

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4754661号
(P4754661)

(45) 発行日 平成23年8月24日 (2011. 8. 24)

(24) 登録日 平成23年6月3日 (2011. 6. 3)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 15/14 (2006. 01)

GO 1 N 15/14 D

GO 1 N 21/64 (2006. 01)

GO 1 N 15/14 C

GO 1 N 33/48 (2006. 01)

GO 1 N 21/64 F

GO 1 N 33/48 M

請求項の数 22 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願平11-503119
 (86) (22) 出願日 平成10年6月9日 (1998. 6. 9)
 (65) 公表番号 特表2002-506522 (P2002-506522A)
 (43) 公表日 平成14年2月26日 (2002. 2. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/011958
 (87) 国際公開番号 W01998/057152
 (87) 国際公開日 平成10年12月17日 (1998. 12. 17)
 審査請求日 平成17年5月6日 (2005. 5. 6)
 審査番号 不服2009-16996 (P2009-16996/J1)
 審査請求日 平成21年9月14日 (2009. 9. 14)
 (31) 優先権主張番号 60/049, 012
 (32) 優先日 平成9年6月9日 (1997. 6. 9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 504115013
 ミリボア・コーポレーション
 アメリカ合衆国 O 1 8 2 1 マサチュー
 セッツ州 ビレリカ コンコード ロード
 2 9 0
 (74) 代理人 100059959
 弁理士 中村 稔
 (74) 代理人 100067013
 弁理士 大塚 文昭
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100086771
 弁理士 西島 孝喜
 (74) 代理人 100109070
 弁理士 須田 洋之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 流体サンプル中のマイクロ粒子を検出するための方法及び装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

流体中のマイクロ粒子を検出するための装置であって、マイクロ粒子は蛍光基質で標識付けされ、蛍光物質は電磁照射に曝されると蛍光性の光を放射する、そのような装置において、実質的に一定の壁の厚さ及び実質的に一定の内部断面領域を有する毛管チューブであって、磁気要素が該毛管チューブを取り囲むように配置された毛管チューブと、
 前記マイクロ粒子を含む流体を前記毛管チューブを介して流すことが可能な、前記毛管チューブに連結された流体送出システムと、
 前記毛管チューブの試験容積部を定義し、該試験容積部において前記蛍光物質を電磁照射にさらすために前記毛管チューブを介して電磁波照射のビームを放出する電磁照射のソースとを備え、マイクロ粒子を含む前記流体が使用時に前記毛管チューブの前記試験容積部を満たしており、更に、
 前記マイクロ粒子が前記試験容積部を流れるときに前記蛍光物質から発光する蛍光性の光を計測するように構成されている検出機器を備えていることを特徴とする装置。

【請求項 2】

前記マイクロ粒子が、微生物であることを特徴とする、上記請求項 1 に記載の装置。

【請求項 3】

前記マイクロ粒子が、細菌、ウィルス、又は寄生虫であることを特徴とする、上記請求項 1 に記載の装置。

【請求項 4】

前記マイクロ粒子が、C D 4 細胞であることを特徴とする、上記請求項 1 に記載の装置。

【請求項 5】

前記マイクロ粒子が蛍光球体であることを特徴とする、上記請求項 1 に記載の装置。

【請求項 6】

前記蛍光球体が、フィルタ・フィーダ（濾過摂食動物）により摂取されていることを特徴とする、上記請求項 5 に記載の装置。

【請求項 7】

前記フィルタ・フィーダ（濾過摂食動物）が、流体サンプル中の毒性レベルに感応する捕食速度を有していることを特徴とする、上記請求項 6 に記載の装置。

【請求項 8】

前記蛍光物質が染色接合抗体であることを特徴とする、上記請求項 1 に記載の装置。

【請求項 9】

前記蛍光物質が D N A 着色剤であることを特徴とする、上記請求項 1 に記載の装置。

【請求項 10】

前記流体送出システムが、注入器ポンプに連結された注入器であることを特徴とする、上記請求項 1 に記載の装置。

【請求項 11】

前記流体送出システムが、ぜん動式のポンプであることを特徴とする、上記請求項 1 に記載の装置。

【請求項 12】

前記電磁照射のソースが少なくとも 1 個のレーザーであることを特徴とする、上記請求項 1 に記載の装置。

【請求項 13】

前記検出機器が、検出器のアレーであることを特徴とする、上記請求項 1 に記載の装置。

【請求項 14】

磁荷を有している蛍光物質の標識を付けられたマイクロ粒子を検出するための方法において、

毛管チューブにおいて前記マイクロ粒子を含む流体を選択された箇所まで移送する段階であって、前記毛管チューブは実質的に一定の壁の厚さ及び実質的に一定の内部断面領域を有しており、前記マイクロ粒子を含む前記流体は選択された箇所の前記毛管チューブを満たしており、磁気要素が前記毛管チューブを取り囲むように配置されている、前記移送する段階と、

前記選択された箇所において前記マイクロ粒子に対して標識付けされた蛍光物質を照射する段階と、

前記選択された箇所前記蛍光物質から発光される蛍光性の光を測定する段階とから成ることを特徴とする方法。

【請求項 15】

前記マイクロ粒子が、細菌であることを特徴とする、上記請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記マイクロ粒子が、ウイルスであることを特徴とする、上記請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

前記マイクロ粒子が、寄生虫シストであることを特徴とする、上記請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

前記マイクロ粒子が、D C 4 細胞であることを特徴とする、上記請求項 14 に記載の方法。

【請求項 19】

前記マイクロ粒子が、蛍光球体であることを特徴とする、上記請求項 14 に記載の方法。

【請求項 20】

前記蛍光球体が、フィルタ・フィーダ（濾過摂食動物）により摂取されていることを特徴とする、上記請求項 19 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

前記フィルタ・フィーダ（濾過摂食動物）が、流体サンプル中の毒性レベルに感応する捕食速度を有していることを特徴とする、上記請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記蛍光物質が、染色接合抗体であることを特徴とする、上記請求項 1 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の属する技術的分野

本発明は、流体サンプル中のマイクロ粒子を検出するための方法及び装置に関する。より厳密には、本発明は、流体送出システムとレーザー蛍光検出システムを使って、流体サンプル中にある濃度の低い蛍光標識付けされたマイクロ粒子を検出する方法及び装置に関する。 10

関連技術の説明

流体中に低濃度で存在する微生物を検出することは、患者の疾病をより良好に処置したり、致命的疾病の突発的流行を予防したり、食物、飲み物、及び医薬品の製造工場での品質管理処理をより良好に遂行したり、科学者に分析研究器具を強力に且つ容易に使用できるようにさせるに当たり、微生物汚染に対する回答をより速やかに提供するための決定的な要素である。

結核菌、腫トリコモナス、カンピロバクター、サルモネラ菌、大腸菌、及びサイクロスポラ等の微生物に関する検査方法には、増殖培養法、PCR法、蛍光強化顕微鏡的視覚化、ATP生物発光技術、及びバクトメータが含まれる。これらの方法は、時間がかかり高価な上検出能力に限界があることがしばしばである。 20

検査機器には、エピ蛍光顕微鏡、蛍光測定器、及びフローサイトメーターが含まれる。エピ蛍光顕微鏡を冷却されたCCD高解像度カメラに連結すると、顕微鏡的微粒子のエピ蛍光顕微鏡的視覚化ができるようになる。蛍光測定器は、検出能力に限界があり、また多くの生物個体群のスペクトル識別が必要とされるときにはあまり適さない。生対死の生物識別が必要とされる事例がしばしばある。フローサイトメーターは、免疫蛍光検査法で死んだ粒子又は生きている粒子を検出し識別するに際しては非常に正確である。しかしながら、フローサイトメーターは高価であり、熟練した技術者または科学者がそれを操作してデータを解釈することが必要である。

クリプトスポリジウムオーシスト及びジアルジアシストは、免疫蛍光検査分析（IFA）手法を使って検出することができる。この方法ではポリクロナール抗体を使ってシストを着色し、そのシストを次にエピ蛍光鏡検法により検出する。この方法は、熟練技術者により多数の粒子をエピ蛍光鏡検法で検査しなければならないことを考えると、極端に労働集約的である。フローサイトメーターを使用してもよいが、非常に高価であり、操作に当たっては経験を積み十分に訓練された技術者を必要とする。更に、フローサイトメーターは、オーシスト識別には依然として鏡検法による確認を必要とする。 30

水質モニタリングは、農業用、工業用、及び人間が消費するための非汚染水の供給管理に絶対に必要である。水質モニタリングには、真水毒性のインジケータとして、例えばファットヘッドミノウ、ピメフェイルプロメラス、枝角類セリオダフニアドゥビア、及び緑藻類セテナストラムカプリコルヌイアム等の検査生物を使って行ってもよい。検査生物は標準条件下で培養され、ある期間中毒性に曝される。対照生物に対する検査生物の生存及び繁殖速度を比較すれば、水の毒性が表示できる。 40

細菌酵素活性は、裂けると蛍光状態になる特別に設計された酵素基質を用いて水質を推定するのに使用される。この基質は細菌の酵素により裂かれ、特定の波長の光に曝されると蛍光性の光を放つ。酵素活性の速度は、蛍光測定器を用いて計測され、細菌上の毒性侵襲レベルの間接的な測定値を示す。

動物プランクトンの捕食習性も水質を評価するために使用することができる。広範にわたる急性毒性研究が、概括的にはプランクトンを使って、厳密には様々なワムシを使って行われてきた。ワムシの捕食と繁殖速度は高速毒性評価ツールとして使うことができる。淡水に関してはワムシ、ブラキオナスカリシフロラスの捕食と繁殖速度について、海水に関してはブラキオナスプリカチリスの捕食と繁殖速度について、キシレン、カドミウム、 50

銅、水銀、及びジアザノンを始めとして広範囲の化学物質の影響がもっぱら研究されてきた。捕食速度法では、ワムシは毒物を含んだ水に対して数分間曝され、次に蛍光的に印の付けられたビーズ上で捕食できる状態にさせられる。ワムシは、それから麻酔をかけられ、洗浄されて、顕微鏡スライドに移されて、蛍光顕微鏡を使って個別に検査される。捕食速度は、個々のワムシの消化管中の摂取されたビーズの蛍光輝度を画像技術を駆使して計量することにより推定される。この方法は熟練作業者と、カメラと、蛍光顕微鏡を必要とし、時間の掛かる高価なものとなる。

必要とされているものは、有害微生物のようなミクロ粒子を検出して水質を評価するための、迅速、敏感で、再現性があり、実質上自動的で、且つ費用効率の良い方法と装置である。

10

発明の概要

本発明は、ミクロ粒子に対して標識付けされた蛍光物質を検出するための装置を提供する。本装置は、選択された場所を通してミクロ粒子を移送するための単一の毛管流搬送システムと、ミクロ粒子に対して標識付けされた物質を照射するための電磁放射のソースと、選択された場所で物質から放射される蛍光性の光を測定するための検出システムとから成る。

【図面の簡単な説明】

図 1 は、サンプル準備システムを示す。

図 2 A は、流れ搬送システムを示す。

図 2 B と 2 C は毛管の 2 通りの実施例の詳細図である。

20

図 3 A は、レーザー蛍光測定装置の 1 実施例を示す。

図 3 B は、レーザー蛍光測定装置の別の実施例を示す。

図 3 C は、レーザー蛍光測定装置の更に別の実施例を示す。

図 4 A は、デジタル処理ユニットのサンプル出力を示す。

図 4 B は、デジタル処理ユニットの別のサンプル出力を示す。

図 5 A は、ミクロ粒子に標識付けするために使用される様々な蛍光シアン化合物染料に関する発光スペクトルを示す。

図 5 B は、他の蛍光で印を付けられたミクロ粒子が存在する場合に、Cy 5 標識を付けられたミクロ粒子を検出するための信号処理戦略のフローチャートを示す。

図 6 A は、本発明の装置を使用して、既知量 $2 \mu\text{m}$ の蛍光球体が混入された水のサンプルから得られるキャリブレーションカーブを示す。

30

図 6 B は、粒子濃度の粒子到着速度分布（ポアッソン統計モデル）への依存度のグラフを示す。

図 6 C は、積分された検出蛍光信号対 SYTOTM 60 大腸菌濃度の展開のグラフを示す。

図 7 A は、3 種類の異なる生物濃度についての分析的モデルによる、正規化されたビード濃度対捕食時間を示す。

図 7 B は、500 ワムシ/ml のワムシ濃度を使用して、1 ppm のジアザノンを含有する試験サンプルと対照サンプルについての、正規化された蛍光球体濃度対捕食時間を示す。

図 7 C は、600 ワムシ/ml のワムシ濃度を使用して、1 ppm のジアザノンを含有する試験サンプルと対照サンプルについての、正規化された蛍光球体濃度対捕食時間を示す。

40

図 7 D は、600 ワムシ/ml のサンプルと、1000 ワムシ/ml のサンプルについての、正規化された蛍光球体濃度対捕食時間を示す。

発明の詳細な説明

図 1 は、サンプル準備システム 100 を示す。サンプル準備システム 100 はミクロ粒子 104 を含有している疑いのある流体サンプル 102 を含む。流体サンプル 102 は、フィルタ又はトラップを通して不要物もしくは顕微鏡的粒子状物体を取り除く。検査するサンプルを準備するために、蛍光物体 106 を流体サンプル 102 及びミクロ粒子 104 と反応させる。蛍光物体 106 は、着色したり、標識付けしたり、またそうでなければミク

50

口粒子104に取り付くようになっている、1つ又はそれ以上の蛍光着色剤、染料、又は試薬であってもよい。試験サンプル108は、流体サンプル102から遊離残留蛍光物体を濾過分離することにより得られる。試験サンプル108は、こうして、流体サンプル102とマイクロ粒子104に付着した蛍光物体106を含有する。

流体サンプル102は、水サンプル、尿サンプル、血液サンプル、食料品サンプルでもよいし、又は検査されるものなら他のどんな流体であってもよい。流体サンプル102は、HIVのようなウイルス検出用にPCR増幅されたサンプルを含有していてもよい。マイクロ粒子104は、結核菌、腔トリコモナス、カンピロバクター、サルモネラ菌、大腸菌、サイクロスポラ、クリプトスポリジウムオーシスト、ジアルジアシスト又は標識付けが可能な他の何れの細菌、ウイルス、真菌、微生物であってもよい。マイクロ粒子104は又、AIDS患者をモニターするためのCD4又はCD8細胞であってもよい。異なる型の微生物を検出し互いに区別できるようにするためには、異なる蛍光物体106を用いてもよい。例えば、細菌に関しては、蛍光物体106は標準DNA又は表面ラベル試薬着色剤でもよい。クリプトスポリジウムオーシスト又はジアルジアシストに関しては、蛍光物体106は、それぞれ抗クリプトスポリジウム抗体又は抗ギアルジア抗体と接合した蛍光染料でもよい。蛍光物体106は、磁界により影響を受けるように磁荷を帯びていてもよい。

マイクロ粒子104は、蛍光物体106を含有する顕微鏡的ビーズでもよい。流体サンプル102中の毒物濃度を測定するためには、ワムシ又は動物プランクトンなどのフィルトロフィード微生物をサンプル102に既知の量だけ加えてもよい。このようなフィルトロフィード微生物は、毒物濃度の既知の関数である捕食速度を有する。既知の培養期間の後、マイクロ粒子104は流体サンプル102に加えられる。マイクロ粒子104は、オレゴン州、ユージンのモレキュラプローブ社から入手可能な蛍光染料を含有しているラテックスビーズのような、フィルトロフィード微生物が摂取することのできる蛍光球体であってもよい。蛍光球体は2 μ mの均一直径であってもよいし、サイズが非均一でもよい。それらは、最大吸収波長が624nmで最大発光波長が645nmの均一な分光光度特性を有していてもよいし、多様な分光光度特性を有していてもよい。試験サンプル108は、既知の時間間隔でサンプル準備システム100から引き出される。試験サンプル108は、流体サンプル102から摂取されなかったマイクロ粒子104を濾過分離することにより得られる。試験サンプル108は、このように水サンプル102と消化管にマイクロ粒子104が付いた微生物104とを含んでいる。

図2Aは、流れ搬送システム200を示す。流れ搬送システム200は、試験サンプル108を毛管202に導入する流体送出システムである。毛管202は非常に薄い壁と優れた光学特性を有している。毛管202は、微生物104が1度に1個ずつ入るように作られた内径を有する。毛管202の断面は試験容積204を規定する。毛管202は、少なくとも一部が、毛管をその場に保持する役目を負う光学テーブル206に連結されている。処理量を増やすため、多数の毛管202を並列に配置してもよい。

流れ搬送システム200は、毛管202に連結されたポンプシステム216を含んでいてもよい。ポンプシステム216は、試験サンプル108を含む注入器208であってもよく、試験サンプル108を毛管202と試験容積204を通るように注入する。毛管202を通過した後、サンプル108はダンプ212に入る。この方法で、試験サンプル102中のマイクロ粒子104は1度に1個ずつ毛管202を通過する。ポンプシステム216は、注入器208に連結された注入器ポンプ214を更に含んでいてもよい。注入器ポンプ214は、試験サンプル108が毛管202中を通る流量を精密に制御するように作られている。ポンプシステム216は、ぜん動型ポンプであってもよい。

図2Bと2Cは、毛管202の2通りの実施例の詳細図を示す。図2Bは、毛管202を通過して試験容積204に向かって流れるマイクロ粒子104を示す。図2Cは、磁気要素220が毛管202周りに同軸に配置された状態の毛管202を示す。磁気要素220は、連続リングであってもよいし、又は1個またはそれ以上の別々の要素から成ってもよい。磁気要素220は磁荷を帯びたマイクロ粒子104及び蛍光物体106と結びつけて使用してもよい。この構成により、蛍光物体106で標識付けされたマイクロ粒子104は、試験

10

20

30

40

50

容積 204 を流れ抜ける際に毛管 202 の中心に実質的に集束されるので、こうしてマイクロ粒子 104 の検出性が向上する。

図 3 A は、レーザー蛍光測定装置 300 を示す。レーザー 302 は、レーザー光線 304 を生成する。レーザー光線 304 は、1 個又はそれ以上のレンズ 306 を介して試験容積 204 上に集束される。レーザー 302 の波長と光束サイズは、蛍光物体 106 の吸収波長と毛管 202 のサイズに従って選択される。

試験サンプル 108 が試験容積 204 を通過するとき、試験サンプル 108 中に存在する蛍光物体 106 は何れもレーザー光線 302 に曝される。代わりに毛管 202 中の定在試験サンプル 108 をレーザー光線 302 に対して移動させ、試験サンプル 108 を曝すようにしてもよい。集合レンズ 310 は、蛍光物体 106 により発光される蛍光性の光を光電子増倍管 312 上に集めて像を映す。蛍光性の光から共振光を濾過分離するために、干渉フィルタのセット 314 を光電子増倍管 312 の前に置いてよい。その共振光を集めるために、試験室 308 の反対側にフォトダイオード 316 を置いてよい。光電子増倍管 312 からの出力は、蛍光のピークを分析するために第 1 デジタル処理ユニット 318 に送られる。フォトダイオード 316 からの出力は、ミー散乱ピークを分析するために第 2 デジタル処理ユニット 320 に送られる。

図 3 B は、もう 1 つのレーザー蛍光測定装置 300 を示す。この場合には、蛍光発光は回折格子 313 を通り抜けて、多重検出器アレー 315 上に像を結ぶ。集合レンズ 310 の焦点距離と口径、格子 313 の分散特質、及びアレー状の多重検出器 315 のサイズと分離は、共振光の他にも蛍光物体 106 の発光スペクトルに特有の少なくとも 2 個又は 3 個の蛍光発光帯を検出するために最適化される。干渉フィルタのセット 317 は、マイクロ粒子 104 を標識付けするため使われる蛍光物体 106 の蛍光発光を選抜するために用いることもできる。特定の伝送特性を有する多重干渉フィルタ 317 を使用して、多数のスペクトル箇所では蛍光発光を読み取ることにより、使用される特定の蛍光物体 106 を検出、識別することができる。各検出器への総蛍光信号の寄与により、特定の蛍光物体 106 を標識付けされていない粒子の蛍光発光と区別するために必要なデータが提供される。多重検出器アレー 315 からの出力はデジタル処理ユニット 318 に供給され、このユニットは多重検出器アレー 315 により送出された多数の信号を処理してデジタル化する。

図 3 C は、レーザー蛍光測定装置 300 のもう 1 つの実施例を示す。複数のレーザー 302 が複数のレーザー光線 304 を生成する。レーザー光線 304 は 1 個又はそれ以上のレンズ 306 を介して試験容積 204 上に集束される。レーザー光線 304 のサイズは、毛管 202 のサイズに整合している。レーザー 302 の波長は、蛍光物体 106 に特有の吸収帯と同調している。この多数レーザー及び検出器システムは、単一のレーザーシステムに付きまとう間違った正及び負の結果を減少させるのを支援する。

図 4 A は、デジタル処理ユニット 318 からのサンプル出力を示す。光電子増倍管 312 から出てくる電圧信号は、デジタル化されコンピュータに送信され、そこで操作と分析が行われる。電圧信号は、3000 Hz までの周波数で 8 ビット精度でデジタル化される。蛍光物体 106 が試験容積 204 を通過する度毎に、蛍光ピーク 402 が現れる。閾値 404 はベースライン信号レベルとその分散に従って選択される。電圧スパイクのサイズと共に閾値を超えて検出された蛍光ピーク 402 の数により、蛍光物体 106 の量の測定が行われる。毒物濃度の場合は、このデータを汚染されていない基準サンプルについてのデータと比較すれば、水サンプル 102 中の毒物濃度を求めることができる。

図 4 B はデジタル処理ユニット 318 からのもう 1 つのサンプル出力を示す。蛍光物体 106 により標識付けされたマイクロ粒子 104 が試験容積 204 を通過するとき、時間シグネチャ 406 とスペクトルシグネチャ 408 付きの蛍光性の光のバーストを生成する。時間シグネチャ 406 及びスペクトルシグネチャ 408 は、次にデジタル信号処理ユニット 318 により処理され、検出されるべきマイクロ粒子 104 及び蛍光物体 106 の予測される時間及びスペクトルシグネチャと比較される。

広範囲の粒子と微生物は、生来的に、広範囲の波長で蛍光性があるので、マイクロ粒子をスペクトルで区別して確実にそれを検出するのは至難の業である。多数のレーザーソースと

10

20

30

40

50

検出器は、検出の標的にされたミクロ粒子に付着した染料の蛍光パターンのスペクトルのピンポイントに近い近似波長で使用してもよい。電子信号分析技術は、検出に先立ち、標的ミクロ粒子の事前に定義された形状とスペクトル特性の理解に合わせた特別仕様にすることができる。

多数の信号を使用すれば正規化が行えるし、選択度が改善される。2個以上の蛍光発光波長及び/又は2個以上の励起波長で計測すれば、異なる染料源を区別することができるスペクトル選択度が得られる。免疫蛍光のために使われる染料は、バックグラウンドの蛍光源に比較すると比較的狭い発光ピークを有するのが普通であるので、オンピーク時信号対オフピーク時信号の割合によって、染料で印された粒子を同じ絶対蛍光度がバックグラウンドで起きてそれらと正確に区別できる。

10

バックグラウンド粒子信号は、電子フィルタリングの使用を介して排除され、これにより持続性のある非常に早いデータサンプリング速度が可能になる。電子フィルタリングには数器の検出器の使用が伴い、粒子の光分散シグネチャの特異性と少なくとも2個の蛍光波長シグネチャの存在により実現される。検出されたログ増幅信号の各々の差分信号解析に基づき、標識付けされたミクロ粒子を50kHzまでのデータ周波数速度で選抜する能力が実現される。

図5Aは、ミクロ粒子104を標識付けするために使うことのできる様々な蛍光シアン化合物着色剤の蛍光スペクトルを示しており、Cy5、Cy5.5、Cy7はそれぞれ最大吸収ピークが650nm、675nm、743nmである。多重検出器アレー318は、最初に特定染料の蛍光スペクトルを記録するのに使うことができる。サンプル中の標識付けされたミクロ粒子104により発光される蛍光スペクトルは、次に染料の記録された蛍光スペクトルと比較される。このやり方では、標識付けされたミクロ粒子104は、識別されて、他の蛍光的に標識付けされたミクロ粒子104から区別される。更に、流量が制御されるので、追跡信号の幅は試験容積204を横切るミクロ粒子104の直径に比例すると考えられる。

20

図5Bは、他の蛍光印の付いたミクロ粒子が存在する状況でCy5標識付けされたミクロ粒子104を検出するための信号処理戦略のフローチャートを示す。4器の検出器が使用されている。検出器D1は共振レーザー励起に中心合わせされており、この事例では635nmである。検出器D2、D3及びD4は、Cy5蛍光発光の特性に対応して、650nm、670nm、及び690nmで中心合わせされている。

30

ミクロ粒子104が試験容積204で検出されると、まず、検出器D1により検出された信号の時間履歴が分析され(ブロック502)、信号強度S1及びパルス幅W1が、試験容積内の特定のミクロ粒子の経路により生成される予測時間履歴(Sc, Wc)と比較される(ステップ504)。検出された信号がこの判定基準に合致しなければ、そのデータは排除される(ステップ506)。検出された信号がこの第一試験を通過すれば、検出器D2、D3、及びD4の蛍光輝度比率が分析される(ブロック508)。S2/S3及びS2/S4の蛍光比率が、Cy5蛍光スペクトルSc a及びSc bそれぞれに対応する予測蛍光比率と比較される(ブロック510)。これら2通りの試験が肯定的であれば、ミクロ粒子が家運とされ(ブロック512)、試験の結果が否定的であればデータは排除される(ブロック514)。

40

事例1

フロー搬送システムシステム100を既知の蛍光濃度を持った水サンプルを使用して較正した。3×10⁹ビーズ/mlの基準溶剤を1000倍に希釈した。次に、0、3、500、7000、14000、28000ビーズ/mlを含有する水サンプルを、20μlマイクロピペットを使って10%の信頼度で準備した。これらの水サンプルを装置に通した。図6Aは、検出された蛍光ピーク計数対較正サンプルの予想計数を示す。優れた相関関係が一貫して入手できた。

10⁷大腸菌SYTOTM60DNA着色済みの基準サンプルを、最初に70%のイソプロパノールを用いて1時間曝して細菌を死滅させ、次に滅菌洗浄を3回行うことによって準備した。大腸菌の細菌個体群を次に5μmol濃度のSYTOTM60着色剤により着色し

50

た。SYTO™60 着色剤のスペクトル特性 ($Abs = 650\text{ nm}$ 、 $Em = 678\text{ nm}$) は、本発明のレーザーをベースにしたシステムに非常によく適合する。

1 ml 当たり 10^7 から 0 までの着色された大腸菌の 5 等級に分けられた濃度サンプルを、 $2\text{ }\mu\text{l}$ マイクロピペット及び $2\text{ }\mu\text{l}$ 濾過済み非イオン化水を使って準備した。サンプル毎に $100\text{ }\mu\text{l}$ 溶液を、1 ml 注入器を使って抜き取った。注入器を注入器ポンプ上に置き、溶液を $10\text{ }\mu\text{l}$ / 分の流量で $70\text{ }\mu\text{m}$ の単一毛管内に試験容積に向かって注入した。蛍光試験容積は、 635 nm 、 5 mW レーザーダイオードと単一の 10 mm 焦点レンズを使って $20\text{ }\mu\text{m}$ の集束されたレーザー光線により規定された。試験容積は、40 倍の対物顕微鏡を使って $3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ のスリット上に結像された。光検出器信号は、 3000 Hz 、8 バイトのダイナミックレンジでデジタル化された。デジタル化された信号は、単一のシリアルケーブルを介してラップトップコンピュータへと送信された。信号は、専有のソフトウェアを使ってウィンドウスクリーン上にオンラインで表示された。各サンプルを $10\text{ }\mu\text{l}$ / 分の流量で 30 分間注入するのに対応するデータが時系列に記録された。サンプル毎に三重の反復実験が行われたが、これは 90 分間の注入に相当する。流量、注入時間、及び予想濃度を制御することにより、予想蛍光ピーク計数が計算され、実測計数と比較された。サンプル毎に、平均ピーク滞留時間、ピーク輝度、及びピークパワー (ピーク積分) も計算された。

粒子が試験容積を横切って到着するプロセスはランダム到着プロセスに従い、従ってポアソンプロセスに従うものと仮定された。予想計数の数は、粒子がレーザー光線を横切る通過時間に匹敵する時間中に 2 個以上の粒子が試験容積に到着する可能性を考慮に入れるために、一つの検出計数が 2 個以上の粒子に帰するはずであるという事実を考えに入れそれに従って修正された。

図 6 B は、調査された生物濃度についての試験容積への粒子到着速度分布を表している。 $10\text{ }\mu\text{l}$ / 分の流量で 10^5 p/ml より濃度が高い場合には、ポアソンの統計的修正が必要である。特に、1 ml 当たり 10^7 個の大腸菌濃度ではその期間の 80 % は試験容積を横切っている大腸菌が 2 個以上ある。

図 6 C は、予想濃度と、着色された個々の大腸菌のレーザー試験容積を通る通路に対応する積分された検出蛍光信号との間の相関を表す。積分された信号は、ポアソン統計学により修正された検出ピークの数と平均ピークパワー (V/ms) の積として計算された。相関は高く、傾斜 98 % である。しかしながら、サンプル中に大腸菌が存在しない時には、30 秒毎に 4 ピークの積分されたバックグラウンドノイズが検出された。これらのバックグラウンドは、光線反射を光検出器スリットに偏向させるバブルに属する所、もしくはは自然蛍光性粒子に属する所でピークとなる。多数の波長検出アレーと光散乱検出器を使用することによりこれらの間違った正の計数を排除できる。

事例 2

ワムシを使った水質モニタリングを、内径 $70\text{ }\mu\text{m}$ の毛管で、 635 nm の狭帯域を使い、 3 mW ダイオードレーザーで光束直径を $40\text{ }\mu\text{m}$ として実行した。干渉フィルタは、 670 nm (20 nm FWHM) で 12 % を、そして他の全ての波長では 10^{-6} を透過させるように選択した。

方法

1. フロリダの水産養殖所から、生きている B プリカチリスワムシ培養物を入手した。このワムシは、飼育が簡単で、捕食、繁殖及び死滅速度への毒性サンプルの影響が広い範囲に亘り研究されていることから選んだ。100 ml バイアル内のワムシの平均濃度は、5 個の $20\text{ }\mu\text{l}$ サンプルを 50 倍の顕微鏡で検査して数えた。20 μl サンプル毎に平均 10 匹のワムシが計測され、これは 500 ワムシ/ml という勘定になる。

2. 捕食速度計測を行うために各 8 ml のサンプル 2 個を用いた。基準サンプルと試験サンプルである。これら 2 個のバイアルに 500 ワムシ/ml のワムシ溶液を満たした。

3. pH、 O_2 、アルカリ度、塩度、及び温度等の水質パラメータをできる限り一定に維持するために、ワムシ媒体溶液を使って 2000 ppm ジアザノン溶液を準備した。20 μl 量のジアザノン溶液を試験サンプルに加えた。

4. 5分間定温放置した後、深紅色の蛍光球体の 40×10^6 ビーズ / ml 溶液 $20 \mu\text{l}$ を、基準サンプルと試験サンプル両方に加えた。このときの時間を $t = 0$ とした。

5. ルアーユニオンで、 $20 \mu\text{m}$ プランクトンフィルタが末端に付く $100 \mu\text{m}$ 片のナイロンチューブに連結された2個の同じ注入器を使って、 $50 \mu\text{l}$ のサンプルを基準サンプルと試験サンプルとから抽出した。両方共に、生物はビード溶液から濾過分離した。

6. 基準サンプルと試験サンプルは、注入器ポンプを使って流量 $15 \mu\text{l} / \text{分}$ で試験室を連続的に通した。手に入れたデータは後の分析に備えて保存した。

7. ステップ5と6を、 $t = 5$ 、 10 、 15 、及び 20 分で繰り返した。

データ分析

各データファイルは、TOXANA™、即ち時系列データ分析ソフトウェアプログラムを使って検索した。このプログラムは、データファイル毎に $0 - 5 \text{ V}$ のスケールでデジタル化された光電子増倍管追跡信号の視覚化ができるようになっている。信号のベースライン平均及び分散値の評価を（ピークが検出されない所で）ファイル毎に行った。この測定から、ピーク検出閾値、 T_d は以下のように算出した。

$$T_d = \text{mean} + \sqrt{\text{variance}}$$

平均ピーク輝度、平均ピーク幅、及び平均ピーク面積の他にも、輝度が T_d を上回るピークの数ファイルを毎に算出した。

分析モデル

平均移動度を持つ生物に対するすきま容積 V_{C1} とすきま直径 d は次のように仮定できる。

$$(式1) \quad V_{C1} = \Omega \cdot \pi \cdot \frac{d^2}{4}$$

単位時間当たりのすきま容積に存在するビーズの数は以下になる。

$$(式2) \quad \frac{dN_b}{dt} = C_b(t) \cdot V_{C1}$$

容積 V は平均移動度を持つ生物を含有するものと仮定する。この容積内では食物粒子もしくはビーズは $C_b(t)$ である。

単位時間当たりのビード濃度変化は、

$$(式3) \quad \dot{C} = \frac{d(C_b(t))}{dt} = -\frac{dN_b(t)}{dt} \cdot \frac{N_0}{V}$$

のように変化する。

(1) と (2) を (3) に代入すると、時間経過と共にビード濃度が変化する速度は、以下の微分方程式で表される。

$$(式4) \quad \frac{d(C_b(t))}{dt} = -C_b(t) \cdot \pi \cdot \frac{d^2}{4} \cdot \Omega \cdot \frac{N_0}{V}$$

定数 k を次のように定義する。

$$(式5) \quad K = \pi \cdot \frac{d^2}{4} \cdot \Omega \cdot \frac{N_0}{V}$$

そうすると、 $1/k$ は、ビード濃度が下がる速度を反映する時定数である。従って (5) は次のようになる。

$$(式6) \quad \frac{d(C_b(t))}{dt} = -K \cdot C_b(t)$$

(6) を積分すると次のようになる。

$$(式7) \quad C_b(t) = C_{B0} \cdot e^{-Kt}$$

$t = 0$ で、 $C_N = (t = 0) = C_{B0}$ のとき (7) は次のようになる。

$$(式8) \quad C_b(t) = C_{B0} \cdot e^{-Kt}$$

捕食速度は、生物毎に単位時間当たりに摂取されるビーズの数と定義され、以下の式で表される。

10

20

30

40

$$(式9) \quad FR = \frac{dN_b}{dt} \cdot \frac{1}{N} = \frac{d(C_b)}{dt} \cdot \frac{V}{N_0}$$

(8)と(9)を組み合わせると、Fは以下ようになる。

$$(式10) \quad FR = K \cdot C_b(t) \cdot \frac{V}{N_0}$$

$d(C_b)/dt$ が $C_b(t)$ に比べて小さいと仮定すれば、Fは定数となり以下のように表される。

$$(式11) \quad FR = K \cdot C_b \cdot \frac{V}{N_0}$$

10

図7Aは、3通りの異なる生物濃度、即ち100ワムシ/ml、250ワムシ/ml、及び1000ワムシ/mlにつき、数式8で求められたモデルによる、正規化されたビード濃度対捕食時間を示す。この場合捕食速度(FR)をモデル化するために使用された分析値は12.7ビーズ/分である。

この値は、以下の仮定、即ち生物がワムシであり、そのすきま割合は移動度15cm/秒で150μm直径の断面に比例するという仮定に基づき計算された。技術の感応度は生物濃度に強く依存しているということに留意することが肝心である。

結果

図7Bは、1ppmのジアザノンを含むしている試験サンプルと対照サンプルにつき、正規化された蛍光球体濃度と捕食時間の関係を示している。モデルに対して実験結果を比較

20

するために、500ワムシ/mlの濃度を使用した。この対照サンプルに関しては、モデルと実験の間の相関は最初の600秒に関してはすばらしい。この領域では、平均捕食速度は 2.9×10^{-3} ビーズ/秒である。900秒後にモデルから実験が逸れるのには2つの要因がある。第1に、モデルは C_b の変動が C_b に比較して小さいままで、従って捕食速度は一定であると仮定していることである。実際には、捕食速度は食料濃度に依存しており、900秒後には50%下がった。この変動は無視できない。第2に、ワムシは平均消化経過時間が1200秒だということである。蛍光球体はワムシによって代謝されないの、1000秒後にはワムシによりサンプル中に吐き戻されてしまい、このことがビード濃度の増加に寄与することになる。

試験サンプルについては、蛍光球体の濃度は、生物当たりの消化速度 10^{-3} ビーズ/秒に比例した傾斜でわずかに下がっている。ここでは、捕食速度は、1ppmのジアザノンへの暴露から30係数分下がった。

30

図7Cは、1ppmのジアザノンを含むしている試験サンプルと対照サンプルにつき、正規化された蛍光球体濃度と捕食時間の関係を示している。生物の濃度は、今度は600ワムシ/mlである。

ここでもまた、対照サンプルに関し、モデルと実験とは最初の600秒に関してはすばらしい一致を示している。捕食速度は、先に入手した生物当たり1.7ビーズ/分という値と比べ、生物当たり3ビーズ/分である。試験サンプルに関しては、ビーズの濃度は時間が経過してもほとんど変化のないままで、捕食速度は0.05ビーズ/分未満を指している。この計測は、先の実験と一致する。

40

図7Dは、600ワムシ/mlサンプルと1000ワムシ/mlサンプルにつき、正規化された蛍光球体濃度と捕食時間の関係を示している。2個のサンプルを、濃縮された2μm蛍光球体に1700秒間曝した。蛍光球体濃度は、継続してモニターされ、正規化された濃度は報告されて先に述べた隙間割合モデルと比較された。モデルと実験の一致度は、生物当たりの平均捕食速度に対して最適であり、4.8ビーズ/分に等しい。

質量の項で捕食速度を表すと、以下の数式が使える、

$$(数式12) \quad \dot{M} = FR \cdot \rho \cdot V_{flow}$$

ここにFR、 ρ 、及び V_{flow} はそれぞれ、個々のワムシ当たりの平均捕食速度、蛍光球体密度、及び個々の蛍光球体容積である。ここで、捕食速度が4.8ビーズ/分、球形状の

50

蛍光球の密度が 1.055 g/ml で直径が $2 \mu\text{m}$ という場合は、生物当たり $M - dot = 21 \times 10^{-12} \text{ g/分}$ である。

本発明に関しこれまで述べてきたのは説明のためである。余すところ無く記したり、本発明を開示された形態に寸分違わず限定することは意図していない。多くの修正や変更が行えることは当業者には自明であろう。本発明の範囲は以下の請求項並びにそれと等価なものによって定義されるものである。

【図 1】

100

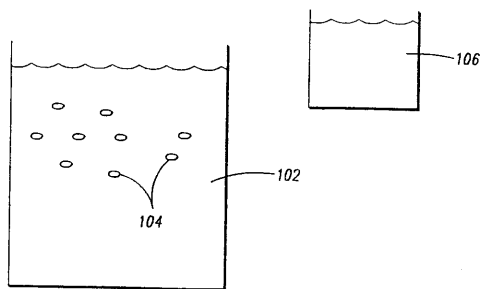


FIG. -1

【図 2 A】

200

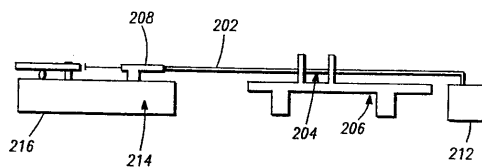


FIG. -2A

【図 2 B】

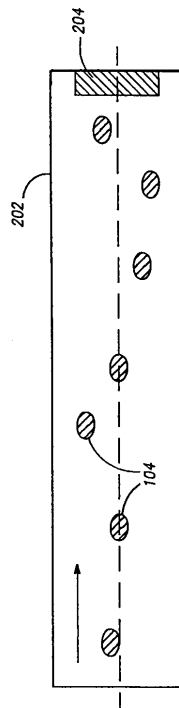
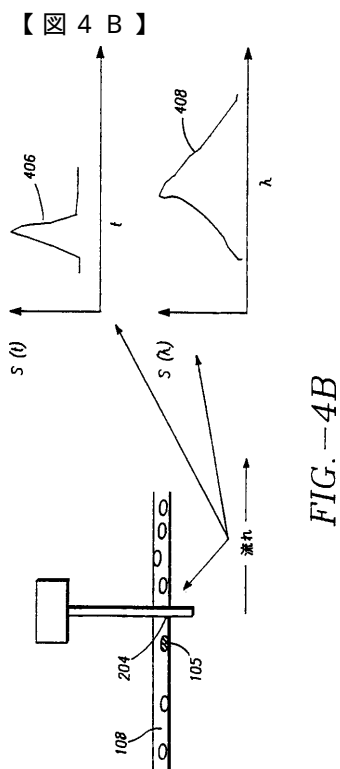
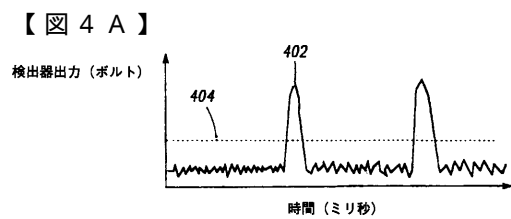
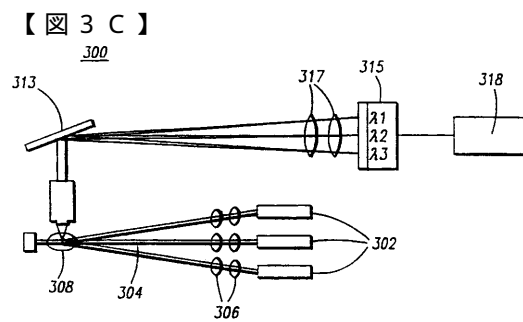
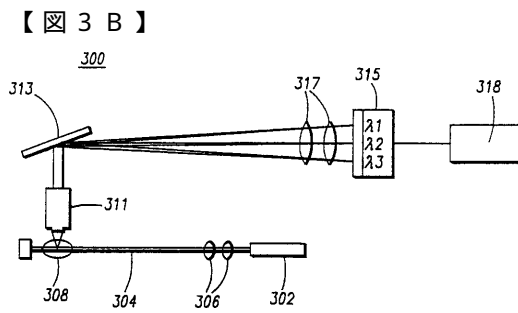
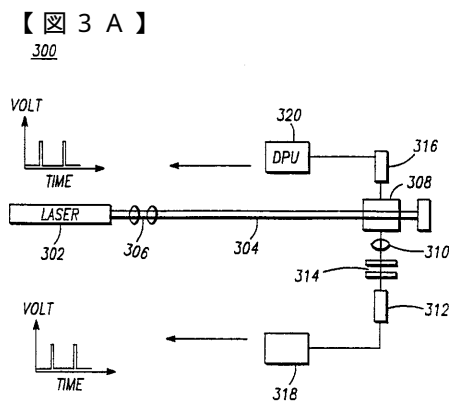
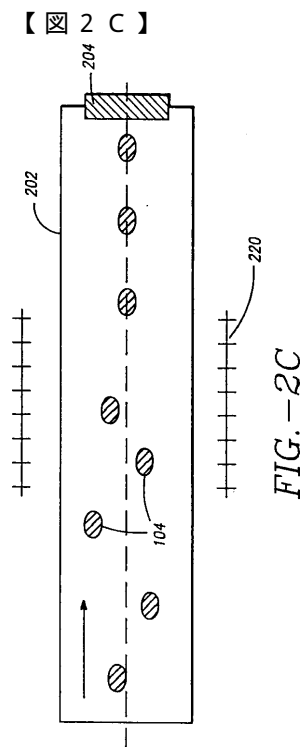


FIG. -2B



【図 5 A】

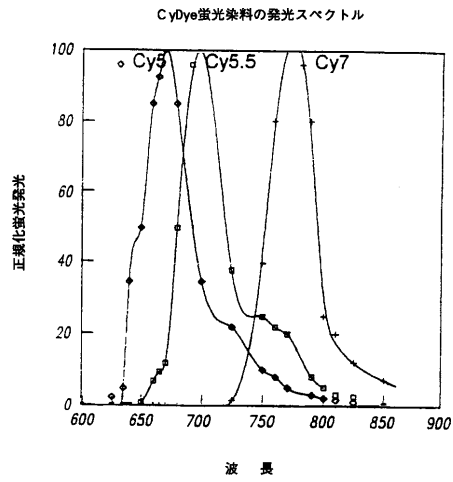


FIG.-5A

【図 5 B】

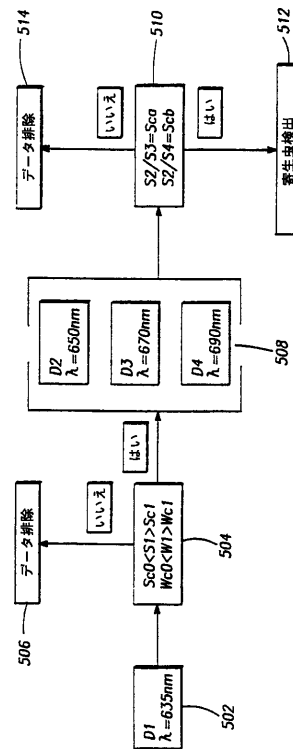


FIG.-5B

【図 6 A】

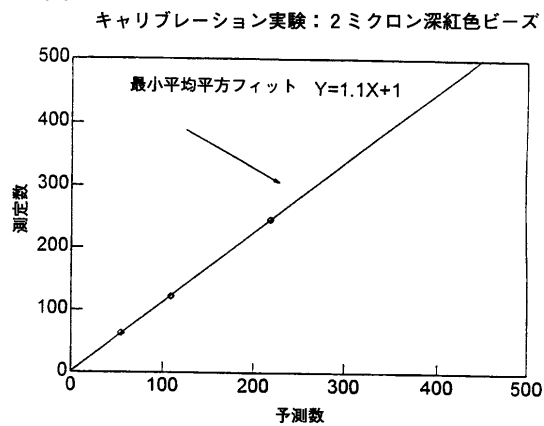


FIG.-6A

【図 6 B】

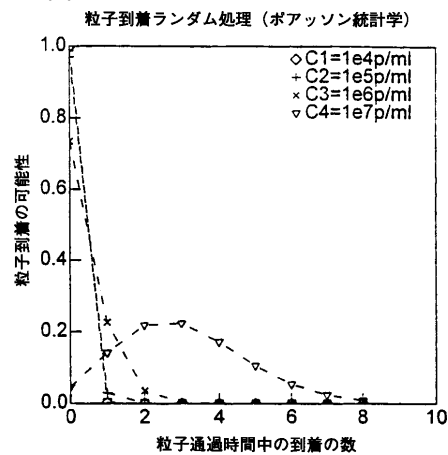


FIG.-6B

【図 6 C】

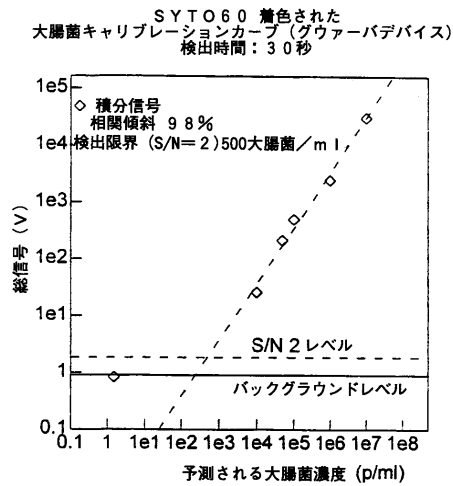


FIG.-6C

【図 7 A】

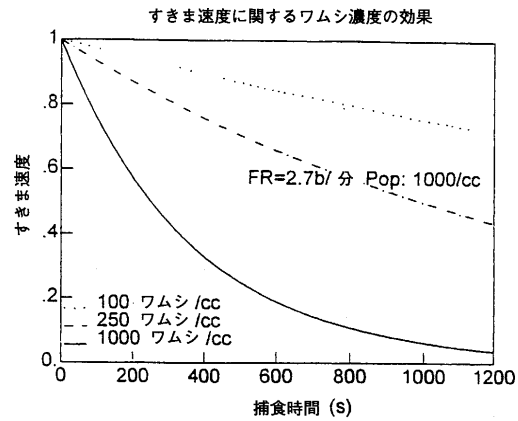


FIG.-7A

【図 7 B】

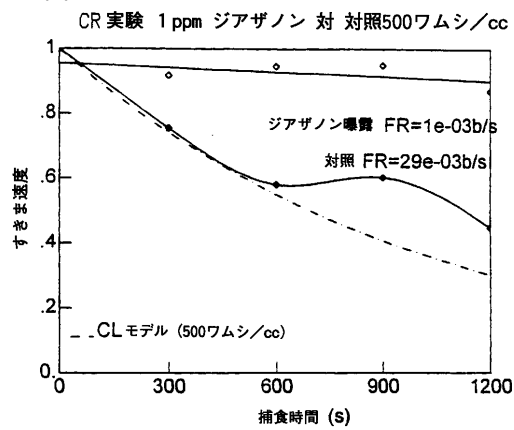


FIG.-7B

【図 7 C】

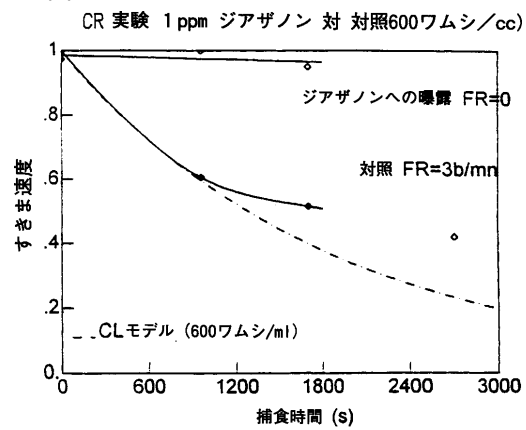


FIG.-7C

【図 7 D】

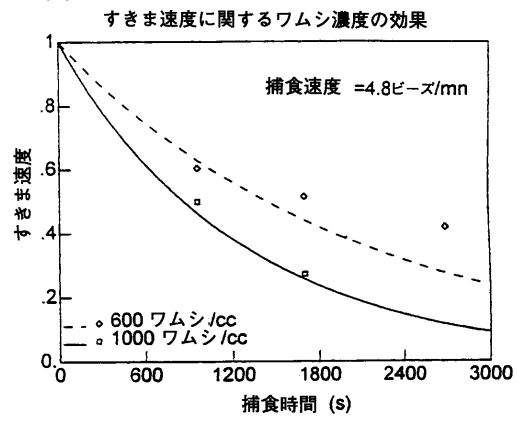


FIG. - 7D

フロントページの続き

(74)代理人 100109335

弁理士 上杉 浩

(74)代理人 100141553

弁理士 鈴木 信彦

(72)発明者 ゴーイクス フィリップ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 6 1 1 オークランド フローレンス テラス 5 6 1
2

合議体

審判長 岡田 孝博

審判官 横井 亜矢子

審判官 信田 昌男

(56)参考文献 特開平5 - 1 8 0 7 5 1 (J P , A)

特開平7 - 2 8 6 9 5 3 (J P , A)

特開平4 - 1 0 2 0 6 2 (J P , A)

特開平8 - 1 6 3 9 9 6 (J P , A)

特開昭63 - 2 3 1 2 4 4 (J P , A)

特開平6 - 9 4 7 2 2 (J P , A)

特表平4 - 5 0 0 2 7 4 (J P , A)

特表平10 - 5 1 2 9 5 2 (J P , A)

国際公開第97 / 1 2 2 2 3 (W O , A 1)

特開平2 - 1 4 5 9 4 1 (J P , A)

特開平5 - 3 1 2 8 1 1 (J P , A)

特開平5 - 2 9 6 9 1 4 (J P , A)

C . M . Juchelka , T . W . Snell , Rapid Toxicity Assessment Using Rotifer Ingestion Rate , Archives of Environmental Contamination and Toxicology , 2 6 , 5 4 9 ~ 5 5 4 , 1 9 9 4

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N15/00 ~ 15/14