

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 533674

(P2003 - 533674A)

(43)公表日 平成15年11月11日(2003.11.11)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/483		G 0 1 N 33/483	C 2 G 0 4 3
A 6 1 B 1/00	300	A 6 1 B 1/00	300 D 2 G 0 4 5
	334		334 D 4 B 0 6 3
A 6 1 K 49/00		A 6 1 K 49/00	A 4 C 0 6 1
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求(全 53数) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2001 - 568033(P2001 - 568033)
(86)(22)出願日	平成13年3月9日(2001.3.9)
(85)翻訳文提出日	平成14年9月6日(2002.9.6)
(86)国際出願番号	PCT/US01/07589
(87)国際公開番号	W001/069199
(87)国際公開日	平成13年9月20日(2001.9.20)
(31)優先権主張番号	09/522,557
(32)優先日	平成12年3月10日(2000.3.10)
(33)優先権主張国	米国(US)

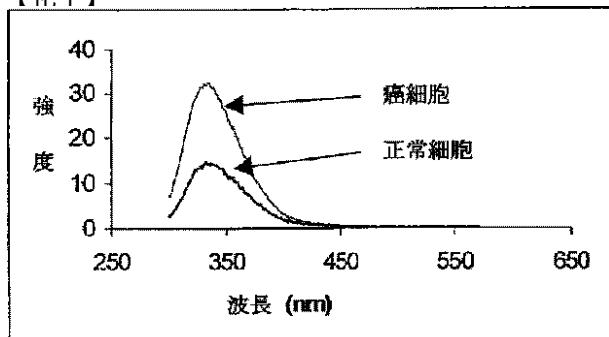
(71)出願人	バスカー・バナージー アメリカ合衆国ミズーリ州63132,セント・ ルイス,マンスフィールド・ドライブ 963 1
(72)発明者	バスカー・バナージー アメリカ合衆国ミズーリ州63132,セント・ ルイス,マンスフィールド・ドライブ 963 1
(74)代理人	弁理士 社本 一夫 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞の自己蛍光を使用した癌の検出方法

(57)【要約】

【化.1】



【特許請求の範囲】**【請求項1】**

新形成を検出する方法であつて、
新形成を構成すると推測される細胞を紫外線に暴露すること；
トリプトファン放射を示す波長で自己蛍光を測定すること；そして
前記細胞の放射強度と新形成を構成しない細胞の放射強度の比が1.3を超える場合、前記細胞が新形成を構成すると決定すること、を含む、前記方法。

【請求項2】

トリプトファン放射を示す波長で自己蛍光を測定することが、約300nmから約400nmまでの範囲にある波長で自己蛍光を測定することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

約300nmないし約400nmの範囲にある波長で自己蛍光を測定することが、約330nmの波長で自己蛍光を測定することを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記方法が、新形成の程度を検出し、そして、前記細胞の放射強度と新形成を構成しない細胞の放射強度の比が約1.3を超える場合、前記細胞が新形成を構成すると決定することが、前記細胞が新形成を構成しない細胞の放射強度に対して1.3を上回るより高い照射強度の比を示す場合、前記細胞がより重篤である程度の新形成を構成すると決定することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記方法が、過形成を検出し、そして、前記細胞が新形成を構成しない細胞の放射強度に対して1.3を上回るより高い照射強度の比を示す場合、前記細胞がより重篤である程度の新形成を構成すると決定することが、前記細胞の放射強度と新形成を構成しない細胞の放射強度の比が、約1.3より高くしかし約1.7より低い場合、細胞が過形成を構成すると決定することを含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記方法が、異形成を検出し、そして、前記細胞が新形成を構成しない細胞の放射強度に対して1.3を上回るより高い放射強度の比を示す場合、前記細胞がより重篤である程度の新形成を構成すると決定することが、前記細胞の放射強度と新形成を構成しない細胞の放射強度の比が、約1.7より高くしかし約2.5より低い場合、前記細胞が、異形成を構成すると決定することを含む、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記方法が、癌細胞を検出し、そして、前記細胞が新形成を構成しない細胞の放射強度に対して1.3を上回るより高い放射強度の比を示す場合、前記細胞がより重篤である程度の新形成を構成すると決定することが、前記細胞の放射強度と新形成を構成しない細胞の放射強度の比が、約2.5より高い場合、前記細胞が、癌細胞を構成すると決定することを含む、請求項4に記載の方法。

【請求項8】

約300nmないし約400nmの範囲にある波長で自己蛍光を測定することが、自己蛍光を約300nmないし約400nmの範囲にある帯域幅で測定することを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項9】

前記帯域幅が、約10nmの帯域幅を含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

新形成を構成すると推測される細胞を紫外線に暴露することが、新形成を構成すると推測される細胞を290nmの波長の紫外線に暴露することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記細胞が、in vivoである、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

新形成を構成すると推測される細胞を紫外線に暴露することが、新形成を構成すると推測される細胞を、直接、又はレンズ若しくは鏡を使用することによって、或いは内視鏡の生検鉗子口を通して挿入された光ファイバーの束又は針を経由して放射される紫外線のビームに暴露することを含む、請求項11に記載の方法

。

【請求項13】

前記細胞が *in vitro* である、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

前記細胞が、セルウォッシング (cell washing) またはセルブラッシング (cell brushing) から得られる、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記細胞が、組織の生検から得られる、請求項13に記載の方法。

【請求項16】

前記新形成を構成すると推測される細胞が、新形成を構成しない細胞と同一の器官の種類から得られる、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

前記新形成を構成すると推測される細胞が、胃腸器官、肺、膀胱、輸尿管、頸管、皮膚、胆管、胰管、肝臓、腎臓、子宮、卵巣、卵管、口、喉、又は鼻咽喉から得られる、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

前記新形成を構成すると推測される細胞が、食道、胃、小腸又は大腸から得られる、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記細胞が、固定された細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項20】

前記細胞が、ホルマリンで固定された細胞である、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

新形成を検出する方法であって、

新形成を構成すると推測される細胞を紫外線に暴露すること；

前記細胞からの自己蛍光放射を帯域幅 20 nm 以外の帯域幅で測定し、ここにおいて前記帯域幅は約 300 nm ないし約 400 nm の範囲にあること；そして放射が新形成を構成しない細胞の放射より大きい場合、前記細胞が、新形成を

構成すると決定すること、を含む、前記方法。

【請求項22】

放射が新形成を構成しない細胞の放射より大きい場合、前記細胞が新形成を構成すると決定することが、前記細胞の放射強度と新形成を構成しない細胞の放射強度の比が約1.3を超える場合、前記細胞が、新形成を構成すると決定することを含む、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記方法が、新形成の程度を検出し、そして、前記細胞の放射強度と新形成を構成しない細胞の放射強度の比が約1.3を超える場合、前記細胞が新形成を構成すると決定することが、前記細胞が新形成を構成しない細胞の放射強度に対して1.3を上回るより高い照射強度の比を示す場合、前記細胞が、より重篤である程度の新形成を構成すると決定することを含む、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記方法が、過形成を検出し、そして前記細胞が新形成を構成しない細胞の放射強度に対して1.3を上回るより高い照射強度の比を示す場合、前記細胞がより重篤である程度の新形成を構成すると決定することが、前記細胞の放射強度と新形成を構成しない細胞の放射強度の比が、約1.3より高く、しかし約1.7より低い場合、前記細胞が、過形成を構成すると決定することを含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記方法が、異形成を検出し、そして、前記細胞が新形成を構成しない細胞の放射強度に対して1.3を上回るより高い放射強度の比を示す場合、前記細胞がより重篤である程度の新形成を構成すると決定することが、前記細胞の放射強度と新形成を構成しない細胞の放射強度の比が、約1.7より高くしかし約2.5より低い場合、前記細胞が、異形成を構成すると決定することを含む、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

前記方法が、癌細胞を検出し、そして、前記細胞が新形成を構成しない細胞の放射強度に対して1.3を上回るより高い放射強度の比を示す場合、前記細胞が

より重篤である程度の新形成を構成すると決定することが、前記細胞の放射強度と新形成を構成しない細胞の放射強度の比が、約2.5より高い場合、前記細胞が、癌細胞を構成すると決定することを含む、請求項23に記載の方法。

【請求項27】

前記帯域幅が、約10nmの帯域幅を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項28】

前記新形成を構成すると推測される細胞を紫外線に暴露することが、前記新形成を構成すると推測される細胞を、290nmの波長を含む紫外線に暴露することを含む、請求項21に記載の方法。

【請求項29】

前記細胞が、in vivoである、請求項21に記載の方法。

【請求項30】

前記新形成を構成すると推測される細胞を紫外線に暴露することが、前記新形成を構成すると推測される細胞を、直接、又はレンズ若しくは鏡を使用することによって、或いは内視鏡の生検鉗子口を通して挿入された光ファイバーの束又は針を経由して放射される紫外線のビームに暴露することを含む、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記細胞がin vitroである、請求項21に記載の方法。

【請求項32】

前記細胞が、セルウォッシングまたはセルブラッシングから得られる、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

前記細胞が、組織の生検から得られる、請求項31に記載の方法。

【請求項34】

前記新形成を構成すると推測される細胞が、新形成を構成しない細胞と同一の器官の種類から得られる、請求項21に記載の方法。

【請求項35】

前記新形成を構成すると推測される細胞が、胃腸器官、肺、膀胱、輸尿管、頸

管、皮膚、胆管、膀胱、肝臓、腎臓、子宮、卵巣、卵管、口、喉、又は鼻咽喉から得られる、請求項21に記載の方法。

【請求項36】

前記新形成を構成すると推測される細胞が、食道、胃、小腸又は大腸から得られる、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記細胞が、固定された細胞である、請求項21に記載の方法。

【請求項38】

前記細胞が、ホルマリンで固定された細胞である、請求項36に記載の方法。

【請求項39】

食道の扁平上皮細胞の円柱細胞への化生を検出する方法であって、
食道の化生を構成すると推測される細胞を紫外線に暴露すること；
トリプトファン放射を示す波長で前記細胞の自己蛍光放射を測定すること；そして

前記細胞の放射強度と食道の化性を構成しない細胞の放射強度の比が約0.65より低い場合、前記細胞が食道の化生を構成すると決定すること、を含む、前記方法。

【請求項40】

トリプトファン放射を示す波長で前記細胞の自己蛍光放射を測定することが、約300nmないし約400nmにある波長で自己蛍光を測定することを含む、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

約300nmないし約400nmにある波長で自己蛍光を測定することが、約330nmで自己蛍光を測定することを含む、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

約300nmないし約400nmにある波長で自己蛍光を測定することが、細胞の自己蛍光放射を約300nmないし約400nmにある帯域幅で測定することを含む、請求項40に記載の方法。

【請求項43】

前記帯域幅が、約10nmの帯域幅を含む、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

食道の化生を構成すると推測される細胞を紫外線に暴露することが、食道の化生を構成すると推測される細胞を290nmの波長を含む紫外線に暴露することを含む、請求項39に記載の方法。

【請求項45】

前記細胞が、in vivoである、請求項39に記載の方法。

【請求項46】

食道の化生を構成すると推測される細胞を紫外線に暴露することが、食道の化生を構成すると推測される細胞を、内視鏡の生検鉗子口を通して挿入された光ファイバーの束を経由して放射される紫外線のビームに暴露することを含む、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記細胞がin vitroである、請求項39に記載の方法。

【請求項48】

前記細胞が、セルウォッシングまたはセルブラッシングから得られる、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

前記細胞が、組織の生検から得られる、請求項47に記載の方法。

【請求項50】

前記食道の化生を構成しない細胞が、食道の扁平上皮細胞である、請求項39に記載の方法。

【請求項51】

前記細胞が、固定された細胞である、請求項39に記載の方法。

【請求項52】

前記細胞が、ホルマリンで固定された細胞である、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

炎症を検出する方法であって、

炎症を構成すると推測される細胞を紫外線に暴露すること；

トリプトファン放射を示す波長で細胞の自己蛍光放射を測定すること；そして前記細胞の放射強度と炎症を構成しない細胞の放射強度の比が約0.75より少なく、そして約0.65より大きい場合、前記細胞が炎症を構成すると決定すること、を含む、前記方法。

【請求項54】

トリプトファン放射を示す波長で前記細胞の自己蛍光放射を測定することが、約300nmないし約400nmにある波長で自己蛍光を測定することを含む、請求項53に記載の方法。

【請求項55】

約300nmないし約400nmにある波長で自己蛍光を測定することが、330nmで自己蛍光を測定することを含む、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

約300nmないし約400nmにある波長で自己蛍光を測定することが、細胞の自己蛍光放射を約300nmないし約400nmにある帯域幅で測定することを含む、請求項54に記載の方法。

【請求項57】

前記帯域幅が、約10nmの帯域幅を含む、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

炎症を構成すると推測される細胞を紫外線に暴露することが、炎症を構成すると推測される細胞を290nmの波長を含む紫外線に暴露することを含む、請求項53に記載の方法。

【請求項59】

前記細胞が、in vivoである、請求項53に記載の方法。

【請求項60】

炎症を構成すると推測される細胞を紫外線に暴露することが、炎症を構成すると推測される細胞を、内視鏡の生検鉗子口を通して挿入された光ファイバーの束を経由して放射される紫外線のビームに暴露することを含む、請求項59に記載の方法。

【請求項61】

前記細胞が *in vitro* である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記細胞が、セルウォッシングまたはセルブラッシングから得られる。請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記細胞が、組織の生検から得られる、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記炎症を構成しない細胞が、食道の扁平上皮細胞である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記細胞が、固定された細胞である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記細胞が、ホルマリンで固定された細胞である、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

炎症の存在中で新形成を検出する方法であって、

炎症の存在中で新形成を構成する細胞を含むと推測される領域を紫外線に暴露すること；

トリプトファン放射スペクトルを示す波長で自己蛍光を測定すること；そして放射が新形成を構成しない細胞の放射より大きい場合、新形成を構成する細胞を含む領域と決定すること、を含む、前記方法。

【請求項 6 8】

前記方法が、新形成の程度を検出し、そして、放射が新形成を構成しない細胞の放射より大きい場合、前記領域が新形成を構成する細胞を含むと決定することが、新形成を構成しない細胞の放射強度に対する放射の比がより高いことを示す場合、前記領域がより重篤である程度の新形成を構成する細胞を含むと決定することを含む、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記領域が、放射強度が新形成を構成しない細胞の放射強度より高い場合、新形成を構成する細胞を含むと決定することが、前記領域の放射強度と新形成を構

成しない細胞の放射強度の比が約1.3を超える場合、前記領域が新形成を構成する細胞を含むと決定することを含む、請求項67に記載の方法。

【請求項70】

前記方法が、過形成を検出し、そして、前記領域の放射強度と新形成を構成しない細胞の放射強度の比が約1.3を超える場合、前記領域が新形成を構成する細胞を含むと決定することが、前記領域の放射強度と新形成を構成しない細胞の放射強度の比が約1.3より高く、しかし約1.7より低い場合、前記領域が過形成を構成する細胞を含むと決定することを含む、請求項69に記載の方法。

【請求項71】

前記方法が、異形成を検出し、そして、前記領域の放射強度と新形成を構成しない細胞の放射強度の比が約1.3を超える場合、前記領域が新形成を構成する細胞を含むと決定することが、前記領域の放射強度と新形成を構成しない細胞の放射強度の比が約1.7より高くしかし約2.5より低い場合、前記領域が異形成を構成する細胞を含むと決定することを含む、請求項69に記載の方法。

【請求項72】

前記方法が、癌細胞を検出し、そして、前記領域の放射強度と新形成を構成しない細胞の放射強度の比が約1.3を超える場合、前記領域が新形成を構成する細胞を含むと決定することが、前記領域の放射強度と新形成を構成しない細胞の放射強度の比が約2.5より高い場合、前記領域が癌細胞を構成する細胞を含むと決定することを含む、請求項69に記載の方法。

【請求項73】

トリプトファン放射を示す波長で自己蛍光を測定することが、約300nmから約400nmまでの範囲にある波長で自己蛍光を測定することを含む、請求項67に記載の方法。

【請求項74】

約300nmから約400nmまでの範囲にある波長で自己蛍光を測定することが、約330nmの波長で自己蛍光を測定することを含む、請求項73に記載の方法。

【請求項75】

約300nmから約400nmまでの範囲にある波長で自己蛍光を測定するこ
とが、細胞の自己蛍光放射を約300nmから約400nmまでの範囲にある帶
域幅で測定することを含む、請求項67に記載の方法。

【請求項76】

前記帯域幅が、約10nmの帯域幅である、請求項75に記載の方法。

【請求項77】

炎症の存在中で新形成を構成する細胞を含むことが推測される領域を紫外線に
暴露することが、炎症の存在中で新形成を構成する細胞を含むことが推測される
領域を290nmの波長を含む紫外線に暴露することを含む、請求項67に記載
の方法。

【請求項78】

前記細胞が、in vivoである、請求項67に記載の方法。

【請求項79】

新形成を構成すると推測される細胞を紫外線に暴露することが、新形成を構成
すると推測される細胞を、直接放出される、又はレンズ若しくは鏡を使用するこ
とによって、或いは内視鏡の生検鉗子口を通して挿入された光ファイバーの束又
は針を経由して紫外線のビームに暴露することを含む、請求項78に記載の方法
。

【請求項80】

前記細胞がin vitroである、請求項67に記載の方法。

【請求項81】

前記細胞が、セルウォッキングまたはセルブラッシングから得られる。請求項
80に記載の方法。

【請求項82】

前記細胞が、組織の生検から得られる、請求項80に記載の方法。

【請求項83】

新形成を構成すると推測される細胞が、新形成を構成しない細胞と同一の器官
の種類から得られる、請求項67に記載の方法。

【請求項84】

新形成を構成すると推測される細胞が、胃腸器官、肺、膀胱、輸尿管、頸管、皮膚、胆管、胰管、肝臓、腎臓、子宮、卵巣、卵管、口、喉、又は鼻咽喉から得られる、請求項67に記載の方法。

【請求項85】

前記新形成を構成すると推測される細胞が、食道、胃、小腸又は大腸から得られる、請求項84に記載の方法。

【請求項86】

前記細胞が、固定された細胞である、請求項67に記載の方法。

【請求項87】

前記細胞が、ホルマリンで固定された細胞である、請求項86に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****関連出願との相互参照**

本出願は、2000年3月10日に出願された先行する出願09/522,557の部分継続出願であり、当該先行する出願は引用文献として本願明細書に組み込まれる。

【0002】**発明の背景****(1) 発明の分野**

本発明は、一般的に異常な細胞の発達を検出することに、そして更に特定的には、細胞の自己蛍光を測定することによる新形成又は化成である細胞の検出に関する。

【0003】**(2) 関連技術の説明**

癌細胞の発達は、最終的に悪性の新形成となる進行性異常細胞の発達に関係している。このような進行の一つの例は、食道の腺癌の発達において起こると信じられている。この疾病の進行は、炎症及び細胞の損傷を生じさせる酸及び胆汁の食道への逆流によって開始される場合がある。化生 - 異形成 - 癌系列と呼ばれる一連の事象が起こりうる。食道の正常な扁平細胞上皮が円柱上皮によって置き換えられることとなり、これはバレット病と呼ばれる。その後、細胞は異形成となり、そしてこれは最終的に腺癌に進行する。概観については、Tselepis et al., Digestion 61:1-5, 2000を参照されたい。

【0004】

癌の発達における進行性の特質は、疾病の早期の検出を可能にすることができます、これは、癌患者の生存率が早期の検出に伴なって増加する限りは重要である。組織生検、X線走査、コンピューター断層撮影法、及び分子マーカーの使用を含む、数多くの侵襲性及び非侵襲性の方法が、癌の検出に使用されている。癌組織を検出するための試みの一つの非侵襲性の方法は、自己蛍光、即ち目標領域を紫

外線に暴露することによる蛍光放射の測定の使用を含む。自己蛍光は、目標中の蛍光団が一つの波長の光によって励起され、そしてその後より長い波長の光を放射する時に起こる。ヒト及び動物の組織は、組織中に天然に存在する蛍光団からの自己蛍光を示す。いくつかの内在性発色団が研究され、その中で、トリプトファン、コラーゲンIV型及びNADHが、正常、腺腫及び悪性組織において見られる三つの最大放射に対して原因となる可能性のある放射源として報告されている(Banerjee et al., Am. J. Med. Sci. 316: 220-226, 1998)。これらの組織の放射スペクトルの研究において、一つの放射ピークの強度が異形成及び癌腫に伴なって徐々に増加し、そしてトリプトファンが放射ピークを起こす可能性があることが報告された(同典拠)。然しながら、この初期の研究は、組織学的に異なる組織中に全ての放射ピークが存在するものであるか否か、そしてピークが新形成に伴なって何らかの変動を示すものであるか否かを決定することを意図したものであり、そして蛍光強度の測定はこの研究の目的ではなかった。従って、この初期の研究は、疾病の進行に伴なう増加した放射強度の観察を、新形成、又は新形成の進行の程度を検出するための方法として適用することができることについて示唆を与えていなかった。

【0005】

自己蛍光を測定することに基づく癌の検出方法は、放射性核種、モノクローナル抗体、又は外部の蛍光団のような外部剤の導入を回避するという長所を有する。外部剤の使用は、このような薬剤を使用する診断法のコストを増加させ、そしてこのような薬剤を投与し、そしてこれらを試験される組織中に組み込ませることを可能にするために必要な時間は、試験の時間及び複雑さを増加させる。外部剤は、また有害な反応の危険性をも導入する可能性がある。

【0006】

癌を検出するために自己蛍光を使用する初期の研究は、全体の組織の自己蛍光の測定を含んでいる。然しながら、このような方法は、主として全体の組織の各種の細胞外成分から放射される非特異的自己蛍光を測定する。自己蛍光を示す細胞外成分は、コラーゲン及びエラスチン、並びに血液及び血管のような非組織成分を含む。これらの細胞外成分は、正常から癌組織への進行中に変化するかもし

れないが、この変化は癌それ自体の変化を構成せず、結果として細胞外の自己蛍光の変化は、癌細胞の存在の特異的指標ではない。例えば、炎症の存在は、炎症細胞の存在のために癌細胞の誤った分類を引き起こす可能性がある。（Rama nujam et al., Photochem. Photobiol. 64: 720-735, 1996）。従って、癌組織を検出するための自己蛍光の使用は、これまで、癌を示す特異的細胞変化及び非特異的細胞外変化の間を識別することができないでいる。

【0007】

発明の概要

従って、本発明人は、ここに細胞特異的自己蛍光が、トリプトファン関連の自己蛍光を測定することによって測定することができ、そして正常な細胞のその細胞特異的自己蛍光の変化が、新形成の進行的発達中の異常細胞を検出することに対して、簡単な、そして予測可能な方法を与えることを発見することに成功した。

【0008】

従って、一つの態様において、本発明は新形成（neoplasia）を検出する方法を含む。この方法は、新形成を構成すると推測される細胞を紫外線に暴露し、そして自己蛍光を測定することを含む。測定される自己蛍光は、トリプトファンスペクトルを示す波長を含み、そしてこれは、約300から約400nmまでの波長の範囲にある。放射強度が、新形成を構成しない細胞の放射強度より高い場合、細胞は新形成であると決定される。新形成を構成しない細胞の放射強度に対して約1.3より高い放射強度の比を示す細胞は、新形成を構成するとみなされる。測定された細胞の自己蛍光は、新形成の程度が自己蛍光の量を評価することによって決定することができるよう、新形成の程度の増加に伴なって増加する。従って、細胞の自己蛍光の大きさは、新形成の重篤度の程度、即ち新形成が過形成（hyperplasia）から異形成（dysplasia）へ、癌へと進行が大きくなるに従って増加する。

【0009】

新形成を構成する細胞は、過形成、異形成又は癌を構成する可能性がある。新

形成を構成しない細胞のそれに対して約1.3ないし約1.7の自己蛍光の比を示す細胞は、過形成を構成するとみなされ；約1.7ないし約2.5の比を示す細胞は、異形成を構成するとみなされ、そして約2.5より高い比を示す細胞は、癌を構成するとみなされる。

【0010】

この態様の一つの側面において、自己蛍光は、約300から約400nmまでの範囲にある帯域幅で、好ましくは約100nmの帯域幅、更に好ましくは約50nmの帯域幅、更に好ましくは約30nmの帯域幅、更に好ましくは約20nmの帯域幅、そして最も好ましくは約10nm又はそれ以下の帯域幅で測定することができる。帯域幅が約330nmのトリプトファンのスペクトルのピークを含むことが好ましい。

【0011】

更なる態様において、本発明は、新形成細胞の検出のもう一つの方法を指向する。この方法は、新形成であると推測される細胞を紫外線に暴露し；細胞からの自己蛍光放射を、帯域幅20nmの帯域幅以外の帯域幅で測定し、ここにおいて帯域幅は約300から約400nmまでの範囲にあり；そして放射強度が、新形成を構成しない細胞の放射強度より高い場合、細胞が新形成を構成すると決定することを含む。好ましくは、新形成を構成しない細胞のそれとの放射強度の比が約1.3より高い場合、新形成を構成すると決定される。

【0012】

新形成の程度は、細胞の自己蛍光の大きさが新形成の重篤度の程度に伴なって増加するために、自己蛍光の大きさを評価することによって決定することができる。新形成を構成しない細胞のそれに対して、約1.3から約1.7までの自己蛍光放射の比を示す細胞は、過形成を構成するとみなされ；約1.7から約2.5までの比を示す細胞は、異形成を構成するとみなされ、そして約2.5より高い比を示す細胞は、癌を構成するとみなされる。

【0013】

本発明はもう一つの態様において、化生(metaplasia)を検出する方法を指向する。この方法は、化生を構成すると推測される細胞を紫外線に暴露

し、そして細胞からの自己蛍光放射をトリプトファン放射スペクトルを示す波長で測定すること含む。放射強度が化生を構成しない細胞のそれと異なる場合、細胞は化生を構成すると決定される。この態様の一つの側面において、この方法は、食道の扁平上皮細胞から円柱細胞への化生を検出する方法を指向する。このような食道の化生の殆んどは、ベレツツ病と診断される。食道の化生の扁平上皮細胞から円柱細胞への変化は、細胞の自己蛍光の減少をもたらすことが見出されている。従って、放射強度が、化生ではない細胞の放射強度より低い場合、細胞は食道の化生を構成すると決定される。好ましくは、化生ではない細胞の放射強度との放射強度の比が約0.65より低い場合、細胞は食道の化生を構成すると決定される。

【0014】

自己蛍光放射は、約300ないし約400nmにある波長で、好ましくは330nmで測定することができる。自己蛍光放射は、更に約300から約400nmまでの範囲にある帯域幅で測定することができ、帯域幅は好ましくは約100nm、更に好ましくは約50nm、更に好ましくは約30nm、そして最も好ましくは約10nm又はそれ以下である。帯域幅は、好ましくは約330nmのトリプトファンのスペクトルのピークを含む。

【0015】

本発明は、なおもう一つの態様において、炎症を検出する方法を指向する。この方法は、炎症を構成すると推測される細胞を紫外線に暴露し、そして細胞からの自己蛍光放射をトリプトファン放射スペクトルを示す波長で測定すること含む。炎症を構成しない細胞のそれとの放射強度の比が約0.75より低い場合、細胞は炎症を構成すると決定される。この方法は更に化生と炎症とを識別することができる。従って、この態様の一つの側面において、炎症を構成しない細胞のそれとの放射強度の比が約0.75より小さく、そして約0.65より大きい場合、細胞は炎症を構成すると決定される。

【0016】

自己蛍光放射は、約300ないし約400nmにある波長で、好ましくは330nmで測定することができる。自己蛍光放射は、更に約300ないし約400

nmの範囲にある帯域幅で測定することができ、帯域幅は、好ましくは約100 nm、更に好ましくは約50 nm、なお更に好ましくは約30 nm、そして最も好ましくは約10 nm又はそれ以下である。帯域幅は、好ましくは約330 nmのトリプトファンのスペクトルのピークを含む。

【0017】

本発明のもう一つの態様は、炎症の存在中の新形成を検出する方法を指向する。この方法は、炎症の存在中で新形成を構成する細胞を含むと推測される領域を紫外線に暴露し、そして自己蛍光をトリプトファン放射スペクトルを示す波長で測定すること含む。放射強度が新形成を構成しない細胞の放射強度より高い場合、領域は新形成を構成する細胞を含むと決定される。

【0018】

細胞の自己蛍光は、新形成の重篤度の程度に伴なって増加する。新形成を構成しない細胞のそれに対して、約1.3から約1.7までの自己蛍光放射の比を示す細胞は、過形成を構成するとみなされ；約1.7から約2.5までの比を示す細胞は、異形成を構成するとみなされ、そして約2.5より高い比を示す細胞は、癌を構成するとみなされる。

【0019】

自己蛍光放射は、約300ないし約400 nmにある波長で、好ましくは330 nmで測定することができる。自己蛍光放射は、更に約300ないし約400 nmの範囲にある帯域幅で測定することができ、ここにおいて帯域幅は、好ましくは約100 nm、更に好ましくは約50 nm、更に好ましくは約30 nm、更に好ましくは約20 nm、そして最も好ましくは約10 nm又はそれ以下である。帯域幅は、好ましくは約330 nmのトリプトファンのスペクトルのピークを含む。

【0020】

本発明の方法において、新形成を構成しない対照細胞と放射強度の比を計算することによって、放射強度が比較されることが好ましいが、然しながら試験される細胞の自己蛍光放射を対照細胞と比較するために使用される、当業者にとって使用可能いかなる方法も使用することができる。In vivo又はin v

in vitro であることができる細胞は、トリプトファン放射を示すある波長又は複数の波長における放射を誘導することが可能な波長に暴露される。細胞が *in vivo* である態様において、紫外線は、紫外線を直接放射、或いはレンズ若しくは鏡の使用することによって、又は内視鏡若しくは腹腔鏡の生検鉗子口を通して挿入された光ファイバーの束を経由して或いは針を経由して放射することを含む一つのアプローチを含む多くの方法のいずれによっても放射することができる。細胞が *in vitro* である態様において、細胞は、セルウォッシング（細胞洗浄、cell washing）又はセルブラッシング（細胞の刷毛による収集、cell brushing）或いは組織生検を含むいかなる方法によつても得ることができる。

【0021】

新形成を構成すると推測される細胞は、胃腸器官、肺、膀胱、輸尿管、頸管、皮膚、胆管、胰管、肝臓、腎臓、子宮、卵巣、卵管（fallopian tube）、口、喉、又は鼻咽喉から得ることができる。胃腸器官からの細胞は、典型的には食道及び大腸からのものである。細胞は、好ましくは、しかし必ずしもではないが、化生ではない細胞と同一の器官の種類から得られる。細胞は、活きた細胞又はホルマリンのようなもので固定されたものであることができる。

【0022】

本発明は、更に本発明の方法によって新形成細胞を検出するために構成された装置を指向する。

従って、本発明によって達成されるいくつかの利益の中で、癌細胞の早期検出を促進する細胞の自己蛍光を使用する新形成細胞を検出するための方法及び装置の提供；組織の癌性の変化を、癌に非特異性である細胞外変化と識別するための方法の提供；実施が簡単であり、そして組織の複雑な主観的な病理学的比較の必要を回避した、癌の早期検出のための方法の提供；化生の検出のための方法の提供；炎症を検出するための方法の提供；及び組織の炎症に影響されない信頼性を示す、癌の早期検出のための方法の提供；を記載することができる。

【0023】

発明の詳細な説明

本発明は、細胞の自己蛍光を使用する *in vitro* 及び *in vivo* の新形成を検出するための方法及び装置を指向する。新形成又は新形成組織或いは新形成を構成する細胞は、これが細胞又は組織が発達の異常な状態にあることを意味する。本明細書中で使用される「新形成」は、過形成、異形成及び癌を含むことを意図している。

【0024】

過形成は、細胞それ自体は一般的に正常であると考えられるが、組織中の細胞の数の異常な増加である。過形成は、多くの刺激のいずれによっての開始することができる。異形成は、異常な細胞の新形成的増殖であり、これは更に前癌であることができる。異形成の例は、腺腫及び扁平上皮細胞の異形成である。癌細胞は、複製に対する制御の喪失又は存在しないこと、侵襲性及び転移する能力の特性によって特徴付けられる悪性腫瘍中に存在する細胞である。

【0025】

本発明は、更に化生及び化生を構成する細胞の検出を包含する。「化生」又は「化生を構成する細胞」は、しばしば慢性の傷害に対する適応的反応における、一つの種類の成熟し分化した細胞種が、もう一つの成熟した細胞種で置換されることを表す。置換細胞種は、通常それが見出された組織中には存在しない。異常な細胞種は、食道の腺癌の発達において見られるような、化生から異形成へ、そして最終的に癌細胞へ進行する系列における、癌細胞の進行性の発達を反映することができる。

【0026】

本発明の方法は、細胞の自己蛍光の進行性の変化の測定に基づく。アミノ酸のトリプトファンは、細胞中に普通に見出され、これは強力な蛍光を示す。内在性の蛍光团のトリプトファンによる細胞の自己蛍光は、癌の進行に関する存在及び細胞の変化の程度の測定可能な標識であることが見出されている。コラーゲン、エラスチン、血管及び白血球を含む多くの細胞外の自己蛍光源が存在するが、トリプトファンは第1に細胞の成分であり、そしてトリプトファンによる細胞の自己蛍光の水準の測定は、癌の発達における進行性の変化における各種の段階の細胞の存在の、敏感な、特異的な、そして再現可能な評価を提供する。

【0027】

本明細書中で使用される「組織」の用語は、活きたヒト又は動物の組織若しくは器官、並びにスライドガラス上の細胞のフィルムの検査におけるような細胞診断学におけるもののような、ヒト又は動物から得られた組織の試料を含む *in vitro* 及び *in vivo* の組織を指す。このような組織は、ヒト又は動物の患者若しくは対象中に存在する又はこれらから得ることができる生物学的試料を構成する。

【0028】

本発明の方法及び装置は、初期癌、又は前癌、或いは異形成の検出に関連して使用することができる。

本発明の方法は、細胞からの自己蛍光を得るために、細胞を紫外線に暴露することを含む。紫外線源は、細胞の蛍光団のトリプトファンの励起を与えることが可能ないかなる紫外線源であることもできる。適当な紫外線源は、キセノンアーケランプ、水銀蒸気ランプ、金属ハロゲン化物ランプ、紫外線レーザー等を含む。

【0029】

トリプトファンの放射波長を励起し、そして誘導するために適した紫外線は、典型的には予期される放射波長より低い波長である。トリプトファン放射のスペクトルは、約 300 nm から 約 400 nm までの範囲にわたり、ピーク放射は約 330 nm である。従って、励起波長は好ましくは 400 nm 又はそれ以下、更に好ましくは 330 nm 及びそれ以下、更に好ましくは 300 nm 又はそれ以下、そして最も好ましくは 290 nm 又はそれ以下である波長を含む。本明細書中で使用される用語の“約”は、記載した値より 10 % 低い及び 10 % 多い値の範囲を包含することを意図し、従って、例えば約 300 nm は、270 nm ないし 330 nm を包含することを意図している。

【0030】

例えば細胞が、トリプトファンの蛍光放射を誘導するものである波長の範囲のいかなる波長の 2 倍で 2 個の光子に、又はトリプトファン励起波長の 3 倍で 3 個の光子に、等のように暴露される、パルスレーザーのような多光子励起を使用し

て自己蛍光を誘導することも更に可能である。従って、300 nmで励起する代わりに、2個の光子で600 nm、又は3個の光子で900 nmを使用することができます、そして290 nmの代わりに、2個の光子で580 nm、又は3個の光子で870 nmを使用することができる。

【0031】

細胞が異常であるか又は異常な組織からのものであるかを決定するための自己蛍光放射の測定の使用は、好ましくは対照細胞のそれに対する放射の比の計算に基づく。然しながら、典型的には任意の単位で測定された絶対値の比較、トリプトファンの放射に対応するスペクトル領域の曲線下面積の比較、トリプトファンの放射を示す单一の波長又は帯域幅に対する値の比較等のような試験細胞の放射を対照細胞と比較する、当業者にとって使用可能いかなる方法も使用することができる。

【0032】

トリプトファンの曲線を示す波長が使用される測定において、測定波長は、好ましくは約300 nmから約400 nmまでの範囲にある。好ましくは、波長はトリプトファンの放射のピーク、即ち約330 nmの近辺である。帯域幅が評価される測定において、帯域幅は、好ましくは約300 nmから約400 nmまでの範囲にあるトリプトファンの放射スペクトルを示す帯域幅である。好ましくは帯域幅は、約330 nmであるトリプトファンの放射のピークを包含するか、又は少なくともその近辺である。帯域幅は、好ましくは約100 nm、更に好ましくは約50 nm、更に好ましくは約30 nm、更に好ましくは約20 nm、そして最も好ましくは約10 nm又はそれ以下の帯域幅である。

【0033】

自己蛍光放射は、例えばフォトダイオードのようないかなる適当な蛍光検出器のよっても測定することができる。トリプトファンの蛍光放射のスペクトルの波長又はその範囲の帯域幅の蛍光放射は、当技術において公知の適当なフィルターを使用することによって識別することができる。例えば、商業的に入手可能なFabry-Perot型帯域フィルターのような、紫外線の充分に定義された帯域を透過し、そして選択された帯域の上及び下の波長で所望しない光線を拒絶す

る帯域フィルターを使用することができる。

【0034】

更に、本発明の方法を行うために、励起及び放射波長を選択することができる商業的に入手可能な分光蛍光計を使用することができる。

本発明の方法は、正常な組織と比較した組織から検出された自己蛍光の差に基づいて、細胞又は組織が異常であることを決定する。対照と比較したいずれもの変化の大きさ、並びに変化が対照と比較して増加又は減少のいずれであるかの両方が決定に関係する。このようにして、少なくとも正常より約30%ないし50%大きい、即ち正常細胞のその約1.3ないし約1.5の比の自己蛍光強度の増加が、過形成に伴なって起こることが見出されている。

【0035】

方法を簡略化する目的のために、ある値を区分点として選択することができ、そして区分点より上の値を示す細胞は異常とみなされ、一方区分点より下の値を示す細胞は、正常な、又は比較的疾病ではない細胞を構成するとみなされる。このような区分値の選択は、方法が偽陰性及び偽陽性を検出するものである方法に対する均衡の程度に関係する。偽陰性は、正常であると結論付けられたが、事実は細胞は異常である細胞であり、そして偽陽性は、異常であると結論付けられたが、事実は細胞は正常である細胞である。従って、低すぎる区分値は、より多い偽陽性を検出する傾向があるものであり、そして高すぎる区分値は、より多い偽陰性を検出する傾向があるものである。

【0036】

細胞又は組織が過形成を構成すると結論付けることに対する好ましい区分値は、正常より約30%以上の値、即ち1.3の比であり、やや好ましくは正常より40%以上の値、即ち1.4の比である。

【0037】

異形成を構成する細胞又は組織は、正常より少なくとも約60%ないし約100%上、即ち約1.6ないし約2.0の比の自己蛍光強度の増加を示す。方法を簡略化する目的のために、正常の約70%以上の値、即ち約1.7の比、そしてやや好ましくは、正常の約60%以上の値、即ち約1.6の比、又は正常の約80%

上の値、即ち約1.8の比を、細胞又は組織が異形成を構成すると結論付ける区分値として使用することができる。

【0038】

細胞又は組織が、好ましくは正常より少なくとも約150%上、即ち少なくとも約2.5又はそれ以上の比、そしてやや好ましくは正常の少なくとも200%上、即ち少なくとも約3.0又はそれ以上の比の区分点で自己蛍光の増加を示す場合、細胞又は組織が、本発明の方法の上記の簡略化によって癌を構成するとみなすことができる。

【0039】

上記で与えた値は、異常な細胞又は組織を示す最小の変化を反映することを意図し、そして過形成、異形成又は癌を構成する細胞又は組織は、上記に示したものよりも高い値を示すことは了解される。

【0040】

自己蛍光の減少も、更に細胞の異常な変化を反映する条件に伴なって起こる。このようにして、炎症が約25%又はそれ以上の自己蛍光強度の減少、即ち0.75又はそれ以下の比となることが見出されている。扁平上皮細胞から円柱細胞への変化を含む食道の化生も、更に自己蛍光強度の減少を生じさせ、そしてこの変化は、自己蛍光強度の約35%又はそれ以上の減少、即ち0.65又はそれ以下の比の量となる。

【0041】

本発明の方法は、更に食道の化生において見られるような扁平上皮細胞から円柱細胞への化生的変化以外の化生を検出するために使用することができる。細胞種の変化に伴なう一定の種類の化生に対する自己蛍光の変化は、当業者によって容易に確認することができ、そしてその後の与えられた試験細胞の試料中に化生が存在するか否かの決定は、このような初期の決定に基づく。

【0042】

殆んどの癌は、最初上皮層で発達する。癌が進行し、そして大きくなるに従つて、これらはより深い組織層に増殖し、そして血管又はリンパ管の近辺に達して、身体中に転移する。拡大は更に直接隣接する組織及び器官に対して起こること

ができる。癌の早期診断に対する鍵は、これらがまだ器官の上皮層に局在する時に、これらが転移する以前に悪性又は異形成増殖を検出することである。実際面では、これは、これらが肉眼によって見ることができる以前に、高い危険度の患者において新形成を検出することを可能にするものである。そして初期の新形成は治療され、そして潜在的に治癒することができる。

【0043】

腸のような組織の上皮表面を照射し、そしてトリプトファンの自己蛍光の評価が行われる場合、細胞の蛍光の測定は、非常に少ない細胞外分子からの蛍光を伴なって達成される。この蛍光を発生するために使用される低い波長において（約280 nmないし310 nmにおいて）、より深い組織層への実質的な透過は起こらない。これらの両方の因子が組み合わせられて、主として上皮細胞からのものである自己蛍光の測定が得られる。

【0044】

この技術は、そこに針又は套管針或いは他の器具によって光学的方法が取られる場合、或いはこのような病源からの組織の試料がそれを取り出した後で評価された場合、更に粘膜に達するより深い部分の、より高いトリプトファン含有率を伴なう悪性細胞を検出することを可能にするものである。多光子励起は、共焦点（顕微鏡）技術の使用と同様に、より深い層に達するもう一つの方法である。

【0045】

発癌中に、細胞の複製は制御なしに増加し；タンパク質を含む細胞内分子の合成は、それぞれの細胞が分割に備えるために促進される。顕微鏡的には、細胞はより濃厚に見え、進行的に細胞空間のより大きい部分を占めるより大きい濃厚な核及び核小体を伴ない、より高い核と細胞質の比となる。これらは、新形成の変化の存在及び程度に対して組織を評価する場合、病理学者によって使用される基準の中のものである。トリプトファンの自己蛍光の測定は、これらの要素の対比可能な決定を即時に行うこと可能にする。

【0046】

組織の一定体積中の細胞の密度は、新形成の進行に従って増加し、一方細胞外分子は、比例的により小さい空間を占める。コラーゲン及びエラスチンのような

細胞外分子の自己蛍光は、同時に減少することが予想されるものである。

【0047】

炎症は、感染、外傷、火傷、化学薬品による損傷、毒素、薬物及び免疫系の障害を含む多くの過程によって起こされる、活きた組織の非常に普通の状態である。炎症は、急性及び慢性の場合があり、これは、それ自体で存在することができ、異形成又は癌と共に存在することができ、そして更に癌の発達に導くことができる。炎症の存在は、異形成を伴なうバレット食道及び食道炎（食道の進行性の炎症）のように、異形成の検出の顕微鏡的方法を妨げることがありうる。従って、自己蛍光とは異なり、いかなる光学的診断方法においても、組織の炎症を排除することが可能であることが最も重要である。技術が炎症及び新形成の変化間を識別できない場合、癌の検出におけるその使用は制約されるものである。新形成及び炎症が自己蛍光において同様な変化を起こす場合、炎症の存在中で悪性腫瘍を検出することは、偽陽性の結果のために、非常に困難であるものとなるであろう。

【0048】

炎症は複合した過程である。組織の炎症は、血管の充血、微小血管の血液の流れの変化、タンパク質に富んだ流体の浸出及び白血球の移動を起こす。炎症部分における炎症の内在性化学媒介物質は、血管の浸透性及び炎症性反応を更に増加する。好中球、単球、好塩基球及び好酸球を含む循環する白血球が組織の部位に到着する。補体及びキニン系、ヒスタミン、インターロイキン1、腫瘍壊死因子並びにその他のものを含む体液媒介物質が炎症を起こした組織において見出される。T及びBリンパ球がこれら自体の中で、そして更に単球、マクロファージ、免疫グロブリン及び補体系と共に相互作用する。上皮損傷の程度もまた、異なっていてもよい。慢性の炎症において、リンパ球が細胞の反応の主体であることがある。ある場合には、マクロファージが融合して、巨大細胞及び肉芽腫を形成する。炎症部位の線維症は、瘢痕組織の形成に導き、そして構築を歪める。従って炎症は、時間、原因剤、宿主の反応及び治療に伴なって発達する、細胞、体液及び血流力学の変化の複合体である。

【0049】

炎症における複合した変化は、光学的検出を含むいかなる方法においても排除されなければならない。炎症組織は、浮腫となり、これは組織の光学的特性に影響する。トリプトファンによる組織の自己蛍光に対する炎症の全体的な影響は、恐らくは細胞密度を、そして従ってトリプトファン関連の自己蛍光を減少するものである炎症組織における過剰の流体の集積のために、僅かに減少するものである。

【0050】

上皮は、身体の内部及び外部表面の両方の細胞的被覆であり、脈管及び空洞の内膜を含む。上皮は、細胞の形及び層の数（重層又は多列）によって分類される。上皮細胞は、扁平型（皿型）、円柱状、移行型、立方体、纖毛を持つ型（線毛を保有）、錐形、棒型、等であることができる。これらの細胞の構造又は型の差は、光学的又はこれらと相互作用するいかなる電磁放射（光を含む）の他の物理学的特性に異なった影響を有するものである。このような差は、異なった細胞種を、顕微鏡又は肉眼を使用することなく、検出し、そして従って同定することを可能にするものである。従って光学的及び他の物理的技術は、一旦特定の細胞型又は上皮に伴なう変化が証明された場合には、上皮の変化を自動化された様式で検出するために使用することができる。これは、自己蛍光及び制約されるものではないが：時間変化蛍光、励起走査、弹性分散、ラマンスペクトル法及び光音響法を含む他の技術に適用されるものである。ある器官中に通常存在しない細胞種の検出は、しばしば疾病の存在を示す。一つの例は、バレット食道であり、ここにおいて食道の扁平上皮内膜は、円柱細胞によって置換されている（特異的腸管化生）。

【0051】

本発明の検出方法は、更に固定された組織試料に適用可能である。以下に例示するように、10%ホルマリン溶液で固定された細胞は、異常な細胞又は組織を、正常な細胞又は組織から識別することにおいて使用することができる自己蛍光をなお示す。本発明の方法が、ホルマリン、ホルムアルデヒド、酢酸、アセトン、三酸化クロム、エタノール、グルタルアルデヒド、塩化水銀、メタノール、四酸化オスミウム、ピクリン酸、二クロム酸カリウム、トリクロロ酢酸等のような

化学固定剤の使用、並びに冷凍乾燥、マイクロ波等による固定を含む細胞構造及び化学的組成を維持するいかなる方法によって固定された細胞に対しても適用可能であることが信じられている。

【0052】

本発明の方法は、悪性腫瘍の組織診断に細胞特異的自己蛍光を適用することに基づいている。全体の組織が約230nmないし350nm範囲の波長、例えば約290nmで励起された場合、組織から放射され、そして約330nmの放射波長で測定される自己蛍光は、主として細胞から得られ、そしてこれはアミノ酸のトリプトファンによる可能性が最も大きい。細胞のトリプトファン関連の自己蛍光の強度は、悪性度の増加に伴なって増加する正常、前癌、及び癌細胞において識別可能である。この方法は、トリプトファン関連の細胞の自己蛍光を使用して、癌及び早期癌を示す特異的な細胞の変化を検出する。この方法は、組織又は細胞の試料の励起スペクトル又は放射スペクトルのいずれかを得る光学的技術を使用して、初期癌又は癌を示す細胞のトリプトファン関連自己蛍光の変化を明らかにする。この方法は、複雑な波形の多点分析の代わりに、スペクトルのピークの単一の強度測定のみを含む明白な利益を有する。更に、この方法は悪性腫瘍の迅速な光学的検出をもたらす。

【0053】

細胞のトリプトファン関連自己蛍光は、悪性腫瘍の存在によって影響されると同様な方法では炎症症状の存在によって影響されない。炎症は、細胞のトリプトファン関連自己蛍光の減少を起こす。従って、炎症症状を持つ患者において癌に対してスクリーニングする場合、このような患者の炎症組織のために偽陽性の結果を得る危険度が減少する。

【0054】

この方法の別の態様において、同じ細胞のトリプトファン関連自己蛍光を多光子励起により得るために、励起波長の整数倍数が使用される。多光子励起法は、深部組織に浸透することに対して特に適しているが、しかし表面組織の検査にも更に適している。

【0055】

この方法は、広い範囲の器官から得られる細胞又は組織試料に対して適用可能である。例えば、この方法は皮膚のような器官の直接検査に、或いは内視鏡を通して双方向光ファイバープローブを使用することによって、食道、胃、小腸、大腸、肺、膀胱、輸尿管、頸管、皮膚、胆管、胰管、肝臓、腎臓、子宮、卵巣、卵管、口、喉、又は鼻咽喉のような内部器官を検査することに対して適用可能である。乳房組織及び他の固体器官は、光ファイバーの束を針又は套管針を経由して通すことによってこの方法を使用することが可能である。別の方法として、深部組織又は表面下の測定は、多光子励起又は共焦点顕微鏡技術を使用して達成することができる。

【0056】

更に、この方法は、外科医によって悪性腫瘍が切除されている時、即時に安全なふち(margin)を確定することに対して有用であり、従って典型的に行われているような、手術中に冷凍した切片が病理学者によって検査される必要が回避される。この方法は、更に自動化された細胞の測定、又は細胞計算に適用可能であり、ここにおいて組織ブラッシング、塗抹又は流体吸引によって得られた正常又は悪性と推測される組織の試料は、固定され又は固定されないで、自動化された細胞計算器でトリプトファン関連自己蛍光に対して検査される。従って、この方法を実行するために使用されるいかなる組織試料も、このような細胞診断学的試料採取方法によって得られた細胞診断学的試料であることができる。

【0057】

なお更に、この方法は、既知の染料、着色剤及び対比剤の使用との組み合わせで使用することに対して、細胞のトリプトファン関連自己蛍光のピークがこのような薬剤に影響されないままであるために適している。これらの薬剤は、例えばメチレンブルー及び医師によって例えば内視鏡法等において対比剤として普通に使用される他の染料又は着色剤を含む。対比剤は、病的な可能性のある部分を見出すことを援助する。更に、本明細書中に記載された方法は、これもトリプトファン関連自己蛍光のピークに影響しない外部の染料及び蛍光剤の使用と矛盾しない。従って、この方法の別の態様は、適當な対比剤を組織の試料又は検査される組織の部位に適用する工程を含み、そして次いで対比剤を使用して、病的可能性

のある部分を同定し、次いでこれを更にトリプトファン関連自己蛍光に対して検査する。

【0058】

なお更に、電荷結合装置をこの方法と組み合わせて使用して、検査された組織の視覚イメージを構築し、ここにおいて強度測定値は、例えば色彩でコードされたスケールに換算され、そしてビデオモニターに表示することができる。この方法のこのような適用は、組織のより大きい面積を同時に走査することを可能にする。

【0059】

本発明の好ましい態様は、以下の実施例において記載される。本明細書中の特許請求項の範囲に入る他の態様は、本明細書又は本明細書中で開示された本発明の実施を考慮することによって、当業者にとって明白となるものである。本明細書は、実施例と共に、特許請求項によって示される本発明の範囲及び思想に伴なう例示のみと考慮されることが意図されている。

【0060】

実施例1

この実施例は、トリプトファン放射に対応する細胞の自己蛍光のピークに対する最大波長を例示する。

【0061】

この以後の実施例における全ての蛍光の走査は、キセノンランプ及び二つの分光計を持つShimatzu Inc., Columbia, Marylandから入手した分光蛍光計を使用して行った。放射走査は、10 nm間隔で230 - 350 nmの励起で行った。自己蛍光強度は、励起波長の10 nm上ないし励起波長の2倍より10低い点まで、1 nm増分で、任意の単位で測定された。励起走査は、350 nm及び400 nmにおける放射で、220 nmないし放射波長より10 nm低い励起までで行われた。

【0062】

正常、異形成及び悪性の大腸組織を含む全体組織の試料の自己蛍光を研究した。組織の試料は大腸の過形成及び腺腫ポリープ、及び大腸からの対になった組織

試料を含み、それぞれの対は、正常な粘膜の試料及び腺癌又は同じ大腸からのポリープの試料を含んでいた。全ての組織の試料は、回収後、直ちに液体窒素中で冷凍され、そして -70°で保存された。分光分析の直前に、組織試料を室温で氷上で解凍し、そしてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で、7.4 の pH で加湿した。同様な形及び大きさの固体試料を、黒色のマット表面を有する特別に構築した試料保持器に設置し、そして分光蛍光計の内部に置いた。組織試料からのスペクトルを、デジタル的に記録し、そして後刻細胞から得られたスペクトルと比較した。

【0063】

腺癌、大腸のポリープ（過形成及び腺腫の両方）及び正常な大腸組織試料から得られた放射スペクトルは、一つは約 330 nm (A)、一つは約 365 nm (B)、一つは約 385 nm (C)、そして一つは約 450 nm (D) の四つの主要な放射ピーク又は最大値を明らかにした。図 1 は、310 nm で励起した腺腫ポリープからの例示的な放射スペクトルを示す。四つの主要な放射ピーク A - D の内の三つが、330 nm (A)、365 nm (B)、及び 450 nm (D) で観察された。励起波長の変化に伴なって、異なった放出ピークが出現したが、しかし四つの主要な放射ピーク A - D は、研究した励起波長の範囲にわたって観察された。食道、胃及び小腸の組織は、同様な結果を与えた。ピーク A は、以下において更に詳細に検討されるものである。以下において更に検討されるように、少なくとも比較的幅の広い約 450 nm におけるピーク D は、細胞外起源の可能性があり、そして従って正常な細胞から癌への発達に伴なう細胞特異的变化を示すものではない。

【0064】

表 1 は、正常 (n)、腺腫 (a) 及び癌 (t) の大腸組織に対する主要な放射最大値 A - D の分布の要約である。表 1 は、標準誤差 (SE) を伴なう平均波長、及びそれぞれの細胞種のそれぞれの最大値が起こった波長の範囲を記載している。一変数分散分析 (ANOVA) を、それぞれの組織種（例えば A_n、A_a 及び A_t）に対するそれぞれの最大値の波長分布について行い、表 1 の記載した P 値を得た。正常組織試料に対して、N = 20；腺腫ポリープに対して N = 20；悪

性組織に対して $N = 20$ である。

【0065】

【表1】

表 1

最大値	組織種	平均波長	S E	P 値	範囲 (nm)
A	n	331.7	0.5	0.857	328-336
	a	331.8	0.5		329-336
	t	331.4	0.6		326-336
B	n	365.9	0.6	0.303	360-370
	a	365.1	0.6		360-370
	t	364.7	0.5		361-368
C	n	385.4	1.0	0.463	380-391
	a	385.3	0.8		380-390
	t	386.6	0.6		384-392
D	n	454.5	1.5	0.472	442-460
	a	452.1	1.4		443-463
	t	452.9	1.3		448-463

【0066】

実施例2

この実施例は、培養された細胞における細胞特異的自己蛍光を例示する。

培養された細胞を増殖し、そして例えば特にコラーゲン及びエラスチンのようないくつかの非特異的細胞外発光源を含む、組織の自己蛍光からの細胞特異的自己蛍光の研究に使用した。培養した細胞は、いかなる細胞外物質も含んでいない。ヒト大腸腺癌に由来する細胞（HT29-18N2）を、単層及び多層で、密集的とみなされるまで覆いガラス上で増殖した。細胞を分光分析に先立って PBS で洗浄して、増殖培地を除去した。

【0067】

図2は、ヒト大腸腺癌（HT29-18N2）細胞の単層の放射スペクトルを示す。培養された細胞の 280 nm ないし 330 nm の励起は、約 330 nm でただ一つの主要なピーク S を明らかにした。多くの波長における励起にも関わらず、S は、280 nm ないし 700 nm の範囲にわたって観察される唯一の主要ピークであった。従って、細胞の自己蛍光のピークである S は、図1に示したよ

うな主要な組織のピークであるピークAと一致した。ヒトの乳房組織(MCF7)由来のもう一つの細胞培養物において、約330nmで同様なピークが観察された。上記の実施例1及び図1に記載されたピークB-Dに合致するピークは、細胞中で観察されなかった。

【0068】

異なった励起波長下で他の放射最大値が存在するか否かを見るために、異なる波長における光の吸収を測定する励起走査を行った。励起走査は、240nm及び290nmにおける最大値又は最強の光の吸収を明らかにした。235nmから270nmまでの細胞の励起は、約330nmにおけるSピーク、及び260nmにおける不完全に限定された放射を明らかにした。然しながら、このような低い励起波長は潜在的に有害であるために、260nmの放射はそれ以上研究されなかった。より高い波長の290nmにおける細胞の励起は、再びSピークのみを明らかにした。

【0069】

290nmの励起で研究された全ての培養された細胞、並びにヒトの大腸、食道及び胃を含む正常な及び悪性の固体組織から分離された細胞は、Sピークを示した。他の放射ピークは見られなかった。以前に、組織のスペクトルの約450nmにおいて観察される幅広のDピークが、細胞中に存在するNADH分子によることが提案された。然しながら、研究された培養された又は抽出された細胞の自己蛍光スペクトルは、Dに合致する放射のピークを示さず、従ってD蛍光ピークは細胞が発光源ではないことを示している。

【0070】

実施例3

この実施例は、細胞において観察されたSピークの原因となることができる、トリプトファンの放射及び励起スペクトルを例示する。

【0071】

いくつかの既知の蛍光団の放射及び励起スペクトルを290nmの励起波長で調査した。蛍光団は、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、コラーゲンIV型、エラスチン、NADH、及びFADを含んでいた。水溶液中のトリプ

トファンのスペクトルのみが、約330 nmの細胞の自己蛍光Sピーク、及び約330 nmの組織の自己蛍光ピークAに合致するピークを生じた。

【0072】

図3は、290 nmの励起波長における、水溶液中のトリプトファンの放射スペクトルを示す。従って、トリプトファンは、細胞の自己蛍光Sピークの主たる発光源であり、そして組織の自己蛍光Aピークに合致するものである高い可能性がある。

【0073】

更に、NADHの放射スペクトル(示されていない)は、450 nmではなく、460 nmのピークを示した。これらの結果は、約450 nmにおいて組織のスペクトルで観察される幅広のDピークが、NADHによる可能性がないという考えを更に支持する。従って、癌を検出するための幅広なDピークを使用する既知の方法は、Dピークが細胞のマーカーNADHに相關していると言う謝った仮説に基づいている可能性がある。それよりも、Dピークは、細胞外起源であり、そして従って癌に伴なう細胞の変化に対して、非特異的である可能性がある。更に、ピークDの大きさは、恐らくは癌中の細胞と細胞外組織のより高い比によって、悪性度に伴なって低下するように見受けられる。

【0074】

実施例4

この実施例は、癌細胞中の約330 nmにおける自己蛍光の増加が、細胞内の変化によるもので、そして癌組織中のより大きい細胞密度によっては説明されないことを証明する。

【0075】

細胞を、大腸及び他の器官からの正常及び悪性組織の細胞外物質から分離した。組織から分離され、そして非蛍光性の溶液中に懸濁された細胞を、光学顕微鏡で確認し、そして次いで分光分析用の石英キュベットに入れた。それぞれの細胞の試料の一部をトリパンブルーで染色し、そして生存細胞及び細胞の合計数(1立方ミリメートル当たりの細胞)を既知の顕微鏡技術を使用して推定した。試料から放射される自己蛍光の強度を、290 nmの励起波長で330 nmで測定し

た。それぞれの細胞の330 nmにおける蛍光の強度を推定された細胞の数で割った。次いで正常及び悪性細胞からの結果を比較した。

【0076】

図4は、正常な大腸粘膜（正常細胞）から得られた細胞及び大腸の腺癌（癌細胞）からの細胞の放射スペクトルを示す。スペクトルは、両方の細胞種に対して約330 nmのSピークを示す。他の放射ピークは観察されず、そしてスペクトルは、同一励起波長で同じ種類の培養された細胞から得られたものと同一であった。図4は、更に癌細胞のスペクトル中の約330 nmにおけるピークによって示される自己蛍光の強度が、正常細胞のスペクトル中で観察されるものより実質的に高いことを示す。

【0077】

表2は、大腸及び食道から抽出された正常及び悪性細胞の、細胞当たりの任意の単位の平均自己蛍光を示す。表2は、細胞当たりの平均自己蛍光が、悪性細胞において正常細胞より大きいことを示す。

【0078】

【表2】

表2

細胞当たりの平均自己蛍光/mm ³		
組織	大腸	食道
正常	4.5	4.9
悪性	13.4	18.2
比：悪性/正常	3	3.7

【0079】

実施例5

この実施例は、固定された細胞が、新形成を検出するために使用することがで

きる自己蛍光を示すことを証明する。

【0080】

培養されたヒト大腸腺癌細胞(HT29-18N2)を、覆いガラス上で増殖し、そして次いで固定した。次いで細胞を密閉した箱の中で室温に保った。細胞を10%ホルマリン溶液中で固定した。固定後、幾つかの時点で290nmの励起波長で放射スペクトルを得て、そして約330nmにおけるピーク自己蛍光強度を測定した。分光分析は、固定後の次の時間：50分、1日、8日、14日及び75日目に行われた。

【0081】

表3は、培養された細胞の、約330nmの放射波長における、固定後の異なった時期に測定された任意の単位で与えられたピーク強度を示す。結果は、細胞の自己蛍光、そして更に特定的には、約330nmにおける細胞のトリプトファン関連ピークが、細胞が標準的な固定剤で固定された後、室温で何日も維持されることを示す。

【0082】

【表3】

表3

時間	強度
0 (基線－ ホルマリンなし)	5.3
50分	4.5
1日	6.4
8日	7.0
14日	5.8
75日	4.9

【0083】

同様な実験を組織から抽出された細胞で行った。細胞を10%ホルマリン溶液中でまた固定し、そして先に記載したように分光分析を行った。細胞のトリプトファン関連ピークの絶対強度は変化したが、正常及び悪性細胞間の強度の差は維持された。固定する前、約330nmにおける悪性細胞の強度は、正常細胞のそれより71%大きかった。固定後、同じ悪性細胞の強度は、正常細胞のそれより125%大きかった。従って、ホルマリンによる固定は、トリプトファン関連の自己蛍光を保存するだけでなく、細胞試料は正常及び悪性細胞間の自己蛍光強度の差を増幅するように見受けられる。これは、トリプトファン関連の自己蛍光が自動化された細胞診断学に使用することができる事を示唆する。例えば、器官から得られた細胞塗沫をホルマリン中で固定し、そして細胞の自己蛍光を測定する施設に室温で輸送し、そして細胞当たりの自己蛍光に対する値を得ることができる。

【0084】

実施例6

この実施例は、自己蛍光に伴なうトリプトファンの細胞の発光源を例示する。細胞を大腸の組織から分離し、ホモジナイズし、そして超音波処理して、細胞壁を破壊し、そして遠心して、細胞質ゾルの上清及び膜の試料を製造した。膜の試料を分離し、そして溶解し、そして次いで細胞質ゾルの上清及び膜の試料の両方を分光分析にかけた。約330nmにおけるトリプトファン関連ピークが両方の画分で観察されたが、しかし膜の画分において更に大きい強度であった。

【0085】

図5は、正常な大腸の組織から得られた細胞由来の膜及び細胞質ゾル画分の放射スペクトルを示す。約330nmで観察されたピークは、上記で更に詳細に検討したようにトリプトファンによることが最も可能性がある。従って、トリプトファン関連ピークは、主として細胞の膜成分中の発光源源が起源であるように見受けられる。このような発光源は、膜関連のタンパク質、タンパク質の群、又は他のトリプトファン含有分子である可能性がある。このような分子又は複数の分子が癌及び前癌細胞中に増加した量で存在し、従ってこのような細胞のトリプトファン関連自己蛍光の強度の増加の原因であることが信じられている。

【0086】

この細胞のトリプトファン関連自己蛍光の増加は、約200 nmないし約400 nmの励起波長で観察可能である。然しながら、280 nmないし約300 nmの波長を有する光線による励起が特に適している。280 nmないし300 nmの範囲外の励起波長において、例えば310 nmないし320 nmでの励起により、約330 nmの細胞のトリプトファン関連ピークに加えて、他の放射ピークが現れるが、しかしピークはなお検出可能であり、そして強度測定を行うことは可能である。適当な励起波長で全体の組織が研究された場合も、組織内の細胞からの自己蛍光のみが観察される。これは、選択的な光学的窓を作りだし、これを通して、細胞外蛍光団の妨害を受けずに細胞の自己蛍光を観察することができる。従って、約230 nmないし約350 nmの範囲の波長における励起で観察される、約330 nmのピークにおける細胞のトリプトファン関連自己蛍光の増加は、悪性組織の組織の自己蛍光から識別される。

【0087】

実施例7

この実施例は、食道及び胃腸管の組織中の化生、過形成、異形成又は癌を構成する異常細胞の検出を例示する。

【0088】

組織の試料を食道、胃、大腸及び小腸から得た。正常、前癌状態、即ち異形成、悪性及び炎症組織の試料を得て、そして290 nmの励起波長を使用して約330 nmにおけるトリプトファン関連ピークの強度を測定した。正常組織に対する疾病の組織の正規化した強度の比を計算した。

【0089】

表4は、食道組織に対する平均強度比±平均の標準誤差(S E M)を示す。表5は、追加の組織の試料を使用した研究の繰り返しを、95%信頼区間の追加の計算を伴なって示す。図6は、研究された異なった種類の食道の組織に対するトリプトファン関連ピークの自己蛍光比を示す。その大多数がバレット病と考えられる扁平上皮細胞から円柱細胞への食道の化生は、潜在的に悪性腫瘍に発達することができる。食道炎は、炎症の状態である。異形成は、悪性腫瘍に進行するこ

とができる異常な状態であり、そして癌腫は、上皮細胞の癌である。

【0090】

表4及び5に示した結果は、約330nmにおける自己蛍光は、炎症によって僅かに減少し、対照的に、軽度の異形成及び癌腫に対する強度比は増加することを示している。群間の差は、分散分析を使用して、有意であることが見出された。従って、単一の強度測定は、炎症組織及び食道の化生（強度比の減少を伴なう）、並びに異形成及び悪性組織（強度比の増加を伴なう）を、正常な組織から識別する。これは、炎症の症状を持つ患者の癌の監視中の偽陽性の結果を回避するものである。

【0091】

【表4】

表4

組織	N	平均強度比±S E M
食道化生	17	0.62 ±0.07
軽度の異形成	8	2.01 ±0.29
癌腫	7	3.36 ±1.03
食道（炎症）	4	0.63 ±0.06

【0092】

群間の差は有意であった： $p = 0.0002$ (ANOVA)。

【0093】

【表5】

表 5

組織	N	平均強度比±S E M	95%信頼区間
食道化生	10	0.63±0.04	0.53 - 0.73
軽度の異形成	6	1.83±0.26	1.17 - 2.49
癌	7	3.18±0.94	0.89 - 5.48
食道(炎症)	5	0.76±0.07	0.57 - 0.95

【0094】

群間の差は有意であった: $p = 0.0027$ (ANOVA)。

表6は、大腸組織に対する平均強度比±平均の標準誤差(S E M)を示す。表7は、追加の組織試料を使用した研究の繰り返しを、95%信頼区間の追加の計算を伴なって示す。図7は、研究された異なった種類の大腸の組織に対するトリプトファン関連ピークの自己蛍光比を示す。過形成ポリープは、悪性の可能性を欠く成長物である。これらは倍数体であるが、しかし正常な細胞を含む。腺腫性ポリープは悪性の可能性を持つ良性の成長物であり、そして“非典型的”である細胞を含む。検出された場合、腺腫性ポリープは除去されるべきであるが、しかしこれらは癌性ではない。然しながら、除去されずに残した場合、腺腫性ポリープは癌に発達することができる。潰瘍性大腸炎及びクローン病を含む炎症性腸疾患(IBD)は、癌の増加する危険度を伴なう慢性の炎症性症状である。

【0095】

表6及び7において、結果は、先に記載したような炎症にかかった食道の組織で得られた結果と同様に、炎症(IBD)が約330nmにおける細胞の自己蛍光強度を増加せず、しかし代わりに僅かに減少させていることを示している。対照的に、過形成の組織に対する強度比は、正常な粘膜に対するものより高い。比は、腺腫及び癌に対して段階的に増加する。群間の差は、分散分析を使用して有

意であることが見出された。従って、単一の強度測定は、炎症にかかった大腸組織（強度比の減少を伴なう）、並びに過形成、異形成及び悪性組織（強度比の増加を伴なう）を、正常な組織から識別する。これは、IBDを伴なう患者の癌の監視中の偽陽性の結果を回避するものである。

【0096】

【表6】

表6

組織	N	平均強度比±SEM
過形成ポリープ	9	1.48±0.16
腺腫ポリープ	22	2.13±0.16
癌腫	11	3.81±0.71
IBD	15	0.9±0.04

【0097】

群間の差は有意であった： $p = 0.001$ (ANOVA)。

【0098】

【表7】

表7

組織	N	平均強度比±S E M	95%信頼区間
過形成ポリープ	8	1.44±0.12	1.15-1.72
腺腫ポリープ	15	1.88±0.12	1.63-2.13
癌	10	3.08±0.55	1.84-4.33
I B D	9	0.82±0.07	0.67-0.97

【0099】

群間の差は有意であった： $p < 0.0001$ (ANOVA)。

実施例8

この実施例は、癌を検出するための励起走査の使用を例示する。

【0100】

励起走査において、先に記載した放射走査とは反対に、放射波長は一定に保たれ、そして励起波長を変化させた。トリプトファン、培養細胞、及び組織から抽出された細胞に対する励起走査は、全て 290 nm における主要な励起のピークを明らかにした。このピークは、更に全体の組織でも観察され、そして先に記載したような放射走査を使用したものと同様な方法で癌の存在を明らかにする。

【0101】

特定的には、正常、異形成及び癌並びに食道組織の励起スペクトルを、励起波長を 220 nm から 340 nm まで変化させることによって得た。主要なトリプトファン関連励起ピークの単一の強度測定を、290 nm において、それぞれの組織種に対して得た。それぞれの組織種に対する平均強度の測定値を、正常組織の 290 nm における強度測定値（平均強度 = 1）に対して正規化した。平均放射強度の比は：食道の化生（バレット病）の軽度の異形成に対して 1.42 ± 0.35 (S E) (N = 6)；及び腺癌に対して 4.03 ± 1.17 (N = 9) であった。従って、結果は、細胞のトリプトファン関連励起スペクトルの単一の強

度測定は、癌の組織を異形成及び正常組織から識別することを示す。

【0102】

本明細書中に引用された全ての参考文献は、本明細書中に参考文献として援用される。本明細書中の参考文献の検討は、単にその著者によって行われた主張を要約することを意図し、そして従来の技術を構成するいかなる参考文献をも承認するものではない。本出願人は、引用した文献の正確さ及び適切さを吟味する権利を留保する。

【0103】

上記を考慮して、本発明の幾つかの利益が達成され、そして他の利益のある結果が得られることは了解されるものである。

各種の変更が、上記の方法及び装置において本発明の範囲から逸脱することなく行うことができるために、上記の説明に含まれ、そして付属する図面に示された全ての内容は、例示であり、そして制約する意味がないと解釈されるべきであることを意図している。

【図面の簡単な説明】

【図1】 組織試料の例示的な自己蛍光放射スペクトルを例示する。

【図2】 培養された細胞の放射スペクトルを例示する。

【図3】 水溶液中のトリプトファンの放射スペクトルを例示する。

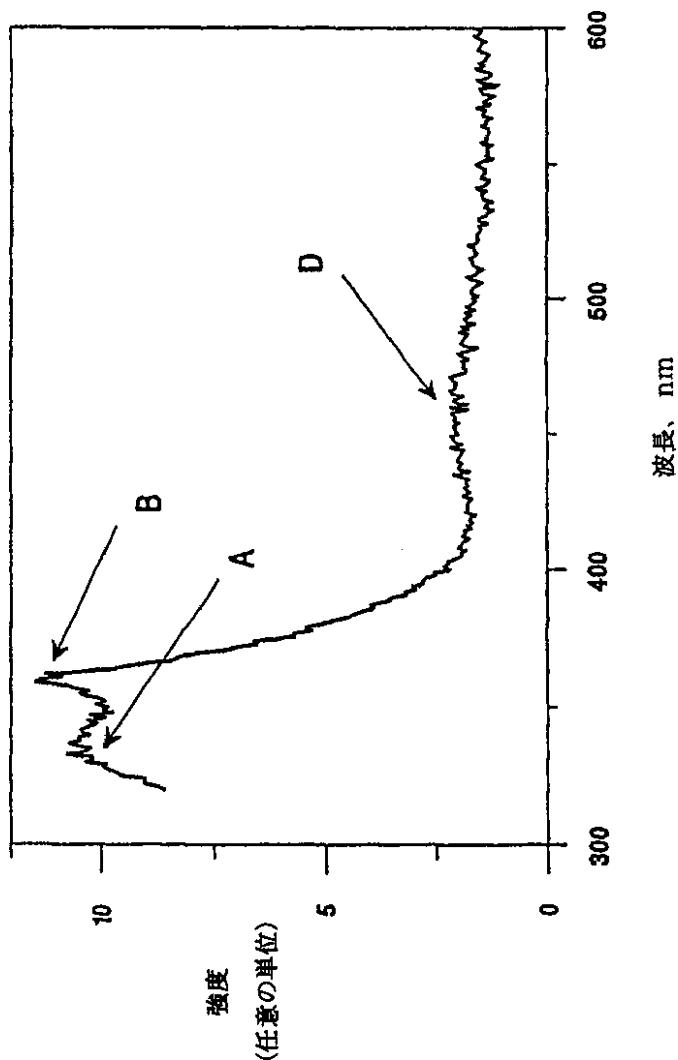
【図4】 正常な大腸細胞及び癌の大腸細胞の放射スペクトルを例示する。

【図5】 正常な大腸の組織から得られた細胞由来の膜及び細胞質ゾル画分の放射スペクトルを例示する。

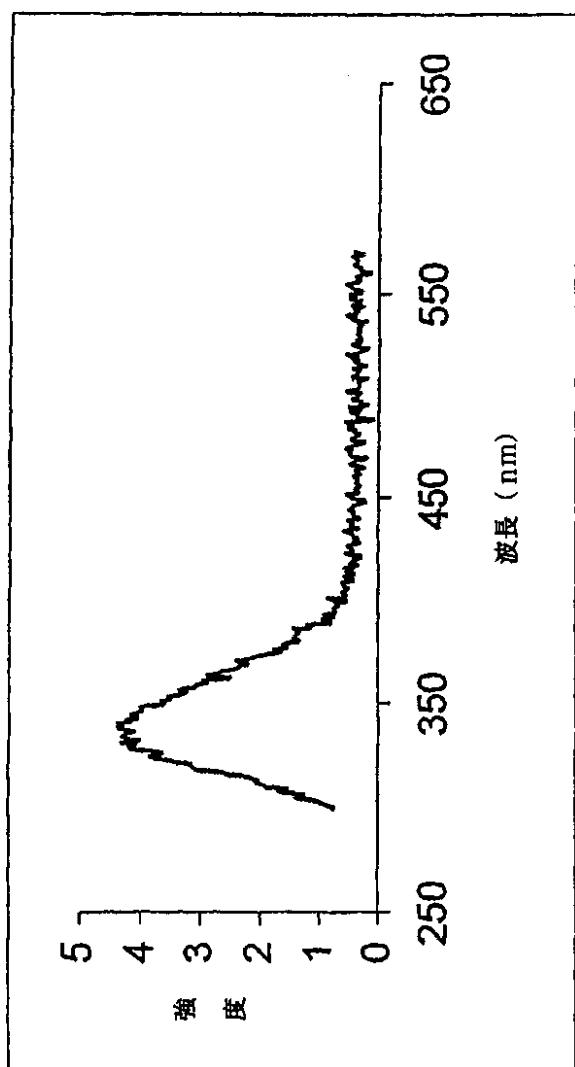
【図6】 異なった種類の食道の組織のトリプトファン関連の放射のピークの自己蛍光の比を例示する。

【図7】 研究された異なった種類の大腸組織のトリプトファン関連のピークの自己蛍光の比を例示する。

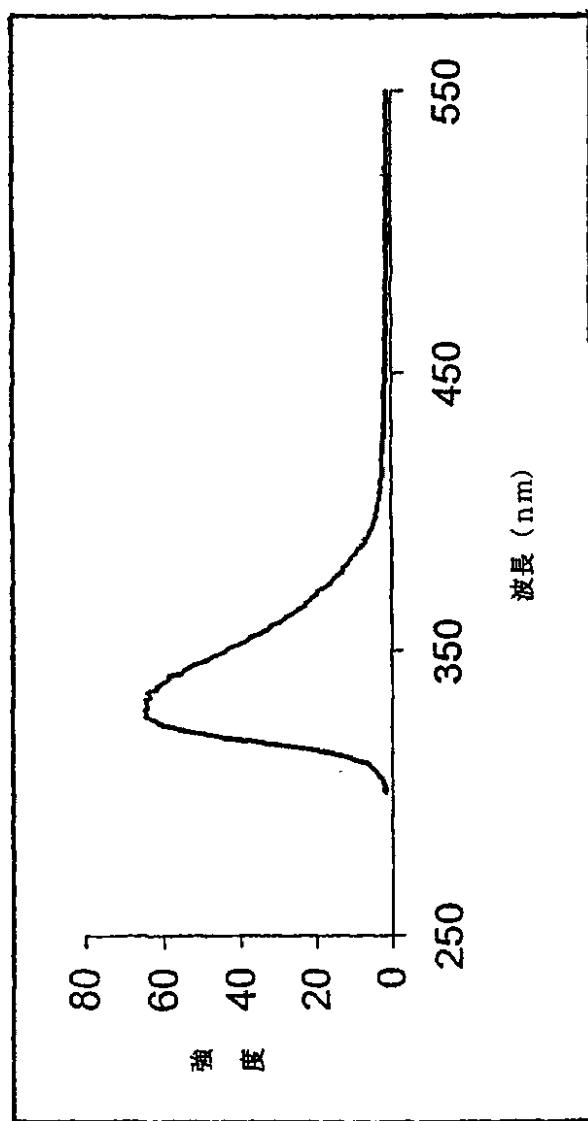
【図1】



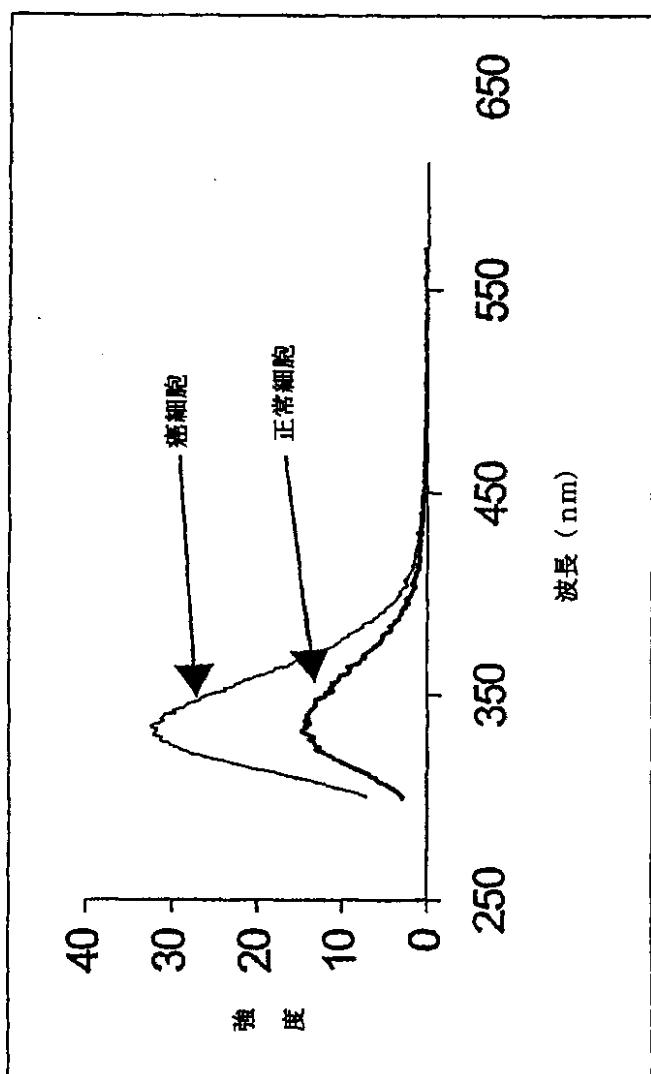
【図2】



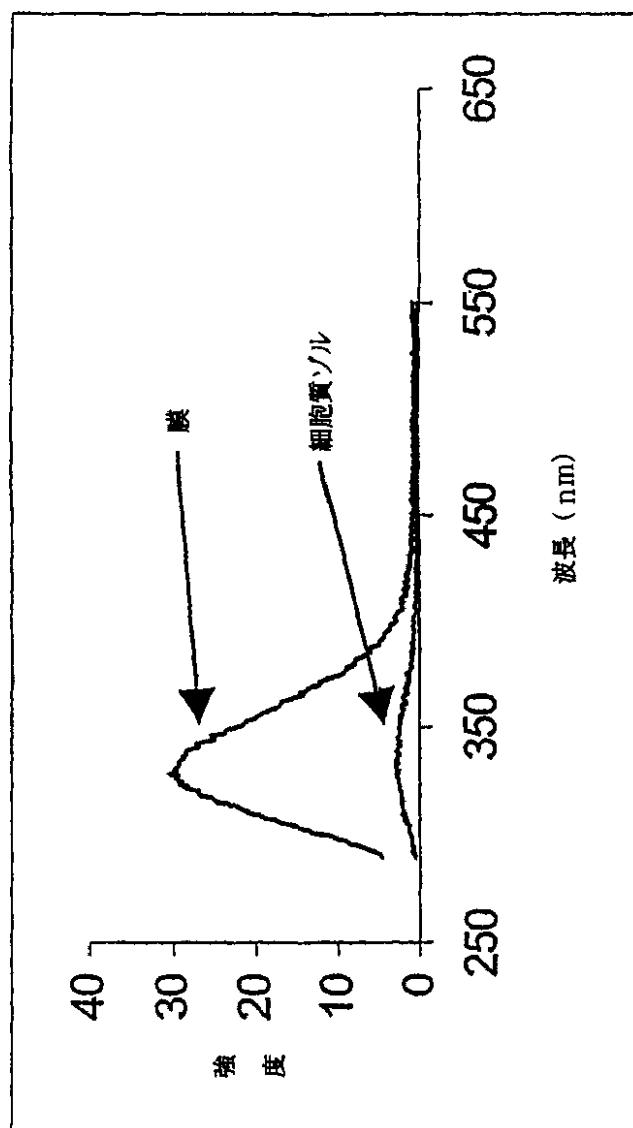
【図3】



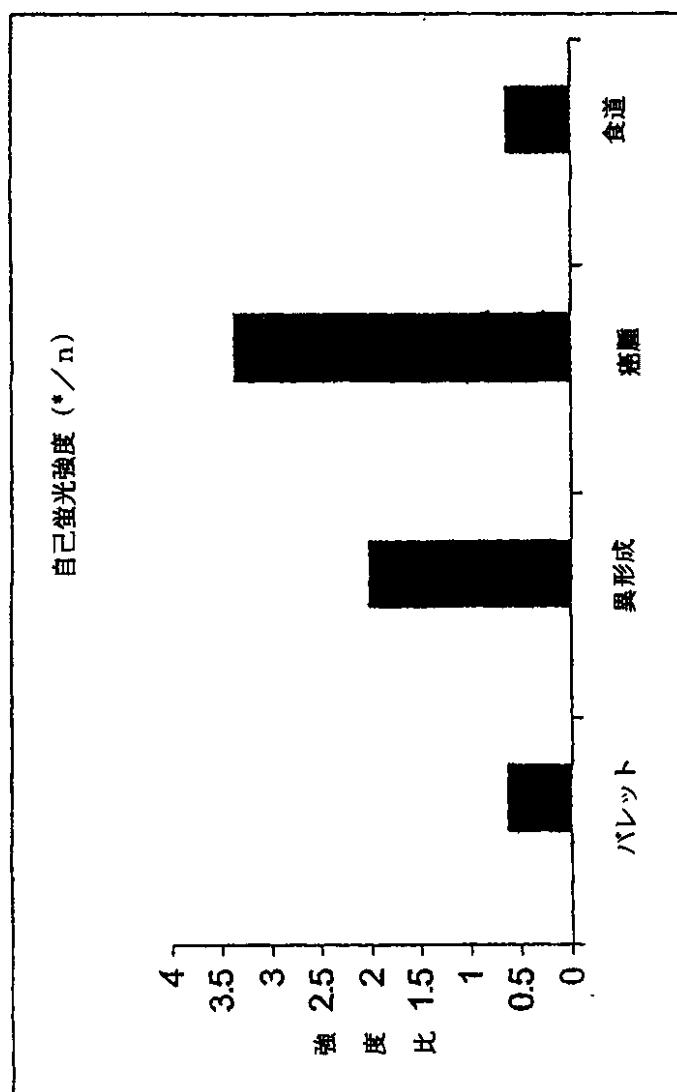
【図4】



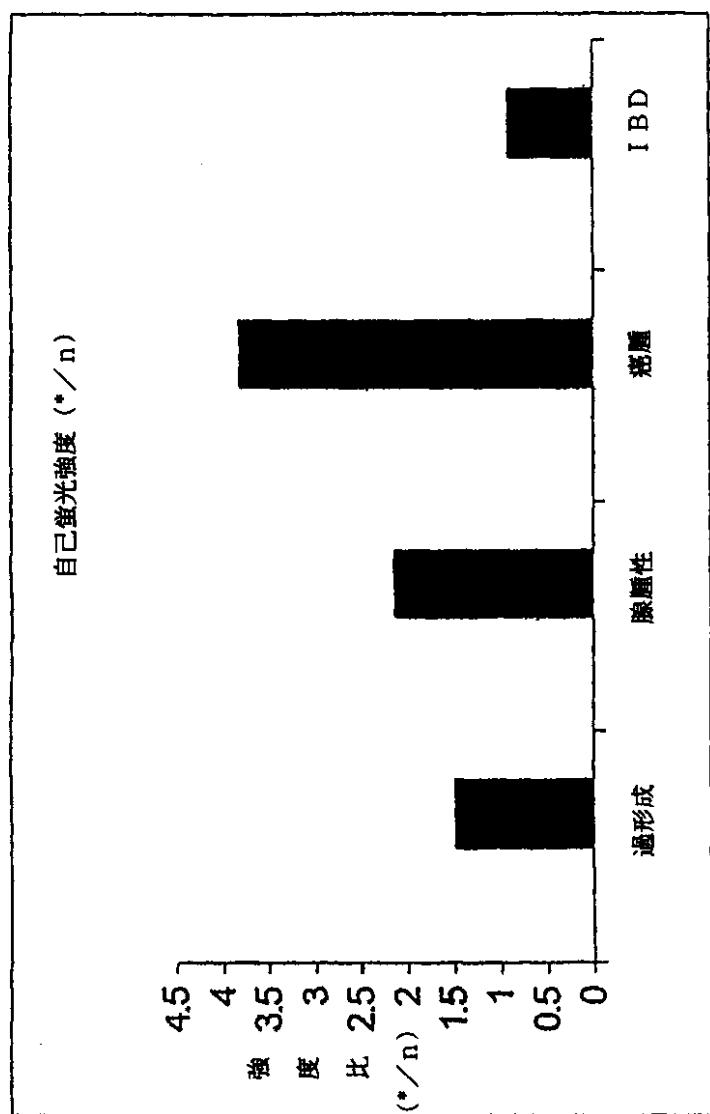
【図5】



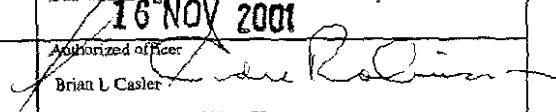
【図6】



【図7】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/07589	FILE COPY
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC(7) : A 61B 6/00 US CL : 600/431			
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. : 600/431,473,475,476,477,310; 250/458 1,461,2, 484,2			
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	US 5,759,081 A (Alfano et al.) 23 June 1998, see entire document and Note Table 1, col. 8, a ratio of 1.37 is given for malignant tissue	1-87	
A	US 5,419,323 A (Kitwell et al.) 30 May 1995, see entire document	1-87	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.	
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>			
<p>Date of the actual completion of the international search 02 July 2001 (02-07-2001)</p> <p>Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230</p>		<p>Date of mailing of the international search report 16 NOV 2001</p> <p>Authorized officer Brian L Casler</p> <p>Telephone No. 703-308-0858</p> 	

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

フロントページの続き

(51) Int.CI. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ド ⁸ (参考)
G 0 1 N	21/64	G 0 1 N	Z
	33/48		M
(81) 指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C O , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W	F タ-ム(参考) 2G043 AA03 BA16 EA01 FA01 FA02 FA05 FA06 HA01 HA02 HA05 KA02 KA03 KA05 KA08 KA09 LA03 NA01 2G045 AA26 CB01 CB02 FA11 4B063 QA01 QA19 QQ08 QR77 QS40 QX02 4C061 GG15 HH51 4C085 HH11 LL05 LL09 LL11 LL12 LL18	

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003533674A5	公开(公告)日	2008-04-24
申请号	JP2001568033	申请日	2001-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	大巴车的旗帜啧啧		
申请(专利权)人(译)	Basuka-Banaji		
当前申请(专利权)人(译)	Basuka-Banaji		
[标]发明人	バスカーバナージー		
发明人	バスカーバナージー		
IPC分类号	G01N33/483 A61B1/00 A61K49/00 C12Q1/02 G01N21/64 G01N33/48		
CPC分类号	G01N33/533 G01N21/6456 A61B5/4233 A61B5/0071 A61B5/0084 A61B5/4331 A61B5/441 A61B5 /4375 G01N33/5005 A61B5/0075 G01N21/6486		
F1分类号	G01N33/483.C A61B1/00.300.D A61B1/00.334.D A61K49/00.A C12Q1/02 G01N21/64.Z G01N33/48.M		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/EA01 2G043/FA01 2G043/FA02 2G043/FA05 2G043/FA06 2G043 /HA01 2G043/HA02 2G043/HA05 2G043/KA02 2G043/KA03 2G043/KA05 2G043/KA08 2G043/KA09 2G043/LA03 2G043/NA01 2G045/AA26 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/FA11 4B063/QA01 4B063 /QA19 4B063/QQ08 4B063/QR77 4B063/QS40 4B063/QX02 4C061/GG15 4C061/HH51 4C085/HH11 4C085/LL05 4C085/LL09 4C085/LL11 4C085/LL12 4C085/LL18		
优先权	09/522557 2000-03-10 US		
其他公开文献	JP2003533674A		

摘要(译)

[化学1] 公开了基于色氨酸相关自发荧光的测量可用于检测异常细胞和组织的方法。该方法包括将细胞暴露于紫外线下；在表现出色氨酸辐射的波长下测量自发荧光；以及确定细胞构成了超出正常组织的辐射强度的异常组织。这种方法可以检测和区分化生，增生，异常增生和癌症中异常的细胞发育。该方法还可以检测炎症的存在。