原著：

野生シュバイカによる中枢神経系の保護作用

——培養細胞系を用いた機能性食物素材探索の試み——

松谷 Knox 洋子*, 荒井 優 気^{2*}, 林 要 喜 知^{2*}

バラ科植物果実である中国産野生シュバイカがどのような作用を脳神経系に及ぼすかを調べるため、幾つかの細胞変性系を用いて細胞障害の抑制あるいは遅延効果について検討した。ラット胎児由来の初代海馬ニューロンをトランスフェリン濃度を低めた無血清培地中におくと、細胞死が誘導される。そこで、この細胞死に対して抑制効果を示すビタミンEやKを基準にして、組織抽出液の効果を調べたところ、シュバイカ抽出液は、他の幾つかの植物と同様に著しい抑制作用を認めた。アミロイド前駆体蛋白質（APP）の高発現グリオーマでは、クロロキン処理により細胞死が誘導されるが、この作用には、ビタミン類やシュバイカ、あるいは、その他の植物抽出液のどれもが、ほとんど抑制効果を示さなかった。しかしながら、クロロキン処理後の回復過程に対してシュバイカのみが促進作用を示した。さらに、老齢チャイニーズハムスターにシュバイカ溶液を与え続けたところ、これらの生存日数が平均15%ほど増加し、老齢動物における恒常性維持にも作用したと考えられた。以上のことから、野生シュバイカには、中枢神経系細胞に対する保護作用や免疫系を賦活化する生理活性物質が含まれると推察される。このような研究による抗痴呆性機能食品／食材の探索は、21世紀の超高齢社会における人々の健康や我が国の農業に大きく貢献すると期待される。

①シュバイカ ②アルツハイマー病 ③神経細胞培養 ④神経変性 ⑤機能性食品

緒 言

ヒトが長寿であるのは、脳・神経系などの生体恒常性維持の機構が著しく発達してきたためと考えられる。しかしながら、皮肉なことに、超高齢社会が到来しつつある21世紀では、脳・神経系の変性疾患の一つである痴呆症に悩む高齢者数が激増し、ケアのための労力や経済的な負担は、単に患者の家族のみならず社会全体にとって大きな問題になると懸念されている^{1,2)}。

このような社会的状況に対応するためには、二大痴呆症である脳血管性痴呆症やアルツハイマー病（AD）の罹患者数の減少をめざした明確な戦略を立て、それらをすみやかに実行することが望まれる。幸いなことに、最近、脳血管性痴呆症の増加率は徐々に低下しつつある。これは、病因の解明、診断や治療の向上、生活指導、さらには、ライフスタイルの改善などが功を奏したためである。しかしながら、ADの場合、基礎／臨床研究は未だ不十分な面が多い。

ごく最近、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤である塩酸ドネペジル（アリセプト）などがAD治療薬として使用されるようになった。これは副作用が少なく、初期ADに著効を示す³⁾。しかし、かなり進行したAD痴呆症高齢

* 〒078-8510 旭川市緑が丘東2条1丁目1番1号
旭川医科大学医学部微生物学講座

^{2*} 同 生命科学

（受付：2000年11月27日）

者の治療にはほとんど期待できない。それゆえ、まずADの病因を明らかにし、本質的な治療／診断法を確立する為の努力が急務であろう。とくにADの大部分を占める弧発性ADに対しては、残念ながら、病因に関する研究だけでなく、診断や治療に於いても成果をあげていないのが現状であり、満足のいく臨床的な対応が強く待ち望まれる。

一方、ADの予防や発症遅延をはかるための脳のリハビリテーション法や脳・中枢神経系の働きに有益な機能性食品開発などが注目を集め始めている。とくに後者は、老化の原因の一つとして活性酸素の作用が明かになってきたこともその背景にあるためである⁴⁾。そのため食品成分の抗酸化活性物質が、生体内の余剰な活性酸素種を消去するという役割に、近年大きな関心が寄せられている。

食物中の抗酸化物質としては、豆類や緑色野菜に多く含まれているビタミンE、淡色野菜のビタミンC、そして緑茶や赤ワインに多くふくまれているポリフェノールなどのフラボノイドが広く知られている。活性酸素による老化や脳の変性疾患を極力防止するという視点⁴⁾から、これらの有効成分を含む食品をバランスよく必要量摂取することが、今後高齢者の健康管理に極めて重要となると推察される。それゆえ日頃から活性酸素種の捕捉物質を過不足なく摂取し、脳障害時のみならず、普段の生活においても、脳細胞の障害を最小限度におさえることは意味あることと考えられる。

一方中国では、古来より様々な野生種の果実が栄養／野生活性成分の高い自然食品として日常的に食されている。バラ科植物果実である野生シュバイカもそのような食物の一つであり、果実のみならず、枝や根、花なども広く食されており、滋養強壯の漢方薬材にも加えられている。日本においても多くの漢方素材が知られているが、それらの効能や含まれる有効成分に関しては、医食同源という考え方が広がりつつある現代においても、必ずしも十分には解析されていない現状がある。

そこで本研究では、脳変性疾患の予防や発症

の遅延に有効に働く食材成分を探索、同定する試みとして、培養神経細胞やグリア細胞の病態モデル系を用いて寒冷地植物や生薬等を評価した。

方 法

材料

細胞培養液 (DMEM)、インシュリン、プロジェステロン、トランスフェリン、クロロキン、及び、牛胎児血清は、オリエンタルキブコ社から購入した。黒五は、黒五本舗から入手した。野生シュバイカは中国黒竜江省産を使用した。その他の試薬や食品材料は市販のものを用いた。

食品食材粗抽出液の調整

各食品食材の粗抽出液を調整するため、乳ばちを用いて細粉化した後、3倍量の冷エタノールを加えた。一昼夜室温で放置したものを遠心 (15,000RPM, 15分間)、その遠心上清を粗抽出液として使用した。また、水溶性画分の調整には、細粉化した食材に5倍量のDMEMを加え、同様に抽出した。実験には、水溶性画分の遠心上清をポアサイズ0.45 μ mの無フィルター (ミリポア) を用いてろ過滅菌した後、使用した。

ラット胎児海馬ニューロンの培養

ラット胎児海馬ニューロンの初代培養は、基本的には既報に従った^{5,6)}。則ち、妊娠18日齡ラット胎児 (ウイスター) から調整した海馬細胞をトリプシン処理 (0.25%, 15分, 室温) により分散させ、10%牛胎児血清を含んだDMEMに懸濁させた。細胞数を 10^5 細胞/mlにあわせて後、ポリオルニチン塗布培養皿 (ファルコン24穴) に1mlずつ加えて培養を開始した。翌日、インシュリン (5 μ g/ml)、プロジェステロン (20nM)、およびトランスフェリン (100 μ g/ml) を含むDMEM無血清培地に置換した。粗抽出液を培養系に添加する時には、低濃度トランスフェリン (5 μ g/ml) を含むDMEM無血清培地に置換した。その後48時間培養した後細胞を3.7%グルタルアルデハイド溶液で固定し、抗map-2抗体を用いて免疫染色し

た。map-2陽性細胞濃度を位相差顕微鏡（ニコン TE 300）下でカウントし、生存率を算出した。この実験では、各ポイントあたり4サンプルずつ測定してデータを求め、同じ実験を3回実施した。

アミロイド前駆体蛋白質（APP）発現グリオーマ細胞の培養と変性誘導

APP 高発現細胞は、APP 遺伝子 cDNA を導入して作製した⁷⁾。10%FCS を含む DMEM を用いて海馬ニューロンの同様な条件で培養した。変性誘導を誘導するために、細胞をマルチウェル（ファルコン96穴）にまき、コンフルエントになるまで培養を続けた。そこに50 μ M になるようにクロロキンを培養系に添加し、24時間細胞変性を誘導させた。その後クロロキンを除いた培養液に置換した。シュバイカ添加、非添加により、さらに2週間培養を継続し、細胞の生存状態を顕微鏡下で観察した。

シュバイカ処理実験

まず約96週齢に達したチャイニーズハムスター（クルーズドコロニー）のメスを各々5匹ずつ選び、2群にわけた。各群の摂水ボトルに水またはシュバイカ溶液（2,400倍希釈）を加えて給水することでシュバイカ処理を開始した。その後各動物が死亡するまで同じ条件下で飼育を行い、それらの生存日数を記録した。生育環境は、10時間暗所／14時間明所の明暗サイクル条件下で23℃の恒温条件に設定した。餌にはMF（オリエンタル酵母）を与え、摂水ボトルの内容物や床敷は1週間ごとに交換した。

統計的処理

統計的処理はANOVAで検討し、多重比較検定はFisherのPLSD法で行った。危険率が1%未満の場合には有意な差があると判定した。

結 果

シュバイカ粗抽出液による初代培養神経細胞の生存促進

ビタミンKは、無血清培地で培養したラット胎児由来の海馬ニューロンの生存を促進する効果がある⁶⁾。この反応系を用いて培養神経細胞

の生存を高める因子活性を様々な抽出液で調べた。まず抽出液を添加しないで培養神経細胞を無血清培養液で培養したところ、培養24時間目には生存率が平均40%になり、48時間では生存率が0%となった。この培養系にビタミンKやEを 10^{-7} Mで添加したところ、ニューロンの生存率が著しく向上した（図1）。両ビタミン添加の場合、どちらも24時間では平均95%、48時間では80%～90%であった。そこで、様々な食品食材のエタノール抽出液を調整し、本培養系に添加した。表1には、48時間後における生存率を示した。アロニア、生姜、オオバ、あるいはダイコンの葉では、海馬ニューロンの生存は0～3%であり、無添加とほぼ同様の成績

図1. 培養海馬ニューロンの位相差顕微鏡写真。18齢ラット胎児海馬より調整したニューロンを分散させ24時間培養した。翌日B-27を含む無血清培地に置換した。1週間後に実験用無血清培地に置換し、各々の試験抽出液を添加した。さらに2日間培養した後、細胞をフォルムアルデヒドで固定し、写真撮影を行った。写真Aは未処理、写真BはビタミンE (10^{-7} M)、写真CはビタミンK1 (10^{-7} M)、および、写真DおよびEは、シュバイカ抽出液を最終容積0.03%および0.1%になるように添加したもの。写真Fは、オオバを0.1%加えたもの。

表 1. 海馬神経細胞生存に及ぼす食物粗抽出液の効果

原材料名	最終添加濃度	生存率 (%)		
		0.03%	0.10%	0.30%
ななかまど	10	5	3	
黒かりん	5	15	7	
タンニン	3	10	2	
プロポリス	3	35	10	
シュバイカ	10	42	20	
黒五	9	25	12	
なんてん	8	10	8	
アロニア	1	0	0	
大豆	10	10	9	
黒大豆	5	18	0	
青まめ	10	15	10	
麦 (野生種)	10	10	3	
麦	11	9	4	
ホウレンソウ	10	18	0	
バセリ	0	28	3	
コマツ菜	0	15	0	
生姜	3	0	0	
オオバ	3	0	0	
ヨモギ	10	7	3	
ダイコン (葉)	0	1	0	
からまつ (樹皮)	3	0	0	
からまつ (木粉)	12	3	0	
アラビノガラクトン	15	30	3	
タクスフォリン	3	3	1	
ワサビ	10	3	0	
ひじき	5	20	3	
岩のり	5	25	3	
昆布	5	4	3	
青のり	2	1	5	
わかめ	5	18	5	
ふのり	4	10	0	

であった。しかしながらプロポリス、シュバイカ、およびアラビノガラクトンの抽出液添加の場合には、生存率が30～42%ほどに維持され、ビタミン K や E と比較しうる生存率維持効果が認められた ($P < 0.01$)。この生存促進効果は粗抽出液の最終濃度が0.03%から0.3%の間で認められたが、シュバイカの濃度をさらに高めると、生存率は逆に低下した。また水溶液などで同様な実験を繰り返したが、これらには著明な生存維持活性は認められなかった。また、大豆、黒かりん、ななかまど、さらには、わかめやふのりなどの海藻類にも10～28%ほどの生存率維持活性が認められた。

非ニューロン細胞の変性阻害

シュバイカによる初代培養神経細胞の促進効果はビタミン類と同様の効果によると推測されるが、この点は必ずしも明らかではない。そこで脳神経系を構成する非ニューロン細胞に対する作用を検討した。APP 高発現ヒトグリオーマは、リソソームの働きを阻害するクロロキン

図 2. APP 高発現ヒトグリオーマの位相差顕微鏡写真。マルチウエル (ファルコン96穴) で培養したヒトグリオーマ細胞株にクロロキン処理を施した。1 日間の培養後洗浄し、新たな培養液にシュバイカを加えて 2 週間培養を継続した。細胞の生存状態を位相差顕微鏡にて200倍で写真撮影した。写真 A は未処理、写真 B はクロロキン処理しただけのもの。写真 C は、写真 B の条件にシュバイカ抽出液 (最終容積 0.1%) を、写真 D はふのり 0.3% を添加処理したもの。

で処理すると、2～3日のうちに死滅する。そこでこの変性モデル系におよぼすシュバイカの効果を検討した。残念なことにビタミン E や K と同様にシュバイカ添加群においても、この細胞死を抑制することができなかった。

そこでクロロキン添加後の回復過程でシュバイカ添加、非添加群を作製して比較した。定量的な解析は実施していないが、細胞の形態や増殖には大きな差異が認められた。すなわち非添加群では、クロロキンによる死滅細胞が培養皿中に残存し、生存している細胞の状態も必ずしも良好ではなかった。シュバイカ添加群では、細胞増殖が刺激され、ほぼコンフルエントにまで増殖した (図 2)。また、死滅細胞の排除も良好に進んでいることが明らかとなった。これらの作用は、ビタミン添加群やその他の植物抽出液ではほとんど認められなかった。それゆえビタミン K や E などの作用とは異なる物質が

シュバイカに含まれており、それらがグリア細胞の変性阻止／活性化や細胞増殖促進に働いたと考えられる。

実験動物の生存に及ぼすシュバイカの促進効果

シュバイカは脳神経系を構成する培養ニューロンやグリア株細胞に対して生存促進効果を示したが、この作用は培養細胞のみに対する効果であるのか、あるいは動物個体に対しても、何らかの作用を及ぼすかは興味ある問題である。そこで、老齢チャイニーズハムスターの生存日数に及ぼすシュバイカの効果を検討した。まず投与濃度を定めるために、シュバイカ液の希釈液（600倍～9,600倍）を作製し、3か月間、48週齢のチャイニーズハムスターに与え続けた。この期間における摂水量や体重変化には、対照群として水を与え続けたものと全く変化なく、シュバイカ処理群には何らの急性毒性も認められなかった。そこで、約96週齢まで飼育した老齢チャイニーズハムスターを10匹選び、1ケージに1匹ずつ入れてシュバイカ液（2,400倍希釈）あるいは水で給水を始めた。その後、これらの動物がすべて死亡するまで2年間飼育を継続し、体重、毛並み、あるいは、飲水量の変化を調べた。シュバイカ処理群と対照群のどちらにも、これらの変化に大きな違いはみとめられなかったが、動物の生存日数に有意差（ $P < 0.01$ ）が認められた（図3）。すなわち水給水を継続した対照群の動物では、延べの生存日数が732日から888日の範囲に及び、平均および標準偏差は各々802.5日および59.3日であった。シュバイカ処理群では、856日から997日の範囲まで生存した。そのため平均生存日数は900.7日、標準偏差は48.8日となり、対照群に対して約15%ほどの延命効果が認められた。一方神経細胞の生存を高めたよもぎやアラビノガラクトンは、老齢チャイニーズハムスターに対する有意な生存促進効果は認められなかった。

考 察

野生シュバイカをはじめ幾つかの野菜や海藻には、ビタミンEやK（VEやVK）で阻止できる神経細胞死滅作用と同等な活性が存在す

図3. チャイニーズハムスターの生存に及ぼすシュバイカの促進効果。96週齢チャイニーズハムスターに水またはシュバイカ溶液（2,400倍希釈）を加えた摂水ボトルで給水することによりシュバイカ投与を始めた。その後各動物が死亡するまで飼育を行い、それらの平均生存日数をグラフに示した。未処理群とシュバイカ群の生存日数にのみ $P < 0.01$ で有意差が認められた。

ることが明らかになった。事実これらのビタミン類を多く含むその他の野菜でも同じような作用があることが認められたため（未発表データ）、この細胞死抑制効果は抗酸化剤としての働きを持つビタミンEやKによると判断された。ただこの作用に対する用量依存カーブを比較すると、ビタミンEやKの場合とは異なり、粗抽出画分の最大活性値や高濃度における値が低い傾向が観察された。これは、おそらく粗抽出分画には相反する作用を持つ、さまざまな夾雑物が存在するためと考えられた。野生シュバイカに含まれる抗酸化物質としては、これまでビタミンE、ビタミンK、ビタミンC、ビタミンB複合体、さらにバイオフィラボノイド複合体等、さらにはグルタチオン、含硫アミ

ノ酸のタウリン、およびシステイン等などが知られている（黒竜江中医学院，私信）。これらを適当な混合比にすると，前述のように阻害的に働いたり，あるいは逆に，何か別の作用が働くという可能性は存在する。

APP 高発現グリオブラストーマは，アミロイドペプチドによる細胞死や APP に対する抗体処理による細胞死と共に，AD の病態モデルの一つと考えられる^{8~10)}。APP 遺伝子が高発現することにより，アミロイドペプチドを含むフラグメントが細胞内に蓄積し，これが細胞に負荷をかけると解釈される。そこにクロロキンの作用が加わると，APP やそのフラグメントの細胞内輸送や修飾作用が著しく抑制され，急激なアポトーシス様細胞死が誘導される。このようなストレスを与えられた細胞は，変性過程から容易に回復できなかったが，シュバイカ抽出液により，細胞の状態が改善された（図 1）。この作用には，VE や VK による単純なニューロン保護作用とは全く異なる作用物質が介在していると考えられる。おそらくそれらは，細胞内における APP 代謝を高めたり，あるいは，グリア細胞増殖に促進的な役割を果たす活性物質であるだろう。

野生シュバイカは培養神経細胞の生存率を高めるだけではなく，動物個体の生存日数を有意に延長させた（図 3）。本実験で用いたチャイニーズハムスターを長く飼育した場合，それらは老化による感染症や発がん，あるいは，その他様々な原因で死亡すると考えられる。シュバイカ処理および未処理動物のどちらも，死亡時には担がん状態ではなかった。また肺組織の概観や脳重量にも大きな差異は認められなかったため，シュバイカによる延命効果の明確な原因を特定できなかった。最近佐藤らは，マウス免疫系に及ぼすシュバイカ処理効果を調べ，IL-2 産生の亢進を見い出している（私信）。それゆえ今回のチャイニーズハムスターに対する作用の一つには，例えば，感染症／炎症に対する抵抗力を高める等の免疫賦活作用があると考えられる。シュバイカには脳神経系細胞に対する直接作用を示すことから，この両者がどのように

脳，神経系に対する機能保持や生体の恒常性に働くのか，今後のさらなる解析が望まれる。

シュバイカに含まれる有効成分は，実際に脳内に到達しうるものであろうか。残念ながら，今回のスクリーニングでは有効成分の諸性質を明らかにできていないため，明確な実験的な証拠は得られていない。しかしこれら有効成分は有機溶媒で抽出される脂溶性低分子物質が主であり，水溶性分画にはほとんど存在していなかった。それゆえ食品として摂取された脂溶性低分子の一部が何らかの血中分子と結合し，一部血液脳関門を通過しうる可能性が想定される。このような物質が脳内に到着すれば，ニューロン間のシナプス結合のみならず，ニューロン／グリアのクロストークを高めることになり，脳の保護効果の視点からは望ましい効果をもたらすであろう。もっとも脳内に到達することができない物質であれば，培養系における作用は実験系にのみあてはまることになる。ただその場合は，脳内にもシュバイカ含有物質と類似の作用物質（内在物質）が存在することになり，これがどのような物質であるかは興味深い。

以上本研究では，病態モデル細胞系を用いて様々な食品食材をスクリーニングすることにより，これまで評価が困難であった抗痴呆性機能性食材を探索する一つの方向性を示した。最近抗ウイルス活性を示す黒かりん抽出液¹¹⁾にも，脳に対する作用を有することを見い出している（未発表）。今後さらに多くの植物や食材をスクリーニングすることによって，より効果的な機能性食品開発をめざしたいと考えている。シュバイカの解析に関しては，さらに有効成分の単離／同定を試み，それらの諸性質や作用機序を明らかにすると共に，脳神経系機能の賦活化や個体レベルでのホメオスタシス維持に働く活性物質を厳密に評価したいと考えている。そしてこれらの成果を，寒冷地農業の生産作物の選択や，機能性食品開発に応用していきたいと考えている。

結 論

バラ科植物果実であるシュバイカには、抗酸化作用を有するビタミン類と同様に、培養神経細胞に対する保護作用を認めるのみならず、変性グリア細胞の細胞障害度を軽減する作用が認められた。また老齡チャイニーズハムスターの生存日数を延長する作用が確認されたことから、中枢神経系細胞の保護や機能維持に関わる何らかの生理活性物質が含まれると考えられた。シュバイカに含まれる有効成分同定を試みるとともに、それらを用いた抗痴呆性機能性食品／食材の開発研究は、21世紀の超高齢社会における人々の健康や我が国の農業に大きく貢献すると期待される。

文 献

- 1) Gonzalez-Salvador T, Lyketsos CG, Baker A, et al. Quality of life in dementia patients in long-term care. *Int J Geriatr Psychiatry* 2000; 15: 181—189.
- 2) Kinosian BP, Stallard E, Lee JH, et al. Predicting 10-year care requirements for older people with suspected Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 2000; 48: 631—638.
- 3) 小倉博雄, 小笹貴史, 荒木 伸, 他. アルツハイマー病治療薬塩酸ドネベジル (Aricept) の薬理学的特性. *日本薬理学雑誌* 2000; 115: 45—51.
- 4) Samson FE, Nelson SR. The aging brain, metal and oxygen free radicals. *Cell Mol Biol* 2000; 46: 699—707.
- 5) Nakajima M, Kashiwagi K, Hayashi Y, et al. α -tocopherol supports the survival and neurite extension of neurons cultured from various regions of fetal rat brain. *Neurosci Lett* 1991; 133: 49—52.
- 6) Nakajima M, Furukawa S, Hayashi K, et al. Age-dependent survival-promoting activity of vitamin K on cultured CNS neurons. *Dev Brain Res* 1993; 73: 17—23.
- 7) Hayashi Y, Kashiwagi K, Yoshikawa K. Protease inhibitors generate cytoplasmic fragments in glioma cells transfected with cDNA coding for the Alzheimer amyloid protein precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 1249—1255.
- 8) 林 要喜知, 吉川和明. アルツハイマー病の培養細胞モデルの作製. *組織培養* 1993; 19: 303—308.
- 9) Rohn TT, Ivins KJ, Bahr BA, et al. A monoclonal antibody to amyloid precursor protein induces neuronal apoptosis. *J Neurochem* 2000; 74: 2331—2342.
- 10) Glabe C. Does Alzheimer disease tilt the scales of amyloid degeneration versus accumulation? *Nature* 2000; 6: 133—134.
- 11) KNOX 洋子, 錫谷達夫, 吉田逸朗, 他. 黒加倫抽出物の機能性—抗ウイルス作用を中心に. *食品と開発* 1998; 33: 21—24.

Protective Effect of *Rosa duvurica* Pall on Degenerative Cells from the Central Nervous System (CNS) : A Trial of in vitro Identification of Functional Food Materials

Yoko Knox. MATSUTANI*, Yuki ARAI^{2*} and Yokichi HAYASHI^{2*}

Rosa duvurica pall (Rdp) is a kind of rose berries which came from the northern part of China originally. In the present paper, we examined whether or not Rdp exerts a neuronal protective action on cultured cells using the crude extracts from Rdp. When hippocampal neurons derived from a rat fetus were cultured in a serum-free medium supplemented with a reduced concentration of transferrin, they began to die within a few days. Both vitamin E and K stimulated their survival at physiological concentrations of 10^{-8} M to 10^{-6} M. Rdp also showed similar activities like several other plants. However, none of these extracts did inhibit degeneration of glioma cells overexpressing an amyloid precursor protein (APP), which are induced to die by chloroquine treatment and therefore regarded as one of AD degenerative model cells. Interestingly, only Rdp exerted some kind of action for repairing their damage caused by chloroquine and stimulated their proliferation. It also prolonged the life of aged Chinese hamsters by about 15% on average. These data, taken together, suggest that Rdp contained some of the functional molecules that act on both neuron and glial cells from the central nervous system (CNS), probably enhancing neuronal activities in vitro and/or in vivo. Thus, this line of experiments may contribute to the promotion of the health of Japanese as well as the development of domestic agriculture in the 21st century when Japan is expected to be the most aged society.

*Dept. of Microbiology, ²*Dept. of Life Science, Asahikawa Medical College, Hokkaido, Japan