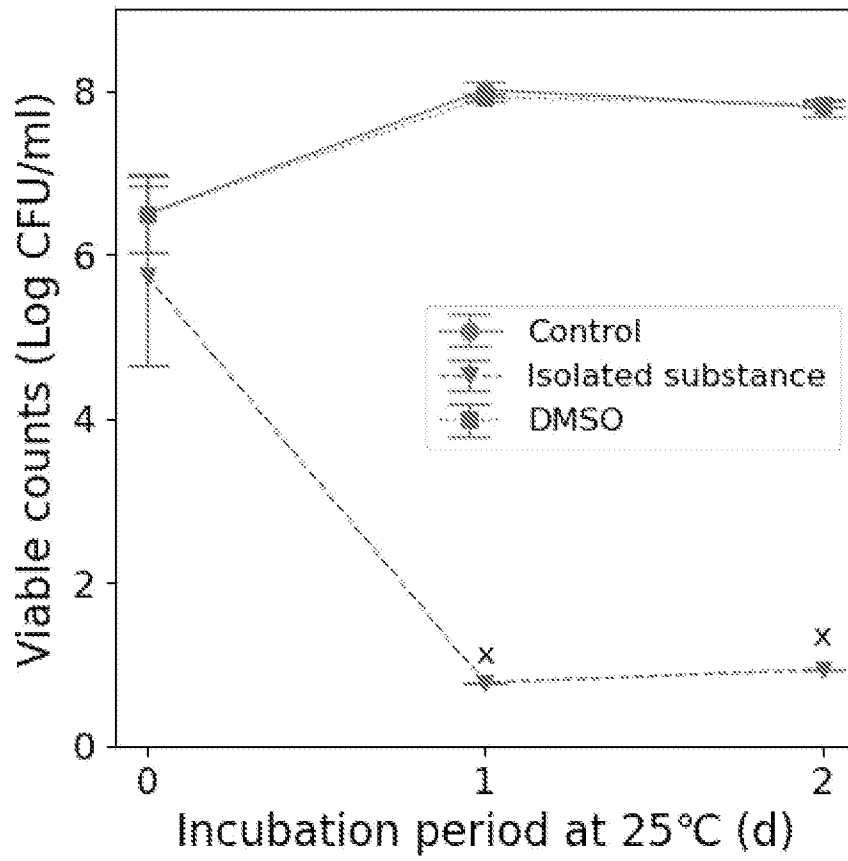
[図7A]



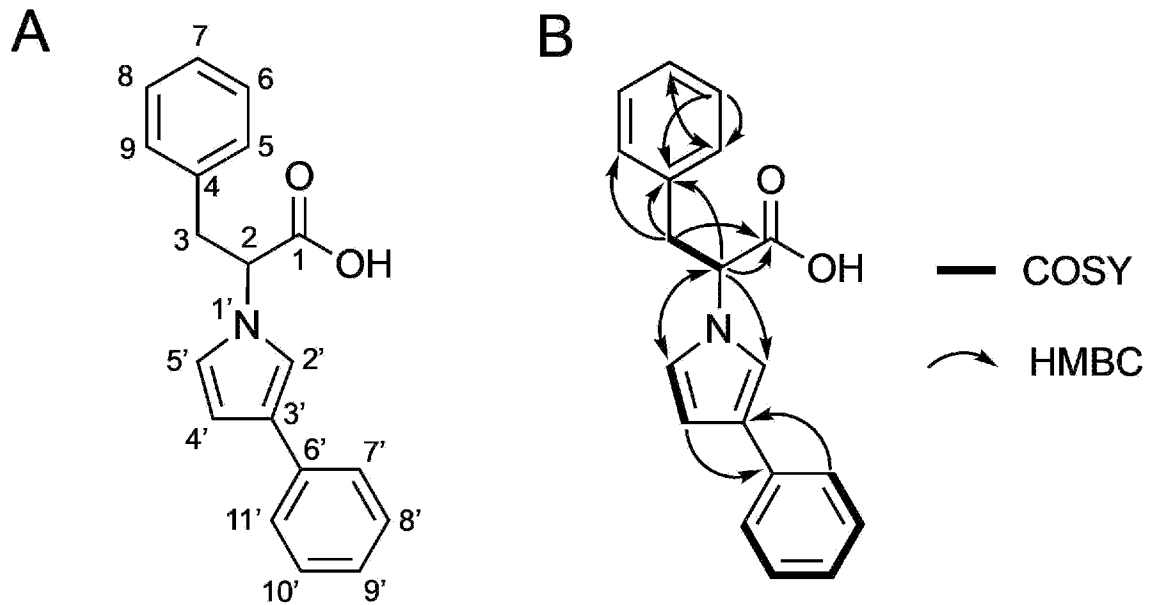
[図7B]



[圖8]



[圖9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/013264

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p><i>A01N 61/00</i>(2006.01)i; <i>A01N 43/36</i>(2006.01)i; <i>A01P 1/00</i>(2006.01)i; <i>A23L 3/3526</i>(2006.01)i; <i>A23L 3/3544</i>(2006.01)i; <i>A61K 31/40</i>(2006.01)i; <i>A61P 31/04</i>(2006.01)i; <i>C07D 207/327</i>(2006.01)i; <i>A61K 8/49</i>(2006.01)n; <i>A61Q 19/00</i>(2006.01)n FI: A01N61/00 A; A01N43/36 A; A01P1/00; A23L3/3526 501; A23L3/3544 502; A61K31/40; A61P31/04; C07D207/327; A61K8/49; A61Q19/00</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01N61/00; A01N43/36; A01P1/00; A23L3/3526; A23L3/3544; A61K31/40; A61P31/04; C07D207/327; A61K8/49; A61Q19/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 56-018170 B1 (EISAI CO., LTD.) 27 April 1981 (1981-04-27) p. 1, right column, lines 12-18, 22-26, examples 1, 2, tables 1-4	1-9
A	桑原聰子他. 糖-アミノ加熱反応物質の抗微生物作用(第1 堯) 抗微生物作用に影響する要因. 日本農芸化学会誌. 1972, vol. 46, no. 2, pp. 89-93, (KUWABARA, Soko et al. Antimicrobial Nature of the Products of Sugar-Amino Acid Reaction Part 1. Factors Affecting the Antimicrobial Activity. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan.) Materials and methods, Results, fig. 1, table I	1-9
A	JP 2009-171890 A (TSUKISHIMA FOODS IND CO., LTD.) 06 August 2009 (2009-08-06) paragraphs [0032], [0033], fig. 3, table 4	1-9
A	ALAVEZ-ROSAS, D et al. Synthesis of 1,3- and 1,2,3-functionalized pyrroles via Ir(I)-catalyzed vinylation of allyl alcohols. Chemistry of Heterocyclic Compounds. 01 June 2017, vol. 53, no. 5, pp. 526-531 table 2, compound 12	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 May 2022		Date of mailing of the international search report 07 June 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/013264

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 56-018170 B1	27 April 1981	(Family: none)	
JP 2009-171890 A	06 August 2009	(Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A01N 61/00(2006.01)i; A01N 43/36(2006.01)i; A01P 1/00(2006.01)i; A23L 3/3526(2006.01)i; A23L 3/3544(2006.01)i; A61K 31/40(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; C07D 207/327(2006.01)i; A61K 8/49(2006.01)n; A61Q 19/00(2006.01)n</p> <p>FI: A01N61/00 A; A01N43/36 A; A01P1/00; A23L3/3526 501; A23L3/3544 502; A61K31/40; A61P31/04; C07D207/327; A61K8/49; A61Q19/00</p>																	
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A01N61/00; A01N43/36; A01P1/00; A23L3/3526; A23L3/3544; A61K31/40; A61P31/04; C07D207/327; A61K8/49; A61Q19/00</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2022年	日本国実用新案登録公報	1996-2022年	日本国登録実用新案公報	1994-2022年							
日本国実用新案公報	1922-1996年																
日本国公開実用新案公報	1971-2022年																
日本国実用新案登録公報	1996-2022年																
日本国登録実用新案公報	1994-2022年																
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>JP 56-018170 B1 (エーザイ株式会社) 27.04.1981 (1981-04-27) 第1頁右欄12-18行、22-26行、実施例1-2、第1-4表</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>桑原 聰子 他, 糖-アミノ加熱反応物質の抗微生物作用 (第1報) 抗微生物作用に影響する要因, 日本農芸化学会誌, 1972年, 第46巻, 第2号, pp.89-93 実験材料および方法、実験結果、Fig.1、Table 1</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2009-171890 A (月島食品工業株式会社) 06.08.2009 (2009-08-06) [0032]-[0033]、図3、表4</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>ALAVEZ-ROSAS, D et al., Synthesis of 1,3- and 1,2,3-functionalized pyrroles via Ir(I)-catalyzed vinylation of allyl alcohols, Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2017.06.01, Vol.53, No.5, pp.526-531 Table 2, Compound 12</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> <p>* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献</p>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	A	JP 56-018170 B1 (エーザイ株式会社) 27.04.1981 (1981-04-27) 第1頁右欄12-18行、22-26行、実施例1-2、第1-4表	1-9	A	桑原 聰子 他, 糖-アミノ加熱反応物質の抗微生物作用 (第1報) 抗微生物作用に影響する要因, 日本農芸化学会誌, 1972年, 第46巻, 第2号, pp.89-93 実験材料および方法、実験結果、Fig.1、Table 1	1-9	A	JP 2009-171890 A (月島食品工業株式会社) 06.08.2009 (2009-08-06) [0032]-[0033]、図3、表4	1-9	A	ALAVEZ-ROSAS, D et al., Synthesis of 1,3- and 1,2,3-functionalized pyrroles via Ir(I)-catalyzed vinylation of allyl alcohols, Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2017.06.01, Vol.53, No.5, pp.526-531 Table 2, Compound 12	1-9
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号															
A	JP 56-018170 B1 (エーザイ株式会社) 27.04.1981 (1981-04-27) 第1頁右欄12-18行、22-26行、実施例1-2、第1-4表	1-9															
A	桑原 聰子 他, 糖-アミノ加熱反応物質の抗微生物作用 (第1報) 抗微生物作用に影響する要因, 日本農芸化学会誌, 1972年, 第46巻, 第2号, pp.89-93 実験材料および方法、実験結果、Fig.1、Table 1	1-9															
A	JP 2009-171890 A (月島食品工業株式会社) 06.08.2009 (2009-08-06) [0032]-[0033]、図3、表4	1-9															
A	ALAVEZ-ROSAS, D et al., Synthesis of 1,3- and 1,2,3-functionalized pyrroles via Ir(I)-catalyzed vinylation of allyl alcohols, Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2017.06.01, Vol.53, No.5, pp.526-531 Table 2, Compound 12	1-9															
<p>国際調査を完了した日</p> <p>24.05.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>07.06.2022</p>																
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>阿久津 江梨子 4H 2587</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3443</p>																

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/013264

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 56-018170 B1	27.04.1981	(ファミリーなし)	
JP 2009-171890 A	06.08.2009	(ファミリーなし)	