

ローヤルゼリーの抗アレルギー作用の検討

片岡麻理*, 新井紀恵, 谷口美文, 河野恵三, 岩城完三, 池田雅夫, 栗本雅司

(株) 林原生物化学研究所 藤崎研究所

Analysis of Anti-allergic Function of Royal Jelly

Mari Kataoka*, Norie Arai, Yoshifumi Taniguchi, Keizo Kohno, Kanso Iwaki, Masao Ikeda, and Masashi Kurimoto

Fujisaki Institute, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., 675-1 Fujisaki, Okayama 702-8006, Japan

(Received February 22, 2001)

We have previously shown using *in vitro* and *in vivo* experimental systems that *Perilla frutescens* leaf extract (PFE) exhibits anti-allergic functions through inhibiting IgE production by way of down-regulating the production of the Th2 cytokines IL-4, IL-5, and IL-10, but not that of the Th1 cytokine IFN- γ . Th2 cytokines play important roles in allergic responses. In this study, we have examined whether royal jelly (RJ) exhibits anti-allergic functions similar to those of PFE using an immediate hypersensitivity model, in which BALB/c mice were immunized with ovalbumin (OVA)-Alum. In a manner similar to that observed with PFE, intraperitoneal administration of RJ significantly inhibited both OVA-specific IgG1 and IgE production, and IL-4, IL-5, and IL-10 production by spleen cells stimulated with OVA. In contrast to PFE, however, administration of RJ also inhibited IFN- γ production by OVA-stimulated spleen cells, and tended to down-regulate OVA-specific IgG2a production. IL-2 production by OVA-stimulated spleen cells was unaffected by the administration of RJ and there were no significant changes in cytokine production by spleen cells in response to concanavalin A (Con A) among the experimental groups. Similar findings were observed when lymph node cells from OVA-Alum-immunized mice were stimulated with OVA in the presence of RJ. Furthermore, oral administration of RJ also resulted in a significant inhibition of both OVA-specific IgE and total IgE production. These results suggest that RJ exhibits anti-allergic functions through a different mechanism from that of PFE.

Keywords: Royal jelly, *Perilla frutescens*, allergy, Th1, Th2

B細胞の増殖や分化を誘導するヘルパーT細胞(Th)は、そのサイトカイン産生パターンによってTh1とTh2の2つの主要なサブセットに分類される^{1, 2)}。Th1細胞は主としてIL-2、IFN- γ を産生し、B細胞からのIgG2a、IgG2b或いはIgG3抗体の産生誘導に関与し、生体防御反応においては細胞性免疫を誘導する。一方、Th2細胞はIL-4、IL-5、IL-10などのサイトカインを産生し、IgG1やIgE抗体の産生誘導に関与し、生体防御においては液性免疫を誘導する。Th2

サイトカインはIgEの産生誘導のみならず、好酸球などの活性化を介してアレルギーの発症とその病態形成に関与していることが明らかになってきている³⁾。またこれらTh1/Th2の前駆細胞としてIFN- γ とIL-4の両方を産生するTh0細胞も存在することが報告されている^{4, 5)}。

Th1細胞とTh2細胞の間には、その産生するサイトカインを介して互いの機能を制御する作用があり、生体における免疫応答はこのTh1とTh2のバランスにより成り立って

いる。しかしながら、どちらかのThサブセットが過剰に活性化されることによって疾患に至る場合のあることが近年明らかになってきた。例えばアトピー性皮膚炎患者の炎症局所、或いは喘息患者の気管支肺胞洗浄液中の細胞においては、IL-4やIL-5などのTh2サイトカインが強く発現していることが報告されている^{6, 7)}。従って過剰に活性化されたTh2応答を抑制することができればアレルギー症状の改善につながると考えられる。

近年、種々の天然物或いはそれらの抽出物に抗アレルギー作用があることが報告されている⁸⁻¹¹⁾。その中で我々は昨年、アカジソ葉から抽出したエキス (*Perilla frutescens* extract, PFE) に、Th1サイトカイン産生には影響は見られないが、Th2型のサイトカイン産生を抑制し、その結果として抗原特異的IgEおよびIgG1抗体産生を抑制する作用があることを報告した⁹⁾。

ローヤルゼリー(RJ)は、働き蜂が体内で消化した蜂蜜を再び唾液腺から分泌することによって生産される、乳白色でクリーム状の物質であり、女王蜂の成育に必須であることが知られている。RJにはビタミン類が豊富に含有されており、動脈硬化の予防、血中コレステロールの低下や精力の増進などの種々の生理作用が報告されている¹²⁾。ごく最近、特異抗原で感作したマウスに対してRJを経口投与することによって血中の総IgE量の抑制や、肥満細胞からのヒスタミンの遊離が抑制されることからRJには抗アレルギー作用があることが報告された¹¹⁾。しかしながら、RJの抗アレルギー作用に関する論文は、我々の知る限りこの1報のみであり、これを支持する報告はいまだ見当たらない。

今回我々は、RJの抗アレルギー作用について、卵白アルブミンとAlumで免疫した即時型過敏症モデルマウスを用いて、抗原特異的サイトカイン産生と抗体産生に着目してアカジソ葉抽出エキス(PFE)の抗アレルギー作用と比較検討したので報告する。

材料と方法

動物

雌性BALB/c マウス(7週齢)は日本チャールス・リバー株式会社(神奈川)より購入した。

試薬

免疫に用いた水酸化アルミニウムゲル(Alum)はPIERCE社より購入した。卵白アルブミン(OVA)はSigma 社製のものを、PFEは(株)林原生物化学研究所 天瀬研究所

製のものを、用いた。またRJは、蜜蜂(学術名: *Apis Mellifera*)によって生産され、ブラジルサンパウロ州Paraibuna地方で採集された生RJを用いた。マウス血清アルブミン(MSA)は、BALB/cマウス腹水より純度約90%に精製したものを、用いた。

投与サンプルの調製

PFEの調製は以下の方法により行った。すなわち、ソウウ(永大薬業社製)100 gに脱イオン水を加え1500 gとし、直火で40分煎じた。ろ過後、遠心分離を行い上清を回収した。この上清を煮込みにより201 gまで濃縮後、熱処理(121℃、20分)を行った。この標品の重量濃度を減圧濃縮により測定したところ、108.2 mg/mlであった。これを0.1% MSA/PBSにて希釈し、0.22 μmフィルターでろ過した後、投与サンプルとした。RJは秤量後、注射用精製水で10 mg/mlに懸濁し、腹腔内投与用には0.22 μmフィルターでろ過した0.1% MSA/PBSで希釈し、経口投与用には注射用精製水にて希釈して用いた。なお、このRJ懸濁液を標準寒天平板培養法にて細菌検査を行ったところ、細菌の増殖は認められなかった。投与サンプルは使用時まで-80℃で保存した。

免疫およびサンプルの投与

BALB/c マウスに対して、2 μgのOVAと2 mgのAlumの混合物を、1週間毎に計3回腹腔内に投与することによって免疫した。

RJの腹腔内投与試験においては、1群6匹で行い、OVA-Alumによる3回の免疫の2日前および6時間前に各サンプルを0.2 ml腹腔内投与した。この試験における各実験群と投与量は以下の通りである。

コントロール群: 0.1% MSA、RJ 0.1群: RJ 0.1 mg/body (5 mg/kg)、RJ 0.3群: RJ 0.3 mg/body (15 mg/kg)、RJ 1.0群: RJ 1.0 mg/body (50 mg/kg)、PFE群: PFE 1.0 mg/body (50 mg/kg)

一方、RJの経口投与試験においては、1群5匹で行い、OVA-Alumによる初回免疫の1週間前より、最終免疫から4日後まで週5回のスケジュールで、胃ゾンデにて各サンプルを0.2 ml経口投与した。この試験における各実験群と投与量は以下の通りである。

コントロール群: 注射用精製水、RJ 1.0群: RJ 1.0 mg/body (50 mg/kg)、RJ 5.0群: RJ 5.0 mg/body (250 mg/kg)

投与期間中、マウスの体重を測定し、被験物質の体重変化に及ぼす影響を検討した。

脾細胞およびリンパ節細胞の培養

最終免疫の1週間後にマウスをsacrificeした。エーテル麻酔下に腹大動脈(下大動脈)より採血し、脾臓を摘出した。脾細胞を調製後、OVA (200 $\mu\text{g/ml}$)あるいはCon A (10 $\mu\text{g/ml}$ 、生化学工業社製)存在下、 1×10^7 cells/2 mlの濃度になるように10% FCS (Life Technologies社製)、 5×10^{-5} M 2-ME (和光純薬社製)含有RPMI1640培地(日水製薬社製)で調製し、37℃で2日間培養した。2日後に培養上清を回収し、上清中のサイトカイン量をELISAで測定した。またリンパ節細胞の抗原刺激によるサイトカイン産生に及ぼすRJの影響について検討した実験においては、OVAとAlumのみで1週毎に3回免疫したBALB/cマウスより、腋下、鼠蹊部及び腸間膜のリンパ節よりリンパ節細胞を得た。このリンパ節細胞(2.4×10^6 cells/well)を200 $\mu\text{g/ml}$ OVA、抗原提示細胞として50 $\mu\text{g/ml}$ マイトマイシンC (和光純薬社製)で処理(37℃、30分)したBALB/cマウス脾臓細胞(6×10^6 cells/well)の存在下、種々の濃度のRJを添加して24穴プレート中で2日間培養し、上清中のサイトカイン量をELISAにて測定した。

血液は血清を分離後、血清中OVA特異的IgE、IgG1及びIgG2a量は石原らの報告⁹⁾に準じて行った。すなわち抗OVA IgE抗体価は、IgE-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法にて、96穴マイクロプレートにrat anti-mouse IgE mAb (5 $\mu\text{g/ml}$ 、BD PharMingen)を固相化し、ビオチン標識したOVA(5 $\mu\text{g/ml}$)並びにHRP0標識streptavidin (Zymed)を用いて検出した。OVA特異的IgE抗体価は、OVA-Alumを3回投与したマウス血清(ラットPCA抗体価; 320単位)のIgE抗体価を32 U/mlとし、この血清を用いて作成した検量線(測定範囲; 1~32 U/ml)より算出した。一方血清中の総IgE量は、上記のELISAにおいてビオチン標識OVAの代わりにビオチン標識rat anti-mouse IgE mAb (5 $\mu\text{g/ml}$ 、BD PharMingen)を添加し、BD PharMingen社製のマウスIgEを標準品に用いて測定した。

抗OVA IgG1及びIgG2a抗体価の測定は間接法ELISAにて行った。すなわちマイクロプレートに直接固相化したOVAに対して、血清を段階希釈して添加しOVAに結合したIgG1及びIgG2aをそれぞれHRP0標識rat anti-mouse IgG1 mAb (Zymed)、或いはHRP0標識rat anti-mouse IgG2a mAb (BD PharMingen)を用いて検出した。IgG1抗体価は吸光度が0.5となる希釈倍率の逆数を暫定的なユニットとして表示した。IgG2a抗体価は血清を40倍希釈したときのELISAの吸

光度で比較した。

サイトカインの測定はサンドイッチELISAにて行い、そのための固相抗体(IL-2: JES6-1A2、IL-4: BVD4-1D11、IL-5: TRFK5、IL-10: JES5-2A5)およびビオチン標識抗体(IL-2: JES6-5H4、IL-4: BVD6-24G2、IL-5: TRFK4、IL-10: SXC-1、IFN- γ : XMG1.2)はBD PharMingen社より購入した。ただし、IFN- γ に対する固相抗体は、自家調製したウサギ抗マウスIFN- γ ポリクローナル抗体のIgG画分を用いた。またこれらELISA系のスタンダードは、IFN- γ は自家調製品であり、その力価をWHO国際スタンダードを用いて検定したものを用いた。その他のサイトカインについては、IL-2およびIL-10はGenzyme社、IL-4はIntergen社、IL-5はBD PharMingen社よりそれぞれ購入したものを用いた。

統計処理

各データは等分散の場合、一元配置分散分析(ANOVA)を行い、有意性がある場合、対照群との有意差をpost hoc テスト(Dunnett法)にて検定を行った。等分散性がない場合は、Kruskal-Wallis 法にて有意性を確認の後、Dunn法を用いて対照群との有意差を検定した。

結果

RJの腹腔内投与による血清中OVA特異的IgE、IgG1およびIgG2a量に及ぼす影響

RJの*in vivo*抗体産生に及ぼす影響について、PFEのそれと比較検討するため、OVA-Alumでマウスを1週ごとに3回免疫した。各免疫の2日前と6時間前の2回ずつ計6回、RJまたはPFEを腹腔内投与し、最終免疫から1週後にマウス血清中のOVA特異的IgE、IgG1およびIgG2a抗体価をそれぞれ特異的ELISAにて測定した。なお図には示していないが、RJ或いはPFEの投与によるマウスの体重の減少は見られなかった。

図1に示したように、血清中のOVA特異的IgE量は、RJを投与した群では、明らかな用量依存性は見られなかったが、すべての用量においてコントロール群に対して76~80%の有意な抑制が認められた。また、PFEの1 mg投与によってもOVA特異的IgE量は有意に抑制されていた。同様の結果はOVA特異的IgG1についても見られた。すなわちRJの0.1~1 mgの投与によりコントロール群に対して88~95%の抑制が見られ、特に0.3 mgと1 mgで有意な抑制が見られた。PFE投与群でも有意ではないが、83%の抑制が見られた。これに対して、OVA特異的IgG2a抗体価においては、どの群もコントロール群との間に有意差は見られな

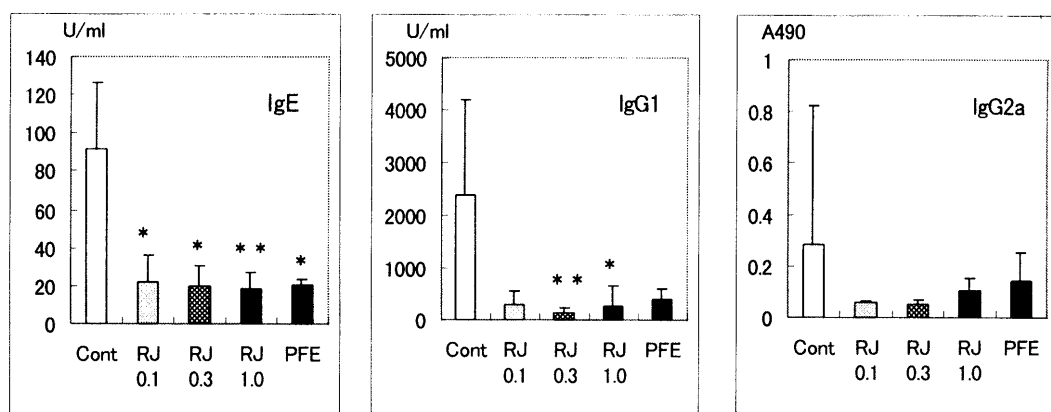


Fig.1

Effect of intraperitoneal administration of RJ (0.1, 0.3, and 1.0 mg/mouse) on the production of anti-OVA antibodies in the sera of mice immunized with OVA in alum adjuvant. The data represent the mean $\pm$ SD of six mice per group. Statistically significant when compared with control group; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

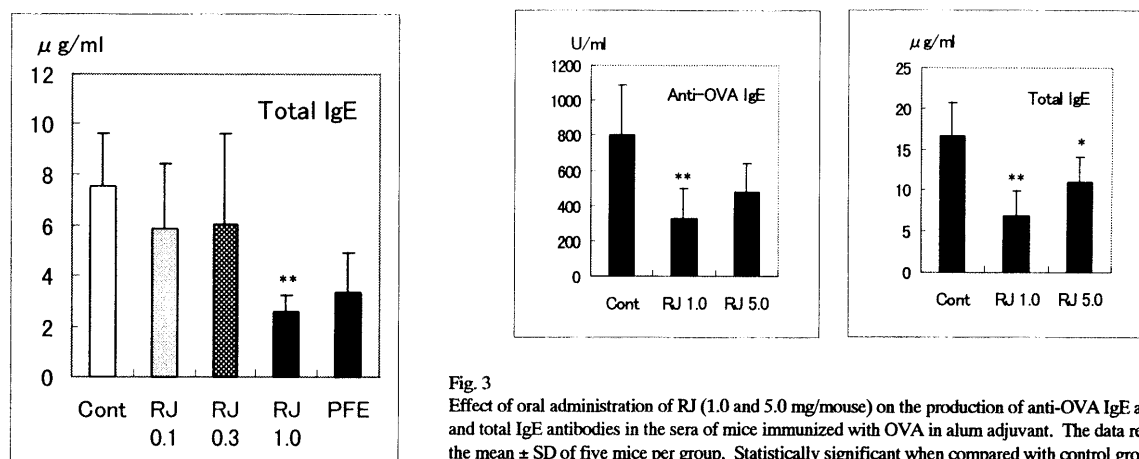


Fig. 3

Effect of oral administration of RJ (1.0 and 5.0 mg/mouse) on the production of anti-OVA IgE antibodies and total IgE antibodies in the sera of mice immunized with OVA in alum adjuvant. The data represent the mean $\pm$ SD of five mice per group. Statistically significant when compared with control group; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

Fig. 2

Effect of intraperitoneal administration of RJ (0.1, 0.3, and 1.0 mg/mouse) on the production of total IgE antibodies in the sera of mice immunized with OVA in alum adjuvant. The data represent the mean $\pm$ SD of six mice per group. Statistically significant when compared with control group; **: $p < 0.01$.

いが、特にRJ投与群ではPFE投与群よりもさらに抑制される傾向が見られた。また図2に血清中の総IgE量に及ぼすRJの影響を調べた結果を示した。OVA特異的IgE量に対しては、RJの全ての投与群で有意な抑制が見られたが、総IgE量に対しては、RJの1 mg/マウスの投与群でのみ有意な抑制が認められた。

RJの経口投与による血清中OVA特異的IgEおよび総IgE量に及ぼす影響

RJの抗アレルギー作用が、腹腔内投与だけでなく、経口

投与によっても認められるかについて検討するため、OVA-Alumによる初回免疫の1週間前より、最終免疫から4日後まで週5回のスケジュールで、RJ 1 mgおよび5 mg/マウスを経口投与し、最終免疫より1週後に血清中のOVA特異的IgEおよび総IgE量を、ELISAにて測定した。

図3に示したように、RJの経口投与により腹腔内投与で見られたのと同様に、血清中のOVA特異的IgEおよび総IgE量共に抑制され、特にRJ 1 mg/マウス投与群で両者に対して有意な抑制が見られた。

OVAで免疫したマウスの脾臓細胞からのサイトカイン産生に及ぼすRJの影響

RJを腹腔内投与し、最終免疫より1週間後にsacrificeしたマウスの脾臓細胞をOVA あるいはCon A 存在下で培養し、2日後に培養上清を回収した。その上清中のIFN- γ 、

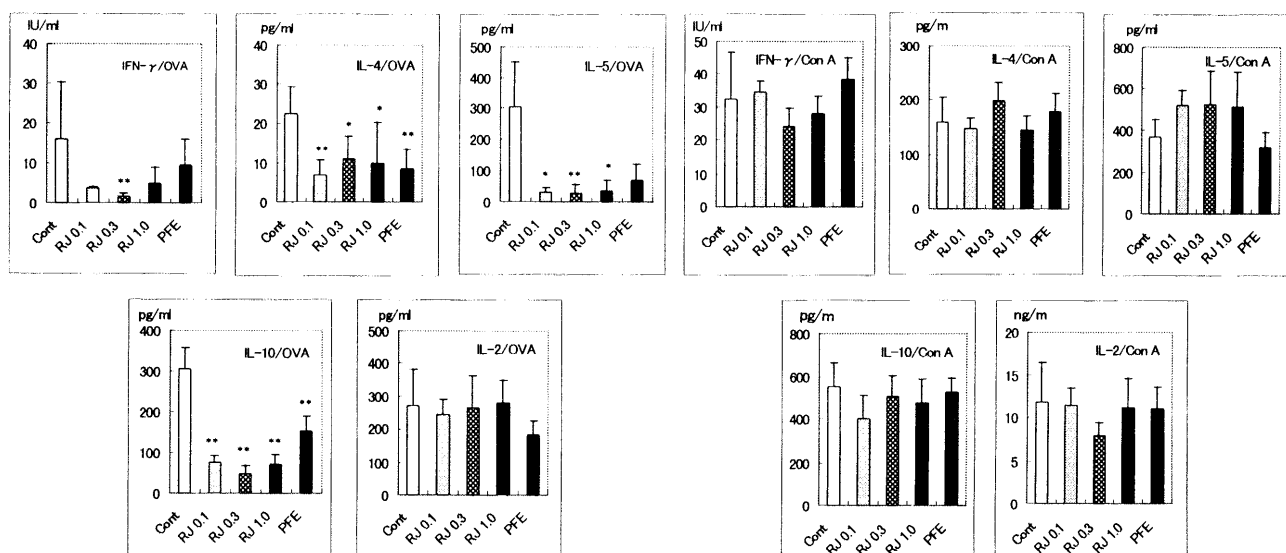


Fig. 4
Effect of intraperitoneal administration of RJ (0.1, 0.3, and 1.0 mg/mouse) on cytokine production by OVA-stimulated spleen cells from mice immunized with OVA in alum adjuvant. Assays were performed in triplicate per mouse, and data represent the mean $\pm$ SD of six mice per group. Statistically significant when compared with control group; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

IL-2、IL-4、IL-5、IL-10をELISAにより測定した (図4, 5)。その結果、図4に見られるように、OVA刺激によるIL-4、IL-5、IL-10産生に対して、RJ投与群ではいずれの投与量においてもコントロール群に対して有意な抑制が見られた。PFE投与群でもIL-4とIL-10の産生においてコントロール群に対して有意な抑制が認められた。IL-5に関しては有意ではないものの、コントロール群に対して77%の抑制が認められた。一方、IFN- γ の産生はPFE投与群ではコントロール群と有意な差は見られないが、RJ投与群ではPFE投与群よりもさらに抑制される傾向が見られ、特にRJ0.3 mgの投与群では、コントロール群に対して90%の有意な抑制が認められた。しかしながら、図4に示したようにOVA刺激によるIL-2産生は、RJ投与群、PFE投与群共にコントロール群と同等であり、有意な抑制も増強も見られなかった。

次に脾臓細胞をCon Aで刺激した時のサイトカイン産生を図5に示した。OVA刺激の場合と異なりCon A刺激では、すべてのサイトカイン産生において、コントロール群に対して有意な抑制や増強は見られなかった。

さらに、OVAとAlumで免疫したBALB/cマウスリンパ節細胞を、*in vitro*においてOVAと抗原提示細胞としてマイトマイシンC処理した同系マウス由来脾臓細胞で刺激した際のサイトカイン産生に及ぼすRJの影響を調べた。図6に示したように、腹腔内に投与した場合と同様にRJの濃度依存的にIFN- γ 、IL-4産生は有意に抑制されたが、IL-2産生にはまったく影響は見られなかった。

Fig. 5
Effect of intraperitoneal administration of RJ (0.1, 0.3, and 1.0 mg/mouse) on cytokine production by Con A-stimulated spleen cells from mice immunized with OVA in alum adjuvant. Assays were performed in triplicate per mouse, and data represent the mean $\pm$ SD of six mice per group.

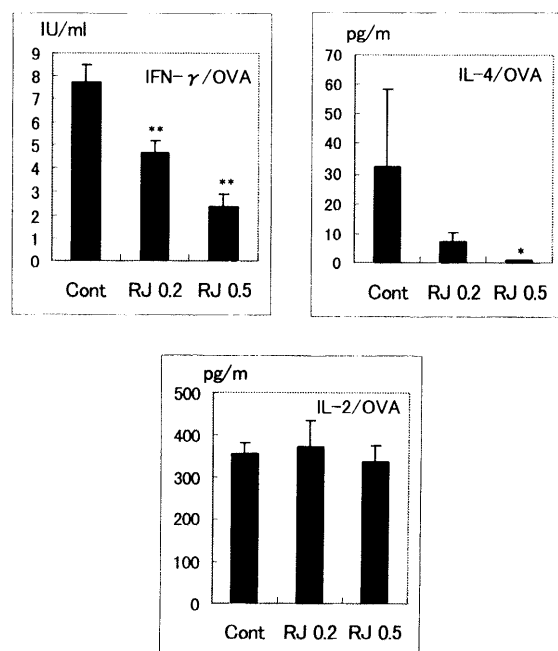


Fig. 6
Cytokine production by lymph node cells stimulated *in vitro* with OVA in the presence or absence of RJ. Lymph node cells were prepared from mice immunized with OVA in alum adjuvant. The data represent the mean $\pm$ SD of triplicate cultures. RJ 0.2 and 0.5 indicate the concentration of RJ added to the culture; 0.2 mg/ml and 0.5 mg/ml, respectively. Statistically significant when compared with control culture; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

考察

我々はすでにアカジソ葉から抽出したエキスであるPFEは、*in vitro*における分化誘導実験系において、IL-4、IL-5などのTh2サイトカインを産生する細胞への分化を抑制すること、さらにスギ花粉アレルゲンとAlumで免疫したマウスに対してPFEを腹腔内投与することにより、脾臓細胞

からのスギ花粉アレルギー特異的IFN- γ の産生には影響を及ぼさないが、Th2サイトカインの産生を有意に抑制することから、PFEにはTh1/Th2バランスを制御することによって過剰なTh2応答を抑え、結果として種々のアレルギー症状の緩和につながることを期待されることを報告している⁹⁾。

本研究において我々は、RJの抗アレルギー作用をOVA-Alumで免疫したマウスを用いて、PFEのそれと比較検討した。RJの腹腔内投与量は0.1 mg、0.3 mg、1.0 mg/マウスの3用量を用いたが、いずれの投与量においてもOVA特異的IgG1抗体、及び即時型アレルギーの発症に重要なIgE抗体の強い抑制と、これらの抗体産生へのクラススイッチに重要な役割を果たすTh2サイトカインの抑制が見られた。一方で、脾臓細胞のCon A刺激によるサイトカイン産生では抑制が見られないことから、これらの抑制は全身的な免疫抑制ではなく、マウスの免疫に用いた抗原であるOVAに特異的である。さらに、このRJによるIgEの抑制作用は、RJを腹腔内のみならず、経口投与することによっても認められた。これらの結果から考えると、RJはPFEと同様に抗アレルギー作用の期待される物質であることが示唆される。

岡らはDNP-KLHとAlumで1回感作したマウスに対して、その感作1週間前及び感作直後よりRJを1 g/kg連日経口投与することにより、血清中の総IgE量の有意な抑制と、感作マウス脾臓細胞より調製したCD4⁺ T細胞を抗CD3抗体で非特異的に刺激することによって産生されるIL-4が有意に低下することを報告している¹¹⁾。ただし、我々の今回の結果とは異なりCD4⁺ T細胞の抗CD3抗体刺激によるIFN- γ 産生は、感作1週後では影響は見られないが、感作2週後、3週後ではコントロール群に対して上昇してくることを報告している。この報告と我々の実験系では免疫に用いた抗原、免疫回数、RJの投与量及び投与回数が異なるので一概には比較できない。しかしながら、今回の実験系ではOVA-Alumで1週ごとに計3回免疫を繰り返すという、より強くIgEを誘導する条件下においても、RJの腹腔内投与、或いは経口投与により抗原特異的なIgE抗体価のみならず、総IgE量の抑制が見られ、さらには抗原特異的Th2サイトカインの抑制も認められていることから、RJには抗アレルギー作用が認められるという岡らの実験結果を支持する結果は得られたと考えている。

RJによる抗アレルギー作用の機序に関しては、詳細な解析は今後の検討課題であるが、PFEで見られたTh1/Th2バ

ランスの制御とは異なるものと考えられる。すなわち、PFEを用いて得られた以前の実験結果⁹⁾、並びに今回の実験においてPFE投与群で見られた結果とは違って、RJ投与群ではOVA刺激によるIL-2産生に抑制は見られないが、IFN- γ 産生の抑制と、IFN- γ によって産生が調節されることが報告されているIgG2a抗体が抑制される傾向が認められたことから、Th1レスポンスも抑制されていることが示唆された。同様の結果は、OVA免疫マウスリンパ節細胞を*in vitro*で抗原刺激する際にRJを添加しても認められた。

IL-2はTh1細胞のみならず、未分化のナイーブCD4陽性マウスT細胞からも産生されることが報告されている^{13, 14)}。さらに、より分化の進んだTh1細胞では、IFN- γ 産生能は維持されているが、IL-2の産性能が低下してくることが、IL-12或いは抗IL-4抗体を用いた*in vitro*における分化誘導実験の結果から報告されている^{15, 16)}。これらの結果から、分化したTh1細胞から産生されるIL-2の量は、Th0等のより未分化の細胞と比較するとそれ程高くないことが推察される。

これらの報告と、OVA特異的なIL-2産生はRJの投与によって影響を受けないことを併せて考慮すると、RJはOVA特異的なT細胞応答全体を抑制しているのではなく、OVA特異的であるが、より分化の進んだTh1、Th2細胞のレスポンスそのものを抑制しているのか、或いはOVA特異的で分化の未熟なTh前駆細胞からTh1、Th2エフェクター細胞への分化を抑制していることが考えられる。

Spiegelberg らは、ホソムギに対するアレルギー患者では全てのホソムギ特異的なT細胞がTh2へと分化しているのではなく、Th0細胞やTh細胞の前駆細胞なども単離されることを報告している¹⁷⁾。この結果から、アレルギーの刺激を受けるたびにTh前駆細胞からTh2細胞への分化も起こり、種々のアレルギー症状の発現に関与していることが考えられる。また、近年アトピー性皮膚炎患者の皮膚局所では、IL-4の発現のみならずIFN- γ の発現も見られ、しかもIFN- γ の発現レベルと症状の程度が関連していることが報告されており¹⁸⁾、アトピー性皮膚炎患者ではTh1、Th2両方がこの疾患の病態形成に関与していることも示唆されている¹⁹⁾。

以上の結果を合わせて考慮すると、RJはTh1/Th2バランスの調節というよりも、Th前駆細胞からTh1、Th2エフェクター細胞への分化を抑制することによって、これらエフェクター細胞による種々のアレルギー、もしくはアトピー症状の発現を緩和することが期待される。

引用文献

- 1) Finkelman F. D., Holmes J., Katona I. M., Urban J. F. J., Beckmann M. P., Park L. S., Schooley K. A., Coffman R. L., Mosmann T. R., Paul W. E., *Annu. Rev. Immunol.*, **8**, 303-333 (1990).
- 2) Paul W. E., Seder R. A., *Cell*, **76**, 241-251 (1994).
- 3) Romagnani S., *Immunol. Today*, **6**, 263-266 (1997).
- 4) Rocken M., Saurat J., Hauser C., *J. Immunol.* **148**, 1031-1036 (1992).
- 5) Kamogawa Y., Minasi L. A., Carding S. R., Bottomly K., Flavell R. A., *Cell*, **75**, 985-995 (1993).
- 6) Kay A. B., Ying S., Varney V., Gaga M., Durham S. R., Moqbel R., Wardlaw A. J., Hamid Q., *J. Exp. Med.*, **173**, 775-778 (1991).
- 7) Robinson D. S., Hamid Q., Ying S., Tsicopoulos A., Barkans J., Bentley A. M., Corrigan C., Durham S. R., Kay A. B., *N. Engl. J. Med.*, **326**, 298-304 (1992).
- 8) Imaoka K., Inoue S., Takahashi T., Kojima Y., *Jpn. J. Allergol.* **42**, 74-80 (1993).
- 9) Ishihara T., Okamoto I., Masaki N., Kohno K., Tanimoto T., Ikegami H., Kurimoto M., *Jpn. J. Allergol.*, **48**, 443-450 (1999).
- 10) Kotani M., Matsumoto M., Fujita A., Higa S., Wang W., Suemura M., Kishimoto T., Tanaka T., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **106**, 159-166 (2000).
- 11) Oka H., Emori Y., Kobayashi N., Hayashi Y., Nomoto K., *Biotherapy*, **14**, 145-150 (2000).
- 12) Nakajima M., *New Food Industry*, **36**, 54-64 (1994).
- 13) Ehlers S., Smith K. A., *J. Exp. Med.*, **173**, 25-36 (1991).
- 14) Swain S. L., McKenzie D. T., Weiberg A. D., Hancock W., *J. Immunol.*, **141**, 3445-3455 (1988).
- 15) Bucy R. P., Panoskaltis-Mortari A., Huang G.-Q., Li J., Karr L., Ross M., Russell J. H., Murphy K. M., Weaver C. T., *J. Exp. Med.*, **180**, 1251-1262 (1994).
- 16) Lederer J. A., Perez V. L., DesRoches L., Kim S. M., Abbas A. K., Lichtman A. H., *J. Exp. Med.*, **184**, 397-406 (1996).
- 17) Spiegelberg H. L., Beck L., Stevenson D. D., Ishioka G. Y., *J. Immunol.*, **152**, 4706-4711 (1994).
- 18) Grewe M., Gyufko K., Schopf E., Krutmann J., *Lancet*, **343**, 25-26 (1994).
- 19) Grewe M., Bruijnzeel-Koomen C. A. F. M., Schöpf E., Thepen T., Langeveld-Wildschut A. G., Ruzicka T., Krutmann J., *Immunol. Today*, **19**, 359-361 (1998).