

(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2004-500197

(P2004-500197A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int.Cl.⁷

A61B 1/00
A61B 1/06
G01N 21/64
G02B 23/26

F I

A61B 1/00 300D
A61B 1/06 A
G01N 21/64 Z
G02B 23/26 A

テーマコード (参考)

2G043
2H040
4C061

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 46 頁)

(21) 出願番号 特願2001-558707 (P2001-558707)
(86) (22) 出願日 平成13年2月7日 (2001.2.7)
(85) 翻訳文提出日 平成14年8月7日 (2002.8.7)
(86) 国際出願番号 PCT/US2001/003901
(87) 国際公開番号 W02001/059423
(87) 国際公開日 平成13年8月16日 (2001.8.16)
(31) 優先権主張番号 60/181,012
(32) 優先日 平成12年2月8日 (2000.2.8)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

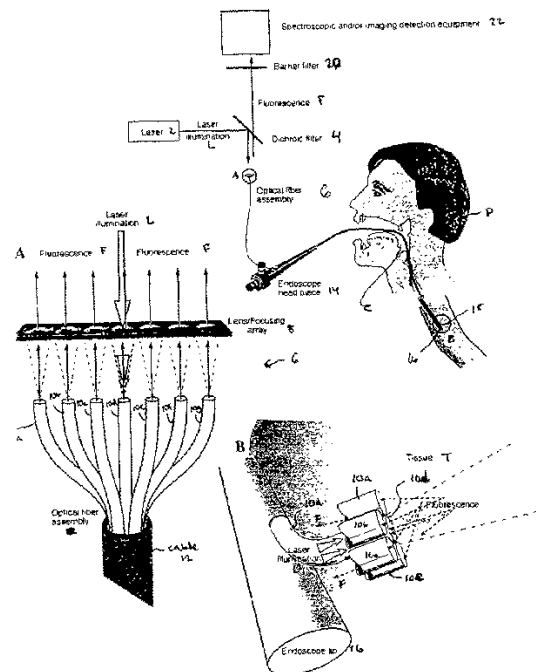
(71) 出願人 500341816
コーネル リサーチ ファンデーション
インコーポレーテッド
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 148
50 イサカ スイート 105 ソーン
ウッドドライブ 20
(74) 代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74) 代理人 100108774
弁理士 橋本 一憲
(72) 発明者 ウェップ ワット ダブリュー.
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 イサカ
パークウェイ ブレイス 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光ファイバーを通じた蛍光分光用の多光子励起

(57) 【要約】

本発明は、植物内もしくは動物内の疾患を検出するため、または植物もしくは動物の特定の組織を画像化するために、光ファイバー(106)を通じて照射を行う方法に関する。さらに、そのように光ファイバー(106)を通じて照射を行うことによって、蛍光を被検者内で検出および位置特定することができる。照射は同時多光子励起を生じさせるのに有効である。光ファイバーは、単独で使用して組織の内部領域を検査し、光学生検針(114)と共に使用して表面下組織を評価し、または、内視鏡(16)と共に使用して体腔内の組織を評価する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

特定の植物または動物の組織の内部で疾患を検出する方法であって、
該特定の植物または動物の組織に同時多光子励起を生じさせ且つ固有の蛍光特性を発生させるのに有効な条件下で、少なくとも 1 本の光ファイバーを通して照射を行うことによって該特定の植物または動物の組織を活性化させる段階；
該活性化の段階に用いられるのと同じ条件下で、該固有の蛍光特性を該特定の植物または動物の健常組織を励起させることによって放出される蛍光と比較する段階；および
該固有の蛍光特性が、該活性化の段階に用いられるのと同じ条件下で該特定の植物または動物の健常組織を励起させることによって放出される該蛍光と異なる場合に、該植物または動物の特定の組織を疾患の可能性があると同定する段階とを含む方法。

【請求項 2】

照射が特定の植物または動物の組織に実質的に隣接して行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

照射が特定の植物または動物の組織の内部で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

活性化の段階の前に特定の植物または動物の組織を少なくとも 1 種類の光活性物質で処理する段階をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

照射がレーザーにより行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

照射がパルスである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

照射がパルス幅約 10^{-9} 秒 ~ 10^{-15} 秒のパルスである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

レーザーがモードロックレーザーである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

少なくとも 1 本の光ファイバーが、植物または動物の組織の表面に接する終端を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

少なくとも 1 本の光ファイバーが、植物または動物の組織内に配置される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

少なくとも 1 本の光ファイバーが、光学生検針で構成されるかまたは光学生検針に連結される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

少なくとも 1 本の光ファイバーが、植物または動物の体腔内に配置される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

少なくとも 1 本の光ファイバーが内視鏡に連結される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

体腔が、結腸、食道、胃、腸、膀胱、子宮、膣、肺、卵巣、および咽喉からなる群より選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

1 本または複数の収集光ファイバーを用いて、植物または動物の組織への照射を収集する段階をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

組織が照射光の第二高調波または第三高調波を生成する能力を有する、請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

植物または動物の特定の組織の内部領域の画像を生成する方法であって、
該植物または動物の該特定の組織の該内部領域に同時多光子励起を生じさせ且つ自己蛍光を発生させるのに有効な条件下で、光ファイバーを通して照射を行うことによって該特定の植物または動物の組織を活性化させる段階；および
該内部領域の画像を生成するために該自己蛍光を収集する段階を含む方法。

【請求項 18】

少なくとも 1 本の光ファイバーが植物または動物の組織の表面に並置される、請求項 17 に記載の方法。

10

【請求項 19】

活性化の段階の前に特定の植物または動物の組織を少なくとも 1 種類の光活性物質で処理する段階をさらに含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

照射がレーザーにより行われる、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

照射がパルスである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 22】

照射がパルス幅約 10^{-12} 秒 ~ 10^{-15} 秒のパルスである、請求項 21 に記載の方法。

20

【請求項 23】

レーザーがモードロックレーザーである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

少なくとも 1 本の光ファイバーが、植物または動物の体腔内に配置される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 25】

少なくとも 1 本の光ファイバーが内視鏡に連結される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 26】

体腔が、結腸、食道、胃、腸、膀胱、子宮、膣、肺、卵巣、および咽喉からなる群より選択される、請求項 17 に記載の方法。

30

【請求項 27】

少なくとも 1 本の光ファイバーが光ファイバーの束である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 28】

組織が照射光の第二高調波および第三高調波を生成する能力を有する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 29】

被検者内で蛍光を検出および位置特定する方法であって、
少なくとも 1 本の光ファイバーを通じて該被検者の内部表面に照射を行う段階であり、該光ファイバーはそれぞれ該内部表面に近接する先端で終結し、且つ、該内部表面内で蛍光体分子の同時多光子吸収を生じさせ、その結果少なくとも 1 本の光ファイバーの先端付近で蛍光励起を生じさせるのに有効な条件下で照射が行われる段階を含む方法。

40

【請求項 30】

少なくとも 1 本の光ファイバーが、被検者の外部から到達可能な体腔を通じて該被検者に挿入される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

少なくとも 1 本の光ファイバーが内視鏡に連結される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

体腔が、結腸、食道、胃、腸、膀胱、子宮、膣、肺、卵巣、および咽喉からなる群より選択される、請求項 30 に記載の方法。

50

【請求項 3 3】

少なくとも 1 本の光ファイバーが、体の貫通可能な表面を通じて被検者に挿入される、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 4】

照射の段階の後に被検者の内部表面を画像化する段階をさらに含む、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 5】

照射の段階の後に被検者の内部表面の疾患を検出する段階をさらに含む、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 6】

照射の段階の前に少なくとも 1 種類の光活性物質で被検者进行处理する段階をさらに含む、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 7】

照射がレーザーにより行われる、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 8】

照射がパルスである、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 9】

照射がパルス幅約 10^{-12} 秒 ~ 10^{-15} 秒のパルスである、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

レーザーがモードロックレーザーである、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

照射の段階の後に、被検者の内部表面の組織学的および臨床的組成、構造、代謝状態、ならびに活力度を検出する段階をさらに含む、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 4 2】

照射の段階の後に、被検者の内部表面の生理的および薬理学的刺激に対する機能的反応と疾患状態とを検出する段階をさらに含む、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 4 3】

照射の段階の後に、被検者の内部表面における組織または薬物の蛍光励起および発光スペクトルと、光度と、蛍光寿命と、時間的変動とを検出する段階をさらに含む、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 4 4】

組織が照射光の第二高調波および第三高調波を生成する能力を有する、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 4 5】

貫通可能な物質の体の中で蛍光を検出および位置特定する方法であって、少なくとも 1 本の光ファイバーを通じて該貫通可能な物質の体の内部領域に照射を行う段階であり、該光ファイバーはそれぞれ該内部領域に近接する先端で終結し、該内部領域内で蛍光体分子の同時多光子吸収を生じさせ、その結果少なくとも 1 本の光ファイバーの先端付近で蛍光励起を生じさせるのに有効な条件下で照射が行われる段階を含む方法。

【請求項 4 6】

少なくとも 1 本の光ファイバーが、貫通可能な物質の体に挿入される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

照射の段階の後に被検者の領域を画像化する段階をさらに含む、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

照射がレーザーにより行われる、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 9】

10

20

30

40

50

照射がパルスである、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 5 0】

照射がパルス幅約 10^{-12} 秒 ~ 10^{-15} 秒のパルスである、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

レーザーがモードロックレーザーである、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

貫通可能な物質の体が照射光の第二高調波および第三高調波を生成する能力を有する、請求項 4 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

本願の特許請求の範囲は、2000年2月8日に出願された米国仮出願第60/181,012号の恩典を主張するものである。

【0002】

発明の分野

本発明は、多光子励起を光学生検針および内視鏡と共に利用することに関する。

【0003】

発明の背景

多くの重要な生物学的機能は、固有の蛍光性を有する生体分子および組織構造によって調整または達成される。したがって、スペクトルおよび組織蛍光発光を測定および位置特定することによって重要な生物学的現象を診断および検査できる可能性がある。ヒトおよび畜産動物などの大型生物の内部過程および内部構造をインビボで観察するためには、体腔または固形組織さえも貫通する内視鏡検査が必要と考えられる。

20

【0004】

通常、体腔の内視鏡ビデオ画像には、内視鏡を通じて照射される後方散乱白色光が使用され、体腔の内部表面のカラー画像は解像度が低くなる。医師は、悪性腫瘍または炎症など、疾患の状態を判断するために形状の変化および局所の顕著な色の変化（主に血液分布の変化に起因する）を利用することが多い。残念ながら、これらの手掛かりは、特に疾患の初期徴候の検出には十分でないことが多い。光散乱および組織蛍光発光の量的測定によって、診断は改善されてきた。

30

【0005】

通常、組織蛍光を励起するのに必要な光は、機械的な生検ワイヤを収容するため内視鏡管に設けられた小さなチューブを通じて挿入される光ファイバーまたはファイバー束を通じて伝達される。小さな光ファイバーまたはファイバー束は、この同じチューブに容易に通すことができる。この方法で通常見られる最も強い組織蛍光の中には、NADH（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）およびコラーゲン構造に起因するものもある。それらの蛍光は、約3~4 eVの光子エネルギーに相当する波長約300~400 nmの紫外線、または、ときとしてこれよりやや波長が長い可視光線を吸収することによって励起される。

【0006】

第1の問題は、この紫外線が蛍光性を持たない血液内のヘモグロビンおよびオキシヘモグロビンに多く吸収され、したがって組織中への照射光の透過がヘモグロビンおよびオキシヘモグロビンの濃度および分布により異なることである。

40

【0007】

第2の問題は、光ファイバーを出て組織に入射する照射光が、光ファイバーの開口数（NA）によって決定される開先角度で扇型に広がることである。光がまず焦点に集束するように小さなレンズによってその広がりを集束することができるが、焦平面より先は、光は扇型に広がる（典型的に、NAは約0.2、開先円錐角は~17°）。吸収によって減衰されるまで、ファイバー端から各距離の球面上ではほぼ同量の蛍光が励起されるため、この角度の広がりは問題となる。図1にこの効果を概略的に示す。蛍光励起も同様の広がり

50

を生じる。散乱は、蛍光励起を減衰させないが、その分布をさらに広くする。その結果、血液の分布および光の散乱による実際的な制限も受けて、観察領域が誤って規定される。照射光をレンズで集束し、ならびに／または、プリズムおよび鏡で側視用に光を屈曲させても、これらの問題は依然として存在する可能性があることは注意を要する。

【 0 0 0 8 】

本発明は、当技術分野におけるこれらの欠陥を克服するものである。

【 0 0 0 9 】

発明の概要

本発明のひとつの局面は、植物または動物の特定の組織内の疾患を検出する方法に関する。この方法には、特定の植物または動物の組織の同時多光子励起を促進し、固有の蛍光特性を放出させる条件下で、少なくとも1本の光ファイバーを通じて照射を行うことによって特定の植物または動物の組織を活性化する段階を含む。この固有の蛍光特性を、活性化の段階を実施する際と同一の条件下で特定の植物または動物の健常組織を励起したときに放出される蛍光と比較する。植物または動物の特定の組織において、固有の蛍光特性が、そのような活性化を実施する際と同一の条件下で特定の植物または動物の健常組織を励起したときに放出される蛍光とは異なる場合、その組織は疾患の可能性のあるものとして同定される。

10

【 0 0 1 0 】

本発明の別の局面は、植物または動物の特定の組織の内部表面の画像を生成する方法を含む。この方法では、植物または動物の特定の組織の内部表面の同時多光子励起および自己蛍光の惹起を促進する条件下で、光ファイバーを通じて照射を行うことによって、特定の植物または動物の組織を活性化する。この自己蛍光は内部表面の画像を生成するために収集される。

20

【 0 0 1 1 】

本発明はまた、少なくとも1本の光ファイバーを通じて被検者の内部領域に照射を行うことによって被検者内の蛍光を検出および位置特定する方法に関する。各ファイバーは内部領域に近接する先端で終結する。照射は、内部領域で蛍光体分子の同時多光子吸収を生じさせ、その結果少なくとも1本の光ファイバーの先端付近で蛍光励起を生じさせるのに有効な条件下で行われる。

【 0 0 1 2 】

本発明の別の態様は、貫通可能な物質の体の内部領域に少なくとも1本の光ファイバーを通じて照射を行うことによって、貫通可能な物質の体の内部で蛍光を検出および位置特定する方法に関する。各ファイバーは内部領域に近接する先端で終結する。照射は、内部領域で蛍光体分子の同時多光子吸収を生じさせ、その結果少なくとも1本の光ファイバーの先端付近で蛍光励起を生じさせるのに有効な条件下で行われる。

30

【 0 0 1 3 】

本発明は、自己蛍光分光法によって疾患を確認するため、組織の自己蛍光を高い空間分解能で励起する多光子吸収を利用する。この目的に最も有用な組織蛍光は、励起のために紫外線エネルギーの吸収を必要とする可能性が高い。多光子励起にはさらに、蛍光分子または蛍光構造による2つまたはそれ以上の光子の同時吸収によって必要な励起エネルギーを提供するという赤外線照射光の利点が提供される。

40

【 0 0 1 4 】

体腔または組織を貫通する光ファイバーを通じた蛍光分光法の内部多光子励起について前述した利点は、蛍光性を有するまたは蛍光性を持たせてもよい他の貫通可能な物質の探索にも有利に適用できる。例として、食料製品、高分子構造または多孔質媒質がある。

【 0 0 1 5 】

多光子励起のひとつの重要な利点は、照射光がヘモグロビンおよびミオグロビンに吸収されないこと、および、事実上他の一般的な組織構成要素にも多くは吸収されないことである。また、組織による赤外線の散乱も紫外線波長の散乱より有意に少ない。しかし、内視鏡蛍光分光法における多光子励起の最も重要な利点は、蛍光が強く励起される有効な集光

50

量を良好に規定し高度に局在化できることである(図2)。この理由は、蛍光の2光子励起の割合が照度の2乗に比例していることにある。より高次の多光子プロセスについては、照度の指数法則が大きくなり、例えば3光子励起では3乗となる。多光子レーザー走査顕微鏡では、この高次指数法則の特徴によって、共焦点空間フィルタリングで除外する必要のある焦点外の蛍光を生成することなしに3次元の分解が可能となる。

【0016】

これと同様の照射条件は、特定の適した組織における第二高調波および第三高調波の生成にも適している。第二高調波および第三高調波は、レーザー照射光波長の正確に2分の1および3分の1の波長でそれぞれ生成され、固有の蛍光性と共に利用して組織の特徴付けに役立てることができる。

10

【0017】

類似の利点のひとつは、内視鏡組織蛍光に適用する場合のように、光ファイバーを通じて伝送されるレーザー光によって励起される蛍光多光子に関するものである。照度は、ファイバーの端または任意の集光レンズの焦平面からの各半径において、ほぼ同量の力を有する1光子の励起と同様に扇形に展開するが、励起蛍光はこの照射光の扇形展開に従わない。単一モードの光ファイバーを通じた2光子励起の場合、蛍光の分布は、ファイバーの先端を起点とするろうそくの炎に似た形状で、ファイバーの先端近くに局在化する。この有効な集光量は、2光子励起の照度の2乗の空間分布によって規定される。照度の2乗は、ファイバー端からの距離の4乗にほぼ反比例して急激に減少するため、蛍光励起は局在化する。図3に示すように、有意な蛍光は、励起強度の2乗が大きいこの制限された領域からのみ放出される。有効な集光量を光ファイバーの端より先方へずらすため、および/または多光子励起の利点を失うことなく側視を得るため、レンズ、プリズムなどを使用してよい。

20

【0018】

この効果によって、蛍光励起の集光量が良好に規定され、且つ、重要な解剖学的構造を分析するのに十分な鮮明さを持つ有用な空間分解能が得られる。例えば、結腸内では、約5つの異なる層が識別できると考えられる。内皮表面では、陰窩のアレイがその領域を覆い、このアレイは陰窩底部を閉じる細胞層で終結し、その後、平滑筋および結合組織を含む複数の層が合計約0.5 mmにわたって続く。これらの層は層ごとに異なる固有の組織蛍光を励起する多光子レーザー走査顕微鏡によって容易に分析される。したがって、そのような層および表面付近の疾患による層の摂動は、組織蛍光の内視鏡分光法によって、多光子励起で得られる十分な空間分解能で無傷の組織内で識別することができる。

30

【0019】

本発明の多光子励起によって精密な空間識別能が得られ、且つ、三次元で規定される小領域の蛍光の定量化が可能となる。これは特に、厚い細胞層を検査する際に重要となる。この場合、ファイバーは深い層の蛍光を励起する多光子を観察および確認するために組織を貫通させてもよく、これによりインサイチューの光学生検が可能となる。さらに、多光子励起では背景蛍光および散乱アーチファクトが大幅に低下する。

【0020】

発明の詳細な説明

40

本発明のひとつの局面は、植物または動物の特定の組織内の疾患を検出する方法に関する。この方法には、植物または動物の特定の組織の同時多光子励起を促進し、固有の蛍光特性を放出させる条件下で、少なくとも1本の光ファイバーを通じて照射を行うことによって植物または動物の特定の組織を活性化する段階を含む。この固有の蛍光特性を、活性化の段階を実施する際と同一の条件下で特定の植物または動物の健常組織を励起したときに放出される蛍光と比較する。植物または動物の特定の組織において、固有の蛍光特性が、そのような活性化を実施する際と同一の条件下で特定の植物または動物の健常組織を励起したときに放出される蛍光とは異なる場合、その組織は疾患の可能性のあるものとして同定される。

【0021】

50

本発明の別の局面は、植物または動物の特定の組織の内部表面の画像を生成する方法を含む。この方法では、植物または動物の特定の組織の内部表面の同時多光子励起および自己蛍光の惹起を促進する条件下で、光ファイバーを通じて照射を行うことによって、特定の植物または動物の組織を活性化する。この自己蛍光は、1セットの隣接領域を記録することによって収集され、内部表面下の組織の画像が生成される。

【0022】

本発明はまた、少なくとも1本の光ファイバーを通じて被検者の内部領域に照射を行うことによって被検者内の蛍光を検出および位置特定する方法に関する。各ファイバーは内部領域に近接する先端で終結する。照射は、内部領域で蛍光体分子の同時多光子吸収を生じさせ、その結果少なくとも1本の光ファイバーの先端付近で蛍光励起を生じさせるのに有効な条件下で行われる。 10

【0023】

本発明の別の態様は、貫通可能な物質の体の内部領域に少なくとも1本の光ファイバーを通じて照射を行うことによって、貫通可能な物質の体の内部で蛍光を検出および位置特定する方法に関する。各ファイバーは内部領域に近接する先端で終結する。照射は、内部領域で蛍光体分子の同時多光子吸収を生じさせ、その結果少なくとも1本の光ファイバーの先端付近で蛍光励起を生じさせるのに有効な条件下で行われる。

【0024】

本発明のひとつの形態は、生体体腔内の組織表面における多光子内視鏡自己蛍光分光法を利用するものである。内視鏡による低分解能での体腔内部表面の観察および画像化は、すでに標準的な医療手技として十分に確立されている。光ファイバーを通じた多光子内視鏡自己蛍光分光法によって、表面自己蛍光と組織下層の自己蛍光とを分離することができる。将来的な改善の可能性は数多くある。体腔の内視鏡観察では、対象とする組織領域の蛍光を検出するために制御器具を使用して進行方向を定め、観察部位を特定し、光ファイバーの焦点を合わせることは既に可能である。内視鏡観察に多光子蛍光励起の利点を生かすために類似の技術が適用できる。多光子固有蛍光の画像を得るために、ファイバーの走査、または、個々のファイバーもしくは束にしたクラスターの連続照射が使用できると予想される。本発明のこの局面は、結腸、食道、胃、腸、膀胱、子宮、膣、肺、卵巣、および咽喉などの体内の管で組織の蛍光を画像化するのに使用してもよい。その結果、紫外線励起エネルギーで励起された蛍光の差異を認識することによって悪性疾患が検出される。 20 30

【0025】

図4に、本発明に係る内視鏡の構成を示す。本発明のこの態様では、レーザー2がレーザー照射光Lを生成し、ダイクロイックフィルタ4によって光ファイバーアセンブリ6に送られる。図4Aに光ファイバーアセンブリ6をさらに詳しく示す。この図において、レーザー照射光Lはレンズ/集束アレイ8を通過し、光ファイバー10dに入る。光ファイバー10a~10gはケーブル12に収められ、ケーブル12は内視鏡ヘッドピース14に接続される。内視鏡の遠位端は、患者Pの口腔に導入され、この場合は食道である腔Cに通される。内視鏡の遠位端は内視鏡端16および励起/収集ユニット18で終結している。図4Bに、励起/収集ユニット18の詳細を示し、レーザー照射光Lは光ファイバー10dを通過して組織Tに照射される。その結果、組織Tは光ファイバー10dの先端部で蛍光を発し(図2参照)、このような蛍光Fは光ファイバー10a~10gによって収集される。収集された蛍光Fは、内視鏡ヘッドピース14、光ファイバーアセンブリ6(レンズ/集束アレイ8を含む)、ダイクロイックフィルタ4、バリアフィルタ20を順に通過し、分光器および/または画像検出装置22に入る。 40

【0026】

本発明の別の形態は、光学生検針または少なくとも1本の従来の光ファイバーで組織自体を貫通することに基づく。この用途では、光ファイバーの末端部で組織の自己蛍光をサンプリングするために、光ファイバーまたは光学生検針を組織自体に挿入する。ファイバーは、必要に応じて組織に挿入できる皮下注射器のように機能してもよい。もしくは、光ファイバーの遠位端は、画像化する植物または動物の組織の表面に接触するよう構成しても 50

よい。多光子励起においては、蛍光が励起されるファイバー先端部の量は原理的に良好に規定される。これは初めのファイバーを取り巻くファイバー束により実現できる。もしくは、より大きな量を照射するファイバーの束を使用してもよい。乳癌または肝癌など、高密度組織の癌の生検では、ファイバーの挿入経路に沿って蛍光を探索できる。一般的に、時間がかかる組織の固定および染色手順が必要とされる従来の生検とは対照的に、多光子励起蛍光分光法を使用した光学生検では、プローブを患者の体内に挿入し移動させる際に、即座に診断スペクトルデータが得られる。

【0027】

図5に、本発明に係る光学生検針の構成を示す。本発明のこの態様では、レーザー102がレーザー照射光Lを生成し、ダイクロイックフィルタ104によって光ファイバーアセンブリ106に送られる。図5Aに光ファイバーアセンブリ106をさらに詳しく示す。この図において、レーザー照射光Lはレンズ/集束アレイ108を通過し、光ファイバー110dに入る。光ファイバー110a~10gはケーブル112に収められ、ケーブル112は光学生検針のヘッドピース114に接続される。光学生検針(すなわち針116)の遠位端は、患者Pの皮膚を通して骨盤Eまで進められる。図5Bにより詳しく示すように、針116の内部ではレーザー照射光Lは光ファイバー10dを通過して組織Tに照射される。その結果、組織Tは光ファイバー10dの先端部で蛍光を発し(図2参照)、このような蛍光Fは光ファイバー110a~110gによって収集される。収集された蛍光Fは、光学生検針ヘッドピース114、光ファイバーアセンブリ106(レンズ/集束アレイ108を含む)、ダイクロイックフィルタ104、バリアフィルタ120を順に通
10
20

【0028】

本発明のこれらの形態は、ファイバーを体腔の内部表面に到達させるための経路を提供するため患者の体腔内に内視鏡を挿入するという組み合わせで使用してもよく、この場合、ファイバーは組織内に挿入されてその連続層をサンプリングしてもよい。例えば、結腸壁で腫瘍の発生を探索する場合、その組織には約5つの層があり、それぞれが特有の光学的性質および自己蛍光を有する。各層を連続して光学的に探索することによって、各層を識別でき、且つ確認できる。

【0029】

多光子励起蛍光ならびに組織内で生じたレーザー励起の第二高調波および第三高調波の検出を、励起を生じさせる光ファイバーと、単一モード励起ファイバーの先端付近で励起した光を効率的に収集するための周囲を囲むファイバー束または太い光学チューブとを通じて、内視鏡観察および光学生検によって達成してもよい。多光子内視鏡組織蛍光では、発光は光収集光学部品に最も到達しやすいファイバー先端の付近に限局されるため、単一光子励起と比較して蛍光収集効率の面で大きな利点がある。この利点は光学生検でも同様である。本発明は、複数の光収集ファイバーで取り囲まれた単一励起ファイバーを含む複数の光ファイバーを用いて実施されることが望ましい。
30

【0030】

本発明に係る効率的な多光子分子励起は、(a)非常に強く、局所的、且つ瞬間的な強度、および(b)パルスされたレーザーの一時的な集中を組み合わせることによって可能となる。回折限界に集光できる高い強度の、長波長の単色光光源としては、各パルスの持続時間が約100フェムト秒(100×10^{-15})で反復速度約80 MHzのチタンサファイア・モードロック固体レーザーなどがある。多光子励起および高調波生成に有効な他のレーザーを使用してもよい。これらの高速のパルスは、内視鏡または光学生検針を通じて生きた植物もしくは動物の標的組織、または組織標本に照射される。回折限界に集光される、持続時間が非常に短い強いパルスによって大きな瞬間的な力が供給されるため、標的に含まれ、通常は波長の短い高エネルギーの単一光子(典型的には紫外線)によって励起されうる蛍光体(蛍光色素)が、レーザー源から出た波長の長い光子を2つ同時に吸収する可能性が十分高くなる。この吸収によって蛍光体分子内で2つの光子のエネルギーが結合され、蛍光体が励起状態まで高められる。蛍光体が通常の状態に戻るときに光が
40
50

放出され、この光が内視鏡または光学生検針を通じて適切な検出器まで戻る。

【0031】

非常に強力な短パルスの光による蛍光体の多光子励起により、一般的な蛍光顕微鏡技術で、背景識別力がより良好で蛍光体の光退色がより少ない画像化が可能となる。これは、顕微鏡内で供給される集束照射光が、標本を通過する際に集束円錐を形成するためである。集束円錐の頂点で焦平面に到達するすべての光は、蛍光体で吸収されるごく一部を除いて、発散円錐を通過して標本の反対側へと抜ける。照度は、集束円錐と発散円錐とで形成されるくびれ部分 (waist) にある対物面上の焦点部位でのみ標本蛍光体の多光子吸収を生じさせるのに十分な強さとなり、この照度依存性により、焦点周囲の小さな局所領域内でのみ長波長の励起を生じさせることが可能となる。この吸収は、高速、強力であり、標本内の焦点以外の部位で長波長光の適度な平均照度を維持する比較的波長の長いフェムト秒パルスの流れという手段によって実現される。その結果、焦平面以外の部位の蛍光体の光退色は事実上生じない。長波長光の1光子吸収は無視できる程度であり、また、実際には時間平均照度は標本の全深度にわたってほぼ均一であるものの、瞬間照度は焦平面以外の部位では低すぎるため、感知可能な2光子吸収および励起を生じさせない。この効果により、生細胞への傷害も大幅に低下する。

10

【0032】

本発明では、3次元分解能を得るため、励起光の波長の2分の1と重複するかまたはこれを上回る波長に1光子吸収のピークをもつ蛍光体の2光子励起を利用してもよい。3光子励起の場合は、1光子吸収の波長が励起光の波長の3分の1と重複するようにする。これを実現するには、例えば赤外線領域の可視赤色など比較的波長が長く、高い瞬間出力をもつ非常に短いパルスのレーザー光を生成させる。この光を、通常は短波長領域 (例：紫外線照射) の1光子で励起される蛍光体を含んだ標本に照射し、2つの低エネルギー (赤色) の光子がそのエネルギーを結合させなければ1つの高エネルギー (紫外線) の光子の場合と同じ励起が生じないようにする。標本中の励起率も、したがって蛍光率も、入射光強度の2乗に比例する。集光した励起レーザー光において、長波長の入射光は標本内の焦点領域でのみ蛍光体を励起するのに十分な強度となる。この焦点は、焦点周囲の選択した長円形量でのみ標本の蛍光および/または光分解が生じるよう、標本内で位置を調整してもよい。したがって、本発明においては、長波長の励起光のみが標本を通過する必要がある、この長波長の光は、非常に小さな領域内でのみ蛍光を励起するのに十分な強度をもつよう集光される。この蛍光は、通常は紫外線でしか吸収しない蛍光体でも発生する。焦点は標本内で選択的に位置決めすることができるため、走査蛍光顕微鏡観察、光分解のいずれにおいても3次元分解能が得られる。光分解には、光分解で放出されてもよい、光子により活性化される試薬の光分解も含まれる。

20

30

【0033】

本発明において、必要な励起強度は、例えば、赤色領域のスペクトル (例えば約700 ~ 1000 nm) の波長を有するか、もしくはパルス幅 $10^{-9} \sim 10^{-15}$ 秒で便宜的には反復速度が約80 MHzであるパルス光を生成する、チタンサファイアモードロックレーザーであってもよい照射光源から供給される。他の高輝度パルスレーザーを使用して、例えば赤外または可視赤色領域の比較的長い異なる波長の光を生成し、これにより、総エネルギーが適切な吸収エネルギーバンドとなるよう必要な励起光子を生じさせてもよい。適切な吸収エネルギーバンドとは、通常はスペクトル領域がこの入射光の波長の約半分の波長を有する単一光子の吸収により励起されるスペクトルの蛍光体が必要とするエネルギーである。より短波長の励起が必要な場合は、外部の高調波発生によりレーザー波長を2、3、または4つに分割してもよい。したがって、例えば、750 nmの可視赤色領域の2つの光子により、通常は375 nmまたはそれ以上の紫外領域の光を吸収する蛍光体が励起され、例えば、1070 nmの赤外領域の2つの光子により、535 nmまたはそれ以上の可視光領域の光を吸収する蛍光体が励起される。

40

【0034】

本発明のひとつの変更された形式においては、入射光が強い瞬間パワーと異なる波長とを

50

有する2つの重ね合わせパルス光となるよう、単一波長の光源を2つの異なる波長のレーザー光源で置き換えてもよい。入射光の各波長は、短波長で吸収性を示す蛍光体を励起するよう選択され、これは以下の式で表される：

$$1 / \lambda_{abs} = 1 / \lambda_1 + 1 / \lambda_2$$

式中、 λ_{abs} は吸収体の短い波長、 λ_1 および λ_2 はレーザー入射光の各波長である。

【0035】

2光子励起において、2光子断面積が典型的な次式

$$= 10^{-58} \text{ m}^4 \text{ s} / \text{光子}$$

で与えられ、パルスパラメータが前述のとおり（反復速度 80 MHz の 100 fs ec パルス）であり、且つ開口数 $A = 1.4$ のレンズで光が集光される場合、平均パワー（ P_0 ）約 50 mW の入射レーザー光により、1 蛍光体 1 パルスにつき 1 吸収光子が限界である蛍光体の蛍光出力が飽和する。1 パルス 1 蛍光体につき吸収される光子数 n_a は以下の関係に従う：

$$n_a \approx \frac{P_0^2 \delta}{\tau f^2} \left[\frac{A^2}{2hc\lambda} \right]^2$$

式中、

δ はパルス持続時間、

f は反復速度、

P_0 は入射レーザーの平均パワー、

τ は光子吸収断面積、

h はプランク定数、

c は光速、

A は集光レンズの開口数

である。ただし、蛍光放出はパルス反復周波数を蛍光寿命の逆数まで増加することによって増強できる。これは典型的に次式で表される：

$$f^{-1} = 10^9 \text{ s}^{-1}$$

比較として、1光子の蛍光飽和は約 3 mW の入射光パワーで生じる。

【0036】

多光子励起で固有組織蛍光を測定することに加えて、薬物の蛍光を利用して組織中の局在を検出することが可能である。こうした薬物はしばしば特定の組織構造または腫瘍などの疾患生成物の中に分離して存在する。これら薬物の同定に多光子励起を用いることができる。多くの重要な薬物は紫外光を吸収して蛍光性となる性質があり、したがって多光子励起により効率的に励起される。したがって、蛍光性薬物の選択的分離または結合により提供される標識付けの特徴とともに、固有組織蛍光の多光子励起の利点がすべて得られる。例えば、結腸炎治療に使用される主要な薬物である 5 - アミノサリチル酸は、生きた結腸組織の外植片において同薬物が代謝される際に結腸組織の全層内で画像化できる。コラーゲン、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）、および他の構造による組織自己蛍光を画像化することにより、複雑な組織構造に対して位置特定することができる。このような薬物の多光子励起により、多光子内視鏡および/または多光子光学生検による組織内のインビボ観察も可能となる。

【0037】

蛍光色素を含む光活性物質は、細胞および組織の特性を画像化するため多光子顕微鏡観察で一般的に用いられる。適切な光活性物質としては、例えば Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、または H^{+} などの金属イオンに結合したときに蛍光特性が変化する有機分子など、多光子励起で励起される色素が含まれる。DAPI（4', 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール、ジヒドロクロライド）など、DNA 二重鎖に結合する色素は特に有用である。多くのこのような色素がインビボの適用において適している。

【0038】

10

20

30

40

50

ヒトを含む生きた動物内で多光子吸収内視鏡分光観察により蛍光の分布を探索し、結腸炎などの炎症性疾患の識別およびその治療経過の観察を行うことができる。同様に、アミノレプリン酸の代謝産物であり、癌細胞に蓄積する蛍光性のプロトポルフィリンIXの分布も癌の検出に有用であると考えられる。NADH蛍光は、多光子吸収内視鏡分光観察で検出できる、最も将来性のある癌シグナルである可能性があるが、隣接組織中で同様に蛍光性を有するコラーゲンと識別するには多光子吸収により空間的に位置特定する必要がある。特定の組織および組織構成物、特に、組織の重要な構造構成物であり多くの形体で存在するコラーゲンは、明るい干渉性の照射光の第二高調波を非常に高効率で生成することが以前から知られている。第二高調波の照射光は波長が基本照射光のちょうど半分であり、したがって基本照射光の2倍の光子エネルギーを有する。同様に、第三高調波の照射光は波長が基本照射光のちょうど3分の1であり、したがって光子エネルギーは3倍である。実際に、第二高調波光の生成は細胞の顕微鏡的な画像化に有用な現象であることが示されている。複雑な組織内で第二高調波および第三高調波を生じさせるのに必要な照射条件は多光子蛍光励起の必要条件と同様であるため、コラーゲンなどの組織において、第二高調波または第三高調波の生成を利用して固有組織蛍光の多光子励起を補うことができる。複雑な組織内では、第二高調波または第三高調波は広い角度から高頻度に照射されるため、多光子励起蛍光とともに検出することができる。本発明は種々の目的に利用可能である。例えば、被検者の当該領域における組織学的および臨床的な組成、構造、代謝状態、ならびに活力度を決定することができる。もしくは、被検者の当該領域における、生理的および薬理的な刺激に対する機能的反応、ならびに疾患状態を検出することができる。最後に、被検者の当該領域における、組織蛍光および薬物蛍光の励起スペクトルおよび発光スペクトル、光度、蛍光寿命、ならびに時間的変動を決定することができる。

10

20

【0039】

本明細書において、好ましい態様を詳細に記述および説明してきたが、当業者には、本発明の精神から逸脱することなく種々の改変、追加、置換などが可能であり、これらは特許請求の範囲で規定される本発明の範囲内に入るとみなされることが理解されるものと思われる。

【図面の簡単な説明】

【図1】先行技術に基づいた、単一モードの光ファイバーから放出される紫外光の空間的分布、およびそれに対応する自己蛍光を示す斜視図である。ここで、照射の強度の減衰は光ファイバー先端からの距離の2乗に反比例する。

30

【図2】本発明に基づいた、単一モードの光ファイバーから放出される2光子励起蛍光の紫外光の空間的分布を示す斜視図である。ここで、照射光のパターンは1光子励起と同様である。しかし、2光子励起の割合がパルスされた照度の2乗に比例するため、蛍光強度はファイバー先端からの距離の4乗にほぼ反比例して減衰し、蛍光の励起が高度に局在化された有効な集光量が得られる。より高次の蛍光励起については、直径の大きな光ファイバーを使用する場合は有効な集光量の鮮明さが低下し得るものの、放出の指数法則はさらに強くなり、例えば、3光子励起の場合は6乗に反比例する。

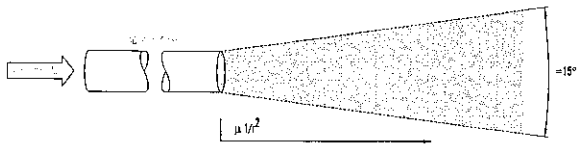
【図3】ファイバー出力の2光子励起プロファイルをガウス強度プロファイル(Gaussian Intensity Profile)で示したものである。この図は、光ファイバーの出口を起点として、光ファイバーの軸に沿った平面について、均一な蛍光体による2光子励起の蛍光放出の空間分布を示したものである。正規化された最大値は、軸に沿って約10~15マイクロメートルで半分に減少し、また、典型的な単一モードのファイバー出口の半分の最大値半幅は約2μmを有する。

40

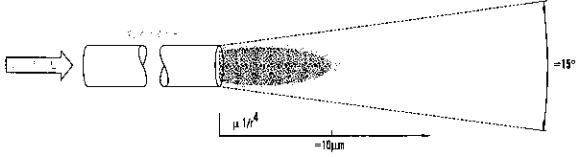
【図4】本発明に係る内視鏡の構成を示す。

【図5】本発明に係る光学生検針の構成を示す。

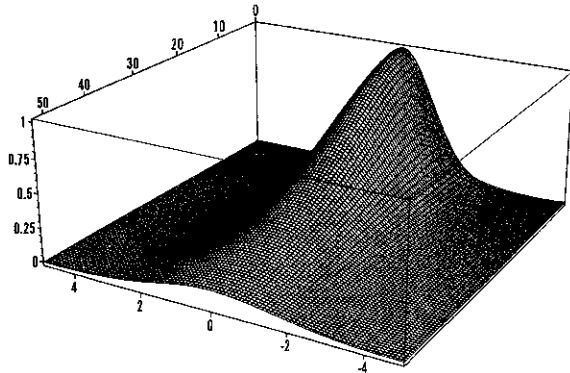
【図 1】



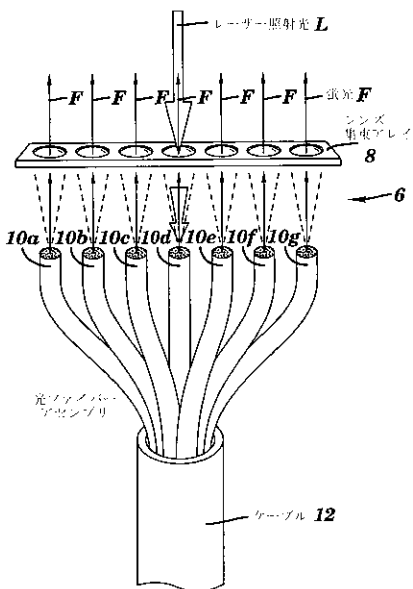
【図 2】



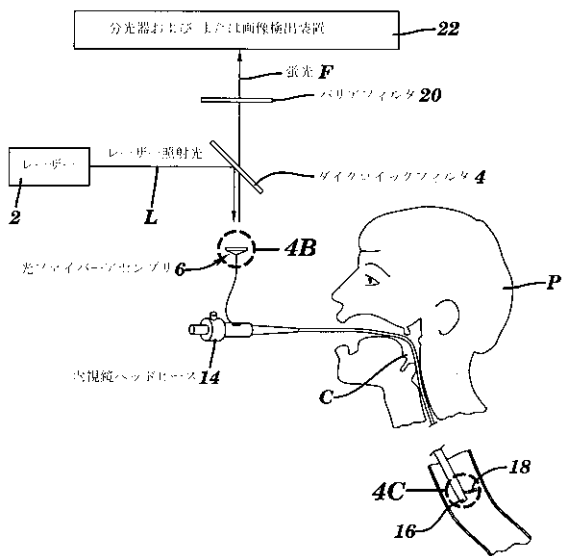
【図 3】



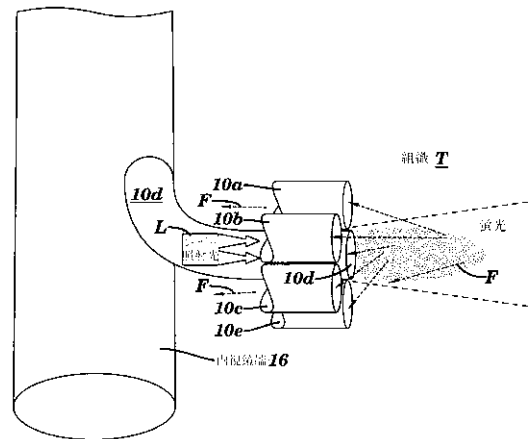
【図 4 B】



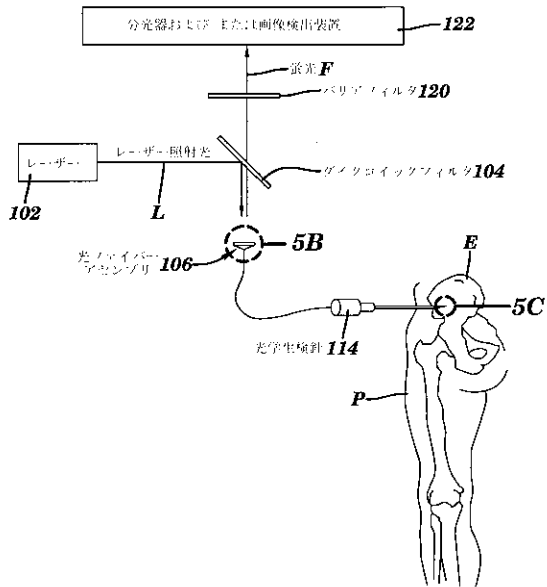
【図 4 A】



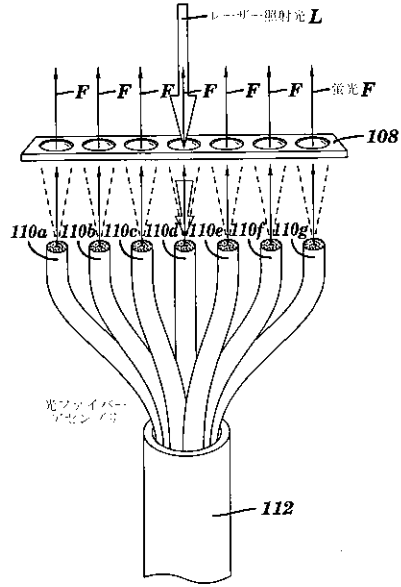
【図 4 C】



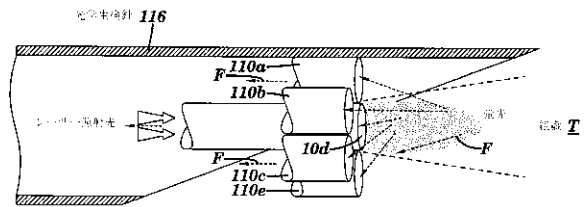
【図 5 A】



【図 5 B】



【図 5 C】



【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
16 August 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/59423 A2

- (51) International Patent Classification: **G01N** (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GD, GE, GR, GU, HK, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KH, KR, KZ, LC, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US91/03901 (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GM, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GR, GB, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) International Filing Date: 7 February 2001 (07.02.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 69/181,612 8 February 2000 (08.02.2000) U.S.
- (71) Applicant: CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC. (U.S.A.); 29 Thornwood Drive, Suite 105, Ithaca, NY 14850 (U.S.).
- (72) Inventor: WEBB, Watt, W.; 9 Parkway Place, Ithaca, NY 14850 (U.S.).
- (74) Agents: GOLDMAN, Michael, L. et al.; Nixon Peabody LLP, Clinton Square, P.O. Box 31051, Rochester, NY 14603-1051 (U.S.).
- 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 01/59423 A2

(54) Title: MULTIPHOTON EXCITATION THROUGH OPTICAL FIBERS FOR FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

(57) Abstract: The present invention is directed to a method of applying radiation through an optical fiber for detecting disease within a plant or animal or imaging a particular tissue of a plant or animal. In addition, fluorescence can be detected and localized within a subject by such application of radiation through an optical fiber. The radiation is effective to promote simultaneous multiphoton excitation. The optical fibers are used alone to examine internal regions of tissue, in conjunction with an optical biopsy needle to evaluate sub-surface tissue, or with an endoscope to evaluate tissue within body cavities.

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- I -

**MULTIPHOTON EXCITATION THROUGH OPTICAL FIBERS FOR
FLUORESCENCE SPECTROSCOPY**

This application claims benefit of U.S. Provisional Patent Application
5 Serial No. 60/181,012, filed on February 8, 2000.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the use of multiphoton excitation in
10 conjunction with optical biopsy needles and endoscopes.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Many crucial biological functions are mediated or accomplished by
15 biomolecules and tissue structures that are intrinsically fluorescent. As a result, there
is an opportunity to diagnose and study important biological events by measuring and
localizing the spectra and tissue fluorescence emission. To investigate *in vivo* internal
processes and structures in large organisms, such as human beings and agricultural
animals, endoscopic procedures which penetrates body cavities or even solid tissue
20 may be required.

Endoscopy video imaging in body cavities ordinarily utilizes back-
scattered white light applied through the endoscope to form a low-resolution color
image of the internal surfaces of these cavities. Physicians often use the changes in
shapes and changes in local apparent color (which are often due to changes in blood
25 distribution) to recognize disease states, such as malignant tumors or inflammation.
Unfortunately, these clues are frequently not sufficient, especially for detection of the
early onset of disease. Diagnostic improvements have been made by quantitative
measurements of the light scattering and of tissue fluorescence emission.

Ordinarily, the light required to excite the fluorescence of tissue is
30 delivered through an optical fiber or fiber bundle that is inserted through a small tube
built into the endoscopic pipe to accommodate a mechanical biopsy wire. Small
optical fibers or fiber bundles can be passed easily through the same tube. Some of
the strongest tissue fluorescence usually seen in this procedure are due to NADH

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 2 -

(nicotinamide adenine dinucleotide) and to collagen structures. Their fluorescence is excited by absorption of ultraviolet light of about 300 to 400 nm wavelength corresponding to photon energies of around 3 to 4 eV or sometimes slightly longer wavelength visible light.

5 A first problem is that this ultraviolet light is strongly absorbed by hemoglobin and oxyhemoglobin in the blood, which are not fluorescent, so that penetration of the illumination into the tissue depends on their concentration and distribution.

10 A second problem is that the illumination exiting the optical fibers into tissue fans out at an included angle determined by the numerical aperture (NA) of the optical fiber. Small lenses can focus the spread so that the light first converges to a focus but it then fans out beyond the focal plane. (Typically, the NA is about 0.2 and the included cone angle is $\sim 17^\circ$.) This angular spreading is a problem, because roughly equal total amounts of fluorescence are excited in every spherical section at
15 each distance from the end of the fiber until attenuated by absorption. This effect is schematically illustrated in Figure 1. Fluorescence excitation is similarly spread out. Scattering does not attenuate the fluorescence excitation but does distribute it even more broadly. Consequently, the volume observed is ill defined with its practical limits depending also on blood distribution and light scattering. It should be noted
20 that these problems tend to persist even if lenses focus the illumination and/or prisms and mirrors deflect the light for side viewing.

The present invention is directed to overcoming these deficiencies in the art.

25 SUMMARY OF THE INVENTION

One aspect of the present invention relates to a method of detecting disease within a particular tissue of a plant or animal. This method involves activating the particular plant or animal tissue by application of radiation through at
30 least one optical fiber under conditions effective to promote a simultaneous multiphoton excitation of the particular plant or animal tissue and to emit an intrinsic fluorescence characteristic. The intrinsic fluorescence characteristic is compared to

WO 01/59423

PCT/US91/03901

- 3 -

fluorescence emitted by exciting healthy tissue of the particular plant or animal under the same conditions used to carry out the activating step. The particular tissue of a plant or animal where the intrinsic fluorescence characteristic differs from the fluorescence emitted by exciting healthy tissue of the particular plant or animal under the same conditions used to carry out such activity, is then identified as potentially diseased.

Another aspect of the present invention involves a method of producing an image of an internal surface of a particular tissue within a plant or animal. In this method, the particular plant or animal tissue is activated with radiation applied through an optical fiber under conditions effective to promote a simultaneous multiphoton excitation of the internal surface of the particular tissue within the plant or animal and produce an autofluorescence. The autofluorescence is collected to produce an image of the internal surface.

The present invention also relates to a method of detecting and localizing fluorescence within a subject by applying radiation to an internal region of the subject through at least one optical fiber. Each fiber terminates in a tip proximate to the internal region. Radiation is applied under conditions effective to cause simultaneous multiphoton absorption of fluorophore molecules within the internal region and, as a result, fluorescent excitation proximate to the tip of the at least one optical fiber.

Another embodiment of the present invention relates to a method of detecting and localizing fluorescence within a body of penetrable material by applying radiation to an internal region of the body of penetrable material through at least one optical fiber. Each fiber terminates in a tip proximate to the internal region. Radiation is applied under conditions effective to cause simultaneous multiphoton absorption of fluorophore molecules within the internal region and, as a result, fluorescent excitation proximate to the tip of the at least one optical fiber.

The present invention utilizes multiphoton absorption to excite autofluorescence of tissue with good spatial resolution in order to recognize disease by autofluorescence spectroscopy. The most useful tissue fluorescence for this purpose is most likely to require absorption of ultraviolet energies for excitation. Multiphoton excitation provides the added convenience of infrared illumination to

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 4 -

provide the necessary excitation energy by simultaneous absorption of two or more photons by the fluorescent molecules or structures.

The same advantages described above for internal multiphoton excitation of fluorescence spectroscopy through optical fibers penetrating a body cavity or tissue can be advantageously applied to probe other penetrable materials that are, or can be made, fluorescent. Some examples are: food products, polymeric structures or porous media.

One important advantage of multiphoton excitation is that the illumination is not absorbed by hemoglobin and myoglobin and, in fact, not strongly absorbed by any other common tissue components. Scattering of infrared light by tissue is also significantly less than scattering by ultraviolet wavelengths. The principal advantage of multiphoton excitation, however, for endoscopic fluorescence spectroscopy is that the effective focal volume within which fluorescence is strongly excited is well defined and highly localized (Figure 2). The reason for this is that the rate of two-photon excitation of fluorescence is proportional to the square of the illumination intensity. For higher multiphoton processes, the power law exponent of the intensity is larger, cubic for three-photon excitation for example. In multiphoton laser scanning microscopy, this higher power law feature makes possible three-dimensional resolution without generating out-of-focus fluorescence that would have to be excluded by confocal spatial filtering.

Nearly the same illumination conditions are also suitable for generation of second and third harmonic generation in certain suitable tissues. The second and third harmonics are generated, respectively, at exactly one half and one third of the laser illumination wavelengths and can be used with the intrinsic fluorescence to help characterize the tissue.

An analogous advantage applies to fluorescence multiphoton excited by laser light transmitted through an optical fiber as in application to endoscopic tissue fluorescence. Although the illumination intensity fans out just as for one-photon excitation with roughly equal total power at each value of radius from the end of the fiber or focal plane of any focusing lens, the excited fluorescence does not follow this fanned out illumination. In the case of two-photon excitation through a single mode optical fiber, the distribution of fluorescence is localized near the fiber tip in a shape

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 5 -

resembling a candle flame beginning at the fiber tip. This effective focal volume is defined by the spatial distribution of the square of the illumination intensity for two-photon excitation. The square of the illumination intensity falls off roughly as the reciprocal fourth power of the distance from the fiber tip so that the fluorescence
5 excitation is localized. Significant fluorescence is emitted only from this limited volume where the square of the excitation intensity is large, as illustrated in Figure 3. Lenses, prisms, etc. can be used to shift the effective focal volume beyond the end of the optical fiber and/or to provide a side-looking orientation without losing the advantages of multiphoton excitation.

10 This effect provides a well-defined focal volume for the fluorescence excitation and allows useful spatial resolution which is sharp enough to resolve important anatomical structures. For example, in the colon, about 5 distinct layers should be distinguishable. At the surface of the endothelium, an array of crypts covers the area and is terminated in a cellular layer that closes the bottoms of the crypts.
15 followed by several more layers including smooth muscle and connective tissue for a total of about 0.5 mm. These layers are readily resolved by multiphoton laser scanning microscopy exciting the intrinsic tissue fluorescence, which differs from layer to layer. Such layers and their perturbations by disease near the surface are thus distinguishable in the intact tissue by endoscopic spectroscopy of the tissue
20 fluorescence with sufficient spatial resolution as provided by multiphoton excitation.

The multiphoton excitation of the present invention allows accurate spatial discrimination and permits quantification of fluorescence from small volumes whose locations are defined in three dimensions. This is especially important in cases where thicker layers of cells are to be studied. In this case, the fiber can penetrate the
25 tissue to observe and resolve the multiphoton excited fluorescence of deeper layers, thus providing optical biopsy *in situ*. Furthermore, multiphoton excitation greatly reduces the background fluorescence and scattering artifacts.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

30 Figure 1 is a perspective drawing showing the spatial distribution of ultraviolet light emitted from a single mode optical fiber as well as the corresponding

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 6 -

autofluorescence in accordance with the prior art. Here, the drop in intensity of radiation is reciprocal to the square of the distance from the tip of the optical fiber.

Figure 2 is a perspective drawing showing the spatial distribution of ultraviolet light of two photon excitation fluorescence emitted from a single mode optical fiber in accordance with the present invention. Here, the pattern of illumination is nearly the same as for one-photon excitation. However, because the rate of two photon excitation is proportional to the square of the pulsed illumination intensity, the fluorescence intensity decreases from the tip of the fiber approximately as the reciprocal fourth power of the distance from the tip of the fiber providing a highly localized effective focal volume for excitation of the fluorescence. For higher order fluorescence excitation, the power law concentration of the emission is even stronger, reciprocal six power for three-photon excitation for example, although the sharpness of the effective focal volume could be reduced if a larger diameter optical fiber is used.

Figure 3 shows a two photon excitation profile at the fiber output in the form of a Gaussian Intensity Profile. This figure is a representation of the spatial distribution of the two-photon excited fluorescence emission from a uniform fluorophore shown for a plane along the axis of the optical fiber beginning at the exit from the fiber. The normalized maximum drops by half in about 10-15 micrometers along the axis and has a half maximum half-width of about 2 μ m at the exit of this typical single mode fiber.

Figure 4 shows an endoscope arrangement in accordance with the present invention.

Figure 5 shows an optical biopsy needle arrangement in accordance with the present invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

One aspect of the present invention relates to a method of detecting disease within a particular tissue of a plant or animal. This method involves activating the particular plant or animal tissue by application of radiation through at least one optical fiber under conditions effective to promote a simultaneous

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 7 -

5 multiphoton excitation of the particular plant or animal tissue and to emit an intrinsic fluorescence characteristic. The intrinsic fluorescence characteristic is compared to fluorescence emitted by exciting healthy tissue of the particular plant or animal under the same conditions used to carry out the activating step. The particular tissue of a plant or animal where the intrinsic fluorescence characteristic differs from the fluorescence, emitted by exciting healthy tissue of the particular plant or animal under the same conditions used to carry out such activity, is then identified as potentially diseased.

10 Another aspect of the present invention involves a method of producing an image of an internal surface of a particular tissue within a plant or animal. In this method, the particular plant or animal tissue is activated with radiation applied through an optical fiber under conditions effective to promote a simultaneous multiphoton excitation of the internal surface of the particular tissue within the plant or animal and produce an autofluorescence. The autofluorescence is collected to
15 produce an image of the tissue under the internal surface by recording a set of adjacent volumes.

The present invention also relates to a method of detecting and localizing fluorescence within a subject by applying radiation to an internal region of the subject through at least one optical fiber. Each fiber terminates in a tip proximate
20 to the internal region. Radiation is applied under conditions effective to cause simultaneous multiphoton absorption of fluorophore molecules within the internal region and, as a result, fluorescent excitation is proximate to the tip of the at least one optical fiber.

Another embodiment of the present invention relates to a method of
25 detecting and localizing fluorescence within a body of penetrable material by applying radiation to an internal region of the body of penetrable material through at least one optical fiber. Each fiber terminates in a tip proximate to the internal region. Radiation is applied under conditions effective to cause simultaneous multiphoton absorption of fluorophore molecules within the internal region and, as a result,
30 fluorescent excitation proximate to the tip of the at least one optical fiber.

One form of the present invention involves the use of multiphoton endoscopic autofluorescence spectroscopy of tissue surfaces inside the cavities of

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 8 -

living organisms. Endoscopic inspection and imaging at low resolution of the internal surfaces of body cavities is already a well-established standard medical procedure. Multiphoton endoscopic autofluorescence spectroscopy through optical fibers allows resolution of surface autofluorescence separately from the autofluorescence of underlying layers of the tissue. There are potentially numerous future improvements. Already it is possible to steer, point, and focus optical fibers with control apparatus to detect the fluorescence of tissue regions of interest in the endoscopy of body cavities. Analogous techniques are applicable to achieve the advantages of multiphoton fluorescent excitation for endoscopy. It can be anticipated that scanning of fibers or successive illumination of individual fibers or clusters in a bundle can be used to form multiphoton intrinsic fluorescence images. This aspect of the present invention can be used to image the fluorescence of tissues in internal channels such as the colon, esophagus, stomach, intestine, bladder, uterus, vagina, lung, ovaries, and throat. As a result, malignancy can be detected by recognition of differences in the fluorescence excited with ultraviolet excitation energies.

Figure 4 shows an endoscope arrangement in accordance with the present invention. In this embodiment of the present invention, laser 2 produces laser illumination L, which is directed by dichroic filter 4 into optical fiber assembly 6. Figure 4A shows optical fiber assembly 6 in more detail where laser illumination L passing through lens/focusing array 8 and into optical fiber 10d. Optical fibers 10a-10g are housed in cable 12 which is connected to endoscope head piece 14. The distal end of the endoscope is passed into the mouth of patient P through cavity C which, in this case, is the esophagus. The distal end of the endoscope terminates in endoscope tip 16 and excitation/collection unit 18. As shown in Figure 4B, which shows excitation/collection unit 18 in more detail, laser illumination L passes through optical fiber 10d and is directed at tissue T. As a result, tissue T fluoresces at the tip of optical fiber 10d (see Figure 2), and such fluorescence F is collected by optical fibers 10a-10g. The collected fluorescence F passes, in seriality, through endoscope head piece 14, optical fiber assembly 6 (including lens/focusing array 8), dichroic filter 4, barrier filter 20, and into spectroscopic and/or imaging detection equipment 22.

Another form of the present invention is based on penetration of tissue itself with either at least one conventional optical fiber or with an optical biopsy

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 9 -

needle. In this application, the optical fiber or optical biopsy needle is inserted in the tissue itself to sample the autofluorescence of the tissue at the end of the fiber or fibers. The fiber can function like a hypodermic syringe which can be inserted into the tissue as needed. Alternatively, the optical fiber's distal end can be configured to abut the surface of the plant or animal tissue being imaged. With multiphoton excitation, the volume at the end of the fiber where fluorescence is excited is well defined in principle. This can be carried out with a bundle of fibers wrapped around an initial fiber. Alternatively, a bundle of fibers which illuminate a larger volume can be utilized. In biopsy of dense tissue cancers, such as breast or liver cancer, the fiber can probe the fluorescence along insertion pathways. Note that in contrast with conventional biopsy, which generally requires time consuming tissue fixing and staining procedures, the optical biopsy with multiphoton excited fluorescence spectroscopy provides immediate diagnostic spectral data as the probe is inserted and moved within the patient.

Figure 5 shows an optical biopsy needle arrangement in accordance with the present invention. In this embodiment of the present invention, laser 102 produces laser illumination L which is directed by dichroic filter 104 into optical fiber assembly 106. Figure 5A shows optical fiber assembly 106 in more detail where laser illumination L passing through lens/focusing array 108 and into optical fiber 110d. Optical fibers 110a-10g are housed in cable 112 which is connected to optical biopsy needle head piece 114. The distal end of the optical biopsy needle (i.e. needle 116) is passed through the skin of patient P and into pelvis E. As shown in more detail in Figure 5B, within needle 116, laser illumination L passes through optical fiber 10d and is directed at tissue T. As a result, tissue T fluoresces at the tip of optical fiber 10d (see Figure 2), and such fluorescence F is collected by optical fibers 110a-110g. The collected fluorescence F passes, in seriatim, through optical biopsy needle head piece 114, optical fiber assembly 106 (including lens/focusing array 108), dichroic filter 104, barrier filter 120, and into spectroscopic and/or imaging detection equipment 122.

These forms of the present invention can also be carried out in combination where an endoscopic is inserted into a body cavity of a patient to provide a route for fibers to reach an internal surface of a body cavity from which the fibers

WG 01/59423

PCT/US01/03901

- 10 -

can be inserted into the tissue to sample its successive layers. For example, in the search for the onset of cancer in the wall of the colon, the tissue has about 5 layers, each with its own characteristic optical properties and autofluorescence. Successive optical probing of each layer can distinguish them and recognize their changes by disease.

5 Detection of the multiphoton excited fluorescence and the second and third harmonic of the laser excitation generated in the tissue can be accomplished by endoscopy and optical biopsy through the optical fiber that provides the excitation and of course through surrounding fibers in a bundle or through thick optical tubes for efficient collection of light excited near the tip of the single mode excitation fiber or 10 fibers. There is a significant advantage in fluorescence collection efficiency for multiphoton endoscopic tissue fluorescence over single photon excitation, because the emission is localized near the fiber tip where it is most accessible to collection optics. The same advantage applies in optical biopsy. Desirably, the present invention is 15 carried out with a plurality of optical fibers, including a single excitation fiber surrounded by a plurality of collection fibers.

Effective multiphoton molecular excitation is made possible, in accordance with the present invention, by the combination of (a) the very high, local, instantaneous intensity and (b) the temporal concentration of a pulsed laser. A high 20 intensity, long wavelength, monochromatic light source which is focusable to the diffraction limit such as a titanium sapphire mode locked solid state laser, with each pulse having a duration of about 100 femtoseconds (100×10^{-15} seconds) at a repetition rate of about 80 MHz. Other lasers that are also effective for multiphoton excitation and harmonic generation can also be used. These fast pulses are directed 25 through the endoscope or optical biopsy needle to target tissue within a living plant or animal or, alternatively, a tissue specimen. Because of the high instantaneous power provided by the very short duration intense pulses focused to the diffraction limit, there is an appreciable probability that a fluorophore (a fluorescent dye), contained in the target, and normally excitable by a single high energy photon having a short 30 wavelength, typically ultraviolet, will absorb two long wavelength photons from the laser source simultaneously. This absorption combines the energy of the two photons in the fluorophore molecule, thereby raising the fluorophore to its excited state.

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 11 -

When the fluorophore returns to its normal state, it emits light, and this light then passes back through the endoscope or optical biopsy needle to a suitable detector.

The multiphoton excitation of fluorophores by highly intense, short pulses of light constitutes a general fluorescence microscopy technique for imaging which provides improved background discrimination and reduces photobleaching of the fluorophores. This is because the focused illumination provided in the microscope fills a converging cone as it passes into the specimen. All of the light which reaches the plane of focus at the apex of the converging cone, except the tiny fraction which is absorbed in the fluorophore, then passes out the opposite side of the specimen through a diverging cone. Only in the region of the focal point on the object plane at the waist formed by the converging and diverging cones is the intensity sufficiently high to produce multiphoton absorption in the specimen fluorophore, and this intensity dependence enables long wavelength excitation only in the small local volume of the specimen surrounding the focal point. This absorption is produced by means of a stream of fast, high intensity, femtosecond pulses of relatively long wavelength which retains a moderate average illumination intensity of long wavelength light throughout the remainder of the specimen outside the region of the focal point. As a result, photobleaching of the fluorophore outside the plane of focus is virtually eliminated. One-photon absorption of the long wavelength light is negligible, and outside the plane of focus the instantaneous intensity is too low for appreciable two-photon absorption and excitation, even though the time average illumination is in reality nearly uniform throughout the depth of the specimen. This effect also significantly reduces the damage to living cells.

In order to obtain three dimensional resolution, the present invention can utilize two-photon excitation of a fluorophore which has a one-photon absorption peak at a wavelength which overlaps or exceeds one-half that of the exciting light. For three-photon excitation, the one-photon absorption overlaps one-third that of the exciting light. To accomplish this, the laser produces a very short pulsed laser beam of high instantaneous power and of a relatively long wavelength, for example in the visible red or the infrared range. This light is directed to a specimen containing a fluorophore normally excited by a single photon having a short wavelength (e.g., ultraviolet radiation) range so that two low energy (red) photons must combine their

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 12 -

energy to provide the same excitation of the specimen that would be provided by a single high energy (ultraviolet) photon. Both the excitation and hence the fluorescence rates in the specimen are proportional to the square of the intensity of the incident light. In the focused excitation laser beam, the intensity of the long wavelength incident light becomes high enough to excite the fluorophores in the specimen only in the region of the focal point. This focal point may be adjustably positioned within the specimen so that fluorescence and/or photolysis of the specimen are produced only in a selected ellipsoidal volume around the focus. Thus, in accordance with the present invention, only long wavelength excitation light has to pass through the specimen, and this long wavelength light is focused to produce sufficient intensity to excite fluorescence only in a very small region. This fluorescence is produced even if the fluorophore normally absorbs only in the ultraviolet. Since the focal point can be selectively positioned in the specimen, three-dimensional resolution is provided in both scanning fluorescence microscopy and in photolysis, including photolysis of photon-activatable reagents which can be released by photolysis.

In accordance with the present invention, the necessary excitation intensity is provided from a radiation light source which may be, for example, a titanium sapphire mode locked laser generating pulses of light having a wavelength in the red region of the spectrum, for example about 700-1000 nm, or with the pulses having a width of 10^{-9} seconds to 10^{-15} seconds, conveniently at about 80 MHz repetition rate. Other bright pulsed lasers may also be used to produce light at different relatively long wavelengths in the infrared or visible red region of the spectrum, for example, to generate the necessary excitation photon energies which will add up to the appropriate absorption energy band required by the fluorophores in the spectrum which normally would be excited by absorption of a single photon in the spectral region having wavelengths about one-half the wavelength of the incident light. If shorter excitation wavelengths are needed, the laser wavelengths can be divided by 2, 3, or 4 by external harmonic generation. Thus, for example, two photons in the visible red region at 750 nm would combine to excite a fluorophore which normally absorbs light in the ultraviolet region at or above 375 nm, while two

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 13 -

photons in the infrared region of, for example, 1070 nm, would excite a fluorophore which absorbs at or above 535 nm in the visible light region.

In a modified form of the invention, the single wavelength light source can be replaced by two different long wavelength laser sources so that the incident light beam consists of two superimposed pulsed light beams of high instantaneous power and of different wavelengths. The wavelengths of the incident beam are selected to excite a fluorophore which is absorbent at a short wavelength which may be described as:

$$1/\lambda_{\text{eff}} = 1/\lambda_1 + 1/\lambda_2$$

where λ_{eff} is the short wavelength of the absorber, and λ_1 and λ_2 are the laser incident beam wavelengths.

In two-photon excitation, with a typical two-photon cross section δ of:

$$\delta = 10^{-49} \text{ m}^4/\text{s/photon}$$

with the pulse parameters given above (100 fsec. pulses at a repetition rate of 80 MHz), and with the beam focused by a lens of numerical aperture $A = 1.4$, the average incident laser power (P_0) of approximately 50 mW saturates the fluorescence output of a fluorophore at the limit of one absorbed photon per pulse per fluorophore. The number n_a of photons absorbed per fluorophore per pulse depends on the following relationship:

$$n_a = \frac{P_0 \delta}{\tau f^2} \left[\frac{\Lambda^2}{2hc\lambda} \right]^2$$

where

τ is the pulse duration;

f is the repetition rate;

P_0 is the average incident laser power;

δ is the photon absorption cross section;

h is the Planck quantum of action;

c is the speed of light; and

Λ is the numerical aperture of the focusing lens.

The fluorescence emission could be increased, however, by increasing the pulse repetition frequency up to the inverse fluorescence lifetime, which typically is:

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 14 -

$$\tau_f^{-1} = 10^9 \text{S}^{-1}$$

For comparison, one-photon fluorescence saturation occurs at incident powers of about 3 mW.

In addition to measurement of intrinsic tissue fluorescence with multiphoton excitation, it is possible to utilize the fluorescence of drugs to detect their location in tissue. Often, such drugs segregate to particular tissue structures or disease products, such as tumors. Multiphoton excitation can be used to identify them. Many important drugs absorb ultraviolet light to become fluorescent and are, therefore, effectively excited by multiphoton excitation. As a result, all of the advantages of multiphoton excitation of intrinsic tissue fluorescence together with the labeling features provided by the selective segregation or binding of fluorescence drugs are achieved. For example, the principal drug used to treat colitis, 5-amino salicylic acid, can be imaged in all of the layers of living colon tissue explants as the drug is metabolized. It can be located relative to complex tissue structure by imaging tissue autofluorescence due to collagen, nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), and other structures. Multiphoton excitation of such drugs can be observed *in vivo* within tissues by multiphoton endoscopy and/or multiphoton optical biopsy.

Photoactive agents including fluorescent dyes are commonly used in multiphoton microscopy to image properties of cells and tissues. Suitable photoactive agents include dyes which are excited by multiphoton excitation such as, organic molecules whose fluorescence changes when they bind metal ions such as Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ or K^+ or H^+ . Dyes which bind to the DNA double helix such as DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) are particularly useful. Many such dyes are suitable for application *in vivo*.

Fluorescence distribution could be probed by multiphoton absorption endoscopic spectroscopy in living animals, including humans, to recognize inflammatory disease such as colitis and to follow the progress of its treatment. The distribution of fluorescent protoporphyrin IX, the metabolic product of aminolevulinic acid, which accumulates in cancer cells, would similarly be useful in cancer detection. NADH fluorescence may be the most promising cancer signal accessible by multiphoton absorption endoscopic spectroscopy, but it must be spatially localized by multiphoton absorption to distinguish it from collagen, which is similarly fluorescent

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 15 -

in adjacent tissues. It has been known for many years that certain tissues and tissue components, particularly collagen, an important structural component of tissue that appears in many forms, are very effective at generating the second harmonic of bright coherent illumination. The second harmonic of illumination has exactly half of the wavelength and thus twice the photon energy of the fundamental illumination. Similarly, the third harmonic of illumination has exactly one third of the wavelength and, therefore, three times the photon energy. Generation of second harmonic radiation has, in fact, been demonstrated to be a useful phenomenon for microscopic imaging of cells. Because the illumination conditions required to excite second or third harmonic in complex tissue are nearly the same as for multiphoton fluorescence excitation, it is possible to take advantage of second or third harmonic generation, in tissues such as collagen, to complement multiphoton excitation of intrinsic tissue fluorescence. In complex tissues, the second or third harmonic radiation is frequently radiated through broad angles which makes it detectable along with the multiphoton excited fluorescence. The present invention can be used for a variety of purposes. For example, histological and clinical composition, structure, metabolic state, and vitality in the region of the subject can be determined. Alternatively, functional response to physiological and pharmacological stimuli and disease states can be detected in the region of the subject. Lastly, tissue or drug fluorescence excitation and emission spectra, luminosity, fluorescence lifetime, and temporal fluctuations in the region of the subject can be determined.

Although preferred embodiments have been depicted and described in detail herein, it will be apparent to those skilled in the relevant art that various modifications, additions, substitutions and the like can be made without departing from the spirit of the invention and these are therefore considered to be within the scope of the invention as defined in the claims which follow.

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 16 -

WHAT IS CLAIMED:

1. A method of detecting disease within a particular tissue of a plant or animal comprising:
 - 5 activating the particular plant or animal tissue by application of radiation through at least one optical fiber under conditions effective to promote a simultaneous multiphoton excitation of the particular plant or animal tissue and to emit an intrinsic fluorescence characteristic;
 - 10 comparing the intrinsic fluorescence characteristic of fluorescence emitted by exciting healthy tissue of the particular plant or animal under the same conditions used to carry out said activating; and
 - 15 identifying the particular tissue of a plant or animal where the intrinsic fluorescence characteristic differs from the fluorescence, emitted by exciting healthy tissue of the particular plant or animal under the same conditions used to carry out said activating, as potentially diseased.
2. The method according to claim 1, wherein the radiation is applied substantially adjacent to the particular plant or animal tissue.
- 20 3. The method according to claim 1, wherein the radiation is applied within the particular plant or animal tissue.
4. The method according to claim 1 further comprising:
 - 25 treating the particular plant or animal tissue with at least one photo-active agent prior to said activating.
5. The method according to claim 1, wherein the radiation is generated by a laser.
- 30 6. The method according to claim 5, wherein the radiation is pulsed.

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 17 -

7. The method according to claim 6, wherein the radiation is pulsed at a pulse width between about 10^{-9} second to 10^{-15} second.
8. The method according to claim 7, wherein the laser is a mode-locked laser.
9. The method according to claim 1, wherein the at least one optical fiber has a terminal end abutting a surface of the plant or animal tissue.
10. The method according to claim 1, wherein the at least one optical fiber is disposed within the plant or animal tissue.
11. The method according to claim 10, wherein the at least one optical fiber constitutes or is associated with an optical biopsy needle.
12. The method according to claim 1, wherein the at least one optical fiber is disposed within a body cavity of the plant or animal.
13. The method according to claim 12, wherein the at least one optical fiber is associated with an endoscope.
14. The method according to claim 12, wherein the body cavity is selected from the group consisting of colon, esophagus, stomach, intestine, bladder, uterus, vagina, lung, ovaries, and throat.
15. The method according to claim 1 further comprising:
collecting radiation applied to the plant or animal tissue using one or more collection optical fibers.
16. A method according to claim 1, wherein the tissue is effective to produce second or third harmonics of illumination.

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 18 -

17. A method of producing an image of an internal region of a particular tissue within a plant or animal comprising:
activating the particular plant or animal tissue with radiation applied through an optical fiber under conditions effective to promote a simultaneous
5 multiphoton excitation of the internal region of the particular tissue within the plant or animal and produce an autofluorescence and
collecting the autofluorescence to produce an image of the internal region.
- 10 18. The method according to claim 17, wherein the at least one optical fiber is juxtaposed with a surface of the plant or animal tissue.
19. The method according to claim 17 further comprising:
treating the particular plant or animal tissue with at least one
15 photo-active agent prior to said activating.
20. The method according to claim 17, wherein the radiation is generated by a laser.
- 20 21. The method according to claim 17, wherein the radiation is pulsed.
22. The method according to claim 21, wherein the radiation is pulsed at a pulse width between about 10^{-12} second to 10^{-15} second.
- 25 23. The method according to claim 21, wherein the laser is a mode-locked laser.
24. The method according to claim 17, wherein the at least one
30 optical fiber is disposed within a body cavity of the plant or animal.

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 19 -

25. The method according to claim 17, wherein the at least one optical fiber is associated with an endoscope.

26. The method according to claim 17, wherein the body cavity is selected from the group consisting of colon, esophagus, stomach, intestine, bladder, uterus, vagina, lung, ovaries, and throat.

27. The method according to claim 17, wherein the at least one optical fiber is a bundle of optical fibers.

28. A method according to claim 17, wherein the tissue is effective to produce second and third harmonics of illumination.

29. A method of detecting and localizing fluorescence within a subject comprising:

applying radiation to an internal surface of the subject through at least one optical fiber, each of which terminates in a tip proximate to the internal surface, under conditions effective to cause simultaneous multiphoton absorption of fluorophore molecules within the internal surface and, as a result, fluorescent excitation proximate to the tip of the at least one optical fiber.

30. A method according to claim 29, wherein the at least one optical fiber is inserted into the subject through an externally accessible body cavity of the subject.

31. A method according to claim 30, wherein the at least one optical fiber is associated with an endoscope.

32. A method according to claim 30, wherein the body cavity is selected from the group consisting of colon, esophagus, stomach, intestine, bladder, uterus, vagina, lung, ovaries, and throat.

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 20 -

33. A method according to claim 29, wherein the at least one optical fiber is inserted into the subject through a penetrable surface of the body.
- 5 34. A method according to claim 29 further comprising:
imaging the internal surface of the subject after said subjecting.
35. A method according to claim 29 further comprising:
detecting disease in the internal surface of the subject after said
applying.
- 10 36. A method according to claim 29 further comprising:
treating the subject with at least one photo-active agent prior to
said applying.
- 15 37. A method according to claim 29, wherein the radiation is
generated with a laser.
38. A method according to claim 29, wherein the radiation is
pulsed.
- 20 39. A method according to claim 38, wherein the radiation is
pulsed at a pulse width between about 10^{-12} second to 10^{-15} second.
40. A method according to claim 39, wherein the laser is a mode-
25 locked laser.
41. A method according to claim 29 further comprising:
detecting histological and clinical composition, structure,
metabolic state, and vitality in the internal surface of the subject after said applying.
- 30 42. A method according to claim 29 further comprising:

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 21 -

detecting functional response to physiological and pharmacological stimuli and disease states in the internal surface of the subject after said applying.

- 5 43. A method according to claim 29 further comprising:
 detecting tissue or drug fluorescence excitation and emission
 spectra, luminosity, fluorescence lifetime, and temporal fluctuations in the internal
 surface of the subject after said applying.
- 10 44. A method according to claim 29, wherein the tissue is effective
 to produce second and third harmonics of illumination.
45. A method of detecting and localizing fluorescence within a
 body of penetrable material comprising:
 15 applying radiation to an internal region of the body of
 penetrable material through at least one optical fiber, each of which terminates in a tip
 proximate to the internal region, under conditions effective to cause simultaneous
 multiphoton absorption of fluorophore molecules within the internal region and, as a
 result, fluorescent excitation proximate to the tip of the at least one optical fiber.
- 20 46. A method according to claim 45, wherein the at least one
 optical fiber is inserted into the body of penetrable material.
47. A method according to claim 45 further comprising:
 25 imaging the region of the subject after said subjecting.
48. A method according to claim 45, wherein the radiation is
 generated with a laser.
- 30 49. A method according to claim 45, wherein the radiation is
 pulsed.

WO 01/59423

PCT/US01/03901

- 22 -

50. A method according to claim 49, wherein the radiation is pulsed at a pulse width between about 10^{-12} second to 10^{-15} second.

51. A method according to claim 50, wherein the laser is a mode-
5 locked laser.

52. A method according to claim 45, wherein the body of penetrable material is effective to produce second and third harmonics of illumination.

WO 01/59423

PCT/US01/03901

1 / 4

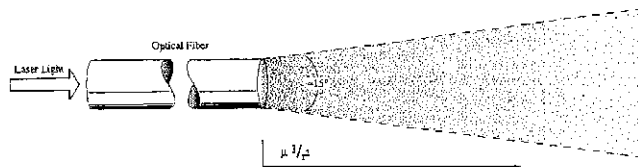


Figure 1

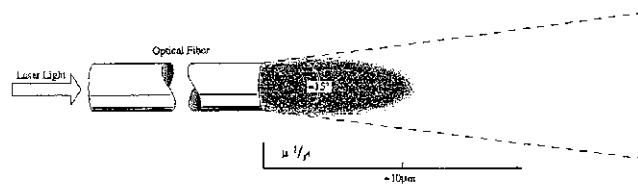


Figure 2

WO 01/59423

PCT/US01/03901

2 / 4

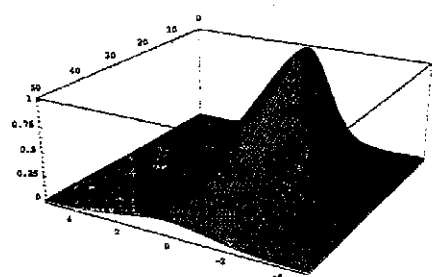


Figure 3

WO 01/59423

PCT/US01/03901

3 / 4

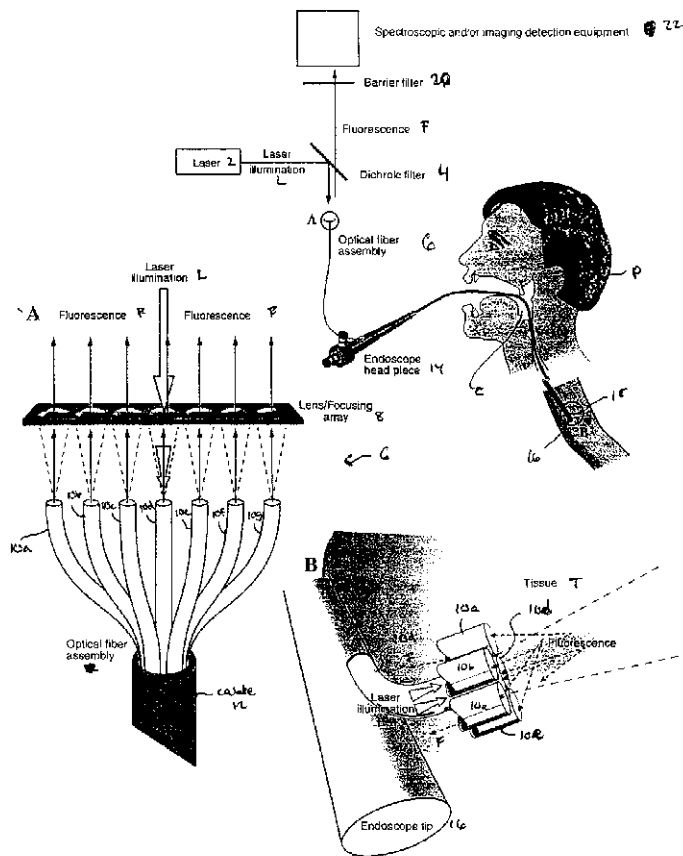


Figure 4

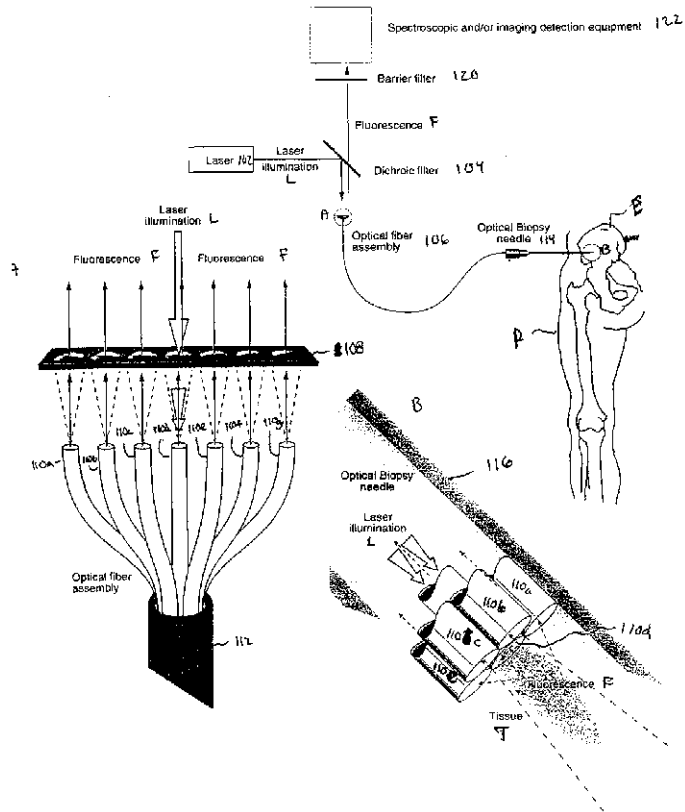


Figure 5

【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
16 August 2001 (16.08.2001)

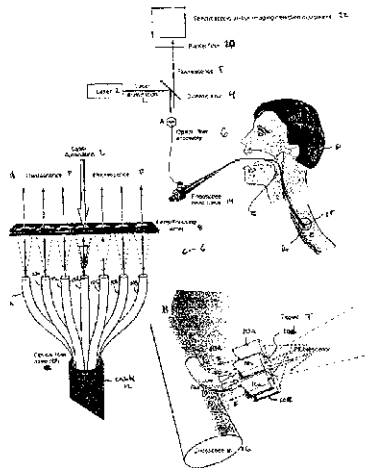
PCT

(10) International Publication Number
WO 01/59423 A3

- (51) International Patent Classification: A61B 6/00 (74) Agents: GOLDMAN, Michael, L. et al.; Nixon Peabody LLP, Clinton Square, P.O. Box 31051, Rochester, NY 14603-1051 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/01901
- (22) International Filing Date: 7 February 2001 (07.02.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/181,012 8 February 2000 (08.02.2000) US
- (71) Applicant: CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC. [US/US]; 20 Thurwood Drive, Suite 105, Ithaca, NY 14850 (US).
- (72) Inventor: WEBB, Watt, W., 9 Parkway Place, Ithaca, NY 14850 (US).
- (81) Designated States (nationally): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regionally): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, 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, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: with international search report

(Continued on next page)

(54) Title: MULTIPHOTON EXCITATION THROUGH OPTICAL FIBERS FOR FLUORESCENCE SPECTROSCOPY



(57) Abstract: The present invention is directed to a method of applying radiation through an optical fiber (106) for detecting disease within a plant or animal or imaging a particular tissue of a plant or animal. In addition, fluorescence can be detected and localized within a subject by such application of radiation through an optical fiber (106). The radiation is effective to promote simultaneous multiphoton excitation. The optical fibers are used alone to examine internal regions of tissue, in conjunction with an optical biopsy needle (114) to evaluate sub-surface tissue, or with an endoscope (116) to evaluate tissue within the body cavity.

WO 01/59423 A3

WO 01/59423 A3



(88) Date of publication of the international search report: 25 February 2002
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/US01/03901
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(Cl) : A61B 6/00 US Cl : 604/476 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) U.S. : 603/476, 473, 477, 478, 510, 356/432, 250/458, 1, 461, 1, 461, 2, 483, 1, 464, 2, 484, 4, 492, 1, 358, 1 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 practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X.E	US 6,336,349 B1 (Crowley et al.) 29 May 2001, see entire document	1-52
X.E	US 6,201,989 B1 (Whitehead et al.) 13 March 2001, see entire document	1-52
X.B	US 6,212,425 B1 (Irion et al.) 03 April 2001, see entire document	1-52
X.P	US 6,070,096 A (Hayashi) 30 May 2000, see entire document	1-52
X	US 5,421,337 A (Richards-Komum et al.) 06 June 1995, see entire document	1-52
X	US 5,419,323 A (Kintell et al.) 30 May 1995, see entire document	1-52
A	US 5,986,271 A (Lazarev et al.) 16 November 1999, see entire document	1-52
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" documents which may show doubts on priority claims or to which is used to establish the publication date of another document or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later documents published after the international filing date in priority date and not in conflict with the application but used to understand the principles 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" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in light of one or more other such documents, such 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		Date of mailing of the international search report
01 July 2001 (01.07.2001)		19 NOV 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20591 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Brian L. Casler Telephone No. 703-308 0858

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US91/09901

Continuation of Item 4 of the first sheet: the title is too long in that it exceeds 7 words(see PCT Rule 4.3). The new Title is:
—MULTIPHOTON EXCITATION FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,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,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,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,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA05 EA01 FA01 FA05 GA01 GB01 HA01 HA05
HA09 JA03 KA08 KA09 LA03 NA06
2H040 BA01 CA11 CA12 CA27 DA03 DA12
4C061 AA01 AA02 AA13 AA15 AA16 BB08 CC07 DD03 LL03 QQ04
WW17

专利名称(译)	通过光纤进行荧光光谱的多光子激发		
公开(公告)号	JP2004500197A	公开(公告)日	2004-01-08
申请号	JP2001558707	申请日	2001-02-07
[标]申请(专利权)人(译)	康乃尔研究基金会有限公司		
申请(专利权)人(译)	康奈尔大学研究基金会有限公司		
[标]发明人	ウェブワットダブリュー		
发明人	ウェブ ワット ダブリュー.		
IPC分类号	A61B1/00 A61B1/06 A61B1/07 A61B5/00 G01N21/64 G02B23/26		
CPC分类号	G01N21/6486 A61B1/043 A61B1/07 A61B5/0071 A61B5/0075 A61B5/0084 A61B5/0086 A61B5/6848 G01N21/64 G01N21/645 G01N21/6458 G01N2021/6417 G01N2021/6484		
FI分类号	A61B1/00.300.D A61B1/06.A G01N21/64.Z G02B23/26.A		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/CA05 2G043/EA01 2G043/FA01 2G043/FA05 2G043/GA01 2G043/ GB01 2G043/HA01 2G043/HA05 2G043/HA09 2G043/JA03 2G043/KA08 2G043/KA09 2G043/LA03 2G043/NA06 2H040/BA01 2H040/CA11 2H040/CA12 2H040/CA27 2H040/DA03 2H040/DA12 4C061 /AA01 4C061/AA02 4C061/AA13 4C061/AA15 4C061/AA16 4C061/BB08 4C061/CC07 4C061/DD03 4C061/LL03 4C061/QQ04 4C061/WW17		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/181012 2000-02-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种通过光纤 (106) 进行照射以检测植物或动物的疾病, 或者对植物或动物的特定组织成像的方法。此外, 通过经由光纤 (106), 为这样进行照射, 所以能够检测和定位在所述受试者的荧光。照射是有效产生同时多光子激发。光纤可单独用于检查组织的内部区域并与光学学生针 (114) 一起使用以评估表面下组织或与内窥镜 (16) 一起使用以隔离体腔中的组织评估。

