

低アレルギー発症性が言及されている鶏卵の 機能特性に関する動物実験

長門久美子・阿部 浅樹・橋原 清顕・近藤 康博

(応用動物科学コース)

Animal Experiment on Functional Features of Eggs Stated to be Hypoallergenic for People with Food Allergies

Kumiko Nagato, Asaki Abe, Kiyooki Narabara and Yasuhiro Kondo

(Course of Applied Animal Science)

Functional features concerned with low proallergic natures were examined using an allergy-inducible rat strain (Brown Norway rat; BN rat) on hen's eggs which have been empirically mentioned as hypoallergenic for patients suffering from food allergies (experimental eggs). BN rats were fed on feed containing whole experimental eggs (feed E) and whole normal eggs (control feed, feed C). The densities of immunoglobulin E (IgE)-positive cells, have reported to be IgE-bearing mast cells, in the jejunum and ileum of BN rats fed on experimental-egg-containing feed were lower than those of BN rats fed on normal-egg-containing feed. The number of blood eosinophils was also lower in BN rats fed on feed E. Serum IgE levels were no different between BN rats fed on feed E and feed C. These results indicate that the low proallergic nature of hen's eggs studied in the present study is due to the decreased ability of experimental eggs to facilitate the proliferation and induction of mast cells in the intestinal tissue.

Key words : egg, food allergy, IgE, mast cells

緒 言

特定の食品を摂取することによって引き起こされるアレルギー症状、すなわち、食物アレルギーは多くの食品について報告されているが、このうち、小麦、そば、卵、乳、落花生の5品目はアレルギーの発症例数や症状の重篤性から、特に重視すべき食物アレルゲンであると考えられており、これらを含む加工食品には原材料に使用していることを明記すべきことが食品衛生法の第19条によって義務付けられてもいる。

わが国では、上記の5品目のなかでも食卵によるアレルギーの発症が最も多いことが報告されており¹⁾、早急に食卵アレルギーへの対策を講じる必要性が指摘されている。

食物アレルギーの対策の主流はアレルゲン除去食、すなわち、人為的にアレルゲンを除去した食品の利用である。このような人為的な低アレルゲン食品の開発・利用には、アレルギー誘発食材の不使用、食材からのアレルゲンの除去、アレルゲン構造の破壊などの方法があるが、食材から完全にアレルゲンを取り除くことが難しい、コストがかかることなどの問題点がある。このような現状から、自然素材のまま低アレルゲン誘発性を示す食品を開発することの必要性が指摘されており、特に食品としての重要度が大きい低アレルゲン誘発性鶏卵の開発は

大きな意義を持っていると考えられる。

岡山県笠岡市で生産されている健康モミジ卵(採女ファーム)は、これまで鶏卵アレルギーを引き起こすヒトが摂取してもアレルギー症状が出現しないことが消費者の間で経験的に指摘されている鶏卵である。この鶏卵はアレルギー発症性について遺伝的に改変された鶏に由来するものではなく、指摘されている低アレルギー発症性は遺伝子の変化によるものとは思われない。この鶏卵で指摘されている低アレルギー誘発性の原因は卵の成分の違いによるものであることはおそらく疑い得ない事実ではあるが、この鶏卵の一般的な成分と他の鶏卵の成分の間に大きな違いはなく、いまだ物質レベルでの低アレルギー性の原因は明らかにされていない。

アレルギー発症のバックグラウンドをなしている免疫系と神経系は相互に影響を与え合っていることが知られており、経験的に特定の食物でアレルギーになったヒトはその食物を見ただけでもアレルギーが発症することもある²⁾。この結果を裏返せば、鶏卵アレルギーを持つヒトに、ある鶏卵を食べてもアレルギー症状が出にくいと教

Received October 1, 2008

岡山大学大学院自然科学研究科

(The Graduate School of Natural Science and Technology,
Okayama University)

示するだけで実際にその鶏卵によるアレルギー症状が低減される可能性もあるのではないと思われる。したがって、この鶏卵を摂取することによってアレルギーが発症しにくい事実が心因性のものではないことがまず明らかにされなければならない。さらに、この鶏卵を摂取した動物やヒトにおいて生じる反応が一般の卵を摂取した反応と異なることが科学的に明らかにされなければならない。

以上の点を踏まえて、本実験では、アレルギー好発性のラットと正常のラットの2系統を用いて、この鶏卵と市販されている別種の鶏卵をそれぞれ長期間摂取させて、これらのラット体内でアレルギーの発症に関係する諸数値の変化を比較することによって低アレルギー誘発性の科学的な根拠を見いだして、この鶏卵の機能性の有無を明らかにしようとした。

材料と方法

1) 供試動物

試験には3週齢のアレルギー好発ラットであるBrown Norwayラット(BNラット, 日本チャールスリバー)³⁾と、同じ週齢の正常ラットであるWistarラット(日本チャールスリバー)をそれぞれ15頭用いた。BNラットとWistarラットについてそれぞれ試験卵投与群、普通卵投与群およびコントロール群を設定してそれぞれの群につき5頭ずつのラットを振り分けた。動物は23±1℃の飼育室で2から3頭ずつ飼育ケージで飼育した。

後述のように鶏卵で抗原感作した後、1週間は通常のラット用固形飼料で飼育し、その後それぞれの試験試料によって42日間飼育した。飼育期間中は試料と水は自由に摂取させた。飼育期間中は毎日ケージごとの摂食量を測定し、4週齢からは一日おきに体重を測定した。試験期間を通じてラットの外部所見(脱毛など)臨床所見(目の充血, 下痢・軟便, 呼吸症状など)について観察した。

飼育期間終了後にエーテル麻酔下で開腹して腹部大動脈から採血し、同時に空腸, 回腸, 肺の一部を採取した。

2) 試験飼料

4週齢以降には、市販の粉末飼料(オリエンタル酵母, 実験動物用粉末飼料)を基礎飼料として試験卵投与群には健康もみじ卵(采女ファーム)を重量として25%添加した練餌飼料(Feed E)を、普通卵投与群には市販の鶏卵を同様に25%添加した練餌飼料(Feed C)を与えた。コントロール群には鶏卵投与群用の飼料と同じ水分含量になるように蒸留水を添加した飼料(Normal feed)を与えた。

3) 抗原感作(鶏卵感作)

3週齢時に、それぞれの鶏卵を攪拌して液卵状態とし、同量のフロイントコンプリートパジュバント(DIFCO)を加えて作成したエマルジョン2mlを腹腔内に投与して

抗原感作した。コントロール群には鶏卵の代わりに蒸留水を用いて同様に投与した。

4) 血液の測定

血液中の赤血球数と総白血球数を測定するとともに、ヘマトクリット値を測定した。さらに血液塗抹標本をギムザ染色して血液白血球中の好中球, リンパ球, 単球, 好酸球および好塩基球の割合を測定し、総白血球数に基づいてそれぞれの白血球数を求めた。血漿を分離して、ラットイムノグロブリンE(IgE)測定用ELISAキット(シバヤギ社製, AKRIE-011)によって血漿中のIgE濃度を測定した。

5) 組織中のIgE陽性細胞数の測定

空腸, 回腸および肺の組織片をホルマリンで固定して定法に従ってパラフィン包埋して3μm厚の組織切片を作成した。脱パラフィン後, 1% H_2O_2 エタノールで30分間クエンチング処理した。ついで, 5%ヤギ血清含有PBSで30分間ブロッキング処理し, 5%ヤギ血清含有PBSで800倍に希釈したマウス抗ラットIgE抗体(アズカム社)を滴下して室温で1時間反応させ一次抗体処理した。ついで, 室温で30分間ビオチン標識抗マウスイムノグロブリン・ヤギ抗体(ZyMax社)に反応させて2次抗体処理を行った。抗体処理後にストレプトアビジンHRP(ダゴジャパン社)で30分間処理し, DAB反応液で発色させた。流水で反応を停止させた後, メチルグリーンで核の対比染色を行った。以上のように作成した組織標本中で褐色に染色された細胞をIgE陽性細胞としてそれらの細胞数を計測した。組織像の写真撮影を行い, 撮影した組織像から画像処理によって求めた組織の面積から組織1mm²あたりの陽性細胞数を求めた。

6) 統計処理

すべてのデータは各群5頭の平均±標準偏差で示した。各群の摂食量と体重の差については二元配置分散分析によって, その他の値の差についてはt検定によって有意性の検定を行った。

結 果

1. 摂食量, 体重および外部所見・臨床所見

BNラット, Wistarラットともに, 摂食量と体重は成長に伴って増加した(Fig. 1, 2)。BNラットの作出・販売元であるチャールズリバー社の公表データ(2006)において報告されていると同様, BNラットでは摂食量, 体重ともにWistarラットに比較して低い値が認められた。Wistarラットの摂食量では, 試験卵投与群と普通卵投与群ではコントロール群に比較して有意に低い値が($P<0.05$), BNラットではコントロール群に対して普通卵投与群で有意に低い値($p<0.05$)が観察されたがいずれの差もそれほど大きいものではなかった。一方, BNラット, Wistarラットともに, 体重には各群間の差は認められなかった。外部所見と臨床所見については試

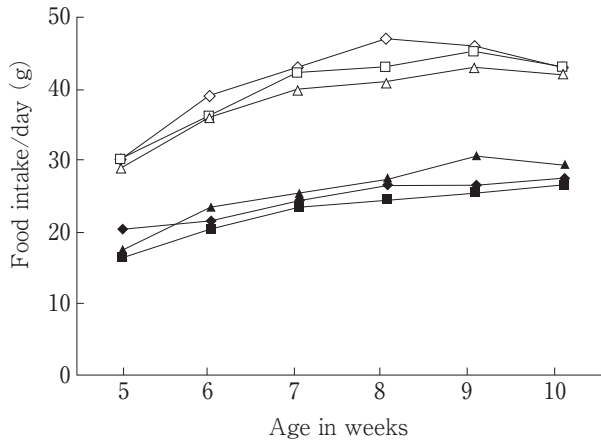


Fig. 1 Daily food intake. ◇, □ and △ represent the data of Wistar rats on normal feed, control feed (feed C) and experimental feed (feed E), respectively. ◆, ■ and ▲ represent the data of BN rats fed on normal feed, feed C and feed E, respectively.

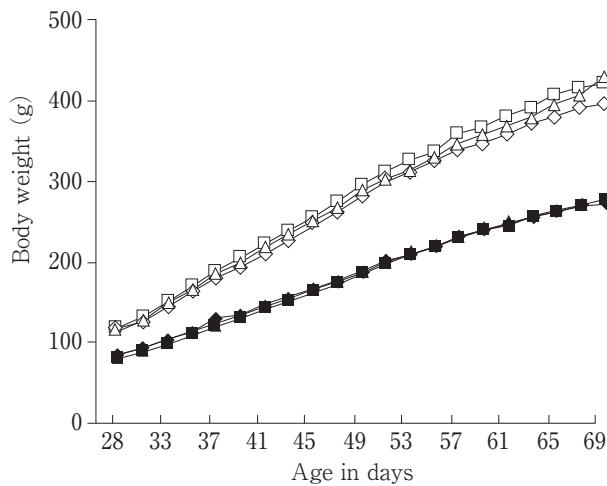


Fig. 2 Body weights of rats. ◇, □ and △ represent the data of Wistar rats on normal feed, control feed (feed C) and experimental feed (feed E), respectively. ◆, ■ and ▲ represent the data of BN rats on normal feed, feed C and feed E, respectively.

験期間を通じてすべての群においてなんらの異常も観察されなかった。

2. 赤血球数、ヘマトクリット値および白血球数

赤血球数とヘマトクリット値では、BN ラットと Wistar ラットの間には差はなく、また、それぞれのラットの各投与群間の差も認められなかった（データ示さず）。両ラットともに、総白血球数において群間の差は認められなかったが、各群において BN ラットの値は Wistar ラットよりも高かった（Fig. 3 A）。リンパ球数はいずれの群においても Wistar ラットよりも BN ラッ

トで有意に高かった（Fig. 3 B）。BN ラットでは、普通卵投与群の値はコントロール群に対して有意に低かった（Fig. 3 B）。コントロール群と試験卵投与群の好中球数はリンパ球数とは逆に BN ラットに比べて Wistar ラットで有意に高かった（Fig. 3 C）。BN ラットの好中球数は普通卵投与によって有意に上昇した。BN ラットでは、コントロール群と普通卵投与群の好酸球は Wistar ラットに比較して高く、普通卵投与群では両系統の間に有意な差が認められた。また BN ラットでは、試験卵投与群の好酸球数はコントロール群に比較して低下する傾向が認められた（Fig. 3 D）。単球数には系統間ならびに試験区間の差は見られなかった（データ示さず）。

3. 血漿 IgE 濃度

Wistar ラットの血漿中 IgE 濃度はいずれの群においても 20 から 30 ng/ml であったのに対して、BN ラットでは 200 から 300 ng/ml と有意に高い値が認められた（Fig. 4）。Wistar ラット、BN ラットともに、試験卵投与群の値はコントロール群の値に比較して高い傾向が認められたが有意な差はなかった。

4. IgE 陽性細胞数

ラット IgE 抗体を用いた免疫組織化学染色によって、空腸、回腸（Fig. 5）および肺には IgE 陽性細胞が観察された。Fig. 5 において矢印で示されているように、回腸の絨毛の粘膜固有層や腸陰窩周辺の粘膜固有層には褐色に染色された IgE 陽性細胞が観察された。空腸でも同様の細胞の分布が認められた。また肺では、肺胞壁や気管支の結合組織中に同様の IgE 陽性細胞が観察された。Wistar ラットの空腸と回腸の組織 1 mm² に存在する IgE 陽性細胞数はコントロール群、普通卵投与群および試験卵投与群の間に差は認められなかった（Fig. 6 A, B）。一方、BN ラットの空腸と回腸では、IgE 陽性細胞の密度は普通卵投与によって上昇する傾向が認められた。試験卵投与群ではこの細胞密度は逆に低下し、空腸と回腸の組織では普通卵投与群と試験卵投与群の間に有意な差が認められた（Fig. 6 A, B）。Wistar ラットの肺組織の IgE 陽性細胞は試験卵投与によって有意に減少した。BN ラットでも試験卵投与群の細胞密度は低下したがコントロール群との間に有意な差は認められなかった（Fig. 6 C）。

考 察

アレルギー好発性ラットである BN ラットでは、血中の総白血球数、リンパ球数、好酸球数、血漿 IgE 濃度、空腸、回腸の IgE 陽性細胞数は Wistar ラットに比べて有意に高かった。これらの項目はすべてアレルギーの発症に関連するものであり、これらの結果は BN ラットのアレルギー好発性を反映しているとともに、本研究で行ったこれらの測定の信頼性を実証している。

アレルギーに関する動物実験では用いた実験系が適切

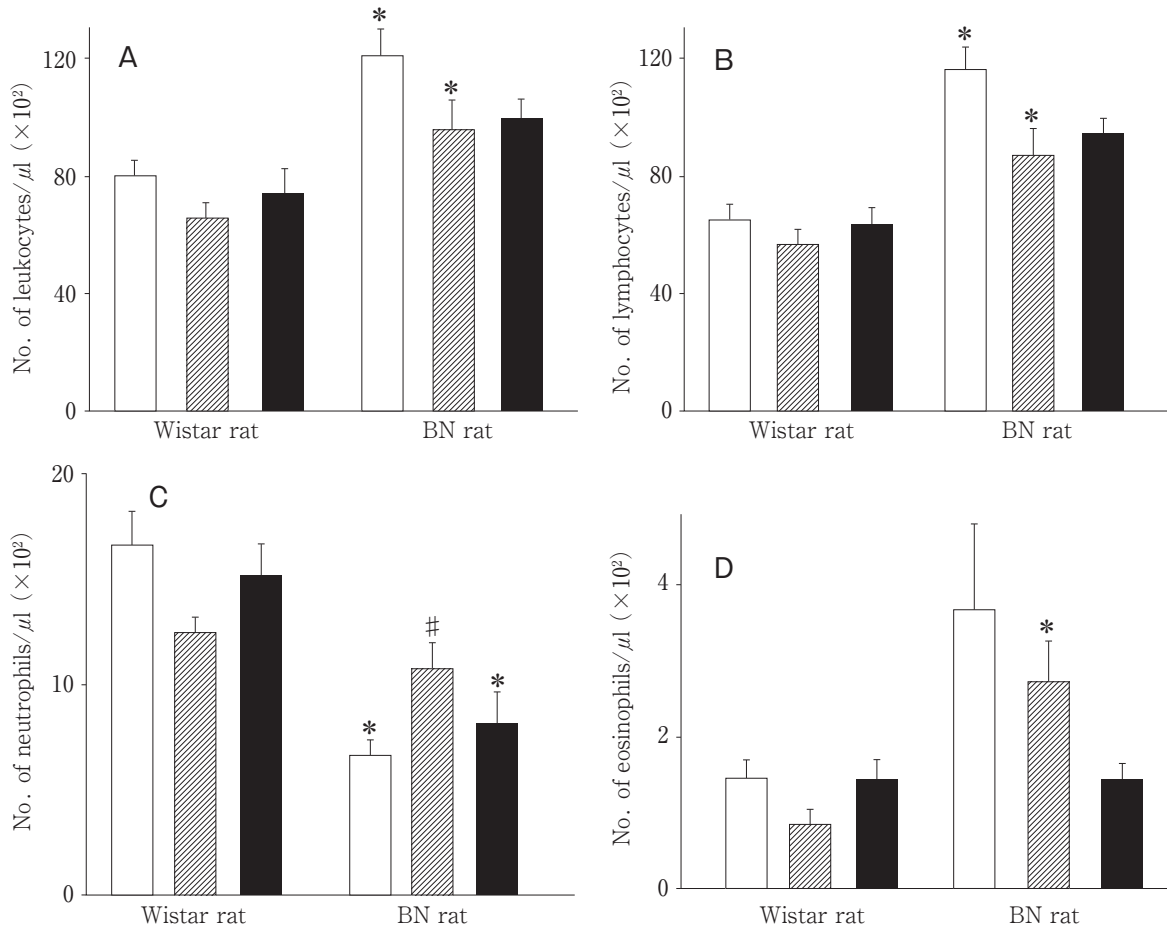


Fig. 3 White blood cell counts in the blood of rats on normal feed (blank columns), feed C (shadowed columns) and feed E (black columns). A) total white blood cell (WBC) counts, B) lymphocyte counts, C) neutrophil counts and D) eosinophil counts. * =significantly different from corresponding group of Wistar rats. # =significantly different from rats on normal feed.

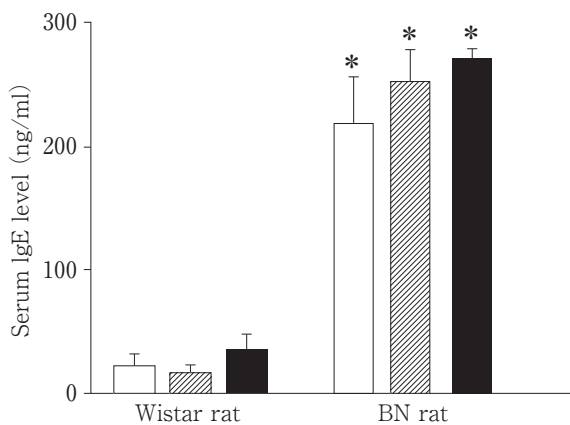


Fig. 4 IgE levels in the plasma of rats on normal feed (blank columns), feed C (shadowed columns) and feed E (black columns). * =significantly different from corresponding group of Wistar rats.

であるか否かが重要な問題である。すなわち、用いたアレルゲンと実験動物の系においてアレルギーが誘導されていることが評価の必要条件である。本実験では、BNラットにおいてアレルギー症状の発現に直接的に関与する血漿中のIgE濃度が卵の投与によって上昇すること、さらには、同様にアレルギー症状の発現に直接的に関与するIgE陽性細胞は特に小腸組織において普通卵投与によって上昇することが示され、用いた実験系はアレルギーの検定に適切であったと思われる。

食物アレルギーは免疫グロブリンEを介して起こる即時型アレルギーの一種であり、抗原を経口的に摂取することによって引き起こされる。消化管粘膜から侵入した抗原情報は抗原提示細胞、T細胞を経由する種々の免疫細胞の応答を経てIgE産生B細胞に至る⁴⁾。B細胞によって産生された抗原特異的なIgEは粘膜や間質の結合組織に多く存在する肥満細胞や血液中の好塩基球のIgE、受容体に結合する。これらの白血球の細胞質に多く含まれる顆粒中にはヒスタミンなどの炎症性メディエ

ーターが存在しており, IgE 受容体に抗原 (アレルゲン) が結合することによってこれらのメディエーターが細胞外に放出されて各種の炎症上昇が惹起される⁵⁾. 本実験で最も注目される実験結果はアレルギー好発ラットであ

る BN ラットの空腸と回腸の IgE 陽性細胞の密度は普通卵の投与によって上昇するのに対して, 試験卵投与群の値には上昇がみられず, 無投与群よりもさらに低下したことである. 組織中の IgE 陽性細胞は, 組織中に存在する IgE 産生 B 細胞と組織肥満細胞の 2 種類から構成されていると考えられているが, このうち IgE 産生細胞の割合は極めて低く, 大部分は肥満細胞であるとされている⁶⁾. 本実験において試験卵投与 BN ラットの血漿 IgE 濃度は低下せず, 組織中の IgE 陽性細胞密度の変化と血漿 IgE 濃度との相関は認められなかったことは BN ラットの組織中の IgE 陽性細胞のほとんどは肥満細胞である可能性を支持している. 試験卵を投与された BN ラットでは普通卵で起こる小腸の肥満細胞密度の上昇は有意に低下しており, 本実験で検定した試験卵の摂取した BN ラットでは特異的に小腸の肥満細胞数が減少したことを示している. この結果はこれまで経験的に言及されてきた試験卵 (健康もみじ卵) の低アレルギー誘発性の科学的根拠の一つを示していると考えられる.

BN ラットでは試験卵投与群の血中の好酸球数はコントロール群や普通卵投与群と比較して低下した. 好酸球は炎症の発現に関与する白血球の一種であることが知られており^{6,7)}, 試験卵が血中の好酸球数を上昇させないこともこの卵の低アレルギー発症性の一因である可能性があると考えられる.

肥満細胞や好塩基球あるいは好酸球は骨髄において分化因子の影響を受けて未分化な細胞から成熟細胞に分化して末梢血や組織中に存在している. 食物アレルギーなどの即時型アレルギーでは, アレルゲンの侵入から炎症症状の発現の過程においてこれらの白血球が局所に誘導されることが知られている⁸⁾. したがって, 本実験の試験卵によって組織や血中でこれらの細胞が増加しにくい

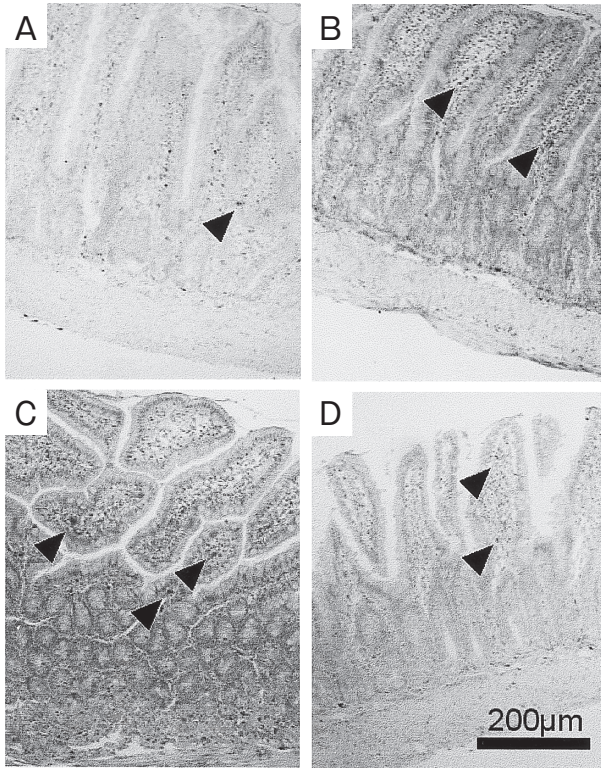


Fig. 5 IgE-positive cells in the ileum of rats. Arrowheads indicate representative IgE-positive cells. A) Wistar rats on normal feed, B) BN rats on normal feed, C) BN rats on feed C, D) BN rats on feed E.

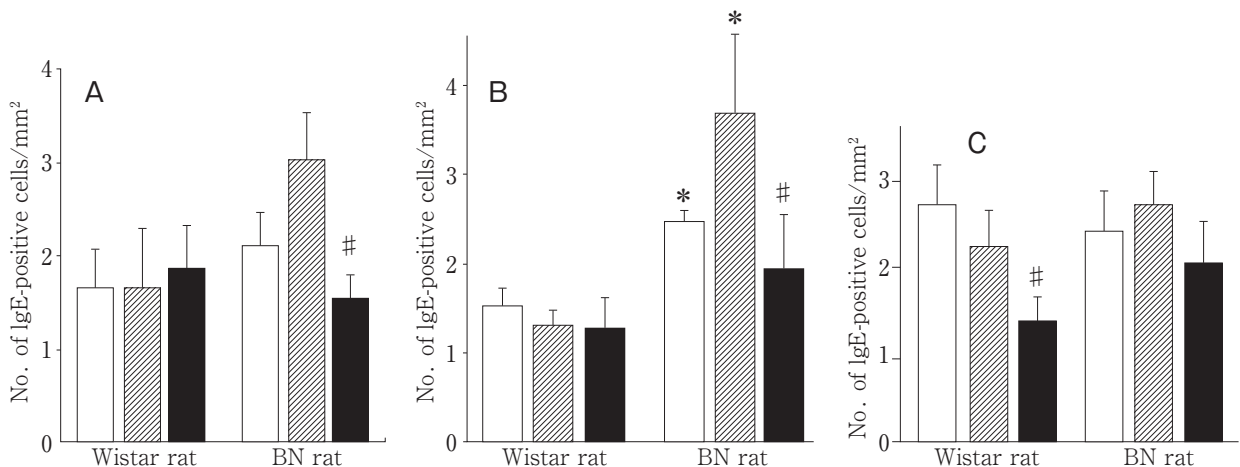


Fig. 6 Number of IgE-positive cells in the jejunum (A), ileum (B) and lung (C) of rats on normal feed (blank columns), feed C (shaded columns) and feed E (black columns). * = significantly different from corresponding group of Wistar rats. # = significantly different from rats fed on normal feed.

原因の一つとしてこの卵の摂取ではこれらの細胞が動員されにくいことがあげられる。白血球の分化を誘導する因子は多数知られており⁹⁾、このうち肥満細胞や好酸球が含まれる骨髄性白血球の分化に関与する因子としてインターロイキン-3 (IL-3)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、IL-1 やIL-6 があげられる。さらに、好酸球の分化に直接的に関係する因子としてIL-5 が報告されている¹⁰⁾。一方、肥満細胞の分化・誘導に直接関与する因子はいまだ明らかにされていないが、前述の因子のうちのいくつかはアレルゲンの侵入に伴うアレルギー発症に関与していることが知られている⁹⁾。試験卵投与 BN ラットの組織肥満細胞密度は普通卵投与ラットと比較して有意に低い本実験の結果は、アレルギー性の個体においてこれらの因子の誘導は普通卵を摂取した場合と比較して試験卵を摂取した場合において低く、そのために試験卵は組織の肥満細胞の増加をひきおこさなかった可能性を示唆している。

本研究で調査した試験卵の投与は血漿 IgE レベルに影響することなく、即時型アレルギーの発症に関与する肥満細胞などの白血球数の上昇を引き起こさない機構によって食物アレルギーを誘発させないことが示唆された。しかし、本研究で用いた試験卵や肥満細胞などの白血球数の上昇を誘導しにくい原因となり得る卵の性質については明らかにではない。低アレルギー誘発性の鶏卵の開発はこれまでもなされてきており、ヨード含量が多い鶏卵では、肥満細胞からの炎症性メディエーターの放出が抑制されることが報告されている¹¹⁾が、本研究の場合と同様、このような機能をもたらすこの卵の性質についてはまったく明らかにされていない。食物アレルギーの原因物質は主としてタンパク質であることが知られており、鶏卵ではオボアルブミンやオボムコイドなどの卵白のタンパク質が主なアレルゲンであると指摘されている。一方、卵黄にもアレルゲンが含まれていることも報告されており¹²⁾、いまだすべてのアレルゲンが明らかになっているとはいえない。本研究で試験した鶏卵のタンパク質組成の特殊性が低アレルギー発症性に関係している可能性もあり、この面での検討が必要である。以前の調査では、本試験鶏卵の組成を市販の鶏卵と比較すると、トリプトファンのレベルが0.28倍と低下していることが明らかにされている(未発表)。肥満細胞にも存在しており、炎症性メディエーターとして機能するセロトニンの直接的な前駆体がトリプトファンのレベル低下が低アレルギー発症性の一因である可能性は否定できない。

小腸粘膜の上皮細胞層にはM細胞と呼ばれる一種の貪食性細胞が存在している¹³⁾。この細胞はタンパク質などの高分子の物質を消化管から体内に取り込む能力を持つことが知られていることから食物アレルギーの発症に大きく関与していることが知られている。本研究で明らか

になった試験鶏卵に伴う肥満細胞などの誘導抑制が消化管のM細胞によって取り込まれるべき鶏卵成分の差異によって生じている可能性が考慮されるべきである。また消化管では、摂取物は腸内フローラによってある程度の修飾を受けるが、腸内フローラの違いが腸内の摂取物における異なる修飾を引き起こすことが想定できる。一般の鶏卵と本研究における試験鶏卵の何らかの成分上の違いが腸内フローラの割合に変化を生じさせたことが鶏卵成分の異なる修飾を誘導した結果、異なる物質がM細胞を介して体内に取り込まれたことが肥満細胞などの誘導性の違いとなって現れたと推論することも可能である。今後これらの点に関する検討も必要であろう。

要 約

食物アレルギーを持つ消費者の経験に基づいて低アレルギー誘発性であることが言及されている鶏卵について、低アレルギー誘発性の有無と科学的な根拠を明らかにするために動物を用いた実験をおこなった。実験にはアレルギーを発症することが知られているラットの系統である Brown Norway rat (BN ラット) を用い、この鶏卵を混ぜ込んだ飼料で飼育した。対照として、市販の鶏卵(普通卵)で同様に飼育した。試験卵で飼育した BN ラットでは、空腸と回腸組織の IgE 陽性細胞の密度は普通卵で飼育した場合と比較して大きく低下した。組織中の IgE 陽性細胞の大部分は肥満細胞であることが知られていることから試験卵群における小腸組織の肥満細胞密度は低下した。さらに、血中の好酸球数は同様に試験卵による飼育で低下した。一方、血清の IgE 濃度には摂取させた卵による違いは認められなかった。以上の結果は、試験卵を摂取した場合、通常の卵の摂取に比較して即時型アレルギー症状の発症に直接的に関与する肥満細胞と好酸球の誘導や増殖が促進されにくいと考えられ、このことが、試験卵がアレルギーを引き起こしにくい一因であると推察される。

引用文献

- 1) 今井孝成・海老沢元宏：食物アレルギーの疫学。pp. 2-3, 厚生労働科学研究班によるアレルギー診療の手引き(2005)
- 2) 横山三男：神経・内分泌による免疫調節機構。神経内分泌免疫学：第1版(井村裕夫, 堀 哲郎, 村松繁編), pp. 73-169, 朝倉書店, 東京(1993)
- 3) Knippels, L.M.J., Houben, G.F., Spanhaak, S. and A.H. Penninks : An oral sensitization model in Brown Norway rats to screen for potential allergenicity of food proteins. *Methods*, **19**, 78-82 (1999)
- 4) Kim, T.S., K.M. Kim, Shin, B.A. and S.Y. Hwang : Efficiency induction of an antigen-specific, T helper type 1 immune response by interleukin-12-secreting fibroblasts. *Immunology*, **100**, 203-208 (2000)
- 5) Ahlstedt, S. and L.A. Hanson : IgE-positive duodenal mast cells in patients with food-related diarrhea. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.*, **95**, 86-91 (1991)

- 6) Blom, H.M., Godthelp, T., Fokkens, W.J. Klein, J.A., Holm, A.F., Vroom, T.M. and F. Rijntjes : Mast cells, eosinophils and IgE-positive cells in the nasal mucosa of patients with vasomotor rhinitis. An immunohistochemical study. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, **252** Suppl. 1, S33-39 (1995)
- 7) 小池隆夫 : 免疫反応による組織障害ーアレルギー. 医科免疫学改定第4 (菊池浩吉編), pp. 373-378, 南江堂, 東京 (1998)
- 8) Bishoff, S.C : Food allergies. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, **8**, 374-382 (2006)
- 9) Abbas, A.K and A.H. Lichtman : Cytokine, Cellular and Molecular Immunology fifth ed., pp. 243-274, Saunders, Philadelphia (2003)
- 10) Park, Y.J., Oh, E.J., Park, J.W. Kim, M. and K. Han : Plasma eosinophil cationic protein, interleukin-5, and ECP/E0 count ratio in patients with various eosinophilic disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **36**, 262-266 (2005)
- 11) Inoue, H., Funayama, H., Sekimoto, K., Miura, E, and N. Kumagai : The suppressive mechanism of histamine release from rat peritoneal mast cells of iodine-enriched eggs. *Int. J. Tissue React.*, **19**, 78-82 (1999)
- 12) Anet, J., Back, J.F., Baker, R.S., Barnett, D., Burley, R.W. and M.E. Howden : Allergens in the white and yolk of hen's egg. A study of IgE binding by egg proteins. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **77**, 364-371 (1985)
- 13) Kanaya, T., Miyazawa, K., Takakura, I., Itani, W., Watanabe, K., Ohwada, S., Kitazawa, H., Rose, M.T., McConochie, H.R., Okana, H., Yamaguchi, T. and H. Aso : Differentiation of a murine intestinal epithelial cell line (MIE) toward the M cell lineage. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **295**, G273-284 (2008)