

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5388846号
(P5388846)

(45) 発行日 平成26年1月15日(2014.1.15)

(24) 登録日 平成25年10月18日(2013.10.18)

| (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 | 21/64 Z |
| 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 A |

請求項の数 13 (全 9 頁)

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|----------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2009-518496 (P2009-518496) | (73) 特許権者 | 505233343 |
| (86) (22) 出願日 | 平成19年6月25日(2007.6.25) | | バイオヴィジラント システムズ インコーポレイテッド |
| (65) 公表番号 | 特表2010-513847 (P2010-513847A) | | アメリカ合衆国 85705 アリゾナ州 |
| (43) 公表日 | 平成22年4月30日(2010.4.30) | | , ツーソン, スイート 153, 2015 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2007/072050 | | ダブリュー. ルースラウフ ロード |
| (87) 国際公開番号 | W02008/105893 | (74) 代理人 | 100098729 |
| (87) 国際公開日 | 平成20年9月4日(2008.9.4) | | 弁理士 重信 和男 |
| 審査請求日 | 平成22年6月22日(2010.6.22) | (74) 代理人 | 100116757 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/805,962 | | 弁理士 清水 英雄 |
| (32) 優先日 | 平成18年6月27日(2006.6.27) | (74) 代理人 | 100123216 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 高木 祐一 |
| (31) 優先権主張番号 | 11/768,103 | (74) 代理人 | 100089336 |
| (32) 優先日 | 平成19年6月25日(2007.6.25) | | 弁理士 中野 佳直 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 粒度および蛍光の同時測定による病原体検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

光源で粒子を照射する段階と、粒度と粒子からの内部蛍光を同時に測定する段階と、粒度と、測定値を付与した蛍光強度とに基づいて、粒子を不活性粒子と生物学的に活性な粒子とのいずれかに分類する段階を含む、

前記粒子を不活性粒子と生物学的に活性な粒子とのいずれかに分類する段階が、断面積、粒度、体積、または直径によって正規化された蛍光強度に基づいて粒子を分類する段階を含む、流体中の粒子を検出および分類する方法。

【請求項 2】

粒度情報を用いて、粒子が生物学的に活性か否かを判定する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

粒子の断面積、粒度、粒子の体積、または粒子の直径の測定結果を用いて粒子を分類する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

蛍光応答に基づいて粒子を分類する段階を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

粒子を、細菌、カビ、真菌、または孢子に区別する段階を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

個々の粒子の粒度および蛍光強度データを用いて花粉およびアレルゲンを微生物から区

20

別する方法であって、粒子を花粉またはアレルゲンに区別する段階を選択的に含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

個々の粒子の粒度および蛍光シグナルデータを用いて、生物学的に活性な粒子内の生化学化合物の相対存在量を推定する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

流体が空気または水である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

サンプルセルと、

サンプルセルの片側にある光源であって、該サンプルに集中光線を送ることによって、該光線の一部分が該サンプル領域内に存在するさまざまな粒度の粒子によってさまざまな角度に散乱するとともに、該光線の非散乱部分が散乱しないまま残る光源と、

該サンプルセルの反対側にある光線遮断装置であって、該光線の該非散乱部分の少なくとも一部分を遮断し、測定される粒子の範囲を制限する光線遮断装置と、

該光線遮断装置の後ろの光路に配置された第 1 検出器であって、前方散乱光の一部分を検出し、所定の粒度範囲内の該光路にある単一粒子の粒度に関する情報を含む出力を生成する第 1 検出器と、

該光線の軸外に配置されて、同じ単一粒子からの内部蛍光を検出する第 2 検出器と、

到来する粒子流と該光線の交点が楕円の一方の焦点にあり、該第 2 検出器がもう一方の焦点にあるように、粒子サンプリング領域内に置かれる楕円鏡と、を

含み、

さらに、一時に粒度分布と粒子蛍光を処理し、検出粒度と検出内部蛍光を統合する処理装置とを含み、

所定の粒度範囲内で蛍光も発する粒子が検出されると警報信号を発する警報器を、選択的にさらに含む、粒子検出器システム。

【請求項 10】

該光源の放射範囲が 270 ~ 410 nm である、請求項 9 に記載のシステム。

【請求項 11】

該光源に LED またはレーザを含む、請求項 9 または 10 に記載のシステム。

【請求項 12】

該サンプルセルが空気サンプルセルまたは水サンプルセルである、請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 13】

該蛍光強度を測定し、該処理装置によって、粒度と蛍光強度とに基づいて粒子を不活性粒子と生物学的に活性な粒子とに分類する、請求項 9 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概して空中または水中浮遊粒子を検出するシステムおよび方法に関し、より詳細には、空中または水中浮遊粒子を検出して、検出粒子を分類するシステムおよび方法に関する。本発明は、アレルゲンおよび生物兵器剤の検出および分類における特有の有用性を有しており、その他の有用性も考えられるが、そのような有用性に関して説明する。

【背景技術】

【0002】

現在、炭疽菌（炭疽病）等の生物兵器剤の放出を伴う都市型テロ攻撃が現実的な懸案事項である。兵器化された炭疽菌胞子は人間の肺に通路を得ることができるので、非常に危険である。人間にとっての炭疽菌胞子の致死吸入量 LD_{50} （攻撃に曝された人の 50% を殺すのに十分な致死量）は、2,500 ~ 50,000 胞子だと推定される（非特許文献 1 を参照）。その他の潜在的な兵器化された生物剤としては、ペスト菌（ペスト）、ボ

10

20

30

40

50

ツリヌス菌（ボツリヌス中毒症）、および野兔病菌などがある。この潜在的脅威を考慮して、そのような攻撃を検出するための早期警報システムが現在必要である。製薬、保健医療、食品業界では、環境微生物レベルのリアルタイム検出器が公衆衛生、品質管理および規制目的に有効である。例えば、非経口製剤メーカーは、無菌クリーンルーム内の微生物レベルを監視する必要がある。これらの用途において、環境の微生物を即座に検出することのできる計器が有効なツールであり、微生物が成長して検出されるまでに日数を要する従来の栄養平板培養法よりも優れた利点を有する。

【0003】

粒度測定と紫外線（UV）誘発蛍光検出は、空気中の生体物質の存在を検出するのに用いられてきた。これらの技術を兵器化された生物剤の放出による生物テロ攻撃に対する早期警報センサとして用いることを説明しているさまざまな特許が存在する。これらの装置の中には、MIT（マサチューセッツ工科大学）リンカーン研究所によって開発された生物剤警報センサ（BAWS）、Hoの蛍光生物学的粒子検出システム（Jim yew-Wah Ho、特許文献1；特許文献2；特許文献3）、ミネソタ州のTSI社によるFLAPSおよびUV-APS（Peter P. HaristonおよびFrederick R. Quant、特許文献4）、Silcottによる蛍光センサ（特許文献5）がある。

10

【0004】

パルス紫外線レーザーを用いたレーザー誘起蛍光に基づいて提案されたバイオセンサは、非特許文献2によって説明される。これは、空気1リットル当たり5つの粒子のエアロゾル濃度を検出することができるが、高価で精巧な計器を必要とする。その他の粒子計数器は、オレゴン州グランツ・パスのMet One Instrument社、コロラド州ボルダーのParticle Measurement Systems社、カリフォルニア州アナハイムのTerra Universal社によって製造されている。

20

【0005】

空中アレルゲン粒子を検出し、空気サンプル内の粒子の数が所定の最小値を超える場合は、敏感な人に警告を発するために、さまざまな検出器が設計されている。これらは全て、Hamburgerらの特許文献6、特許文献7、特許文献8、特許文献9、特許文献10、特許文献11で説明される。これらの検出器は全て、光線の一部が空気中の何らかの粒子によって散乱するように環境空気のサンプルを通る光線の方向と、所定のアレルゲンサイズ範囲に対応する所定の角度範囲において散乱する光のみを透過する光線遮断装置と、透過光を検出する検出器とを必要とする。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許第5,701,012号明細書

【特許文献2】米国特許第5,895,922号明細書

【特許文献3】米国特許第6,831,279号明細書

【特許文献4】米国特許第5,999,250号明細書

【特許文献5】米国特許第6,885,440号明細書

40

【特許文献6】米国特許第5,646,597号明細書

【特許文献7】米国特許第5,969,622号明細書

【特許文献8】米国特許第5,986,555号明細書

【特許文献9】米国特許第6,008,729号明細書

【特許文献10】米国特許第6,087,947号明細書

【特許文献11】米国特許第7,053,783号明細書

【特許文献12】国際公開第2007/011854パンフレット

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】T. V. Ingresbyら、「Anthrax as a Biol

50

ogical Weapon (生物兵器としての炭疽菌)」(JAMA、第281巻、1735頁、1999年)

【非特許文献2】T. H. Jeyssら、IRIS Active Systems会報(第1巻、235頁、1998年)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

空中または水中の微生物を検出するために、粒度と、微生物に起因する蛍光の両方を測定するための有効なシステムの工夫が重要である。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、粒度の測定と、代謝産物やその他の生体分子の内部蛍光の存在の検出とを粒子毎に同時に行なうことができるセンサシステムを提供する。この検出方式の従来技術よりも優れた利点がいくつかある。一例としては、粒子特性評価のために従来技術で用いられた統計モデルに依存せず、粒子の特性評価をする決定論的粒子測定方法論を提供することである。決定論的測定方法論により、従来技術に比べて粒子特性をより明確に付与できるようになり、統計モデルへの依存を減らすことができる。さらに、例えば、花粉(微生物よりも大きな粒度)や煙粒子(微生物よりも小さな粒度)を検出から除外することができるので、微生物検出における偽陽性の可能性が低くなる。そして、粒子の生物学的状態を決定する目的で、粒子を特性評価するために個々の粒子に関して収集されたデータ、例えば、その断面積または体積に応じた粒子からの蛍光シグナルの強度の詳細分析が可能になる。

【0010】

本発明は、(1)個々の粒度を測定する第1光学系と、(2)個々の粒子からのUVレーザー誘起内部蛍光シグナルを検出する第2光学系と、(3)個々の粒子に粒度と蛍光強度の両方を付与するデータ記録形式と、微生物を非微生物(例えば、不活性塵埃粒子)から区別するコンピュータ読み取り可能プログラムコードの3つの主要構成要素からなっている。

【0011】

本発明の光学アセンブリは、2つの光学サブアセンブリを有する。1つ目は、(a)粒度を測定する光学装置である。例えば、本発明の好適な実施形態は周知で頻繁に用いられるミー散乱検出方式を使用するが、目新しいやり方でその方式を利用することで、システムが0.5ミクロン~20ミクロンの粒度範囲を有する空中浮遊粒子を非常に精密に測定することができる。異なる種類の微生物は異なる粒度範囲を有するので、粒度において微細な区別をつけるこの能力は、微生物の種類を決定するために重要である。2つ目は、(b)粒度測定と同時に、調べている最中の粒子からの蛍光レベルを測定するために使用される光学装置である。例えば、本発明の好適な実施形態は、粒度を測定しているのと同じ粒子からの蛍光を収集するように配置される楕円鏡を使用する。

本発明のさらなる特徴および利点は、添付図面と併せて以下の詳細な説明から明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】各空中浮遊不活性粒子および微生物粒子の粒度範囲を示す図である。

【図2(a)】微生物の内空気に関する粒子分布を示す粒度と蛍光の同時測定の柱状図である。

【図2(b)】パン酵母粉末を含有する空気に関する粒度と蛍光の同時測定の柱状図である。

【図3】7ミクロン粒度の蛍光色素ドーブ粒子の粒度と蛍光の同時測定の柱状図である。

【図4】粒度と蛍光の同時測定を行なう、本発明に従った光学系の概略図である。

【図5】図4の光学系のブロック図である。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0013】

図4は、本発明の第1の例示的实施形態に従った流体粒子検出器システム用の光学系の概略図である。このシステムの第1実施形態は、例えば、テロリストやその他の人によって故意に放出された空中または水中浮遊生物テロ剤を検出するように設計されているが、カビや細菌のように自然に存在し得るか、あるいは偶然、不注意、自然または故意に関係し得るその他の空中または水中浮遊粒子の有害レベルを検出する民間用途や、食品製造業および製薬業などの工業用途のみならず、クリーンルーム用途で使用することもできる。

【0014】

本明細書で用いられる用語「流体浮遊粒子」は、空中浮遊粒子および水中浮遊粒子の両方を意味する。

10

【0015】

本明細書で用いられる用語「病原体」は、空中または水中に多量に存在すると、そのような粒子に曝された人間を殺傷することさえできるあらゆる空中または水中浮遊粒子、生物剤、または毒素を指す。

【0016】

用語「生物剤」は、その起源や生成法が何であれ、任意の微生物、病原体または感染性物質、あるいはそのような任意の微生物、病原体または感染性物質の毒素、生物毒素、または自然に存在するか、生物工学によって作られたか、合成された任意の成分として定義される。そのような生物剤としては、例えば、生物毒素、細菌、ウイルス、リケッチア、

20

【0017】

「生物毒素」は、生きた植物、動物、または微生物から生成または抽出された有毒物質であるが、化学的手段によって生成または変質させることもできる。しかしながら、毒素は、一般に宿主生物内で自然に発達する（すなわち、サキシトキシンは海藻によって生成される）が、遺伝子組み換えおよび/または合成的に作られた毒素は実験室環境で生成されている。微生物と比べて、毒素は比較的単純な生化学的組成を有しており、それら自身で繁殖することができない。多くの点で、毒素は化学剤に匹敵する。そのような生物毒素としては、例えば、ボツリヌスおよび破傷風毒素、ブドウ球菌エンテロトキシンB、トリコテシンマイコトキシン、リシン、サキシトキシン、志賀および志賀様毒素、デンドロトキシン、エラプトキシンbのみならず、その他の公知の毒素がある。

30

【0018】

本発明の検出器システムは、空中または水中浮遊粒子を検出して、例えば、サンプルで検出された範囲内で各粒度の粒子の数を示す出力を生成し、粒子が生物学的に活性か不活性かを示すように設計される。このシステムはさらに、粒子の数が、通常的背景レベルおよび/または生物有機体や生物剤を上回る危険になりかねない所定の値を超える場合に、警報信号やその他の応答を発することもできる。

【0019】

図4は、本発明の一例示的实施形態に従った流体粒子検出器システム用のシステム10の図である。図4に示すように、システム10は、紫外光源波長を有する電磁放射光線14を発するレーザ等の紫外光励起源12を含む。紫外光源は、微生物内の代謝産物の内部蛍光を励起することができる波長を有するように選択される。例えば、励起源12は、好ましくは約270nm～約410nm、より好ましくは約350nm～約410nmの波長で動作する。約270nm～約410nmの波長は、微生物が3つの一次代謝産物からなるという前提に基づいて選択される。1つ目は、約220nm～約300nmの範囲で一般に約270nmの蛍光を発するトリプトファンである。2つ目は、一般に約340nm（約320nm～約420nmの範囲）の蛍光を発するニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）である。3つ目は、一般に約400nm（約320nm～約420nmの範囲）の蛍光を発するリボフラビンである。しかしながら、励起源12は、好ましくは約350nm～約410nmの波長を有する。この波長は、生物剤の前述の3つの一

40

50

次代謝産物のうちNADHおよびリボフラビンの2つの励起を確実にするが、例えばディーゼルエンジン排ガスおよび塵埃やベビーパウダー等のその他の不活性粒子などの干渉による励起を排除する。従って、本発明は好適な実施形態において、励起源12の波長範囲の公正な選択を行なって、(トリプトファンを励起する能力よりも)NADHおよびリボフラビンからの蛍光を励起しながら、ディーゼルエンジン排ガス等の干渉による励起を排除する能力を保持する。この措置は、(例えば短い紫外波長266nmの光によって励起することのできる)ディーゼル排ガスによって発せられる誤警報を減らすために取られる。

【0020】

図4に示すシステム10では、粒子サンプリング用にノズル16からシステム内に環境空気(または液体サンプル)が取り込まれる。ノズル16はその中央部に開口18を有しており、レーザー光線が粒子流を通過することができる。レーザー光線のすぐ下流には、ミー散乱粒度検出器20がある。ミー散乱粒度検出器20は、光線遮断レンズ22と、コリメータレンズ24と、光線14の一部分を粒子検出器28に集中させる集光レンズ26とを含む。

10

【0021】

レーザー光線14の軸外で、到来する粒子流とレーザー光線の交点が楕円の2つの焦点の1つとなる一方、蛍光検出器32(この場合、光電管)はもう1つの焦点を占めるように、楕円鏡30が粒子サンプリング領域に置かれる。この設計は、楕円の2つの焦点の一つから発せられる点光源がもう1つの焦点に集中するという事実を利用している。この光学設計において、楕円鏡30は、微生物からの蛍光シグナルを一点に集めて、それを蛍光検出器32に集中させる。光学フィルタ34が蛍光検出器の前方に置かれて、散乱紫外光を遮断し、誘起蛍光を通過させる。

20

【0022】

光線遮断レンズ22は、レーザー光線14の非散乱成分を反射するように設計されており、電磁放射光線の非散乱成分を反射するためにビニル等の材料を前面に取り付けてもよい。光線遮断レンズ22のその他の特徴および重要な点は、参照することにより本明細書に援用される、先に挙げたHamburgerらの米国特許の一部と特許文献12(PC T/US2006/027638)で開示される。

【0023】

粒子検出器20は、例えば、先に挙げた参照することにより本明細書に援用されるHamburgerらの米国特許に記載されるような、粒子のサイズを設定するフォトダイオードを有する。

30

【0024】

本発明のミー散乱の使用によって、紫外光照明の検出用の光学部品の配置も促進されて、同時に、生物の代謝にとって必要な中間体であって、細菌および真菌等の微生物に存在する代謝産物NADH、リボフラビンおよびその他の生体分子の存在に関して個々の粒子が検査される。これらの化合物がバイオエアロゾル中に存在する場合、それらは、紫外光エネルギーによって励起された後に、上記に概説した検出方式に基づいて計器によって検出される自発蛍光を発する。この検出方式では微生物の属や種を識別することができず、ウイルスは微小かつ代謝に乏しいので検出されないが、この検出方式では、各粒子の粒度を測定すると同時に、粒子が生物学的に活性であるか不活性であるかをそれぞれ判定することによって、微生物汚染の有無をユーザに示すことができる。

40

【0025】

図5を参照すると、本発明の粒度と蛍光の同時測定方式の機能性が、計器などによる測定結果の図式表現で示される。この動作原理は以下の通りである。計器が環境空気(または液体)を継続的に監視して、個々の空中浮遊粒子の粒度をリアルタイムで測定すると同時に、粒子が蛍光を発しているかどうかを決定する。蛍光シグナルに対して閾値が設定される。蛍光シグナルが設定レベルを下回る場合、粒子は不活性と認識される。この蛍光シグナル閾値は、蛍光シグナル強度、粒子断面積または粒子体積に応じた蛍光強度にするこ

50

とができる。蛍光シグナル閾値が設定レベルを超える場合、粒子は生物学的に活性であると認識される。粒度と蛍光シグナル強度の統合データは、粒子毎に微生物の有無を決定することになる。図2(a)および図2(b)は、本発明に従った検出器の機能性を示す。これらは、この検出方式を用いて測定した環境の空中浮遊粒子データを示す。各グラフにおいて、上層部分は、粒子濃度(空気1リットル当たり)対粒度(1ミクロン~13ミクロン)の粒度柱状図を対数目盛で示しており、無地の棒は不活性粒子を表しているのに対して、縞模様の棒は微生物の存在を示している。グラフの下層部分は、1秒以内に検出された粒子のリアルタイムスナップショットであり、各スパイクは1つの単一粒子を表しており、その高さは粒度に対応している。図2(a)では、清浄な空気に対してテストが行われたので、微生物がなく、不活性粒子のみが存在した。第2のテストでは、パン酵母粉

10

【0026】

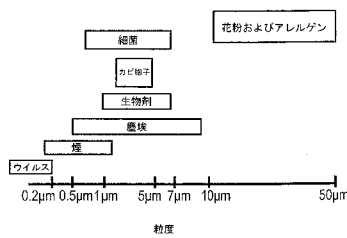
図3は、粒度と蛍光の同時測定方式が可能な検出器に7ミクロンの蛍光色素ドーブ・プラスチックビーズが散布されたときに得られたデータ集合を示す。縞模様の棒は、7ミクロンの粒度範囲に分布するそれらの粒子内の蛍光の存在を示している。

【0027】

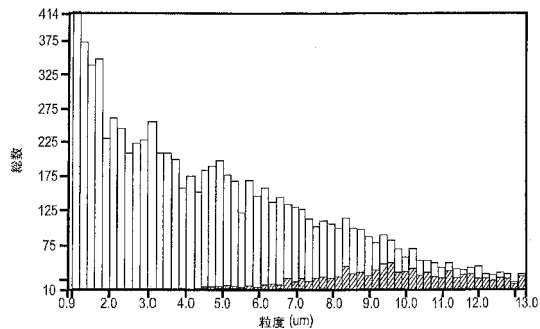
本発明の上記の実施形態、特にあらゆる「好適な」実施形態は、実行例の可能性を示すとともに発明の原理の明確な理解のために記載されているに過ぎないことを強調したい。発明の精神および原理から実質的に逸脱することなく、本発明の上記の実施形態に多くの

20

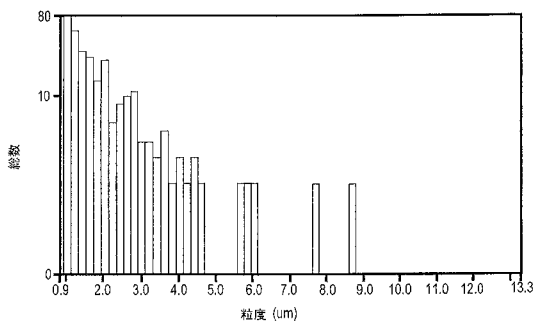
【図1】



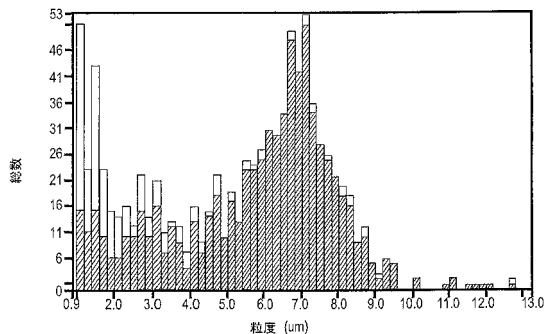
【図2(b)】



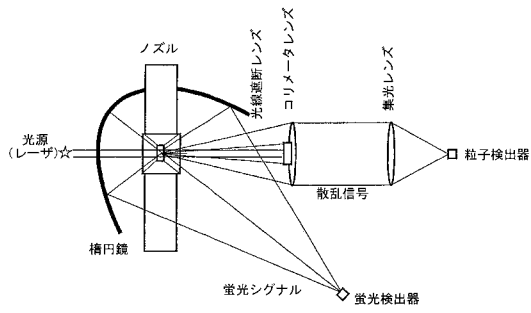
【図2(a)】



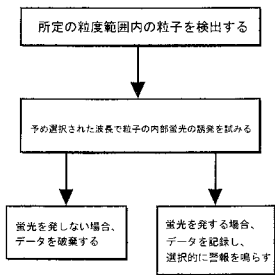
【図3】



【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

(74)代理人 100148161

弁理士 秋庭 英樹

(72)発明者 ジアン, ジアン - ビン

アメリカ合衆国 8 5 7 5 7 アリゾナ州 ツーソン ダブリュー. コール ドン アントニオ
4 9 2 5

(72)発明者 モーレル, ミシェル

アメリカ合衆国 8 0 5 4 9 コロラド州 ビュー ポイント サークル ウェリングトン 7 3
5 9

(72)発明者 モーリス, グレゴリー, スコット

アメリカ合衆国 8 5 7 1 9 アリゾナ州 ツーソン イー. エイス ストリート 2 3 4 5

審査官 高橋 亨

(56)参考文献 国際公開第2005/029046(WO, A1)

特表2007-525648(JP, A)

特開昭63-259442(JP, A)

特開2003-038163(JP, A)

特開2005-102645(JP, A)

特開2001-149091(JP, A)

特表2002-514741(JP, A)

特表2006-518044(JP, A)

特表平09-502254(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 1 4

C 1 2 M 1 / 3 4

C 1 2 Q 1 / 0 4

G 0 1 N 2 1 / 6 4