

(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2004-518124

(P2004-518124A)

(43) 公表日 平成16年6月17日(2004.6.17)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 21/64

A 6 1 B 1/00

GO 1 N 21/27

F I

GO 1 N 21/64

A 6 1 B 1/00

A 6 1 B 1/00

GO 1 N 21/27

Z

3 0 0 B

3 0 0 D

B

テーマコード (参考)

2 GO 4 3

2 GO 5 9

4 CO 6 1

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 91 頁)

(21) 出願番号 特願2002-557989 (P2002-557989)
 (86) (22) 出願日 平成14年1月18日 (2002.1.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年7月11日 (2003.7.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/003094
 (87) 国際公開番号 W02002/057757
 (87) 国際公開日 平成14年7月25日 (2002.7.25)
 (31) 優先権主張番号 09/766, 879
 (32) 優先日 平成13年1月19日 (2001.1.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

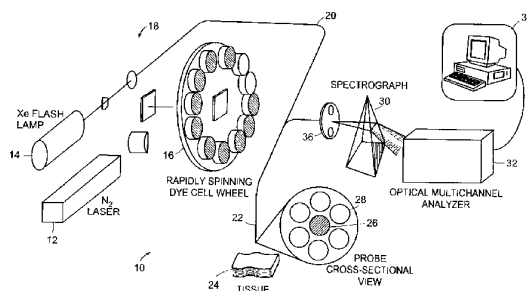
(71) 出願人 591275056
 マサチューセッツ・インスチテュート・オブ
 ・テクノロジー
 MASSACHUSETTS INSTI
 TUTE OF TECHNOLOGY
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州0213
 9・ケンブリッジ・マサチューセッツアベニ
 ュー77
 (74) 代理人 100060782
 弁理士 小田島 平吉
 (72) 発明者 ジョーガク・ディ、アイリーン
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州0172
 0アクトン・ベリーレーン2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織の特徴を測定するための蛍光、反射率および光散乱による分光学的システムおよび方法

(57) 【要約】

本発明は、複数の分光システムおよび分光学的方法を使用して、病気の診断に有効な組織の特徴を測定する。好ましい実施形態では、蛍光スペクトルと、反射率スペクトルと、散乱光スペクトルとの組合せを測定しかつ処理して、組織の生化学的、構造的および形態学的状態を得る。本発明の方法およびシステムは、体内および体外から、組織内の癌の早期検出を行なうのに特に有効に使用できる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

蛍光および組織からの複数の波長の反射光を収集しかつ収集された光を検出する光収集システムを設け、
検出された光からの波長の関数として蛍光表現および散乱光表現を形成し、
蛍光表現および散乱光表現がなされた組織層の特徴を決定する段階を有することを特徴とする、スペクトルデータを分析して組織層の構造を測定する方法。

【請求項 2】

前記蛍光表現を用いて組織の 1 つ以上の成分を決定する段階を更に有することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記散乱光表現を用いて組織内の構造のサイズを決定する段階を更に有することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記検出された光の周期的成分を測定して散乱光表現を形成することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

拡散反射光スペクトルおよび光散乱スペクトルを分析する段階を更に有することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

反射光標準および蛍光標準を用いて較正する段階を更に有することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

異なる散乱サイズをもつルックアップテーブルを創出する段階を更に有することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

前記蛍光スペクトルを補正して固有蛍光スペクトルを得る段階を更に有することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

前記光散乱スペクトルを変形させかつスペクトル成分を除去して組織成分のサイズ分布を決定する段階を更に有することを特徴とする請求項 5 記載の方法。

【請求項 10】

識別分析を行なって組織を診断する段階を更に有することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

複数の散乱係数値を複数の異なる領域に区分する段階を更に有することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

入射放射により測定すべく組織の対象領域を照射する放射源と、
組織からの散乱光および蛍光を複数の波長で収集する光学系と、
収集された光を検出しかつ波長の関数として蛍光データおよび散乱光データを供給する検出器システムと、
蛍光データおよび散乱光データを用いて対象領域の特徴を決定するデータプロセッサとを有することを特徴とする、組織を光学的に測定する装置。

【請求項 13】

330～700nm の範囲内の光を発生する広帯域光源を更に有することを特徴とする請求項 12 記載の装置。

【請求項 14】

前記光源を組織に連結する光ファイバプローブを更に有することを特徴とする請求項 12 記載の装置。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

前記プローブは内視鏡内に挿入できることを特徴とする請求項 12 記載の装置。

【請求項 16】

高速励起エミッションマトリックス器具を更に有することを特徴とする請求項 12 記載の装置。

【請求項 17】

情報を記憶して蛍光データおよび散乱光データを約 2 ～ 8 秒で処理するデータプロセッサを更に有することを特徴とする請求項 12 記載の装置。

【請求項 18】

蛍光スペクトルを取得し、
反射率スペクトルを取得し、
蛍光スペクトルおよび反射率スペクトルを処理して、固有蛍光スペクトルと、拡散反射率スペクトルと、光散乱スペクトルとを供給し、
固有蛍光スペクトル、拡散反射率スペクトルおよび光散乱スペクトルから、生物物理的組織特徴を決定する段階を有することを特徴とする、組織スペクトルを分析する方法。

【請求項 19】

処理ユニットに、請求項 18 の方法の段階を実行させる 1 組の情報が記憶されていることを特徴とするコンピュータ読取り可能な媒体。

【請求項 20】

前記組織層内の構造のサイズを決定する段階を更に有することを特徴とする請求項 18 記載の方法。

【請求項 21】

前記構造は組織中の上皮細胞の核であることを特徴とする請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

前記検出された反射率スペクトルの周期的成分を測定する段階を更に有することを特徴とする請求項 18 記載の方法。

【請求項 23】

反射光標準および蛍光標準を用いて較正する段階を更に有することを特徴とする請求項 18 記載の方法。

【請求項 24】

異なる散乱サイズをもつルックアップテーブルを創出する段階を更に有することを特徴とする請求項 18 記載の方法。

【請求項 25】

前記蛍光スペクトルを補正して固有蛍光スペクトルを得る段階を更に有することを特徴とする請求項 18 記載の方法。

【請求項 26】

前記光散乱スペクトルを変形させかつスペクトル成分を除去して組織成分のサイズ分布を決定する段階を更に有することを特徴とする請求項 18 記載の方法。

【請求項 27】

識別分析を行なって組織のリアルタイム診断を行なう段階を更に有することを特徴とする請求項 18 記載の方法。

【請求項 28】

複数の散乱係数値を複数の異なる領域に区分する段階を更に有することを特徴とする請求項 18 記載の方法。

【請求項 29】

入射放射により測定すべき組織の対象領域を照射する放射源と、
散乱光、蛍光および組織からの反射光を複数の波長で収集する光学系と、
収集された光を検出しかつ波長の関数として蛍光スペクトル、反射率スペクトルおよび散乱光スペクトルを供給する検出器システムと、
蛍光スペクトル、反射率スペクトルおよび散乱光を用いて対象領域の特徴を決定するデー

10

20

30

40

50

タプロセッサとを有することを特徴とする、組織層中の構造を光学的に測定する装置。

【請求項 30】

330～700nmの範囲内の光を発生する広帯域光源を更に有することを特徴とする請求項29記載の装置。

【請求項 31】

前記光源を組織に連結する光ファイバプローブを更に有することを特徴とする請求項29記載の装置。

【請求項 32】

前記プローブは内視鏡内に挿入できることを特徴とする請求項29記載の装置。

【請求項 33】

高速励起エミッションマトリックス器具を更に有することを特徴とする請求項29記載の装置。

【請求項 34】

情報を記憶して蛍光スペクトル、反射率スペクトルおよび散乱光スペクトルを約2～8秒で処理するデータプロセッサを更に有することを特徴とする請求項29記載の装置。

【請求項 35】

測定すべき物質中の対象領域上に入射放射を指向させ、
物質からの蛍光放射および反射された放射を収集し、
収集された放射から蛍光スペクトルおよび反射率スペクトルを検出し、
検出された反射率スペクトルの周期的成分を波長の関数として測定して、蛍光スペクトル
および反射率スペクトルから、物質の複数の物理的特徴を決定する段階を有することを特
徴とする、物質を光学的に測定する方法。

【請求項 36】

光ファイバプローブを用いて物質上に放射を指向させる段階を更に有することを特徴とする請求項35記載の方法。

【請求項 37】

光ファイバプローブを用いて物質から放射を収集する段階を更に有し、前記プローブは0.05～0.25の範囲内の開口数をもつ光ファイバを有していることを特徴とする請求項35記載の方法。

【請求項 38】

対象領域内の核の平均核サイズを決定する段階を更に有することを特徴とする請求項35記載の方法。

【請求項 39】

対象領域内の単位面積当りの粒子の数を測定する段階を更に有することを特徴とする請求項35記載の方法。

【請求項 40】

入射放射により測定すべき組織の対象領域を照射する第一放射源および第二放射源と、
蛍光および組織からの反射放射を収集する光学系と、
収集された蛍光および反射放射をする検出器システムと、
波長の関数として検出放射の周期的成分を決定し、組織の物理的特徴を決定するデータ
プロセッサとを有することを特徴とする、組織を光学的に測定する装置。

【請求項 41】

フィルタホイールと、330～700nmの範囲内の光を発生する広帯域光源とを更に有することを特徴とする請求項40記載の装置。

【請求項 42】

前記第一放射源および第二放射源を組織の単一対象領域に連結する光ファイバプローブを更に有することを特徴とする請求項40記載の装置。

【請求項 43】

前記データプロセッサは、検出された反射放射から散乱スペクトルを発生しかつ収集された蛍光および反射放射により変調された蛍光スペクトルを発生することを特徴とする請求

10

20

30

40

50

項 40 記載の装置。

【請求項 44】

前記プローブは内視鏡内に挿入できることを特徴とする請求項 43 記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

関連出願の相互参照

本願は、係属中の 2001 年 1 月 19 日付米国特許出願第 09/766,879 号の一部継続出願である。前記米国特許出願の全内容は本願に援用する。

【0002】

(背景技術)

下部食道の腺癌は、ほぼ例外なく、バレット食道 (BE)、すなわち化生円柱上皮 (metaplastic columnar epithelium) が存在するという特徴をもつ患者に現われる。腺癌であると診断された患者の予後は悲しいが、疾患が異形成段階で発見されるならば、成功裏の治療の機会が高い。BE に異形成がある患者のサーベイランスは、2 つの点で挑戦的なことである。第一に、異形成は、日常的な内視鏡検査時には視認できない。かくして、多数のランダムな生検 (バイオプシー) が必要になる。第二に、熟練した胃腸病理学者の間でも、特定検体の類別に関して観察者相互間の同意が得られ難いため、異形成の組織病理学的診断は問題がある。蛍光等の光学的技術は、BE におけるこれらの早期異形成変化を検出する内視鏡医の能力を大幅に高めている。実際に、Photofrin (登録商標) 等の外因性蛍光物質およびアミノレブリン酸誘導プロトポルフィリン IX 型を用いる蛍光分光学的の研究によれば、癌の測定した赤色蛍光と薬剤の選択的蓄積の結果としての非異形成組織との間に大きい差異があることが証明されている。初期のオートフルオロエッセンス分光学的の研究は、高度異形成の検出を約束する 410 nm 励起レポートで行なわれた。しかしながら、局所的な高段階病巣および低段階病巣を信頼性をもって検出することはできなかった。かくして、早期癌の検出に使用される光学的測定技術の更なる改善に対する継続的な要望が存在している。

【0003】

(発明の開示)

本発明は、組織の状態の測定感度および測定精度を改善できる分光システムの組合せに関する。例えば、組織の一領域が正常であるか、前癌状態であるか、癌状態であるかを判断するのに、複数の異なる分光システムを使用できる。好ましい実施形態では、バレット食道 (BE) を患う患者の異形成検出を遂行できる。好ましい実施形態では、蛍光分光学的手法、反射率分光学的手法および光散乱分光学的手法により、組織の生化学的、構造的および形態学的状態および病気の進行中に生じる対応変化、より詳しくは異形成に関する補完情報が得られる。好ましい実施形態では、これらの 3 つの分光学的手法を組合せて、組織の検出、マッピングおよび/またはイメージングを行なうシステムが開発された。より詳しくは、自動化された診断ルーチンを遂行すべくプログラムされたデータプロセッサによりスペクトルデータまたは画像データを処理する方法は、蛍光分光学的手法および光散乱分光学的手法を含む複数の異なる測定様相の結果を得るのに有効である。本発明の他の好ましい実施形態は、3 モードシステムを使用して生検手順を案内する。

【0004】

リアルタイム測定を行なうこのシステムの 1 つの重要性は、対象とする同一スポットすなわち領域から同時にまたはほぼ同時に光を収集 (集光) できることである。例えば、収集には、測定した蛍光スペクトルおよび反射率スペクトルの収集が含まれる。検出された反射率スペクトルは、拡散性背景成分を除去すべく処理される。これが完了されたならば、次に、波長内に周期的に見られる光成分が測定される。この成分は、例えば、表皮細胞核によりミー散乱 (Mie-scattered) される光から生じる。周期構造の振幅および周波数を分析することにより、これらの細胞核の密度およびサイズ分布を抽出できる。対象とする所与の領域を評価するのに、反射率要素、光散乱要素および蛍光要素を適正

10

20

30

40

50

に相関付けかつ使用できるようにするには、反射率測定および蛍光測定の両方について励起を大きくオーバーラップさせるのが好ましい。反射光は、これに含まれる周期構造の使用に基いて、蛍光スペクトルの補正および光散乱スペクトルの発生の両方に使用される。本発明の装置は、両励起要素を、プローブの同じ遠位面を介して、好ましくは同じ光ファイバまたは光ファイバ集合体を介して対象領域に供給する。

【0005】

内視鏡の生検チャンネルは、測定を行なうのに使用される光ファイバによる光供給／収集システムを挿入するのに使用できる。或いは、例えば直径5mm以下の小径内視鏡に、多くの用途に適した光供給／収集システムを設けることができる。本発明のシステムの好ましい実施形態は、光の供給／収集を行なう単一ファイバシステムを使用でき、或いは中心の供給ファイバおよびこの周囲に同心状に配置された6本の収集ファイバを使用することもできる。光供給／収集プローブの近位端は、広帯域フラッシュランプおよびレーザのような単色光源の両方に光学的に連結される。選択された範囲に亘って励起波長を迅速に切換えるのに、回転フィルタまたは染料ホイール (dye wheel) を使用できる。

10

【0006】

反射光を使用する必要性は、測定された集積組織蛍光強度でのヘモグロビン吸収の効果を補正する必要性から生じる。蛍光分光学的手法と反射率分光学的手法との組合せは、散乱および吸収により、測定された全組織蛍光スペクトル内に導入された歪みを除去すべく適用できる。歪んでいないまたは修正された蛍光スペクトルは組織生化学の感応インジケータとして機能し、一方、反射率表示および光散乱表示は、組織構造 (tissue architecture) および表皮細胞核に関する形態情報を与える。本発明は、組織を特徴付けしかつ病巣を診断する3つの全ての分光学的手法を同時に使用できる。3つの全ての技術を組合せて使用することにより、例えば、BEにおける高段階異形成だけでなく、低段階異形成の検出に関して、各技術の結果を個々に比較することに比べ、優れた結果を得ることができる。

20

【0007】

好ましい実施形態では、スペクトルデータを分析して組織層の構造を測定する方法は、蛍光および組織からの複数の波長の反射光を収集しかつ収集された光を検出する光収集システムを設ける段階を有している。本発明の方法は更に、検出された光からの波長の関数として蛍光表現および散乱光表現を形成する段階を有している。また本発明の方法は、蛍光表現および散乱光表現がなされた組織層の特徴を決定する段階を有している。また本発明の方法は、散乱光表現を用いて組織層内の構造、例えば細胞の核のサイズを決定する段階を有している。好ましい実施形態では、拡散反射率スペクトルが分析される。本発明の好ましい実施形態は、異なる散乱サイズをもつルックアップテーブルを創出する段階を更に有している。蛍光表現は、補正して固有蛍光スペクトルを得ることができる。

30

【0008】

本発明の好ましい実施形態では、蛍光スペクトルを取得し、反射率スペクトルを取得し、次にこれらの両者を処理して、固有蛍光スペクトルと、拡散反射率スペクトルと、光散乱スペクトルとを供給する段階を有している。また本発明の方法は、固有蛍光スペクトル、拡散反射率スペクトルおよび光散乱スペクトルから、生物物理的組織特徴を決定する段階を有している。本発明の方法には、拡散反射率スペクトルからの診断パラメータ、固有蛍光スペクトルからの診断パラメータ、および散乱光パラメータからの診断パラメータを用いて識別分析を遂行し、次に診断する段階を含めることができる。

40

【0009】

(発明を実施するための最良の形態)

本発明の上記および他の目的、特徴および長所は、添付図面に示す本発明の好ましい実施形態についての以下に述べる詳細な説明から明らかになるであろう。尚、全図面を通して同じ部品は同じ参照番号で示されており、また図面は必ずしも縮尺通りではなく、本発明の原理を示すため強調もなされている。

【0010】

50

測定は、例えば、1999年1月26日付米国特許出願第09/238,664号（この全内容は本願に援用する）において詳細に説明されている高速の励起エミッションマトリックス（excitation-emission matrix: EEM）装置10を用いて行なわれる。この高速EEMシステムの励起光源には、高速回転ホイール16に正確に取付けられた10個の染料キュベットをポンピングする、337nmでのエミッション窒素レーザ12（Laser Science, Inc., Franklin, マサチューセッツ州、モデルVSL-337MD）を使用できる。この態様で、好ましい実施形態では、337~620nmの間で11個の異なる励起波長が得られ、これらの波長は、光学系18を用いて直径1mmの光ファイバプローブ20に連結される。反射率測定を行なうため、Xeフラッシュランプ14（Perkin Elmer Optoelectronics社、Salem、マサチューセッツ州）からの白色光が同じプローブに連結される。或いは、膀胱内での測定を含む他の実施形態では、例えば308nmを放出するXeClエキシマレーザを使用できる。好ましい実施形態では、プローブ20は、光供給ファイバ26を包囲する6本の収集ファイバ28で構成でき、図1に示すように、プローブの遠位端22を透明保護シールドで覆うことができる。

10

20

30

40

50

【0011】

内視鏡検査中、プローブは内視鏡のアクセサリチャンネル内に挿入されかつ組織に優しく接触するように移動され、かくして一定の供給/収集ジオメトリが形成される。反射された蛍光はプローブにより収集されかつ分光器30および検出器22に連結される。蛍光励起波長をブロックするのに、第二同期ホイール36が使用される。各部位からの3組のスペクトルの平均が、データ処理システム34使用する分析に用いられる。データ取得の直後に、プローブが除去され、プローブの接触の結果として、僅かな分画（demarcation）が30~60秒間組織上に留まる。この内視鏡的に明らかなマーカは、スペクトルが取得されたのと同じ部位から生検を採取するガイドとして使用される。生検検体は、胃腸病理学者により解釈されかつ類別される。異形成病巣が疑われる場合には、検体が再検査されかつケア基準に従って第二の胃腸病理学者により診断が確認される。データは、26箇所の非異形成バレット食道部位（9人の患者）、7箇所の低段階異形成部位（4人の患者）および7箇所の高段階異形成部位（5人の患者）から分析された。

【0012】

好ましい実施形態では、好ましくは1/2以下で3種類の内視鏡検査情報が取得される。11個の異なる励起波長、反射率スペクトルおよび光散乱スペクトルでの蛍光スペクトルが得られる。各種のスペクトルは、異形成変態中に生じる生化学的および形態的变化に関する情報を供給する態様で分析できる。蛍光分光学的手法は、異形成の発生中に組織生化学に生じる変化に関する価値ある情報を供給できる。しかしながら、測定される組織蛍光スペクトルは、無関係の散乱および吸収事象により大きい歪みを受ける。これらの歪みを除去するため、対応する反射率スペクトルからの情報と組合せて、蛍光スペクトルが分析される。蛍光スペクトルおよび反射率スペクトルが、同様な歪みを受ける同じ光供給/収集ジオメトリを用いて、対象とする特定部位または領域から収集されるという事実から、この手順の成功が予測される。固有の（歪んでいない）組織蛍光を抽出することにより、組織生化学の変化は、より敏感な特定態様で隔絶される。

【0013】

主成分の分析および論理的帰帰（logistic regression）は、固有蛍光のスペクトル特徴と組織病理学的診断のスペクトル特徴との相関関係を決定するのに用いられる。この比較的小さいデータ組を不偏態様で分析するため、「1つを残しておく」相互検証（"leave-one-out" cross-validation）を使用できる。特に、異形成の進行中に変化するスペクトル特徴を説明する固有蛍光スペクトルの主成分が選択される。対応標点（全スペクトルへの主成分の寄与を記述する係数）を使用して、システムが、（a）低段階異形成および非異形成バレット食道（BE）低段階の異形成から高段階異形成を識別する能力、および（b）非異形成バレット食道（BE）から低段階および高段階の異形成を識別する能力を決定できる。不偏態様でこれを達成す

るため、次の手段を遂行できる。特定部位からの標点除去され、論理学的回帰を使用して、組織病理学的類別との一致を最適化する態様で残余の部位を類別する決定表面を形成する。得られる決定表面は、次に、除外部位を類別するのに使用できる。この方法は、各部位について反復される。この方法は、比較的小さいデータ組を使用して、偏りのない決定表面の性能を検証する。決定表面は、この手順中の変化が最小であり、技術の信頼性を表示する。感度値および特異性値は、分光学的類別と組織病理学的類別とを比較することにより決定できる。好ましい実施形態に従って、Matlabの統計学的ソフトウェア(The Math Works, Inc., Natick、マサチューセッツ州)を用いて統計学的分析を行なうことができる。

【0014】

測定された反射率スペクトルは、反射光を、組織の吸収係数($\mu_a(\lambda)$)および低下した散乱係数($\mu_s'(\lambda)$)として表現する拡散理論に基いた表現を用いて分析できる。この分析により、収集された光が組織表面からの500~700 μm の範囲内に源を発するとき、主として連結組織の構造および形態、すなわち粘膜固有層および粘膜下組織に関する情報が得られる。得られる組織散乱係数値の診断値は、固有蛍光の場合におけるように、論理学的回帰および相互検証と、組織病理学的類別とを相関付けることにより決定される。

【0015】

検出された反射光の僅かな部分(2~5%)は、組織により1回だけ散乱された後にプローブにより収集された光から出る。光散乱分光学的手法は、2000年7月18日付米国特許第6,091,984号(この全内容は本願に援用する)に詳細に開示されているので、ここでは概略的に説明する。米国を指定して1998年10月9日出願された国際特許出願PCT/US/98/2145(該出願の全内容も本願に援用する)には、組織構造を測定する他の方法が開示されている。この単独で散乱される光の強度は、逆波長の周期的な成分を含んでおり、この大きさおよび周波数は、上皮細胞層の核の数およびサイズに基いている。この周期的信号は分析されて、特定部位に一致する上皮細胞核の数およびサイズを決定する。次に、論理学的回帰および相互検証を用いて、分光学的類別と組織病理学的類別とを比較する。感度および特異性を最適化するため、一実施形態では、非高段階異形成部位から高段階異形成を識別する事後確立閾値を0.3に定める。

【0016】

最後に、3つの全ての分光学的技術からの結果が組合されて、正しく類別される部位の数を向上できる。より詳しくは、部位には、3つの分析方法のうちの少なくとも2つからの結果と一致する類別が割当てられ、この類別は組織病理学的手法に匹敵する。

【0017】

図2Aには、非異形成バレット食道(BE)部位(実線)からの337nm光で励起された典型的な蛍光スペクトルが示されている。2つの異なる組織蛍光物質の存在に帰すことができる2つのピークがある。これらの2つのピーク間の蛍光強度の低下は、ヘモグロビンが非常に効率的に光を吸収する波長範囲内に生じることにより留意されたい。ヘモグロビンの吸収効果は、オキシヘモグロビン吸収ピーク(図2)に一致する約420、540および580nmで最小値を呈する対応反射率スペクトル(図2B)内に観察される。図2Aの測定した蛍光スペクトルが本願で論じるように図2Bの対応反射率スペクトルと組合せて処理されるとき、特定励起波長での固有(非歪み)組織蛍光スペクトルが得られる(図2A、破線)。このスペクトルは単一の幅広ピークを有することに留意されたい。

【0018】

337nmで励起された非異形成部位およびバレット食道(BE)部位の固有組織蛍光の例(図3Aおよび図3B)と、397nmで励起された非異形成部位およびバレット食道(BE)部位の固有組織蛍光の例(図3Cおよび図3D)との間には大きい差異が観察される。337nm励起では、異形成部位の腺形状は幅広でかつ非異形成から低段階異形成および高段階異形成へと進行する間にスペクトルの赤色領域に変位する。397nm励起では、蛍光は、異形成BE部位についてはスペクトルの赤色領域で増大する。412nm

10

20

30

40

50

励起でも同様な変化が観察される。

【0019】

これらの相違は、BEでの異形成を検出するためのアルゴリズムを得るのに使用できる。より詳しくは、(a)異形成(低段階異形成および高段階異形成)組織から非異形成を識別し、かつ(b)低段階BE上皮および高段階BE上皮から高段階異形成を識別できる感度および特異性を決定するのに、主成分分析、論理的帰帰および「1つを残しておく」相互検証が使用される。各場合において、337、397および412nm励起での固有蛍光スペクトルから抽出される最初の3つの主成分のうちの1つの標点を使用される(図4および図5)。選択された主成分は、観察されたスペクトルの相違を示している。この分析から、高段階異形成のある部位は、高い感度および特異性をもって、低段階異形成部位および非異形成部位から識別される(表1)。また、異形成上皮および非異形成上皮は、非常に高い感度および特異性をもって識別される。

10

【0020】

表1には、バレット食道での非異形成(NDB)、低段階(LGD)および高段階(HGD)組織の分光学的手法による類別の精度が示されている。

【0021】

【表1】

	HGD 対 (LGD および NDB)		(LGD および HGD) 対 NDB	
	感度	特異性	感度	特異性
固有蛍光 (IF)	100%	98%	71%	92%
反射率 (R)	86%	100%	79%	88%
光散乱 (LS)	100%	91%	93%	96%
IF、R および LS の組合せ	100%	100%	93%	100%

20

【0022】

反射率スペクトルは、塊組織の散乱特性および吸収特性に関する詳細情報を得るため、数学的表現を用いて分析される。図6には、この数学的表現を用いて得られた対応適合(corresponding fit)を有する典型的な反射率スペクトルが示されている。

30

【0023】

この分析形式は、バレット食道の組織の低下した散乱係数 $\mu_s'(\lambda)$ は、非異形成から、低段階異形成および高段階異形成へと進行する間に徐々に変化する。例えば400nmでは、高段階異形成組織($1.3 \pm 0.2 \text{ mm}^{-1}$)の $\mu_s'(\lambda)$ が、低段階異形成組織($1.8 \pm 0.3 \text{ mm}^{-1}$)の $\mu_s'(\lambda)$ より小さく、この低段階異形成組織($1.8 \pm 0.3 \text{ mm}^{-1}$)の $\mu_s'(\lambda)$ は、更に、非異形成バレット食道(BE)組織($3 \pm 1.6 \text{ mm}^{-1}$)の $\mu_s'(\lambda)$ より小さい。また、異形成の成長中に、 $\mu_s'(\lambda)$ の波長依存性が変化する。これらの変化を説明するため、1つの直線が $\mu_s'(\lambda)$ に適合され、この直線の遮断(intercept)および傾斜が診断パラメータとして使用される(図7)。論理的帰帰および「1つを残しておく」相互検証を用いて、組織病理学的手法に従って10個の類別組織の感度および特異性が決定される。この方法により、固有蛍光スペクトルにより達成されるよりも僅かに小さい全体的感度および特異性の値が得られる(表1)。

40

【0024】

反射率スペクトルは、上皮細胞核からの後方散乱の抽出および分析を可能にする態様で処理される。この分析結果は図8に示されている。図8の縦座標は、核の密集度合いを示す、 1 mm^2 当りの核数を表し、横方向座標は、10ミクロンより大きい直径をもつ核として定義される拡大核の割合(%)を表す。非異形成試料は左下コーナに集中しており、これは、細胞核が小さくて密集していないことを示している。異形成が進行するにつれて、

50

データ点は右上に移動し、これは、組織病理学的手法による検出結果と一致する核の拡大および密集を示している。この技術は、非異形成 B E 部位から異形成（低段階異形成および高段階異形成）を分離する点で優れている（表 1）。

【0025】

B E での異形成および非異形成組織を特徴付ける能力は、本発明のシステムにより同時に得られる、分光学的手法の各々により得られた情報を組合せることにより改善される。分光学的類別が 3 つの分析方法のうちの少なくとも 2 つと一致する場合には、高段階異形成は、完全な感度および特異性をもって識別されかつ異形成組織は、高い感度を維持しつつ、完全な異形成をもって非異形成組織から識別される（表 1）。

【0026】

分光学的技術は、光信号に含まれる情報を使用して、生物学的組織の状態にアクセスする。光ファイバ技術は、分光学的手法を、内視鏡によりアクセスできる広範囲の組織の診断ツールとして適用することを可能にする。本願において説明する分光学的手法の使用により、医者が、例えば口腔、頸、肺、胸および胃腸管等の多くの器官の前癌状態（異形成）および早期癌病巣の検出する能力を向上できる。用いられる技術に基いて、組織の生化学的、構造的および形態学的特徴を取得できる。異形成の進行中に生じるこれらの特徴の顕微鏡的变化は、内視鏡により視認できる肉眼で見える変化の発現前に分光学的に検出できる。また、分光学的技術は非観血的手法であり、組織を、そのありのままの状態で、かつ組織を切断しかつ化学的に処置することにより導入されるアーチファクト（人工産物）がない態様で研究できる。原則として、分光学的信号はリアルタイムで分析され、かくして、医者を、患者の成功裏の治療に必要な介入の種類に関して直ちに決定できるようにする重大な病理学的手法をもたらし生検領域に案内する。また、光により搬送されるスペクトル信号は、特に、病気の類別に関する観察者内および観察者相互の一致が非常に良くない領域の特定組織部位を評価するための目的ガイドとして使用できる。

【0027】

蛍光分光学的手法のターゲットとして、N A D H、F A D、コラーゲン。エラスチンおよびボルフィリン等の組織生化学物質がある。病巣領域に優先的に蓄積することが証明されている外因性発色団または外因的に誘発される発色団を使用することもできる。410 nm で励起される組織オート蛍光（t i s s u e a u t o f l u o r e s c e n c e）を用いた高段階異形成の検出が行なわれている。測定された集積強度／正規化蛍光（i n t e g r a t e d i n t e n s i t y - n o r m a l i z e d f l u o r e s c e n c e）および正常な食道組織からの平均正規化蛍光が、診断に使用された。高段階異形成組織と非異形成組織との間に優れた識別をもたらし主なスペクトル特徴は、約 470～480 nm の減少した蛍光の存在および高段階異形成組織のスペクトルの赤色領域内の増大した蛍光の存在である。しかしながら、この方法は、低段階異形成部位または病巣の高段階異形成部位を正しく類別することはできない。

【0028】

本発明の好ましい実施形態を示す例では、337～610 nm 間の 11 個の異なる励起波長での蛍光スペクトルが得られた。かくして、単一の蛍光スペクトルの代わりに、励起エミッションマトリックス（E E M）が収集される。E E M は、組織類別が最適化される励起波長を識別するのに使用できる。また、E E M は測定された蛍光信号の起点を、より信頼性のある態様で識別することを補助できる。それにもかかわらず、図 2 および図 3 に示すように、これらの測定された E E M は組織散乱および吸収により大幅に歪んでしまうことがある。組織生化学によるアーチファクトではなく、散乱または吸収の変化により導入されるアーチファクトを除去するため、散乱および吸収事象により同様な態様で影響を受ける対応反射率スペクトルを使用できる。歪んだ測定組織蛍光スペクトルが、反射率手法を用いてひとたび整流されると、337 nm で励起された組織蛍光は、組織が非異形成から低段階異形成、更には高段階異形成へと進行するときに、非常に首尾一貫した態様で、より長い波長に拡大されかつ変位する（図 3）。これらのスペクトル変化は、異形成組織の増大した N A D H レベルの存在と調和している。397 および 412 nm 励起での本発

10

20

30

40

50

明者の発見は内因性のポルフィリンに帰する。高段階異形成部位に一致するスペクトルは、散乱および吸収の効果を補正した後でも、約470nmで僅かに歪む。このことは、この効果が、吸収の結果というよりはむしろ生化学的変化の結果として生じるものであることを示唆するものである。

【0029】

異形成の成長中に組織蛍光に観察される大きい変化レベルを示すため、337、397および412nmで励起された固有蛍光スペクトルに観察される不一致の99%に亘って記述する最初の3つの主成分のうちの1つの標点を使用できる。次に、論理的な回帰および「1つを残しておく」相互検証を用いて、感度および特異性を不偏態様で評価しかつ検証でき、これらの感度および特異性を用いて、(a)低段階異形成組織および非異形成組織から高段階異形成組織を識別し、かつ(b)非異形成組織からの異形成(低段階および高段階異形成)を識別して、低段階異形成組織および非異形成組織から高段階異形成組織を識別でき、分光学的手法による類別は、1つを除く全てにおいて、組織病理学類別に一致している。また、非常に高い感度および特異性で、非異形成組織から異形成を識別できる。

10

【0030】

反射率による分光学的手法は、測定した組織蛍光スペクトルに観察される歪みを除去するだけでなく、組織の形態学および構造的な特徴に関する非常に詳細かつ潜在的に有効な情報を提供できる。より詳しくは、図6に示すように、観察された組織反射率スペクトルは、組織散乱および吸収により決定される2つのパラメータに関して使用できる。例えば、ヘモグロビンの濃度または酸素飽和度の変化、この種類の組織からの可視スペクトルでの主吸収により、組織の吸収係数の付随的な変化が生じる。連結性組織コラーゲン線維および組織散乱の主寄与子は、修正された組織散乱係数をつくる。この分析は、組織の散乱係数は異形成の成長中に大幅に減少することを示唆し、このことは、組織病理学的に観察されない変化が、侵襲が立上る前に粘膜固有層および粘膜下組織内に生じることを示唆する。最近では、システインおよびセリンプロテアーゼの増大したレベルが胃および結腸直腸の癌性および前癌性病巣に見られることが示されている。異形成の進行中の散乱係数の値の低下に関する発見は、このような酵素の存在に一致し、これは例えば、密度の小さいコラーゲンマトリックスを生じさせる。波長の関数としての $\mu'(\lambda)$ の傾斜の変化は、粒子を散乱する組織の平均サイズが変化することを示唆する。細胞および上皮層の核の密集度合いは、この変化に応答する。表1に示すように、全く成功裏に組織を類別するため、組織散乱の観察された変化を使用できる。光散乱分光学的手法は、上皮細胞層の核の数およびサイズに関する情報を得るのに使用できる方法である。上皮細胞核は、反射光がプローブにより収集される前に、単独で散乱される反射光の主ターゲットである。この単独で後方散乱される光の強度および振動は、そのターゲット核の数およびサイズの特徴である。この技術は、結腸、口腔、膀胱およびバレット食道(BE)の前癌および早期癌の変化を特徴付けるのに使用される。この技術の結果は、取得されかつ蛍光分光学的手法および反射光分光学的手法と組合せられる情報を示すため、好ましい実施形態のデータ組に包含される。光散乱分光学的手法は、非異形成BE部位から異形成を識別する能力に関して、他の2つの方法より優れている。

20

30

40

【0031】

3つの全ての技術の組合せにより、バレット食道(BE)の異形成の検出を行なう極めて感度が高い特殊ツールが得られる。この場合には、非異形成部位および低段階異形成部位からの高段階異形成の識別に関して組織病理学的手法との一致が達成される。また、全ての部位は、1つの部位を除き、異形成または非異形成として正しく類別される。各技術は、異形成の変化が生じている間に変化する組織生化学および形態学の種々の特徴を試験するので、目立つ改善が期待される。

【0032】

西欧諸国での5大死亡原因の1つは膵臓癌であり、膵臓癌は、最初の診断後の予後(予測)は非常に困難である。これは、症状が後で現われること、および切除が適当であるのは

50

全患者のうちの約 5 ～ 20 % に過ぎないからである。膵臓の腺癌は管状上皮から生じる。前癌段階では、管状上皮細胞は、大きい核サイズおよび密集度をもつバレット食道 (BE) の形態学的変化と同様な形態学的変化を受ける。前癌状態および早期癌状態の変化の検出を可能にする幾つかの臨床条件が存在する。これらの条件として、膵管の病巣閉塞による急性膵炎または慢性膵炎、膵管内乳頭ムチン腫瘍 (IPMT) および膵臓癌の強い家系をもつ患者がある。このセッティングでの異形成の検出は、現在、膵管の狭窄または拡張の検出および剥離細胞診に基いている。しかしながら、これらの方法は、異形成と炎症との信頼性ある識別を行なうことができず、44.70% という全体的に悪い感度を有している。

【0033】

10

本発明は、内視鏡的逆行性膵胆管造影法 (ERCP) の技術および膵管上皮から得たスペクトルを用いた主膵管内の 3 モード分光学的分析を行なう方法を有している。

【0034】

膵臓の管腺癌の大部分の患者は、有効な治療を受けることができない手遅れの段階の癌である。極く少数の患者のみが、癌の早期異形成を検出できる時点で評価されるに過ぎない。これらには、主膵管の狭窄 (MPD)、急性膵炎を呈する IPMT、および膵臓癌の強い家系をもつ患者の場合がある。これらの全ての場合において、異形成の存在および膵臓の長さに沿う異形成の分散は、(膵臓の一部または全部を切除すべきか否か) についての判断決定を厳しいものとする。本発明は、異形成の検出のための 3 モード分光学的手法を、膵管の侵襲性癌に使用することを可能にする。本発明は、患者の体外または体内検体を評価して異形成の膵臓癌の検出を行なうことができる。スペクトルは、切除の 3 時間以内でかつホルマリン固定前に、1 cm 間隔で MPD から収集される。3 モードスペクトル分析は、歴史的カテゴリを正確に識別する要素を評価すべく遂行できる。これらのスペクトルアルゴリズムは、上記 3 つの状態を評価するため ERCP を受ける患者に、その体内的に適用される。スペクトルは、管の全長に沿って、1 cm 間隔で体内で収集される。スペクトル信号は、臨床的状态が膵臓の外科的切除を必要とする患者間の組織と比較できる。スペクトル信号のアナトミー位置は、MPD オリフィスからの距離に従って一致させることができる。

20

【0035】

本発明は、単独でまたは異常なパパニコラウスミア (Pap smear) の後のコルポスコピーのときに、頸管の前侵襲病巣の検出に使用できる。また、本発明は、前侵襲病巣の治療の進行をモニタリングする非侵襲方法にも使用できる。

30

【0036】

パパニコラウスミアは、頸管組織異常に用いるスクリーニングツールである。異常なパパニコラウスミアの後には、コルポスコピー手法が日常的に行なわれる。この方法は、後で生検採取されかつ組織病理学的に検査される異常な頸管上皮の識別を行なう低倍率両眼顕微鏡を使用する。熟練した手では、コルポスコピーの感度および特異性は、それぞれ、94% および 48% であると見積もられる。

【0037】

本発明の好ましい実施形態は、体内の頸管上皮を評価する分光学的技術を含んでいる。337、380 および 460 nm で励起される組織蛍光スペクトルは、子宮腔部領域および頸管内領域内の正常部位および疑わしい部位からのコルポスコピー手術中に取得された。疑わしい部位は生検採取されかつ組織病理学的に類別される。最初の組のスペクトルが分析され、分光学的類別と組織病理学的類別との一致を最適化させる統計学的方法が開発された。第二組のデータを類別するのにこれらの方法が先を見越して使用されると、鱗状上皮内病巣 (squamous intraepithelial lesions: SIL) は、組織病理学的方法と比較して 82% の感度および 68% の特異性で分光学的に識別できることが判明した。本発明は、体内アプローチでリアルタイムに頸管上皮をスペクトル分析するときの感度および特異性を改善する。本発明の方法は、3 モード分光学的手法 (TMS)、および固有蛍光分光学的手法 (IFS) と、拡散反射率分光学的手法 (D

40

50

R S) と、光散乱分光学的手法 (L S S) との組合せ使用を用いる。

【0038】

本発明の方法は、3モード方法を用いて得られたスペクトルと、生検採取された上皮領域の組織学的診断とを比較することができる。この方法は、組織学的異形成を予測態様で予想するパターンを与え、かくして、医者は、頸管上皮の組織学的病巣の予測の確実性を高めることができる。これは、頸管異形成の治療の応答を決定するため、臨床的トライアルで次の患者の大きい値にすることができる。

【0039】

スペクトルは、正常な鱗状子宮腔部および変態ゾーン内の疑わしい部位から取得される。後者は、直ちに生検採取され、次にスペクトルが取得される。データは、34人の患者、42個の正常な子宮腔部（生検採取されない）、15個の良性の生検採取部位（鱗状化生として類別された12個と、成熟した鱗状上皮として類別された3個）、および10個の高段階鱗状上皮内病巣（H I L）から収集された。 10

【0040】

図9A～図9Dに示すように、幾つかの励起波長について、固有蛍光強度および／または線形状の相違が観察される。

【0041】

固有蛍光分光学的手法の診断能力の評価についての主成分分析を用いる代わりに、静脈瘤結紮中に遂行される測定から抽出されるN A D Hと、コラーゲンE E Mとのリニアな組合せとして分解できる。 20

【0042】

図10に示すように、良性の生検採取部位およびH S I Lのコラーゲン蛍光は、正常の鱗状上皮のコラーゲン蛍光に比べて大幅に低減しているのが観察される。これらの変化は、マトリックス金属結合タンパク (matrix metalloproteinases : MMP) の表現のレベル差およびコラーゲン分解の原因となる酵素のクラスの差異から生じる。MMP-2のレベルおよび／またはパターンの差異は、正常の鱗状上皮と、鱗状化生と、S I Lとの間に報告されている。また、図11Aから、N A D H蛍光は、良性の生検採取部位よりもH S I Lの方が増大しているのが見られる。この増大は、上皮細胞数の増大および／またはこれらの代謝活性(52)によるものと考えられる。バレット食道の場合におけるように、論理的帰帰および「1つを残しておく」相互検証を用いると、H S I Lを、80%の感度および67%の特異性をもつ良性の生検採取部位から識別できる。 30

【0043】

図11Bに示すように、散乱光中の周期的成分を用いた拡散反射率スペクトルの分析によれば、H S I Lの低下したH S I Lの散乱係数は、一般に、鱗状化生および成熟した鱗状上皮の生検採取部位の散乱係数より小さい。400nmでの $\mu_s'(\lambda)$ を用いて論理的帰帰および相互検証を行なうときは、7/10 H S I L (70%感度) および9/15 良性の生検採取部位 (60%特異性) は正しく類別される。

【0044】

光散乱スペクトルの抽出および分析により、核サイズの変化、すなわち特定部位に一致する核サイズ母集団の標準偏差は、バレット食道の場合に考えられる拡大核の割合(%)より高い診断値を有することが判明した。診断パラメータとして論理的帰帰および相互検証に核サイズの標準偏差および単位面積当りの核数を用いると、特に図11Bに示すように、H S I Lは、90%の感度および67%の特異性で、良性の生検部位から識別される。 40

【0045】

最後に、3つの技術I F S、D R SおよびL S Sは、好ましい実施形態では、3つの分析方法のうちの少なくとも2つに一致する診断に従って特定部位を類別する態様で組合せられる。表2に示すように、このアプローチは、いずれか1つの技術と比較して、変態ゾーン内の非H S I L部位からのH S I Lの検出を行なう高レベルの感度および特異性(それぞ 50

れ、100%および80%)を達成する。

【0046】

【表2】

	良性の生検対HSIL	
	感度	特異性
固有蛍光分光学的手法 (IFS)	80%	67%
核散反射率分光学的手法 (DRS)	70%	60%
光散乱分光学的手法 (LSS)	90%	67%
3モード分光学的手法 (TMS)	100%	80%

10

【0047】

図12は、患者の体腔内の対象領域が照射され(102)、かつ蛍光および反射光が検出される(104)構成の本発明の好ましい実施形態のプロセスシーケンスを示す。3つの要素(106)、(108)および(110)を使用して、構造的および生化学的情報(112)を発生させる。このデータは、判別分析(114)、重み付けされた要素(116)および遂行された診断(118)をリアルタイムで使用して分析される。これらの測定値は、非侵襲的態様で病気の類別を行なう有効情報を得る分光学的技術の能力を示す。各技術はバレット食道の異形成を検出するのに使用できるが、これらを組合せることにより、組織の生化学的および形態学的状態の包括的画像(comprehensive picture)の形成ができる。より詳しくは、固有組織蛍光EEMのNADHおよびコラーゲン等の生化学的物質のEEMへの分解は、組織生化学に関する詳細を与える。反射率および光散乱分光学的手法は、結合組織および上皮細胞核に関する形態学的情報を発生する。この情報には組織の切除および処理により導入されるアーチファクトがないので、異形成の進行をもたらしプロセスの理解を進めることを助けることができる。リアルタイムでのデータ分析を遂行するソフトウェアは、生検へのガイドとしてこれらの技術を適用することを可能にする。この手順を用いて対象領域をイメージングする方法は、大きい組織領域を迅速に研究することを可能にする。

20

【0048】

システムの作動環境は、少なくとも1つの高速処理ユニットおよびメモリシステムを備えたデータ処理システム34等の処理システムを有している。コンピュータプログラムの当業者の実務に従って、特記しない限り、本発明は、処理システムにより遂行される行為または作動または情報を表す符号に関連して説明する。これらの行為、作動または情報は、ときどき、「コンピュータ実行される」または「処理ユニット実行される」と呼ばれる。

30

【0049】

符号で表される作動または情報には、処理ユニットによる電気信号の操作が含まれることに留意されたい。データビットを使用する電気システムは、電気信号表示の変形または減少および記憶システムのメモリでのデータビットの維持によって処理ユニットの作動および他の信号処理を再構成すなわち変えさせる。メモリ位置がデータビットであるならば、このデータビットに一致する特定の電氣的、磁氣的、光学的または有機的特性をもつ物理的位置が保持される。

40

【0050】

データビットはまた、磁気ディスク、光ディスク、有機ディスク、および使用する処理装置が読取り可能な他の任意の揮発性または不揮発性大量記憶システムを含むコンピュータ読取り可能媒体に保持される。コンピュータ読取り可能媒体は協働しかつ相互接続されるコンピュータ読取り可能媒体を有し、該媒体は、専ら処理システムに設けるか、処理システムに対してローカルまたは遠隔に位置する多数の相互接続された処理システム間に分散配置できる。

【0051】

図13は、本発明に従ってデータをリアルタイムで分析することにより、組織の層の構造

50

を測定する好ましい実施形態を示すフローチャートである。リアルタイム分析は、例えば頸の上皮組織およびG I 路 (G I t r a c t) の前癌状態の診断に使用できる。この測定方法は、キャリブレーションステップ (2 0 0) から開始する。次に、ステップ (3 0 0) で、拡散反射率スペクトル (D R S) が分析される。ステップ (4 0 0) では固有蛍光スペクトル (I F S) が分析される。この方法の次のステップは、光散乱スペクトル (L S S) を分析するステップ (5 0 0) を有している。方法は、次に、この3モードシステム分析の前のモードの組合せ分析を表すステップ6 0 0 に続く。

【0052】

好ましい実施形態では、内視鏡手術中に、複数の波長、例えば3 3 7 ~ 6 2 0 n m 間の1 1 個のレーザ励起波長での蛍光スペクトルと、1つの白色光 (3 5 0 ~ 7 5 0 n m) の反射率スペクトルとが1秒以内に取得される。取得されたスペクトルは、最外組織層 (該層に、ほぼ9 0 % の癌が発生する) に関する情報を含んでいる。 10

【0053】

記録された蛍光スペクトルおよび反射率スペクトルから、3種類の分光学的情報 I F S 、 D R S および L S S が抽出される。I F S とは、組織の散乱および吸収により導入される歪みがない組織の蛍光スペクトルの回収をいう。これらの歪みを除去するため、測定した蛍光スペクトルおよび反射率スペクトルが、例えば光子移動法を用いて組合せられる。抽出された I F S は分解されて、生化学的組織組成に関する量的情報および前癌組織に生じる変化を得る。

【0054】

測定された反射率スペクトルは、主として、検出される前に多数回散乱される光子からなる。拡散理論に基いたモデルは、拡散的に反射される光を説明するため、従って組織の吸収および低下した散乱係数に関する情報を抽出するのに使用される。低下した散乱係数は、主として、上皮すなわち最も表面に近い組織層の構造的支持体を形成する結合組織の形態学的性質に基いて定まる。 20

【0055】

I F S 、 D R S および L S S の組合せ使用は、生物物理学的組織の特徴化および前癌病巣の検出を行なうツールとして機能する。好ましい実施形態では、T M S 分析はデータ収集時から2 ~ 8 秒以内に遂行される。このT M S 分析は、生検へのリアルタイムガイドを形成できる。 30

【0056】

図1 4 は、本発明の好ましい実施形態によるキャリブレーションのステップ2 0 0 の詳細を示すものである。例えば情報と関連するスペクトルの変化を除去するためのキャリブレーション方法は、病巣組織の診断に使用されるシステムの任意のデータファイルを較正するステップ (2 1 0) から開始する。キャリブレーションシーケンスでの次のステップは、反射率基準を用いてシステムを較正するステップ (2 2 0) を有している。この基準は、反射率の S p e c t r a l o n キャリブレーションのような白色光標準の使用を含むが、これに限定されるものではない。キャリブレーション方法 (2 0 0) は、蛍光標準を用いてシステムを較正するステップ (2 3 0) を有している。蛍光標準として、例えば R h o d a m i n e があるが、これに限定されるものではない。キャリブレーション方法 (2 0 0) の次のステップは、例えば任意の背景蛍光 (b a c k g r o u n d f l u o r e s c e n c e) を減じることにより背景蛍光を除去するステップ (2 4 0) を有している。機器のスペクトル応答は、ステップ (2 5 0) で較正される。 40

【0057】

図1 5 は、D R S の分析を詳述する本発明の好ましい実施形態のフローチャートである。この方法は、ステップ (3 1 0) での、種々の直径の散乱粒子のミー散乱パラメータを記述するlookupテーブルの創成を有している。ミー散乱を記述するlookupテーブルを創出することにより、各反復についてのミー散乱計算の処理時間が短縮される。ステップ (3 2 0) は、減少した散乱係数値 $\mu_s'(\lambda)$ を複数の異なる領域に分割する。好ましい実施形態では、5つの領域がある。異なる領域へのこの分割は、1つの最適値ま 50

たは全ての $\mu_s'(\lambda)$ 値に対する万能適合 (universal fit) が存在しないことの説明がつく。なぜならば、異なる領域の $\mu_s'(\lambda)$ には異なる値があるからである。かくして、 $\mu_s'(\lambda)$ スペースが複数の領域に分離され、かつ各領域について最小化方法が別々に遂行される。ステップ (330) では、較正された反射率スペクトルが、或るモデル、例えば前掲の米国特許第 6, 091, 984 号において説明されておりかつ異なる各領域での Zonios モデルとして後述するモデルを用いて分析される。Zonios モデルは、1 つの層の組織構造を説明しかつモデルの結果と実際の記録からの値との最良の適合を得るための反復方法を表す。本発明の好ましい実施形態は、2 層モデルのような多層組織構造を説明することを含む。Zonios モデルでは、光は光源により組織の表面上に当てられる。組織から反射される光は波長の関数であり、組織の吸収係数、減少された散乱係数およびプローブ等の幾つかのパラメータに基いて定められる。かくして、反射率スペクトル $R(\lambda) = F(\mu_a(\lambda), \mu_s'(\lambda), r_c)$ と表される。ここで、 $\mu_a(\lambda)$ は、光を吸収するヘモグロビンまたはベータカロチンまたはより一般的に生化学物質、 $\mu_s'(\lambda)$ は、減少した散乱係数、および r_c は、プローブの有効光収集領域である。次に、ステップ (340) において、モデルとデータとの間の最適値が選択される。最適値は、例えばスケール定数、粒子サイズおよび粒子密度、ヘモグロビン濃度および所定スペース内の飽和等のパラメータの値を最適化することにより決定される。必要ならば、高ヘモグロビン濃度および／または吸収の場合に、ステップ 350 において補正が計算されかつ適用される。一般に、ヘモグロビン濃度が高い場合には、適合が良くない。好ましい実施形態において、ヘモグロビン濃度適合が所定閾値を超える場合には、適合は或る領域例えば 450 ~ 700 nm について遂行されるに過ぎない。また、必要ならば、ステップ (360) におけるように、反射率曲線の形状により示されるように適合が劣る場合にも補正が計算されかつ適用される。

【0058】

図 16 は、本発明の好ましい実施形態による IFS の分析を詳細に説明するフローチャートである。生物学的組織は、散乱光が優勢であると吸収および蛍光の効果が不可避免的に混乱される混濁媒体であることに留意すべきである。吸収および散乱の相互作用により、測定された蛍光に大きい歪みを引き起こす。従って、測定した組織蛍光から固有蛍光を抽出することが重要である。固有蛍光は、組織中に存在する吸収体および散乱体からの干渉を受けない、蛍光物質のみによる蛍光であると定義される。蛍光スペクトルの最大の歪みは、ヘモグロビンが強く吸収する 420 nm 近くのエミッションに生じる。このような歪みの除去は、重要な診断情報を含むことが証明されている紫外励起波長にとって特に重要である。

【0059】

ステップ (410) では、入力データは、Zonios モデルにより与えられる反射率適合からの情報を用いて分析される。入力は、 $\mu_s'(\lambda)$ 、 $\mu_a(\lambda)$ 、蛍光 $F(\lambda)$ および R_{obs} を有している。ここで、 R_{obs} は、観察された白色光の反射率である。データはまた、以下に Zhang モデルと呼ぶ光子移動理論に基いた方法を用いて分析される。Zhang モデルは、「較正された分光イメージング (Calibrated Spectrographic Imaging)」という名称に係る 1995 年 9 月 26 日付米国特許第 5, 452, 723 号 (該米国特許の全内容は本願に援用する) に開示されたモデルに比べて改善されている。Zhang モデルは、Zhang 等の論文「生物学的組織の混濁のない蛍光分光 (Turbidity-free fluorescence spectroscopy of biological tissue)」(Optics Letter 社発行、Vol. 25、第 19 巻、2000 年、10 月 1 日) に開示されている。尚、この論文の全内容は本願に援用する。Zhang モデルは、反射率および蛍光が、同じプローブを用いて所与の組織部位から収集されるときは、拡散反射光および蛍光光子が同じ経路を横行するので、吸収および散乱によって蛍光スペクトルおよび反射率スペクトルが同様に歪まされるという事実に基づいている。

【0060】

好ましい実施形態では、媒体の蛍光強度は、次式のようにモデル化される。

【0061】

【数1】

$$F_{xm} = \frac{I_x}{h\nu_x} \left[\sum_{n=1}^x \sum_{i=1}^{n-1} \rho_{ni} \alpha_x^i \left(\frac{\mu_{ix}}{\mu_{ax} - \mu_{sx}} \phi_{xm} \right) \alpha_m^{n-i-1} \right] h\nu_m \quad (1)$$

【0062】

ここで、 I_x は励起強度、 ϕ_{xm} は蛍光の量子効率（ここで、添字 x および m は励起周波数 ν_x およびエミッション周波数 ν_m での対応量の評価）、 ρ_{ni} は蛍光速度での蛍光の逃散確率、 α は $\mu_s / (\mu_a + \mu_s)$ でありかつ各相互作用中に吸収されない光子の一部であって、この相互作用時の光子重量低減係数であると考えることができる。従って、カッコ内の表記は、単位励起光子当りの蛍光光子を意味する。光子が第 i 吸収すなわち散乱ノードを横切って、伝達ロスを受けた後、その重量は、各入射励起光子について α_x^i となる。第 $(i+1)$ 番目のノードに到達する各励起光子については、 $\mu_{fx} / (\mu_{ax} + \mu_{sx})$ 個の光子が蛍光により吸収される。蛍光により吸収される各光子については、 ϕ_{xm} 個の蛍光光子が発生される。蛍光光子の伝搬ロスは、ファクタ α_m^{n-i-1} により説明される。

10

【0063】

同量の蛍光を有するが他の吸収体および散乱体はもたない厚さ l （エル）の希薄で光学的に薄い（ $\mu_{fx} l$ （エル） $\ll 1$ ）場合には、次の固有蛍光が得られる。

20

【0064】

【数2】

$$f_{xm} = (I_x / h\nu_x) \mu_{fx} l \phi_{xm} h\nu_m \quad (2)$$

【0065】

式（1）中の蛍光の表現は、反射率に関して次式の補助により表現できる。

【0066】

【数3】

$$R = \sum_{n=1}^x \alpha^n \rho_n = \frac{k\alpha \exp(-\beta)}{1 - \alpha \exp(-\beta)} \quad (3)$$

30

【0067】

ここで、 R は、散乱体および吸収体の均質媒体の反射率である。この結果は、式（2）と組合せることにより、固有蛍光スペクトル f_{xm} と、実験的に測定した蛍光スペクトル F_{xm} と、蛍光スペクトル R_m との間に下記関係を得ることができる。

【0068】

【数4】

$$f_{xm} = \frac{F_{xm}}{\frac{1}{\mu_{sx} l} \left(\frac{R_{ox} R_{om}}{\epsilon_x \epsilon_m} \right)^{1/2} \frac{R_x}{R_{ox}} \left(\frac{R_m}{R_{om}} + \epsilon_m \right)} \quad (4)$$

40

【0069】

ここで、 R_o は、吸収がなくかつ $\epsilon = \exp \beta - 1$ であるときの反射率、 β は、段数 n とは独立しているが、媒体の散乱特性に依存しているパラメータ、および μ は、組織の散乱

50

係数である。

【0070】

式(4)は、同一プローブを用いて蛍光および反射率が測定される限り、任意の供給のプローブすなわち収集ジオメトリを保持する。すなわち、 R_0 は波長の関数であることに留意されたい。式(4)は、実験的に測定された蛍光 E E M から固有蛍光励起すなわちエミッションマトリックス (E E M) を抽出するのに使用できる。媒体が多数の蛍光を含んでいるときに必要な1つのことは、式(1)、(2)中の $\mu_{fx} \phi_{xm}$ の全ての発生を、全ての蛍光に亘るこの量の合計に置換することである。これを行うことにより、式(4)におけるものと同じ表現が得られる。

【0071】

ステップ(420)では、I F S ($R_{obs}(\lambda)$) が得られる。次に、ステップ(430)において、生化学的分解プロセスが遂行される。生化学的分解プロセスは I F S に基づくニア分解プロセスにすることができ、かつスペクトルの量的測定を行なう。また、ステップ(440)では、主成分分析 (P C A) も行なわれる。

【0072】

図17Aおよび図17Bは、本発明の好ましい実施形態による L S S の分析を詳細に示すフローチャートである。この分析はステップ(510)から開始し、ここでは、観察された白色光反射率曲線 ($R_{obs}(\lambda)$) および反射率適合曲線 ($R_{fit}(\lambda)$) が円滑化される。好ましい実施形態では、移動窓平均円滑化プロセス (moving window average smoothing process) が使用される。ステップ(520)では、円滑化されたデータから L S S スペクトルが発生され、L S S スペクトルは、観察された白色光反射率と、反射率適合との差で表される ($L S S \text{ スペクトル} = R_{obs}(\lambda) - R_{fit}(\lambda)$)。L S S スペクトルは波長依存性スペクトルである。次にステップ(530)において、データは、波長 (λ) スペースから、波数 (κ) スペースへと伝送される。次に、ステップ(540)において第一試験が行なわれ、フーリエスペースのスペクトル中に明確なピークが存在するか否かが決定される。明確なピークが存在する場合にのみフーリエ変換が評価され、さもなければ信頼性のある診断は行なわれない。好ましい実施形態では、明確なピークの存在の試験には、例えば下記のサイン・フーリエ変換を使用できる。

【0073】

【数5】

$$\int_{k=\min}^{k=\max} \left(\frac{R(k)}{R(k)} - 1 \right) \sin k \, dk.$$

【0074】

明確なピークが存在する場合には、プロセスはステップ(550)に進み、ここでフーリエ変換 (F T) が創出される。しかしながら、明確なピークが存在しない場合には、プロセスはステップ(310)に戻る。次にプロセスはステップ(560)に入り、該ステップ(560)は、ヘモグロビン吸収特徴が説明される第二試験すなわちチェックポイントとして機能する。二次多項式が $R_{obs}(\lambda)$ データに適合される。次に、適合が正確でない場合には、ステップ(510)、(520)および(530)が反復される。次に、フーリエ変換を行なって、ステップ(550)および(560)から得られた F T (フーリエ変換) と比較する。次に、F T と同じであるか否かを決定する。異なる場合には、プロセスはステップ(570)に進む。しかしながら、F T が同じである場合には、限定的ではないが、図15の D R S 分析に関して説明したような他のヘモグロビンまたは2層モデルが使用される。

【0075】

ステップ(570)では、ステップ(550)からの F T を分析しかつ顕著なピークの有無を確認することにより、第三試験すなわちチェックポイントが行なわれる。顕著なピー

10

20

30

40

50

クが存在しない場合には、多分、ヘモグロビン吸収パラメータがアーチファクトであると思われるので、プロセスはDRS分析のステップ(310)に戻る。顕著なピークが存在する場合には、ステップ(574)で高周波成分を濾過することにより、顕著なピーク以外のピークスペクトル成分が除去される。

【0076】

データは、ステップ(576)で、例えば全スケール定数を掛けて結果を正規化することにより適当スケールに変換される。ステップ(580)で、核サイズ分布が決定される。この決定には、ステップ(582)での核サイズの拡大割合(%)の決定を含めることができる。核サイズ分布の決定には、ステップ(584)の核サイズ分布の幅の決定を含めることもできる。更に、核サイズ分布の決定には、ステップ(586)の数密度の決定を含めることもできる。

10

【0077】

図18は、本発明による3モードシステム(TMS)分析の好ましい実施形態を示す。TMS分析には、ステップ(610)のDRS分析($\mu_a(\lambda)$ および $\mu_s'(\lambda)$)からの診断パラメータ出力の少なくとも1つの値と、ステップ(620)のIFS分析例えば生化学的分析(但し、これに限定されない)からの診断パラメータ出力の値と、ステップ(630)のLSS分析例えば核サイズ分布、サイズ変化、標準偏差および数密度の分析(但し、これに限定されない)からの診断パラメータ出力とが含まれ、ステップ(640)での識別分析を遂行する。好ましい実施形態では、判別分析には、各パラメータへの重みの割当て、重み付けされたパラメータの合計、および該合計と閾値との比較を含むFisher判別分析(但し、これらに限定されない)を含めることができる。TMS分析の結果は、ステップ(650)で、TMS診断として得られる。TMS診断には、非異形成組織、高段階異形成組織、および異形成組織の有無に関する評価が含まれる。

20

【0078】

図19には、本発明によるTMS分析の他の好ましい実施形態が示されている。この好ましい実施形態では、分光学的手法の各様相からの診断が個々に与えられかつ全体的診断を行なう前に比較される。ステップ(662)で、DRS分析からの診断パラメータ出力の値例えば $\mu_s'(\lambda)$ を使用して、ステップ(664)で、DRS分析からの診断を行なう。例えば、傾斜/遮断データ値(slope/intercept data values)が決定されかつ閾値と比較されて、組織特徴を決定する。同様に、ステップ(670)でのIFS分析からの診断パラメータ出力の値を用いて、ステップ(672)で、IFS分析と同一基準の分析を行なう。例えば、IFSスペクトルへのNADHおよび/またはコラーゲン、および/またはポルフィリン(但し、これらに限定されない)の寄与が閾値と比較され、IFS分析からの診断を行なう。ステップ(680)でのLSS分析からの診断パラメータ出力の値は、次に、ステップ(682)で、LSS分析からの診断を行なうのに使用される。LSS分析からの診断として、例えば、拡大割合、数密度、サイズ変化、分散対密集の幅等で表される核サイズのような少なくとも1つの核サイズ特徴と、閾値との比較が含まれる。組織およびその位置に基いて、2つ以上の核サイズ特徴の組合せを対応閾値と比較し、LSS分析からの診断を行なうことができる。

30

【0079】

ステップ(690)で、3つの診断、より詳しくは、DRS分析からの診断と、IFS分析からの診断と、LSS分析からの診断とが比較される。ステップ(692)でこの比較からの全体的診断が行なわれる。全体的診断は、2つの同様な個々の診断、例えばIFS分析およびLSS分析からの同様な診断から行なうこともできる。好ましい実施形態において、同様な診断の種々の順列および組合せを使用できる。

40

【0080】

当業者ならば、組織の特徴を測定するための蛍光、反射率および光散乱分光学的手法のシステムに含まれる方法は、コンピュータが使用できる媒体を含むコンピュータプログラム製品に具現できることは明らかであろう。例えば、このようなコンピュータが使用できる媒体として、コンピュータ読取り可能なプログラムコードセグメントが記憶されたハード

50

ドライブデバイス、CD-ROM、DVD-ROM、またはコンピュータディスク等
の読取り可能なメモリがある。また、コンピュータ読取り可能な媒体として、デジタルま
たはアナログデータ信号として形成されたプログラムコードセグメントを備えた光学的、
有線または無線のバスまたは通信リンク等の通信または伝送媒体がある。

【0081】

以上、本発明を、特にその好ましい実施形態について図示しかつ説明したが、当業者なら
ば、特許請求の範囲に記載された本発明の範囲から逸脱することなく。形状および詳細に
種々の変更を施すことができることは理解されよう。

【0082】

特許請求の範囲は、効果を述べたものでない限り、記載された順序または要素そのものに限
定すべきものと理解すべきではない。従って、あらゆる実施形態は、特許請求の範囲に記
載された範囲および精神内に包含されるものである。 10

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明による測定を行なうシステムの好ましい実施形態を示す概略図である。

【図2A】

非異形成バレット食道部位からの蛍光（337nm）を示すグラフであり、測定されたス
ペクトルが実線で、抽出された固有蛍光が破線で示されている。

【図2B】

図2Aに示した蛍光スペクトルによる対応反射率スペクトルを示すグラフである。 20

【図3A】

非異形成部位（実線）、低段階部位（一点鎖線）および高段階異形成バレット食道（BE）
部位（破線）からの蛍光スペクトルを示すグラフであり、337nmでの励起のための
測定された固有蛍光および抽出された対応蛍光を示す。スペクトルはこれらのピーク強度
に正規化されており、大きい腺形状変化に留意されたい。また、各カテゴリについての平
均±標準偏差値が示されている。

【図3B】

非異形成部位（実線）、低段階部位（一点鎖線）および高段階異形成バレット食道（BE）
部位（破線）からの蛍光スペクトルを示すグラフであり、337nmでの励起のための
測定された固有蛍光および抽出された対応蛍光を示す。スペクトルはこれらのピーク強度
に正規化されており、大きい腺形状変化に留意されたい。また、各カテゴリについての平
均±標準偏差値が示されている。 30

【図3C】

非異形成部位（実線）、低段階部位（一点鎖線）および高段階異形成バレット食道（BE）
部位（破線）からの蛍光スペクトルを示すグラフであり、397nmでの励起のための
測定された固有蛍光および抽出された対応蛍光を示す。スペクトルはこれらのピーク強度
に正規化されており、大きい腺形状変化に留意されたい。また、各カテゴリについての平
均±標準偏差値が示されている。

【図3D】

非異形成部位（実線）、低段階部位（一点鎖線）および高段階異形成バレット食道（BE）
部位（破線）からの蛍光スペクトルを示すグラフであり、397nmでの励起のための
測定された固有蛍光および抽出された対応蛍光を示す。スペクトルはこれらのピーク強度
に正規化されており、大きい腺形状変化に留意されたい。また、各カテゴリについての平
均±標準偏差値が示されている。 40

【図4】

非異形成部位および低段階異形成バレット食道（BE）部位（正方形）から高段階異形成
部位（菱形）を識別するのに使用される337、397および412nm励起での固有蛍
光スペクトルの分解から抽出された3つの主成分の標点を示す図面である。337nm励
起では、固有蛍光スペクトルの460～520nm領域で分解が行なわれた。これは、ス
ペクトル差が最も顕著である波長範囲だからである。同様に、397nm励起では、60 50

0～650nm間の固有蛍光スペクトルから主成分が抽出された。PC1は第一主成分を示し、PC3は第三主成分を示している。

【図5】

非異形成バレット食道（BE）部位（正方形）から低段階および高段階異形成部位（菱形）を識別するのに使用される337、397および412nm励起での全固有蛍光スペクトルの分解から抽出された3つの主成分の標点を示す図面である。PC2は第二主成分を示している。

【図6】

非異形成バレット食道部位の反射率スペクトルを示すグラフであり、実線は測定データを示し、破線は組織の既知の散乱特性および吸収特性に基いた組織の投影特性を示す。

10

【図7】

非異形成部位（正方形）、低段階異形成部位（菱形）および高段階異形成バレット食道（BE）部位（三角形）についての波長依存性組織低減散乱係数 $\mu_s'(\lambda)$ の傾斜および遮断を示すグラフである。各場合において、直線は反射率スペクトルから抽出した $\mu_s'(\lambda)$ に適合された。全てのデータ点が見られるようにするため、両対数スケールを使用している。

【図8】

光散乱モデル分析から決定されたときの拡大核（直径>10 μ m）の割合（%）の関数としてプロットされた1mm²当りの核の全数を示すグラフであり、非異形成バレット食道は正方形、低段階異形成は丸、高段階異形成は三角形のプロットで示されている。

20

【図9A】

正常の鱗状上皮（実線）、良性生検部位（破線）および高段階SIL（点線）の測定蛍光スペクトルおよび固有蛍光スペクトルを示すグラフであり、337nm励起で観察された線形状および強度の差を示す。

【図9B】

正常の鱗状上皮（実線）、良性生検部位（破線）および高段階SIL（点線）の測定蛍光スペクトルおよび固有蛍光スペクトルを示すグラフであり、337nm励起で観察された線形状および強度の差を示す。

【図9C】

正常の鱗状上皮（実線）、良性生検部位（破線）および高段階SIL（点線）の測定蛍光スペクトルおよび固有蛍光スペクトルを示すグラフであり、358nm励起で観察された固有蛍光に観察された強度差を示す。

30

【図9D】

正常の鱗状上皮（実線）、良性生検部位（破線）および高段階SIL（点線）の測定蛍光スペクトルおよび固有蛍光スペクトルを示すグラフであり、358nm励起で観察された固有蛍光に観察された強度差を示す。

【図10】

正常の鱗状上皮（正方形）、良性生検（丸）およびHSIL（三角形）についてプロットした、相対コラーゲン蛍光レベルの関数としての相対NADH蛍光レベルを示すグラフであり、3つの矢印は「成熟鱗状上皮」として類別された良性生検を示し、他の良性生検は「鱗状化生」として類別された。

40

【図11A】

良性生検採取部位および高段階異形成部位について400nmでの減少した散乱係数を示すグラフである。

【図11B】

特定部位の核サイズ母集団の標準偏差の関数としてプロットした1mm²当りの核密集度すなわち全数を示すグラフであり、線は論理的な回帰により決定されたものである。

【図12】

本発明の好ましい実施形態によるプロセスシーケンスを示すものである。

【図13】

50

本発明による組織層中の構造を測定する好ましい実施形態を示すフローチャートである。

【図 1 4】

本発明の好ましい実施形態による、図 1 3 に示したキャリブレーションのステップを詳細に示すものである。

【図 1 5】

本発明による拡散反射率スペクトル (D R S) の分析を詳細に示す本発明の好ましい実施形態のフローチャートである。

【図 1 6】

本発明の好ましい実施形態による固有蛍光スペクトル (I F S) の分析を詳細に示すフローチャートである。

【図 1 7 A】

本発明の好ましい実施形態による光散乱スペクトル (L S S) の分析を詳細に示すフローチャートの前段部である。

【図 1 7 B】

図 1 7 A のフローチャートの後段部である。

【図 1 8】

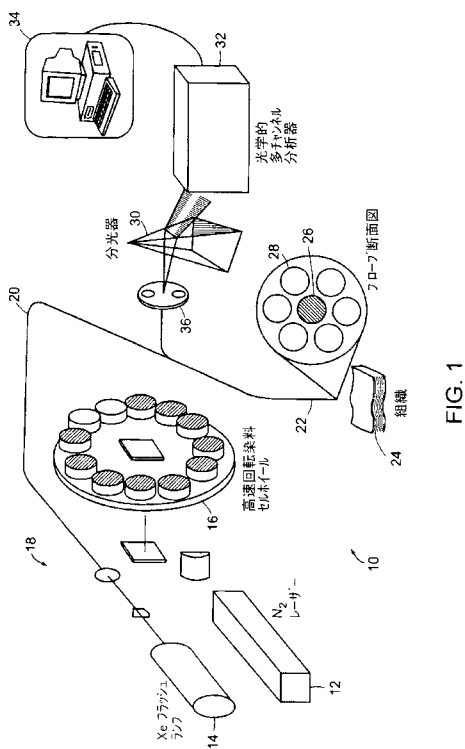
本発明の好ましい実施形態による 3 モードシステムの分析を示すものである。

【図 1 9】

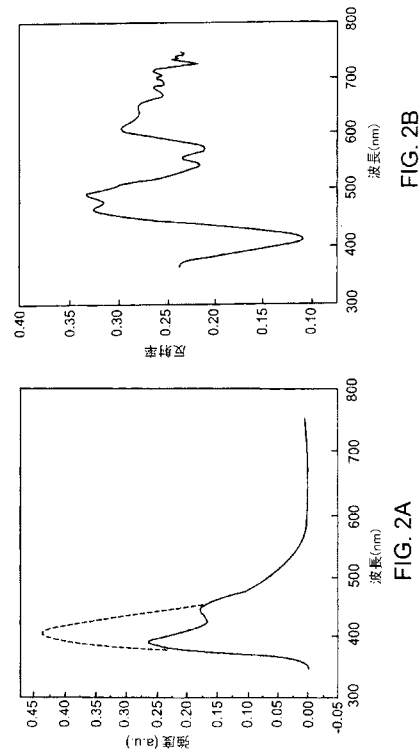
本発明による 3 モードシステムの他の好ましい実施形態を示すものである。

10

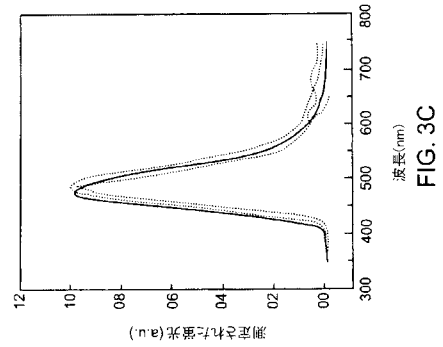
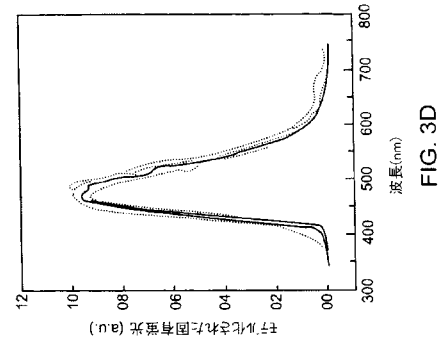
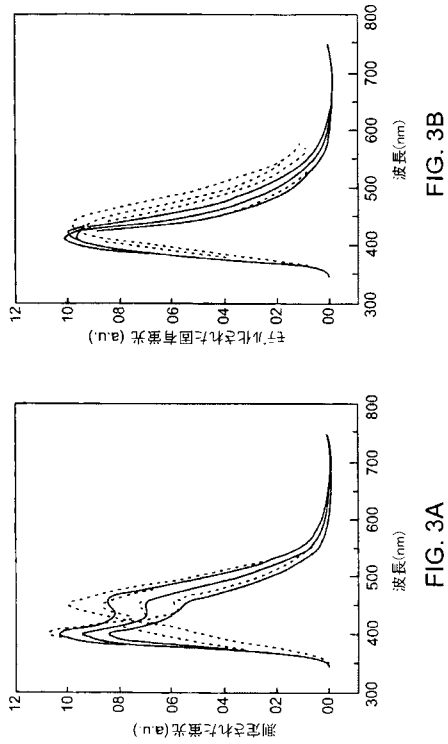
【図 1】



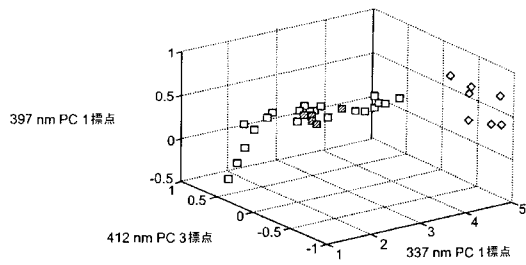
【図 2】



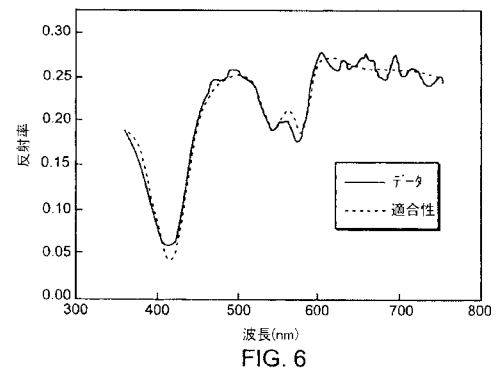
【図 3】



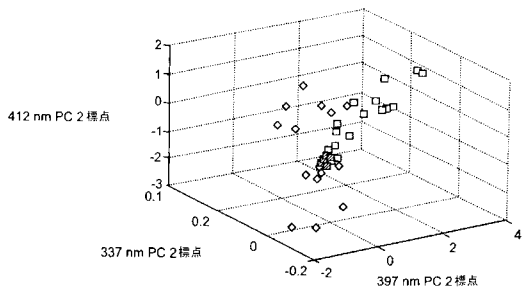
【図 4】



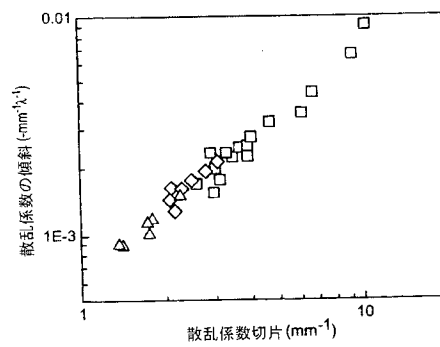
【図 6】



【図 5】



【図 7】



【図 8】

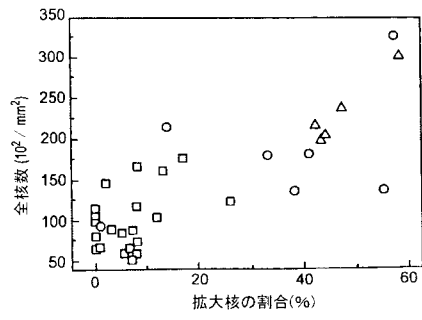


FIG. 8

【図 9】

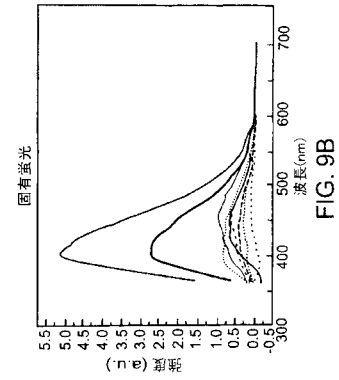


FIG. 9B

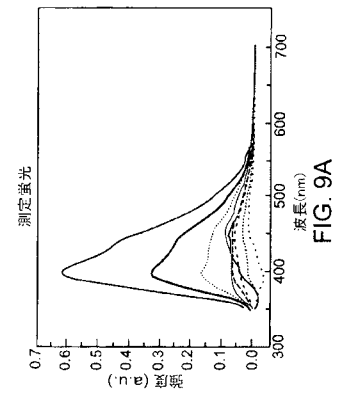


FIG. 9A

【図 10】

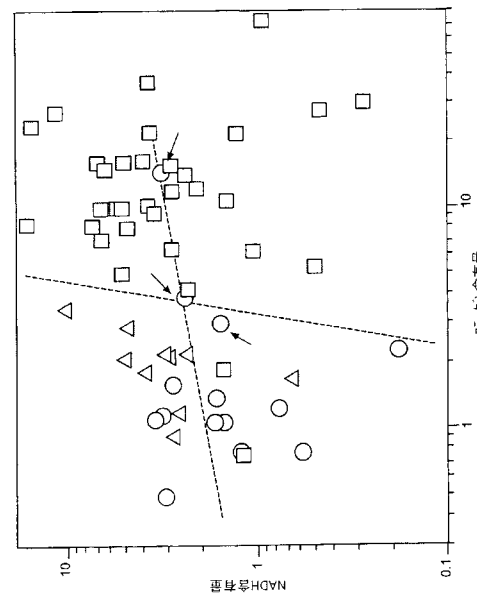


FIG. 10

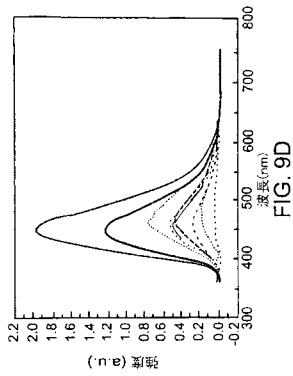


FIG. 9D

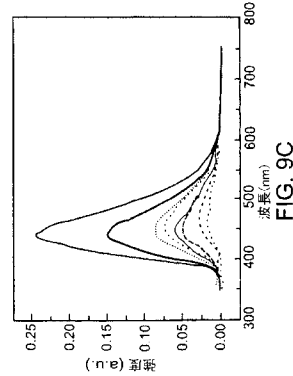
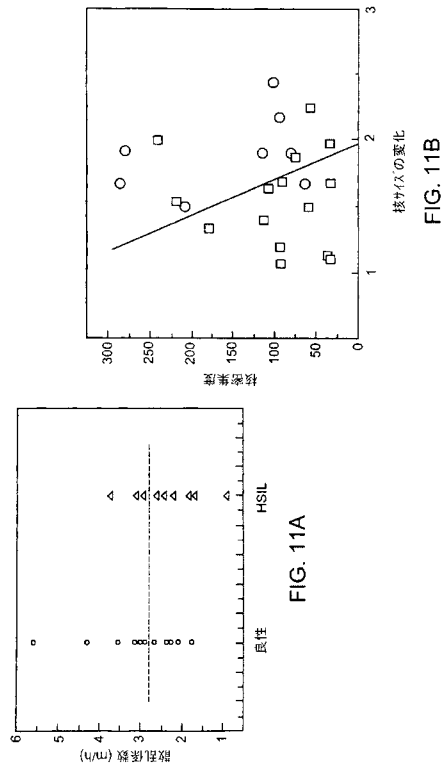
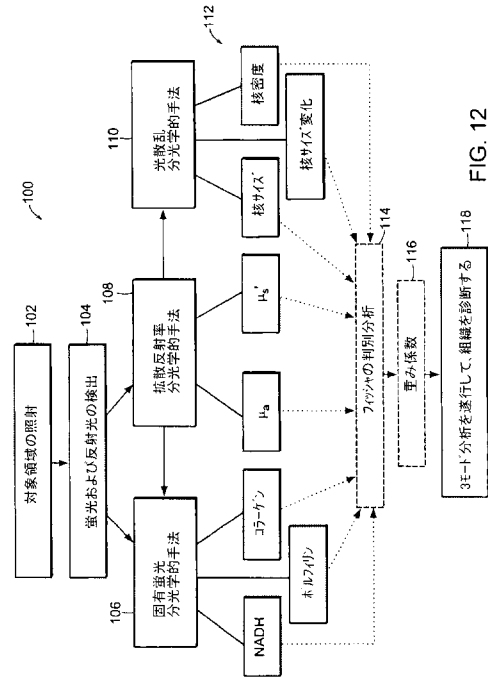


FIG. 9C

【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】

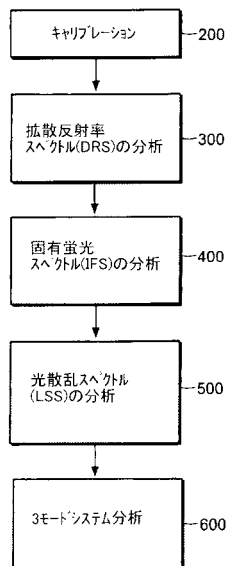


FIG. 13

【図 1 4】

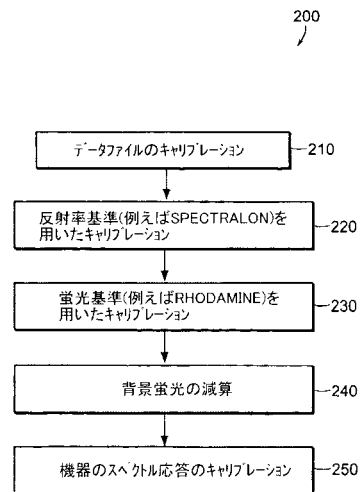


FIG. 14

【図 15】

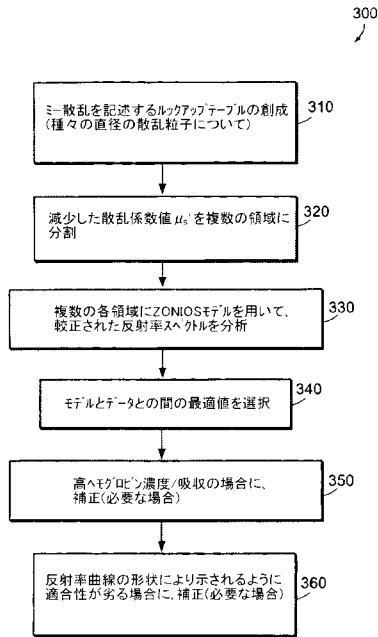


FIG. 15

【図 16】

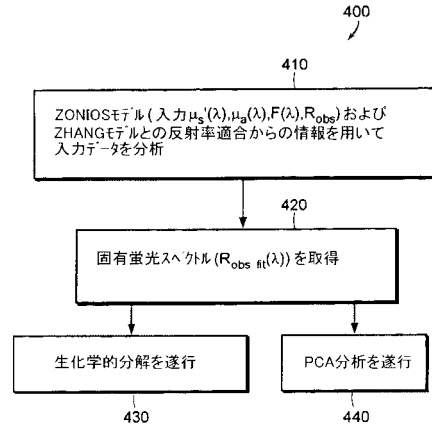


FIG. 16

【図 17 A】

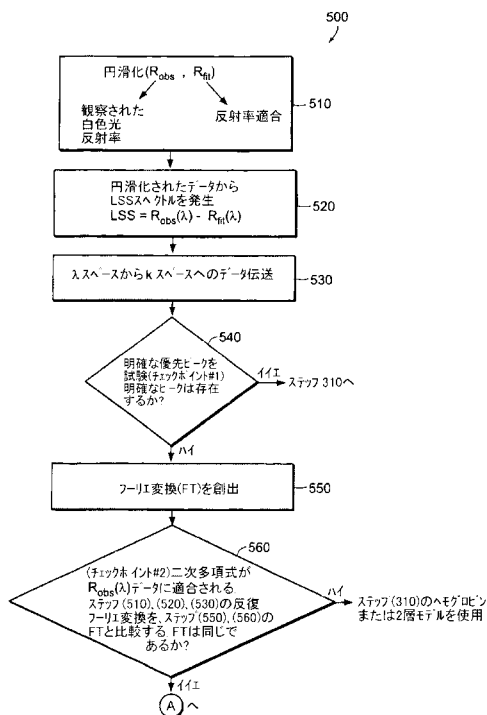


FIG. 17A

【図 17 B】

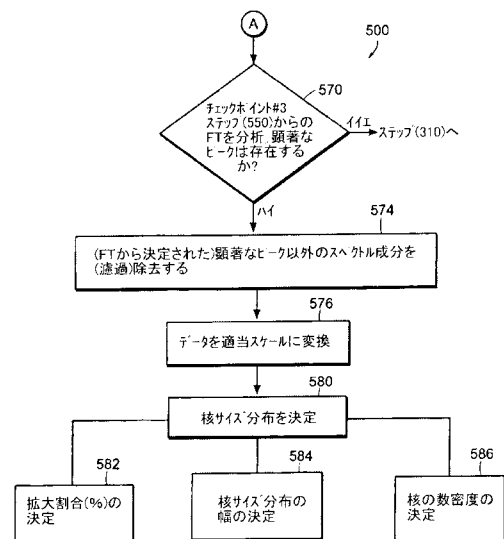
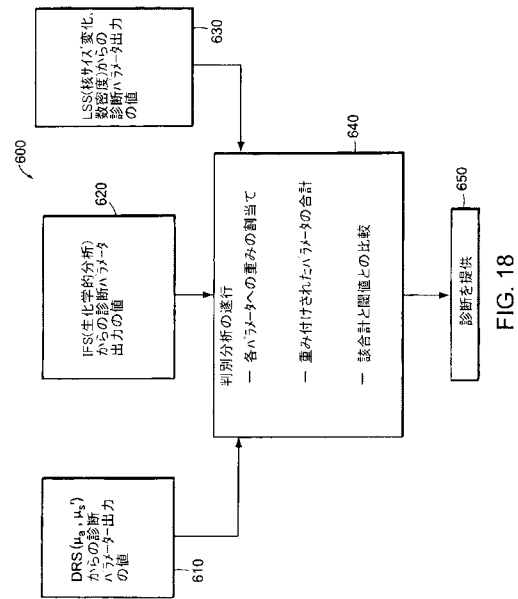
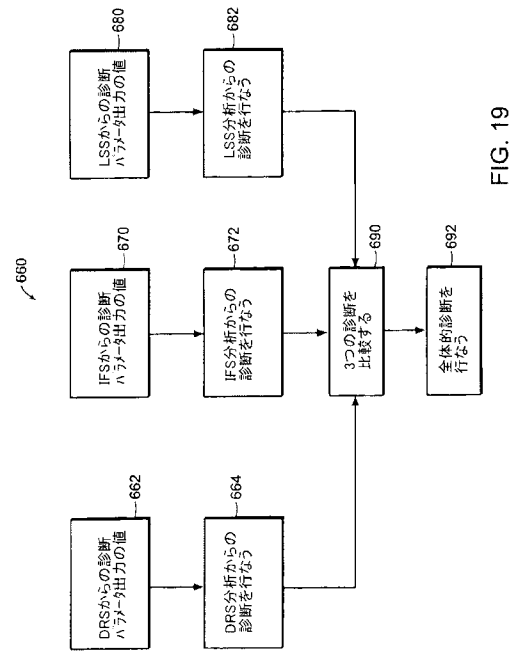


FIG. 17B

【図 18】



【図 19】



【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
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/057757 A2(51) International Patent Classification: G01N 21/64,
21/47

(21) International Application Number: PCT/US02/03094

(22) International Filing Date: 18 January 2002 (18.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 09/766,879 19 January 2001 (19.01.2001) US

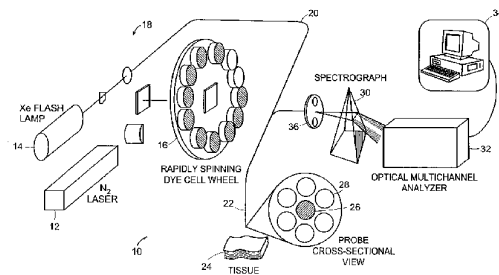
(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: 09/766,879 (CIP) US
Filed on 19 January 2001 (19.01.2001)(71) Applicant (for all designated States except US): MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY [US/US];
77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GEORGAKOUDL

Irene [GR/US]; 2 Berry Lane, Acton, MA 01720 (US);
FELD, Michael, S. [US/US]; 62 Upland Road, Newton,
MA 02168 (US); ZHANG, Qingguo [US/US]; 22 Almont
Street, Medford, MA 02155 (US); MUELLER, Markus,
G. [DE/US]; 154 Amory Street, #2, Cambridge, MA 02139
(US).(74) Agents: GREWAL, Monica et al.; Bowditch & Dewey,
LLP, 161 Worcester Road, P.O. Box 9320, Framingham,
MA 01701 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,

[Continued on next page]

(54) Title: SYSTEM AND METHODS OF FLUORESCENCE, REFLECTANCE AND LIGHT SCATTERING SPECTROSCOPY
FOR MEASURING TISSUE CHARACTERISTICS

(57) Abstract: The present invention utilizes a plurality of spectroscopic systems and methods to measure characteristics of tissue useful in the diagnosis of disease. In a preferred embodiment, a combination of fluorescence, reflectance and light scattered spectra can be measured and processed to provide biochemical, architectural and morphological state of tissue. The methods and systems can be used particularly in the early detection of carcinoma within tissue in vivo and in vitro.

WO 02/057757 A2

WO 02/057757 A2



GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR,
NE, SN, TD, TG).

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.

Published:

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

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-1-

SYSTEM AND METHODS OF FLUORESCENCE, REFLECTANCE AND
LIGHT SCATTERING SPECTROSCOPY FOR MEASURING TISSUE
CHARACTERISTICS

CROSS REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS

- 5 The present application is a continuation-in-part of co-pending U.S. Patent Application Serial No. 09/766,879, filed January 19, 2001. The entire contents of the above application is incorporated herein by reference.

BACKGROUND OF THE INVENTION

- 10 Adenocarcinoma of the lower esophagus develops almost exclusively in patients with Barrett's esophagus (BE), a condition characterized by the presence of metaplastic columnar epithelium. While the prognosis of patients diagnosed with adenocarcinoma is poor, the chances of successful treatment increase significantly if the disease is detected at the dysplastic stage. The surveillance of patients with BE
- 15 for dysplasia is challenging in two respects. First, dysplasia is not visible during routine endoscopy. Thus, numerous random biopsies are required. Second, the histopathologic diagnosis of dysplasia is problematic, as there is poor inter-observer agreement on the classification of a particular specimen, even among expert gastrointestinal pathologists. Optical techniques, such as fluorescence, may
- 20 significantly enhance the endoscopist's ability to detect these early dysplastic changes in BE. Indeed, fluorescence spectroscopy studies using exogenous fluorophores, such as Photofrin® and aminolevulinic-acid induced protoporphyrin IX, show that there is a significant difference between the measured red fluorescence of the carcinomatous and non-dysplastic tissue as a result of the preferential
- 25 accumulation of the drug. Initial autofluorescence spectroscopy studies performed at 410 nm excitation report promising results for detecting high-grade dysplasia. However, focal high-grade and low-grade lesions could not be detected reliably. Thus a continuing need exists for further improvements in the optical measurements used to detect early stage carcinomas.

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-2-

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a combination of spectroscopic systems that can improve the sensitivity and accuracy of measuring the state of tissue. For example, a plurality of different spectroscopic systems can be used to determine whether a region of tissue is normal, pre-cancerous or cancerous. In a preferred embodiment dysplasia detection in patients with Barrett's esophagus (BE) can be performed. In a preferred embodiment, fluorescence, reflectance and light scattering spectroscopies provide complementary information about the biochemical, architectural and morphological state of tissue and the corresponding changes that occur during the progression of disease, and in particular, of dysplasia. In a preferred embodiment, the system has been developed for combining these three methods to provide for detection, mapping, and/or imaging of tissue. In particular, methods of processing the spectral or image data with a data processor programmed to perform an automated diagnostic routine is useful to provide the results of a plurality of different measurement modalities including fluorescence and light scattering spectroscopy. A further preferred embodiment of the invention utilizes a tri-modal system to guide a biopsy procedure.

Of importance in this system for real-time measurements is the simultaneous or near simultaneous collection of light from the same spot or region of interest. For example, the collection of light includes the collection of a measured fluorescence and reflectance spectra. The detected reflectance spectrum is processed to remove a diffusive background component. Once this is accomplished, then a component of the light that is periodic in wavelength is measured. This component arises from the light that is Mie-scattered by surface epithelial cell nuclei, for example. By analyzing the amplitude and frequency of the periodic structure, the density and size distribution of these nuclei can be extracted. For the reflectance, light scattered and fluorescence components to be properly correlated and used to assess a given region of interest, there is preferably substantial overlap of the excitation light for both the reflectance and fluorescence measurements. The reflected light is used to both correct the fluorescence spectrum and to generate a light scattered spectrum based on the use of the periodic structure contained therein. The apparatus delivers both

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-3-

excitation components to the region of interest through the same distal surface of the probe, preferably through the same optical fiber or collection of fibers.

The biopsy channel of an endoscope can be used to insert the fiber optic light delivery and collection system used to obtain measurements. Alternatively, a small diameter endoscope, 5 mm or less in diameter, for example, can include the light delivery and collection system suitable for many applications. A preferred embodiment of the system can use a single fiber system for delivery and collection, or alternatively, can employ a central delivery fiber and six collection fibers concentrically arranged around the delivery fiber. The proximal end of the light delivery and collection probe is optically coupled to both a broadband flash lamp and a monochromatic source such as a laser. A rotating filter or dye wheel can be used to rapidly switch the excitation wavelength over a selected range.

The need for using reflected light arises from the need to correct for the effects of hemoglobin absorption on the measured integrated tissue fluorescence intensity. The combination of fluorescence and reflectance spectroscopies can be applied to remove distortions introduced by scattering and absorption into the entire measured tissue fluorescence spectrum. The undistorted or modified fluorescence spectrum can serve as a sensitive indicator of tissue biochemistry, while reflectance and light scattering representations provide morphological information on tissue architecture and epithelial cell nuclei. The present invention can include the simultaneous use of all three spectroscopic methods for characterizing tissue and diagnosing disease. The following demonstrates that the combined use of all three techniques provides improved results as compared to the results of each technique individually, in terms of detecting not only high-grade, but also low-grade dysplastic changes in BE, for example.

In a preferred embodiment, a method of analyzing spectral data to measure a structure in a layer of tissue includes providing a light collection system to collect fluorescent and reflected light from the tissue at a plurality of wavelengths and detect the collected light. The method further includes forming a fluorescence representation and a scattered light representation as a function of wavelength from the detected light. The method includes determining a characteristic of the tissue layer with the fluorescent representation and the scattered light representation. The

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-4-

method includes using the scattered light representation to determine a size of a structure, for example, the nuclei of cells, within the tissue layer. A diffuse reflectance spectrum can be analyzed in a preferred embodiment. The method, in the preferred embodiment includes generating a lookup table with different sizes of scatterers. The fluorescence representation can be corrected to obtain an intrinsic fluorescence spectrum.

In a preferred embodiment of the present invention a method for analyzing tissue spectra includes acquiring a fluorescence spectrum, acquiring a reflectance spectrum and then processing the two to provide an intrinsic fluorescence spectrum, a diffuse reflectance spectrum and a light-scattering spectrum. The method includes determining a biophysical tissue characteristic from the intrinsic fluorescence spectrum, the diffuse reflectance spectrum and the light scattering spectrum. The method may include performing a discrimination analysis using the diagnostic parameters from the diffuse reflectance spectrum, the diagnostic parameters from the intrinsic fluorescence spectrum and the diagnostic parameters from the light scattered spectrum and then providing a diagnosis.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 schematically illustrates a preferred embodiment of a system for performing measurements in accordance with the invention.

Figure 2A illustrates graphically fluorescence from a non-dysplastic Barrett's esophagus site, 337 nm excitation wherein the measured spectrum is the solid line; extracted intrinsic fluorescence is the dashed line.

Figure 2B illustrates graphically the corresponding reflectance spectrum in accordance with the fluorescence spectrum illustrated in Figure 2A.

Figures 3A-3D illustrate the fluorescence spectra from non-dysplastic (solid lines), low-grade (dashed-lines) and high-grade dysplastic (dotted lines) Barrett's esophagus (BE) sites. The measured and corresponding extracted intrinsic fluorescence for excitation at 337 nm ((A) and (B)) and 397 nm ((C) and (D)) are shown. Spectra are normalized to their peak intensities. Note the significant lineshape changes. The mean $\pm$ standard deviation values are displayed for each category.

Figure 4 illustrates the scores of three principal components extracted from the decomposition of intrinsic fluorescence spectra at 337, 397 and 412 nm excitation used to distinguish high-grade dysplasia (diamonds) from non-dysplastic and low-grade dysplasia (squares) Barrett's esophagus (BE) sites. At 337 nm excitation, decomposition was performed in the 460 to 520 nm region of the intrinsic fluorescence spectra, as this is the wavelength range within which spectral differences are most pronounced. Similarly, at 397 nm excitation principal components were extracted from the intrinsic fluorescence spectra between 600 and 650 nm. PC 1 indicates the first principal component and PC 3 the third.

Figure 5 illustrates the scores of three principal components extracted from the decomposition of the entire intrinsic fluorescence spectra at 337, 397 and 412 nm excitation used to distinguish dysplastic (low- and high-grade; diamonds) from non-dysplastic (squares) Barrett's esophagus (BE) sites. PC 2 indicates the second principal component.

Figure 6 is a reflectance spectrum of a non-dysplastic Barrett's esophagus site. The solid line represents the measured data and the dashed line represents the projected properties of the tissue based on known scattering and absorption properties of the tissue.

Figure 7 illustrates graphically the slopes and intercepts of wavelength dependent tissue reduced scattering coefficient, $\mu_s'(\lambda)$, for non-dysplastic (squares), low-grade (diamonds) and high-grade (triangles) dysplastic Barrett's esophagus (BE) sites. In each case, a straight line was fit to $\mu_s'(\lambda)$, extracted from the reflectance spectrum. A log-log scale is used to facilitate visualization of all the data points.

Figure 8 illustrates the total number of nuclei per mm^2 plotted as a function of percentage of enlarged nuclei (diameter $> 10 \mu\text{m}$), as determined from the light-scattering model analysis. Non-dysplastic Barrett's are represented by squares, low-grade dysplasia are represented by circles; and high-grade dysplasia are represented by triangles.

Figures 9A-9D illustrate graphically the measured and intrinsic fluorescence spectra of normal squamous epithelium (solid line), benign biopsied sites (dashed lines) and high-grade SILs (dotted lines). Curves A and B show differences in the

lineshape and intensity observed at 337 nm excitation. Curves C and D show intensity differences observed in the intrinsic fluorescence excited at 358 nm.

Figure 10 illustrates relative NADH fluorescence levels as a function of relative collagen fluorescence levels plotted for normal squamous epithelium (squares), benign biopsies (circles) and HSILs (triangles). The three arrows point to the benign biopsies that were classified as "mature squamous epithelium." The remaining benign biopsies were classified as "squamous metaplasia."

Figure 11A shows reduced scattering coefficient at 400 nm for benign biopsied and high-grade dysplastic sites.

Figure 11B shows nuclear crowding or total number of nuclei per mm^2 plotted as a function of the standard deviation of the nuclear size population for a particular site. The line is determined by logistic regression.

Figure 12 illustrates a process sequence in accordance with a preferred embodiment of the present invention.

Figure 13 illustrates a flow chart of a preferred embodiment for measuring a structure in a layer of tissue in accordance with the present invention.

Figure 14 illustrates the details of the step of calibration referred to in Figure 13 in accordance with a preferred embodiment of the present invention.

Figure 15 is a flow chart of a preferred embodiment of the present invention detailing the analysis of the diffuse reflectance spectrum (DRS) in accordance with the present invention.

Figure 16 is a flow chart detailing the analysis of the intrinsic fluorescence spectrum (IFS) in accordance with a preferred embodiment of the present invention.

Figures 17A and 17B illustrate a flow chart detailing the analysis of the light scattering spectrum (LSS) in accordance with a preferred embodiment of the present invention.

Figure 18 illustrates the tri-modal system analysis in accordance with a preferred embodiment of the present invention.

Figure 19 illustrates an alternate preferred embodiment of a tri-modal system analysis in accordance with the present invention.

The foregoing and other objects, features and advantages of the invention will be apparent from the following more particular description of preferred

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-7-

embodiments of the invention, as illustrated in the accompanying drawings in which like reference characters refer to the same parts throughout the different views. The drawings are not necessarily to scale, emphasis instead being placed upon illustrating the principles of the invention.

5 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Measurements are performed, for example, using a fast excitation-emission matrix (EEM) instrument 10 that has been described in greater detail in U.S. Application No. 09/238,664, filed January 26, 1999, the entire contents of which is incorporated herein by reference. The excitation light source of this fast-EEM
 10 system can include a nitrogen laser 12 emitting at 337 nm (Laser Science, Inc., Franklin, MA; Model: VSL-337MD) pumping 10 dye cuvettes precisely mounted on a rapidly rotating wheel 16. In this manner, in a preferred embodiment, eleven different excitation wavelengths are obtained between 337 and 620 nm and coupled using optical system 18 into the delivery fiber of a 1 mm diameter optical fiber probe
 15 20. For the reflectance measurements, white light (350-700 nm) from a Xe flash lamp 14 (Perkin Elmer Optoelectronics, Salem, MA) is coupled into the same probe. Alternatively, for other embodiments involving measurements in the bladder, for example, a XeCl excimer laser emitting at 308 nm can be used. In a preferred embodiment, the probe is composed of six collection fibers 28 surrounding the
 20 central light delivery fiber 26, and it is covered with a protective, transparent optical shield at the distal end 22 as shown in Figure 1.

During endoscopy, the probe is inserted into the accessory channel of the endoscope and brought into gentle contact with the tissue, thus providing a fixed delivery-collection geometry. The reflected and fluorescence light is collected by
 25 the probe and coupled to a spectrograph 30 and detector 22. A second synchronized wheel 36 is used to block the fluorescence excitation wavelength. The average of three sets of spectra from each site is used for analysis using a data processing system 34. Immediately following data acquisition, the probe is removed and a slight demarcation remains on the tissue for 30 to 60 seconds as a result of the probe
 30 contact. This endoscopically apparent marker is used as a guide for taking a biopsy from the same site at which spectra were acquired. The biopsy specimen is

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-8-

interpreted and classified by a gastrointestinal pathologist. If a dysplastic lesion is suspected, the specimen is reviewed and the diagnosis confirmed by a second gastrointestinal pathologist, in accordance with the standard of care. Data has been analyzed from 26 non-dysplastic Barrett's esophagus sites (9 patients), 7 low-grade (4 patients) and 7 high-grade (5 patients) dysplastic sites.

Three types of spectroscopic information are acquired, preferably in less than one second in a preferred embodiment. Fluorescence spectra at eleven different excitation wavelengths, reflectance spectra and light scattering spectra are obtained. Each type of spectrum can be analyzed in a manner that provides information about biochemical and morphological changes that occur during dysplastic transformation. Fluorescence spectroscopy can provide valuable information about changes that take place in tissue biochemistry during the development of dysplasia. However, the measured tissue fluorescence spectra can be distorted significantly by unrelated scattering and absorption events. To remove these distortions, the fluorescence spectra are analyzed in combination with information from the corresponding reflectance spectra. The success of this procedure is predicated on the fact that the fluorescence and reflectance spectra collected from a specific site or region of interest using the same light delivery/collection geometry undergo similar distortions. By extracting the intrinsic (undistorted) tissue fluorescence, changes in tissue biochemistry may be isolated in a more sensitive and specific manner.

Principal component analysis and logistic regression is employed to determine the correlation between spectral features of the intrinsic fluorescence and histopathological diagnosis. To analyze this relatively small data set in an unbiased manner, "leave-one-out" cross-validation can be used. Specifically, the principal components of the intrinsic fluorescence spectra that described the spectral features that change during the progression of dysplasia are selected. The corresponding scores (the coefficients describing the contributions of the principal components to the overall spectra) can be used to determine the ability of the system to distinguish (a) high-grade dysplasia from low-grade dysplastic and non-dysplastic Barrett's esophagus (BE), and (b) dysplastic (low- and high-grade) from non-dysplastic Barrett's esophagus (BE). To achieve that in an unbiased manner, the following procedure can be performed. The scores from a particular site are eliminated, and

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-9-

logistic regression is used to form a decision surface that classifies the remaining sites in a manner that optimizes agreement with the histopathological classification. The resulting decision surface may be then used to classify the excluded site. This process can be repeated for each of the sites. This method provides use of a

5 relatively small data set to validate the performance of a decision surface without bias. The decision surface varied minimally during this procedure, indicating the reliability of the technique. Sensitivity and specificity values can be determined by comparing the spectroscopic classification with histopathology. Statistical analysis may be performed using Matlab statistic software (The Math Works, Inc, Natick,

10 MA) in accordance with a preferred embodiment.

The measured reflectance spectra can be analyzed using a representation based on diffusion theory which expresses the reflected light as a function of the absorption ($\mu_a(\lambda)$) and reduced scattering ($\mu_s'(\lambda)$) coefficients of tissue. This analysis provides information about the architecture and morphology of mainly the

15 connective tissue, i.e. the lamina propria and the submucosa, as the collected light originates within 500-700 μm from the tissue surface. The diagnostic value of the resulting tissue scattering coefficient values can be determined by correlating the results of logistic regression and cross-validation with histopathological classification, as in the intrinsic fluorescence case.

20 A small fraction (2-5%) of the detected reflected light originates from light collected by the probe after being scattered only once by the tissue. This method described generally herein as light scattering spectroscopy is described in greater detail in U.S. Patent No. 6,091,984, issued on July 18, 2000, the entire contents of which is incorporated herein by reference. Additional methods for measuring tissue

25 structure are described in International Application No. PCT/US98/2145, filed on October 9, 1998 designating the United States, the entire contents of which is also incorporated herein by reference. The intensity of this singly-scattered light contains a component which is periodic in inverse wavelength, the magnitude and frequency of which depends on the number and size of the nuclei in the epithelial cell layer.

30 This periodic signal is analyzed to determine the number and size of epithelial cell nuclei corresponding to a particular site. Logistic regression and cross-validation are then used to compare the spectroscopic classification with that of histopathology.

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-10-

To optimize sensitivity and specificity, the posterior probability threshold for separating high-grade dysplasia from non-high-grade dysplasia sites is set to 0.3 in one preferred embodiment.

Finally, results from all three spectroscopic techniques are combined to determine whether the number of correctly classified sites can be improved. Specifically, a site is assigned a classification that is consistent with results from at least two of the three analysis methods, and this classification is compared to histopathology.

Figure 2A shows a typical fluorescence spectrum excited with 337 nm light from a non-dysplastic Barrett's esophagus (BE) site (solid line). There are two peaks, which can be attributed to the presence of two different tissue fluorophores. Note that the fluorescence intensity decrease between these two peaks occurs at the wavelength range in which hemoglobin absorbs light very efficiently. The effects of hemoglobin absorption are observed in the corresponding reflectance spectrum, which exhibits minima at approximately 420, 540 and 580 nm, corresponding to oxy-hemoglobin absorption peaks (Figure 2B). When the measured fluorescence spectrum of Figure 2A is processed in combination with the corresponding reflectance spectrum of Figure 2B as discussed herein, the intrinsic (undistorted) tissue fluorescence spectrum at the particular excitation wavelength is obtained (Figure 2A, dashed line). Note that this spectrum consists of a single broad peak.

Significant differences are observed in the representation of intrinsic tissue fluorescence of non-dysplastic and dysplastic Barrett's esophagus (BE) sites excited at 337 nm (Figures 3A and 3B) and 397 nm (Figures 3C, 3D). At 337 nm excitation the lineshape of the dysplastic sites broadens and shifts to the red region of the spectrum during the progression from non-dysplastic, to low-grade, to high-grade dysplasia. At 397 nm excitation, the fluorescence increases in the red region of the spectrum for the dysplastic BE sites. Similar changes are observed at 412 nm excitation.

These differences can be used to develop algorithms for detecting dysplasia in BE. Specifically, principal component analysis, logistic regression and leave-one-out cross-validation are employed to determine the sensitivity and specificity with which one can separate (a) non-dysplastic from dysplastic (low- and

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-11-

high-grade) tissue, and (b) high-grade dysplasia from low-grade and non-dysplastic BE epithelium. In each case, the scores of one of the first three principal components extracted from the intrinsic fluorescence spectra at 337, 397, and 412 nm excitation are used (Figures 4 and 5). The selected principal components

5 describe the observed spectral differences. From this analysis, sites with high-grade dysplasia can be differentiated from low-grade and non-dysplastic sites with high sensitivity and specificity (Table 1). Additionally, dysplastic and non-dysplastic epithelia can be distinguished with very high sensitivity and specificity.

Table 1 illustrates the accuracy of spectroscopic classification of

10 non-dysplastic (NDB), low-grade (LGD) and high-grade dysplastic (HGD) tissue in Barrett's esophagus.

Table 1

	HGD vs. (LGD and NDB)		(LGD and HGD) vs NDB	
	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
Intrinsic fluorescence (IF)	100%	98%	71 %	92%
Reflectance (R)	86%	100%	79%	88%
Light Scattering (LS)	100%	91%	93%	96%
Combination of IF, R and LS	100%	100%	93%	100%

Reflectance spectra can be analyzed using a mathematical representation to obtain detailed information about the scattering and absorption properties of the bulk tissue. A typical reflectance spectrum with the corresponding fit obtained using this

15 representation is shown in Figure 6.

This type of analysis shows that the reduced scattering coefficient $\mu_s'(\lambda)$ of Barrett's esophagus tissue changes gradually during the progression from non-dysplastic, to low-grade, to high-grade dysplasia. For example, at 400 nm the $\mu_s'(\lambda)$ of high-grade dysplastic tissue ($1.3 \pm 0.2 \text{ mm}^{-1}$) is lower than that of

20 low-grade dysplastic tissue ($1.8 \pm 0.3 \text{ mm}^{-1}$) which, in turn, is lower than that of non-dysplastic Barrett's esophagus (BE) tissue ($3 \pm 1.6 \text{ mm}^{-1}$). Additionally, the wavelength dependence of $\mu_s'(\lambda)$ changes during the development of dysplasia. To describe these changes, a straight line is fit to $\mu_s'(\lambda)$ and the intercept and slope of this line are used as diagnostic parameters (Figure 7). Using logistic regression and

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-12-

leave-one-out cross-validation, the sensitivity and specificity for 10 classifying tissue in accordance with histopathology are determined. This method results in slightly lower overall sensitivity and specificity values than those achieved with the intrinsic fluorescence spectra (Table 1).

5 The reflectance spectra are further processed in a manner that allows extraction and analysis of the backscattered light from the epithelial cell nuclei. The results of this analysis are displayed in Figure 8. The ordinate of Figure 8 represents the number of nuclei per square mm, indicative of the degree of nuclear crowding, and the abscissa represents the percentage of enlarged nuclei, defined as nuclei
10 having diameter greater than 10 microns. Note that the non-dysplastic samples are concentrated in the lower left-hand corner, indicating cell nuclei that are small and free of crowding. As dysplasia progresses, the data points move to the upper right, indicating nuclear enlargement and crowding, in agreement with the findings of histopathology. This technique is superior in terms of separating the dysplastic
15 (low- and high-grade) from the non-dysplastic BE sites (Table 1).

 The ability to characterize dysplastic and non-dysplastic tissue in BE is improved by combining the information provided by each one of the spectroscopic techniques, obtained simultaneously with our system. When a spectroscopic classification is consistent with at least two of the three analysis methods, high-grade
20 dysplasia is identified with perfect sensitivity and specificity, and dysplastic tissue is distinguished from non-dysplastic tissue with perfect specificity, while maintaining very high sensitivity (Table 1).

 Spectroscopic techniques use information contained in light signals to assess the state of biological tissue. Optical fiber technology allows spectroscopic methods
25 to be applied as a diagnostic tool for a wide range of tissues that are accessible endoscopically. The use of spectroscopy as described herein can be used for improving the physician's ability to detect pre-cancerous (dysplastic) and early cancerous lesions in many organs, such as the oral cavity, the cervix, the lung, the breast and the gastrointestinal tract. Depending on the technique employed, specific
30 information can be acquired about tissue biochemical, architectural and morphological features. Microscopic changes in these features that occur during the progression of dysplasia may be detectable spectroscopically before the

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-13-

manifestation of macroscopic changes that are visible endoscopically. Additionally, spectroscopic techniques are non-invasive, allowing study of the tissue in its native state, free of artifacts introduced by cutting and chemically processing the tissue. In principle, spectroscopic signals can be analyzed in real-time, thus guiding the physician to biopsy areas that are likely to yield significant pathology or possibly allowing her to make an immediate decision on the type of intervention that is required for successful treatment of the patient. Furthermore, the spectroscopic signals carried by light can be used as objective guides for assessing a particular tissue site, especially in areas in which the intra- and inter-observer agreement on the classification of disease is not very good.

The targets of fluorescence spectroscopy include tissue biochemicals such as NADH, FAD, collagen, elastin and porphyrins. Exogenous or exogenously-induced chromophores that have been shown to accumulate preferentially in the diseased areas can also be used. The detection of high-grade dysplasia using tissue autofluorescence excited at 410 nm have been conducted. The difference between the measured integrated intensity-normalized fluorescence and the mean normalized fluorescence from normal esophageal tissue was used for the diagnostic procedure. The main spectral features that resulted in good differentiation between high-grade dysplastic and non-dysplastic tissues were the presence of decreased fluorescence around 470-480 nm and increased fluorescence in the red region of the spectrum for the high-grade dysplastic tissues. However, this process does not classify correctly sites with low-grade or focal high-grade dysplasia.

In the present example illustrating an embodiment of the invention fluorescence spectra at 11 different excitation wavelengths between 337 and 610 nm were obtained. Thus, instead of a single fluorescence spectrum an excitation-emission matrix (EEM) is collected. EEMs can be used to identify the excitation wavelengths at which tissue classification is optimized. Additionally, EEMs can assist in identifying the origins of the measured fluorescence signals in a more reliable manner. Nevertheless, as shown in Figures 2 and 3, these measured EEMs can be distorted significantly by tissue scattering and absorption. To eliminate artifacts introduced by changes in scattering or absorption, rather than by tissue biochemistry, corresponding reflectance spectra can be used which are

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-14-

affected in a similar manner by scattering and absorption events. Once the distorted measured tissue fluorescence spectra are rectified using the reflectance, tissue fluorescence excited at 337 nm broadens and shifts to longer wavelengths in a very consistent manner as the tissue progresses from non-dysplastic to low-grade to high-grade dysplasia (Figure 3). These spectral changes are consistent with the presence of increased NADH levels in dysplastic tissue. Our findings at 397 and 412 nm excitation are attributed to endogenous porphyrins. The spectra corresponding to the high-grade dysplasia sites appear slightly distorted around 470 nm, even after correcting for the effects of scattering and absorption. This suggests that this difference arises as a result of biochemical changes rather than absorption changes.

To demonstrate the level of significant changes that are observed in tissue fluorescence during the development of dysplasia, the scores of one of the first three principal components which described over 99% of the variance observed in the intrinsic fluorescence spectra excited at 337, 397 and 412 nm can be used. Subsequently, one can use logistic regression and leave-one-out cross-validation to estimate and validate in an unbiased manner the sensitivity and specificity with which one can distinguish (a) high-grade dysplasia from low-grade and non-dysplastic tissue, and (b) dysplastic (low- and high-grade) from non-dysplastic tissue to separate high-grade dysplasia from low-grade and non-dysplastic tissue, spectroscopic classification is consistent with histopathology in all but one case. Additionally, one can distinguish dysplastic from non-dysplastic tissue with very high sensitivity and specificity.

Reflectance spectroscopy can be used not only to remove the distortions observed in the measured tissue fluorescence spectra, but also to provide very detailed and potentially useful information about morphological and architectural features of the tissue. Specifically, as shown in Figure 6 the observed tissue reflectance spectra can be used in terms of two parameters that are determined by tissue scattering and absorption. For example, changes in the concentration or the oxygen saturation of hemoglobin, the main absorber in the visible spectrum for this tissue type, result in concomitant changes in the absorption coefficient of tissue. Alterations in the architecture of the connective tissue collagen fibers, one of the

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-15-

main contributors of tissue scattering, lead to a modified tissue scattering coefficient. The analysis suggests that the scattering coefficient of tissue decreases significantly during the development of dysplasia, suggesting that changes that are not observed histopathologically are taking place within the lamina propria and submucosa before

5 the onset of invasion. Recently, it has been shown that an increased level of cysteine and serine proteases is found in gastric and colorectal cancerous and precancerous lesions. The findings related to the decrease in the value of the scattering coefficient during the progression of dysplasia are consistent with the presence of such enzymes, which can result in a less dense collagen matrix, for instance. The change

10 in the slope of $\mu_s'(\lambda)$ as a function of wavelength suggests that the mean size of the tissue scattering particles is changing. Crowding of the cells and nuclei of the epithelial layer may be responsible for this change. As shown in Table 1, one can use the observed changes in tissue scattering to classify tissue quite successfully. Light scattering spectroscopy is a procedure that can be used to obtain information

15 about the number and the size of nuclei of the epithelial cell layer. Epithelial cell nuclei are the primary targets of reflected light that is singly scattered before it is collected by a probe. The intensity and oscillations of this singly-backscattered light are characteristic of the number and size of its target nuclei. This technique is used to characterize pre-cancerous and early cancerous changes in the colon, the oral

20 cavity, the bladder and Barrett's esophagus (BE). Results of this technique are included for the data set of a preferred embodiment to illustrate the information that can be acquired and combined with fluorescence and reflectance spectroscopies. Light scattering spectroscopy outperforms the other two methods in terms of its ability to separate the dysplastic from non-dysplastic BE sites.

25 The combination of all three techniques provides an extremely sensitive and specific tool for the detection of dysplasia in Barrett's esophagus (BE). In this case, agreement with histopathology is achieved in terms of separating high-grade dysplasia from non-dysplastic and low-grade dysplasia sites. Additionally, all sites are classified correctly as dysplastic or non-dysplastic, with the exception of one site.

30 The observed improvement is expected, since each one of the techniques examines different features of tissue biochemistry and morphology that can be altered during the development of dysplastic changes.

Pancreatic carcinoma is one of the first five leading causes of death in Western countries and has a very poor prognosis after initial diagnosis. This is due to late presentation of symptoms and the fact that only about 5-20% of all patients are eligible for resection. Adenocarcinoma of the pancreas arises from the ductal epithelium. In the precancerous stages ductal epithelial cells undergo morphological changes similar to those of Barrett's esophagus (BE) including increasing nuclear size and crowding. Several clinical conditions exist which may allow detection of precancerous or early cancerous changes. These include acute or chronic pancreatitis due to focal obstruction of the pancreatic duct, acute pancreatitis due to intraductal papillary mucinous tumor of the pancreas (IPMT), and patients with a strong family history of pancreatic cancer. Detection of dysplasia in this setting is currently based on the detection of stricturing or dilation of the pancreatic duct, and exfoliative cytology. However, these methods cannot reliably distinguish dysplasia and inflammation and have an overall poor sensitivity of 44-70%.

The present invention includes methods for performing tri-modal spectroscopic analysis within the main pancreatic duct using the technique of endoscopic retrograde cholangio-pancreatography (ERCP), and obtained spectra from the pancreatic duct epithelium.

The majority of patients with ductal adenocarcinoma of the pancreas present with late stage tumors that are not amenable to curative therapy. A significant minority of patients present for evaluation at a time where early dysplasia of carcinomas are detectable. These include strictures of the main pancreatic duct (MPD), and IPMT presenting as acute pancreatitis, and in patients with a strong family history of carcinoma of the pancreas. In all of these cases, the presence of dysplasia, and the distribution of dysplasia along the length of the pancreas are critical to management decisions (whether to remove part of all of the pancreas). The present invention can be directed to the use of tri-modal spectroscopy for the detection of dysplasia an invasive cancer in the pancreatic duct. The present invention can evaluate ex vivo or in vivo specimens of patients to detect pancreatic cancer of dysplasia. Spectra can be collected from the MPD at 1 cm intervals within 3 hours of resection and before formalin fixation. Tri-modal spectral analysis can be performed to evaluate for components which accurately discriminate histological

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-17-

categories. These spectral algorithms can be applied in vivo to patients undergoing endoscopic retrograde cholangiopancreatography for evaluation of the 3 conditions mentioned above. Spectra can be collected in vivo at 1 cm intervals along with entire length of the duct. Spectral signals can be compared to histology among the patients whose clinical condition dictates surgical removal of the pancreas. Anatomic locations of the spectral signals can be matched according to the distance from MPD orifice.

The present invention can be employed for the detection of pre-invasive disease of the cervix either alone or at the time of colposcopy following an abnormal Pap smear. The present invention can also be used for a non-invasive method of monitoring the progress of medical therapies for pre-invasive disease.

The Pap smear is a screening tool for cervical tissue abnormalities. Abnormal Pap smears are routinely followed up by colposcopy. This process uses a low-power binocular microscope for the identification of abnormal cervical epithelium, which is subsequently biopsied and examined histopathologically. It is estimated that in expert hands the sensitivity and specificity of colposcopy are 94% and 48%, respectively.

A preferred embodiment of the present invention include spectroscopic techniques to evaluate cervical epithelium in vivo. Tissue fluorescence spectra excited at 337, 380 and 460 nm were acquired during colposcopy from normal and suspicious sites within the ectocervical and endocervical regions. Suspicious sites were biopsied and classified histopathologically. An initial set of spectra was analyzed and statistical methods were developed to optimize the agreement between spectroscopic and histopathological classification. When these methods were used prospectively to classify a second set of data, it was found that squamous intraepithelial lesions (SILs) can be identified spectroscopically with 82% sensitivity and 68% specificity when compared to histopathology. The present invention improves upon the sensitivity and specificity of spectral analysis of cervical epithelium in a real-time in vivo approach. The method employs tri-modal spectroscopy (TMS), the combined use of intrinsic fluorescence spectroscopy (IFS), diffuse reflectance spectroscopy (DRS), and light scattering spectroscopy (LSS).

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-18-

- The method can compare the spectra obtained using tri-modal processing with the histologic diagnosis of the area of epithelium biopsied. This process provides patterns that are predictive of histologic dysplasia in a prospective fashion, thus allowing the clinician to increase the positive histologic lesions of the cervical epithelium prospectively. This can be of immense value in following patients on clinical trials in order to determine the response to medical treatments of cervical dysplasia.
- Spectra can be acquired from the normal squamous ectocervix and suspicious sites within the transformation zone. The latter may be biopsied immediately following spectral acquisition. Data has been collected from 34 patients, 42 normal ectocervical sites (not biopsied), 15 benign biopsied sites (12 classified as squamous metaplasia and 3 as mature squamous epithelium) and 10 high-grade squamous intraepithelial lesions (HSILs).
- Differences in the intrinsic fluorescence intensity and/or lineshape are observed for several excitation wavelengths as shown in Figures 9A-9D.
- Instead of using principal component analysis for the assessment of the diagnostic potential of intrinsic fluorescence spectroscopy, the spectra may be decomposed as a linear combination of the NADH and collagen EEMs extracted from the measurements performed during variceal ligation.
- A significant decrease is observed in collagen fluorescence of the benign biopsied sites and HSILs compared to that of the normal squamous epithelium as seen in Figure 10. These changes result from differences in the levels of expression of matrix metalloproteinases (MMPs), a class of enzymes responsible for collagen degradation. Differences in the levels and/or patterns of expression of MMP-2 have been reported between normal squamous epithelium, squamous metaplasia and SILs. Additionally, an increase in the NADH fluorescence is noted for the HSILs compared to that of benign biopsied sites as seen in Figure 11A. This increase can be the result of an increase in the number of epithelial cells and/or their metabolic activity (52). Using logistic regression and "leave-one-out" cross-validation, as in the case of Barrett's esophagus, HSILs can be distinguished from the benign biopsied sites with a sensitivity of 80% and a specificity of 67%.

Analysis of the diffuse reflectance spectra using the periodic component in the scattered light indicates that the reduced scattering coefficient of the HSILs is generally lower than that of the squamous metaplastic and mature squamous epithelium biopsied sites as seen in Figure 11B. When the value of $\mu_s'(\lambda)$ at 400 nm is used to perform logistic regression and cross-validation, 7/10 HSILs (70% sensitivity) and 9/15 benign biopsied sites (60% specificity) are classified correctly.

Extraction and analysis of the light scattering spectra indicated that the variation in nuclear size, i.e. the standard deviation of the nuclear size population corresponding to a particular site, has a higher diagnostic value than the percentage of enlarged nuclei considered in the case of Barrett's esophagus. Using logistic regression and cross validation with the nuclear size standard deviation and the number of nuclei per unit area as diagnostic parameters, HSILs may be separated from the benign biopsied sites with 90% sensitivity and 67% specificity as seen in Figure 11B.

Finally, the three techniques, IFS, DRS and LSS, are combined in a preferred embodiment in a manner that classifies a particular site according to the diagnosis that is consistent with at least two of the three methods of analysis. This approach leads to a high level of sensitivity and specificity (100% and 80%, respectively) for the detection of HSILs from non-HSIL sites biopsied within the transformation zone when compared to any one of the techniques alone as seen in Table 2.

Table 2

	benign biopsies vs HSIL	
	Sensitivity	Specificity
Intrinsic Fluorescence Spectroscopy (IFS)	80%	67%
Diffuse Reflectance Spectroscopy (DRS)	70%	60%
Light Scattering Spectroscopy (LSS)	90%	67%
Tri-Modal Spectroscopy (TMS)	100%	80%

Figure 12 illustrates a process sequence 100 of a preferred embodiment of the invention in which a region of interest within a lumen of a patient is illuminated 102 and the fluorescent and reflected light is detected 104. The three components 106, 108 and 110 are used to generate structural and biochemical information 112. This

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-20-

data can be analyzed using discriminant analysis 114, the components weighted 116, and a diagnosis performed 118 in real-time. These measurements demonstrate the ability of spectroscopic techniques to provide useful information for disease classification in a non-invasive manner. While each of the techniques can be used for detecting dysplasia in Barrett's esophagus, their combination allows the formation of a comprehensive picture of the biochemical and morphological state of tissue. Specifically, decomposition of the intrinsic tissue fluorescence EEMs into EEMs of biochemicals such as NADH and collagen can provide details about tissue biochemistry. Reflectance and light scattering spectroscopy yield morphological information related to the connective tissue and the epithelial cell nuclei. As this information is free from artifacts introduced by tissue excision and processing, it can help advance the understanding of the processes that lead to the progression of dysplasia. Software for performing data analysis in real-time enables the applicability of these techniques as a guide to biopsy. Methods to image regions of interest using this procedure enables large tissue areas to be studied rapidly.

An operating environment for the system includes a processing system such as data processing system 34, with at least one high speed processing unit and a memory system. In accordance with the practices of persons skilled in the art of computer programming, the present invention is described with reference to acts and symbolic representations of operations or instructions that are performed by the processing system, unless indicated otherwise. Such acts and operations or instructions are sometimes referred to as being "computer-executed," or "processing unit executed."

It will be appreciated that the acts and symbolically represented operations or instructions include the manipulation of electrical signals by the processing unit. An electrical system with data bits causes a resulting transformation or reduction of the electrical signal representation, and the maintenance of data bits at memory locations in the memory system to thereby reconfigure or otherwise alter the processing unit's operation, as well as other processing of signals. The memory locations where data bits are maintained are physical locations that have particular electrical, magnetic, optical, or organic properties corresponding to the data bits.

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-21-

The data bits may also be maintained on a computer readable medium including magnetic disks, optical disks, organic disks, and any other volatile or non-volatile mass storage system readable by the processing using. The computer readable medium includes cooperating or interconnected computer readable media, which exist exclusively on the processing system or is distributed among multiple interconnected processing systems that may be local or remote to the processing system.

Figure 13 is a flowchart of a preferred embodiment of measuring a structure in a layer of tissue by analyzing data in real-time in accordance with the present invention. The real-time analysis may be used to diagnose a pre-cancerous condition in, for example, epithelial tissue in the cervix and GI tract. The measurement process begins with the step 200 of calibration. The diffuse reflectance spectrum (DRS) is then analyzed per step 300. In step 400 the intrinsic fluorescence spectrum (IFS) is analyzed. The next step in the process includes the step 500 of analyzing the light scattering spectrum (LSS). The method then proceeds to step 600, which represents the combined analysis for the previous modes of this tri-modal system analysis.

In a preferred embodiment, during an endoscopic procedure, fluorescence spectra at a plurality of wavelengths, for example, at eleven laser excitation wavelengths between 337 and 620 nm and one white light (350-750 nm) reflectance spectrum is acquired in less than one second. Light delivery and collection is mediated through an optical fiber probe. The acquired spectra contain information about the uppermost tissue layers, where almost 90% of cancers begin.

From the recorded fluorescence and reflectance spectra, three types of spectroscopic information is extracted: IFS, DRS and LSS. The IFS refers to the recovery of tissue fluorescence spectra that are free of distortions introduced by tissue scattering and absorption. To remove these distortions, the measured fluorescence and reflectance spectra are combined using, for example, a photon-migration-based method. The extracted IFS is decomposed to provide quantitative information on the biochemical tissue composition and the changes that take place in pre-cancerous tissues.

The measured reflectance spectra consists mainly of photons that are scattered many times before being detected. A model that is based on diffusion theory is used to describe the diffusely reflected light and thus to extract information about the absorption and the reduced scattering coefficients of tissue. The reduced scattering coefficient depends mainly on the morphology of connective tissue, which provides structural support for the epithelium, the most superficial tissue layer.

The combined use of the IFS, DRS and LSS serves as a tool for biophysical tissue characterization and detection of pre-cancerous lesions. In a preferred embodiment, the TMS analysis may be performed in 2-8 seconds from time of data collection. This TMS analysis can provide a real-time guide to biopsies.

Figure 14 illustrates the details of the step 200 of calibration in accordance with a preferred embodiment of the present invention. The process of calibration to remove variations in spectra associated with, for example, instruments begins with step 210 of calibrating any data files in the system that are used to diagnose diseased tissue. The next step in the calibration sequence includes the step 220 of calibrating the system with a reflectance standard. This standard may include but is not limited to, for example, the use of a white light standard such as Spectralon calibration of reflectance. The calibration method 200 includes the step 230 of calibrating the system with a fluorescence standard. The fluorescence standard may be, for example, and without limitation, Rhodamine. The next step in the calibration method 200 includes the step 240 of removing the background fluorescence such as, for example, by subtracting any background fluorescence. The spectral response of the instrument is calibrated per step 250.

Figure 15 is a flow chart of a preferred embodiment of the present invention detailing the analysis of the DRS. The process includes the generation of a look-up table which describes the Mie scattering parameter for different diameters of scattered particles per step 310. The creation of the look-up table describing Mie scattering reduces processing time for Mie scattering calculations for each iteration. Step 320 includes dividing the reduced scattering coefficient values $\mu_s'(\lambda)$ into a plurality of different regions. In a preferred embodiment, there are five regions. This division into different regions accounts for the lack of one optimum or

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-23-

universal fit for all $\mu_s'(\lambda)$ values, as there are different values for $\mu_s'(\lambda)$ in different regions. Thus, the $\mu_s'(\lambda)$ space is separated into a plurality of regions and a minimization process is performed for each region separately. In step 330, the calibrated reflectance spectrum is analyzed using a model, for example, the model described in previously referenced U.S. Patent No. 6,091,984 and referenced herein after as the Zonios model in each of the different regions. The Zonios model accounts for one layer tissue architecture and represents an iterative process to get a best fit between the results of the model and values from an actual recording. A preferred embodiment of the present invention includes accounting for a multi-layer tissue architecture such as a two-layer model. In the Zonios model light is provided onto a surface of a tissue by a light source. The light reflected back from the tissue is a function of wavelength and depends on several parameters such as the absorption coefficient of tissue, the reduced scattering coefficient and the probe. Thus, the reflectance spectrum $R(\lambda) = F(\mu_a(\lambda), \mu_s'(\lambda), r_c)$ wherein $\mu_a(\lambda)$ is the absorption coefficient of tissue indicative of hemoglobin or betacarotene or more generally a biochemical that absorbs light, $\mu_s'(\lambda)$ is the reduced scattering coefficient and r_c is the effective light collection area of the probe. A best fit is then selected between the model and data per step 340. The best fit is determined by optimizing values of parameters, for example, a scaling constant, particle size and density and hemoglobin concentration and saturation within a predetermined space. In step 350 a correction is calculated and applied for high hemoglobin concentrations and/or absorption if necessary. Typically the fit is not good when the concentration of hemoglobin is high. In a preferred embodiment if the hemoglobin concentration fit exceeds a predetermined threshold value, the fit is only performed for a region, for example, 450-700 nm. Further, a correction may also be calculated and applied for a poor fit as indicated by the shape of the reflectance curve if necessary per step 360.

Figure 16 is a flow chart detailing the analysis of the IFS in accordance with a preferred embodiment of the present invention. It should be noted that biological tissues are turbid media in which the predominance of light scattering unavoidably entangles the effects of absorption and fluorescence. The interplay of absorption and

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-24-

scattering can substantially distort the measured fluorescence. Therefore, it is important to extract the intrinsic fluorescence from the measured tissue fluorescence. The intrinsic fluorescence is defined as the fluorescence that is due only to fluorophores, without interference from the absorbers and scatterers that are present in the tissue. The greatest distortion of fluorescence spectra occurs for emission near 420 nm where hemoglobin absorbs strongly. Removal of such distortion is particularly important for ultraviolet excitation wavelengths, which have been shown to contain important diagnostic information.

In step 410 the input data is analyzed using the information from the reflectance fit provided by the Zonios model. The inputs include $\mu'_s(\lambda)$, $\mu_s(\lambda)$, fluorescence $F(\lambda)$, and R_{obs} ; wherein R_{obs} is the observed white light reflectance. Data is also analyzed using a method based on photon-migration theory referred to hereinafter as the Zhang model. The Zhang model is an improvement over the model described in U.S. Patent Number 5,452,723 entitled "Calibrated Spectrographic Imaging" issued on September 26, 1995, the entire contents of which being incorporated herein by reference. The Zhang model is described in an article entitled, "Turbidity-free fluorescence spectroscopy of biological tissue," by Zhang et al., and published in Optics Letter, Vol. 25, No. 19, October 1, 2000, the entire contents of which being incorporated herein by reference. The Zhang model is based on the fact that when reflectance and fluorescence are collected from a given tissue site with the same probe, absorption and scattering distort fluorescence and reflectance spectra similarly, because the diffusely reflected and the fluorescence photons traverse similar paths.

In a preferred embodiment, the fluorescence intensity of the medium can be modeled as

$$F_{xm} = \frac{I_x}{h\nu_x} \left[\sum_{n=1}^N \sum_{i=1}^{n-1} \rho_n \alpha_i \left(\frac{\mu_{ix}}{\mu_{ix} - \mu_{ix}} \phi_{xm} \right) \alpha_n^{n-i-1} \right] h\nu_m \quad (1)$$

where I_x denotes the excitation intensity, ϕ_{xm} is the fluorescence quantum yield, in which the subscripts x and m denote evaluation of the corresponding quantities at excitation frequency ν_x and emission frequency ν_m , ρ_n denotes the fluorescence escape probability for the fluorescence rates, α is $\mu_s/(\mu_s + \mu_a)$ and represents the

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-25-

fraction of photons not absorbed during each interaction event and can be considered the photon weight reduction factor for that event. Consequently, the expression in brackets has the meaning of fluorescence photons per excitation photon. After the photon transverses the first i absorption – scattering nodes and experiences

5 propagation loss, its weight becomes α_x^i for each incident excitation photon. For each excitation photon arriving at the $(i+1)$ th node, $\mu_{\beta}/(\mu_{ax} + \mu_{sx})$ photons are absorbed by the fluorophore. For each photon absorbed by the fluorophore, ϕ_{sm} fluorescence photons are generated. The propagation loss of the fluorescence photons is accounted for by the factor α_m^{n-i-l} .

10 For a dilute, optically thin ($\mu_{\beta}l \ll 1$) sample of thickness l , with the same amount of fluorophore but without other absorbers and scatterers, one obtains the following intrinsic fluorescence,

$$f_{sm} = (I_x / h\nu_x) \mu_{\beta} l \phi_{sm} h\nu_m \quad (2)$$

The fluorescence expression in equation 1 can be expressed in terms of

15 reflectance with the help of the following:

$$R = \sum_{n=1}^{\infty} \alpha^n \rho_n = \frac{k\alpha \exp(-\beta)}{1 - \alpha \exp(-\beta)} \quad (3)$$

where R is the reflectance of the homogeneous medium of scatterers and absorbers. The result can be combined with equation 2 to obtain the relationship among intrinsic fluorescence spectrum f_{sm} , experimentally measured fluorescence

20 spectrum F_{sm} , and reflectance spectrum R_m :

$$f_{sm} = \frac{F_{sm}}{\mu_{sx} l \left(\frac{R_{ox} R_{om}}{\epsilon_x \epsilon_m} \right)^{1/2} \frac{R_x}{R_{ox}} \left(\frac{R_m}{R_{om}} + \epsilon_m \right)} \quad (4)$$

wherein R_o is the reflectance in the absence of absorption and $\epsilon = \exp \beta - 1$ where β is a parameter independent of the number of steps n but dependent on the scattering properties of the medium, and μ_s are the scattering coefficients of the

25 tissue.

Equation 4 holds for a probe of arbitrary delivery – collection geometry, as long as the fluorescence and reflectance are measured with the same probe: note that

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-26-

R_o is a function of wavelength. Note that Equation 4 can be used to extract an intrinsic fluorescence excitation – emission matrix (EEM) from an experimentally measured fluorescence EEM. When the medium contains multiple fluorophores, one need only replace every occurrence of $\mu_{\lambda} \phi_{\lambda}$ in equations 1 and 2 with a

5 summation of this quantity over all fluorophores. Doing so results in the same expression as in equation 4.

In step 420 the IFS ($R_{obs, fit}(\lambda)$) is obtained. A biochemical decomposition process may then be performed per step 430. The biochemical decomposition process may be a linear decomposition process based on the IFS and provides a

10 quantitative measure of the spectra. Further a principal component analysis (PCA) analysis may also be performed per step 440.

Figures 17A and 17B are flow charts detailing the analysis of LSS in accordance with a preferred embodiment of the present invention. The analysis begins with step 510 wherein the observed white light reflectance curve ($R_{obs}(\lambda)$)

15 and the reflectance fit curve ($R_{fit}(\lambda)$) are smoothed. A moving window average smoothing process may be used in a preferred embodiment. An LSS spectrum is generated per step 520 from the smoothed data wherein the LSS spectrum is indicative of the difference between the observed white light reflectance and the reflectance fit ($LSS\ spectrum = R_{obs}(\lambda) - R_{fit}(\lambda)$). The LSS spectrum is wavelength

20 dependent. The data is then transferred from wavelength (λ) space to wavenumber (k) space in step 530. A first test is then performed per step 540 wherein it is determined if there is a well defined peak in the spectrum in Fourier space. Only if there is a well defined peak a Fourier transform is estimated, otherwise a reliable diagnosis cannot be provided. In a preferred embodiment the test for the presence of

25 a well-defined peak may include, for example, using a sine Fourier transform

$$\int_{k=\min}^{k=\max} \left(\frac{R(k)}{R(k)} - 1 \right) \sin k \, dk .$$

If a well-defined peak is present, the process follows to step 550 where a Fourier transform (FT) is generated. However, if there is a lack of a well defined peak, the process returns to step 310. The process then enters step 560 which

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-27-

functions as a second test or checkpoint wherein the hemoglobin absorption features are accounted for. The second order polynomial is fit to the $R_{obs}(\lambda)$ data. Steps 510, 520 and 530 are then repeated if the fit is not accurate. A Fourier transform is then performed to compare the resulting FT's from step 550 and step 560. It is then
 5 determined if the FT's are the same. If they are different, the process proceeds to step 570. If the FT's are the same however, another hemoglobin or a two layer model, without limitation, is used such as described with respect to the DRS analysis in Figure 15.

In step 570, a third test or checkpoint is performed by analyzing the FT from
 10 step 550 and ascertaining the presence or absence of a dominant peak. If no dominant peak is present then the process returns to step 310 in the DRS analysis as the hemoglobin absorption parameter is then probably an artifact. If a dominant peak exists then spectral components other than the dominant peak are removed such as by filtering high frequency components per step 574.

15 The data is converted to an appropriate scale per step 576 by, for example, multiplying by an overall scaling constant to normalize the result. The nuclear size distribution is determined in step 580. The determination may include the determination of the percent enlargement of the nuclear size per step 582. The determination of the nuclear size distribution may also include the determination of
 20 the width of the nuclear size distribution per step 584. Further, determination of the nuclear size distribution may include the determination of the number density of the nuclei per step 586.

Figure 18 illustrates a preferred embodiment of a tri-modal system (TMS) analysis in accordance with the present invention. The TMS analysis includes step
 25 610 of at least one of taking values of diagnostic parameters output from the DRS analysis ($\mu_a(\lambda)$ and $\mu_s'(\lambda)$), values of diagnostic parameters output from IFS analysis, for example, but not limited to, bio-chemical analysis per step 620 and values of diagnostic parameters output from the LSS analysis, for example, without limitation, nuclear size distribution, size variation, standard deviation and number
 30 density per step 630 and performing a discrimination analysis in step 640. In a preferred embodiment the discrimination analysis may include, for example, but

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-28-

without limitation, Fisher discrimination analysis which includes assigning weights to each parameter, summing the weighted parameters and comparing the sum to a threshold value. The results of the TMS analysis are provided as a TMS diagnosis in step 650. The TMS diagnosis includes the assessment about the presence or absence of non-dysplastic tissue, high-grade dysplastic tissue and dysplastic tissue.

Figure 19 is an alternate preferred embodiment of a TMS analysis in accordance with the present invention. In this preferred embodiment a diagnosis from each modality of spectroscopy is provided individually and compared before providing an overall diagnosis. The values of the diagnostic parameters output from the DRS analysis, for example, $\mu_s'(\lambda)$, in step 662 are used to provide the diagnosis from the DRS analysis per step 664. For example, the slope and intercept data values are determined and compared to threshold values to determine the tissue characteristics. Similarly, the values of the diagnostic parameters output from IFS analysis in step 670 are used to provide a diagnosis commensurate with the IFS analysis in step 672. For example, the contribution of, but not limited to, NADH and/or collagen, and/or porphyrin, to the IFS spectrum are compared to threshold values to provide the diagnosis from the IFS analysis. The values of the diagnostic parameters output from the LSS analysis in step 680 are in turn used to provide a diagnosis from the LSS analysis in step 682. The diagnosis from the LSS analysis includes, for example, the comparison of at least one nuclear size characteristic, such as, nuclear size expressed as a percent enlargement, number density, size variation, width of distribution versus crowding to threshold values. Depending upon the tissue and its location, a combination of two or more nuclear size characteristics may be compared to corresponding threshold values to provide a diagnosis from the LSS analysis.

The three diagnoses, specifically the diagnosis from the DRS analysis, the IFS analysis and the LSS analysis, are compared in step 690. An overall diagnosis is provided from this comparison in step 692. The overall diagnosis may be derived from two similar individual diagnoses, for example, a similar diagnosis from the IFS and LSS analyses. Different permutations and combinations of similar diagnoses may be used in preferred embodiments.

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-29-

It will be apparent to those of ordinary skill in the art that methods involved in the system of fluorescence, reflectance and light scattering spectroscopy for measuring tissue characteristics may be embodied in a computer program product that includes a computer usable medium. For example, such as, a computer usable
5 medium can include a readable memory device, such as a hard drive device, CD-ROM, a DVD-ROM, or a computer diskette, having computer readable program code segments stored thereon. The computer readable medium can also include a communications or transmission medium, such as, a bus or a communication link, either optical, wired or wireless having program code segments carried thereon as
10 digital or analog data signals.

While this invention has been particularly shown and described with references to preferred embodiments thereof, it will be understood by those skilled in the art that various changes in form and details may be made therein without departing from the scope of the invention encompassed by the appended claims.

15 The claims should not be read as limited to the described order or elements unless stated to that effect. Therefore, all embodiments that come within the scope and spirit of the following claims and equivalents thereto are claimed as the invention.

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-30-

CLAIMS

What is claimed:

1. A method of analyzing spectral data to measure a structure in a layer of tissue comprising:
 - providing a light collection system that collects fluorescent and reflected light from the tissue at a plurality of wavelengths and detects the collected light;
 - forming a fluorescence representation and a scattered light representation as a function of wavelength from the detected light; and
 - determining a characteristic of the tissue layer with the fluorescence representation and the scattered light representation.
2. The method of Claim 1 further comprising using the fluorescence representation to determine one or more components of the tissue.
3. The method of Claim 1 further comprising using the scattered light representation to determine a size of a structure within the tissue layer.
4. The method of Claim 1 further comprising measuring a periodic component of the detected light to provide the scattered light representation.
5. The method of Claim 1 further comprising analyzing a diffuse reflectance spectrum and a light scattering spectrum.
6. The method of Claim 1 further comprising calibrating with a reflectance standard and a fluorescence standard.
7. The method of Claim 1 further comprising generating a lookup table with different sizes of scatterers.

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-31-

8. The method of Claim 1 further comprising correcting the fluorescence spectrum to obtain an intrinsic fluorescence spectrum.
9. The method of Claim 5 further comprising transforming the light scattering spectrum and removing spectral components to determine size distribution of a tissue component.
10. The method of Claim 1 further comprising performing discriminate analysis to diagnose the tissue.
11. The method of Claim 1 further comprising separating a plurality of scattering coefficient values into a plurality of different regions.
12. An apparatus for optically measuring tissue comprising:
a radiation source that illuminates a region of interest in tissue to be measured with incident radiation;
an optical system that collects scattered and fluorescent light from the tissue at a plurality of wavelengths;
a detector system that senses the collected light and provides fluorescence data and scattered light data as a function of wavelength; and
a data processor that determines a characteristic of the region of interest with the fluorescence data and the scattered light data.
13. The apparatus of Claim 12 further comprising a broadband light source that generates light in the range of 330-700 nm.
14. The apparatus of Claim 12 further comprising a fiber optic probe that couples the source to the tissue.
15. The apparatus of Claim 12 wherein the probe is insertable in an endoscope.

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-32-

16. The apparatus of Claim 12 further comprising a fast excitation-emission matrix instrument.
17. The apparatus of Claim 12 further comprising the data processor storing instructions to process the fluorescence data and scattered light data in approximately 2 to 8 seconds.
18. A method for analyzing tissue spectra comprising:
acquiring fluorescence spectra;
acquiring a reflectance spectra;
processing the fluorescence spectra and reflectance spectra to provide an intrinsic fluorescence spectrum, a diffuse reflectance spectrum and a light scattering spectrum; and
determining a biophysical tissue characteristic from the intrinsic fluorescence spectrum, the diffuse reflectance spectrum and light scattering spectrum.
19. A computer readable medium having stored therein a set of instructions for causing a processing unit to execute the steps of the method of Claim 18.
20. The method of Claim 18 further comprising determining a size of a structure within the tissue layer.
21. The method of Claim 20 wherein the structure is the nuclei of epithelial cells in the tissue.
22. The method of Claim 18 further comprising measuring a periodic component of the detected reflectance spectrum.
23. The method of Claim 18 further comprising calibrating with a reflectance standard and a fluorescence standard.

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-33-

24. The method of Claim 18 further comprising generating a look-up table with different sizes of scatterers.
25. The method of Claim 18 further comprising correcting the fluorescence spectrum to obtain an intrinsic fluorescence spectrum.
- 5 26. The method of Claim 18 further comprising transforming the light scattering spectrum and removing spectral components to determine size distribution of a tissue component.
27. The method of Claim 18 further comprising performing discriminate analysis for providing a real-time diagnosis for the tissue.
- 10 28. The method of Claim 18 further comprising separating a plurality of scattering coefficient values into a plurality of different regions.
29. An apparatus for optically measuring a structure in a layer of tissue comprising:
 - 15 a radiation source that illuminates a region of interest in tissue to be measured with incident radiation;
 - an optical system that collects scattered, fluorescent and reflected light from the tissue at a plurality of wavelengths;
 - a detector system that senses the collected light and provides a fluorescence spectrum, a reflectance spectrum and a scattered spectrum as a function of wavelength; and
 - 20 a data processor that determines a characteristic of a region of interest with the fluorescence spectrum, the reflectance spectrum and the scattered spectrum.
30. The apparatus of Claim 29 further comprising a broadband light source that generates light in the range of 330-700 nm.
- 25 31. The apparatus of Claim 29 further comprising a fiber optic probe that couples the source to the tissue.

WO 02/057757

PCT/US02/03094

-34-

32. The apparatus of Claim 29 wherein the probe is insertable in an endoscope.
33. The apparatus of Claim 29 further comprising a fast excitation-emission matrix instrument.
- 5 34. The apparatus of Claim 29 further comprising the data processor storing instructions to process the fluorescence spectrum, the reflectance spectrum and the scattered spectrum in approximately 2 to 8 seconds.
- 10 35. A method of optically measuring a material comprising:
directing incident radiation onto a region of interest in the material to be measured;
collecting fluorescent and reflected radiation from the material;
15 detecting a fluorescence spectrum and a reflectance spectrum from the collected radiation; and
measuring a periodic component of the detected reflectance spectrum as a function of wavelength to determine a plurality of physical characteristics of the material from the fluorescence spectrum and the reflectance spectrum.
- 20 36. The method of Claim 35 further comprising directing radiation onto the material using a fiber optic probe.
37. The method of Claim 35 further comprising collecting the radiation from the material with a fiber optic probe, the probe having an optical fiber with a numerical aperture in a range of 0.05-0.25.
- 25 38. The method of Claim 35 further comprising determining an average nuclear size of nuclei within the region of interest.

WO 02/057757

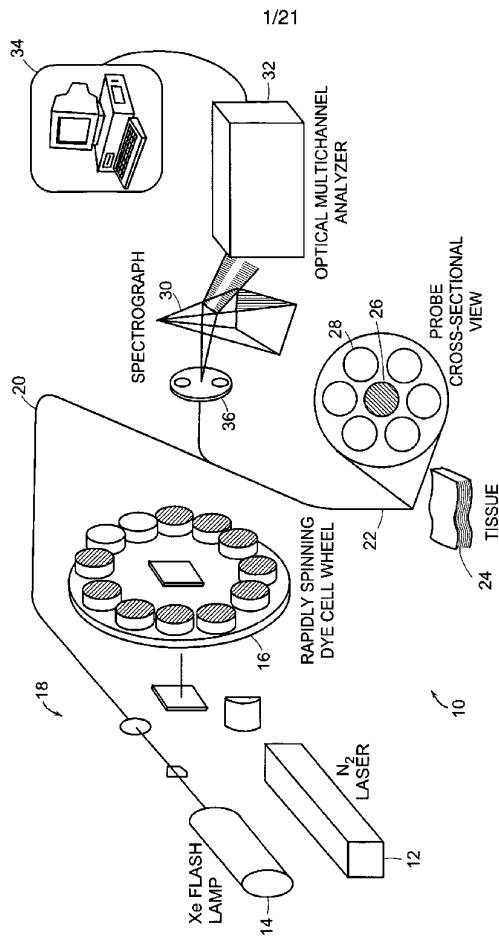
PCT/US02/03094

-35-

39. The method of Claim 35 further comprising measuring a number of particles per unit area within the region of interest.
40. An apparatus for optically measuring tissue comprising:
a first radiation source and a second radiation source that
illuminate a region of interest in tissue to be measured with incident radiation;
an optical system that collects fluorescence and reflected radiation from the tissue;
a detector system that senses the collected fluorescence and reflected radiation; and
a data processor that determines a periodic component of detected radiation as a function of wavelength to determine a physical characteristic of the tissue.
41. The apparatus of Claim 40 further comprising a filter wheel and a broadband light source that generates light in a range of 300-700 nm.
42. The apparatus of Claim 40 further comprising a fiber optic probe that couples the first radiation source and the second radiation source to a single region of interest on the tissue.
43. The apparatus of Claim 40 wherein the data processor generates a scattering spectrum from the detected reflected radiation and generates a modulated fluorescence spectrum with collected fluorescence and reflected radiation.
44. The apparatus of Claim 43 wherein the probe is insertable in an endoscope.

WO 02/057757

PCT/US02/03094



WO 02/057757

PCT/US02/03094

2/21

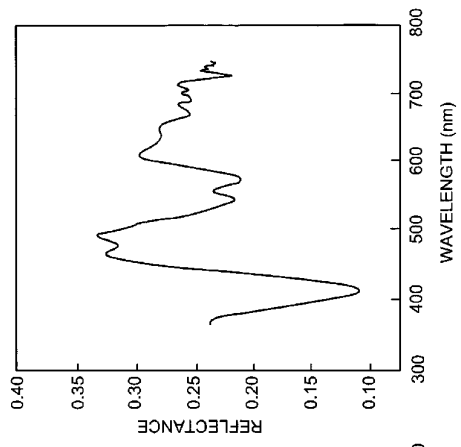


FIG. 2B

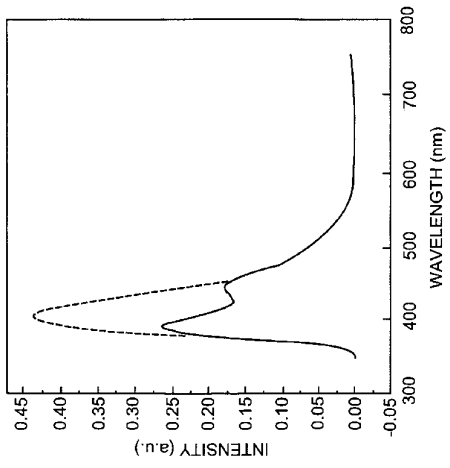
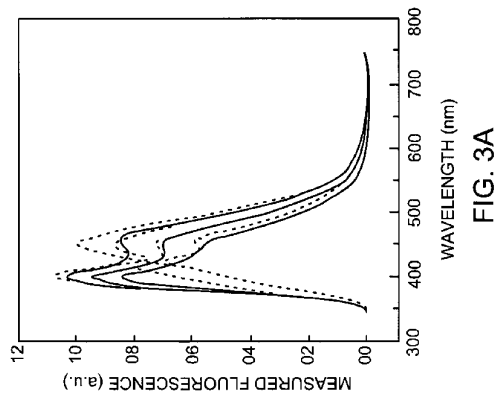
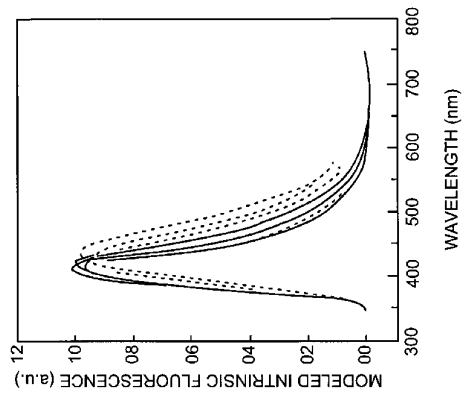


FIG. 2A

WO 02/057757

PCT/US02/03094

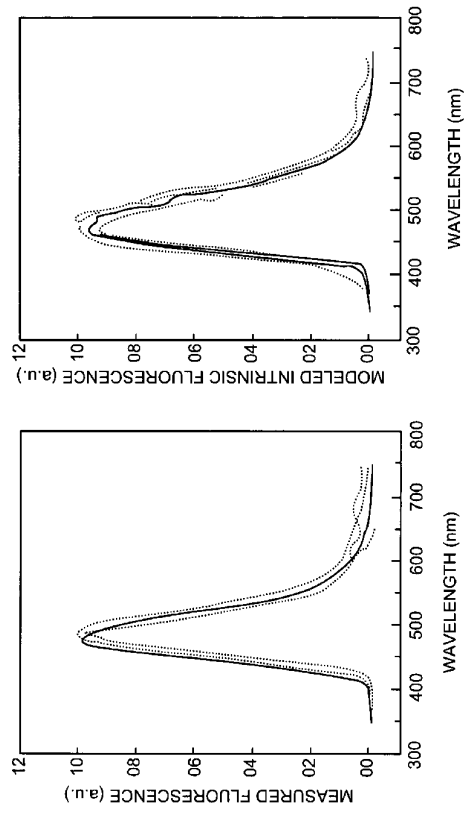
3/21



WO 02/057757

PCT/US02/03094

4/21



WO 02/057757

PCT/US02/03094

5/21

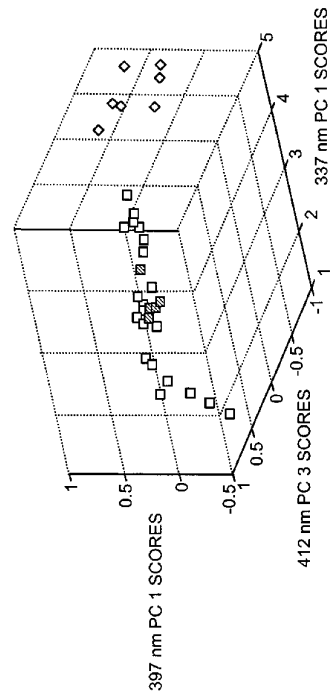


FIG. 4

WO 02/057757

PCT/US02/03094

6/21

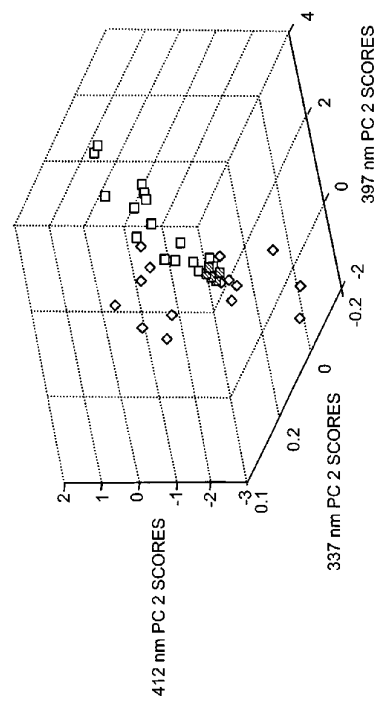
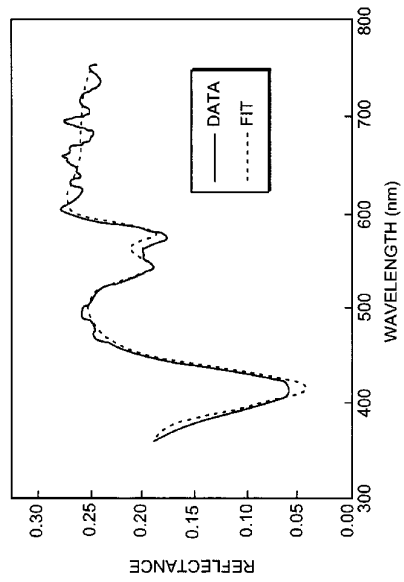


FIG. 5

WO 02/057757

PCT/US02/03094

7/21



WO 02/057757

PCT/US02/03094

8/21

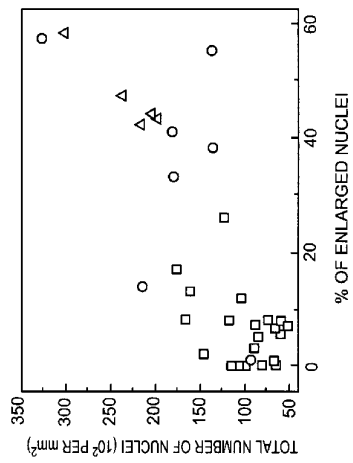


FIG. 8

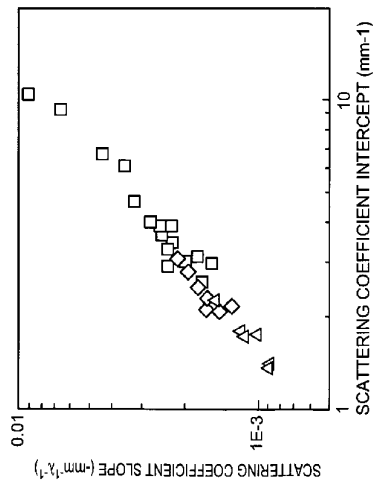
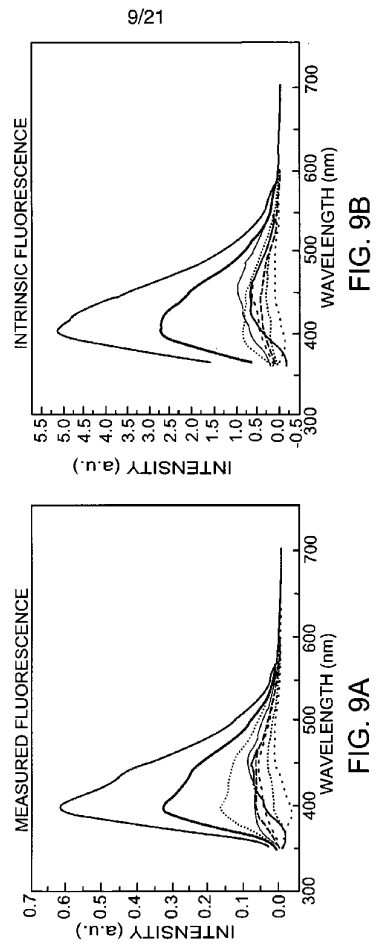


FIG. 7

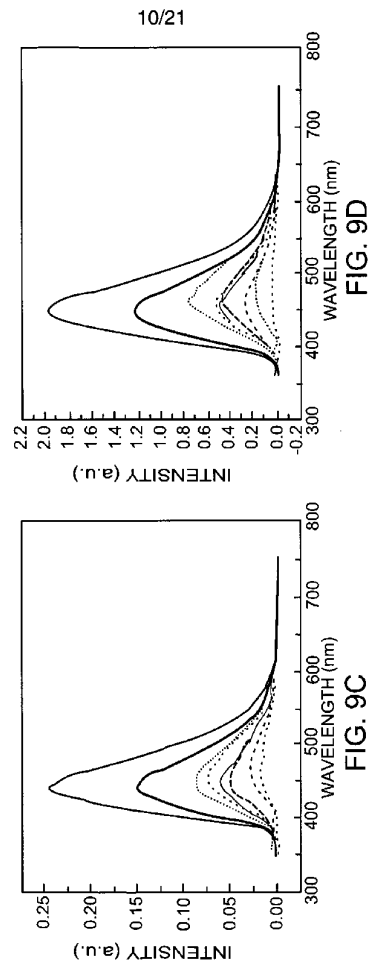
WO 02/057757

PCT/US02/03094



WO 02/057757

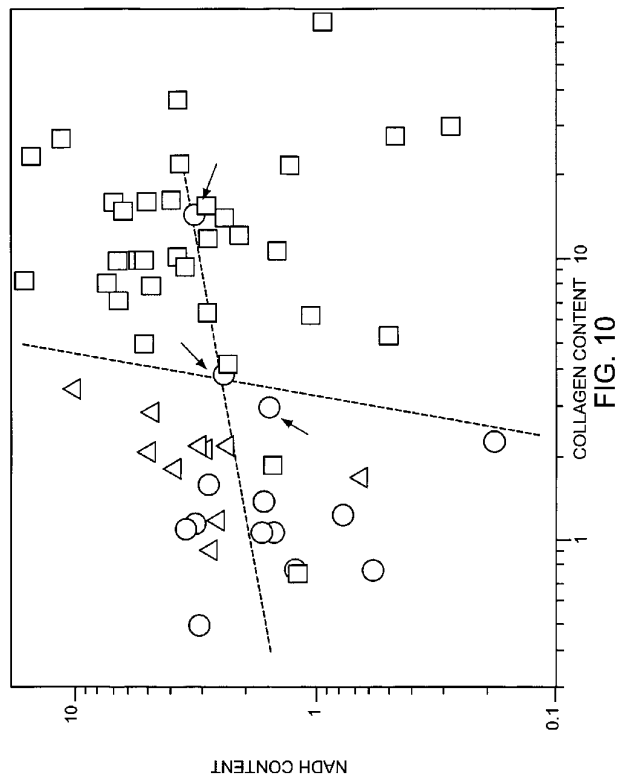
PCT/US02/03094



WO 02/057757

PCT/US02/03094

11/21



WO 02/057757

PCT/US02/03094

12/21

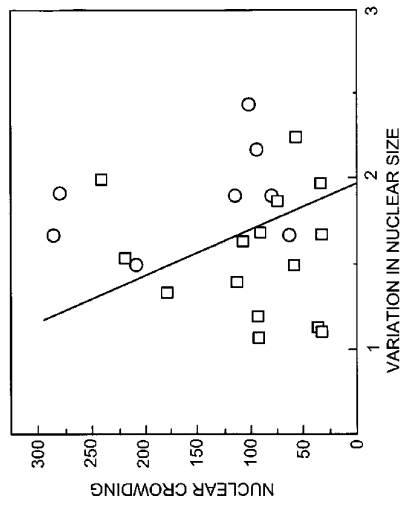


FIG. 11B

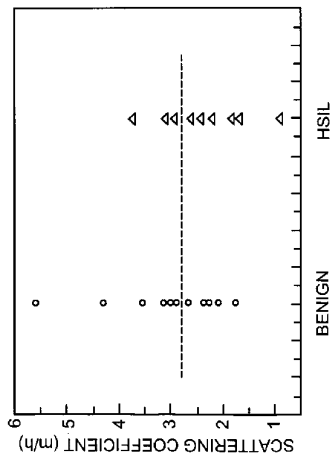
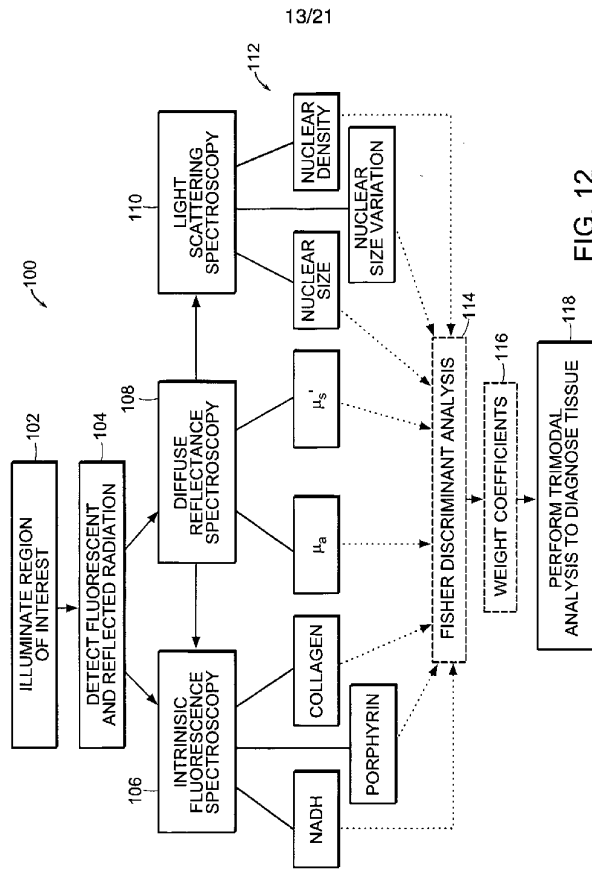


FIG. 11A

WO 02/057757

PCT/US02/03094



14/21

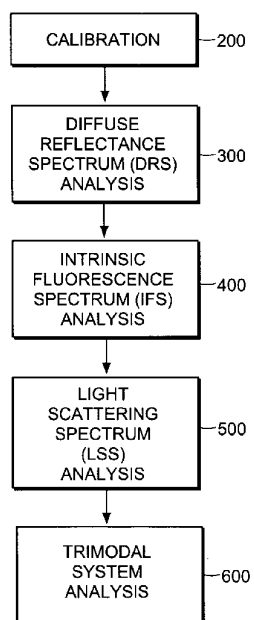


FIG. 13

15/21

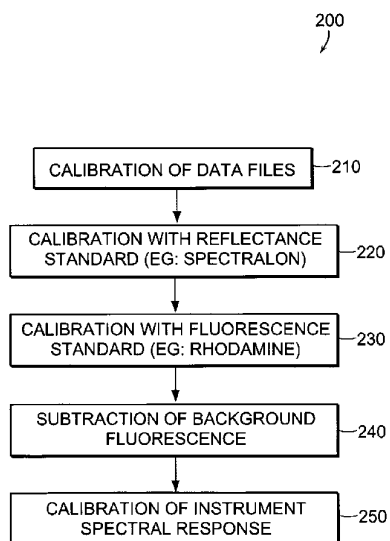


FIG. 14

WO 02/057757

PCT/US02/03094

16/21

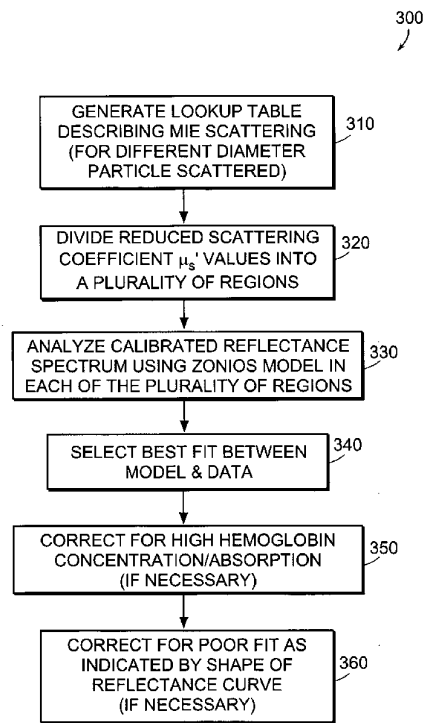


FIG. 15

WO 02/057757

PCT/US02/03094

17/21

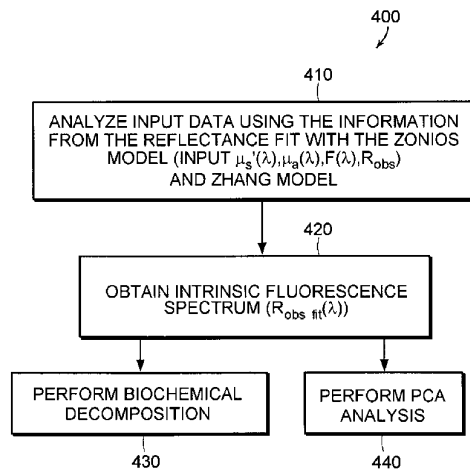


FIG. 16

WO 02/057757

PCT/US02/03094

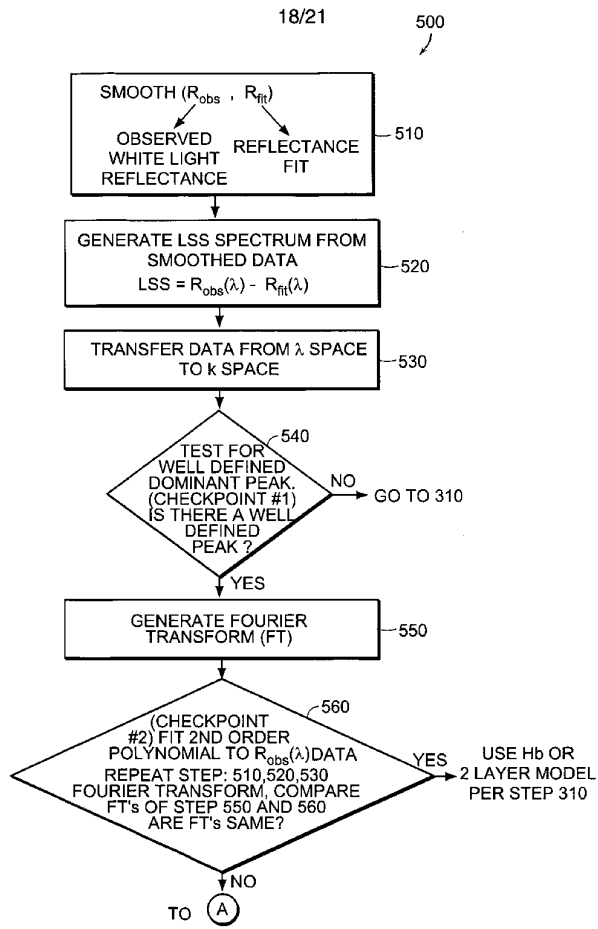


FIG. 17A

19/21

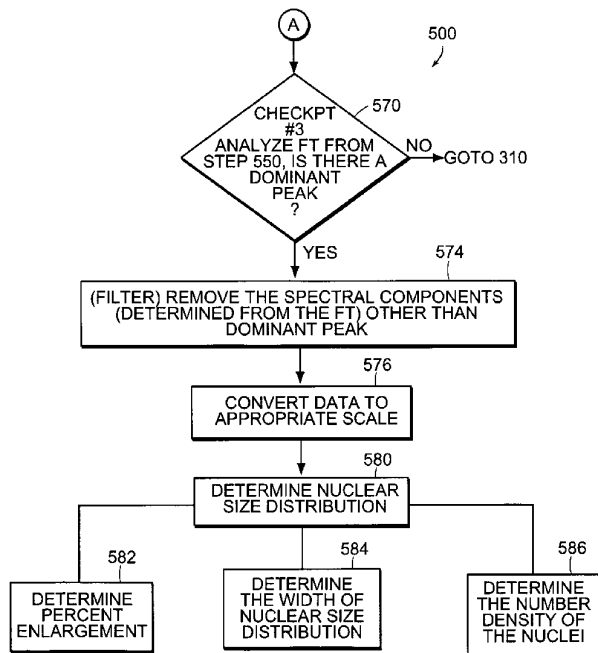
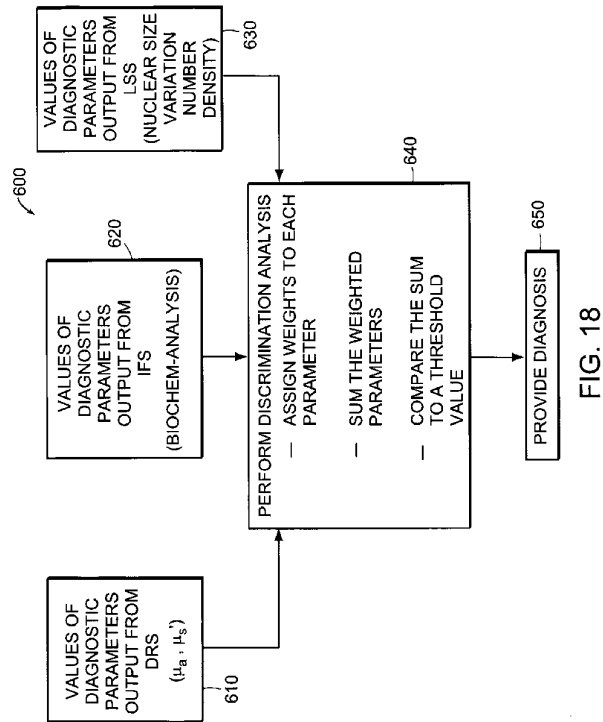


FIG. 17B

20/21



21/21

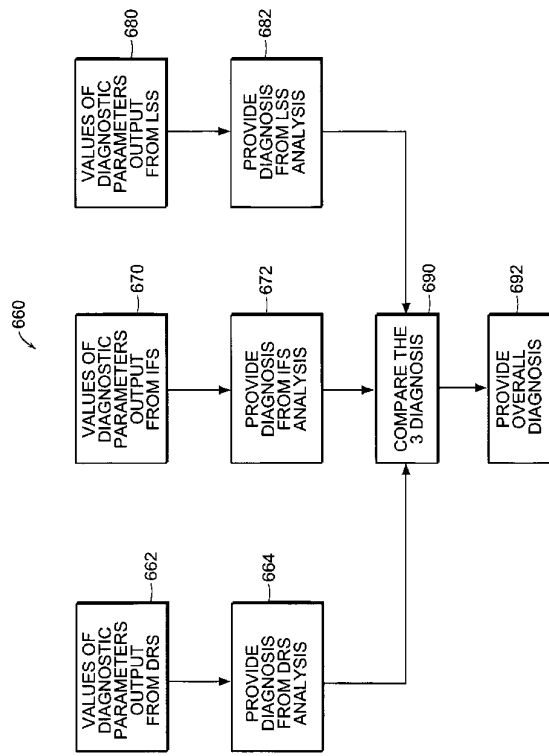


FIG. 19

【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
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/057757 A3(51) International Patent Classification: G01N 21/64,
21/47, A61B 5/00

(21) International Application Number: PCT/US02/03094

(22) International Filing Date: 18 January 2002 (18.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 09/766,879 19 January 2001 (19.01.2001) US

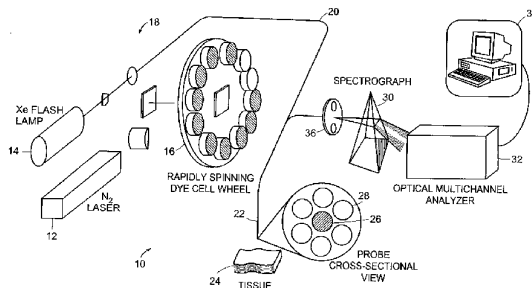
(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 09/766,879 (CIP)
Filed on 19 January 2001 (19.01.2001)(71) Applicant (for all designated States except US): MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY [US/US];
77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GEORGAKOUDI,

Irene [GR/US]; 2 Berry Lane, Acton, MA 01720 (US).
FELD, Michael, S. [US/US]; 62 Upland Road, Newton,
MA 02168 (US). ZHANG, Qingguo [US/US]; 22 Almont
Street, Medford, MA 01255 (US). MUELLER, Markus,
G. [DE/US]; 154 Amory Street, #2, Cambridge, MA 02139
(US).(74) Agents: GREWAL, Monica et al.; Bowditch & Dewey,
LLP, 161 Worcester Road, P.O. Box 9320, Framingham,
MA 01701 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GM,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent

[Continued on next page]

(54) Title: SYSTEM AND METHODS OF FLUORESCENCE, REFLECTANCE AND LIGHT SCATTERING SPECTROSCOPY
FOR MEASURING TISSUE CHARACTERISTICS

(57) Abstract: The present invention utilizes a plurality of spectroscopic systems and methods to measure characteristics of tissue useful in the diagnosis of disease. In a preferred embodiment, a combination of fluorescence, reflectance and light scattered spectra can be measured and processed to provide biochemical, architectural and morphological state of tissue. The methods and systems can be used particularly in the early detection of carcinoma within tissue in vivo and in vitro.

WO 02/057757 A3

WO 02/057757 A3 

(BI, BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG). **(88) Date of publication of the international search report:** 27 February 2003

Published:
— with international search 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.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 02/03094
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N21/64 G01N21/47 A61B5/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N A61B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 01 34031 A (SPECTRX INC) 17 May 2001 (2001-05-17) the whole document ---	1-44
X	US 5 582 168 A (YU NAI T ET AL) 10 December 1996 (1996-12-10) column 1, line 49 -column 2, line 6; claims 12-15 ---	1-44
X	US 6 008 889 A (PALCIC BRANKO ET AL) 28 December 1999 (1999-12-28) column 1, line 58 -column 2, line 37; claims 1,21,32; figure 1 --- -/--	1-44
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in 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 document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
31 October 2002		11/11/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Consalvo, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 02/03094

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 280 788 A (HAYES GARY B ET AL) 25 January 1994 (1994-01-25) column 1, line 26-30 column 2, line 65 -column 3, line 11 column 4, line 44 -column 5, line 4; figures 1,4 ---	1-44
A	US 5 421 337 A (RICHARDS-KORTUM REBECCA ET AL) 6 June 1995 (1995-06-06) column 5, line 15 -column 6, line 51; figure 1 ---	1-44
A	YANG C ET AL: "FEASIBILITY OF FIELD-BASED LIGHT SCATTERING SPECTROSCOPY" OFFSHORE, INDUSTRIAL PUBLICATIONS, CONROE, TX, US, vol. 5, no. 2, April 2000 (2000-04), pages 138-143, XP001051328 ISSN: 0030-0608 page 138, column 1, line 1 -page 139, column 1, line 21 ---	1-44
A	WO 00 42912 A (DASARI RAMANCHANDRA R ;MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY (US); BACKMAN) 27 July 2000 (2000-07-27) page 3, line 2 - line 30 page 12, line 29 -page 14, line 14 figure 7 -----	1-44

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 02/03094

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0134031	A	17-05-2001	AU	1572401 A	06-06-2001
			BR	0015285 A	18-06-2002
			EP	1229836 A1	14-08-2002
			WO	0134031 A1	17-05-2001
US 5582168	A	10-12-1996	US	5203328 A	20-04-1993
			AT	158704 T	15-10-1997
			AU	661026 B2	13-07-1995
			AU	2373392 A	23-02-1993
			CA	2113268 A1	04-02-1993
			DE	69222535 D1	06-11-1997
			DE	69222535 T2	26-03-1998
			EP	0597932 A1	25-05-1994
			ES	2110007 T3	01-02-1998
			JP	7500030 T	05-01-1995
			WO	9301745 A1	04-02-1993
US 6008889	A	28-12-1999	AU	7021198 A	11-11-1998
			WO	9846133 A1	22-10-1998
			US	6069689 A	30-05-2000
US 5280788	A	25-01-1994	EP	0575472 A1	29-12-1993
			WO	9214399 A1	03-09-1992
US 5421337	A	06-06-1995	EP	0466828 A1	22-01-1992
			WO	9012536 A1	01-11-1990
WO 0042912	A	27-07-2000	US	6404497 B1	11-06-2002
			AU	3351000 A	07-08-2000
			CN	1341004 T	20-03-2002
			EP	1148811 A1	31-10-2001
			WO	0042912 A1	27-07-2000

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

(72)発明者 フエルド, マイケル・エス

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 1 6 8 ニュートン・アブランドロード6 2

(72)発明者 ツアング, キングオ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 1 5 5 メドフォード・アルモントストリート2 2

(72)発明者 ミューラー, マルクス・ジー

ドイツ6 7 4 2 3 5 エアレンバツハ・ズルムシュトラッセ3 3

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 EA01 EA14 FA01 FA05 FA06 FA07 HA05 JA02
 KA02 KA03 KA05 KA09 NA01 NA02 NA06 NA13
 2G059 AA06 BB12 CC16 CC18 EE02 EE07 EE12 FF01 FF06 FF08
 GG01 HH02 HH03 HH06 JJ02 JJ17 MM01 MM02 MM05 MM09
 MM14
 4C061 AA01 AA02 BB01 CC07 DD00 FF43 GG11 HH51 NN01 NN05
 QQ04 WW17

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004518124A5	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2002557989	申请日	2002-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	玛莎愈合赛斯双扫描集集乌特技术的利麻省理工学院		
申请(专利权)人(译)	Masachiyusetsutsu仪器集集乌特-的技术毅		
[标]发明人	ジヨーガクーデアイリーン フエルドマイケルエス ツアングキングオ ミューラーマルクスジー		
发明人	ジヨーガクーデイ,アイリーン フエルド,マイケル・エス ツアング,キングオ ミューラー,マルクス・ジー		
IPC分类号	A61B1/00 A61B5/00 A61B6/00 G01N21/27 G01N21/47 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6486 A61B5/0059 A61B5/0071 A61B5/0075 A61B5/0084 A61B5/1459 A61B5/4331 G01N21/47 G01N21/64		
FI分类号	G01N21/64.Z A61B1/00.300.B A61B1/00.300.D G01N21/27.B		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/EA01 2G043/EA14 2G043/FA01 2G043/FA05 2G043/FA06 2G043/FA07 2G043/HA05 2G043/JA02 2G043/KA02 2G043/KA03 2G043/KA05 2G043/KA09 2G043/NA01 2G043/NA02 2G043/NA06 2G043/NA13 2G059/AA06 2G059/BB12 2G059/CC16 2G059/CC18 2G059/EE02 2G059/EE07 2G059/EE12 2G059/FF01 2G059/FF06 2G059/FF08 2G059/GG01 2G059/HH02 2G059/HH03 2G059/HH06 2G059/JJ02 2G059/JJ17 2G059/MM01 2G059/MM02 2G059/MM05 2G059/MM09 2G059/MM14 4C061/AA01 4C061/AA02 4C061/BB01 4C061/CC07 4C061/DD00 4C061/FF43 4C061/GG11 4C061/HH51 4C061/NN01 4C061/NN05 4C061/QQ04 4C061/WW17		
优先权	09/766879 2001-01-19 US		
其他公开文献	JP2004518124A		

摘要(译)

本发明使用多个光谱系统和光谱方法来测量对疾病诊断有效的组织特征。在优选的实施方案中，测量和处理荧光光谱，反射光谱和散射光谱的组合以获得组织的生物化学，结构和形态学状态。本发明的方法和系统可以特别有效地用于早期检测身体内和身体外的组织中的癌症。