

平成28年度

戦略的基盤技術高度化・連携支援事業

戦略的基盤技術高度化支援事業

「ソバ発酵技術を利用した血圧降下作用を有する

機能性食品素材の開発」

研究開発成果等報告書

平成29年3月

担当局 関東経済産業局

補助事業者 株式会社信州 TLO

目 次

第1章 研究開発の概要

- 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標
- 1-2 研究体制
- 1-3 成果概要
- 1-4 当該研究開発の連絡窓口

第2章 本論

- 【1】発酵キョウバク製造方法の確立と規格化
 - 【1-1】生産プロセスの確立
 - 【1-2】有効成分に基づく規格設定
 - 【1-3】粉末化プロセスの確立
 - 【1-4】試作品製造
- 【2】安全性、有効性の確認
 - 【2-1】安全性試験
 - 【2-2】有効性の確認
- 【3】降圧特性の解明
 - 【3-1】テレメトリー法による降圧特性の解明
 - 【3-2】昇圧関与物質および炎症関与物質定量による降圧特性の解明
- 【4】市場調査

第3章 全体総括

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

本事業では、極めて低用量で降圧作用を示すソバspraut乳酸発酵物・発酵キョウバク（図1）の実用スケールでの製造方法確立、規格設定などの課題を解決し、革新的で安価な抗高血圧食品開発を目指す。

【図1】発酵キョウバク



[従来技術]

血圧が高めの方に適した特定保健用食品や機能性表示食品が市販されているが、抗高血圧食品を利用した高血圧予防は実現できていないのが現状である。高血圧予防効果が十分認識されず、価格とのバランスがとれていないため、市場形成が不十分なことが理由の一つと言える。

[新技術]

発酵キョウバクは、十分な食経験のあるソバを伝統的な乳酸発酵で加工した食品であり、また従来品の100分の1（0.01mg/kg）の有効用量を実現できる。よって、低価格な高血圧予防食品の開発が可能であり、国内はもとより海外へも展開が期待される。

1-2 研究体制

事業管理機関：株式会社信州 TLO

研究組織：大和薬品株式会社、国立大学法人信州大学

- ・総括研究代表者 大和薬品株式会社 猪狩直樹
- ・副総括研究代表者 国立大学法人信州大学 准教授 中村浩蔵、研究員 小山正浩

1-3 成果概要

1 発酵キョウバク製造方法の確立と規格化

製造上課題となっていた固液分離について検討し、収率 76.5%、固形分の混入が少ない良好な方法を見出した。また、信州大学中村研究室のアイディアに基づき、培養条件検討により、コリンエステル 2,848 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ という高含量の発酵キョウバクが得られた。さらに、濃縮、粉末化条件を検討し、コリンエステルの低減がほとんどない良好な粉末が得られ、試作品を製造した。

②安全性、有効性の確認

【表1】安全性試験の結果

試験項目	結果
単回投与毒性試験	異常なし LD ₅₀ =5,000mg/kg以上
反復投与毒性試験 (90日間)	一般状態, 体重, 摂餌量, 血液・生化学検査、 病理解剖, 病理組織検査異常なし NOAEL(無毒性量)=2,000mg/kg/日
復帰突然変異試験 (Ames試験)	陰性
アレルギーテスト	ソバアレルギー陰性

安全性試験により発酵キョウバクの安全性を確認した(表1)。そこで、関与成分であるコリンエステル含量を基準に作製した液体サンプルを用いてヒト試験を実施した。試験はダブルブラインドとし、プラセボ群、極低用量群、低用量群、中用量群、高用量群の5群、各群12名、摂取期間4週間とした。試験の結果、群内比較で極低用量群、中用量群に収縮期血圧の有意な低下が認められた。さらに、粉末化した発酵キョウバクを用いてヒト試験を実施した。試験デザインはダブルブラインド、プラセボ対照並行群間試験で、被験者数および投与期間は、対照群、低用量群、高用量群の3群、各群18名、投与期間8週間とした。摂取前、4週後、8週後ならびに12週後に医療機関で血圧測定を実施した。さらに、被験者の自宅を毎日血圧を測定した。試験の結果、医療機関における血圧について収縮期、拡張期ともに対照群と低用量群、対照群と高用量群の間で有意な差は認められなかった。また、群内での比較においても、低用量群、高用量群の開始時と4週目および開始時と8週目の血圧に有意な差は認められなかった。自宅における血圧については、群間比較で有意な差は認められなかったが、群内の比較で高用量群の拡張期血圧については1週目平均と5週目~7週目平均の間に有意な低下が認められた。なお、本ダブルブラインド、プラセボ対照並行群間試験は、試験不適合者の排除、プラセボ群の血圧に問題があった可能性を排除できず、この結果で効果は検証できないものとなった。

③降圧特性の解明

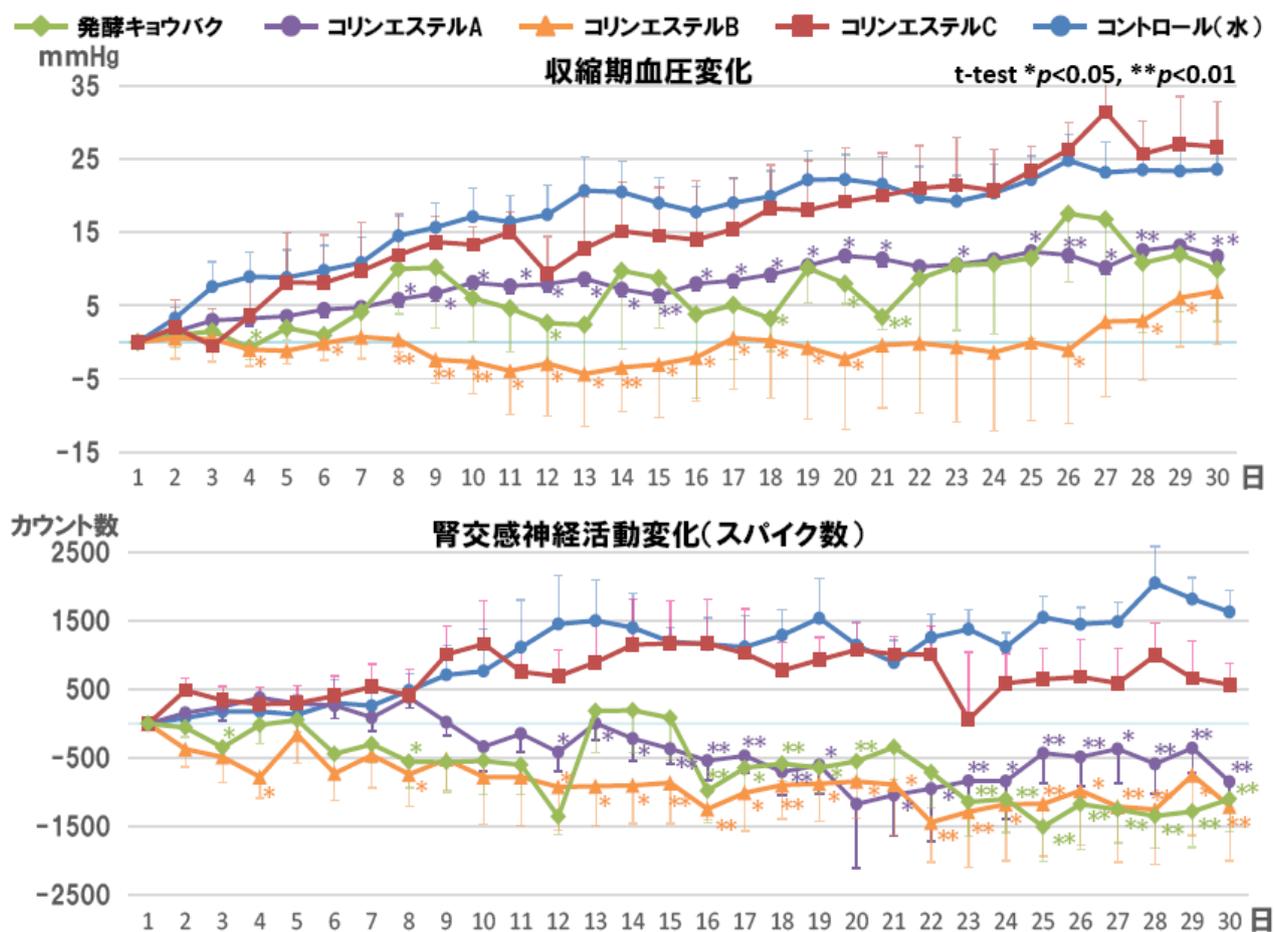
[ラクトイルコリンの単離・同定]

ラクトイルコリンをアセチルコリンと共に発酵キョウバクから単離した(K. Nakamura, et al. Food Chem., 201, 185-9, 2016)。ラクトイルコリンの天然物からの単離は世界で初めてである。

[テレメトリー法による降圧特性の解明]

我々は、国内で他に例がない高血圧自然発症ラット（SHR）へのテレメトリーセンサー埋込法を確立し、血圧および腎交感神経活動の同時取得を可能にした。腎交感神経活動の亢進は、副腎から昇圧物質であるカテコールアミンの放出を引き起こすとともにレニンアンジオテンシン系を活性化し、血圧を上昇させる。そこで、手術済 SHR に、発酵キョウバクおよび関与成分であるコリンエステル（知財保護のため以下、コリンエステル A、B、C とする）を反復経口投与した結果、発酵キョウバクだけでなくコリンエステル A および B も有意な血圧上昇抑制作用と 腎交感神経活動低下作用を示した。つまり、発酵キョウバクは腎交感神経活動を抑制することで血圧を低下させ、その作用にこれらのコリンエステルが関与していることを明らかにした（図2）。

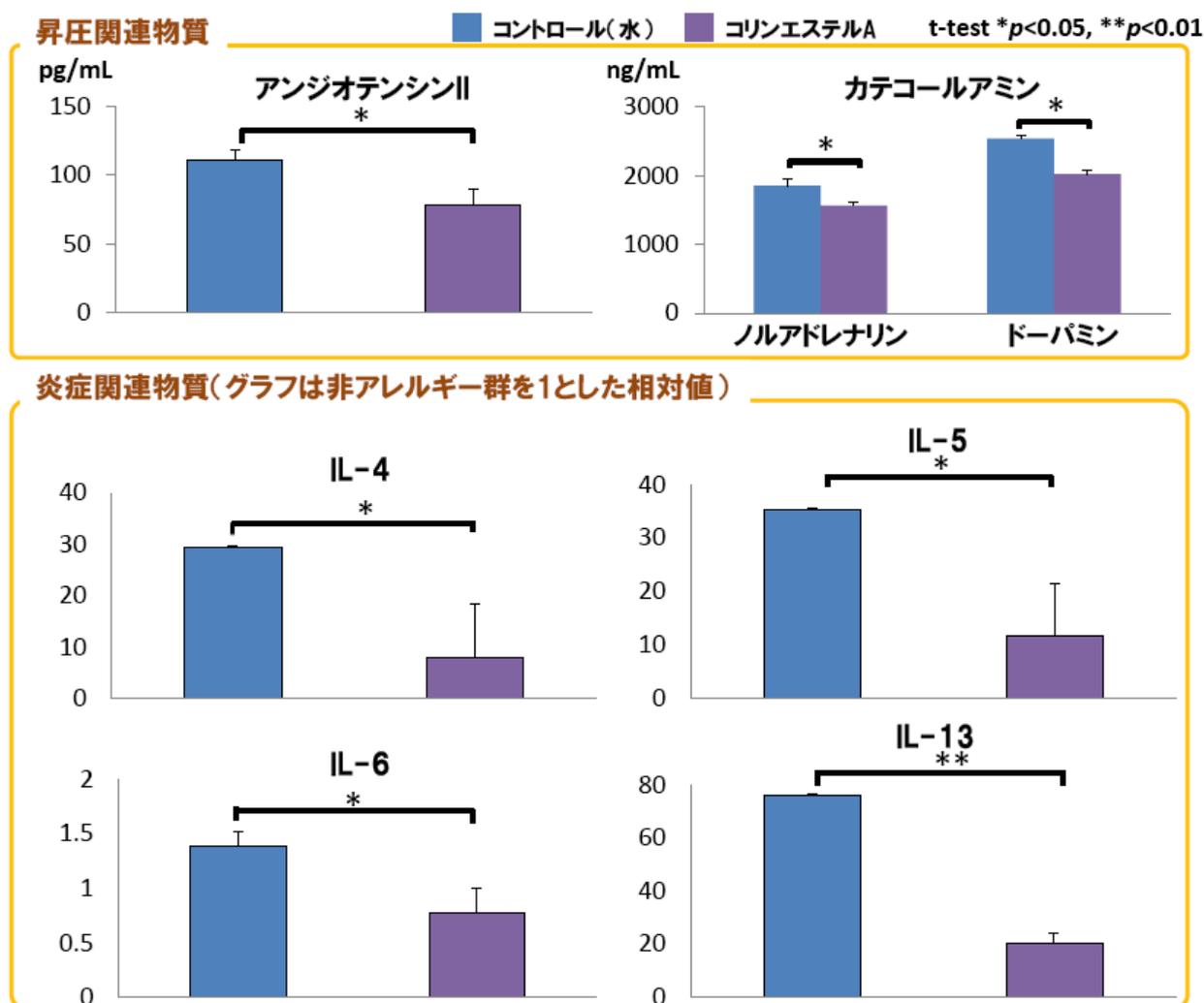
【図2】 経口投与試験の結果



[昇圧物質および炎症物質定量による降圧特性の解明]

関与成分のうちコリンエステル A を SHR へ反復経口投与した結果、昇圧物質であるカテコールアミンおよびアンジオテンシンIIが有意に低下していた（図 3）。つまり、コリンエステル A 経口摂取による交感神経活動低下が昇圧物質生成を抑制し、血圧低下を引き起こすことが明らかとなった。また、アレルギーマウスへのコリンエステル A 経口投与は 4 種の炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルを有意に低下させ（図 3）、コリンエステル経口摂取による抗炎症作用の可能性を見出した。

【図3】昇圧物質および炎症物質の定量結果



4 市場調査

米国：人口の30%が高血圧（約6,700万人）であり、高血圧対策を訴求したサプリメントは膨大な数が販売されているが、食品由来成分を関与成分とした商品は少ない。

国内：人口の47%が、高血圧（約4,000万人）または高血圧予備軍（約2,000万人）であり、2015年度の血圧にかかわる特定保健用食品市場が169億円である。

発酵キョウバクは天然物かつ少量で降圧効果が期待でき、関与成分の食経験が豊富であるため、競合品と比べて安全性およびコストパフォーマンスの点で優位性を持つ。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

株式会社信州 TLO 技術移転グループ 篠塚由紀

電話：0268-25-5181 FAX：0268-25-5188 E-mail：sinozuka@shinshu-tlo.co.jp

第2章 本論

【1】発酵キョウバク製造方法の確立と規格化

【1-1】生産プロセスの確立

(平成 26 年度分)全量約 60kg のソバ発酵エキスから 45.9kg の液体発酵キョウバクが得られ(収率 76.5%)、固形分の混入もほとんどなく良好な結果であった。

【1-2】有効成分に基づく規格設定

(平成 26 年度)当初予定より遅れて今年度 3 ロットの試作となった。

(平成 27 年度分)発酵キョウバクの関与成分であるコリンエステル類の高血圧自然発症ラット(SHR) 反復経口投与試験結果をヒトへ外挿して設定した有効用量 24.4 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ およびヒト用量試験の有効用量 25 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ から、発酵キョウバク含有食品の規格を、一日一人分の商品にコリンエステル類を 25 μg 含有するものと設定し、規格を設定した。発酵キョウバクは、昨年度の中間評価後に 3 回実機試作をおこなった。培養条件は以前と同様であったが、コリンエステル含量が低く(300~600 $\mu\text{g}/100\text{mL F.W.}$) 改善が必要となった。ソバスプラウトの生育条件、使用部位、培養温度について培養条件を再度検討し、実機試作を 2 回おこなったところ、2 回目の実機試作でコリンエステル含量が比較的高い発酵キョウバク(1,050 $\mu\text{g}/100\text{mL F.W.}$) が製造ができた。

(平成28年度分)培地への糖の添加や通気条件の検討といった培養条件の検討をおこなった。その結果、一般的な乳酸菌培養条件とは異なる条件で培養期間10日間でコリンエステル類2,848 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ という高含量の発酵キョウバクを得ることができた。乳酸菌の生菌数は4日目以降はほぼ一定であるが、コリンエステル類は10日目まで上昇した。このことから、乳酸菌の生育が定常期に入ったのちも代謝産物としてコリンエステル類が産生されていることがわかった。低価格の機能性食品を開発するという目標のためには、培養期間を3~4日間に短縮する必要がある。そのため、さらなる培養条件の検討が必要である。

表.発酵キョウバク培養期間とコリンエステル類含有量および乳酸菌生菌数

	培養期間					
	0日	2日	4日	6日	8日	10日
コリンエステル類 ($\mu\text{g}/100\text{mL F.W.}$)	10	173	532	1,286	1,784	2,848
乳酸菌生菌数 (cfu/mL)	3.1×10^6	7.1×10^8	1.4×10^9	1.2×10^9	1.3×10^9	1.1×10^9

【1-3】粉末化プロセスの確立

(平成 26 年度)スプレードライ条件を検討し試作品を製造した。条件を 2 つ設定しスプレードライしたが、どちらの試作品もコリンエステル含有量が凍結乾燥したものより低いことが明らかとなったため、粉末化条件のさらなる検討が必要となった。

(平成 27 年度分)発酵キョウバク(Lot No. 150610)をもちいて、凍結乾燥およびスプレードライにより粉末化を試み、コリンエステル類の含量を比較した。その結果、アセチルコリン含量に着目した場合は、粉末化には凍結乾燥、スプレードライともに利用可能と考えられる。コスト的にはスプレ

ードライの方が有利であるが、スプレードライでは、雑菌増殖を防ぐため溶液を高温に保つことが多く、大量に製造する場合には長時間に及ぶため今回の結果よりもアセチルコリンは低下すると考えられる。また、ラクトイルコリンは、スプレードライでは凍結乾燥に比べ大きく低下した。これらのことから、凍結乾燥による粉末化をおこなうこととした。

(平成 28 年度分) 凍結乾燥においても濃縮が必要なため、濃縮時の温度について検討した。また、濃縮率により粉末の性状に影響があるため、濃縮率についても検討した。そうした検討を経て、液体発酵キョウバクを 5 倍に濃縮し、90°C、10 分間加熱処理により殺菌後、固形分の 10%のデキストリンを添加溶解し凍結乾燥した。その結果、濃縮、粉末化工程でのコリンエステル類の低減はほとんど見られず、良好な結果であった。

【1-4】試作品製造

(平成 26 年度分) スクリュープレスの納入が遅れたが、培養後の固液分離が可能となり、粉末までの試作製造をおこなうことができた。

(平成 27 年度分) 500L 培養槽を用いた試作により、コリンエステル類含有量 1,050 $\mu\text{g}/100\text{g}$ の発酵キョウバク (Lot No. 150826) を得た。この液体発酵キョウバクを用いてドリンクを試作し、ヒト試験を実施した。

(平成 28 年度分) 製品化には成分の安定性、雑菌増殖リスク、輸送、保管などの点で粉末が有利である。そこで、濃縮、粉末化の検討をおこない、培養液から濃縮、乾燥により粉末を得た。コリンエステル類が熱により低減する可能性があるため、温度条件について慎重に作業を実施したところ、濃縮、粉末化工程でのコリンエステル類の低減はほとんど見られず、良好な結果であった。この粉末を用いて顆粒を試作し、ヒト試験を実施した。

【2】安全性、有効性の確認

【2-1】安全性試験

(平成 26 年度分) 変異原性試験 (Ames 試験) の結果は陰性であった。90 日反復毒性試験で NOAEL は 1,000mg/kg 以上と考えられる。

(平成 27 年度分) 発酵キョウバク (Lot No. 150826) のソバアレルギー検査を実施し、結果は陰性であった。

(平成 28 年度分) 用量 5 倍量のヒト過剰摂取試験を実施する予定であったが、新たに発生した別の課題を優先した。詳細は【2-2】参照。

【2-2】有効性の確認

(平成 27 年度分) 関与成分であるコリンエステル含量を基準に作製した液体サンプルを用いてヒト試験を実施した。試験はダブルブラインドとし、プラセボ群、極低用量群 (コリンエステル類 1.5 $\mu\text{g}/\text{日}$)、低用量群 (12.5 $\mu\text{g}/\text{日}$)、中用量群 (25 $\mu\text{g}/\text{日}$)、高用量群 (100 $\mu\text{g}/\text{日}$) の 5 群、被験者は医療機関における血圧が正常高値血圧 (収縮期血圧 130 以上 140mmHg 未満かつ/または拡張期血圧 85 以上 90mmHg 未満) および軽症 (I 度高血圧) (収縮期血圧 140 以上 160mmHg 未満かつ

/または拡張期血圧 90 以上 100mmHg 未満)のものとし、各群 12 名、摂取期間 4 週間とした。試験の結果、群内比較で極低用量群、中用量群に収縮期血圧の有意な低下が認められた。

(平成28年度分) 粉末サンプルの製品化は液体サンプルに比べ、成分の安定性、雑菌増殖リスク、輸送、保管などの点で有利である。そのため、粉末化した発酵キョウバクを用いてヒト試験を実施した。試験デザインはダブルブラインド、プラセボ対照並行群間試験で、被験者は医療機関における血圧が正常高値血圧および軽症 (I 度高血圧) のものを選抜した。群分け、被験者数および投与期間は、対照群、低用量群 (コリンエステル類 $2.5\mu\text{g}/\text{日}$)、高用量群 ($25\mu\text{g}/\text{日}$) の3群、各群18名、投与期間8週間とした。摂取前、4週後、8週後ならびに12週後に医療機関で血圧測定を実施した。さらに、被験者の自宅で毎日血圧を測定した。実際の試験では、試験開始時の収縮期血圧が、プラセボ群144.0mmHg、高用量群137.8mmHg、低用量群145.1mmHg、拡張期平均が、プラセボ群86.4mmHg、高用量群89.8mmHg、低用量群92.4mmHgであり、被験群の拡張期血圧がプラセボ群に比べて高い傾向にあり、低用量群はプラセボ群より有意に高値であり ($p=0.003$)、均等な被験者の割り当てが行われなかった。また、高用量群には、試験対象外の血圧値の被験者 (正常血圧者) が混入していた。また、プラセボ群の収縮期血圧値が、試験開始前に比べ試験終了4週間後に有意に低く ($p=0.013$)、プラセボ群での何らかの血圧低下要因を排除できない。試験の結果、医療機関における血圧について収縮期、拡張期ともに対照群と低用量群、対照群と高用量群の間で有意な差は認められなかった。また、群内での比較においても、低用量群、高用量群の開始時と4週目および開始時と8週目の血圧に有意な差は認められなかった。自宅における血圧については、群間比較で有意な差は認められなかったが、群内の比較で高用量群の拡張期血圧については1週目平均と5週目~7週目平均の間に有意な低下が認められた。

今回の試験では医療機関における血圧を主要評価項目とし、自宅での血圧は二次評価項目とした。そのため被験者は医療機関における血圧をもとに選定した。医療機関における血圧 (拡張期、収縮期とも) は自宅に比べ高く、自宅における血圧で考えると、多くの被験者が正常高値血圧あるいは軽症 (I 度高血圧) の範囲からはずれていた。血圧降下作用を有す機能性食品のヒト試験において、医療機関の血圧を主要評価項目にすることが多く、自宅における血圧を主要評価項目とする事例は少ない。そのため、今回の試験デザインに問題はないが、試験不適合者の排除、プラセボ群の血圧に問題があった可能性を排除できず、この試験結果で効果は検証できないものの、自宅での血圧を主要評価項目とし、自宅での血圧をもとに被験者を選定していればより効果を示すことができた可能性がある。

液体発酵キョウバクを用いたヒト試験では、コリンエステル類 $1.5\mu\text{g}/\text{日}$ および $25\mu\text{g}/\text{日}$ 、4週間の摂取で群内比較により収縮期血圧の有意な低下が認められたが、群間比較では有意な差はなかった。本事業で実施したヒト試験では、事前に想定できない問題が発生したため、発酵キョウバクの効果を裏付ける結果を得ることはできなかった。

【3】 降圧特性の解明

【3-1】 テレメトリー法による降圧特性の解明

(平成 26 年度分) 血圧センサーの腹部大動脈への挿入技術法を検討してマニュアルを整備した。

手術が成功した SHR および正常血圧ラットへの単回経口投与試験を行い、SHR における発酵キョウバクおよびコリンエステル類の降圧作用を確認し、心拍変動解析によって副交感神経活動の亢進と交感神経活動の抑制を明らかにした。

(平成 27 年度分) SHR への血圧・交感神経センサー装着技術を確立し、マニュアルを整備した。血圧・交感神経センサー装着手術の成功率は、SHR で 83.3% (成功 20 匹/実施 24 匹) であった。血圧・交感神経センサー装着技術を確立しているのは、我が国には当研究室だけと考えられる (バイオリサーチセンター談)。センサー装着 SHR へ、コリンエステル A 反復経口投与試験 (用量 10^{-8} mol/kg) を行い、加齢による血圧上昇の抑制作用と腎交感神経活動低下を確認した。本試験結果は、経口投与したコリンエステル A が、消化器系に存在するレセプターを刺激することで副交感神経を亢進し、血圧上昇を抑制していると考えられている。本試験で、心拍変動解析によって副交感神経活動と交感神経活動を評価した。

(平成 28 年度分) 昨年度確立したテレメトリーセンサー埋込手術法を用いて血圧・交感神経センサー装着 SHR を作成し、発酵キョウバク (用量 27mg/kg ; アセチルコリン 10^{-8} mol/kg 相当) およびコリンエステル類 (コリンエステル A、B、C ; 各用量 10^{-8} mol/kg) を 30 日間反復経口投与した。その結果、発酵キョウバクだけでなくコリンエステル A および B も収縮期・拡張期血圧上昇抑制作用と腎交感神経活動低下作用を示した。つまり、コリンエステル類が、発酵キョウバクの交感神経活動低下に伴う血圧上昇抑制作用を担っていることが明らかとなった。すなわち、血圧降下の作用メカニズムが、口腔や食道を含む消化管内壁のレセプターを介すると考えられた。また、アセチルコリンと共に発酵キョウバクからラクトイルコリンを単離した (K. Nakamura, et al. Food Chem., 201, 185-9, 2016)。ラクトイルコリンの天然物からの単離は世界で初めてである。

【3-2】昇圧関与物質および炎症関与物質定量による降圧特性の解明

(平成 26 年度分) カテコールアミン類 (アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミンなど) の定量法を検討した。血液に含まれる極微量のカテコールアミン類を定量する方法を電気化学検出器および質量分析計 (LC-MS/MS) で検討し、ラット血液 1mL 中約 5pg のカテコールアミン類が定量できる技術を確立した。また、採血のための頸静脈へのカテーテル挿入技術を確立した。これらの技術を利用して、SHR へ発酵キョウバク (0.1mg/kg) およびコリンエステル類 (10^{-9} mol/kg) を単回経口投与し、最大血圧低下が確認される投与 9 時間後に採血を行い、交感神経活動に関与する昇圧物質であるカテコールアミン類のうちノルアドレナリンの血中濃度を定量した。その結果、発酵キョウバクおよびコリンエステル類投与により血中ノルアドレナリン濃度の有意な低下または有意差はないものの低値を示した。

(平成 27 年度分) コリンエステル A の抗炎症作用について検討した。炎症は外来および内在ストレスへの生体防御反応であるが、過剰な反応は疾病の原因となる。そこで、BALB/c マウスへコリンエステル A を 10^{-6} mol/kg 用量で 4 週間反復経口投与し、経口投与開始 1 週間後に、1 次感作としてオボアルブミン (OVA、100 μ g)、水酸化アルミニウムアジュバンド (2 mg) をリン酸緩衝食塩水 (200 μ L) で懸濁した懸濁液を腹腔内注射し、経口投与開始 3 週間後に 2 次感作を 1 次感作と同様に行った。

試験終了後、摘出脾臓から作成した培養細胞中のサイトカイン(インターロイキン(IL)-4、IL-5、IL-6、IL-13、IFN- γ)の発現量および血清中の免疫グロブリン E (IgE) 量を定量した。その結果、コリンエステルA経口投与は、培養脾細胞の2型ヘルパーT細胞型サイトカインであるIL-4、IL-5、IL-13および炎症サイトカインIL-6の遺伝子発現レベルを有意に低下させた。しかしながら、血清IgE量に減少傾向が見られたものの、有意差はなかった。培養脾細胞培養上清中のサイトカイン23種類を、Bio-PlexMAGPIXシステムで一斉定量した結果、コリンエステルA経口投与群で炎症サイトカインIL-6、TNF- α の有意な低下が見られた。これらの試験で、抗炎症試験法を習得、コリンエステルA経口投与の抗炎症作用の可能性を見出すことができた。

(平成28年度分)コリンエステルA中長期投与によるカテコールアミン類(ノルアドレナリン、アドレナリン)および昇圧ペプチド(アンジオテンシンII)の変化について検討した。10週齢SHR(n=6)を代謝ケージで飼育し、コリンエステルAを 10^{-8} mol/kg用量で30日間反復経口投与した。投与期間中は、収縮期・拡張期血圧の測定および尿中カテコールアミン定量、投与期間終了後は血中アンジオテンシンII定量を行った。その結果、コリンエステルA経口投与により血圧上昇が抑制されると共に尿中ノルアドレナリン濃度が純水投与群と比較して有意に低下し、血中アンジオテンシンIIも有意に低下した。つまり、コリンエステルA経口摂取による交感神経活動低下が昇圧物質生成を抑制し、血圧低下を引き起こすと考えられた。

【4】市場調査

国内および米国における発酵キョウバクの市場性について調査した。市場情報は、国内はグローバルニュートリショングループ、米国はBakerDillonGroupから入手した。

米国：人口の30%あまりの6,700万人が高血圧であり、高血圧対策を訴求したダイエタリーサプリメントは膨大な数が販売されている。しかし、食品由来成分を関与成分とした商品は少なく、競合と考えられるのはカルピス(株)が販売している乳発酵飲料由来のAmealPeptideと考えられた。

国内：人口の47%の約6,000万人が血圧が高め以上(高血圧者約4,000万人、高血圧予備軍約2,000万人)であり、降圧剤市場が8,500億円(2013年度、高血圧治療)、血圧にかかわる特定保健用食品(血圧トクホ)市場が169億円(2015年度、高血圧予防)である。今後、高齢化により、高血圧は国内外問わず増加する見込みであり、高血圧予防食品市場は拡大すると考えられる。競合品である血圧トクホ市場は、上位3ブランドで73%のシェアを占めていた。しかし、今年9月に売上第2位(シェア19%)の日本サプリメント(株)が、関与成分が不含ままたは表示用量に満たないという食品表示法違反の疑いでトクホが取り消されて市場から撤退し、血圧サプリメントのビジネスチャンスが到来している。

AmealPeptideをはじめ、血圧トクホの関与成分は多くがアンジオテンシンI変換酵素(ACE)阻害ペプチドであり、次いで γ アミノ酪酸(GABA)である。ACE阻害ペプチドは空咳、GABAは動悸、息切れといった副作用が報告されている。発酵キョウバクは天然物で少量で降圧効果が期待できる特徴があり、関与成分であるコリンエステル類は食経験のある成分である。そのため、発酵キョウバク

は競合品と比べて、安全性および効果が高いという点で優位である。

第3章 全体総括

●複数年の研究開発成果

関与成分に基づく規格設定については、コリンエステル類 2,848 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ という高含量の発酵キョウバクを得ることができたが、培養期間短縮という課題が残った。試作品製造については、濃縮、粉末化工程でのコリンエステル類の低減がほとんどない粉末を得ることができた。90 日反復投与毒性試験、復帰突然変異試験（Ames 試験）、ソバアレルギーの検査を実施し、安全性を確認した。過剰摂取試験については、用量が決まっていないため実施しなかった。有効性の確認については、ヒト試験で事前に想定できなかった様々な問題が生じたため、発酵キョウバクの有効性を裏付ける結果が得られなかったが、今後につながる貴重な知見が得られた。テレメトリー法による降圧特性の解明については、国内で初めて血圧・交感神経センサー同時装着技術を確立したうえで、コリンエステル類が、発酵キョウバクの交感神経活動低下に伴う血圧上昇抑制作用を担っていることが明らかにした。また、その作用メカニズムが、口腔や食道を含む消化管内壁のレセプターを介すると推測された。さらに、ラクトイルコリンを天然物として世界で初めて単離した（K. Nakamura, et al. Food Chem., 201, 185-9, 2016, FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY, 上位 5.6%, 7/125, 5Y IF 4.232, IF 4.052）。昇圧関与物質および炎症関与物質定量による降圧特性の解明についても、目標を達成した。市場調査については、目標を達成した。

●研究開発後の課題・事業化展開

発酵キョウバクは SHR による動物試験で、0.01mg/kg の用量で降圧効果が認められた。この用量は他の降圧食品素材と比べ 100 分の 1 以下である。そのため、1 製品当たりの製造原価は大幅に抑えられる可能性がある。ヒト有効用量の確定、培養期間短縮という課題を解決すれば、発酵キョウバクは競合品に対し圧倒的な価格競争力を持つ可能性がある。

ソバがアレルギーの特定原材料 7 品目に指定されていることが、事業化に向けた課題となる可能性がある。食品製造の場において、アレルギーを含む食品の取扱いは年々厳密になっている。アレルギーを含む食品の保管場所を通常とは分ける、製造ラインや製造機器も専用にするなどの対策が取られるようになってきた。そのため、ソバなどの特定原材料を使用不可とする工場もある。発酵キョウバクにはアレルギーが陰性であることが確認されているが、顆粒、打錠、ドリンクなどの製品を製造する際には製造する企業に十分な説明のうえ理解を得る必要がある。