

# 第53回近畿アグリハイテクシンポジウム 第3回大豆研究会シンポジウム

ご来場頂きまして誠に有難うございます

**ECOSUNTE**

2011年3月10(木)  
主催:近畿アグリハイテク 農林水産省  
会場:京都メルパル  
エコサンテ物産

ECOSUNTE

題目

大豆発酵生産物の生理活性と  
これを利用した健康食品(エコサンテ液)の紹介

エコサンテ物産

ECOSUNTE

## この研究を始めた経緯

食品メーカー在籍当時、豆乳アイスの商品化に携わる(京都の企業がきっかけ)

↓  
大学で栄養学を教える講師から  
大豆を利用した興味深い発酵物がある、研究してみないか

↓  
縁を感じながらも  
専門家ではないので、しばらく思案

↓  
やるなら今しかない！  
1992年30歳の時、オフィス新井を創業

ECOSUNTE

## 本日皆様にお伝えしたこと

大豆由来で大腸がん細胞に直接作用

↓  
抗がん剤等との併用、又はESのみで数々の症例

↓  
昨年末より都内総合病院で臨床試験開始

**注意！**

この発表は弊社研究食品素材の発表であり、  
(創造法事業・SBIR事業の研究成果)、商品説明ではありません

## 会社概要

社名	有限会社エコサンテ物産
創業・設立	創業1992年5月 設立1999年1月27日
資本金	3,300万円
事業内容	ES大豆発酵生産物の研究開発 健康食品エコサンテ液の販売
役員	新井行雄(代表取締役)
	羽鳥元久 橋本敏紘
	渡邊一生 外江義明
取引銀行	三井住友銀行深川森下支店(当座・普通)
	東京三菱銀行長原支店(普通)
	東日本銀行深川支店(普通)

## 会社沿革

1992年 5月	オフィス新井創業(大田区)
1999年 1月	(有)エコサンテ物産設立(江東区)
2000年 3月	東邦大学医学部薬理学教室と試験
2004年 8月	行政の研究機関と試験
2005年 5月	筑波大学と第1次共同研究開始
2006年 2月	筑波大学と第2次共同研究開始
2007年 4月	筑波大学と第3次共同研究開始
2008年 6月	「産学官連携成功128社」に選ばれ感謝状を授与
2008年 8月	筑波大学と第3次共同研究完了報告
2010年 10月	都内総合病院でヒト臨床試験開始
2011年 3月	第53回近畿アグリハイテクシンポジウム参加

## ES大豆発酵生産物とは

一次発酵【大豆(豆乳)+乳酸菌】

二次発酵

熟成



大豆を原料に独自の乳酸菌調合環境下により発酵させて生成される生産物。  
熟成期間を入れておよそ3年

## ES大豆発酵生産物食品研究公的支援

江東区中小企業産学連携共同研究補助金事業  
(江東区)

新事業開拓助成金交付事業(研究開発分野)  
(中小企業基盤整備機構)

中小企業創造活動促進法認定(創造法)  
(東京都)

SBIR事業(中小企業技術革新制度)  
生物系特定産業技術研究推進機構(関係省名:農林水産省)

## ES大豆発酵生産物・名前の由来

創造法認定の研究題目  
「エコサンテ大豆発酵生産物の研究開発」

商品名・エコサンテ液に決定

研究題目と商品名がリンクし薬事法上問題(東京都)

研究題目をエコサンテ横文字の頭文字を取ってES

研究題目「ES大豆発酵生産物」に変更

## 機能性研究 第1ステージ

ES大豆発酵生産物  
抗菌力試験

東邦大学医学部薬理学教室

## ES大豆発酵生産物抗菌試験

東邦大学医学部薬理学教室

ピロリ菌、MRSA、0157抗菌効果実証

財団法人日本食品分析センター

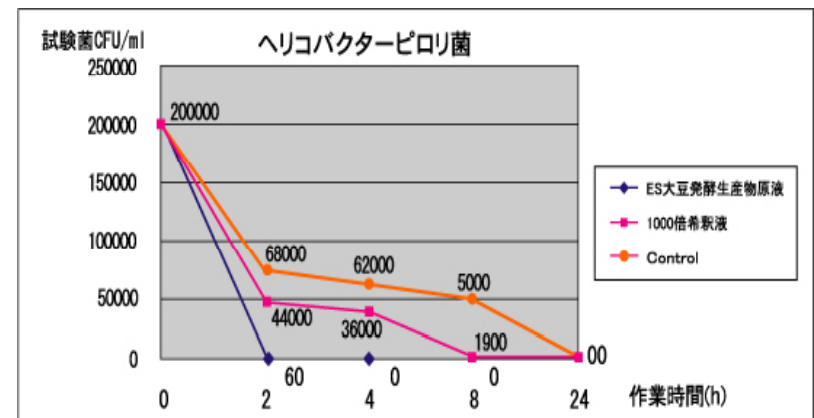
カンピロバクター抗菌効果実証

(社)東京都食品衛生協会 東京食品技術研究所

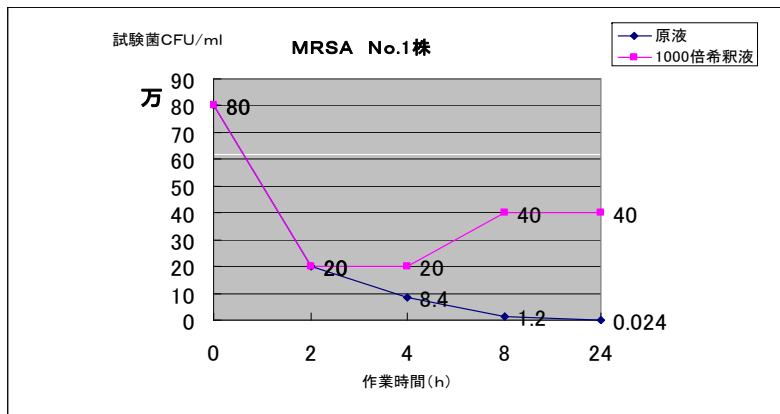
大腸菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ、腸炎ピブリオ、抗菌効果実証  
抗カビ効果実証

## ピロリ菌

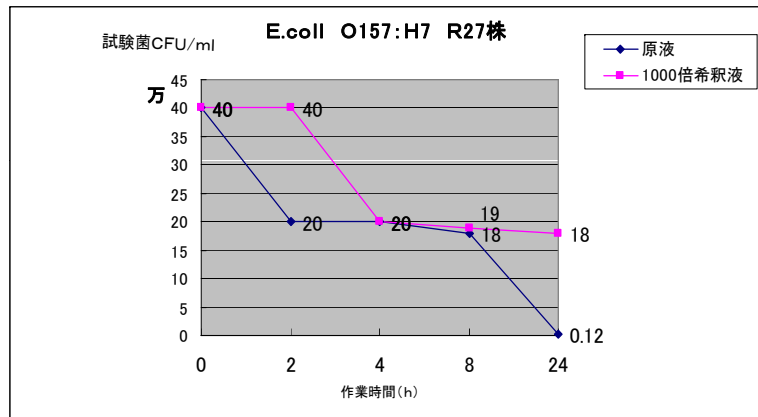
東邦大学医学部薬理学教室



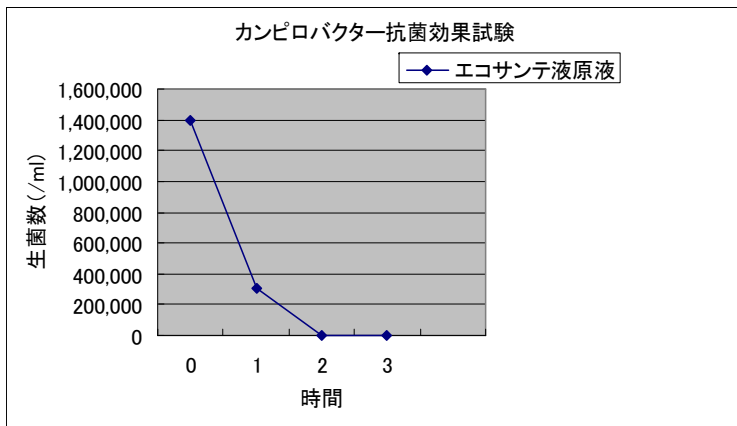
**MRSA**  
東邦大学医学部薬理学教室



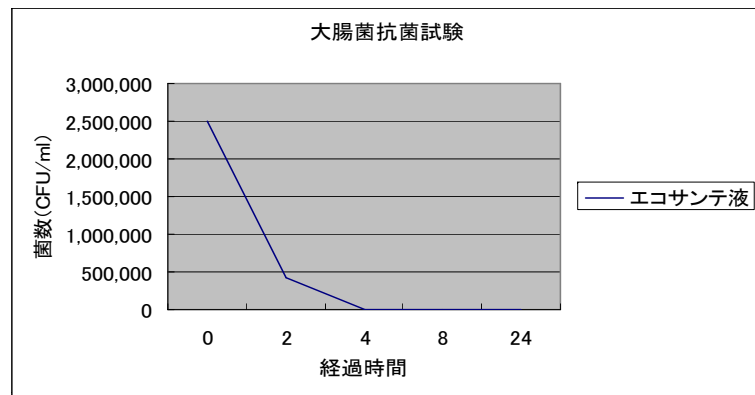
**O-157**  
東邦大学医学部薬理学教室



**カンピロバクター**  
財団法人日本食品分析センター



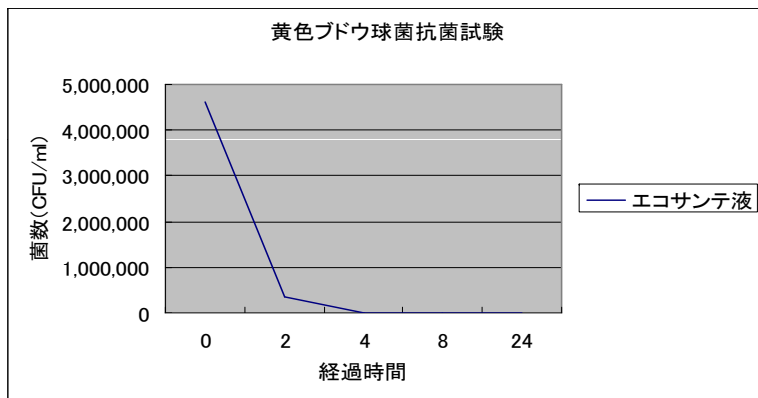
**大腸菌**  
(社)東京都食品衛生協会 東京食品技術研究所



## 黄色ブドウ球菌

(社)東京都食品衛生協会 東京食品技術研究所

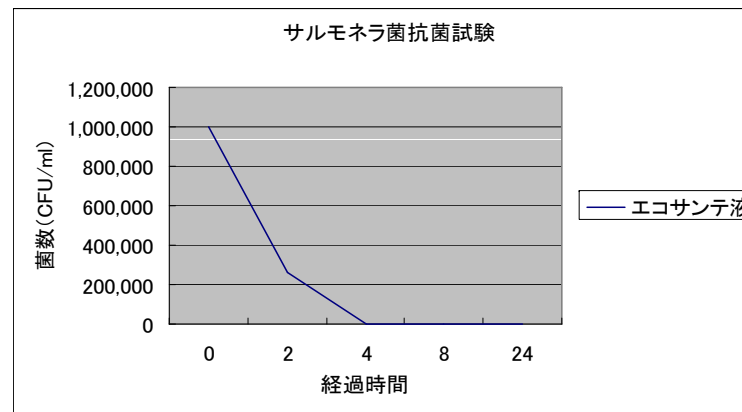
黄色ブドウ球菌抗菌試験



## サルモネラ菌

(社)東京都食品衛生協会 東京食品技術研究所

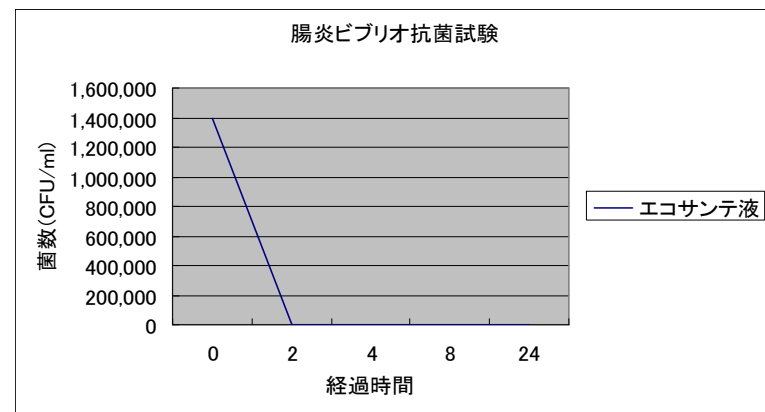
サルモネラ菌抗菌試験



## 腸炎ビブリオ

(社)東京都食品衛生協会 東京食品技術研究所

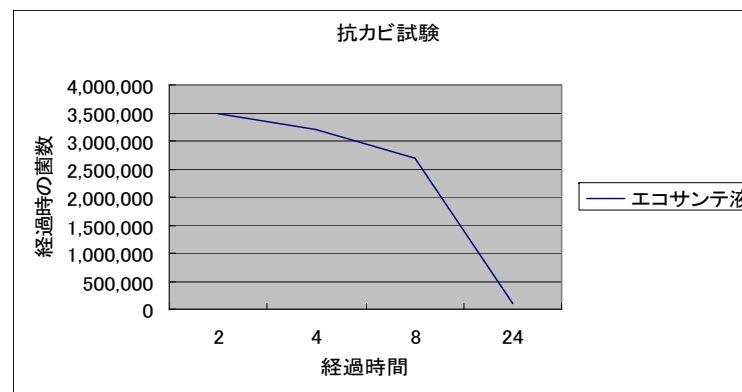
腸炎ビブリオ抗菌試験



## カビ

(社)東京都食品衛生協会 東京食品技術研究所

抗カビ試験



機能性研究 第2ステージ

東京都から技術交流会参加要請

筑波大学が関心を示し共同研究へ

ES大豆発酵生産物  
生理活性試験

平成16年  
産学公・東京技術交流会



## 連携のきっかけ

いつ

2004年12月

どこで

東京技術交流会(東京都庁)東京都産業労働局主催

だれと

筑波大学・技術移転マネージャー 産学官コーディネーター

なにを

ES大豆発酵生産物

なぜ

機能性追及とエビデンスの充実を図るため

どのように

上記マネージャーとコーディネーターに相談し関心のある先生の紹介を受けた

## 筑波大学産学リエゾン共同研究センター



### 産学リエゾン共同研究センターとは

1. 院間からの入社導入などにより、各種支援体制を整備します。
2. 名誉教授や異業種の研究者・技術者OBがシニア・コーディネーター及びシニア・リサーチャーとなつて、その豊富な経験を活かした活動を行います。
3. 近隣の大学・高等専門学校と連携して、企業ニーズに対応的に対応します。
4. 学内の研究組織である大学院研究科体もとより、先端学際領域研究センター (TARA)やベンチャー・ビジネス・ラボラトリー等と連携・協力して研究成果のインキュベーションを行います。

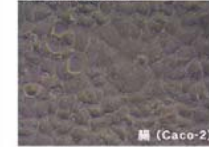
筑波大学との共同研究成果

エコサンテ物産

筑波大学との共同研究成果!  
 “ES大豆発酵生産物の機能性”  
**抗腫瘍アッセイ**

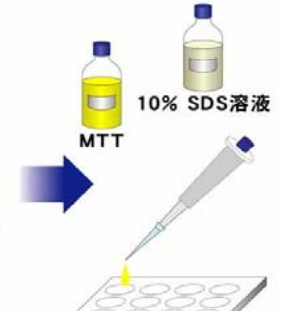
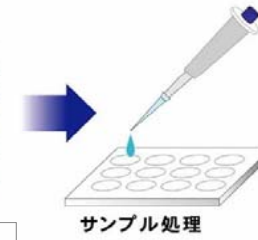


▼がん細胞



腸 (Caco-2)

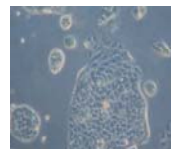
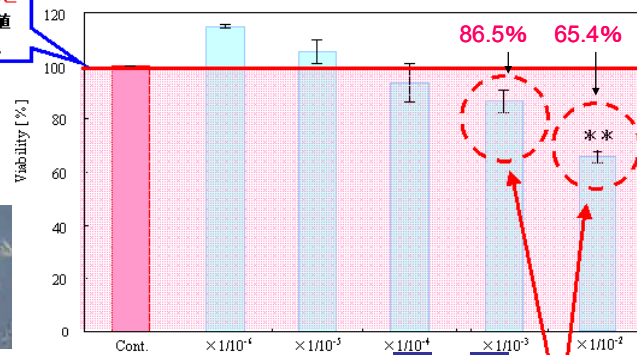
腸がん細胞・Caco-2  
 ヒトの腸管上皮細胞



エコサンテ

腸がん細胞増殖抑制効果

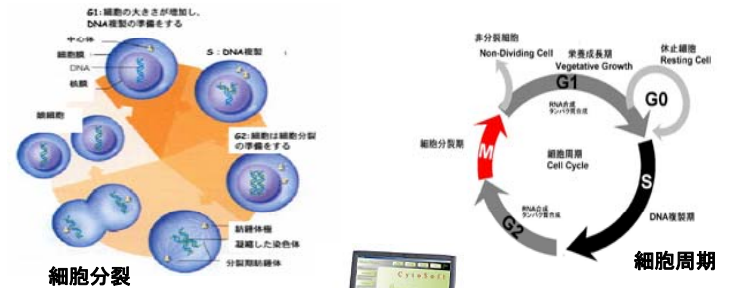
Cont.より低いと  
 がん細胞の増殖  
 抑制効果あり。



腸がん細胞・Caco-2  
 ヒトの腸管上皮細胞

がん細胞の増殖を抑制する。

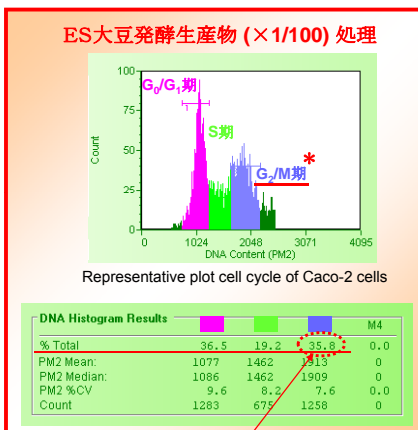
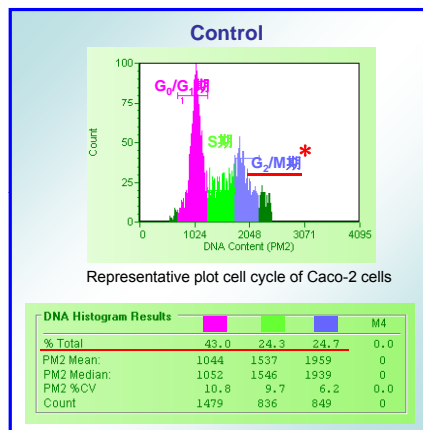
方法



DNAを染色し、細胞周期を評価する。

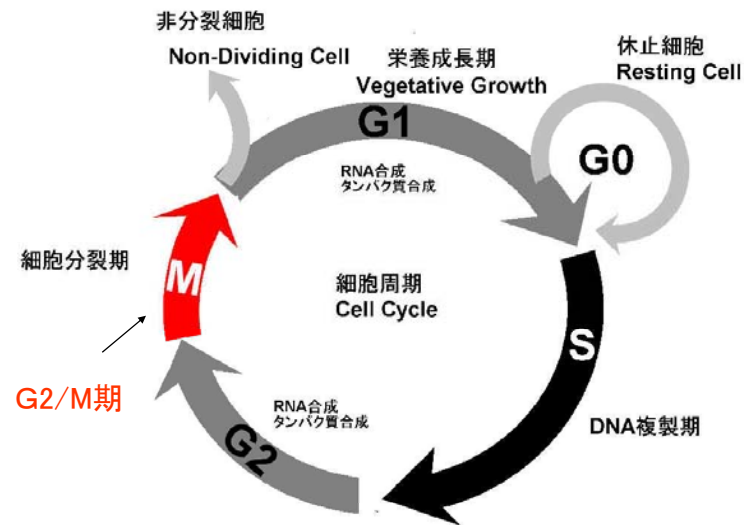


# 結果



G<sub>2</sub>/M期が制御されている！！

# 細胞周期



## 細胞周期G<sub>2</sub>/M期

正常細胞に影響の少ないきわめて適切なもの  
食品機能性としては稀

## シマウマ魚 (ゼブラフィッシュ) 体長5cmほどの小魚





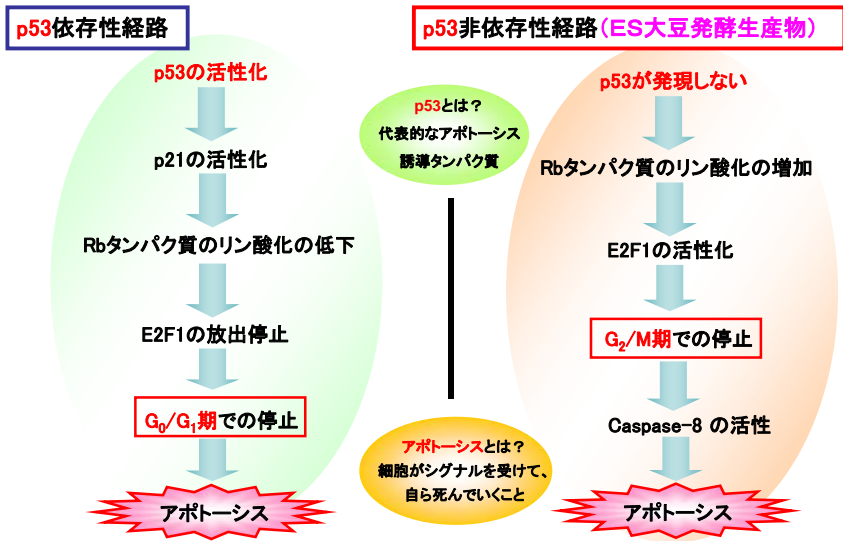
# 結論

ES大豆発酵生産物による大腸がん細胞(Caco-2)における増殖阻害のメカニズムを調べた結果、細胞周期のG<sub>2</sub>/M期で制御されることを見出した。



ES大豆発酵生産物による大腸がん細胞(Caco-2)における増殖阻害効果は、p53非依存性アポトーシスによるものと考えられる。

# アポトーシス誘導メカニズム



# 第1次～第2次共同研究 ES大豆発酵生産物研究の総括

**実験①**

ES大豆発酵生産物で処理した大腸がん細胞の増殖率

**結果①**  
ES大豆発酵生産物による大腸がん細胞の増殖抑制

**そのメカニズムは?**

**実験②**

ES大豆発酵生産物で処理した大腸がん細胞の細胞周期

**結果②**  
大腸がん細胞のG<sub>2</sub>/M期を制御

**予想されるメカニズム**

左側のような経路を介して大腸がん細胞の細胞周期をG<sub>2</sub>/M期で制御

アポトーシス誘導

がん細胞増殖の抑制

# 月刊フードケミカル 2006年12月号

## 大豆発酵生産物の大腸がん細胞増殖抑制効果とそのメカニズム

韓 駿奎\*, 新井 行雄\*\*, 磯田 博子\*  
Hase Junkyu, Arai Yukio, Isohda Hiroko  
\*筑波大学大学院生命環境科学研究科, \*\*(有)エコサンテ特許

1. はじめに  
現在、日本の健康食品市場は1兆円を遙かに超え、多くの機能性食品が発売されており、特に、高齢化社会におけるQOL (Quality of Life) の向上のためのさまざまなサプリメント、健康飲料などの開発に大きな関心が寄せられている。従来一長有短である日本は超一人当たり的大豆消費量が多い国の一つである。また、日本は古くから大豆を用いる独自の食文化、特に、発酵した大豆を食する文化を持っている。  
〔有)エコサンテ社は大豆発酵機能性食品に着目し、1992年から研究・開発して商品化(商品名: ES大豆発酵生産物)に至った。  
その製造工程を簡単に示すと、大豆→豆乳→豆乳に脱脂の乳脂層を結着(写真1-①)→脱脂タンクで発酵(写真1-②)→ろ過で熟成(写真1-③)→加熱殺菌→ろ過精製の工程で完成となる。  
このES大豆発酵生産物の製造には3年間の長い工程が必要であり、さらに〔有)エコサンテ社独自の乳酸菌調合の環境下で発酵させることによりES大豆発酵生産物が生成できる。また、このES大豆発酵生産物にはさまざまな生理活性成分が含まれていることが考えられる。

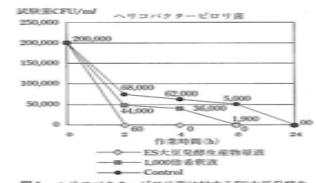


写真1 ES大豆発酵生産物の生産過程

機能性研究 第3ステージ

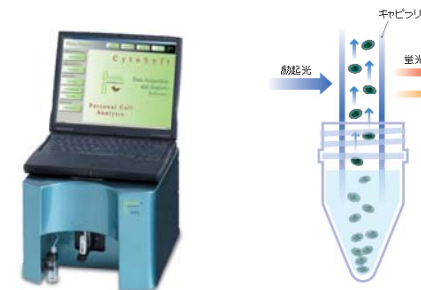
ES大豆発酵生産物  
アポトーシス誘導作用はあるのか？！

筑波大学との共同研究

アポトーシス誘導作用の試験

フローサイトメトリーを用いた  
MultiCaspase Assay

フローサイトメトリー法とは、対象の細胞を流体中に分散させ、その流体を細く流して、個々の細胞を光学的に分析する手法



MultiCaspase assay

- 細胞がアポトーシスのどの期に存在するかを測定
  - 2種類の蛍光試薬で染色し、その染まり具合から判断する
  - SR-VAD-FMK
    - » 細胞浸透性。アポトーシスで活性化するmultiple caspaseと共有結合する。得られるシグナルは、細胞に存在する活性化カスパーゼ酵素の数と比例する
  - 7-AAD
    - » 膜構造の完全性指示薬。生細胞、健康な細胞の細胞は染まらない
- 以下の表のように、判断する

staining	SR-VAD-FMK		
7-AAD	○	×	○
	○	Dead	Apoptosis
	×	Live	Apoptosis



アポトーシス細胞の継時的変化

・コントロール

処理時間 (h)	生細胞	アポトーシス細胞	死細胞
6	86.11%	11.11%	2.78%
12	92.71%	3.82%	3.47%
24	86.55%	12.18%	1.26%
48	84.21%	14.03%	1.75%
72	81.98%	12.17%	5.86%

MultiCaspase Assay

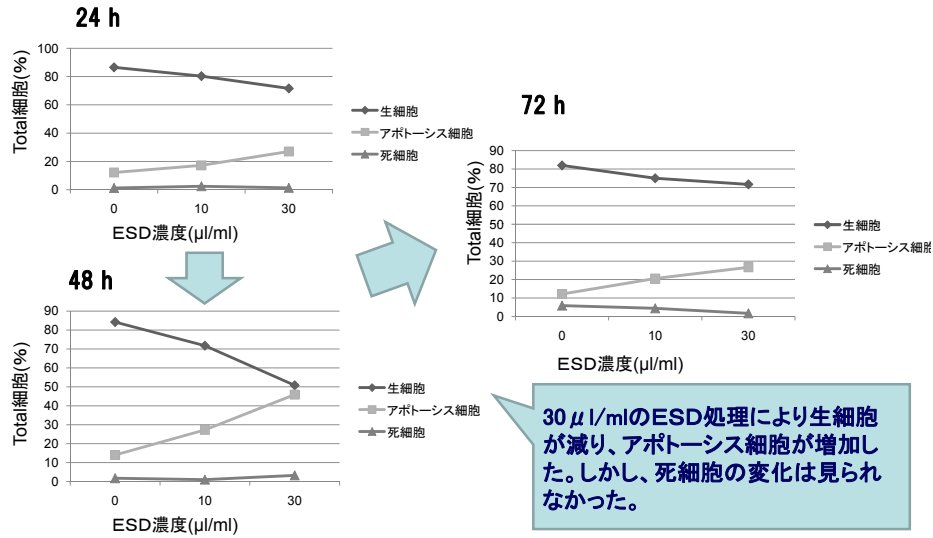
・10 μl/ml ESD処理

処理時間 (h)	生細胞	アポトーシス細胞	死細胞
6	78.77%	12.33%	8.90%
12	86.32%	7.55%	6.13%
24	80.33%	17.21%	2.46%
48	71.72%	27.27%	1.01%
72	75.00%	20.58%	4.41%

・30 μl/ml ESD処理

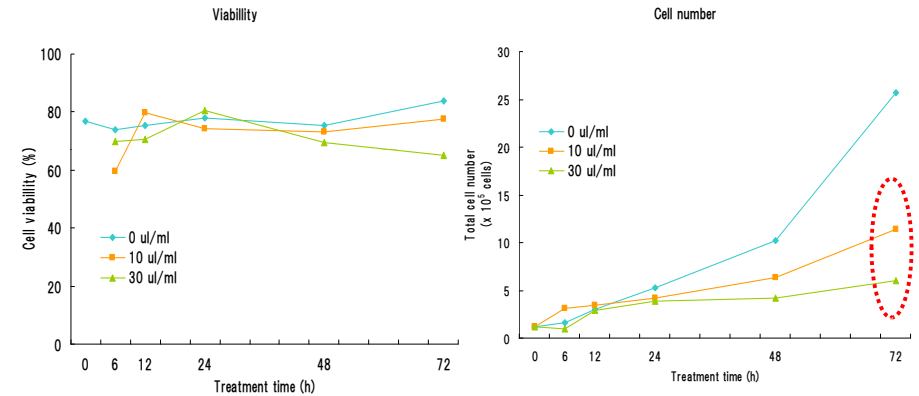
処理時間 (h)	生細胞	アポトーシス細胞	死細胞
6	86.31%	9.78%	3.91%
12	85.55%	8.67%	5.78%
24	71.62%	27.03%	1.35%
48	50.82%	45.91%	3.28%
72	71.67%	26.66%	1.67%

アポトーシス細胞の経時的変化 グラフ化



細胞生存率&細胞数

measured by Guava



MultiCaspase Assay 実験の結論

- ・長い処理時間(10 μl/ml ESD48,72h処理;30 μl/ml ESD12,48,72h処理)においてアポトーシス細胞が著しく増加する傾向が見られた。
- ・Caco-2細胞生存率においてコントロールの細胞生存率と比べ、ESD処理による影響は見られなかった。
- ・Caco-2細胞数においてコントロールは細胞数が増加するのに対し、ESD処理においては、濃度依存的に細胞数の増加が鈍くなった。

ESDによるヒト由来大腸がん細胞に対する抑制効果はアポトーシス細胞を誘導することや細胞分裂を抑制することによるものと考えられる。

機能性研究 第4ステージ

ES大豆発酵生産物  
活性物質は何なのか？！

筑波大学との共同研究

## 同定・単離試験

ES大豆発酵生産物からの大腸がん増殖抑制活性を指標として、活性物質の単離および同定を目的として実験を行った

### 同定・単離試験

Fig.1 ES大豆発酵生産物(ESD)の分離スキーム

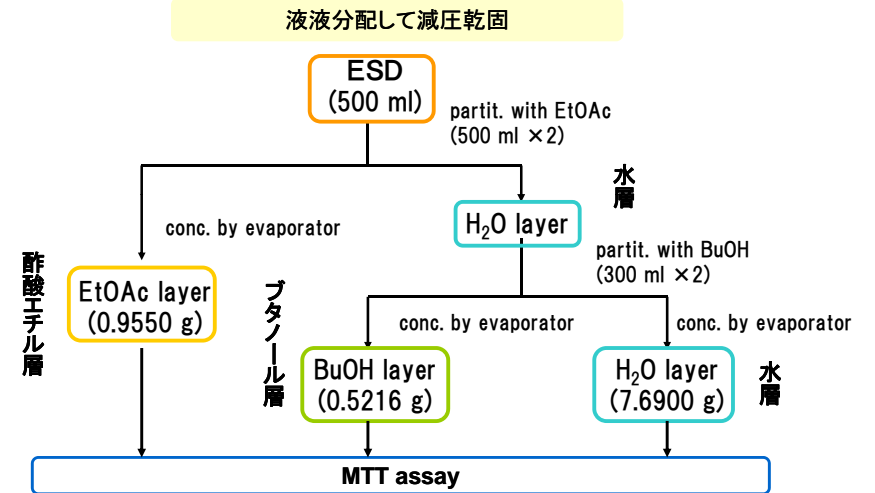


Fig.2 MTT法によるスクリーニング1  
酢酸エチル層、ブタノール層、水層の大腸癌細胞増殖抑制活性  
(コント100%とした場合の相対値)

Cell: Caco-2 (2 x 10<sup>3</sup> cells / well)  
Sample: EtOAc (E), BuOH (B), H<sub>2</sub>O (W) Treatment time: 72 h  
Solvent of samples: EtOH Sample conc.: 0.1, 1.0, 10 μg / ml

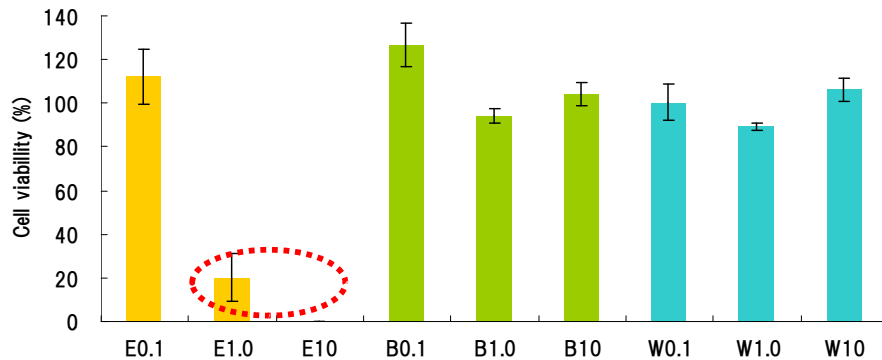
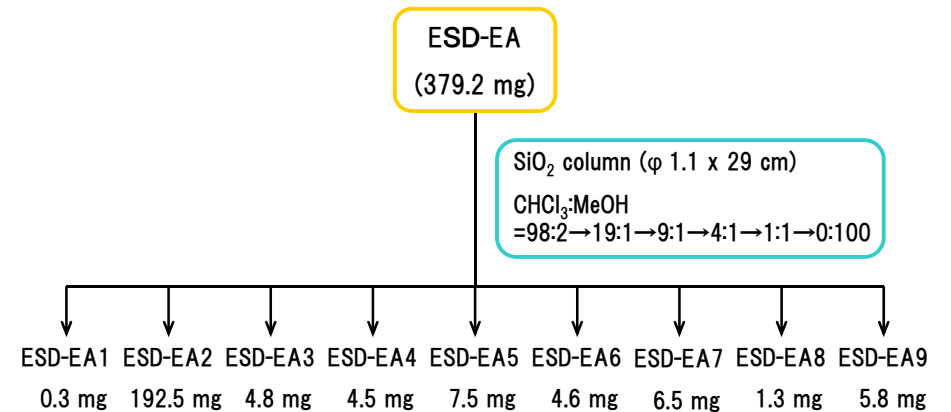


Fig.3 ESD-EAの分離スキーム

シリカゲルカラムクロマトグラフィにより分画



## 最終的に4つの物質を同定

hexanoic acid(ヘキサノイックアシド、ヘキサン酸)

genistein(ゲニステイン)

daizein(ダイゼイン)

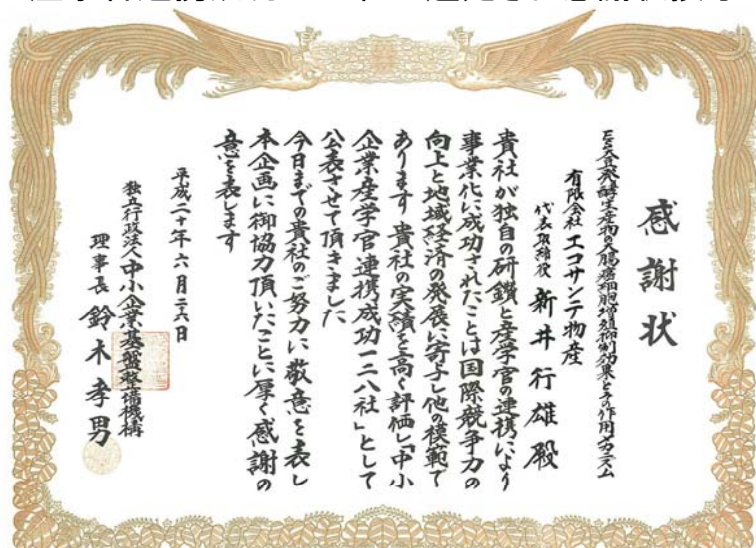
その他

## これまでの総括

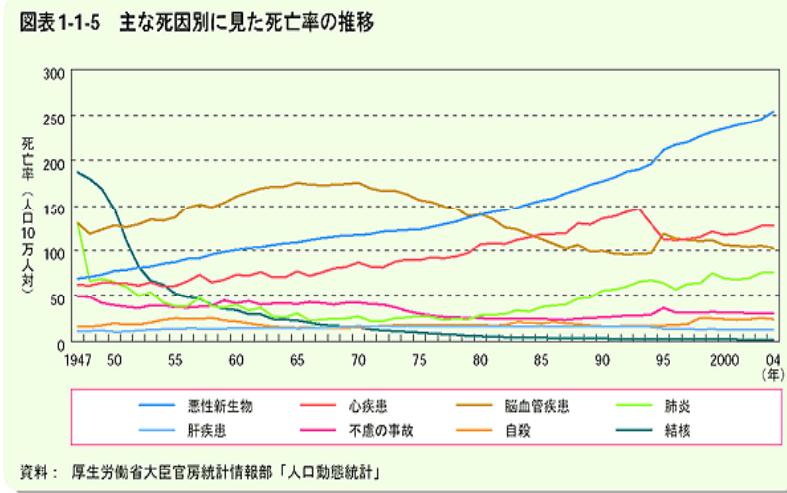
### ES大豆発酵生産物の生理活性に関する研究

1. 大腸がん細胞増殖抑制効果を確認
2. そのメカニズムは？
3. 大腸がん細胞の細胞周期G2/M期抑制
4. アポトーシス誘導作用が推察？
5. アポトーシス誘導作用を確認
6. 活性物質の同定
7. hexanoic acid(ヘキサノイックアシド、ヘキサン酸)
7. genistein(ゲニステイン)
7. daizein(ダイゼイン) その他

## 産学官連携成功128社に選定され感謝状授与



## 主な死因別に見た死亡率の推移



## 本日皆様にお伝えしたこと

大豆由来で大腸がん細胞に直接作用



抗がん剤等との併用、又はESのみで数々の症例



昨年末より都内総合病院で臨床試験開始

### 注意！

この発表は弊社研究食品素材の発表であり、  
(創造法事業・SBIR事業の研究成果)、商品説明ではありません

## 課題・募集

遺伝子レベルでの解明

免疫産性能に及ぼす影響

医療機関とのマッチング

その他個人レベルでも関心がありましたらお問い合わせください

## エコサンテ物産

## ES大豆発酵生産物を使用 健康食品〈エコサンテ液〉



1ヶ月～5ヶ月分 価格:21,000(税込み)

20CC×4本

## エコサンテ液の問題点

発酵食品のため独特な発酵臭がある。

しかし！

発酵臭に力のあることを筑波大学との共同研究で確認

飲みやすさより  
力・質を優先



## 健康食品エコサンテ液の公的支援・評価

17年度 市場開拓支援助成事業に採択  
健康食品として初の採択

18年度 市場開拓支援助成事業に採択  
2年連続は全業種含め数社程度

(財)東京都中小企業振興公社

22年～ 区内公共施設(江東区産業会館)に常設展示  
健康食品として唯一

江東区

## 江東区産業会館 常設展示の様子



## 江東区産業会館 常設展示の様子



今後の予定

厚生労働省が募集する

「がんの代替医療における有効症例の調査研究」申請を予定

エコサンテ物産



ECOSUNTE

近畿圏での協力者を募集中です

エコサンテ液にご関心を頂いた皆様  
またご質問などある方々

終了後、お声をかけてください

エコサンテ物産

## 第53回近畿アグリハイテクシンポジウム 第3回大豆研究会シンポジウム

弊社は今後とも科学的根拠の充実を図って参ります

ご清聴頂きまして誠に有難うございます

ECOSUNTE

2011年3月10(木)  
主催:近畿アグリハイテク 農林水産省  
会場:京都メルパル  
エコサンテ物産