

健康に良いぬか漬けを作りたい！

－ 伝統的発酵食品の微生物・分子生物学的探究－



実施担当者 順天中学高等学校
特任講師 亀田麻記子

1 はじめに

本校では、理数探究において生徒の内発的な興味・関心を出発点とした研究活動を重視している。2年前、アレルギーを持つ2名の生徒が「私たちはどうしても酪酸菌を増やしたい。アレルギー症状軽減につながる研究を行いたい」という非常に強い希望を持って理数探究の授業にやってきたことから本研究は始まった。

腸内細菌叢において酪酸菌を増やすと、酪酸菌が産生する酪酸によって制御性T細胞の分化が促進され、その結果炎症が抑制され、アレルギーが軽減するという報告がある¹。このため、酪酸菌を含む数少ない食品である「ぬか漬け」に着目し、酪酸菌を多く含むぬか漬けの開発を目標にして生徒たちは研究を行ってきた。

その結果、水溶性食物繊維を多く含むゴボウを漬けた場合に酪酸菌が最も増加すること、またオリゴ糖を添加することで酪酸菌が増加する可能性が示唆された。一方で、何も添加しないコントロールのぬか床においても酪酸菌が顕著に増加するという結果が得られた。この結果が実験誤差によるものか、それとも意味のある現象を示唆するものなのかは未解決のままであった。また、オリゴ糖をぬか床に添加した場合に最も酪酸菌の増加が見られたが、オリゴ糖の種類や添加方法によって酪酸菌の増加にどのような影響を及ぼすのかは調べきれいでなかった。

本年度は、後輩たちがこの研究を引き継ぎ、この未解決の問いを出発点として、より精緻な実験と解析を行うことで、より多くの酪酸菌を含むぬか漬けの開発を目指した。

2 研究の継承と新たな挑戦

2-1 後輩たちに引き継がれる研究

昨年度研究を立ち上げた2名の生徒は高校3年生となり、理数探究を卒業した。その後、後輩である高校2年生2名と、新たに加わった高校1年生4名、計6名のチームで研究を継続した。

研究のテーマは引き続き、「どのような条件で、ぬか床中の酪酸菌は最も増えるのか」。昨年度の結果を踏まえ、以下の3つの問いを新たに設定した。

- 何も加えないぬか床で酪酸菌が増加したのは実験の失敗だったのか、意味のある結果なのか

- オリゴ糖は本当に酪酸菌増殖に寄与するのか
 - オリゴ糖の種類によって酪酸菌の増殖に違いはあるのか
- これらの問いを解明するため、生徒たちは再びぬか漬け作りに取り組んだ。

2-2 大量のぬか漬けとの奮闘

今年度の研究では、ぬか床に添加するオリゴ糖が酪酸菌の増加に及ぼす影響を調べることを主な目標とした。オリゴ糖とは、単糖が3~10個程度結びついた糖類であり、腸内細菌のエネルギー源となる。構成単糖の種類によりさまざまなオリゴ糖が存在するが、昨年度の研究においてはスーパーで手に入る「オリゴ糖」という商品を使用したため、オリゴ糖の種類が何なのか厳密には分からなかった。そこで、今年度はフラクトオリゴ糖（構成単糖は主にフルクトース、乳酸菌が利用しやすい）、ラフィノース（同ガラクトース・グルコース・フルクトース、ビフィズス菌などの腸内細菌は分解可能）、イソマルトオリゴ糖（同グルコース、さまざまな菌が利用可能）をぬか床に添加して、酪酸菌の増殖に及ぼす影響を調べた。

実験では、何もつけていないぬか床、野菜のみを漬けたぬか漬け、野菜と共にオリゴ糖を加えたぬか漬け、オリゴ糖のみを加えたぬか漬けを作成した。昨年度の研究ではゴボウをつけた場合に最も酪酸菌が増加したため、ゴボウと他の野菜をつけた場合に酪酸菌が増加するかどうか調べた。そのため、合計12種類となり、それぞれ同じものを2つずつ作成し、さらに追加で調べたいものもできたため、管理するぬか床は28個となった。毎日これらをかき混ぜなければすぐにカビが生えたりシンナー臭が発生したりしてしまう。後輩がこの研究に加わって研究グループは6人になったとはいえ、この研究以外に部活動もあり、定期試験もある彼らがこの大量のぬか漬けをかき混ぜ、野菜を入れ替えるのは簡単ではなかった。連休などで学校に来れず、ぬか漬けがほとんどダメになり、やり直したこともあった。納得できる状態のぬか漬けを揃えることができたのは、11月の終わりだった。どのオリゴ糖が酪酸菌の増殖に効果的なのか、私たちはドキドキしながら細菌叢解析の結果を待った。



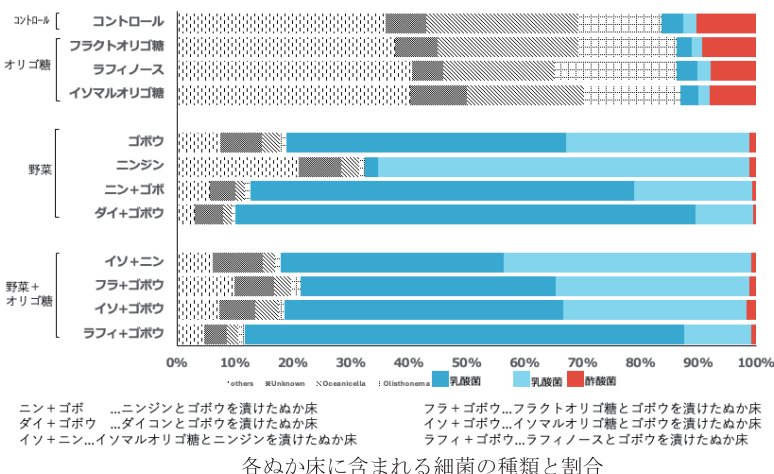
ぬか漬けの管理と細菌叢解析の準備

3 深まる理解、深まる謎

3-1 昨年の研究結果は失敗ではなかった

12月の中頃、細菌叢解析の結果が送られてきた。「細菌叢解析の結果」は、400種類以上の細菌の学名とその検出頻度が記されたエクセルデータである。この膨大なデータを初めて見た生徒たちはかなり戸惑っていたが、受験を終えた高3生がエクセルデータの見方や数値の抽出・解析、グラフ作成方法を丁寧に後輩たちに教えてくれた。高2生はデータと格闘しながら結果を整理していった。

その結果分かったのは、昨年度のコントロールのぬか床で酪酸菌が増加したように見えたのは、間違いではなかったということであった。ぬか床に「野菜を漬けない」場合、酪酸菌は増加すること

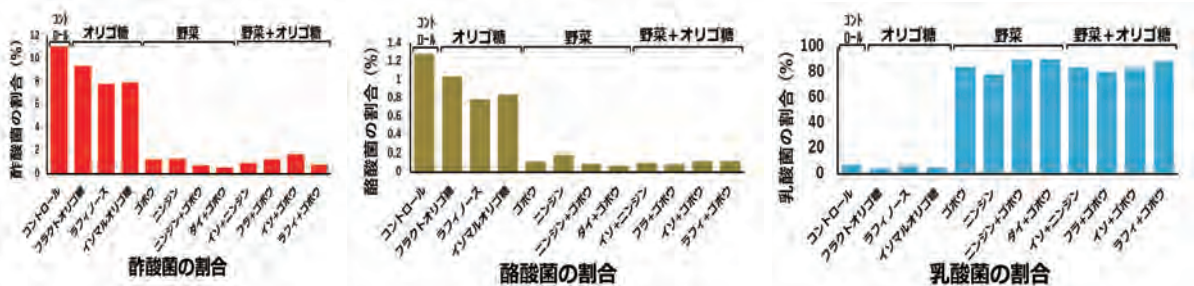


が明らかになった。ぬか床に野菜を漬けた場合には、酪酸菌は少なく、乳酸菌が細菌叢の 80% 以上を占めるようになる一方で、野菜をつけないぬか床では酪酸菌が多く、乳酸菌の割合は 5% 程度となり、大きな差が見られた。誰も「野菜を漬けないぬか床」をかき混ぜ続けて細菌叢を解析したことなどなかった故に今まで分からなかったが、「野菜の有無」が酪酸菌数に大きく影響していることが明らかになった。これは、野菜をつけたぬか床では乳酸菌が産生する乳酸がぬか床の pH を下げ、酪酸菌の増殖が抑制された一方、野菜を漬けないぬか床では pH の低下がさほど起こらず、酪酸菌が増殖できたためだと考えられる。

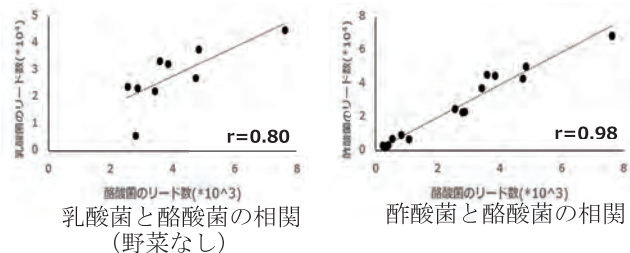
しかし、野菜を漬けなければ、ぬか漬けではない。野菜と共にオリゴ糖を添加した場合、酪酸菌数は増加するのだろうか。残念ながら、野菜を漬けると同時にオリゴ糖を添加しても酪酸菌数に大きな違いは見られず、オリゴ糖添加による酪酸菌の増加は見られなかった。オリゴ糖の種類によっても、酪酸菌の増殖に大きな差は見られなかった。

3-2 酪酸菌と似た挙動をする細菌の発見

細菌叢解析をする際、生徒たちは一つの細菌に興味を持った。それは、細菌叢解析でわずかに検出された「酢酸菌」であった。酢酸菌は、野菜を漬けないぬか床で多く見られ、野菜をつけたぬか床では少なかった。酪酸菌、乳酸菌の解析と共に酢酸菌についても各ぬか床に含まれる割合をグラフ化したところ、似たような形になった。



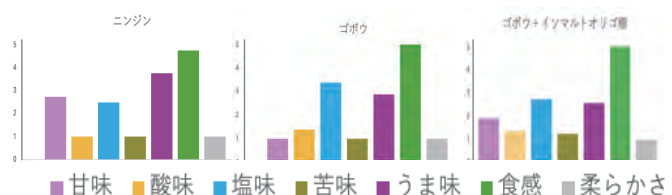
そこで、これらの菌の増殖が連動しているのではないかと考え、酪酸菌と酢酸菌、酪酸菌と乳酸菌の相関を調べた。その結果、酪酸菌と乳酸菌では、野菜のある場合には相関係数 0.5 となりはっきりとした相関は見られず、野菜のない場合には相関係数 0.8 となり相関が見られた。一方、酢酸菌と酪酸菌に関しては、相関係数が 0.98 となり、非常に強い正の相関が見られた。このことから、酪酸菌と酢酸菌が同様の環境条件で増殖している可能性、あるいは酢酸菌が産生する酢酸が酪酸菌の増殖に寄与している可能性が浮かび上がってきた。



これらの結果を踏まえて、生徒たちは今後酪酸菌の増殖に関与する菌をさらに調べ、酪酸菌が豊富なぬか漬けの開発をさらに進めたいと考えている。

3-3 お味の方は？

今回はぬか漬けの細菌叢解析だけでなく、味の評価も行った。複数の生徒たちがぬか漬けを実際に食べ、甘味、酸味、塩味、苦味、うま味、食感、柔らかさについて 5 段階評価を行った。その結果、ニンジン(carrot) は甘味や旨味があり、評価が高かった。ゴボウ(burdock) は甘味がなく硬かったが、オリゴ糖の添加により甘味が増して優しい味になった。

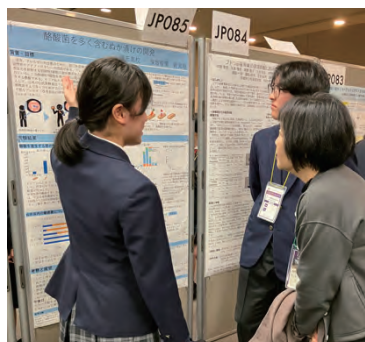


4 学びの深化と進路選択

4-1 生物の授業と探究の往復による分子生物学的解析への理解の深化

生徒たちは高2の生物の授業においてDNAの分子生物学的解析方法を学ぶ。教科書ではPCRやシーケンス解析、次世代シーケンサーなどといった概念まで扱うが、実際に行ったことがなければ理解はなかなか難しい。本研究を行った生徒たちは自分たちの手で実際にPCRやメタゲノム解析も行った。その結果、PCRの原理やプライマーの選択、メタゲノム解析まで自分で説明できるようになった。本研究で分子生物学的解析を経験したことにより、理解が格段に深まったことがうかがえた。

4-2 学会発表により育まれる研究者とのつながり



高1生は高校生サイエンス研究発表会、高2生はエコチル調査全国フォーラム・つくばサイエンスエッジでそれぞれ研究成果を発表し、環境省環境保健部化学物質安全課環境リスク評価室長賞などを受賞した。また、高3生は大学受験後にジュニア農芸化学会で研究発表を行い、農芸化学の研究者とさまざまな意見交換を行うことができた。特に農学部で食品と免疫の関係について研究している方と有意義な話が出来たようで、将来進みたい研究室が見つかったと生徒が目輝かせていたのが印象的だった。



4-3 探究から研究へ、生徒たちの進路選択

本研究を始めた高3生のうちの1人は、発酵食品の持つ可能性に魅了され、発酵と食品を専門的に学べる大学への進学を決めた。

もう1人は、細菌叢の解析において、自力でのデータ解析に限界を感じた経験からデータサイエンスに強い関心を持つようになり、数理系分野への進学を決めた。同じ研究を行ないながら、それぞれの興味を深め、自らの進むべき道を決めることができたのは、それだけ本気でこの研究に取り組んできた証だろう。



5 まとめ

本研究ではぬか漬けにおける酪酸菌の増殖に関する科学的知見の獲得にとどまらず、生徒同士の学び合いの場となり、科学への関心を深め、進路選択にまでつながった。今後も生徒達と共に健康に良いぬか漬けの開発を目指すとともに、研究の輪を一層広げていきたい。

謝辞

彼らの本気の研究を支え、高度で高価な細菌叢解析にチャレンジできたのは中谷財団の支援のお陰です。本研究の遂行にあたり多大なるご支援を賜りましたことに、心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Furusawa, Y. et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 2013, 504, 446-450.
- 2) Nicolas Simonelli, et al. Stimulation of microbial butyrate synthesis through prebiotics. *Food bioscience*. 2024 Dec 62:105329.