

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6550076号
(P6550076)

(45) 発行日 令和1年7月24日 (2019.7.24)

(24) 登録日 令和1年7月5日 (2019.7.5)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 B
G O 1 B 11/03 (2006.01)	G O 1 B 11/03 H
G O 1 N 21/47 (2006.01)	G O 1 N 21/47 Z

請求項の数 11 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2016-564204 (P2016-564204)	(73) 特許権者	591032596
(86) (22) 出願日	平成27年3月30日 (2015.3.30)		メルク パテント ゲゼルシャフト ミツ
(65) 公表番号	特表2017-514473 (P2017-514473A)		ト ベシュレンクテル ハフツング
(43) 公表日	平成29年6月8日 (2017.6.8)		Merck Patent Gesell
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/000679		schaft mit beschrae
(87) 国際公開番号	W02015/161914		nkter Haftung
(87) 国際公開日	平成27年10月29日 (2015.10.29)		ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ
審査請求日	平成30年3月29日 (2018.3.29)		ルムシュタット フランクフルター シュ
(31) 優先権主張番号	14290114.9		トラーセ 250
(32) 優先日	平成26年4月22日 (2014.4.22)		Frankfurter Str. 25
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		O, D-64293 Darmstadt
			, Federal Republic o
			f Germany
		(74) 代理人	100102842
			弁理士 葛和 清司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サンプルの膜またはアガロース媒体上で増殖する微小コロニーを検出する方法および無菌テスト装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

閉デバイス (3) におけるサンプル (5) の膜 (1) またはアガロース媒体上で増殖する微小コロニーを検出する方法であって、該方法は：

デバイス (3) の外から膜 (1) またはアガロース媒体の表面法線に対してゼロとは異なる角度 (β) の入射光線をサンプル (5) に照射するステップ；

デバイス (3) の外から膜 (1) またはアガロース媒体の表面への法線に対する角度 (β) およびゼロとは異なる撮像角度 (α) を使用した受光素子 (9) を利用して、膜 (1) またはアガロース媒体の表面上の光の入射領域 (7) を撮像するステップ；

膜またはアガロース媒体の表面および / または膜上の微小コロニーまたはアガロース媒体上の微小コロニーから、反射、散乱および / または拡散された光を検出するステップ；および、

受光素子 (9) に対するサンプルの直線運動および回転運動によって、膜 (1) またはアガロース媒体の表面をスキャンするステップを含み、

ここで、受光素子 (9) に対するサンプル (5) の相対運動が少なくとも連続的な、撮像された入射領域 (7) のサンプル (5) の中心からその境界に向けての直線運動、続いてサンプル (5) のその中心軸回りの回転運動、および、撮像された入射領域 (7) のサンプル (5) の境界からその中心に向けての直線運動、または、

撮像された入射領域 (7) のサンプル (5) の境界からその中心に向けての直線運動、続いてサンプル (5) のその中心軸回りの回転運動、および、撮像された入射領域 (7)

10

20

のサンプル（５）の中心からその境界に向けての直線運動、を含み、および、
入射光の照射方向と、撮像された入射領域（７）のサンプル（５）の中心からその境界
に向けての直線運動移動の方向との間の角度（ γ ）、および、撮像された入射領域（７）
のサンプル（５）の中心からその境界に向けての直線運動移動の方向と、受光素子（９）
の撮像方向との間の角度（ δ ）が、 90° を超えるようにセットされる、

前記方法。

【請求項２】

サンプルを照らすパターンを具備する電気光源を使用し、前記パターンは、点、ライン、複数のライン、正方形パターン、円弧または円パターン、クロスパターン、多数の正方形／円形パターン、格子パターンまたは二次元領域、円スポット、長方形スポットまたは

10

【請求項３】

三角測量法を使用して受光素子（９）上の入射領域の画像の位置に基づいて、膜（１）またはアガロース媒体の表面の撮像された入射領域（７）の高さにおける変化を決定するステップを含む、請求項１または２に記載の方法。

【請求項４】

微小コロニーの検出が、画素センサの画素アレイの各ラインまたは列の光強度ピーク周辺の閾値より上の信号レベルを受信する画素の数を使用することによる、光の変化を検出することによって行われる、請求項１または２に記載の方法。

20

【請求項５】

微小コロニーの検出が、画素センサの画素アレイの各ラインまたは列のための最高の信号レベルを使用することによる、光のピーク強度値における変化を検出することによって行われる、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６】

微小コロニーの検出が、画素センサのアレイの信号レベルを使用して、光の強度値における変化を検出することによって行われる、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７】

膜（１）全体またはアガロース媒体の表面全体を照らして撮像するように、光源（１３）および受光素子（９）に対するサンプルの相対運動を行うことを含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項８】

角度（ δ ）が、角度（ γ ）を超えるようにセットされる、請求項１～７のいずれか一項
に記載の方法。

【請求項９】

角度（ γ ）が、角度（ δ ）を超えるようにセットされる、請求項１～７のいずれか一項
に記載の方法。

【請求項１０】

閉デバイス（３）におけるサンプル（５）の膜（１）またはアガロース媒体上で増殖する微小コロニーを検出する装置であって、該装置は：

40

デバイス（３）の外から膜（１）またはアガロース媒体の表面への法線に対してゼロとは異なる角度（ β ）の入射光線をサンプル（５）に照射するための光源；

デバイス（３）の外から膜（１）またはアガロース媒体の表面への法線に対する角度（ β ）およびゼロとは異なる撮像角度（ α ）を使用した受光素子（９）を利用して、膜（１）またはアガロース媒体の表面上の光の入射領域（７）を撮像するための受光手段（９）；
；

膜またはアガロース媒体の表面および／または膜上の微小コロニーまたはアガロース媒体上の微小コロニーから、反射、散乱および／または拡散された光を検出する手段；および、

受光素子（９）に対するサンプルの直線運動および回転運動によって、膜（１）または

50

アガロース媒体の表面をスキャンする手段を含み、

ここで、受光素子（９）に対するサンプル（５）の相対運動が少なくとも連続的な、
撮像された入射領域（７）のサンプル（５）の中心からその境界に向けての直線運動、
続いてサンプル（５）のその中心軸回りの回転運動、および、撮像された入射領域（７）
のサンプル（５）の境界からその中心に向けての直線運動、または、
撮像された入射領域（７）のサンプル（５）の境界からその中心に向けての直線運動、
続いてサンプル（５）のその中心軸回りの回転運動、および、撮像された入射領域（７）
のサンプル（５）の中心からその境界に向けての直線運動、を含み、および、
入射光の照射方向と、撮像された入射領域（７）のサンプル（５）の中心からその境界
に向けての直線運動移動の方向との間の角度（ γ ）、および、撮像された入射領域（７）
のサンプル（５）の中心からその境界に向けての直線運動移動の方向と、受光素子（９）
の撮像方向との間の角度（ δ ）が、 90° を超えるようにセットされる、

10

前記装置。

【請求項１１】

光源（１３）が、サンプルを照らすパターンを照射するように構成された電気光源であり、前記パターンは、点、ライン、複数のライン、正方形パターン、円弧または円パターン、クロスパターン、多数の正方形／円形パターン、格子パターンまたは二次元領域、円スポット、長方形スポットまたは正方形スポットであり、受光素子（９）が、画素センサのアレイを含有する、請求項１０に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【０００１】

本発明は、膜またはアガロース媒体上で増殖する微小コロニーを検出する方法および無菌テスト装置に関する。

【背景技術】

【０００２】

医薬品業界における無菌テストのための現行の簡便な方法は、培養ベースのままであり、１４日間のインキュベーションを含む。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【０００３】

アデノシン三リン酸（ＡＴＰ）生物発光は、特定の基質および酵素の組み合わせ、ルシフェリン／ルシフェラーゼ、を利用する確立された高速法であり、増殖する細胞から微生物ＡＴＰを分解して可視光を生成し、それは照度計を使用して測定できる。特に、サンプルにおける非微生物ＡＴＰに対する関心がより少ない過サンプルのための、無菌テストを含む、いくつかの商業的なシステムが、さまざまな医薬品テスト応用のために開発されてきた。培地における微生物増殖の検出が、視認できる濁度によるものでなく、ＡＴＰ生物発光によって成し遂げられるため、テスト時間が大幅に減少される。一般的に、標準テストのそれと同等の結果が、７日間以内またはそれ以下で得られる。

【０００４】

40

メルクミリポア社からのミリフレックス（登録商標）高速微生物検出および計数システムもまた、微生物細胞を検出するためのＡＴＰ生物発光を使用し、特にろ過できるサンプルにおける微生物汚染を監視するために設計されている。それは自動であり、生物発光試薬を加えた後の膜フィルタの表面上で直接的に増殖する微小コロニーを検出するための画像解析技術を採用している。システムは、定量的であるように設計されているが、ひとつの方法が高速無菌テストのためにこれを使用するように開発および実証されている。

【０００５】

比色増殖検出法は、成長段階での微生物代謝の結果として、多くの場合 CO_2 産出の結果として、増殖媒体において生成される色変化に依存する。無菌テストに使用可能な商業的な比色アッセイシステムの例は、ピオメリュー社からのBacT/ALERT（登録商標）3D Du

50

al-T 微生物検出システムがある。システムは自動であり、高感度の色検出および解析技術を採用している。それは、好気性および嫌気性両方のバクテリア、ならびに酵母菌類およびカビを検出することが可能である。

【0006】

すべての生体細胞は、少ない量の蛍光（自己蛍光）を生成し、これは固体表面上で増殖する微小コロニーを、これらが裸眼で視認可能である前に検出するために使用可能である。この技術は、ろ過可能なサンプルのために特に有益であり、膜フィルターは従来の培養液上でインキュベートされ、高感度画像システムを使用してスキャン可能であり、従来のコロニー計数法を使用するよりも数日早く微小コロニーを検出する。

【0007】

自己蛍光検出は、Growth Direct社のRapid Micro Biosystemsとして商業化され、それは顕微後処理の微小コロニーを検出するための拡大なしの広域CCD画像システムを使用する。無菌製品をテストする保証はまだされていないが、“概念実証”は確立されている。システムは自動であり、高感度の色検出および解析技術を採用している。それは、好気性および嫌気性両方のバクテリア、ならびに酵母菌類およびカビを検出することが可能である。

【0008】

一方で、血球計算は、汚染を検出するための微生物増殖に依存しないが、代わりに、生存可能な微生物を検出するための細胞ラベリング技術を使用する。このアプローチは、酵母菌類およびカビを含む、広い範囲の有機体を数分で検出する可能性を有する。商業的なシステムは、生存可能な微生物細胞を検出するための蛍光性細胞ラベリングおよびフローサイトメトリーまたは固相サイトメトリーの組み合わせを使用する。一般的に、蛍光性染色または非蛍光性基質を使用してラベリングされ、それは生存可能な細胞における蛍光色素に変換される。ラベリングされた細胞の検出は、フローセル（フローサイトメトリー）または膜フィルタなどの固相プラットフォーム（固相サイトメトリー）上のどちらかにおけるレーザースキャンによって起こる。AES Chemunexは、固相サイトメトリー検出システムを開発した。

【0009】

WO 2011/125033 A1 (PCT/IB2011/051481)は、膜またはアガロース媒体上の生物学的粒子のクラスターを検出するための方法を開示している。この最先端文献の方法は、表面のトポグラフィー表現の決定、および、トポグラフィー表現上における生物学的粒子のクラスター、すなわち微小コロニーに対応しそうな領域を画定する少なくとも1つの輪郭の検出を開示している。

【0010】

この方法は、微小コロニーの直径が裸眼で視認するにはとても小さいときに（数十マイクロメートル、例えば30 μm以下の直径）、増殖における初期段階で微小コロニーを検出することを目標としている。

表面のトポグラフィー表現を取得するために、膜は開ベトリ皿内に配置され、周囲に曝されながらスキャンされる。これは膜のさらなる汚染につながるかもしれない。

【0011】

一方で、EP 1428018 B1は、広域撮像を使用してin situの細胞分裂に由来する微小コロニーを検出することによって生体細胞を計数するための方法を開示している。この文献に基づく微生物計数テストは、ラベリング試薬なしで細胞状の微小コロニーを検出するための非破壊無菌性法を含む。これらの方法は、純粋培養の生成を可能にし、これは微生物同定および抗菌剤耐性の決定のために使用可能である。

【0012】

COPAN社は、2011年4月に、商標WASPLab（登録商標）の下で、微小コロニーの増殖を検出するためのデバイスを発表した。膜の画像は、平面図フォトグラフィーおよびレーザートポグラフィーマッピングによって取られる。そして、膜が周囲に曝されながらデータが取得される。したがって、この方法は無菌テストには適さない。

10

20

30

40

50

上記すべての方法は、開放デバイスにおける検出と追加の試薬の仕様とのどちらかに依存するものであるか、または、無菌テストのための今日の要求に適合するには遅すぎるものである。

【0013】

近年では、WO 2014/005669 Aが、ろ過ユニットのための1以上の容器、好ましくは媒体コンテナ/バイアルのための1以上の追加の容器、および、少なくとも1つの入口および/または出口ポートを含むマニホルドを含む、好ましくは無菌テストのためのサンプル調製デバイスを開示している。容器には、各容器中へサンプルを挿入すると同時に、ろ過ユニットおよび媒体コンテナ/バイアルの結合ポートとの流体接続を確立するための1以上のコネクタがそれぞれ提供される。コネクタは、マニホルドにおいて画定されるチャンネルを介して入口および出口と流体接続され、マニホルドを通した所望の流体移行を可能にする。

10

【0014】

ろ過ユニットは、膜サポートを画定する基部、基部を具備する膜チャンバを画定し膜チャンバを周囲からシールするための取り外し可能な蓋、および、それぞれがろ過ユニットの外からアクセス可能で、膜サポート上に提供されたときに膜の上流および下流位置で膜チャンバと通じる、少なくとも1つの入口ポートおよび少なくとも1つの出口ポートを含む。入口ポートおよび出口ポートには、外部容器上の結合コネクタ、好ましくはサンプル調製デバイスのマニホルドのコネクタに接続する際に開放され、遮断時に自動的に再シール可能なように形成されたシール機構がそれぞれ設けられる。

20

【0015】

本発明の目的は、環境による汚染の危険性がなく、追加の試薬を使用することなく、閉デバイス内の微小コロニーおよび微生物の迅速な検出を可能にする新規な方法および対応する無菌テストデバイスを提供することである。

上記目的は、請求項1に記載の方法および請求項12に記載の装置によって達成される。従属請求項は、本発明の異なる有利な態様を対象とする。

【0016】

本発明によれば、閉デバイス中のサンプルの膜またはアガロース媒体上で増殖する微小コロニーを検出するための方法が提供される。本方法は：

閉デバイスの外から膜またはアガロース媒体の表面法線に対して角度 β で入射する光線をサンプルに照射するステップ；

30

閉デバイスの外から膜またはアガロース媒体の表面への法線に対する角度 β とは異なる撮像角度 α を使用した受光素子を利用して、膜またはアガロース媒体の表面上の光の入射領域を撮像するステップ；

膜またはアガロース媒体の表面および/または膜上の微小コロニーまたはアガロース媒体上の微小コロニーから、反射、または後方散乱された光を検出するステップを含む。

【0017】

さらなる態様として、上記の方法は、サンプルを照らすパターンを具備する電動光源を使用することを意図しており、パターンは、点、線、複数の線、正方形パターン、円弧または円パターン、クロスパターン、多数の(正方形/円形)パターン、格子パターンまたは二次元領域、円スポット、長方形スポットまたは正方形スポットであり、受光素子は、画素センサのアレイを含有する。

40

【0018】

さらなる態様として、上記の方法は、三角測量法を使用して受光素子上の入射領域の画像の位置に基づいて、膜またはアガロース媒体の表面の入射領域の高さにおける変化を決定するステップを含む。

【0019】

さらなる態様として、上記方法は、画素センサの画素アレイの各ラインまたは列の光強度ピーク周辺の閾値より上の信号レベルを受信する画素の数を使用することで、膜またはアガロース媒体の表面から、反射、散乱および/または拡散された光の変化を検出するこ

50

とによって、汚染物質様の微小コロニーを検出することを意図している。

【0020】

さらなる態様として、上記方法は、画素センサの画素アレイの各ラインまたは列の最高の信号レベルを使用することで、膜またはアガロース媒体の表面から、反射、散乱および/または拡散された光のピーク強度値における変化を検出することによって、微小コロニーを検出することを意図している。

【0021】

さらなる態様として、上記方法は、画素センサのアレイの信号レベルを使用することで、膜またはアガロース媒体の表面から、反射、散乱および/または拡散された光の強度値における変化を検出することによって、微小コロニーを検出することを意図している。

10

【0022】

さらなる態様として、上記方法は、受光素子に対するサンプルの直線運動および/または回転運動によって、膜またはアガロース媒体の表面および/または膜上の微小コロニーまたはアガロース媒体上の微小コロニーをスキャンすることをさらに含む。

【0023】

上記方法のさらなる態様として、受光素子に対するサンプルの相対運動は、入射領域のサンプルの中心からその境界に向けての移動、続いてサンプルの中心軸回りのサンプルの回転運動、入射領域のサンプルの境界からその中心に向けての移動、または、入射領域のサンプルの中心からその境界に向けての移動、入射領域のサンプルの境界からその中心に向けての移動、続いてサンプルのその中心軸回りの回転運動の連続的な直線運動によって形成される。

20

【0024】

さらなる態様として、上記方法は、光源および受光素子に対するサンプルの相対運動を実行する間に、膜の全体またはアガロース媒体の表面全体の照射および撮像をするように、光源および受光素子を配置することを含む。

【0025】

上記方法におけるさらなる態様として、入射領域の中心から境界に向けての直線運動移動の方向と、受光素子の撮像方向との間の角度 δ が、中心から境界への入射領域の直線運動移動の方向と、レーザー光の照射方向との間の角度 γ を超えるようにセットされる。

【0026】

上記方法におけるさらなる態様として、中心から境界への入射領域の直線運動移動の方向と、レーザー光の照射方向との間の角度 γ が、入射領域の中心から境界に向けての直線運動移動の方向と、受光素子の撮像方向との間の角度 δ を超えるようにセットされる。

30

さらなる態様として、本発明は、先述のいずれかの方法を実行するための無菌テスト装置を提供する。

【0027】

特に、無菌テスト装置は、閉デバイスにおけるサンプルの膜またはアガロース媒体上で増殖する微小コロニーを検出するように構成され、デバイスの外から膜またはアガロース媒体の表面への法線に対して角度 β の入射光線をサンプルに照射するための光源、デバイスの外から膜またはアガロース媒体の表面への法線に対する角度 β とは異なる撮像角度 α を使用した受光素子を利用して、膜またはアガロース媒体の表面上の光の入射領域を撮像するための受光素子、および、膜またはアガロース媒体の表面および/または膜上の微小コロニーまたはアガロース媒体上の微小コロニーから、反射、散乱および/または拡散された光を検出する手段を含む。

40

【0028】

本発明のさらなる態様の無菌テスト装置は、サンプルを照らすパターンを照射するように構成された電気光源である光源を有し、パターンは、点、ライン、複数のライン、正方形パターン、円弧または円パターン、クロスパターン、多数の(正方形/円形)パターン、格子パターンまたは二次元領域、円スポット、長方形スポットまたは正方形スポットである。

50

【 0 0 2 9 】

本発明のさらなる態様の無菌テスト装置は、受光素子に対するサンプルの直線運動および/または回転運動によって、膜またはアガロース媒体の表面および/または膜上の微小コロニーまたはアガロース媒体上の微小コロニーをスキャンする手段をさらに含む。

【 0 0 3 0 】

本発明は特に、トポグラフィー自体のために3Dカメラを活用することが可能である。さらに、3Dカメラの2D撮像能力は、追加の情報を提供するために使用可能である。例えば、カメラによって記録された“品質マップ(quality map)”(すなわちライン内側の最高のグレー値)を、トポグラフィーとして同時に使用可能である。代替的または追加的に、カメラによって記録された“幅マップ(width map)”(すなわちライン幅)を、

10

【 0 0 3 1 】

本発明によれば、高さ測定を単独で使用することも、また、2D写真、品質マップまたは幅マップの様な他の信号との組み合わせる利点を取ることも可能である。

以下において、本発明の好ましい態様が、添付の図面を参照して説明される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 2 】

【図1】図1は、サンプルに対するレーザー光源および3Dカメラの配置の概略図である。

【図2】図2は、請求項1による照射領域がサンプルの境界に近いときの概略図である。

20

【図3】図3は、一方のサンプルと、他方の光源および3Dカメラとの間のスキャン移動を図示した概略図である。

【図4】図4Aおよび図4Bは、本発明を使用したサンプルのスキャンの結果である。

【図5】図5は、本発明のフロー図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 3 】

以下において、本発明を実施するための例が、上記図面を参照して説明される。

本発明は、WO 2014/005669 Aパンフレットに記載されているような、“死角”および“アーチファクト”を避けるために実施されるトポグラフィー測定によって、閉デバイス中の膜(またはアガロース媒体)上で増殖する微小コロニーを普遍的に検出するための方法

30

を対象にしており、無菌テスト応用に適している。

【 0 0 3 4 】

一方で、「死角」は、偽陰性結果のリスクの増加を招き、検出方法を無菌テスト応用と関連しないものと示す。他方で、「アーチファクト」は、偽陽性率を促進し、非汚染パッチの廃棄という、財務上の結果をもたらすため、顧客の受け入れを減少させる。

【 0 0 3 5 】

トポグラフィー測定は、無菌応用のために使用される通常の膜上、すなわち抗生物質または抗菌剤との製品ののためのセルロース膜(HA膜)およびポリビニリデンフルオライド(PVDFまたはHV膜)膜の混合エステル上で行われる。

【 0 0 3 6 】

40

トポグラフィー測定は、光、好ましくはLED光またはレーザー光、およびカメラの助けを借りた三角測量法を使用する。閉デバイスの境界(垂直エッジ)での光の多重反射によるアーチファクトを回避し、光は常にカメラによって視認される。

好ましい態様において、“LED光”は、レーザー光源を使用する場合には邪魔になるかもしれないスペckル効果を防ぐことから、光源として使用される。

【 0 0 3 7 】

LEDで利用可能な典型的な波長は、近赤外線、すなわち405nm、青色、すなわち465nm、または緑色、すなわち525nmである。しかしながら、本発明はこれらの波長に限定されない。

最初のテストでは、465nmの波長は、他の波長よりもHV膜上のノイズが少ないこ

50

とが示されている。

【 0 0 3 8 】

図 1 および図 2 は、サンプル 5 を一緒に形成する透過蓋 1 5 を含む閉デバイス 3 内に設けられた膜 1 を示す。サンプル 5 は、発光デバイス 1 3 からの光、例えばレーザ光源で照射される。レーザ光源 1 3 は、膜上に入射領域 7 を得るように、透過蓋 1 5 を通してサンプル 5 の閉デバイス 3 内の膜 1 に向けてレーザ光を照射する。

【 0 0 3 9 】

本態様における受光素子 9 は、光入射領域 7 を撮像する、画素センサのアレイを含むカメラ (3 D カメラ) である。受光素子 9 は、例えば、CCD カメラ、CMOS カメラ、アクティブピクセルセンサなどであり得る。光入射領域 7 は、1、2、3 等の点、ライン、
10 ラインパターン、正方形パターン、円弧または円パターン、十字パターン、多数の (正方形 / 円形) パターン、格子パターンまたは表面 (円スポット、長方形スポット、正方形スポット) のいずれかであり得る。

【 0 0 4 0 】

レーザ光源 1 3 とカメラ 9 とは、互いに所定の位置関係で規定および固定されるように、サポート構造 1 7 上に取り付けられている。

【 0 0 4 1 】

一例として、レーザ光源 1 3 と受光素子 9 の組み合わせのために、波長 4 0 5 n m のキーエンス社の L J - V 7 0 6 0 ラインレーザスキャナと、8 k H z のサンプルレートを具備する受光素子としての CMOS とを使用することが可能である。スキャナによって得ら
20 れるレーザ線、すなわち入射領域 7 の長さは、約 1 5 m m である。スキャナは、膜 1 から 6 0 m m の距離で使用することができる。サンプル 5 は、回転テーブルおよびリニアテーブルを含む運動テーブル上に置かれ、それにはサンプル 5 を掴み、それをステージ上に置くグリッパーが提供されてもよい。

【 0 0 4 2 】

本発明によれば、膜の表面の法線に対するカメラの光軸、または、レーザ光の照射方向と膜の表面法線方向とで形成される照射角 β および撮像角 α はそれぞれ、ゼロとは異なることが好ましい。さらに、これらの角度は、互いに異ならなければならない。

【 0 0 4 3 】

1 つの好ましい態様において、 $\alpha = 40^\circ$ 、 $\beta = 5^\circ$ である。

α および β の値は、広い範囲から選択可能である。例えば、レーザ光源 1 3 およびカメラ 9 の位置は逆でもよい。

【 0 0 4 4 】

カメラ 9 は、微小コロニー検出ユニット (図示せず) に接続されており、これは、3 D カメラから得られた画像情報を受信し、この情報を処理して任意の微小コロニーを検出する。したがって、膜またはアガロース媒体の表面および / または膜上の微小コロニーまたはアガロース媒体上の微小コロニーから、反射、散乱および / または拡散された光を検出することによって、および、検出された 3 D カメラ上の反射、散乱および / または拡散された光の位置情報を処理および評価することによって、微小コロニーの存在を判定することが
40 できる。

【 0 0 4 5 】

微小コロニーは、膜の表面に垂直な方向におけるいくつかの増殖を有するであろう。これは検出可能である。

三角測量のよく知られた式によれば、膜 1 の高さ $d Z$ の変化は、次の式によって得ることができる。

$$d Z = d X (\cos \beta) / (\sin (\alpha - \beta))$$

ここで、 $d X$ は、受光素子 9 上の入射領域の画像の位置の変化量である。

【 0 0 4 6 】

好ましい態様によれば、レーザまたは LED 光源 1 3 は、膜の平坦部分上の Y 方向の線の形態における光入射領域 7 を形成するように光を放出する。したがって、膜 1 とレーザ
50

光源 13 とカメラ 9 の支持構造 17 との間の相対運動を行うことによって、膜 1 の画定された表面領域をスキャンすることが可能になる。

【0047】

サンプル 5 は、以下のように調製される。最初に、膜 1 は、例えば製薬プロセスにおける液体のろ過プロセスに使用される。その後、サンプルは、そのステージでの汚染を防止するために、閉デバイス 3 を閉状態に維持しながら、どのような死角も残すことなく、膜の表面全体をスキャンすることによる無菌テストのために使用される。本発明の別の態様において、ろ過後および無菌テストの前に、サンプル 5 は、ある期間、例えば 5 日間の間、微小コロニーの増殖を促進するのに適切な環境に置かれる。

【0048】

膜 1 が閉デバイス 3 内に配置されている場合、膜の境界はしばしば閉デバイス 3 の縁またはリム 11 に隣接する。サンプルをスキャンするとき、スキャン工程中に、この縁またはリム 11 が、レーザ光も光入射領域 7 の撮像もブロックしないことを確実にするため、死角は残らず、縁またはリム 11 によるアーチファクトは発生しない。

【0049】

図 2 は、図 1 の撮像システムでかかる縁またはリム 11 にアプローチする場合を示している。本発明によれば、入射光と実際のスキャン方向との間の角度 γ が 90° よりも大きいことが常に保証される。カメラ 9 の光軸と閉デバイス 3 の縁またはリム 11 にアプローチする場合のスキャン方向との間の角度 δ についても同じ関係が適用される。

【0050】

図 3 は、図 1 および図 2 に示されたデバイスを用いたスキャン中の光源 13 および 3D カメラ 9 に関するサンプルの好ましい相対運動の例を示す。好ましい例では、スキャンシーケンスは、サンプル 5 の線形ステージ変位を使用してスキャンストリップを構成する。スキャンがそのストリップの終わりに達すると、すなわち、スキャンが閉デバイス 3 の縁またはエッジ 11 に到達すると、回転ステージは、レーザを次のセクタに置き、次のストリップのスキャンを開始するために、サンプル 5 を回転させ、そして、サンプルを反対方向に移動する、すなわち入射領域 7 を閉デバイスの境界からその中心に向かって変位させる。

【0051】

この特別なスキャンシーケンスの利点は、スキャンが常にカメラ 9 に対するサンプルの直線運動で行われるので、スキャンされる微小コロニーの形状が歪まないか変更されないことにある。

【0052】

ストリップの重なりを、特にサンプル 5 の中心で減少させるために、サンプル 5 の境界に向かって線形移動で中心から所定の距離で開始することが可能である。距離は、入射領域の幅に依存する。膜 1 の中心の残りの非スキャン領域は、ストリップの幅と同様の直径を有するべきである。そして、膜の中心の最初または最後のスキャンがこの領域をカバーする。したがって、図 3 に示すように、膜 1 全体がこの特定のシーケンスでスキャンされる。

【0053】

スキャンの回数は、各スキャンの幅、入射領域の幅およびカメラの視野にそれぞれ依存する。回転テーブルの位置決め誤差のため、スキャンされるストリップの最小数は 3 以上でなければならない。

膜スキャンは高速であり、例えば、47 mm の膜スキャンは、少なくとも $20\ \mu\text{m}$ の空間分解能で 1 分未満を要する可能性がある。

【0054】

通常の信号対ノイズ比は、ナイキスト・シャノンサンプリング定理に従って $25\ \mu\text{m}$ の空間ピッチを与えるセットアップのために、 $50\ \mu\text{m}$ のサイズで微小コロニーの検出を開始することを可能にする。この定理は、画像の解析に関して、分解されるべき最小のディテールが、少なくとも 2 つの画素を用いてサンプリングされなければならないことを述べ

10

20

30

40

50

ている。膜に関して低いコントラストを提示する微小コロニー、例えば、白色膜上の白色微小コロニーのために、本発明は、裸眼より前にどのような微小コロニーも検出できることを意味する。事実、トポグラフィー測定は、色およびコントラストの問題ではなく、形状、すなわち高さおよび直径にのみ関係する。

【0055】

典型的には、ほとんどの細菌について、これは、それらが5日以内のインキュベーションで検出されることを意味する。

HAまたはHV膜のいずれかによる無菌テストのための従来のサンプル調製は、これらの膜タイプが600nmより小さなレーザー波長で検出されるので実施することができる。

10

本発明は、*Methylobacterium extorquens*、*Propionibacterium acnes*、*Aspergillus brasiliensis*、*Dekkera anomala*、*Pseudomonas aeruginosa*のような全ての種類の細菌を検出する能力を有する。

【0056】

別のスキャンシーケンスとして、入射領域がサンプルの中心に向かって直線運動の終わりに達するとき、サンプルを回転させることが可能である。

上記の例では、入射領域はラインとして記述されていた。しかしながら、入射領域7の形状とスキャン運動のシーケンスが膜1の表面全体を完全に死角なしでスキャンすることができるのであれば、複数のラインまたは入射領域7のための異なる形状を使用することが可能である。

20

【0057】

上記の例は、円形の膜1に関して記載されているが、当業者には、長方形の膜のような他の形状の膜1を使用できることは明らかである。したがって、スキャンシーケンスはそれに応じて適合されるべきである。

【0058】

閉デバイス3の閉じた蓋15を通してスキャンを行い、透明、半透明または不透明の膜から反射された光を有するために、閉デバイス3は、蓋15と膜1との間に所定の距離を有するように、600nmより小さな光波長、例えば465nmを有するように、および、蓋15の反射光、散乱光および/または拡散光のマスキングを行うように配置されている。

30

【0059】

閉デバイス3の蓋15と膜1との間の「遠い」距離は、たとえこれらの膜が寒天培地（液体または固体）上で半透明であっても、透明な蓋15を通してHAおよびHV膜または他の種類の膜上のどのような微小コロニーを検出することをも可能にする。上述したように、蓋15を膜から「遠い」距離に配置することによって、蓋15から来るレーザー線の放出はカメラ9のセンサに当たらず、したがって検出されない。

【0060】

幾何学的理由から、膜1と蓋15との間に必要とされる遠距離を維持することができない場合、関心領域を定義するためにカメラ9をセットアップすることが可能であり、それは、膜1の信号を含有し、言い方を変えれば、センサー上の蓋15からの信号をマスクすることが可能である。

40

【0061】

したがって、本発明によれば、各アーティファクトの原因を診断するために、関心領域のグレースケール2次元画像を取るためにカメラ9を使用することが可能である。この点に関して、蓋15または膜1上に提供された微小コロニーによって引き起こされるアーティファクトを確実に区別するために、蓋15と膜1との間に適切な距離を提供するように注意する必要がある。これは、偽陽性検出を避けることを助ける。

【0062】

上記の説明はHV膜に関連して行われたが、HA膜のような他の種類の膜1も同様に使用することができる。これらの膜1が比較的平坦な表面を有する場合、検出装置の空間ビ

50

ッチが $25\ \mu\text{m}$ になるセットアップのために、約 $50\ \mu\text{m}$ のサイズで微小コロニーの検出を開始することが可能である。

【0063】

さらに、メンブレンに関して低いコントラスト、例えば白い膜上の白色ミクロコロニーを提示するミクロコロニーについては、裸眼検出が可能になる前にスキャナでこれらのミクロコロニーを検出することが可能であることを意味する。

したがって、本発明は、典型的には5日以下のインキュベーション時間の後に、高い信頼性でミクロコロニーを検出することを可能にする。

【0064】

それぞれの膜1上のいくつかの微小コロニーによって与えられるトポグラフィの例を図4に示す。

トポグラフィの計算の結果から、関心領域を決定することができる。

【0065】

さらに、グレースケールまたはカラー形態における関心領域のカメラ9によって撮影された二次元画像を使用して、微生物コロニーが膜1上で増殖している実際の関心領域と、蓋15のほこり、傷または液滴によって引き起こされる可能性があるアーチファクトとをさらに区別することが可能である。

【0066】

これらのステップに基づいて、膜の無菌性の評価を信頼性の高い迅速な方法で行うことができる。

【0067】

第2の好ましい態様によれば、三角測量のために使用されるカメラ上の反射光の位置情報に加えて、カメラによって得られる付加的な画像情報が、どのような微小コロニーの有無の決定にも関与する。

【0068】

この第2の態様によれば、微小コロニー検出ユニットは、アーティファクトと実際の微小コロニーとをより確実に区別するために、カメラ9によって得られたカラーまたはグレースケール画像を利用する。例えば、微小コロニーの検出は、膜またはアガロースの表面または膜上の微小コロニーまたはアガロース媒体上の微小コロニー上の入射光のピーク強度値の変化を、画素センサのアレイの各列の最高信号レベルを使用して決定することによって行われる。

【0069】

代替的に、汚染の検出は、画素センサのアレイの信号レベルを使用することによって、膜またはアガロースの表面または膜上の微小コロニーまたはアガロース媒体上の微小コロニー上の入射光の強度値の変化を決定することによって行われる。

【0070】

第3の態様によれば、反射光パターンの形状の変化が使用されてもよい。例えば、微小コロニーの検出は、画素センサのアレイの各列の光強度ピーク付近の所与の値を上回る信号レベルを有するピクセルの数を使用することで、膜またはアガロースの表面または膜上の微小コロニーまたはアガロース媒体上の微小コロニー上の入射光の幅（例えば、ラインの太さ）の変化を決定することによって行われる。

【0071】

言うまでもなく、第2および第3の例は、カメラによって得られた画像の情報を十分に利用するように組み合わせることができる。

本発明を詳細な例に基づいて説明したが、様々な変更および変形が実施されてもよい。特に、レーザの波長は $405\ \text{nm}$ に限定されない。 450 、 465 、 525 、 $532\ \text{nm}$ のような他のレーザ光波長も同様に使用することができるが、レーザ光波長は $600\ \text{nm}$ 未満であることが好ましい。

これらの異なる波長は、LEDラインに関連して使用することもできる。

【0072】

10

20

30

40

50

さらに、図示された第1の態様では、膜の法線に対する入射角はそれぞれ 5° に設定されている。しかしながら、この値は、ゼロと異なる限り、より大きくても小さくてもよい。同様に、好ましい第1の態様におけるカメラの光軸の角度は 40° に設定される。この角度も異なる値を持つ可能性がある。ここでもまた、膜表面の法線に関して角度がゼロと異なる角度であることが重要である。さらに、上記2つの角度は異なるべきである。

【0073】

好ましい第1の態様では、ステージにおけるサンプルの移動は、一連の直線および回転運動であった。これは、線形運動の間に検出される微小コロニーの形状が、回転運動に起因する歪みなしに正確に撮像されるという利点を有する。

しかしながら、装置の画像処理セクションがスキャンされた領域の実際の形状を再構成することができる限り、他の種類の移動、例えば線形変位及び回転を含む組み合わされた動作を実行することが可能である。

10

【図1】

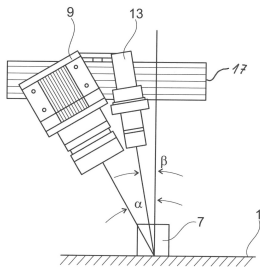


図1

【図3】

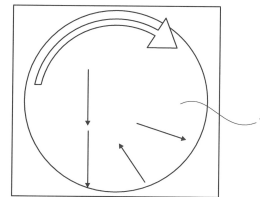


図3

【図2】

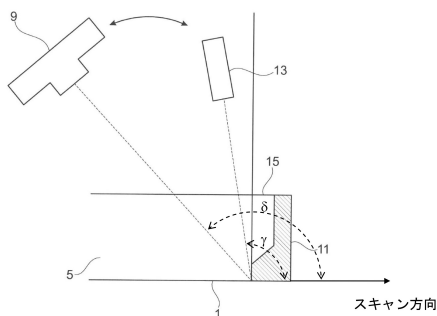


図2

【 図 4 】

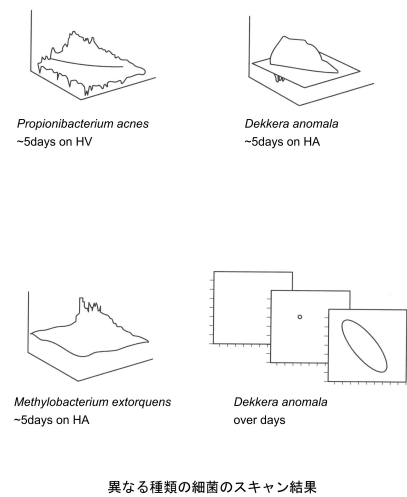


図 4

【 図 5 】

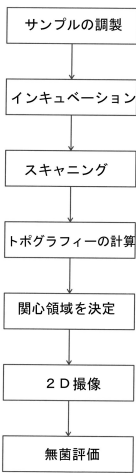


図 5

フロントページの続き

- (72)発明者 フェルデン, リュック
フランス国 6 8 2 8 0 アンドルスハイム、リュ デ セヴェンヌ、 5
- (72)発明者 ブシロン, マリン
フランス国 エフ - 6 7 2 0 0 ストラスブール、リュ ジャン - フィリップ ショーンフェル
4
- (72)発明者 オリヴィエ, ステファン
フランス国 エフ - 6 7 5 6 0 ロスハイム、シュマン デュ ロザンムエ 1 1
- (72)発明者 ベール, ピエール
フランス国 エフ - 6 7 0 0 0 ストラスブール、アヴェニュー デ ラ ペ、 1 4
- (72)発明者 ゲドン, ピエール
フランス国 エフ - 6 7 5 6 0 ロスハイム、リュ デ ヴォージュ 1 1 A
- (72)発明者 アラード, フローリアン
フランス国 エフ - 6 7 0 0 0 ストラスブール、リュ ド コペンアーグ 1 8

審査官 西 賢二

- (56)参考文献 特表 2 0 0 5 - 5 0 2 3 5 4 (J P , A)
特開 2 0 1 3 - 2 2 1 7 9 9 (J P , A)
特開 2 0 1 2 - 1 5 9 4 5 6 (J P , A)
特開 2 0 0 7 - 1 3 9 6 2 2 (J P , A)
米国特許第 0 3 7 3 6 4 3 2 (U S , A)
国際公開第 2 0 1 4 / 0 6 7 9 0 7 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
C 1 2 M 1 / 0 0 - 3 / 1 0
G 0 1 N 2 1 / 0 0 - 2 1 / 0 1
G 0 1 N 2 1 / 1 7 - 2 1 / 6 1
G 0 1 B 1 1 / 0 0 - 1 1 / 3 0
MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)