

アレルギー自動計測用免疫センサーシステムの開発

樋口, 元信

九州大学大学院生物資源環境科学研究科生物機能科学専攻食品バイオ工学講座

桑野, 貴久

九州大学大学院生物資源環境科学研究科生物機能科学専攻食品バイオ工学講座

松本, 清

九州大学大学院生物資源環境科学研究科生物機能科学専攻食品バイオ工学講座

<https://doi.org/10.15017/23628>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 54 (1/2), pp.7-16, 1999-11. 九州大学農学部

バージョン：

権利関係：

アレルギー自動計測用免疫センサーシステムの開発

樋口 元信・桑野 貴久・松本 清

九州大学大学院生物資源環境科学研究科
生物機能科学専攻食品バイオ工学講座
(1999年7月27日受付, 1999年8月24日受理)

Development of Automatic Immunosensor System for Quantification of Allergens

Motonobu HIGUCHI, Takahisa KUWANO and Kiyoshi MATSUMOTO

Institute of Food Biotechnology, Department of Bioscience and Biotechnology,
Division of Bioresource and Bioenvironmental Sciences,
Graduate School Kyushu University, Fukuoka 812-8581

緒 言

現在, 何らかのアレルギー症状をもつ者は, 国民の3人に1人と云われ(厚生省, 1991; 上野川, 1992), アレルギーは「新たな国民病」としてその対策が重要課題となっている。食物アレルギーを起こす食材としては, 卵が最も多く, 牛乳, 畜肉, 魚によるアレルギー発症が認められている(上野川, 1992; 矢田, 1994)。また, そば, ピーナッツについては死亡例があることから特に関心を集めている(上野川, 1992; Hefle, 1996)。食物アレルギーは, 他の多くのアレルギー発症の引き金となる(アレルギーマーチ)(菅野, 1995)と考えられるところから, 食物アレルギー発症の解明及びアレルギーの検定が重要である。

食品中のアレルギー測定法としては, 酵素免疫測定法(EIA法)の他に, 放射性同位元素を標識として用いる方法(RAST法)(Ceska, 1972), 動物を用いて測定する方法(PCA法)(山村, 1972)等があるが, RAST法は放射性元素を用いるため取り扱いが難しく, PCA法は動物検定系のため施設及び多大の時間を要する。EIA法は, 通常イムノプレートやプラスチックボール等の固相に抗体を固定化して測定しているが(Taylor, 1996; Tsuji, 1993; Hattori, 1992; Smith, 1996), それらの測定法はバッチ式であるため, 測定に多大の時間と時間を要する。しかも, 固相を再生し再利用する事が出来ないため測定後は使い捨てとなり, 経済的ロスも大きい。

一般に, 固相の再生法としては, pH 1~2 かつ強いイオン強度条件下で抗原-抗体結合を切断し, 抗体を固相表面に残す方法がとられるが(Alwis, 1985, 1987; Mattiasson, 1977), 完全に切断することは難しい上, 抗体の変性や脱離の問題を抱えている。

本研究では, 食物アレルギーの簡易迅速かつ自動的な計測システムを確立するため, 食物アレルギーの代表例であるオボアルブミン測定用の再生可能な免疫センサーを開発することを目的とした。測定法としては, EIA法を用い酵素標識抗体としてアルカリホスファターゼを用いる蛍光検出法を採用し, 高感度化を図ると共に, 再生可能な固相としてグラッシーカーボンを用い(Huet, 1993), 測定後電極表面に電圧を印加することにより表面クリーニングを行なう自動フローシステムを開発した。本測定法と固相再生法の概念をFig. 1に示す。同様のシステムで, 測定対象を他のアレルギー(β -ラクトグロブリン, オボムコイド等)に拡張した。本研究は, 現在多大の時間と労力を要している食物アレルギーの簡易迅速な計測システムを提供するもので, 食品を選択する上で極めて有効である。

実験方法

1. 試薬及び材料

ラット IgG, 抗ラット IgG (H+L) (アフィニティー精製ポリクローナル抗体), ペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG (H+L) (アフィニティー精製ポリクローナル抗体), アルカリフォスファターゼ標識抗ラット

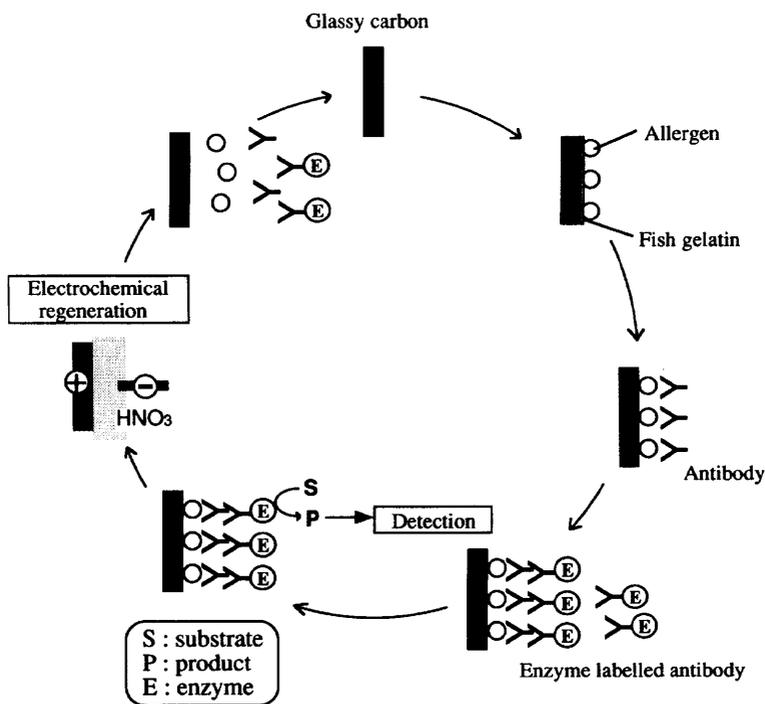


Fig. 1. Scheme of continuous measurement of food allergen.

IgG (H+L) (アフィニティー精製ポリクローナル抗体), アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG (H+L) (アフィニティー精製ポリクローナル抗体) はオルガノン・テクニカ社製のものを用いた。フィッシュゼラチン (製品番号 G7765), オボアルブミン (OVA: 製品番号 A7269), β -ラクトグロブリン (β -LG: 製品番号 L0130), オボムコイド (OVM: 製品番号 T2011) はシグマ社製, ABTS- 2NH_4 (2,2'-azino-bis (3-methylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid, diammonium salt)), Tween 20 (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate) は和光純薬製, 抗OVA特異抗体 (ウサギ免疫, アフィニティー精製ポリクローナル抗体) はコスモバイオ社製, 抗 β -LG・ウシ抗体 (ウサギ免疫, ポリクローナル抗体) はノルディック社製, グルコースオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG (H+L) (アフィニティー精製ポリクローナル抗体) はアメリカン・コーレックス社製, 4-メチルウンベリフェリルリン酸はナカライテスク社製を用いた。グラッシーカーボン (ウサギ免疫) は日本食品分析センターより恵与を受けた。その他の試薬は市販

特級品をそのまま用いた。

ジエタノールアミン緩衝液は10%ジエタノールアミン溶液 (脱イオン水に溶解) に終濃度0.01%になるように塩化マグネシウム (6水和物) を添加し, 1.0M塩酸でpH 9.8に調整した。ペルオキシダーゼ酵素反応に用いる比色定量用基質溶液は, A液: 0.2Mクエン酸塩緩衝液 (pH 4.0) に溶解した0.006% (v/v) 過酸化水素, B液: 6.0mg/mlのABTS- 2NH_4 水溶液, C液: 超純水とし, これらをA:B:C=10:1:9の割合に混合して調製した。アルカリフォスファターゼ酵素反応に用いる蛍光定量用基質溶液は, 4-メチルウンベリフェリルリン酸を0.1mMになるようジエタノールアミン緩衝液で溶解し調製した。PBS (phosphate buffered saline) は0.8% NaCl, 0.02% KClを含む20mMリン酸塩緩衝液 (pH 7.4) とした。

2. 装置

グラッシーカーボンへの電圧印加及び電圧走引は柳本製作所製サイクリックボルタモグラフ P-8 及び研究室試作のポテンショスタット (Matsumoto, 1988) を使用した。マニュアルフローシステムにおい

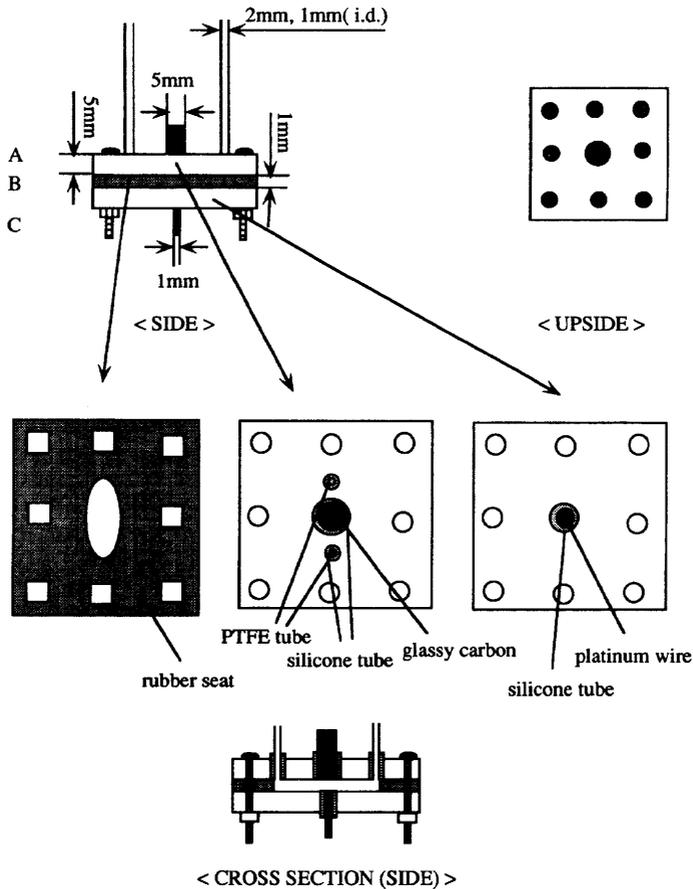


Fig. 2. Structure of Flow cell.

では、6方切り換えバルブはジー・エル・サイエンス社製フランジ型バルブMPV-FR6を、マイクロチューブポンプは東京理科器械製MP-3、レコーダーは理化電機工業社製DB-101、吸光光度検出器及び蛍光検出器はトソー製UV-8000及びFS-8000を用いた。電磁弁（ストップバルブ）は高砂電気工業製のものを用い、電源スイッチは当研究室で作製したものを用いた。自動フローシステムにおいては、システムコントローラー、サブコントローラーは島津製作所製SCL-10A、オプションコントロールLを用い、バルブは島津製作所製FCV-14AHを、蛍光検出器は日本分光工業社製FP-920を用いた。その他の装置はマニュアルフローシステムと同じものを用いた。

3. マニュアルフローシステムによる測定

3.1 フローシステム

フローセルの全体図及び断面図をFig. 2に、フロー

システムをFig. 3に示す。送液チューブはポンプ部分にシリコンチューブ、それ以外の部分はすべてPTFE（polytetrafluoroethylene）チューブを用いた。

3.2 測定基本操作

フロー系で測定するにあたって、抗体吸着時間、酵素反応時間、再生時間など測定項目により操作条件、反応試薬濃度、操作順序は若干異なるが、基本操作を以下に述べ各検討項目により変更した点を次項で述べる。

①電極表面のクリーニング：硝酸溶液（1.6M）を60秒間流し、その間電圧印加装置を用いて+2.0Vの電圧を印加してグラッシーカーボン表面を再生した。続いてPBSを5分間流し、セル内を洗浄した。

②抗体の吸着：抗ラットIgG（200 μ g/ml）を45秒流し（セル中心部到達時間、以下同様）、10分間流れ

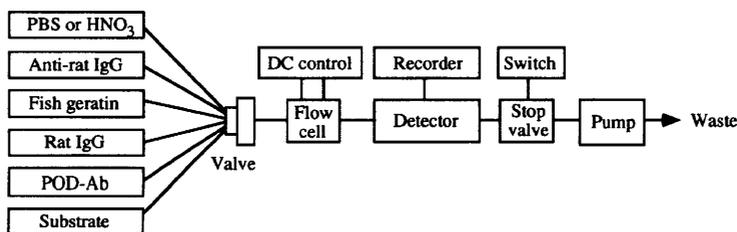


Fig. 3. Schematic diagram of flow system for determination of rat IgG.

ABBREVIATIONS.

- PBS : phosphate buffered saline
 POD-Ab : peroxidase conjugated anti-rat IgG
 Substrate : ABTS solution (absorbance detection)
 : 4-methylumbelliferyl phosphate solution (fluorescence detection)
 DC control : direct current control

を止め、抗体を吸着させた後、PBSで5分間洗浄した。

③ブロッキング：フィッシュゼラチン（2%）を45秒流し、10分間流れを止めブロッキングを行った後、PBSで5分間洗浄した。

④抗原の結合：ラット IgG（1.0 μ g/ml）を45秒流し、10分間流れを止め抗原-抗体反応を起こさせた後、PBSで5分間洗浄した。

⑤標識抗体の結合：アルカリフォスファターゼ標識抗ラット IgG（2,000倍希釈）を45秒流し、10分間流れを止め標識抗体を結合させた後、PBSで5分間洗浄した。

⑥酵素反応：基質溶液（0.1mM 4-メチルウンベリフェリリン酸）を45秒流し、3分間流れを止め酵素反応を進行させた。

⑦測定：PBSを流し、検出器により4-メチルウンベリフェロンの蛍光強度を励起波長360nm、検出波長440nmにて測定した。

3.3 検討項目別変更点

抗体吸着時間の検討：操作順として基本操作（3.2項）で示した①～⑦の順序で行ったが、②の抗体吸着時間を10, 20, 30, 60分として測定した。

酵素標識抗体の吸着時間の検討：操作順として、①, ⑤, ⑥, ⑦の順序で行い、⑥の標識抗体吸着時間を5, 10, 30, 60, 90分として測定した。

酵素反応時間の検討：操作順として、①, ⑤, ⑥, ⑦の順序で行い、⑤の酵素反応時間を5, 10, 20, 30, 60, 120分として測定した。

再生時間の検討：電極未処理の状態で、⑥, ⑦の操作を行い、蛍光強度を測定した（コントロールに相当）。続いて、PBSで5分間洗浄後、⑤, ⑥, ⑦の操作を順次行い、①の操作で電極を再生した。①の電極再生時間を30秒, 60秒と変化させ、⑤, ⑥, ⑦の操作を繰り返した。

3.4 比色法によるラット IgG の測定

基本操作（3.2項）で示した①～④の操作を行った後、⑤の操作の標識抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG（2,000倍希釈）を用い、⑥の操作の基質溶液として、ABTS/過酸化水素/クエン酸緩衝液を用いて10分間発色反応を行った。測定は、PBSを流し、380nmにおける吸光度を測定した。上記の操作を繰り返し、④で用いるラット IgG 濃度を5～50 μ g/mlに変化させてそれぞれ測定した。

3.5 蛍光法によるラット IgG の測定

基本操作（3.2項）で示した①～⑦の操作を行った。ただし、④の操作のラット IgG を0.25～2.0 μ g/mlに変化させてそれぞれ測定した。

4. 自動フローシステムによる測定

4.1 フローシステム

自動フローシステム図を Fig. 4 に示した。ポンプ、ストップバルブはサブコントローラーの電源の ON/OFF をコントロールできるコンセントに差し込み、システムコントローラーによりその ON/OFF を制御した。すなわち、溶液を流したいときシステムコントローラーから電源 ON の信号が出て溶液を流し、溶液を止めたいとき（アレルゲンなどを吸着させている

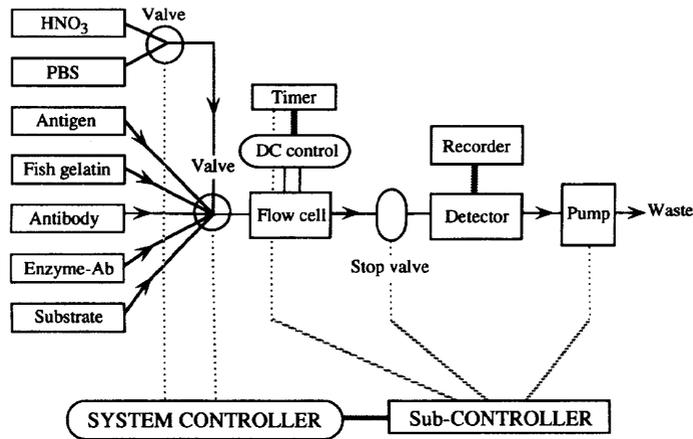


Fig. 4. Schematic diagram of immunosensor system.

とき) OFF の信号を出して溶液を止めておいた。電圧印加装置は再生の時のみ電圧を印加するようにサブコントローラーの EVENT 信号により ON/OFF 制御した。溶液を切り替えるバルブは直接システムコントローラーにより制御した。これら電源 ON/OFF とバルブの切り替えをシステムコントローラーのタイムプログラムにより操作することにより自動測定を行った。

4.2 蛍光法による OVA の測定

①電極表面のクリーニング：硝酸溶液 (1.6M) を 90秒間流し、その間電圧印加装置を用いて +2.0V の電圧を印加してグラシーカーボン表面を再生、活性化した。続いて PBS を 3.5分間流し、セル内を洗浄した。

②抗原の吸着：OVA (1.0ng/ml~1000 μg/ml) を 0.4分 (セル中央部到達時間) 流し、10分間流れを止め抗原を吸着させた後、PBS で 5分間洗浄した。

③ブロッキング：フィッシュゼラチン (2%) を 0.4分間流し、10分間流れを止めブロッキングを行った後、PBS で 5分間洗浄した。

④抗体の結合：抗 OVA 抗体 (250倍希釈) を 0.4分間流し、10分間流れを止め抗原-抗体反応を起こさせた後、PBS で 5分間洗浄した。

⑤標識抗体の結合：アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG (2,000倍希釈) を 0.4分間流し、10分間流れを止め標識抗体を結合させた後、PBS で 5分間洗浄した。

⑥酵素反応：基質溶液 (0.1mM 4-メチルウンベリフェリリン酸) を 0.4分間流し、10分間流れを止め酵素反応を進行させた。

⑦測定：PBS を流し、検出器により 4-メチルウンベリフェロンの蛍光強度を励起波長 360nm、検出波長 440nm にて測定した。

4.3 β-LG の測定

操作手順として基本操作 (4.2項) で示した①~⑦の順序で行ったが、②の抗原として β-LG (10 μg/ml~1.0mg/ml) を使い、④の抗体として抗 β-LG 抗体 (20 μg/ml) を用いた。また、⑥の酵素標識抗体と基質との反応時間を 5分間とした。

4.4 OVM の測定

操作手順として基本操作 (4.2項) で示した①~⑦の順序で行ったが、②の抗原として OVM (1.0 μg/ml~10 μg/ml) を使い、④の抗体として抗 OVM 血清 (PBS で 1,000倍希釈) を用いた。また、⑥の酵素標識抗体と基質との反応時間を 2分間とした。

結果及び考察

1. マニュアルフローシステムによる測定

1.1 抗体吸着時間

抗ラット IgG の吸着時間と応答値の関係をプロットしたところ 20分で吸着量はほぼ飽和に達したと推察された (Fig. 5)。このことから、抗原または抗体およびブロッキング剤の吸着時間は 20分ずつとるのが望ましいと考えられる。しかし、この時間設定だと 1 サイクルの測定時間は、約 120分程になるので迅速化の観点からして好ましくない。そこで、グラフより約 8割の吸着が完了していると考えられる、10分を吸着時間として採用した。これにより 1 サイクルの測定時間は約 70分となった。

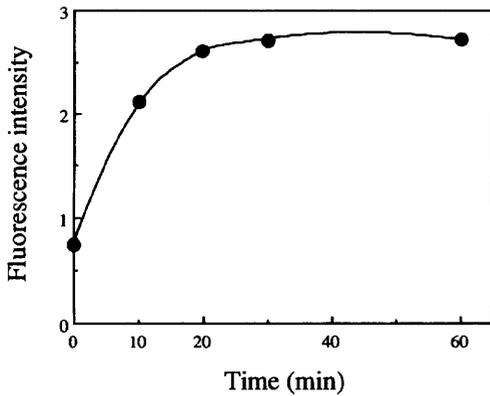


Fig. 5. Effect of adsorption time on measurement.
(Each measurement was done with 200 μ l/ml of anti-rat IgG and 1.0 μ g/ml of rat IgG)

1.2 酵素標識抗体の吸着時間

酵素標識抗体の非特異的吸着を防止するためにはブロッキング剤の検討とあわせてグラッシーカーボンへの「吸着されやすさ」の把握も必要であるため、酵素標識抗体の吸着時間を検討した。その結果を Fig. 6 に示した。グラフから分かるとおり、吸着時間30分までは時間の増加とともに吸着量も増加し、その後は、多少上下するもののほぼ横這いとなった。抗ラット IgG の吸着の結果と比較すると、吸着量が飽和に達する時間にやや差があるものの似たような傾向を示すことから酵素標識抗体は抗体類と同じぐらいグラッシーカーボンに吸着されやすいものと考えられた。このことから、フィッシュゼラチン等により未吸着領域をできる限り覆い隠すことが、非特異的吸着の防止のために特に必要であることが改めて示された。

1.3 酵素反応時間の検討

酵素反応時間と蛍光強度の関係をプロットしたところ、反応時間100分においても蛍光強度が頭打ちになる傾向が見られず直線的に増加した (Fig. 7)。本来ならば頭打ちとなる時間を酵素反応時間として採用する予定であったが、この結果によりそのことは困難となった。しかしながらこの結果は、例えば応答値が小さすぎて定量できない場合は、必要に応じて酵素反応時間を十分長くすることによって十分定量できる高さの応答値を得ることができるというメリットがあるものと判断された。実際の実験においては、バックグラウンド (抗原または抗体濃度 0 μ g/ml のときの応答値)

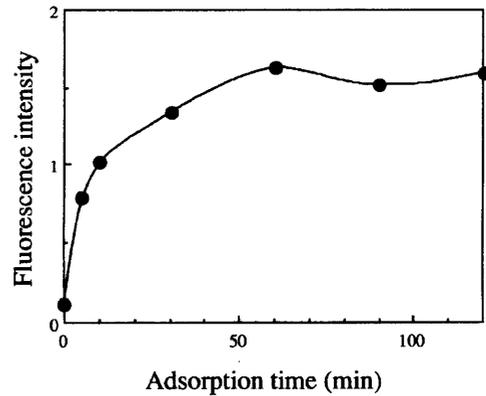


Fig. 6. Effect of time on adsorption of enzyme labelled anti-rat IgG.

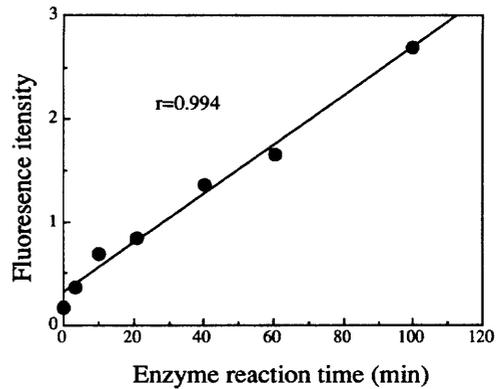


Fig. 7. Effect of enzyme reaction time on measurement.

と測定における応答値の差を考慮して酵素反応時間を設定した。この結果、酵素反応 5~10 分間で必要十分な感度が得られた。この酵素反応時間は、アルカリフォスファターゼ/4-メチルウンベリフェリルリン酸蛍光検出系では基質が律速因子でないため15分で最大検出能に達するという過去の知見を支持するものであった (Kato, 1976)。

1.4 再生時間の検討

再生時間すなわち1.6M 硝酸溶液中での電圧の印加時間を30秒および60秒とったときのグラッシーカーボン表面上の酵素標識抗体の残存活性を Table 1 に示した。この表から分かるように、30秒再生においてもグラッシーカーボン表面上の96%の酵素標識抗体は遊離して取り除かれたと判断された。また表から60秒再

Table 1. Evaluation of electrochemical regeneration.

Time (sec)	Before regeneration ^a	After regeneration ^a	Residual ratio (%)
30	1.25	0.05	4.0
60	1.58	0.03	1.9
60	1.59	0.02	1.2

^a: Fluorescence intensity

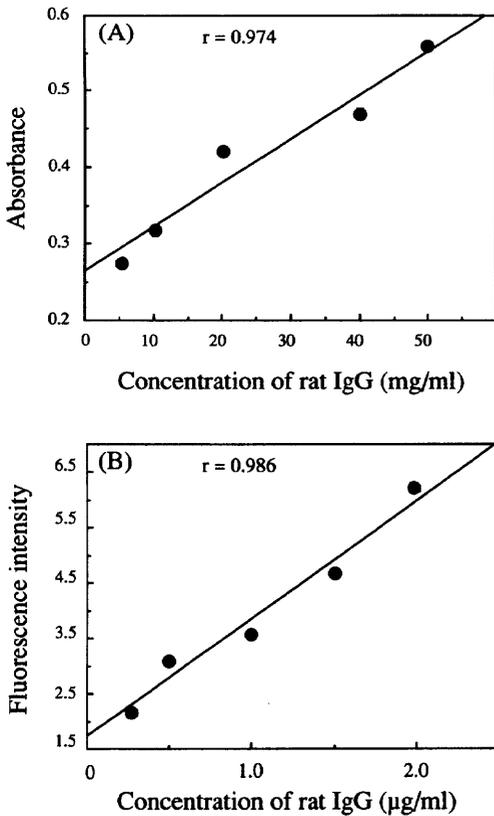


Fig. 8. Calibration curve for determination of rat IgG by flow type immunosensor.

生で十分であると判断されたが、実際の測定においては余裕を見て90秒間再生とした。

1.5 ラット IgG の測定

比色法：吸光度に対するラット IgG 濃度依存性を Fig. 8 (A) に示した。グラフから分かるとおり 5 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$ の間で $r = 0.974$ の良好な相関関係が得られた。

蛍光法：同じく蛍光強度に対するラット IgG 濃度依存性を Fig. 8 (B) に示した。蛍光法においても 0.25 ~ 2.0 $\mu\text{g/ml}$ の間で $r = 0.986$ の良好な相関関係が得られた。この結果、本センサーによりラット IgG の測定が可能である、すなわち抗原-抗体測定用センサーとして有効であることが示された。

2. 自動フローシステムによる測定

2.1 蛍光法による OVA の測定

酵素活性（蛍光強度）に対する OVA の濃度依存性を Fig. 9 に示した。図から分かるように 1.0 ng/ml ~ 1000 ng/ml の範囲において相関係数 0.972、1.0 ~ 1000 $\mu\text{g/ml}$ の範囲において相関係数 0.998 の良好な相関関係が得られた。また、10 回繰り返しにおける変動係数は 4.3% であった。この結果、蛍光法は高感度かつ広範囲の濃度で測定できることが明らかになった。また、ベースラインはきわめて安定であった。

以上の結果より、食物アレルギー測定においては本法、すなわち固相にグラッシーカーボンを用い、再生は硝酸中での電圧印加、測定法は酵素免疫測定法、酵素活性検出法はアルカリフォスファターゼ/4-メチルウンベリフェリリン酸蛍光法が適切であると判断された。また、今後本法はモノクローナル抗体、酵素標識モノクローナル抗体の使用による特異性の向上、化学発光、生物発光による検出系の高感度化が期待できる。さらに、マルチチャンネル化による試料処理能力の向上も期待される。

2.2 蛍光法による β -LG, OVM の測定

蛍光強度に対する β -LG の濃度依存性を Fig. 10 (A) に示した。この結果、OVA と同様に蛍光強度と β -LG 濃度に良好な相関関係 ($r = 0.949$) が得られた。この様に OVA, β -LG に濃度依存性が見られたことは他のアレルギー、特に可溶性タンパクアレルギーには本法が有効な測定法であることが示された。また、 β -LG についてはバックグラウンド値 (0 $\mu\text{g/ml}$ の時の応答値) が高かったが β -LG, 抗体, 酵素標識抗体濃度, 酵素反応時間を変えることによりさらに測

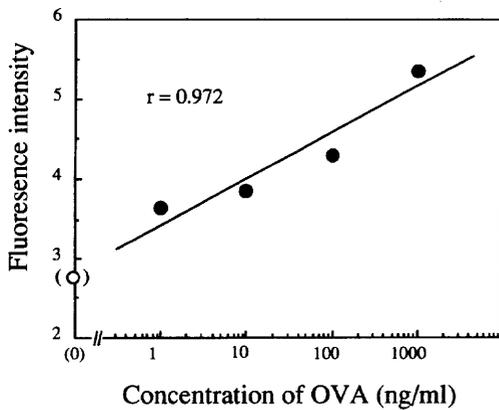
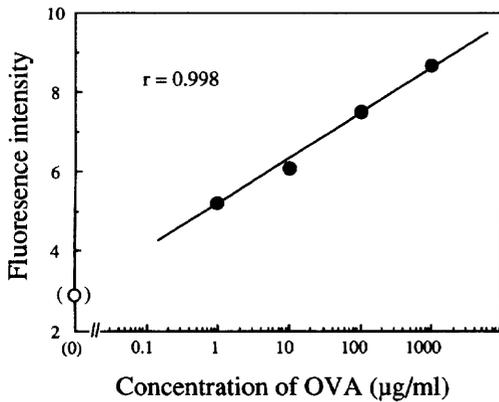


Fig. 9. Calibration curve for determination of OVA concentration (fluorescence).

○ : Blank R.S.D=4.3% (n=10)

定可能な濃度範囲を広げ得る可能性があるため更なる検討が必要であると判断された。蛍光強度に対するOVMの濃度依存性をFig. 10(B)に示した。この結果、OVA、 β -LGと同様に蛍光強度とOVM濃度に良好な相関関係($r=0.999$)が得られた。しかしながら、バックグラウンド値が高いためOVAほど高感度での測定はできなかった。この理由として、精製した抗体ではなく抗血清を用いたため特異性が低くなり非特異的吸着が増えたことが考えられる。現在のところ市販のOVM抗体がなく、アフィニティークロマトグラフィーにかけて精製するほどの量の抗血清もないことから特異性を上げるのは難しいので、酵素反応時間、抗体量などを減らして夾雑物質の影響を減らす必要があると考えられた。

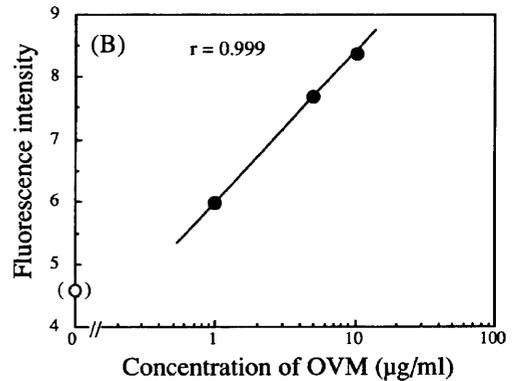
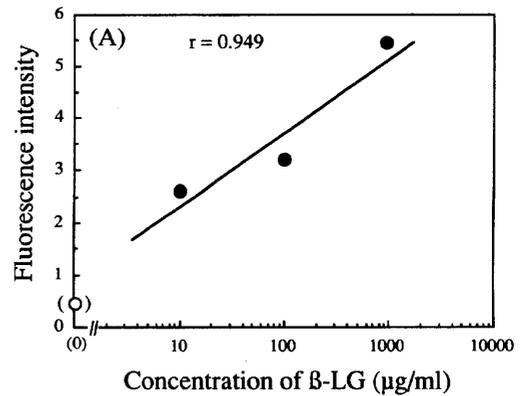


Fig. 10. Calibration curve for determination of allergens.

○ : Blank

要 約

グラッシーカーボンを用いた、表面を電気化学的に再生するフロー型免疫センサーシステムを構築し、モデル系(ラットIgG/抗ラットIgG)においてそのセンサーの有効性について検討を行った。その結果、ラットIgG濃度と酵素活性の間に良好な相関関係が得られ、本センサーが抗原/抗体測定用センサーとして有効であることが示された。また、酵素活性測定法についてもペルオキシダーゼ/ABTS吸光度法とアルカリフォスファターゼ/4-メチルウンベリフェリリン酸蛍光法の比較を行い、蛍光法がより高感度であることを確認した。電気化学的再生法は、1.6M硝酸溶液中で60秒間+2.0Vの電圧を印加することにより達成され、電極を磨きなおした時と同様な再生能

力を有しており、再現性も高かった。

モデル系の結果をもとに、自動化型免疫センサーシステムを構築し、アレルギーとして卵白の主要アレルギーであるオボアルブミン (OVA), 同じく卵白に含まれるアレルギー性は OVA よりも強いオボムコイド (OVM), 牛乳中に含まれる強いアレルギー性を持つ β -ラクトグロブリン (β -LG) の測定を試みた。センサーの自動化は、バルブの切り替え、電磁弁、ポンプ、電圧印加、記録計の ON/OFF をシステムコントローラー、サブコントローラーのタイムプログラムにより制御することにより行った。初めに、この自動化されたセンサーにより OVA の蛍光測定を試みた。その結果、蛍光法は OVA 濃度 $1.0\text{ng/ml} \sim 1000\ \mu\text{g/ml}$ の間で応答値との間に良好な直線関係が得られ、繰り返し測定による変動係数は 4.3% ($n=10$) であった。 β -LG, OVM についても自動化センサーにより測定を行った結果、前者は $10\ \mu\text{g/ml} \sim 1000\ \mu\text{g/ml}$, 後者は $1.0\ \mu\text{g/ml} \sim 1000\ \mu\text{g/ml}$ の範囲で応答値との間に良好な相関関係が得られた。しかしながら、これらの測定におけるバックグラウンド値が高く OVA ほど高感度には測定できなかった。これは、抗体の特異性が低いため非特異的吸着、結合が起きているためと推察された。また、基質自体も自然分解により測定に影響を及ぼすほど蛍光を発する場合もあるので、抗体の検討と併せて基質の更なる検討も必要であると考えられる。

本研究は、(財) 食品産業センター食品安全性向上技術開発事業の支援によるものであり、記して謝意を表する。

文 献

- Alwis, U. and G. S. Wilson 1985 Rapid Sub-Picomole Electrochemical Enzyme Immunoassay for Immunoglobulin G. *Anal. Chem.*, **57**: 2754-2756
- Alwis, U. and G. S. Wilson 1987 Rapid Heterogeneous Competitive Electrochemical Immunoassay for IgG in the Picomole Range. *Anal. Chem.*, **59**: 2786-2789
- Ceska, M., R. Eriksson and J. M. Varga 1972 Radioimmunosorbent assay of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **49**: 1-9
- Hattori, M., A. Ametani, Y. Katakura, M. Shimizu and S. Kaminogawa 1993 Unfolding/refolding studies on bovine β -lactoglobulin with monoclonal antibodies as probes. Does a renatured protein completely refold? *J. Biol. Chem.*, **268**: 22414-22419
- Hefle, S. L., J. P. Folger, R. K. Bush and F. S. Chu 1992 A monoclonal antibody-based ELISA for selected peanut allergens in foods. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **89**: 195 (abst.)
- Hefle, S. L. 1996 The Chemistry and Biology of Food Allergens. *Food Technology*, **50**: 86-92
- Huet, D. and C. Bourdillon 1993 Automatic apparatus for heterogeneous enzyme immunoassays based on electrocatalytic detection of the enzyme and electrochemical regeneration of the solid phase. *Anal. Chim. Acta*, **272**: 205-212
- Kato, K., H. Fukui, Y. Hamaguchi and E. Ishikawa 1976 Enzyme-linked immunoassay: conjugation of the Fab' fragment of rabbit IgG with β -D-galactosidase from E. coli and its use for immunoassay. *J. Immunology*, **116**: 1554-1560
- 厚生省 1991年保健福祉動向調査
- Matsumoto, K., H. Kamikado, H. Matsubara and Y. Osajima 1988 Simultaneous Determination of Glucose, Fructose, and Sucrose in Mixtures by Amperometric Flow Injection Analysis with Immobilized Enzyme Reactors. *Anal. Chem.*, **60**: 147-151
- Mattiasson, B., C. Borrebaeck, B. Samfridson and K. Mosbach 1977 Thermometric enzyme linked immunosorbent assay: TELISA. *Biochim. Biophys. Acta*, **483**: 221-227
- Smith, D. H. 1995 Immunoassays in Process Control and Speciation of Meats. *Food Technology*, **49**: 116-119
- 菅野道廣・岸野泰雄 (編) 1995 食物アレルギー, 光生館
- Taylor, S. T. and J. A. Nordlee 1996 Detection of Food Allergens. *Food Technology*, **50**: 231-234
- Tsuji, H., N. Bando, M. Kimoto, N. Ogata and T. Ogawa 1993 Preparation and Application of Monoclonal Antibodies for a Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of the Major Soybean Allergen, Gly m Bd 30K. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **39**: 389-397
- 上野川修一 1992 食物アレルギー, 講談社
- 山村雄一 (監修) 1972 医化学実験法講座, 第 4 巻 「免疫化学」, 中山書店, 240-245
- 矢田純一 1994 アレルギー, 岩波新書

Summary

A glassy carbon electrode, anodized for a short time at about 2.0 V vs. Pt, is a very convenient regenerable solid phase for the successive steps of an automated enzyme-linked immunosorbent assay. The anodized surface absorbs allergen and the blocking proteins in a similar manner to classical polystyrene solid phase; the detection of the immobilized alkaline phosphatase used as a label can be achieved from an enzymatic process occurring; and the protein stacking, accumulated during the assay, can be eliminated by a simple re-anodization at the end of the cycle, allowing the adsorption of a new allergen. Using peroxidase or alkaline phosphatase as labels, various allergens such as ovalbumin, ovomucoid, and β -lactoglobulin were assayed.