

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6530141号
(P6530141)

(45) 発行日 令和1年6月12日 (2019.6.12)

(24) 登録日 令和1年5月24日 (2019.5.24)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 1/30 (2006.01)	GO 1 N 1/30
GO 1 N 1/28 (2006.01)	GO 1 N 1/28 N
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 Z

請求項の数 15 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2018-529499 (P2018-529499)	(73) 特許権者	518063126
(86) (22) 出願日	平成28年8月24日 (2016.8.24)		ゼテオ テック、 エルエルシイ
(65) 公表番号	特表2018-534583 (P2018-534583A)		Z E T E O T E C H, L L C
(43) 公表日	平成30年11月22日 (2018.11.22)		アメリカ合衆国、21043 メリーラン
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/048395		ド州、エリコット シティ、ピント コー
(87) 国際公開番号	W02017/035229		ト 4652
(87) 国際公開日	平成29年3月2日 (2017.3.2)	(74) 代理人	100086531
審査請求日	平成31年2月6日 (2019.2.6)		弁理士 澤田 俊夫
(31) 優先権主張番号	62/378, 153	(74) 代理人	100093241
(32) 優先日	平成28年8月22日 (2016.8.22)		弁理士 宮田 正昭
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100101801
(31) 優先権主張番号	62/209, 320		弁理士 山田 英治
(32) 優先日	平成27年8月24日 (2015.8.24)	(74) 代理人	100095496
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 佐々木 榮二
早期審査対象出願		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 音響コータを用いたエアロゾル粒子のコーティング

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプリングされたエアロゾル粒子をコーティングする方法であって、
コーティング材料をエアロゾル化して、液体粒子を有する第1のエアロゾルを形成するステップと、

検体粒子を有するサンプリングされたエアロゾルを提供して第2のエアロゾルを形成するステップと、

上記第1のエアロゾルおよび上記第2のエアロゾルを受け取るための音響コータを提供するステップと、

上記第2のエアロゾル粒子上に、第1のエアロゾルのコーティングを有する、コーティングされたエアロゾル粒子を形成するために、上記第1のエアロゾルを上記第2のエアロゾルの粒子にオンザフライで衝突させるように上記音響コータに音響場を提供するステップとを有することを特徴とする、上記方法。

【請求項 2】

上記コーティング材料がMALDIマトリックス溶液を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

上記MALDIマトリックス溶液が、上記検体粒子を染色するための染色剤を有する、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

10

20

上記MALDIマトリックス溶液が、2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸、 α - シアノ - 4 - ヒドロキシ桂皮酸、3, 5 - ジメトキシ - 4 - ヒドロキシ桂皮酸、2 - メルカプト - 4, 5 - ジヒドロキシ安息香酸、1, 8 - ジヒドロキシアントラセン - 9 (10H) - オン、3 - メトキシ - 4 - ヒドロキシ桂皮酸、2, 4, 6 - トリヒドロキシアセトフェノン、2 - (4 - ヒドロキシフェニルアゾ) - 安息香酸、トランス - 3 - インドールアクリル酸、4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシ安息香酸、6 - アザ - 2 - チオチミン、2 - アミノ - 4 - メチル - 5 - ニトロピリジン、4 - ニトロアニリン、1, 5 - ジアミノナフタレン、5 - フルオロサリチル酸、5 - クロロサリチル酸、5 - ブロモサリチル酸、5 - ヨードサリチル酸、5 - メチルサリチル酸、5 - アミノサリチル酸、および1, 8 - ジアミノナフタレンのうちの少なくとも1つを有する、請求項2に記載の方法。

10

【請求項5】

上記MALDIマトリックス溶液が、アセトニトリル、水、エタノール、メタノール、プロパノール、アセトン、クロロホルム、イソプロピルアルコール、テトラヒドロフラン、トルエン、塩酸、トリフルオロ酢酸、ギ酸、および酢酸のうちの少なくとも1つを有する、請求項2に記載の方法。

【請求項6】

上記音響コートに入る前に、上記第1のエアロゾルが上記第2のエアロゾルと混合される混合ステップをさらに有する、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

エアロゾルの堆積を低減または排除するために、混合ステップ中にシース流体を付加する、請求項6に記載の方法。

20

【請求項8】

上記被覆された第2のエアロゾル粒子を乾燥させる乾燥ステップをさらに有する、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

上記サンプリングされたエアロゾルが、呼気粒子、および、周囲空気から収集されるエアロゾルの少なくとも1つを有する、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

検体粒子を含有するサンプリングされたエアロゾルをMALDIマトリックス溶液でコーティングするためのデバイスであって、

30

液体粒子の第1のエアロゾルを形成するためにMALDIマトリックス溶液をエアロゾル化するための噴霧器と、

上記噴霧器と流体連通し、上記第1のエアロゾルおよび検体粒子を含有するサンプリングされたエアロゾルを受け取るように構成された音響コートとを有し、

上記音響コートに音響場を印加して、上記第1のエアロゾルが、上記サンプリングされたエアロゾル中の上記検体粒子に衝突して、上記検体粒子上に、上記第1のエアロゾルのコーティングを有する、コーティングされたエアロゾル粒子を形成することを特徴とする、上記デバイス。

【請求項11】

混合チャンバをさらに有し、上記第1のエアロゾルは、上記音響コートに入る前に上記検体粒子を含有するサンプリングされたエアロゾルと混合される請求項10に記載のデバイス。

40

【請求項12】

サンプルされたエアロゾル粒子をコーティング材料でコーティングする方法であって、
個体粒子および個体粒子の混合物の少なくとも一方を有するコーティング材料をエアロゾル化して第1のエアロゾルを形成するステップと、

検体粒子を含有するサンプリングされたエアロゾルを提供して第2のエアロゾルを形成するステップと、

上記第1のエアロゾルおよび上記第2のエアロゾルを受け取るための音響コートを提供
するステップと、

50

上記第 1 のエアロゾルを上記第 2 のエアロゾルの粒子に衝突させて上記第 2 のエアロゾルの粒子上に、上記第 1 のエアロゾルのコーティングを有する、コーティングされたエアロゾル粒子を形成するように上記音響コータに音響場を提供するステップとを有することを特徴とする、上記方法。

【請求項 1 3】

上記固体粒子が、1 マイクロメートル未満の粒子サイズの金属粉末を有する、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

液体試料中の検体粒子をコーティングするための方法であって、

コーティング材料をエアロゾル化して、液体粒子を有する第 1 のエアロゾルを形成するステップと、

液体サンプルをエアロゾル化して検体粒子を有する第 2 のエアロゾルを形成するステップと、

上記第 1 のエアロゾルおよび上記第 2 のエアロゾルを受け取るための音響コータを提供するステップと、

上記第 1 のエアロゾルを上記第 2 のエアロゾルの粒子に オンザフライ で衝突させて上記検体粒子上に、第 1 のエアロゾルのコーティングを有する、コーティングされたエアロゾル粒子を形成するように上記音響コータに音響場を提供するステップとを有することを特徴とする、上記方法。

【請求項 1 5】

上記コーティング材料が M A L D I マトリックス溶液を有する、請求項 1 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0 0 0 1】

本出願は、2 0 1 5 年 8 月 2 4 日に提出され、「音響コータを用いたエアロゾル粒子のコーティング」と題する米国仮出願第 6 2 / 2 0 9 , 3 2 0 号および 2 0 1 6 年 8 月 2 2 日に提出され、「音響コータを用いたエアロゾル粒子のコーティング」と題する米国仮出願第 6 2 / 3 7 8 , 1 5 3 号に関連し、その利益を主張し、それらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【連邦支援研究開発】

【0 0 0 2】

該当しない。

【技術分野】

【0 0 0 3】

本開示は、検体粒子の検出および定量を改善するために、音響コータを使用してエアロゾル検体粒子をコーティングするための方法および装置に関する。より詳細には、限定するものではないが、本開示は、エアロゾル飛行時間型質量分析計における分析の前に、バイオエアロゾル粒子に M A L D I マトリックス溶液のコーティングを施すための方法および装置に関する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

2 0 0 2 年に、ノーベル化学賞は、質量分析法を用いて巨大分子を無傷で分析することを可能にする「マトリックス支援」レーザー脱離イオン化 (M A L D I) の概念について、田中光一氏によって共有された。この技術では、標的粒子 (検体) は、レーザーからの光 (しばしば紫外線波長) を優先的に吸収するマトリックス化学物質によってコーティングされる。マトリックスが存在しない場合、生物学的分子は、質量分析計においてレーザービームに暴露されると熱分解によって分解する。また、マトリックス化学物質は気化した分子に電荷を移動させ、電場によって飛行管の下で加速されるイオンを生成する (B r o w n、1 9 9 5 ; K n o c h e n m u s s、1 9 9 6)。微生物学およびプロテオミクス

は、質量分析のための主な応用分野となっている。その例には、細菌の同定 (Carbone et al., 2010)、化学構造の発見、およびタンパク質機能の誘導が含まれる (Karas, 1987; Cotter, 1994, 1997)。Danieliewicz および共同研究者 (2011) は、藻類の脂質プロファイリングのための MALDI 質量分析法の使用を報告している。

【0005】

被覆された検体粒子は、しばしば無傷の微生物であり、その後、MALDI 飛行時間 (TOF) 質量分析法を用いて分析される。図 1 は、「従来の」MALDI TOF 質量分析プロセスを示す。トリフルオロ酢酸 (TFA) のような酸から通常構成される液体と、 α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸のような MALDI マトリックス化学物質を溶媒に溶解し、検体に加える。溶媒には、アセトニトリル、水、エタノール、およびアセトンが含まれる。TFA は、通常、検体の質量スペクトルに対する塩不純物の影響を抑制するために添加される。水は親水性タンパク質を溶解させ、アセトニトリルは疎水性タンパク質を溶解させる。MALDI マトリックス溶液を MALDI プレート 10 上の検体にスポットして、検体上の MALDI マトリックス物質の均一な均質な層を得る。溶媒は蒸発し、マトリックス結晶を通して広がった検体と共に再結晶マトリックスのみが残る。酸は、検体の細胞膜を部分的に分解して、タンパク質をイオン化および TOF 質量分析計での分析に利用できるようにする。次いで、コーティングされたプレートを TOF 質量分析計で分析する。

【0006】

他の MALDI マトリックス材料には、3, 5-ジメトキシ-4-ヒドロキシ桂皮酸 (シナピン酸)、 α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸 (α -シアノまたは α -マトリックス) および 2, 5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) が含まれ、これは、米国特許第 8, 409, 870 号明細書に説明されている。

【0007】

MALDI 質量分析法の精度は、従来の化学技術を用いて得られる精度よりも高くすることができる。Carbone et al. その他 (2010) は、臨床微生物学研究所における MALDI 質量分析法の細菌同定の優れた分析を提供し、MALDI 質量分析法による細菌、酵母および真菌の同定が日常微生物学の最速技術であると結論づけている。Cherkaoui および共同研究者 (2010) は、臨床的に関連する細菌についての従来の生化学検査システム同定と質量分析を比較した。「ゴールドスタンダード」の 16S rRNA 遺伝子シーケンシングにより、不調和な結果が解決された。第 1 の MALDI 質量分析システム (Bruker) は、680 個の分離株について信頼性の高い同定を行い、そのうち 674 (99.1%) が正確であった。第 2 の質量分析システム (Shimadzu) は 639 個の分離株について信頼性の高い同定を行い、そのうち 635 個 (99.4%) が正確であった。図 2 は、異なる種のコロニー全体の典型的なスペクトルを示す。成長条件、成長段階、およびスペクトルを得るために使用されるマトリックスのために、同じ種が異なるスペクトルをもたらすことができることに留意すべきである。しかし、タンパク質バイオマーカーに関連する多くのピークが保存されているため、微生物の同定は正確である。

【0008】

従来の MALDI 質量分析法は、培養された細菌試料を分析するために使用することができるが、一般に単一生物の分析には適していない。さらに、サンプルがバクテリアの混合物を含む場合、生成されるスペクトルは、サンプル中の全ての種の特性を含むであろう。従って、スペクトルは乱雑であり、デコンボリュートすることは困難である。これらの問題は、いずれも、サンプルを培養することによって克服することができ、コロニー中に豊富な標的細菌を作製する。しかし、この手法は、(1) 培養可能な標的に対してのみ働く、(2) 試料調製は実験室でオフラインで行われるため、関連する労働コストがかかり、時間がかかるという 2 つの欠点がある。従来の MALDI 質量分析法は、サンプル中のバイオエアロゾル、例えば周囲空気中の生物学的汚染物質粒子のリアルタイム分析には適

していない。

【0009】

エアロゾル飛行時間型質量分析法 (ATOFMS) を用いて、サンプリングされた粒子またはエアロゾルのリアルタイム測定を行うことができる。ATOFMSによって作製された個々の粒子組成およびサイズの測定は、これらの粒子の源についての貴重な洞察を提供する。ATOFMSは、エアロゾルおよび健康影響研究の検出に使用されている。例えば、TSI、Inc. (Shoreview, MN) は、0.03 ~ 3マイクロメートルの範囲の粒子について粒子サイズおよび組成情報を得るための質量分析計を製造している。分光器への総入口空気流量は0.1 L / 分である。周囲のエアロゾル粒子の充填量は、0.03 ~ 3マイクロメートルのサイズ範囲の粒子の場合、mL当たり10 ~ 1000粒子である。ATOFMSは、空気力学的サイジング技術を使用して、2つのレーザービーム間の各粒子の通過時間に基づいて粒子をサンプリングし、サイズを決定する。次いで、粒子をUVレーザーを用いて照射する。レーザーは、照射された各粒子を構成する分子の少なくともいくつかを蒸発させてイオン化し、特定の質量電荷比 (m/z) を有するイオンを生成する。質量分析計内部の電場は、これらの荷電粒子を加速し、独特の指紋スペクトルを得るために検出器への飛行時間を測定する。この測定されたスペクトルをデータベース情報と比較して、化学組成に関する情報を提供することができる。ATOFMSは、各粒子を構成する特定の化合物を迅速に識別する。エアロゾルの性質に関するリアルタイムの情報を提供するこの技術を使用して、数百または数千の粒子を毎秒分析することができる。

【0010】

しかしながら、タンパク質および他の生体有機分子 (バイオエアロゾル) を含む粒子は、強力なUVレーザー光を吸収し、熱分解によって分解し、ATOFMS分析技術を無効にする傾向がある。バイオエアロゾルを分析するためには、エアロゾル中の各粒子をMALDIマトリックスで被覆しなければならない。ATOFMSに導入される前の検体エアロゾル粒子のMALDIマトリックスコーティングは、Stowers (2000) によって最初に説明され、つぎにvan Wuijckhuijse (2004) によって説明された。バイオエアロゾル中の粒子を一度に分析する利点は、各粒子が、構成タンパク質および他の高分子量分子の「純粋な試料」の代表であることである。単一の空中浮遊細菌の場合、それはその1つの生物の「純粋な培養」を表す。周囲のエアロゾル (検体) は、最初に、比較的高い蒸気圧のMALDIマトリックス材料を含むホットゾーンを通過する。マトリックス蒸気は、拡散によってエアロゾルと混合し、次いで冷却ゾーンに入る。ここで、マトリックスは気相から凝縮してマトリクスエアロゾルを形成し、そのいくつかは検体エアロゾル粒子を被覆し得る。検体エアロゾルはマトリクスエアロゾル内に分散するが、平均粒子直径はマトリクスエアロゾルのそれよりもかなり小さい。検体エアロゾル粒子は、典型的には、0.5 ~ 15マイクロメートルの間の粒径を有する。検体エアロゾルは、マトリックスで「蒸気コーティング」されている。エアロゾルMALDI MS技術を用いて得られた質量分析指紋は、従来のMALDI質量分析法から得られたものと非常に似ている。微生物については、指紋は、特定の生物に存在する特定のタンパク質と関連付けることができる。図3は、従来のMALDI質量分析法 (Hathout、1999) からの測定値を用いてvan Wuijckhuijse (2010) による単細胞胞子 (直径約1マイクロメートル) の枯草菌 (*Bacillus atrophaeus*) の測定値を比較する。理解されるように、重要なバイオマーカーは複数のプラットフォームにわたって保存されている。従来のMALDI質量分析法では、何千もの胞子からなる単一の凝集塊から得られた何百ものスペクトルを同時平均することによって指紋が得られる。対照的に、エアロゾルMALDI質量分析法では、135の単一胞子スペクトルを平均して指紋を得た。

【0011】

van Wuijckhuijseらの蒸気コーティング技術は、いくつかの顕著な欠点がある。第1に、従来のMALDIマトリックス化学物質の蒸着は、検体の従来の液体

コーティング中に得られた均質かつ均一なコーティングを正確にシミュレートし、複製することができない(図1)。また、米国特許第8,409,870号明細書に開示されているように、この技術は、カスタマイズされたMALDIマトリックス材料2-メルカプト-4,5-ジアルキルヘテロアレーンおよびアルコールの使用を必要とした。適切なアルコールには、メタノール、エタノール及びプロパノールが含まれる。これは、 α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸、3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシ桂皮酸(シナピン酸)および2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)のような従来のマトリックス化学物質は、蒸着技術の気化工程の間に分解する点で、大きな制約となる。

【0012】

したがって、検体粒子上に、好ましくは従来のマトリックス材料を使用しながら、マトリックス材料のコーティングを生成することができるリアルタイムの「オンザフライ」エアロゾルコーターが望まれる。

【発明の概要】

【0013】

本開示は、検体粒子の検出および定量化を改善するために、音響コータを使用してエアロゾル検体粒子をコーティングするための方法および装置に関する。より詳細には、本開示は、これに限定されないが、エアロゾル飛行時間型質量分析計における分析の前に、バイオエアロゾル粒子にMALDIマトリックス溶液のコーティングを施すための方法および装置に関する。エアロゾルは、一般に、空気または気体中に分散された粒子の懸濁液を意味する。本明細書では、エアロゾル粒子のリアルタイム「オンザフライ」MALDIマトリックスコーティングを行う態様が開示される。「オンザフライ(on-the-fly)」は、エアロゾルを含む粒子が、コーティングプロセスのステップとして表面上(例えば、MALDIプレートの表面上)または液体中に収集されないことを意味する。より具体的には、MALDIマトリックスコーターおよびエアロゾル化MALDIマトリックスおよび検体エアロゾル粒子の音響処理を用いて、ATOFMSのような分析機器を用いた分析の前にMALDI被覆検体粒子を得る方法が本明細書に開示される。

【0014】

本開示は、サンプリングされたエアロゾル粒子をコーティングする方法であって、コーティング材料をエアロゾル化して液体粒子を含む第1のエアロゾルを形成するステップと、検体粒子を含むサンプリングされたエアロゾルを提供して第2のエアロゾルを形成するステップと、音響コータを提供して上記第1および第2のエアロゾルを受け取るステップと、上記音響コータに音響場を区あえて上記第1のエアロゾルを上記第2のエアロゾルに衝突させて上記第2のエアロゾル粒子上に上記第1のエアロゾルのコーティングを形成するステップとを有する、上記方法を実現する。コーティング材料は、MALDIマトリックス溶液を有する。MALDIマトリックス溶液は、検体粒子を染色するための染色剤を有する。MALDIマトリックス溶液は、2,5-ジヒドロキシ安息香酸、アルファ-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸、3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシ桂皮酸、2-メルカプト-4,5-ジアルキルヘテロアレーン、(4-ヒドロキシフェニルアゾ)-安息香酸、トランス-3-インドールアクリル酸、4-ヒドロキシ-3-アザビシクロ[2.2.1]ヘプタン酸、2-ヒドロキシ安息香酸、2-アミノ-4-メチル-5-ニトロピリジン、4-ニトロアニリン、1,5-ジアミノナフタレン、5-フルオロサリチル酸、5-クロロサリチル酸、5-プロモサリチル酸、5-プロモサリチル酸、5-プロモサリチル酸、5-メチルサリチル酸、5-アミノサリチル酸、1,8-ジアミノナフタレン等の少なくとも1つを有する。さらに、MALDIマトリックス溶液は、アセトニトリル、水、エタノール、メタノール、プロパノール、アセトン、クロロホルム、イソプロピルアルコール、テトラヒドロフランおよびトルエンの少なくとも1つを有する。MALDIマトリックス溶液は、塩酸、トリフルオロ酢酸、ギ酸、および酢酸のうちの少なくとも1つを有する。オプションとして、この方法は、第1のエアロゾルが第2のエアロゾルと混合されてから上記音響コータに入る混合ステップを含む。シース流体は、エアロゾルの堆積を低減または排除するために、混合工程中に任意に添加される。オプションとして、この方法

は、被覆された第2のエアロゾル粒子を乾燥させる乾燥ステップを含む。サンプリングされたエアロゾルは、呼気粒子、発酵槽のヘッドスペースから収集された物質、周囲空気から収集された物質の少なくとも1つを有する。

【0015】

本開示は、サンプリングされたエアロゾル粒子をMALDIマトリックス溶液でコーティングするための装置であって、MALDIマトリックス溶液をエアロゾル化して液体粒子の第1のエアロゾルを形成するための噴霧器と、検体粒子を含有するサンプリングされたエアロゾルを捕捉して第2のエアロゾルを形成するための捕捉手段と、上記噴霧器および上記捕捉手段と流体連通して上記第1のエアロゾルおよび上記第2のエアロゾルを受け取るように構成された音響コータとを有し、上記音響コータに音響場を印加して上記第1のエアロゾルを上記第2のエアロゾルの粒子に衝突させ、上記第2のエアロゾル粒子上に第1のエアロゾルのコーティングを形成する、上記装置を実現する。MALDIマトリックス溶液は、検体粒子を染色するための染色剤を有する。MALDIマトリックス溶液は、2,5-ジヒドロキシ安息香酸、アルファ-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸、3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシ桂皮酸、2-メルカプト-4,5-ジアルキルヘテロアレ- 10
ーン、(4-ヒドロキシフェニルアゾ)-安息香酸、トランス-3-インドールアクリル酸、4-ヒドロキシ-3-アザビシクロ[2.2.1]ヘプタン酸、2-ヒドロキシ安息香酸、2-アミノ-4-メチル-5-ニトロピリジン、4-ニトロアニリン、1,5-ジアミノナフタレン、5-フルオロサリチル酸、5-クロロサリチル酸、5-プロモサリチル酸、5-プロモサリチル酸、5-プロモサリチル酸、5-メチルサリチル酸、5-アミ- 20
ノサリチル酸、1,8-ジアミノナフタレンのうちの少なくとも1つを有する。さらに、MALDIマトリックス溶液は、アセトニトリル、水、エタノール、メタノール、プロパノール、アセトン、クロロホルム、イソプロピルアルコール、テトラヒドロフランおよびトルエンの少なくとも1つを有する。MALDIマトリックス溶液は、塩酸、トリフルオロ酢酸、ギ酸、および酢酸のうちの少なくとも1つを有する。オプションとして、装置は、上記音響コータに入る前に、第1のエアロゾルを第2のエアロゾルと混合させる、混合チャンバを有する。シース流体は、エアロゾルの堆積を低減または排除するために、混合チャンバ内に任意に追加される。オプションとして、装置は、溶媒蒸発を促進するために被覆された検体エアロゾルを加熱するための適切な手段を有する。

【0016】

本開示は、サンプリングされたエアロゾル中に存在する粒子を同定する方法であって、MALDIマトリックスでコーティングされたサンプリングされたエアロゾル粒子を提供するステップと、上記コーティングされたエアロゾル粒子を質量分析計に送るステップとを有する上記方法を実現する。一態様において、質量分析計は、エアロゾル飛行時間型質量分析計(ATOFMS)である。

【0017】

本開示は、サンプリングされたエアロゾル中に存在する分子を同定する方法であって、MALDIマトリックスでコーティングされたサンプリングされたエアロゾルを提供するステップ、MALDIマトリックスでコーティングされたエアロゾルでMALDIプレートをコーティングするステップ、および質量分析計でコーティングされたプレートを分析- 40
するステップを有する、上記方法を実現する。オプションとして、この方法は、質量分析計で分析する前に、被覆された第2のエアロゾル粒子を乾燥させる乾燥ステップを有する。

【0018】

本開示は、第1のエアロゾルを形成するためにコーティング材料をエアロゾル化するステップと、第2のエアロゾルを形成するために検体粒子を含むエアロゾルを提供するステップと、第1のエアロゾルおよび第2のエアロゾルを受け取る音響コータを提供するステップと、第1のエアロゾルを第2のエアロゾルの粒子に衝突させて、第2のエアロゾルの粒子上に第1のエアロゾルのコーティングを形成するように、音響コータに音響場を提- 50

供するステップとを有する方法を実現する。コーティング材料は、固体粒子および固体粒子の混合物の少なくとも1つを有する。固体粒子は、1マイクロメートル未満の粒子サイズの金属粉末を有する。この混合物は、金属粉末および非金属粉末を有する。金属粉末は、コバルト粉末を有する。

【0019】

本開示は、サンプリングされたエアロゾル中に存在する粒子を同定するための同定装置であって、MALDIマトリックスでコーティングされたサンプリングされたエアロゾル粒子を提供する装置と、質量分析計とを有する、上記同定装置を実現する。質量分析計は、エアロゾル飛行時間型質量分析計(ATOFMS)である。

【0020】

10

本開示は、液体試料中に見いだされる検体粒子をコーティングする方法であって、コーティング材料をエアロゾル化して液体粒子を含む第1のエアロゾルを形成するステップ、液体試料をエアロゾル化して検体粒子を含む第2のエアロゾルを形成するステップ、上記第1のエアロゾルを上記第2のエアロゾルの粒子に衝突させて上記検体粒子上に第1のエアロゾルのコーティングを形成するように音響コータに音響場を印加するステップとを有する、上記方法を実現する。コーティング材料は、MALDIマトリックス溶液を含む。

【0021】

本開示は、液体試料中に存在する検体粒子を同定する方法であって、MALDIマトリックスでコーティングされた検体粒子を提供するステップと、上記コーティングされた検体粒子を質量分析計で分析するステップとを有する、上記方法を実現する。質量分析計は、エアロゾル飛行時間型質量分析計(ATOFMS)である。

20

【0022】

本開示の他の特徴および効果は、部分的には、以下の説明および添付の図面に記載され、本開示の異なる態様が説明され、示され、部分的には、当業者であれば、添付の図面と併せて以下の詳細な説明を検討することにより、または本開示の実施によって理解することができる。本開示の効果は、添付の特許請求の範囲において特に指摘された手段および組み合わせによって実現され達成される。

【0023】

本開示の前述の態様および付随する多くの利点は、添付の図面と併せて以下の詳細な説明を参照することによってよりよく理解される。

30

図面中のすべての参照番号、指示記号および引き出しは、本明細書に完全に記載されているかのように、この参照により本明細書に組み込まれる。図の要素に番号を付け忘れたことは、権利の放棄を意図したものではない。番号の付いていない参照は、図および附属書においてアルファベット文字によって識別することもできる。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】(従来技術)従来のMALDI TOF質量分析法である。液体MALDIマトリックス溶液は、質量分析計に挿入することができるプレート上で検体と直接混合される。

【図2】(従来技術)MALDI TOF質量分析法の細菌の指紋が、MALDI TOFMSの能力を示す。

40

【図3】(従来技術)エアロゾルMALDI質量分析(下)と従来のMALDI(上)のバチルス(Bacillus)胞子のスペクトルの比較である。下のスペクトルは平均135個のスペクトルであり、各スペクトルは単一の空中のバチルス胞子から得られる。

【図4】一側面の音響コーティングプロセスの一態様の概略図である。

【図5】例示的な噴霧器システムの概略図である。

【図6】別の側面の音響コーティングプロセスの概略図である。

【図7】MALDIコーティングされたエアロゾル検体粒子を用いて従来のMALDIプレートをコーティングするための改変された方法の概略図である。

【図8】検体粒子を有するタイプ2のエアロゾルを形成する液体資料の噴霧化を示す、図

50

4 を変形した概略図である。

【詳細な説明】

【0025】

本開示の特定の態様は、その原理および動作を説明する目的で、以下にかなり詳細に記載される。しかしながら、様々な変更がなされてもよく、本開示の範囲は説明された例示的な態様に限定されない。

【0026】

図4は、MALDIマトリックスで被覆された検体エアロゾル粒子をリアルタイムで生成するための第1の例示的な態様のプロセスフローを示す。図4においては、ステップ401において、MALDIマトリックス溶液が提供される。ステップ402において、MALDIマトリックス溶液が噴霧されて、MALDIエアロゾル液滴（タイプ1エアロゾル）を有する第1のエアロゾルが形成される。ステップ403において、検体粒子を含むサンプルエアロゾル流（タイプ2エアロゾル）が提供される。次いで、タイプ1のエアロゾルは、タイプ2のエアロゾル中に取り込まれる。タイプ2エアロゾルは、周囲空気中の粒子を含み得る。さらに、タイプ2のエアロゾルは、生物起源の少なくともいくつかの粒子を含むことができる。

【0027】

MALDIマトリックス溶液の小滴および検体粒子を有する、得られた流れは、音響コータに入る前に、ステップ404において任意に混合されてもよい。エアロゾル化されたMALDIマトリックスおよび検体エアロゾル粒子は、検体の性質およびMALDIマトリックス材料をエアロゾル化するために使用される方法に応じて、いくつかの方法を用いて混合セクションに導入することができる。上述のように、MALDIマトリックスエアロゾルは、検体エアロゾル流に取り込まれて良い。代替的には、検体エアロゾルをMALDIマトリックスエアロゾルに取り込むことができる。

【0028】

音響コータ内に音響場が設けられ、ステップ405において、マトリックスエアロゾルがサンプリングされたエアロゾル粒子に衝突し、サンプリングされたエアロゾル粒子がコーティングされる。必要であれば、音響コータを出る際に、コーティングされたエアロゾル粒子は、マトリックス溶液中の溶媒が乾燥ステップ406において実質的に蒸発することを可能にするのに十分な長さの管または導管を通る。オプションとして、ステップ406において、エアロゾルを、好ましくは赤外線またはマイクロ波光子で加熱して溶媒の蒸発を促進する。次いで、マトリックス溶液でコーティングされ乾燥された検体エアロゾルを、ATOFMSのような機器を用いて分析する。

【0029】

分析されるエアロゾル粒子は、周囲空気中に見られる粒子に限定されない。例えば、発酵槽のヘッドスペースは、可能性のある汚染物質について分析することができる。食品または医療施設内の空気中の微生物の種別を知ることがしばしば望まれる。さらに、人または他の動物からの呼吸空気は、臨床医にとって関心があるかもしれない。ステップ403の検体粒子は、ウイルス、細菌、藻類または真菌のような微生物を含むことができる。あるいは、検体粒子は、宿主の肺に由来する呼吸空気中に存在するタンパク質およびペプチドを含むことができる。検体粒子は、微生物とタンパク質およびペプチドの混合物を含むこともできる。

【0030】

[MALDIマトリックスエアロゾルの噴霧]

【0031】

事例的な噴霧器システム100（図5）は、MALDIマトリックス溶液を噴霧するために使用でき、ステップ402において、MALDIマトリックスのエアロゾル（タイプ1エアロゾル）を生成するために使用でき、これは、Aerogen（アイルランド）によって提供される。この噴霧器は、Aeroneb Proコントローラを用いて操作される。噴霧器は、MALDIマトリックスの一体性または濃度に影響を与えずにエアロゾ

ルを生成するように設計されている。噴霧器システムは、別個のエアコンプレッサを必要とせず、微細な液滴、低速エアロゾルを生成する。図5において、MALDIマトリックス溶液は、コントローラ102によって制御される噴霧ユニット101に加えられる。噴霧ユニットは、10mlまでのMALDI溶液を保持することができ、Tピース103に取り付けられる。より典型的には、噴霧ユニットは、無駄を防ぐために1ml以下のMALDI溶液を保持するように構成されている。噴霧器は、MALDI液体溶液を平均直径2.5~6マイクロメートル(VMD、体積平均直径)の粒子を含むエアロゾルに変換することができる。噴霧器は、また、3ミクロン未満のサイズのMMAD(空気力学的質量中央直径、mass median aerodynamic diameter)のMALDI小滴を生成することができる。噴霧ユニット101は、エアロゾル液滴のサイズを制御する精密形成孔を有するドーム型アパーチャプレートと、MALDI液体溶液をエアロゾル化するためのマイクロポンプ動作を生成する振動素子とからなる。制御装置によって振動素子に電力が供給されると、アパーチャプレートは毎秒100,000回以上振動する。この急速な振動は、各開口部をマイクロポンプとして作用させ、孔を通して液体を引き込み、一定の大きさの液滴を形成する。Aerogel噴霧器に関する付加的な詳細は、米国特許出願公開第US20090134235号において説明される。Aeroneb社は、振動オリフィスプレート内に異なる大きさの穴を有するように設計され、種々の所定の平均粒子直径の液滴を生成する種々のモデルを販売している。MALDIマトリックス溶液がメタノールなどの高揮発性溶媒を含む場合、タイプ1エアロゾル中の粒子のサイズは、溶媒の蒸発のために約0.5マイクロメートルに減少する可能性がある。

10

20

【0032】

このタイプの噴霧器のさらなる利点の1つは、生成される粒子の数(または粒子の質量)を時間の関数として独立して制御する能力である。FLIR Systems(Wilsonville, OR)は、粒子生成速度を制御できる噴霧器およびコントローラを販売している。検体粒子の粒子密度が、知られているか、または、例えば空気力学的粒子サイザー(ミネソタ州ミネアポリスのTSI社のAPSモデル3320)によって測定されている場合、コーティング粒子の質量は、コーティング粒子の検体粒子に対する所望の比率になるようにリアルタイムで調整できる。

【0033】

各検体粒子を少なくとも同量のマトリックス溶液で被覆することが望ましいが、好ましくは検体粒子の質量の10倍までである。したがって、一態様では、マトリックス溶液は、検体エアロゾル乾燥質量流量の5~10倍に等しい質量流量で噴霧される。粒子の平均間隔は平均粒子直径よりもかなり大きいので、MALDI液体粒子の凝集は最小限であろう。

30

【0034】

典型的には、噴霧器システム100は、喘息のような肺疾患を治療するためのエアロゾル化薬剤を提供するために使用される。しかし、ここに開示された出願については、図5に示すように、検体エアロゾル(例えば、空気中に取り込まれる)は、Tピース103の一端に入り、エアロゾル化されたMALDI溶液と接触し、Tピース103の他端を通過して出る。エアロゾル化されたMALDIが、T-ピース103の端部には、一方向のみの流れを可能にするインラインチェックバルブを、T-ピース103の入口端部またはその近くに設置することができる。適切なチェックバルブは、Cole Parmer社、Cambridge Reactor Design社、およびUpchurch Scientific社のようなベンダによって商業的に販売されている。

40

【0035】

Aeroneb噴霧器の別の代替物は、Philips Healthcare社(Andover, MA)によって供給されるI-neb AADシステムである。この噴霧器は、従来の噴霧器/圧縮器治療の不都合を大幅に低減する一方で、正確な再現可能な用量のエアロゾルを実現するように設計された、小型でバッテリー駆動の軽量かつ実質的に静かな装置を有する。エアロゾルは、振動メッシュ技術によって生成される。計量チャンバ

50

は、約 0.1 ml の残留物を有する 0.25 ~ 1.4 ml の範囲の予め設定された容量を実現することができる。

【0036】

MALDIマトリックスは、3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシ桂皮酸(シナピン酸)、 α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸(α -シアノまたは α -マトリックス)および2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)を含むことができ、これは米国特許第8,409,870号明細書に記載されたとおりである。適切な溶媒およびトリフルオロ酢酸が、一般に、これらのマトリックス材料に添加される。

【0037】

MALDIマトリックスは、さらに、検出をより特異的にするように、サンプリングされたエアロゾルと相互作用するタグを有することができる。タグは、質量タグであってもよいし、タンパク質染色などの光学タグであってもよい。質量タグは、自己犠牲ポリマーなどのスマートポリマーを含むことができる。質量分析計でイオン化などの外部刺激またはトリガを受けると、これらのポリマーは構造的に分解または開裂して分子フラグメントを放出し、出発ポリマーの一部を残す。放出された分子は、出発ポリマーよりも揮発性が高い可能性がある。ポリマーは、また、そのモノマーに対してヘッド・ツー・テイル解重合を連続的に受けることができるであろう。生物学的起源の検体粒子が自己犠牲ポリマータグを含むMALDIマトリックスでコーティングされ、ATOFMSで断片化される場合、タンパク質(検体)の断片化およびタグの断片化による定量データから配列情報を得ることができる。

【0038】

開示された装置および方法は、バイオエアロゾル粒子のMALDIマトリックスコーティングに限定されない。液体タンパク質染色などの任意のタイプのコーティングを、エアロゾルを含む粒子の特性を識別する能力を高めるために、またはエアロゾルの粒子を変更する能力を高めるために、バイオエアロゾルまたは非バイオエアロゾル粒子に適用することができる。エアロゾルを構成する粒子の一部または全部をより有用にする。タンパク質染色剤は、生物学的起源である粒子を、鉱物のような他の組成物であるものと区別するために使用することができる。特定のクラスのタンパク質の検出のためのゲル染色は、ThermoFisher Scientific(Grand Island, NY)およびSigma Aldrich(St. Louis, MO)によって提供される。例えば、細胞染色溶液を使用して、バイオエアロゾル粒子をオン・ザ・フライでコートして、バイオエアロゾル中の細胞または細胞が、色または蛍光測定を介して生存可能であるか否かを決定することができる。被覆された粒子の色または蛍光を測定して細胞の生存率を評価することができる。染色を用いて多数の単一細胞測定を達成することができる。染色の例には、生存染色(トリパンブルーまたは真核細胞のヨウ化プロピジウム)およびsupravital染色(例えば、網状赤血球染色のためのNew Methylene BlueおよびBrilliant Cresyl Blue)が含まれるが、これらに限定されない。液体の混合物はまた、検体粒子をコーティングするために使用されてもよい。

【0039】

MALDIマトリックス材料は、液体の形態である必要はない。それはスラリーであってもよいし、コバルト粉末のような微細な金属粉末を構成していてもよい。これらの粉末は、好ましくは1マイクロメートル未満のサイズであり、より好ましくは0.01マイクロメートル未満のサイズである。また、グラファイト、カーボンナノチューブ、フラーレン誘導体などの導電性材料をMALDIマトリックスとして使用することもできます。導電性金属粉末と非金属粉末との混合物を使用することもできる。

【0040】

[検体エアロゾル]

【0041】

タイプ2のエアロゾル(図4)に関しては、このエアロゾルは、1つ以上のタイプの検

10

20

30

40

50

体粒子を含むことができる。一例として、タイプ2のエアロゾルは、ヒトの呼気中に見出される呼気粒子（EBP）を含むことができる。健康な成人の呼吸中に吐き出される空気の量は、典型的には1～2リットルであり、これは約0.5リットルの通常の一回換気量を含む。人間は、通常の呼吸、咳、話、およびくしゃみなど、様々な呼吸活動中に呼気（EBP）を吐き出す。ある研究は、正常呼吸中の機械的換気患者からのEBP濃度が、0.4～2555粒子/呼吸または0.001～5粒子/mLの範囲であることを見出した（Wan GH、Wu CL、Chen YF、Huang SH、Wang YL、2014）、「粒子サイズの濃度分布および機械的換気患者の呼気粒子への影響」PLoS ONE 9（1）：e87088）。さらに、EBPのサイズは5マイクロメートル未満であり、その80%は0.3～1.0マイクロメートルの範囲であった。吐き出された粒子サイズ分布もまた、0.3～2.0マイクロメートルの間にあると報告されている。EBPの平均粒径は、正常呼吸中は1マイクロメートル未満であり、咳中は1～125マイクロメートルであった。さらに、肺結核患者の25%は、咳時に結核菌の3～633CFU（コロニー形成単位）を吐き出し、この病原体のレベルは主に0.6～3.3マイクロメートルの範囲であった。これらの細菌は、棒状であり、約2～4マイクロメートルの長さであり、約0.2～0.5マイクロメートルの幅である。

【0042】

タイプ2エアロゾルの別の例は、生物学的なテロリストの脅威の産物であり得る生物学的エアロゾルである。国際空港や地下鉄などの重要インフラ内の大気を直接サンプリングすることができる。必要であれば、サンプリングバッグまたは他の同様のエンクロージャなどの適切な手段を使用して、タイプ2エアロゾルのサンプルを取り込むことができる。粒子は、また、後でエアロゾル化されたウェット・ウォール・サイクロンまたは同様の装置から得られた液体試料に由来し得る。ウェット・ウォール・サイクロンの例は、スピンコンII（Innovaprep、Drexel、MO）である。これらのエアロゾル中の粒子には、炭疽菌、エボラウイルス、リシン、およびボツリヌス毒素が含まれ得るが、これらに限定されない。この場合、図4の流れ図500に示すように、空気中にMALDIマトリックス溶液をエアロゾル化する噴霧器を使用することが有益であり得る。適切な噴霧器の一例は、Pari Respiratory Equipment Inc.（Midlothian、VA）によって供給されるVIOS Pro Aerosol Deliveryシステムである。MALDIマトリックス溶液は、ステップ501において提供され、ステップ502において空気ポンプまたは圧縮機によって供給される空気流にエアロゾル化される。流れ図400とは対照的に、タイプ1エアロゾル（MALDIマトリックス溶液）を含む空気流は、ステップ503で提供されるタイプ2のエアロゾル（検体）を飛沫同伴する。タイプ2のエアロゾルは、シリンジまたはポンプを使用してタイプ1のエアロゾルストリームに注入することができる。代替的には、タイプ1のエアロゾルを含む空気を使用して、タイプ2のエアロゾルの適切なサンプルを含むサンプリングバッグまたはエンクロージャをフラッシュすることができる。

【0043】

MALDIマトリックス溶液および検体粒子の小滴を含む、得られた流れは、ステップ505でのコーティングのための音響コータへの流入に先立って、ステップ504で任意に混合されてもよい。

【0044】

タイプ1及びタイプ2のエアロゾルの混合は、激しい乱気流の結果としてエアロゾルの表面沈着を引き起こさないように注意深く行わなければならない。したがって、混合チャンバにおいて、混合流管直径Dおよび平均速度Vは、レイノルズ数（ $\rho DV / \mu$ ）が約2000未満であるように選択されなければならない。ここで、 ρ は空気の密度であり、 μ は空気の粘度である。混合は、静的混合プレート（例えば、Charles Ross and Son Company、Hauppauge、NYによって供給される）、または静的グリッドミキサー（例えば、Stamixco AG、Wollerau、Switzerlandによって供給される）によって誘発され得る。これらの装置は、穏やか

なレベルの乱気流を誘発する。激しい乱気流は実際にエアロゾルの混合を引き起こすが、エアロゾルが管壁に堆積する結果となるので望ましくない。低強度の乱流は、混合チャンバの壁上のエアロゾルの堆積を最小にしながら、タイプ1およびタイプ2のエアロゾルの所望の混合を達成する。

【0045】

エアロゾル化されたMALDIマトリックスおよび分析物エアロゾル粒子は、分析物の性質およびMALDIマトリックス材料をエアロゾル化するために使用される方法に応じて、適切な方法を用いて混合セクションに導入することができる。フローチャート400または500のいずれにおいても、エアロゾルの堆積を低減または排除するために、場合によっては、シース流体（フローサイトメータで使用される）を音響コーティング装置の上流にある混合セクションの壁を通して追加することができる。次いで、混合されたエアロゾルは、音響コートに入る。大部分の用途のための典型的なシース流体は空気であり、適切に濾過して全てまたはほとんどすべての微粒子を除去する。

【0046】

典型的な混合成分は、流入口、流れを横切って横向きに配向されたスタティックミキサー（混合チャンバ）、続いて流れが混合され、次いでゆっくりと再積層化される直管が続く。管の直径の小さな減少を有する管の部分を通る流れを収縮させることによって、流れの再層状化を高めることができる。

【0047】

音響コート内で音響場が維持され、マトリックスエアロゾルが、サンプリングされたエアロゾル粒子に衝突し、ステップ505でサンプリングされたエアロゾル粒子をコーティングする。必要であれば、音響コートから出る際に、コーティングされたエアロゾル粒子は、乾燥ステップ506においてマトリックス溶液中の溶媒を実質的に蒸発させるのに十分な長さの管または導管を通り抜ける。オプションとして、ステップ506において、エアロゾルを、好ましくは赤外線またはマイクロ波光子で空間的に均一な様式で加熱して、溶媒の蒸発を助長させる。次にマトリックス溶液で被覆され、乾燥されたエアロゾルを、適切なイオン化レーザー波長、および、MALDI ATOFMSに典型的な分析器質量範囲で適切に修正された、ATOFSのような機器を用いて分析する。

【0048】

噴霧化ステップ502は、空気中で440mg/分～590mg/分の濃度でMALDI粒子を生成することができる。ステップ502で使用する噴霧器は、また、100mg/分～600mg/分の濃度の空気中でMALDI粒子を生成するように選択されてもよい。粒子の質量中央径(MMD)は、3.7～4.4マイクロメートルで変化し得る。粒子の質量中央径(MMD)はまた、ステップ502において使用される噴霧器のタイプ及びモデルに依存して、1マイクロメートル未満から5マイクロメートルまで変動し得る。5マイクロメートル未満の粒子の質量割合は、67%から75%である。圧縮機からの公称空気流量は、選択される噴霧器のモデルおよびタイプに依存し、典型的には毎分5リットル未満である。

【0049】

[音響コータリング]

【0050】

MALDIエアロゾル（タイプ1エアロゾル）は、一般に、3～4マイクロメートルのメジアン質量直径(MMD)を有する液体粒子から構成することができる。検体エアロゾル（タイプ2）は、0.3～4マイクロメートルの中央質量範囲を有する呼気粒子のような粒子を含むことができる。次のステップは、ステップ405または505において、MALDI液体粒子による分析物エアロゾルの選択的コーティングを含む。これは、MALDI粒子のサイズが分析物粒子のサイズにいくらか匹敵するため、特に困難である。さらに、分析物粒子Mycobacterium tuberculosisのような生物学的物質である。さらに、TSI、Inc.によって以前に供給されたものなどのATOFS機器は、一般に、0.03～3マイクロメートルの範囲の粒子を受けよう設計さ

10

20

30

40

50

れている。しかし、BiosparQ、BV (Leiden社、オランダ) によって開発されているような他のタイプのATOFMS機器は、最大10マイクロメートルの粒子を受けするように設計されている。適切なコーティング方法は、好ましくは、コーティング検体粒子のサイズを10マイクロメートルよりも大きくすることなく、MALDIマトリックス粒子で検体粒子を(例えば、少なくとも1マイクロメートルから5マイクロメートルの厚さのコーティング厚で)コートする必要がある。

【0051】

本発明者らは、予期せぬことに、空気からの汚染物質粒子の環境清浄化中に同じ組成(例えばフライアッシュ)を有する微粒子を凝集させるために使用される方法を改変して、MALDIマトリックス液体粒子を用いてステップ405または505において検体粒子を選択的にコーティングするために修正できることを発見した。音響凝集として一般的に知られている1つの方法が、米国特許第4,475,921号に記載され、これは、0.5マイクロメートルから5マイクロメートルの範囲の粒子を凝集させて5マイクロメートルより大きいサイズの粒子を得ることができることを開示している。この技術は、発電所の排気から微細な汚染物質粒子(石炭粒子など)を除去するのに有効である。より大きな粒子は、ベンチュリスクラパーのような従来の方法を用いて除去することができる。

【0052】

米国特許第5,243,451号に開示されている音波凝集器は、典型的には、平坦な端壁を有する円筒形のチャンバからなる。取り込まれた微粒子を有するガス流は、一方の端部を通して入り、反対側の端部に存在する。音波発生器が、チャンバの入口壁に配置され、音響エネルギーをチャンバに加える。音響エネルギーは、粒子を互いに振動させ、凝集させるように粒子を振動させる。2つ以上の異なる周波数の共鳴音響エネルギーをチャンバに同時に印加することができる。粒子を振動させるための最適な音響周波数は、粒子サイズの減少とともに増加する。音響エネルギーは、チャンバの長さに沿って指向させることができる。音響エネルギーは、また、チャンバへのガスの流れに対して垂直に向けられ得る。2つの波が90度位相がずれている場合、粒子はチャンバの長さに沿って円運動し、より効果的な凝集を提供する。音波発生器は、密に制御された周波数の電気信号を生成するドライバと、電気信号を音波エネルギーに変換する音波変換器と、変換器をチャンバの入口壁に結合する管とからなる。ドライバは、チャンバ内で規定された波長の音波を生成する周波数の信号を生成するように制御される。波長は、チャンバの音響共鳴モードに対応するように選択される。聴力閾値が 10^{-16} ワット/cm²で約140dBの音強度を使用する場合、0.5~5ミクロン範囲の粒子を凝集させるのに要する時間は10秒未満であった。チャンバ内のガスの平均滞留時間は約6秒(約1ft/sの速度で)であった。

【0053】

米国特許第7,150,779号は、周波数および/または振幅変調された音響場を開示している。周波数は、20kHz~1GHzの範囲で変調され、振幅は約200dB(20マイクロパスカルに参照される)に変調される。あるいは、音響場の周波数は約50Hzから約15kHzまで、振幅は130から175dBまで変化する。3フィート/秒の速度でガスを流し、約600Hzで150dBの音響場を印加しながら、0.5~2ミクロン(マイクロメートル)の範囲の粒子は、2~5ミクロンに凝集する可能性がある。変調された音響場は、機械振動子と、振動子を音響プレートに接続するシャフトとを使用して生成することができる。

【0054】

米国特許第8,387,363号は、25Hzおよび45Hzの周波数、ならびに、28および12Wの大きなスピーカ出力を使用しながら、正弦波を使用して自動車排気中の微粒子の良好な分離を開示する。分離効率は音源の電力に比例することが見出された。周波数が軽微な効を有することが判明した。

【0055】

いずれの理論にも限定されるものではないが、ステップ405または505におけるタイプ1エアロゾル(MALDIマトリックス)によるタイプ2エアロゾル(検体)の音響

10

20

30

40

50

コーティングは、より低い音振幅レベルで実現でき、好ましくは、一例において、140 dB未満であり、これは 10^{-16} ワット/cm²の聴力閾値に対応する。上述の粒子除去スキームとは対照的に、ステップ405または505における第1の目的は、被覆された分析物粒子を得、かつ、被覆された分析物粒子の不必要な凝集を回避することである。微粒子除去スキームにおいて、目的は、微細汚染物質粒子をより大きな粒子に凝集させ、従来の手段を用いてそれらを空気排出ストリームから除去することであった。対照的に、ここでは、タイプ1エアロゾルは、互いに衝突すると崩壊する傾向のある液体粒子を含む。検体粒子のコーティングは、タイプ1エアロゾル粒子がタイプ2エアロゾル粒子（検体）と衝突するときに達成される。図4または図5に示すステップ405または505で使用するための音響コータは、直径3インチおよび長さ約10cmの円筒形チャンバを有することができる。約5リットル/分の空気流速では、チャンバ内の滞留時間は約6秒である。あるいは、直径8cm、長さ20cmの円筒形チャンバを使用することもできる。3リットル/分の空気流速では、チャンバ内の滞留時間は約10秒である。約140dBの音響場は、タイプ1エアロゾル粒子がタイプ2エアロゾルに衝突するように促し、タイプ2エアロゾル粒子をコートする。例示的な音響コータでは、音場の強度は10ワット未満であると予想される。電気信号を音に変換する際の非効率性を考慮して、20ワット未満の電源で十分であろう。

10

本発明者らはさらに、粒子が音響コータの長さに沿って円運動して移動する際に過剰なMALDIマトリックス材料を空気流から凝縮させ、かなりの割合のコーティングされた検体粒子が当該音響コータ中の空気流に残るようにするために、音響場を、90度位相をずらして、印加できると考えている。

20

【0056】

ノイズキャンセルシステムを使用して、動作中に音響コータによって生成されるノイズをキャンセルし、室内動作のためにデバイスを静かにすることができる。あるいは、音響コータは、超音波範囲（典型的には20kHz未満）で動作させることができる。超音波トランスデューサ、例えば圧電トランスデューサを用いて、超音波エネルギーを音響コータ（チャンバ）に印加することができる。適切な圧電トランスデューサは、Steiner & Martins, Inc. (Doral、フロリダ州)によって供給される。

【0057】

MALDIマトリックス被覆粒子のサイズは、20マイクロメートル未満、より好ましくは10マイクロメートル未満であると予想される。

30

【0058】

音響コータは、音響MALDIマトリックスコーティング装置または他の一般化されたコーティング装置、またはMALDI ATOFMSにおける交換可能な部品であると考えられる。

【0059】

図4および図6におけるオプションの乾燥ステップは、被覆された粒子を熱い表面に直接接触させることによって行われる。あるいは、コーティングされた粒子の乾燥を促進するために、コーティングされたエアロゾルを加熱するために、赤外線またはマイクロ波放射を使用することができる。加熱された壁も使用することができるが、流れに著しい熱的不安定性を誘発しないように温度プロファイルに注意を払わなければならない。好ましい構成は、熱が穏やかに加えられている間に、エアロゾルが層流状態で垂直下方に流れるように配向させることである。

40

【0060】

別の態様では、本明細書に開示されるコーティング方法は、図1に記載される従来のMALDI TOF分光計の検出効率およびスループットを改善するように、改変することもできる。図7に説明される修正された方法600において、試料検体エアロゾル粒子は、図4または図6に説明された方法400または500を使用してMALDIマトリックスエアロゾルでコーティングされる。ただし、コーティングされた検体エアロゾル粒子は、質量分析計に直接送られない。その代わりに、MALDI被覆検体エアロゾル粒子は、

50

最初にエアロゾルインパクタを用いてステップ601においてMALDIプレート上に堆積される。例えば、米国特許第7,591,980号明細書に気笹入れたインパクタを使用して良いコーティングされ、堆積された粒子はコーティングを形成し、必要に応じて続いて乾燥され(ステップ602)、その後コーティングされたプレートは、従来のTOF質量分析計を用いて分析される。イチジク。図7は、方法500に対する変更を示す。方法400は同様に修正してMALDIプレートをコートすることができる。方法600では、必要に応じてMALDIプレートをコーティングする前に乾燥ステップを使用することができる。

【0061】

MALDIマトリックス溶液は、一般に、有機マトリックス材料と、酸と、溶媒とを有する。MALDIマトリックス溶液中で一般的に使用される有機マトリックス材料は、2,5-ジヒドロキシ安息香酸、 α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸、3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシ桂皮酸および2-メルカプト-4,5-ジアルキルヒドラターレンである。MALDIマトリックス溶液は、1,8-ジヒドロキシアントラセン-9(10H)-オン、3-メトキシ-4-ヒドロキシ桂皮酸、2,4,6-トリヒドロキシアセトフェノン、2-(4-ヒドロキシフェニルアゾ)-安息香酸、トランス-3-インドールアクリル酸、4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸、6-アザ-2-チオチミン、2-アミノ-4-メチル-5-ニトロピリジン、4-ニトロアニリン、1,5-ジアミノナフタレン、2-クロロサリチル酸、5-クロロサリチル酸、5-ブromoサリチル酸、5-ヨードサリチル酸、5-メチルサリチル酸、5-アミノサリチル酸、および1,8-ジアミノナフタレンを含む他のマトリックスからなっている。

【0062】

MALDIマトリックス溶液中で一般的に使用される溶媒には、アセトニトリル、水、エタノール、メタノール、プロパノール、およびアセトンが含まれる。クロロホルム、イソプロピルアルコール、テトラヒドロフラン、トルエンなどの他の溶媒を使用することもできる。

【0063】

MALDIマトリックス溶液中の一般に使用される酸には、塩酸、トリフルオロ酢酸、ギ酸、および酢酸が含まれる。

【0064】

いくつかの例では、目的の検体粒子は、液体試料中に含まれていてもよい。図4および図5に示す事例的な模式図は、液体試料を霧状にしてタイプ2エアロゾルを提供するように変更されてもよい。図8は図4を修正したものであり、図8に示すように、方法700のステップ410で提供された液体サンプルは、適切な噴霧器を用いて(前述したように)噴霧され、ステップ403においてタイプ2のサンプリングされた検体を提供する。図7に示す模式図も、この変更を利用してよい。次いで、タイプ1のエアロゾルは、タイプ2のエアロゾルに取り込まれて良い。代替的には、タイプ2のエアロゾルをMALDIマトリックスエアロゾルに取り込んで良い。MALDI飛行時間型質量分析による分析に適した生体分子を含む液体試料は、環境から、ヒト(しばしば臨床試料と呼ばれる)から、動物から、または、食品または薬物の製造作業の一部であるプロセスから得ることができる。臨床試料の例には、尿、唾液、痰、および血液が含まれる。分析の一例は、尿路感染を引き起こす生物の検出および同定であり、それによって感染を引き起こす生物が尿試料中に存在する。サンプルの一部の前処理が必要な場合がある。例えば、試料中の塩を除去するために、試料を濾過し、フィルターを洗浄して塩を除去し、次いで液体を液体中に再懸濁させることによって、試料中の塩を除去する必要がある。糞便試料のような他の試料は、液体中に懸濁され、同様に分析され得る。

【0065】

前述したように、ノイズキャンセルシステムおよび方法が使用される場合、キャンセルノイズは、音響コータソースに対して180度位相がずれて生成される。通常、ノイズはコータの音響源と同じ周波数で生成される。

【 0 0 6 6 】

要約書は、37 C . F . R . セクション 1 . 7 2 (b) に応じたものであり、読者が技術的開示の性質および要旨を一瞥して迅速に決定できるようになっている。これは、特許請求の範囲またスコープおよび意味を解釈または制限するために使用されるべきではない。

【 0 0 6 7 】

本開示は、開示された実施形態に関連して記載されているが、当業者であれば、本開示の精神から逸脱することなく、多くの変更を行うことができることを理解するであろう。したがって、開示の範囲は、決して上述の説明によって制限されることを意図するものではない。

【 0 0 6 8 】

[参考文献]

1. Brown, R. S.; Lennon, J. J., Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization ion time-of-flight mass spectrometer. (1995) Anal. Chem. 67 (13): 1998-2003.
2. Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Auphin, B., Berti, J.-L., Ferroni, A., Gutmann, L., Nassif, X. MALDI-TOF mass spectroscopy tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory, Clin Biochem (2010), doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017.
3. Cherkaoui, A., Hibbs, J., Emonet, S., Tangomo, M., Girard, M., Francois, P. and Schrenzel, J., Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level (2010) J. Clin. Microbiology, doi:10.1128/JCM.01881-09, p. 1169-1175.
4. Cotter, Robert J. (1997). Time-of-flight mass spectrometry, Instrumentation and Applications in Biological Research, American Chemical Society Professional Reference Books.
5. Cotter, Robert J. (1994). Time-of-flight mass spectrometry, American Chemical Society Symposium Series 549.
6. Danielewicz, M. A., Anderson, L. A. and Franz, A. K., Triacylglycerol profiling of marine microalgae by mass spectroscopy. (2011) J. Lipid Res., 52, 2101-2108.
7. Hathout, Y., Demirev, P. A., Ho, Y.-P., Bundy, J. L., Ryzhov, V., Sapp, L., Stutler, J., Jackman, J., and Fenselau, C., 1999, "Identification of Bacillus Spores by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Mass Spectrometry." Appl. and Env. Microbiology, V.65, No. 10, pp.4313-4319. Jackson, S., Mishra, S. and K.
8. Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. (1987). "Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds". Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes 78: 53-68.
9. Knochenmuss, R. (2006). "Ion formation mechanisms in UV-MALDI". Analyst 131 (9): 966-986.
10. Stowers, M. A. et al., 2000, Application of matrix-assisted laser desorption/ionization to on-line aerosol time-of-flight mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom., 14, 829-833.
11. van Wuijckhuijse, A. L., et al., 2004, Matrix-assisted laser desorption/ionization aerosol time-of-flight mass spectrometry for the analysis of bioaerosols: development of a fast detector for airborne biological pathogens, 36 (5/6), P677-68.

10

20

30

40

50

12. vanWuijckhuijse, A.L., and Call, C., Real-timeMALDI TOF MS analysis of biologicalaerosols and contaminated paper dust withthe BiosparQ™ detector. (2010)Proceedingsfrom the 10th International Symposium from the Protection againstChemical andBiological Warfare Agents, Stockholm, Sweden.

【図 1】

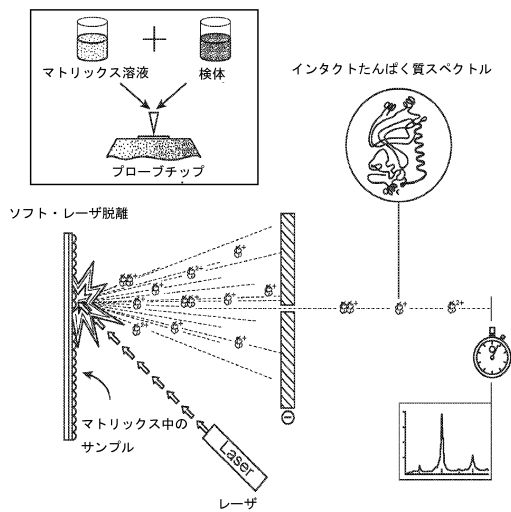


FIG. 1

【図 2】

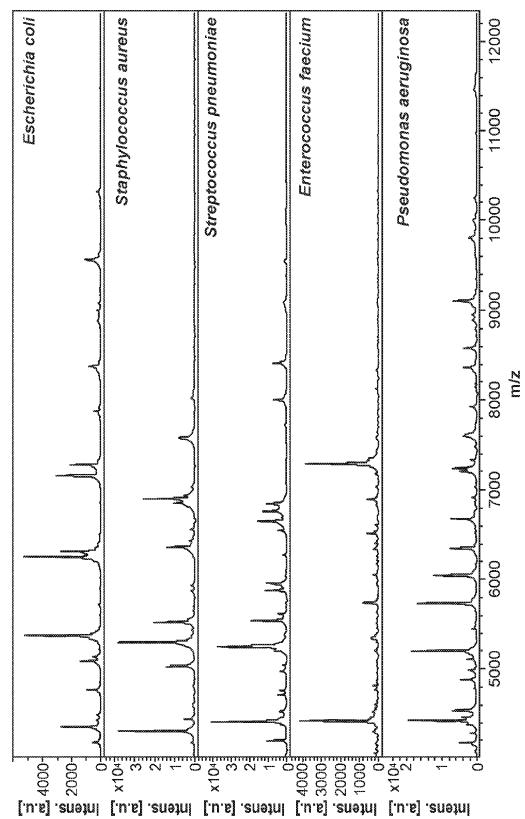


FIG. 2

【図 3】

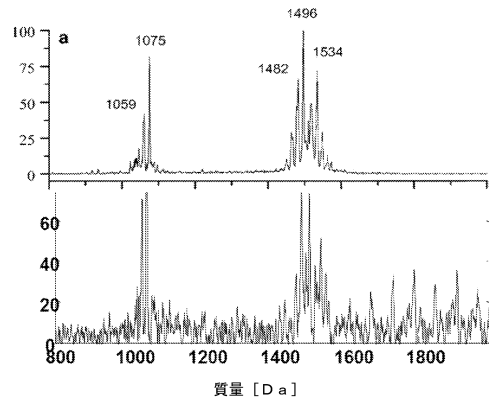


FIG. 3.

【図 4】

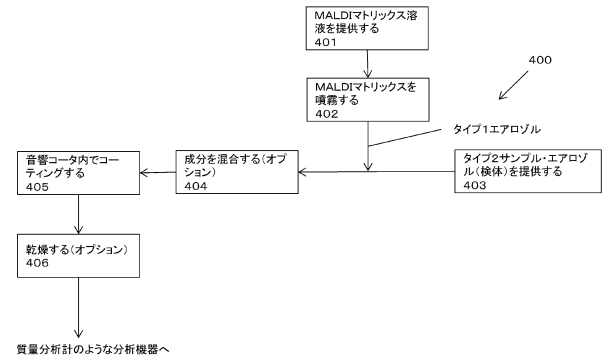


FIG. 4

【図 5】

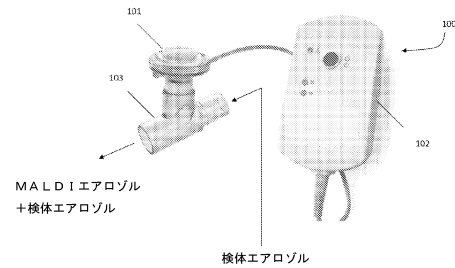


FIG. 5.

【図 6】

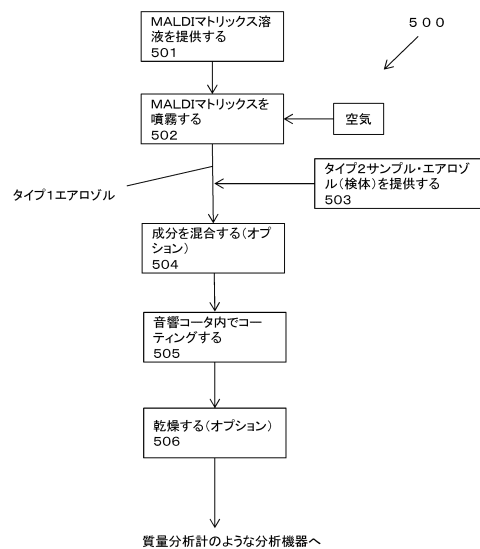


FIG. 6

【図 7】

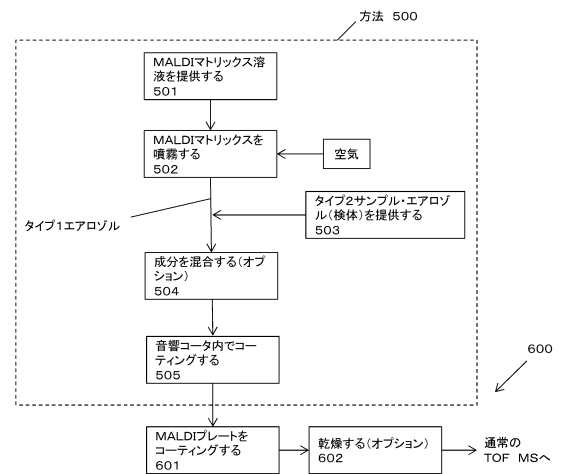


FIG. 7

【図 8】

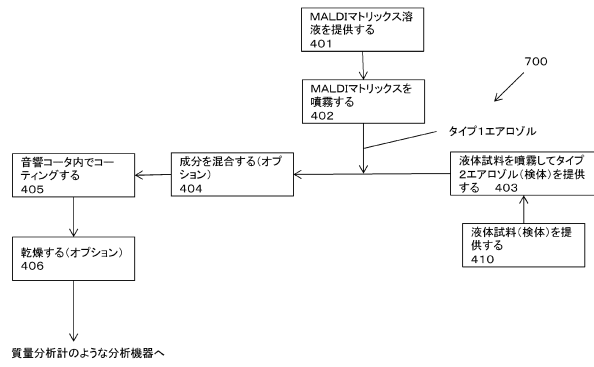


FIG. 8

フロントページの続き

- (72)発明者 ブライデン、ウエイン、エイ．
アメリカ合衆国、２１０４３ メリーランド州、エリコット シティ、ピント コート ４６５２
- (72)発明者 コール、チャールズ、ジェイ．
アメリカ合衆国、８７１１１ ニュー メキシコ州、アルバカーキ、ペーパー フラワー プレー
ス エヌイイ ６１２０

審査官 福田 裕司

- (56)参考文献 特表２０１１－５０３６０５（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２００５／０２３０６１５（ＵＳ，Ａ１）
米国特許第６１４０６３９（ＵＳ，Ａ）
特表２０１４－５３３８７２（ＪＰ，Ａ）
米国特許第４４７５９２１（ＵＳ，Ａ）
特表２００３－５３０２１５（ＪＰ，Ａ）

- (58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ １／２８～１／３０
Ｇ０１Ｎ ２７／６２