

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-531718

(P2004-531718A)

(43) 公表日 平成16年10月14日(2004. 10. 14)

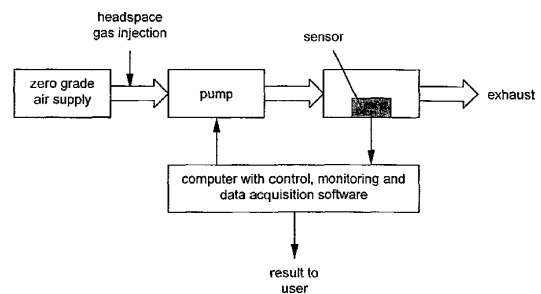
(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/12	GO 1 N 27/12 A	2 GO 4 5
A 6 1 B 1/00	A 6 1 B 1/00 3 O O D	2 GO 4 6
A 6 1 B 5/08	A 6 1 B 5/08	4 B O 6 3
A 6 1 B 5/20	A 6 1 B 5/20	4 C O 3 8
C 1 2 Q 1/04	C 1 2 Q 1/04	4 C O 6 1
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-583662 (P2002-583662)	(71) 出願人	502266191
(86) (22) 出願日	平成14年4月19日 (2002. 4. 19)		克蘭フィールド ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月17日 (2003. 10. 17)		イギリス国, ベッドフォードシャー エム
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/001853		ケー45 4ディーティー, ミルトン ケ
(87) 国際公開番号	W02002/086149		イネス, シルソエ
(87) 国際公開日	平成14年10月31日 (2002. 10. 31)	(74) 代理人	100099759
(31) 優先権主張番号	0109572.8		弁理士 青木 篤
(32) 優先日	平成13年4月19日 (2001. 4. 19)	(74) 代理人	100077517
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		(74) 代理人	100082898
			弁理士 西山 雅也
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 揮発成分の感知による診断

(57) 【要約】

揮発性物質の生成を伴う状態、特に疾病状態、が、該揮発性物質を含むサンプルを単一センサーに通すことによって検出される。このセンサーとしては半導体気体センサー又は表面音響波デバイスを用いることができる。このセンサーは、出力信号を、例えば尾を引くピークの形で提供する。該信号の複数の特性（例えば、ピーク高さと最大正勾配）を測定して、サンプルを特徴づけ、さらにその根底にある状態を特徴づける。我々は、例えば、(a)proteusに感染した状態、(b)E. coliに感染した状態、又は(c)未感染状態、を判別することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

揮発性成分の生成と関連する状態の発生を調べる方法であって：

- a) 前記揮発性成分を含む可能性がある気体状サンプルを用意するステップ；
- b) 一連の異なる揮発性成分に応答して出力信号を発生できる単一センサー・デバイスを前記サンプルに対し曝露させるステップ；及び
- c) 該出力信号の複数のパラメーターを決定し、該決定された複数のパラメーターを、発生を検出しようとする 1 つ以上の状態と関連した、予め決定されたパラメーター・パターンと関連させるステップ；

を含む方法。

10

【請求項 2】

該センサー・デバイスが、揮発性成分への曝露によって電気抵抗が影響されるセンサー・エレメントを有する電氣的デバイスであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記センサーが、半導体センサー・エレメントを有することを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記エレメントが金属酸化物半導体 (MOS) エレメントであることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記エレメントが有機半導体ポリマー・エレメントであることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記エレメントがポリピロール又はポリアニリンをベースとするものであることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記センサーが該サンプル中の揮発物質に応答する表面音響波デバイスであることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記音響波デバイスがセンサー・エレメントを構成する化学層によって修飾されていることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

該検出しようとする状態が疾病状態であることを特徴とする請求項 1 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

該疾病状態が、尿路、胃腸管、呼吸器系、柔組織、皮膚、聴覚及び嗅覚システム、循環系、及び中枢神経系、の少なくとも 1 つに影響することを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

該揮発性成分は微生物によって生成され、ステップ (a) が、該微生物を含む可能性がある物質のサンプルを取得し、該微生物が該揮発性成分を生成するような条件の下でそれを培養する第一のステップを含むことを特徴とする請求項 1 乃至 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 12】

該揮発性成分が体のプロセスによって生成され、ステップ (a) が、関心がある揮発性物質を含む可能性がある物質のサンプルを取得する第一のステップを含むことを特徴とする請求項 1 乃至 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

ステップ (a) が、該揮発性物質を該センサー・デバイスに提示する前に該揮発性物質をプレ濃縮するステップを含むことを特徴とする請求項 1 乃至 12 のいずれか 1 項に記載の方

50

法。

【請求項 14】

該サンプルへの該センサー・デバイスの曝露が尾を引くピークという形の出力信号を生じ、ステップ(c)において、該パラメーターが(i)ピーク高さ、(ii)最大正勾配、(iii)最大負勾配、(iv)該サンプルへの該センサーの曝露後にピークが起こる時間;(v)応答減衰定数;及び(vi)対数傾斜(logarithmic slope)から選択されることを特徴とする請求項 1 乃至 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

該パラメーターが(i)及び(ii)であることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

1 つ以上の前記パラメーターの大きさを用いて揮発性成分の量についての定量的データを得ることを特徴とする請求項 1 乃至 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

請求項 1 乃至 16 のいずれか 1 項に記載の方法を実行するために用いられる装置であって、前記単一センサー・デバイスと、サンプルを該センサー・デバイスに提供するように該センサー・デバイスに結合された気体状サンプル供給システムと、該センサー・デバイスの出力を受け取って分析し、その結果を示すディスプレイ及び／又は出力信号を提供するように該センサー・デバイスに結合されたコンピュータ又はマイクロコントローラを含む装置。

【請求項 18】

該センサー・デバイスが内視鏡又は気管支鏡の一部であることを特徴とする請求項 17 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、揮発成分を検出して、その生成に関わるシステムの状態を推測する方法及び装置を記述する。このシステムは、患者の体、又はその部分を含む。すなわち、検出装置を用いて、微生物によって生ずる疾病からの、又は疾病によって生じた代謝の変化からの臭いの放出を検出することができる。

【背景技術】

【0002】

バクテリア感染に伴う臭い及び組織の死滅に伴う腐敗はずっと以前から認識されている。多くのバクテリアの種が特異な臭いを発生させることが現在では明らかになっている。これは、バクテリオイドやクロストリジウム種などの嫌気性菌において最も顕著である。しばしば、感染が強いときでも、刺激臭しか感知できない。大腸菌によるおだやかな感染は、幼児の尿にはっきりした生臭い臭いを付与するが、多くの場合それは正常な臭いを熟知している母親によって感知される。

【0003】

いくつかの代謝疾患は最初は患者の臭いから検出される。分子及び生化学医療が出現する前は、意識のない子供の息に含まれた甘い臭いがアシドーシス糖尿病昏睡という診断の最初の手がかりであった。老齢の患者のかび臭い臭いは差し迫った肝臓の障害を示していることがあり、尿の臭いは腎臓の故障を示していることがある。口臭又は単なる息の悪臭は、いろいろな原因があり得るが、しばしば胃における(胃がんに関連した)、又は肺における(気管支拡張症又は二次的感染による)、バクテリアの過剰な増殖に関係している。

【0004】

嗅覚はずっと前から疾病診断の手段として用いられてきた。実際、多くの疾病は特徴的な臭いを発することが知られており、それが疾病状態のマーカーとして利用されている(Barr et al., 2001)。

【0005】

微生物の臭いの検出

10

20

30

40

50

感染している生物の速やかな検出は患者の正しい治療のためにきわめて有益なことがある。バクテリア感染の結果はしばしばうみをしょうずるが、これはバクテリアと死んだ白血球の混合物である。うみは容易に見ることができるが、その原因になっているバクテリアは、多くの場合培養技術に頼らなければ検出できない。迅速な検出は正しい抗生物質による治療を可能にする。微生物の迅速な検出は医療の現場で重要であるだけでなく、食品及び飲料産業でも環境の監視においても重要である。いくつかの“迅速な”方法がいろいろな化学的、物理的及び生物的な技法に基づいて記述されている (Hobson et al., 1996)。

【0006】

異なる微生物が異なる代謝経路を示すことは良く知られている。そのような生化学的な差異はその微生物に特有のものであり、それをいろいろな微生物種の検出の手段として利用できる。これを実行するために良く用いられるやり方は、増殖のために代謝して利用できる栄養を与えてある微生物の増殖を促進する選択的栄養培地を用いて、培養プレート上に眼に見えるコロニーを形成させることである。このような微生物プレーティング培養法は微生物識別の目的に広く用いられている。このような考え方の延長上にあるのが、特定微生物から放出される揮発性代謝産物の検出である。このアプローチの1つの好例は、ずっと以前、1970年代、に行われた研究に具体化されている。この研究では、複雑な実験室分析方法を用いて、いろいろな微生物を同定する手段として特定の最終代謝産物が同定された。1977年のHayward et al.の報告、及び1978年のColoeの報告は、気液クロマトグラフィーを用いた*E. coli*と*P. mirabilis*からの揮発性の鎖状代謝産物の検出を記述している。この研究では、成長培地上でのバクテリアの代謝活動が、揮発性の代謝産物の産生に導き、それが生育容器のヘッドスペースにたまり、その後気液クロマトグラフィー検出装置で検出された。異なる微生物は異なる代謝経路を示すので、気液クロマトグラフィー法を用いて、特異的な揮発性マーカーの生成を検出することによって異なる種を区別することが可能になった。1977年のHayward et al.の研究と1978年のColoeの研究は、このアプローチが*E. coli*と*P. mirabilis*の同定に関してきわめて効果的であることを示した。彼らは、この微生物臭気分析法を、クロマトグラフィー検出器を用いる尿路感染の原因バクテリアの迅速診断に応用して成功を収めた。

【0007】

その後の1980年代と1990年代の研究は、いろいろな化学センサーのアレーを用いた揮発性の微生物生成物の検出装置を利用した。これらのアレー形態の揮発性化学物質検出装置は、いくつかの広い特異性を有する期待センサーを用いていた。このような検出アセンブリは、よく電子の鼻 (electronic nose) と呼ばれる。これに関して、W0 97/08337とUS 5 807701は、栄養培地で育成されたいろいろな微生物が産生する異なる気体又は蒸気に応答する複数のセンサー・アレーを用いる微生物同定方法を記述している。異なる微生物種は異なる代謝産物を生ずるので、どの種が存在するかについての今後の予測をもっと正確にするために十分な情報を集めるためには広い応答のアレーが良い検出器になると考えられる。アレーの中のセンサーはいろいろな生成物と相互作用して複数のセンサー信号を生じ、それが後でソフトウェアを用いてパターン認識技術によってまとめて分析される。適当なパターン認識技術を用いることによって、異なる微生物が生ずるセンサ・パターンを認識することが可能になる。

【0008】

代謝疾患からの臭いの検出器

息や尿などに付与される臭いのような体液からの臭いの化学的な構成を調べるためにいくつかの異なる方法が用いられている。これらの検出方法は、微生物の臭いの検出に関して既に述べたものとほぼ同様であり、ガス・クロマトグラフィーや質量分析計、及び電子の鼻などの複雑な計器を用いるものである。最近、代謝疾患の検出のための臭いの利用が示された：すなわち、息の中の22の揮発成分（主としてアルカン、その誘導体及びベンゼン化合物）の組合せを用いて肺がんの患者と肺がんでない患者を判別することができたが (Philips et al., 1999)、これは迅速な診断とスクリーニングのための肺がん“呼気アナ

ライザー”の可能性を示すものである（Gardner and Bartlett, 1994）。

【発明の開示】

【0009】

ある状態で、本発明は、揮発性成分の生成に結びつく状態の発生を試験する方法を提供するものであって、その方法は：

- a) 前記揮発性成分を含む可能性がある気体サンプルを用意するステップ；
 - b) 一連の異なる揮発性成分に応答して出力信号を生成できる単一のセンサー・デバイスを前記サンプルに対して露出するステップ；及び
 - c) その出力信号の複数のパラメーターを決定し、決定された複数のパラメーターを、発生を検出しようとしている複数の状態に関連する予め定められたパラメーター・パターンと相関させるステップ；
- を含む。

【0010】

一連の既知サンプルを試験して、1つ以上の状態に関連する応答パターンを画定するn次元空間における境界を確立する校正のステップがあってよく、この場合nは用いるパラメーターの数である。すると、ある未知サンプルを用いた試験で、結果が前記状態の1つに関連した境界内に入った場合、これはそのサンプルの源にその状態が存在することを示すものと見なされる。

【0011】

第2の様態で、本発明は、そのような方法を実行するための装置であって、センサー・デバイス、気体サンプル供給システム、及びコンピューティング・システム（例えば、コンピュータ又はマイクロコントローラ）を適当に結合された形で含む装置を提供する。

【0012】

ある好ましい実施の形態は、感染する微生物からの臭い又は体液に付与された代謝疾患の臭いを検出するように設計された新しい検出器アセンブリーに関する。本発明の疾病検出能力は以下のセクションで例示される。このアセンブリーを用いて尿路感染に苦しむ患者から提供される尿サンプルで疾病の臭いを検出する仕方が示される。この新しい検出器アセンブリーは単一の気体センサーを用いて、WO 97/08337やUS 5807701に記載されているような複数のアレー・センサーを組み込んだ「電子の鼻」デバイスとは著しく異なるものになっている。さらに、この検出器アセンブリーは、既に述べた、これまでに用いられてきた気液クロマトグラフィー及び質量分析計による検出器とも異なっている。疾病の臭いをモニターするのに1つのセンサー・エレメントしか用いないので、この検出器アセンブリーは、医学的診断の用途での疾病の検出に関していくつかの重要な可能性を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

検出器アセンブリー

検出器アセンブリーは、気体センサー、疾病臭気サンプルをセンサーへ送給する手段、及びパーソナル・コンピュータによって制御されるエレクトロニック・インターフェースを含む。検出器は、図1に概略図で示されている。検出器で用いられる単一の気体センサーには、疾病臭気の存在下で性質が変化するいろいろな物質を用いることができる。そこで発生する応答が、コンピュータ又はプログラミング可能なマイクロコントローラ回路に接続されたエレクトロニクス・インターフェースに記録される。「電子の鼻」デバイスと異なり、検出器から得られる信号は、複数のセンサーからではなく、ただ1つのセンサーだけから来る。単一センサーの応答のいろいろな側面を同時に考察することによって、サンプルが疾病の臭いを含んでいるかどうかを判定できる。

【0014】

ある実施の形態では、金属酸化物半導体（MOS）センサーが用いられる。MOSセンサーはいくつかの気体検出用途で広く用いられており、いろいろなセンサーが商業的に入手できる。MOSセンサーは、また、アレー形態の「電子の鼻」デバイスでも広く用いられている。半導体酸化物を用いる気体センサーは一般に室温より高い温度で動作する。センサー物質

の電気抵抗は、温度、及びまわりの雰囲気中の化学組成に依存する。たいいていの酸化物は、加熱されると、雰囲気中の酸素濃度が変化するにつれてその抵抗が変化するということはずっと前から知られている。気体センサーで用いられるたいいていの半導体物質は、まわりの雰囲気中の標的気体の濃度に対して抵抗の依存性を共有している。酸素を除くたいいていの気体に関して、気体濃度の単位変化あたりの抵抗の変化は標的気体の低い濃度で最大であり、標的気体の濃度が増加するにつれて減少する。数学的には、この挙動は一般に対数カーブに、又は標的気体の濃度の平方根の用に変化する曲線に当てはめることができる。

【0015】

MOSセンサーの応答の性質は、サンプルに存在する揮発性の化合物とこの形態のセンサーとの相互作用のタイプ、ならびに他の測定パラメーターに依存する。金属酸化物材料は多結晶で、p-タイプ又はn-タイプ半導体が可能であり、臭気検出の用途には高い温度（300-650℃）で動作する。パージ気体中の酸素がセンサーの表面を通過して金属酸化物の格子欠陥と可逆的に反応していろいろな形態の酸素（ O_2 ， O^- ， O_2^- ）を生ずる。このプロセスは、内部（bulk）から電子を引き出し、ここで用いられる SnO_2 などのn-タイプ物質の場合には、それが電荷担体を減らし、その結果、測定される抵抗が増加する。MOSフィルムを還元的な被分析物に曝露すると、いくつかの分子種が酸素イオンと反応して生成物を生じ、それが他の表面分子種を脱着又は生成することになる。一般に、このようなプロセスは電子をセンサー物質に戻すことになり、n-タイプMOSセンサーの抵抗は減少する。この抵抗変化が測定されてセンサーの応答を生み出す。

【0016】

この検出器アセンブリーに使用することができる別のタイプのセンサー材料は有機半導体ポリマーである。このセンサーでは、ポリピロール又はポリアニリンをベースとするポリマーが2つ以上の電極素子の表面の間で電気化学的に重合化される。このポリマーの抵抗は、隣接する気体サンプルの組成に応答して変化する。このようなセンサーは、「電子の鼻」検出器におけるアレー形態でも広く用いられている。

【0017】

音響波デバイスを用いることも可能である。これは、感知表面を構成する化学物質層の存在によって変化させることができる。

【0018】

表面音響波（SAW）デバイスは、圧電基板上に構成された金属薄膜インターディジタル電極を用いて表面音響波を発生し検出する。表面音響波は、表面で振幅が最大になる波で、そのエネルギーのほとんど全部が表面から15乃至20波長以内に含まれるものである。このような波は、固体物質が自由境界の表面を有する場合に存在できる。振幅が表面で最大なので、このデバイスはきわめて表面感受性である。通常、SAWデバイスは、空洞スタイルのパッケージに気密に封入されて、その性能がSAWデバイスの表面に接触する物質によって変化することがないようにになっている。

【0019】

SAW化学センサーは、この表面感受性を利用してセンサーとして機能する。SAWデバイスが非常に薄いポリマーの膜でコーティングされると、この薄膜がデバイスの周波数及び挿入損失に影響を及ぼす。ポリマー・コーティングが施されたデバイスがポリマー物質の中に吸着される化学的蒸気にさらされると、デバイスの周波数と挿入損失はさらに変化する。デバイスが化学センサーとして機能することを可能にしているのはこの最後にあげた変化である。

【0020】

ポリマー・フィルムは、通常、いろいろな有機化学物質の部類に対して化学的な親和性を有するように選ばれる。別にポリマー・フィルムでコーティングされないSAWデバイスも、コーティングされたデバイスに対する基準として用いられることがある。

【0021】

蒸気濃度が低い場合、アレーの前で化学的な濃縮装置を用いるというオプションを設けることによってシステムの感度を増強することができる。動作時に、この濃縮装置がある長

さの時間にわたってテスト蒸気を吸着し、その後加熱されてずっと短い時間の間にその蒸気を放出してアレーにおけるその蒸気の実効濃度を高める。

【0022】

技術セクション

本発明を実証するために、この検出器を用いて尿路感染に苦しんでいる患者から集められた尿サンプルに存在する疾病の臭いがモニターされる。膀胱炎などの尿路感染症は非常に多く見られるものであり、30才未満の女性では20%もの人がかかっている。女性が特にかかりやすいのは、女性の尿道の長さが短く、外部からのバクテリアの侵入が男性の場合よりも起こりやすいためである。検査しないでいると、感染は腎臓まで拡がって、腎臓の損傷を含むいくつかの合併症を引き起こす可能性がある。尿路感染症（UTIs）は、感染した微生物の揮発性の副産物によって生ずる異常な臭いを患者の尿に付与する。したがって、UTIsは疾病の臭いに関して新しい検出器アセンブリーを評価するための理想的な機会を提供する。

10

【0023】

現在のUTIs診断は尿の培養：選択培地でのバクテリアの増殖を用いており、それによって原因である微生物を同定している。この検査は、最低でも24時間かかるが、忙しい病院の微生物検査室で多数のサンプルを処理する必要があるため、普通は48+時間かかる。この他に、サンプルが最初に採取された後に医師の医院から受け取るまでに経過する時間がある。いったん尿培養によって、感染した微生物が同定されると、その結果が依頼した医師に返され、医師は通常一連の抗生物質を処方する。UTI診断に関するこの検出器アセンブリーの主な臨床的利点は、感染の原因になっている微生物を同定するために必要な時間を、この分析を最初に採取された点（医師のオフィス）で、又は病院の検査室内で行うことによって短縮できる可能性にある。

20

【0024】

技術的な説明

臨床的な尿サンプルの調製

UTIsを病んでいる患者からの尿サンプルが、プレート培養法を用いてバクテリア感染を確認したある地域病院から入手された。2つのタイプの臨床的な尿サンプルが提供された—1つはE. coliに感染したもの、もう1つはProteus mirabilisに感染したものである。第3の尿サンプルは、健康な人から得られたものである。分析では、各サンプルの0.5 - 5 mlの体積からのバクテリア細胞が集められ、ウシ心臓輸液（BHI）肉汁を0.1 M L-メチオニンと1% (w/v) ラクトースで補った液に再懸濁され、2-4時間次のように培養された：5 mlの体積のサンプルを5 mlの注射器に取り、0.2 μ mの酢酸セルロース膜（Sartorius）を備えたMinisartデバイスを通してフィルターがつまるまで濾過した。No. 16ゲージ（0.6 mm）の針をMinisartデバイスの出口に取り付け、膜に集められた細胞を20 mlのガラス・ヘッドスペース・バイアルから取られた無菌媒質によるバックフラッシングによって5 ml BHIに再懸濁させた。Minisartフィルターを取り外し、注射器に針を再び取り付けて再懸濁させたバクテリア（全体積で5 ml）を、バイアルに再注入した。サンプルは、攪拌せずに37°Cで、600 nmでの培養の光学密度（OD）が0.7になるまでインキュベートされた。分析のために乱れがあるサンプルを避けるために、サンプルは重複して用意してODを決定した。対照として、実験室メンバーから一連の感染していないサンプルが取得され、感染したサンプルと同じプロセスで処理された。

30

40

【0025】

検出器アセンブリーを用いた疾病の臭いの検出

インキュベーション期間の終わりに、サンプルがインキュベーターから取りだされ5秒間攪拌される。ヘッドスペース気体の5 cm³サンプルをHamilton気体注射器を用いて各バイアルから取りだし、ただちにゼロ・グレード空気の流れに注入し、その流れはサンプルを50 ml/min a pumpの流量で単一金属酸化物センサーを通して運ぶ（図1は検出器の配置を示す）。金属酸化物センサーは、地域のメーカーから入手し、このデバイスの正常な動作モードである一定の高い温度で動作させた。

50

【0026】

金属酸化物センサーの抵抗は2分間にわたって、毎秒1回モニターされた。最初の測定の前に、センサーの上に空気を50 ml/min の流量で5分間流してセンサーが安定化するようにした。各測定の後で、センサーの上に空気を200 ml/min の流量で10分間流してセンサーをクリーニングした。サンプルは、数日間にわたるシリーズで、ランダムな順序で分析して、センサー・ドリフトの影響をサンプル間の真正な差異から切り離すようにした。

【0027】

データ分析

センサー抵抗を時間の関数としてプロットすると、それは尾を引くピークの形をとる（図2）。このセンサー応答から、以下の特性パラメーターが決定された：

10

【0028】

- ピーク高さ
- 最大正勾配
- 最大負勾配
- ピーク発生時間
- 応答減衰定数
- 対数傾斜

【0029】

次に、これらを $i \times j$ データ・マトリックス $X_{i,j}$ に組み合わせた、ここで、 i は分析されるサンプルの数、 j は問題とするパラメーターの数である。パラメーターの対に関して、一方のパラメーターを他方に対してプロットすることにより、このマトリックスは容易に視覚化される。パラメーターがもっと多い場合、主要成分分析（PCA）を用いてデータを2次元に縮小させることができる。

20

【0030】

規格化と平均センタリングによるデータ前処理を用いて、PCAにおいて見られる判別が最大になるようにした。この方法について以下で説明する。

【0031】

規格化：各サンプルについて、センサーから取得されるパラメーターをスケール変換して各サンプルでの応答の総和が全てのサンプルで一定になるようにする。これは、サンプルによる応答の大きな変動を除去し、計器のドリフト及び感染の強さの変動を克服するのに役立つ。

30

【数1】

$${}^n x_{ij} = \frac{x_{ij}}{\sum_{j=1}^J x_{ij}}$$

40

【0032】

平均センタリング：全てのサンプルにわたる各パラメーターの平均値がそのセンサーに関する全ての測定値から差し引かれる。これは、データから残留特性を全て除去し、例えば、あるセンサー・パラメーターが常に大きな応答を生じて、それが他のセンサーを支配してしまうことがない。

【数2】

$${}^{mc} \mathbf{x}_{ij} = \mathbf{x}_{ij} - \bar{\mathbf{x}}_j$$

【0033】

結果

2-4時間インキュベートされた臨床的サンプルに関しては、2つのパラメーター（ピーク高さと最大正勾配）から、異なるサンプル・タイプをうまく分解するのに十分な情報が得られるということが見出された（図3を見よ）。図3はこの結果を示している。Proteus 又はE. coliに感染した患者から得られた尿サンプルは、プロットで別々のクラスターを形成している。臭気検出器は、疾病の原因バクテリアの各々をUTIになっていない人から得られた尿サンプルとの比較して検出することに成功した。さらに、診断のための全体的時間は、プレーティング方法で通常必要とされる24時間から大きく短縮された。

【0034】

検出器アセンブリーのその他の特徴

技術的説明で示された例は、臨床的な診断に明らかな利益となるものであり、臨床的診断はこの新しい検出器アセンブリーの理想的な応用分野になる。この検出器はまた、「電子の鼻」又は複雑な実験室用検出器と比べたときに他のいくつかの著しい利点を有する。医学的診断での疾病検出に関する有利な特徴としては次のような点があげられる：

【0035】

1. この検出器では単一のセンサーしか必要でないので、「電子の鼻」又はクロマトグラフィー検出器に比べて検出器の全体サイズを著しく小さくすることができる（普通、最大寸法が数cm）。小さな検出器サイズは、in vivoで、又は体内検査のための内視鏡又は気管支鏡の一部としての利用を可能にするであろう。

【0036】

2. 単一センサーによる検出器は、「電子の鼻」検出器やクロマトグラフィー計測器に比べて電力消費量が低くなる。低電力及び小型サイズ寸法は、移動検出器又は移動デバイスの一部として利用できる可能性を示唆する。

【0037】

3. 検出器の定量的性格により、あるサンプルに存在する疾病臭気の濃度を測定することが可能になり、これは患者の治療における薬剤投与規制の適用で有益なものになる。

【0038】

4. 1つのセンサーしか用いないので、必要なコンピュータ・パワーが大きく減少する。
5. 検出器の全体コストは、商業的な「電子の鼻」アレーや実験室クロマトグラフィー装置のコストより何桁も小さい。低コストの、使い捨て可能なデバイスの可能性はホーム検査などの大量市場向けに明らかである。

【0039】

引用文献

【表1】

10

20

30

40

Barr, H., Bessant, C., Saini, S. Sniffing out disease using the artificial nose. *Journal of the Institute of Biology*, 148 (5), 229-233 (2001).

Coloe et al. *Journal of Clinical Pathology* (1978). vol 31, pp 361-364.

10

Gardner, J. W., Bartlett, P. N. (1994). A brief history of electronic noses. *Sensors and Actuators B- Chemical* 18, 211-220.

20

Hayward NJ et al. *Journal of Clinical Microbiology* (1977). vol. 6, Sept. 1977, pp 195-201.

Hobson, N.S.; Tothill., I., Turner, A.P.F. (1996). *Biosensors and Bioelectronics*, vol 11, No. 5, pp 455-477.

30

Phillips, M., Gleeson, K., Hughes, J. M. B., Greenberg, J., Cataneo, R. N., Baker L., -McVay, W. P. (1999). Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. *Lancet* 353, 1930-1933.

40

【0040】

引用された特許

1. 特許番号 W0 97/08337, 公開日付 1997年3月6日
2. 特許番号 US 5807701, 公開日付: 1998-09-15

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】本発明の実施の形態であるセンサー・アセンブリーの概略図である。

【図2】センサー応答カーブの一例である。

【図3】最大正勾配とピーク高さ（規格化され平均を中央にしたもの）からのバクテリア 50

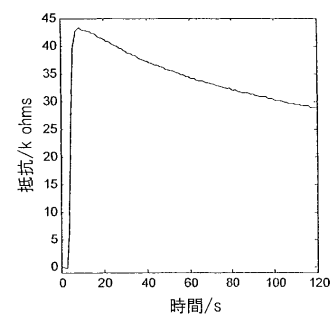
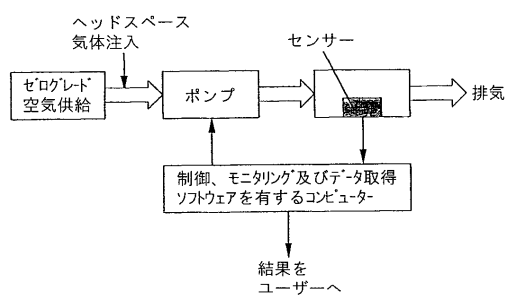
判別を示すグラフ図である。

【図 1】

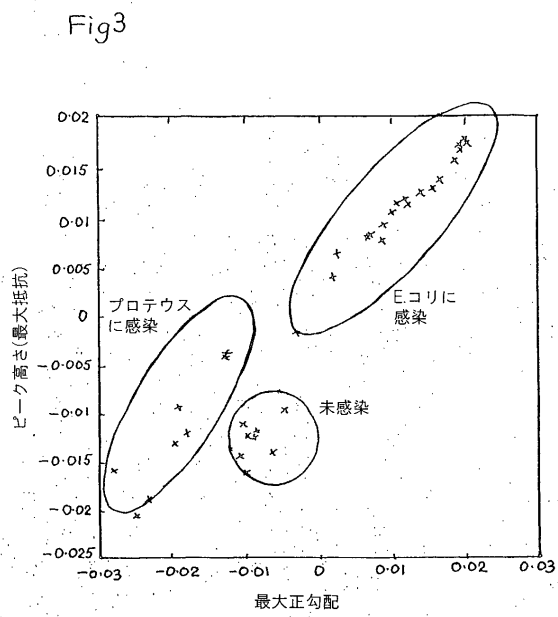
【図 2】

Figure 1

Figure 2



【図 3】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
31 October 2002 (31.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/086149 A2(51) International Patent Classification: C12Q 1/04,
G01N 33/84, 33/00, 33/497, C12M 1/34MK45 2XB (GB). LIEDTKE, Christian [DE/DE];
Kantstrasse 13, 71229 Loonberg (DE). LEIFERKUS, Jan
[RU/GB]; 15B Abberbury Road, Oxford OX4 4ET (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB02/01853

(22) International Filing Date: 19 April 2002 (19.04.2002)

(74) Agents: STUART, Ian et al.; Mewburn Ellis, York House,
23 Kingsway, London, Greater London WC2B 6HP (GB).

(25) Filing Language: English

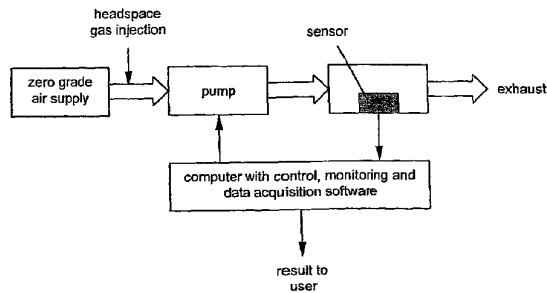
(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0109572.8 19 April 2001 (19.04.2001) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): CRAN-
FIELD UNIVERSITY [GB/GB]; Silsoe, Milton Keynes,
Bedfordshire MK45 4DT (GB).(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: DIAGNOSIS BY SENSING VOLATILE COMPONENTS



(57) Abstract: A state, particularly a disease state, associated with the production of volatiles is detected by passing a sample containing the volatiles to a single sensor. This may be a semiconductor gas sensor element or a surface acoustic wave device. This provides an output signal, e.g. in the form of a tailing peak. A plurality of characteristics of the signal (e.g. peak height and maximum positive gradient) are measured to characterise the sample and hence the underlying state. For example we can discriminate between urine samples which are (a) infected with proteus, (b) infected with E. coli or (c) uninfected.

WO 02/086149 A2

WO 02/086149 A2 **Published:**

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

DIAGNOSIS BY SENSING VOLATILE COMPONENTSTECHNICAL FIELD

This invention describes a method and apparatus for
5 detecting volatile components to deduce the state of a
system involved in their production. The system may
comprise a patient's body, or part thereof. Thus a
detector assembly can be used to detect the odour
emissions from diseases caused by micro-organisms or from
10 metabolic changes brought about through disease.

BACKGROUND ART

The smell associated with bacterial infection and
the putrefaction associated with tissue destruction have
15 long been recognised. It is now clear that many bacterial
species produce specific odours. This is most notable in
the anaerobic bacteria such as bacteroides and clostridia
species. Often a pungent odour can only be detected if
there is an overwhelming infection. Given a mild
20 infection in the urine of a child with *Escherichia coli*
imparts a distinct fishy odour, often detected by the
mother who is familiar with the normal smell.

Certain metabolic diseases may be first detected
from the patient's odour. Prior to the advent of
25 molecular and biochemical medicine, the sweet smell

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

imparted to the breath of an unconscious child was the first clue of an acidotic diabetic coma. A musty odour in an older patient could indicate imminent hepatic failure, or a urinous smell, kidney failure. Halitosis or simple
5 bad breath may have many causes, but is often related to excessive bacterial overgrowth in the stomach (associated with gastric cancer) or in the lungs (with bronchiectasis and secondary infection).

The sense of smell has long been used as a means of
10 disease diagnosis. Indeed, many diseases are known to emit characteristic odours that are used as markers of the diseased state (Barr et al., 2001).

Detection of microbial odours

15 The rapid detection of an infecting organism can be extraordinarily helpful for the correct treatment of patients. The result of bacterial infection is often to produce pus, which is a mixture of bacteria and dead white blood cells. Pus can easily be seen but the causal
20 bacteria have often to await culture techniques to allow detection. Rapid detection allows correct antibiotic treatment to be given. The rapid detection of microbes is not only important in medicinal practice but also in the food and drink industry and in environmental

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

monitoring. A number of "rapid" methods have been described based on different chemical, physical and biological techniques (Hobson et al., 1996).

It is well known that different microbes display
5 different metabolic pathways. These biochemical differences are inherent to the microbe and can be utilised as a means of detecting different microbial species. A common way of doing this is by the use of selective nutrient media that promote the growth of
10 certain microbes by making available nutrients that can be metabolised for growth leading to the formation of visible colonies on a culture plate. Such microbiological plating techniques are widely used for microbial identification purposes. An extension of these ideas is
15 the detection of metabolic volatile products that emanate from specific micro-organisms. A good example of this approach is embodied in research performed as far back as the 1970s where complex laboratory analytical techniques were used to identify specific end-products of metabolism
20 as a means of identifying different microorganisms. Reports by Hayward et al. in 1977 and by Coloe in 1978 describe the detection of metabolic volatile end-products from *E.coli* and *P. mirabilis* using gas-liquid chromatography. In this work, the metabolic activity of

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

bacteria on growth media led to the production of volatile chemicals that appeared in the head space of the growth vessel and were subsequently detected using a gas-liquid chromatography detector. Since different microbes display different metabolic pathways, it became feasible to distinguish between different species by recognising the formation of specific volatile markers using the gas-liquid chromatography detection method. The work of Hayward et al. in 1977 and Coloe in 1978 showed this approach to be highly effective in the identification of *E.coli* and *P. mirabilis*. These authors successfully applied the microbial odour analysis method to the rapid diagnosis of bacteria responsible for urinary tract infections using the chromatography detector.

Further work in the 1980s and 1990s utilised a different detector for microbial volatile products using an array of chemical sensors. These array-based detectors for volatile chemicals employed a number of broad-specificity gas sensors. Such detector assemblies are commonly known as electronic noses. In this respect, WO 97/ 08337 and US5807701 describe methods for the identification of microbes using arrays of sensors that respond to the different gases or vapours that are produced by different microbes grown in nutrient media.

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

Since different microbial species display different metabolic products, a broadly responsive array is thought to provide a good detector in order to capture sufficient information to make subsequent predictions on which species are present more accurate. The sensors in the array interact with the different products causing multiple sensor signals that are subsequently collectively analysed by pattern recognition techniques using software. By using an appropriate pattern recognition technique, it becomes possible to recognise sensor patterns produced by different microbes.

Detectors of odours from metabolic diseases

A number of different techniques have been employed to examine the chemical make-up of odours from bodily fluids such as those imparted to breath and urine. These detection techniques are broadly similar to those already described for the detection of microbial odours, namely, complex instrumentation such as gas chromatographs and mass spectrometers and the electronic nose. Recently, the use of odours for metabolic disease detection was shown: The combination of twenty-two breath volatiles (predominantly alkanes, their derivatives and benzene compounds) could be used to discriminate between patients

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

with and without lung cancer (Phillips et al., 1999)
creating the possibility of a lung cancer 'breathalyser'
for rapid diagnosis and screening (Gardner and Bartlett,
1994).

5

DISCLOSURE OF INVENTION

In one aspect the invention provides a method of
testing for the occurrence of a state associated with the
generation of volatile components comprising:

- 10 a) providing a gaseous sample potentially
containing said volatile components;
- b) exposing a single sensor device to said sample,
said sensor device being capable of generating an output
signal in response to a range of different volatile
15 components;
- c) determining a plurality of parameters of the
output signal, and correlating the plurality of
determined parameters with predetermined parameter
patterns associated with one or more states whose
20 occurrence is to be detected.

There may be a calibration step in which a range of
known samples are tested to establish boundaries in an n-
dimensional space, where n is the number of parameters
used, delimiting the response patterns associated with

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

one or more states. Then in a test using an unknown, if the result falls within the boundary associated with one or said states, this is deemed to indicate the existence of that state in the sample's source.

5 In a second aspect the invention provides apparatus for carrying out such a method, comprising a sensor device, a gaseous sample supply system and a computing device (e.g. a computer or microcontroller), suitably connected together.

10 A preferred embodiment is concerned with a new detector assembly designed to detect disease odours from infecting micro-organisms or metabolic disease odours imparted to bodily fluids. The disease detection capability of the invention is illustrated in the
15 sections below. It is shown how the assembly can be used to detect disease odours from urine samples provided by patients suffering from urinary tract infections. The new detector assembly uses a **single gas sensor** making it significantly different to the electronic nose devices
20 that incorporate multiple array sensors as described in WO 97/ 08337 and US5807701. Furthermore, the detector assembly is different to previously described gas-liquid chromatography and mass spectrometer detectors that have been used. Since only a single sensor element is used for

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

monitoring disease odours, the detector assembly offers a number of important possibilities in the detection of disease odours for medical diagnostics applications.

5 BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

Fig. 1 is a schematic view of a sensor assembly embodying the invention.

Fig. 2 is an example of a sensor response curve.

Fig. 3 is a graphic display showing bacterial
10 discrimination from maximum positive slope and peak height (normalised and mean centred).

MODES FOR CARRYING OUT THE INVENTION

Detector assembly

15 The detector assembly comprises a gas sensor, a means of delivering disease odour samples to the sensor and an electronic interface controlled via a personal computer. The detector is shown schematically in Figure 1. The single gas sensor used in the detector can be of
20 a variety of materials whose properties change in the presence of disease odours. The response generated therein is recorded by the electronic interface connected to a computer or programmable micro-controller circuit. In contrast to electronic nose detectors, the signal

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

obtained from the detector is from one sensor only as opposed to multiple sensors. By simultaneously considering several aspects of the single sensor response, it is possible to determine if the sample
5 contains disease odours.

In one embodiment, a metal oxide semi-conductor (MOS) sensor is used. MOS sensors have been widely employed for several gas detection applications and a variety of sensors are available commercially. MOS
10 sensors are also widely used in array based electronic nose devices. Gas sensors employing semi-conducting oxides generally operate at temperatures above ambient. The electrical resistance of the sensor material depends upon the temperature, and also on the chemical
15 composition of the surrounding atmosphere. It has been known for many years that, when heated, most oxides change their resistance as the oxygen concentration in the atmosphere changes. Most of the semi-conducting materials used in gas sensors share a common dependence
20 of their resistance on the concentration of the target gas in the surrounding atmosphere. For most gases except oxygen, the change in resistance per unit change in gas concentration is greatest at lower concentrations of the target gas, and it decreases as the concentration of the

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

target gas increases. Mathematically, this behaviour can generally be fitted either to a logarithmic curve, or one which varies as the square root of the concentration of the target gas.

- 5 The nature of the response from MOS sensors is dependent on the type of interaction volatile compounds present in the sample undergo with this form of sensor, as well as other measurement parameters. Metal oxide materials are polycrystalline and can be either p-type or
- 10 n-type semiconductors and for odour detection applications are operated at elevated temperatures (300-550 °C). Oxygen in the purge gas passes over the sensor surface and reacts reversibly with lattice vacancies in the metal oxide to produce various oxygen species (O_2 , O^- ,
- 15 O_2^-). This process extracts electrons from the bulk, which in the case of n-type materials such as SnO_2 as used here, reduces the charge carriers and hence increases the measured resistance. Exposure of the MOS film to reducing analytes will allow certain species to react
- 20 with the oxygen ions forming products which may either de-sorb or generate other surface species. In general such processes will release electrons back to the sensor material, which decreases the resistance of an n-type MOS

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

sensor. It is this change in resistance that is measured to generate the sensor response.

A further type of sensor material that can be used in the detector assembly is an organic semi-conducting polymer. In this sensor, a polymer based on poly-pyrrole or poly-aniline is electrochemically polymerised across the surface of two or more electrode elements. The resistance in the polymer changes in response to the composition of the adjacent gas sample. Such sensors have also been widely used in array configurations in electronic nose detectors.

It is also possible to use an acoustic wave device. This may be modified by the presence of a chemical layer that forms the sensing surface.

Surface Acoustic Wave (SAW) devices use thin film interdigital metal electrodes fabricated on piezoelectric substrates both to generate and to detect surface acoustic waves. Surface acoustic waves are waves that have their maximum amplitude at the surface and whose energy is nearly all contained within 15 to 20 wavelengths of the surface. These waves can exist where a solid material has a free bounded surface. Because the amplitude is a maximum at the surface such devices are very surface sensitive. Normally SAW devices are

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

packaged in hermetically sealed cavity style packages to ensure that their performance will not change owing to a substance contacting the surface of the SAW die.

SAW chemical sensors take advantage of this surface
5 sensitivity to function as sensors. If a SAW device is coated with a very thin polymer film it will affect the frequency and insertion loss of the device. If the device with the polymer coating is then subjected to chemical vapours that will adsorb into the polymer
10 material, then the frequency and insertion loss of the device will further change. It is this final change that allows the device to function as a chemical sensor.

The polymer film is normally chosen so that it will have a chemical affinity for a variety of organic
15 chemical classes. An additional SAW device with no polymer film may also be used as a reference for the coated device.

The sensitivity of the system can be enhanced for low vapour concentrations by having the option of using a
20 chemical concentrator before the array. In operation, the concentrator adsorbs the test vapours for a period of time and is then heated to release the vapours over a much shorter time span thereby increasing the effective concentration of the vapour at the array.

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

Technical Section

In order to demonstrate the invention, the detector is used to monitor disease odours present on urine samples collected from patients suffering urinary tract infections. Infections of the urinary tract such as cystitis are very common, affecting as many as 20% of women under the age of 30. Women are particularly susceptible because of the shorter length of the female urethra making the ascent of exogenous bacteria more likely than in males. Left unchecked, an infection can spread to the kidneys, causing a number of complications including kidney damage. Urinary tract infections (UTIs) tend to impart unusual odours to the patient's urine that are caused by volatile by-products of the infecting microbe. UTIs therefore provide an ideal opportunity to evaluate the new detector assembly for disease odours.

Current UTI diagnosis involves urine culture: the growth of bacteria on selective media, which leads to the identification of the responsible organism. This test takes a minimum of 24 hours although 48+ hours is usual owing to the large number of samples that need to be processed in a busy hospital microbiology laboratory. This can be in addition to the time elapsed before the sample is received from a physician's surgery following

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

initial presentation. Once urine culture has identified the offending organism, the results are returned to the referring doctor who will normally prescribe a course of antibiotics. The main clinical advantages of the detector assembly for UTI diagnosis is the potential for reducing the time required in identifying the organism responsible for the infection by performing the analysis at the point of initial presentation (doctors office) or within a hospital laboratory.

10 **Technical description**

Preparation of Clinical Urine Samples

Urine samples from patients suffering from UTIs were obtained from a local hospital that has confirmed the presence of bacterial infection using plating methods.

15 Two types of clinical urine sample were provided - one infected with *E. coli* and the other by *Proteus mirabilis*. A third sample set were urine samples obtained from healthy individuals. For analysis, the bacterial cells from 0.5 - 5 ml volumes of each sample were collected,

20 resuspended in bovine heart infusion (BHI) broth supplemented with 0.1 M L-methionine and 1% (w/v) lactose, and cultured for 2 - 4 hours as follows: a 5 ml volume of sample was taken up in a 5 ml syringe and

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

filtered through a Minisart device containing a 0.2 µm cellulose acetate membrane (Sartorius) until the filter blocked. A No. 16 gauge (0.6 mm) needle was attached to the outlet of the Minisart device and cells collected on the membrane resuspended in 5 ml BHI by backflushing with sterile media taken from a 20 ml glass headspace vial. By removal of the Minisart filter and re-attachment of the needle to the syringe, resuspended bacteria (in a total volume of 5 ml) were injected back into the vial.

10 Samples were incubated at 37 °C without agitation until the optical density (OD) of the culture at 600 nm was 0.7. To avoid disturbing cultures for analysis, duplicate samples were set up for OD determinations. As a control, a selection of uninfected samples were

15 acquired from members of laboratory, and underwent the sample process as the infected samples.

Detection of disease odours using detector assembly

At the end of the incubation period, samples were

20 removed from the incubator, and vortexed for 5 seconds. A 5 cm³ sample of headspace gas was removed from each vial using a Hamilton gas syringe and immediately injected into a stream of zero grade air, which carried the sample

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

across a single metal oxide sensor at a flow rate of 50 ml/min a pump (Figure 1 shows the detector arrangement).

The metal oxide sensor was obtained from a local manufacturer and operated at a constant elevated

5 temperature as is the normal mode of operation with these devices.

The resistance of the metal oxide sensor was monitored once per second over a two minute period.

Prior to the first measurement, the sensor was allowed to
10 stabilise by passing air over it at a rate of 50 ml/min for five minutes. After each measurement, the sensor was cleaned by passing air over for 10 minutes at a rate of at 200 ml/min. Samples were analysed in a randomised order over a series of days, to decouple the effects of
15 any sensor drift from the genuine differences between samples.

Data Analysis

When sensor resistance is plotted as a function of
20 time, it takes the form of a tailing peak (Figure 2). The following characteristic parameters were determined from the sensor response:

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

- Peak height
- Maximum positive gradient
- Maximum negative gradient
- 5 ▪ Time at which peak occurs
- Response decay constant
- Logarithmic slope

These were then combined into an $i \times j$ data matrix $X_{i,j}$,
10 where i is the number of samples analysed and j is the
number of parameters of interest. For pairs of
parameters, this matrix is easily visualised by plotting
one parameter against the other. For more parameters,
principal components analysis (PCA) can be used to reduce
15 the data to two dimensions.

The data pre-processing methods of normalisation and
mean centring were employed to maximise the
discrimination seen in PCA. These methods are described
below.

20 **Normalisation:** For each sample, the parameters acquired
from the sensor are scaled such that the summed response
for each sample is constant for all samples. This
removes any gross changes in response from sample to

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

sample, so can be useful in overcoming instrumental drift and variations in the strength of infection.

$$x_{ij} = \frac{x_{ij}}{\sum_{j=1} x_{ij}}$$

5

Mean centring: The mean average value of each parameter over all samples is subtracted from all the measurements for that sensor. This removes any residual features from the data so, for example, if one sensor parameter always produces a large response, this does not dominate over other sensors.

$$mc x_{ij} = x_{ij} - \bar{x}_j$$

15 Results

Two parameters (peak height and maximum positive gradient) were found to provide enough information to successfully resolve different sample types for clinical samples incubated for 2-4 hours (see Figure 3). Figure 3 shows the results. Urine samples obtained from patients infected with either proteus or E.coli form separate clusters in the plot. The odour detector successfully

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

detected each of the disease causing bacteria compared to urine samples obtained from individuals with no UTI.

Furthermore, the overall time for diagnosis has been markedly reduced from the usual 24 hours required with

5 plating methods.

Other Features of detector assembly

The example shown in the technical description is of clear benefit to clinical diagnostics, which forms an

10 ideal application of the new detector assembly. The detector also offers a number of other significant advantages compared to the electronic nose or complex laboratory detectors. Advantageous features for disease detection in medical diagnostics include:

15

1. Since only a single sensor is required in the detector, the overall size of the detector can be markedly smaller (typically a few cm in the largest dimension) than an electronic nose or chromatography detectors.

20

Small detector size may allow it to be used in-vivo or as part of an endoscope or bronchoscope for internal investigations.

2. A single sensor detector has lower power consumption compared to arrays used in electronic nose detectors

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

- and chromatography instruments. Lower power and smaller size dimensions suggest the use of mobile detectors or as part of mobile devices.
3. The quantitative nature of the detector makes it possible to measure the concentration of disease odours present in a sample which could be useful in the application of drug dosage regimes in patient treatment.
4. Since only one sensor is used, the computer power required is vastly reduced.
5. The overall cost of the detector is orders of magnitude less than the cost of commercial electronic nose arrays and laboratory chromatography equipment. The possibility for low cost, disposable devices is evident for mass markets such as home testing.

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

Cited Literature

Barr, H., Bessant, C., Saini, S. Sniffing out disease using the artificial nose. *Journal of the Institute of Biology*, 148 (5), 229-233 (2001).

5

Coloe et al. *Journal of Clinical Pathology* (1978). vol 31, pp 361-364.

Gardner, J. W., Bartlett, P. N. (1994). A brief history of electronic noses. *Sensors and Actuators B- Chemical* 18, 211-220.

10

Hayward NJ et al. *Journal of Clinical Microbiology* (1977). vol. 6, Sept. 1977, pp 195-201.

15

Hobson, N.S.; Tothill, I., Turner, A.P.F. (1996). Biosensors and Bioelectronics, vol 11, No. 5, pp 455-477.

Phillips, M., Gleeson, K., Hughes, J. M. B., Greenberg, J., Cataneo, R. N., Baker L., -McVay, W. P. (1999). Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. *Lancet* 353, 1930-1933.

20

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

Patents cited

1. Patent Number **WO 97/08337**, Publication Date 6 March 1997.
2. Patent Number **US5807701**, Publication Date: 1998-09-15.

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

CLAIMS

1. A method of testing for the occurrence of a state associated with the generation of volatile components comprising:
 - a) providing a gaseous sample potentially containing said volatile components;
 - b) exposing a single sensor device to said sample, said sensor device being capable of generating an output signal in response to a range of different volatile components;
 - c) determining a plurality of parameters of the output signal, and correlating the plurality of determined parameters with predetermined parameter patterns associated with one or more states whose occurrence is to be detected.
2. A method according to claim 1 wherein the sensor device is an electrical device having a sensor element whose electrical resistance is affected by exposure to volatile components.
3. A method according to claim 1 or 2 wherein said sensor is an electrical device having a semiconductor sensor element.

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

4. A method according to claim 3 wherein said element is a metal oxide semiconductor (MOS) element.

5 5. A method according to claim 3 wherein said element is an organic semiconducting polymer element.

6. A method according to claim 5 wherein said element is based on polypyrrole or polyaniline.

10

7. A method according to claim 1 or 2 wherein said sensor is a surface acoustic wave device that is responsive to volatiles in the sample.

15 8. A method according to claim 7 wherein said acoustic wave device is modified with a chemical layer that forms the sensor element.

9. A method according to any preceding claim
20 wherein the state to be detected is a disease state.

10. A method according to claim 9 wherein the disease state affects at least one of: the urinary tract; the gastrointestinal tract; the respiratory system; soft

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

tissues; skin; auditory and olfactory system; circulatory system; and the central nervous system.

11. A method according to any preceding claim
5 wherein the volatile components are generated by microorganisms, and step (a) includes a first step of obtaining a sample of material potentially containing the microorganisms and culturing it under conditions such that the microorganisms would generate the components.

10

12. A method according to any of claims 1-10
wherein the volatile components are generated by body processes, and step (a) includes a first step of obtaining a sample of material potentially containing the
15 volatiles of interest.

13. A method according to any preceding claim
wherein step (a) includes a pre-concentration step to increase the concentration of the volatiles before
20 presenting to the sensor device.

14. A method according to any preceding claim
wherein exposure of the sensor device to the sample leads to an output signal in the form of a tailing peak, and in
25 step (c) the parameters are selected from (i) peak

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

height, (ii) maximum positive gradient, (iii) maximum negative gradient, (iv) time at which peak occurs after exposure of the sensor to the sample; (v) response decay constant; and (vi) logarithmic slope.

5

15. A method according to claim 14 in which the parameters are (i) and (ii).

16. A method according to any preceding claim in
10 which the magnitudes of one or more of said parameters are used to provide quantitative data about the amounts of volatile components.

17. Apparatus for use in carrying out the method of
15 any preceding claim including said single sensor device, a gaseous sample supply system coupled to the sensor device for providing samples to the sensor device, and a computer or microcontroller coupled to the sensor device for receiving and analysing its output and providing a
20 display and/or an output signal indicative of the result.

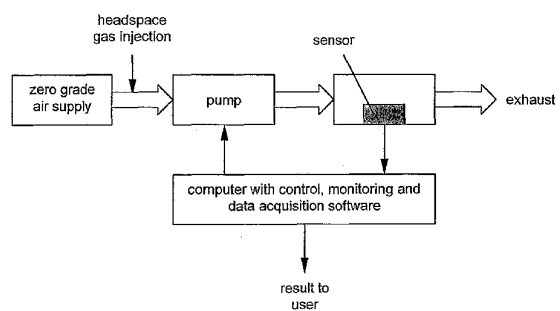
18. Apparatus according to claim 17 wherein the sensor device is part of an endoscope or bronchoscope.

WO 02/086149

PCT/GB02/01853

1/3

Figure 1

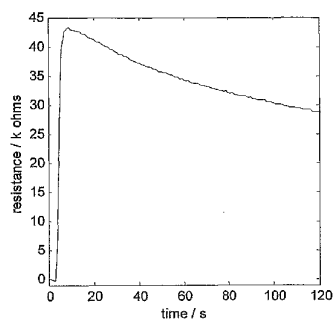


WO 02/086149

PCT/GB02/01853

2/3

Figure 2.

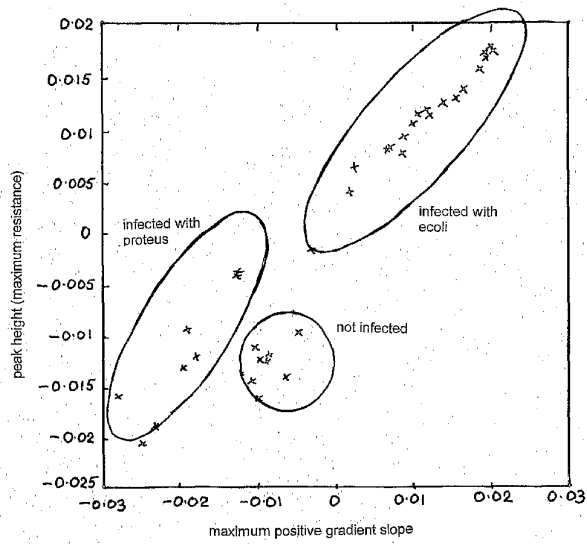


WO 02/086149

3/3

PCT/GB02/01853

Fig3



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
31 October 2002 (31.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/086149 A3

(51) International Patent Classification: C12Q 1/04, G01N 33/84, 33/497, C12M 1/34, G01N 33/50 (74) Agents: STUART, Ian et al.; Mewburn Ellis, York House, 23 Kingsway, London, Greater London WC2B 6LP (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB02/01853

(81) Designated States (national): AI, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 19 April 2002 (19.04.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0109572.8 19 April 2001 (19.04.2001) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): CRANFIELD UNIVERSITY [GB/GB]; Silsoe, Milton Keynes, Bedfordshire MK45 4DT (GB).

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

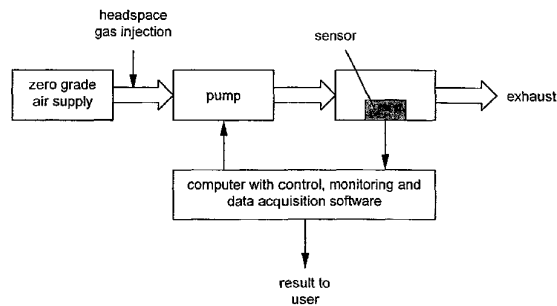
(75) Inventors/Applicants (for US only): SAINI, Selwyan [GB/GB]; 16 Sandhill Close, Millbrook, Bedfordshire MK45 2JD (GB). BESSANT, Conrad [GB/GB]; 49 Aylesbury Road, Ampthill, Milton Keynes, Bedfordshire MK45 2XB (GB). LIEDTKE, Christian [DE/DE]; Kantstrasse 13, 71229 Leonberg (DE). LEIFERKUS, Jan [RU/GB]; 15B Abberbury Road, Oxford OX4 4IT (GB).

Published:

with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

[Continued on next page]

(54) Title: DIAGNOSIS BY SENSING VOLATILE COMPONENTS

(57) Abstract: A state, particularly a disease state, associated with the production of volatiles is detected by passing a sample containing the volatiles to a single sensor. This may be a semiconductor gas sensor element or a surface acoustic wave device. This provides an output signal, e.g. in the form of a tailing peak. A plurality of characteristics of the signal (e.g. peak height and maximum positive gradient) are measured to characterise the sample and hence the underlying state. For example we can discriminate between urine samples which are (a) infected with E. coli, (b) infected with E. coli or (c) uninfected.

WO 02/086149 A3

WO 02/086149 A3 

(88) Date of publication of the international search report: 3 January 2003 *For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 02/01853
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/04 G01N33/84 G01N33/497 C12M1/34 G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 190 858 B1 (PERSAUD KRISHNA CHANDRA ET AL) 20 February 2001 (2001-02-20) abstract	1-18
X	WO 00 47990 A (GENZYME VIROTECH GMBH ;KESSLER PETER (DE); LUFFY DIETER (DE)) 17 August 2000 (2000-08-17) abstract	1-18
X	WO 98 39470 A (PERSAUD KRISHNA CHANDRA ;AROMASCAN PLC (GB); SYMS ALLAN JOHN (GB);) 11 September 1998 (1998-09-11) abstract	1-18
X	WO 00 32091 A (PAVLOU ALEXANDROS K ;TURNER ANTONY PETER FRANCIS (GB); BARR HUGH () 8 June 2000 (2000-06-08) abstract	1-18
-/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document detracting the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 October 2002		Date of mailing of the international search report 14/11/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Paterlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 apo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreno, C

Form PCT/ISA(210) (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/GB 02/01853

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 66304 A (CYRANO SCIENCES INC.; KELSO DAVID M (US); LEWIS NATHAN S (US); MUNO) 23 December 1999 (1999-12-23) abstract ---	1-18
X	US 4 947 861 A (HAMILTON LYLE H) 14 August 1990 (1990-08-14) abstract ---	1-18
A	WO 00 78919 A (UNIV MICHIGAN) 28 December 2000 (2000-12-28) abstract ---	1
A	US 5 801 297 A (MOY LAURENT ET AL) 1 September 1998 (1998-09-01) abstract ---	1
A	GB 2 300 261 A (INSTRUMENTARIUM CORP) 30 October 1996 (1996-10-30) abstract ---	1
A	WO 97 08337 A (SAWNEY ROHINI & HF; UNIPATH LTD (GB)) 6 March 1997 (1997-03-06) cited in the application abstract ---	1
A	US 5 807 701 A (PERSAUD KRISHNA CHANDRA ET AL) 15 September 1998 (1998-09-15) cited in the application abstract -----	1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/GB 02/01853

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 6190858	B1	20-02-2001	AU	5332898 A	31-07-1998
			EP	0958375 A1	24-11-1999
			WO	9829563 A1	09-07-1998
			JP	2001507795 T	12-06-2001
			EP	0972070 A1	19-01-2000
WO 0047990	A	17-08-2000	AU	3153100 A	29-08-2000
			WO	0047990 A2	17-08-2000
WO 9839470	A	11-09-1998	EP	0972070 A1	19-01-2000
			WO	9839470 A1	11-09-1998
			US	2002151814 A1	17-10-2002
WO 0032091	A	08-06-2000	AU	1289300 A	19-06-2000
			GB	2361872 A	07-11-2001
			WO	0032091 A2	08-06-2000
WO 9966304	A	23-12-1999	AU	4694499 A	05-01-2000
			EP	1099102 A1	16-05-2001
			JP	2002518668 T	25-06-2002
			WO	9966304 A1	23-12-1999
			US	6244096 B1	12-06-2001
			US	6319724 B1	20-11-2001
			US	2002017125 A1	14-02-2002
			US	2001041366 A1	15-11-2001
US 4947861	A	14-08-1990	NONE		
WO 0078919	A	28-12-2000	AU	5330200 A	09-01-2001
			WO	0078919 A1	28-12-2000
US 5801297	A	01-09-1998	FR	2710153 A1	24-03-1995
			AT	177203 T	15-03-1999
			DE	69416842 D1	08-04-1999
			DE	69416842 T2	23-09-1999
			DK	719411 T3	04-10-1999
			EP	0719411 A1	03-07-1996
			ES	2131213 T3	16-07-1999
			WO	9508113 A1	23-03-1995
			GR	3030346 T3	30-09-1999
			JP	11500821 T	19-01-1999
			US	5918257 A	29-06-1999
GB 2300261	A	30-10-1996	FI	924716 A	17-04-1994
			GB	2271635 A , B	20-04-1994
			US	5479923 A	02-01-1996
			US	6134462 A	17-10-2000
WO 9708337	A	06-03-1997	AU	6821996 A	19-03-1997
			WO	9708337 A1	06-03-1997
US 5807701	A	15-09-1998	AU	2678095 A	04-01-1996
			EP	0765399 A1	02-04-1997
			WO	9533848 A1	14-12-1995
			JP	10501124 T	03-02-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 5/02	G O 1 N 5/02	A
G O 1 N 33/497	G O 1 N 33/497	D

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 サイニ, セルウェイアン
イギリス国, ベッドフォードシャー エムケー45 2ジェイディー, ミルブルック, サンドヒル
クローズ 16

(72)発明者 ベザント, コンラッド
イギリス国, ベッドフォードシャー エムケー45 2エックスビー, ミルトン ケイネス, アン
プトヒル, アイレスベリー ロード 49

(72)発明者 リートケ, クリスチアン
ドイツ連邦共和国, 71229 レオンベルク, カントシュトラーク 13

(72)発明者 レイファーカス, ジャン
イギリス国, オックスフォード オーエックス4 4イーティー, アバーベリー ロード 15ビ
ー

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA28 CB21 CB30
2G046 AA01 BA09 BG07 DC15 DC18 FA01 FB02
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ05 QQ20 QR41 QR69 QR74 QS10 QS24
QS36 QS39 QX04 QX10
4C038 DD06
4C061 AA01 AA07 AA11 AA12 AA15 BB00 CC00 DD00 HH51

专利名称(译)	通过检测挥发性成分进行诊断		
公开(公告)号	JP2004531718A	公开(公告)日	2004-10-14
申请号	JP2002583662	申请日	2002-04-19
[标]申请(专利权)人(译)	克兰菲尔德大学		
申请(专利权)人(译)	克兰菲尔德大学		
[标]发明人	サイニセルウェイアン ベザントコンラッド リートケクリスチアン レイファークスジャン		
发明人	サイニ,セルウェイアン ベザント,コンラッド リートケ,クリスチアン レイファークス,ジャン		
IPC分类号	G01N33/497 A61B1/00 A61B5/08 A61B5/20 C12Q1/04 G01N5/02 G01N27/12 G01N33/84		
CPC分类号	C12Q1/04 G01N33/84 G01N2333/24 G01N2333/245		
FI分类号	G01N27/12.A A61B1/00.300.D A61B5/08 A61B5/20 C12Q1/04 G01N5/02.A G01N33/497.D		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA28 2G045/CB21 2G045/CB30 2G046/AA01 2G046/BA09 2G046/BG07 2G046/DC15 2G046/DC18 2G046/FA01 2G046/FB02 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ05 4B063/QQ20 4B063/QR41 4B063/QR69 4B063/QR74 4B063/QS10 4B063/QS24 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX04 4B063/QX10 4C038/DD06 4C061/AA01 4C061/AA07 4C061/AA11 4C061/AA12 4C061/AA15 4C061/BB00 4C061/CC00 4C061/DD00 4C061/HH51		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 西山雅也		
优先权	2001009572 2001-04-19 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

通过使含有所述挥发性物质的样品通过单个传感器来检测涉及产生挥发性物质，特别是疾病状况的病症。作为该传感器，可以使用半导体气体传感器或表面声波装置。该传感器提供输出信号，例如以尾峰的形式。测量信号的多个特征（例如峰高和最大正梯度）以表征样本并进一步表征基础条件。例如，我们是（a）感染变形虫，（b）E。感染大肠杆菌的状态，或（c）未感染状态。

