

(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2008-537995  
(P2008-537995A)

(43) 公表日 平成20年10月2日(2008.10.2)

(51) Int.Cl.

G01N 21/64  
A61B 10/00(2006.01)  
(2006.01)

F 1

G01N 21/64  
A61B 10/00Z  
E

テーマコード(参考)

2 G043

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2007-552306 (P2007-552306)  
 (86) (22) 出願日 平成18年1月20日 (2006.1.20)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年9月20日 (2007.9.20)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2006/002165  
 (87) 國際公開番号 WO2006/078973  
 (87) 國際公開日 平成18年7月27日 (2006.7.27)  
 (31) 優先権主張番号 60/645,430  
 (32) 優先日 平成17年1月20日 (2005.1.20)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 11/365,065  
 (32) 優先日 平成18年1月19日 (2006.1.19)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 504387746  
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア  
 アメリカ合衆国 94607-5200  
 カリフォルニア州 オークランド フランクリンストリート 1111 トゥエルフスフロア  
 (74) 代理人 100064724  
 弁理士 長谷 照一  
 (74) 代理人 100073302  
 弁理士 神谷 牧  
 (72) 発明者 トロンバーグ, ブルース, ジェイ.  
 アメリカ合衆国 92612 カリフォルニア州 アーバイン ゾラコート 16

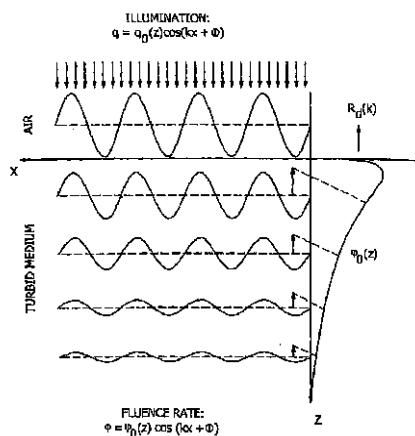
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】高分解能空間変調蛍光画像化および断層撮影のための方法ならびに装置

## (57) 【要約】

【解決手段】ヒトまたは動物組織などの混濁媒体中で、深度区分された反射率または透過率の画像化を行うための、定量的変調画像化の方法の改良である。混濁媒体を周期パターンに露光し、混濁媒体内の構造を深度分解して弁別するとき、照明、好ましくは蛍光励起波長を有する照明の周期パターンをコード化するステップと、混濁媒体内の構造の非接触三次元画像を再構成するステップとが、改良の対象である。結果として、広い範囲で画像化でき、单一画像から不均一成分に由来する平均バックグラウンド光学特性を分離でき、照明の空間周波数の選択に基づいて深部特徴から表層特徴を分離でき、または、空間コード化されたデータから、定性的および定量的な構造、機能および組成の情報が抽出できる。

【選択図】図13



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

混濁媒体を、空間周波数によって特徴付けられた照明の周期パターンに露光することと、

前記混濁媒体からデータ画像を受け取ることと、

前記混濁媒体の関心対象領域を選択することと、

前記混濁媒体の前記選択された関心対象領域の前記データ画像を変換することと、

前記混濁媒体の前記選択された関心対象領域の前記変換データ画像を空間フィルタリングすることと、

前記混濁媒体の前記選択された関心対象領域の、前記フィルタリングされた変換データ画像を再構成することとを含んでなる、

混濁媒体中で深度区分された蛍光および反射率を画像化するための定量変調蛍光画像化法であって、

前記混濁媒体を前記周期パターンに露光するとき、蛍光励起波長を有する照明の周期パターンをコード化して、前記混濁媒体内の蛍光構造を深度分解して弁別することと、

混濁媒体中の蛍光の非接触三次元画像を再構成することを含んでなり、

それにより、広い範囲で画像化し、単一画像から不均一成分に由来する平均バックグラウンド光学特性を分離し、照明の空間周波数の選択に基づいて深部蛍光特徴から表層蛍光特徴を分離し、または、空間コード化されたデータから定性的および定量的な構造、機能および組成の情報を抽出する、

ことを特徴とする方法。

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載の方法において、

前記コード化することおよび再構成することの各ステップが、関心対象の励起および発光波長において空間分解された光学特性を提供し、

さらに、測定された蛍光から散乱および吸収の影響を取り除くことを含んでなる、ことを特徴とする方法。

**【請求項 3】**

請求項 1 に記載の方法であって、さらに、

表面および表面下の媒体の構造、機能、および組成を同時にマッピングすることを含んでなる、

ことを特徴とする方法。

**【請求項 4】**

請求項 1 に記載の方法であって、さらに、

広い範囲で画像化すること含んでなる、

ことを特徴とする方法。

**【請求項 5】**

請求項 1 に記載の方法であって、さらに、

单一画像から、不均一成分に由来する平均バックグラウンド光学特性を分離することを含んでなる、

ことを特徴とする方法。

**【請求項 6】**

請求項 1 に記載の方法であって、さらに、

照明の空間周波数の選択に基づいて、深部蛍光特徴から表層蛍光特徴を分離することを含んでなる、

ことを特徴とする方法。

**【請求項 7】**

請求項 1 に記載の方法であって、さらに、

空間コード化データから、定性的および定量的な構造、機能および組成の情報を抽出することを含んでなる、

10

20

30

40

50

ことを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 3 に記載の方法において、

前記表面および表面下の媒体の構造、機能、および組成を同時マッピングすることは、光源の空間周波数、波長選択および／または振幅変調の関数として、深度感度を評価することを含む、

ことを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 4 に記載の方法において、

広い範囲で画像化することは、広い範囲にわたって空間的に分解する光学特性の決定を含む、

ことを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 7 に記載の方法において、

前記空間コード化データから、定性的および定量的な構造、機能および組成の情報を抽出することは、蛍光データに加えて散乱および吸収特性を空間的に分解すること、ならびに蛍光団スペクトルからの散乱および吸収の影響を取り除くことの両方によって、蛍光を定量的に測定することを含む、

ことを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 5 に記載の方法であって、さらに、

照明の空間周波数の選択に基づいて標的蛍光からバックグラウンド蛍光を分離することと、

照明の空間周波数の選択に基づいて深部蛍光特徴から表層蛍光特徴を分離することを含んでなる、

ことを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の方法であって、さらに、

組織の自己蛍光を、組織内の他の外因性蛍光団または遺伝子工学によって合成されたタンパク質蛍光の発現から深度で分解することを含んでなる、

ことを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法であって、さらに、

光源の空間周波数、波長選択および／または振幅変調の関数として深度感度を評価することを含んでなる、

ことを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 1 に記載の方法であって、さらに、

照明の空間周波数の選択に基づいて深部蛍光特徴から表層蛍光特徴を分離することを含んでなる、

ことを特徴とする方法。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の方法において、

コード化することおよび再構成することを小動物の画像化に応用する、

ことを特徴とする方法。

【請求項 16】

請求項 1 に記載の方法において、

コード化することおよび再構成することを、蛍光内視鏡、蛍光気管支鏡、蛍光腔鏡（子宮頸癌）を用いて、前癌および癌の検出および監視、組織のタイプを識別するための手術中ガイダンス、モーズの外科手術ガイダンス（蛍光および／または反射率に基づく皮膚腫

10

20

30

40

50

瘍輪郭の描写)、または蛍光および/または反射率に基づく腫瘍輪郭描写のような脳腫瘍切除のうちの少なくとも1つに応用することを特徴とする方法。

【請求項17】

請求項1に記載の方法において、コード化することおよび再構成することを、薬剤開発などのような治療法の効果の監視に応用することを特徴とする方法。

【請求項18】

請求項1に記載の方法において、  
コード化することおよび再構成することを、広範囲の組織の水分補給を行いながら、年齢、疾患関連の変化、および皮膚内の化粧品のモニタリング、光老化および治療(化学物質、レーザ、高周波または焼灼)に対する光老化した皮膚の反応、または日焼け止め剤の効果の定量化(様々な日焼け止め製剤を使用した場合の日焼け止め剤としての適切性と日光に対する生理反応との両方の調査)のうちの少なくとも1つに応用することを特徴とする方法。

【請求項19】

請求項1に記載の方法において、  
コード化することおよび再構成することを、糖化最終産物に関連する蛍光変化などのような糖尿病に関連する組織状態の変化に応用することを特徴とする方法。

【請求項20】

請求項1に記載の方法において、  
コード化することおよび再構成することを、移植のための火傷の重症度/火傷の深さの評価に応用することを特徴とする方法。

【請求項21】

請求項1に記載の方法において、  
コード化することおよび再構成することを、光線力学療法の線量測定に応用することを特徴とする方法。

【請求項22】

請求項1に記載の方法において、  
コード化することおよび再構成することを、火傷評価、末梢血管疾患の診断および管理のための広い範囲の組織の酸素測定、または新生児の酸素測定に応用することを特徴とする方法。

【請求項23】

請求項1に記載の方法において、  
コード化することおよび再構成することを、医薬品および定量的なプロセス工学の品質管理の手段として、蛍光、反射率、またはそれらの組合せを用いた化学的画像化に応用することを特徴とする方法。

【請求項24】

混濁試料を照明の周期パターンに露光する光源と、前記試料からのデータ画像を受け取るカメラと、および前記試料の前記データ画像をフーリエ変換し、前記試料の前記変換したデータ画像を空間フィルタリングして、前記試料の前記フィルタリングした変換データ画像を再構成するシグナルプロセッサを備えてなる、

蛍光混濁媒体から成る混濁試料の深度区分された蛍光および反射率を画像化するための定量変調蛍光画像化装置であって、

前記光源が、蛍光励起波長でコード化された照明の周期パターンを提供して、前記混濁媒体内の蛍光構造を深度分解して弁別することと、

10

20

30

40

50

前記混濁試料内の発光周波数における非接触三次元画像を再構成する手段を備えてなることと、

それにより、広い範囲で画像化し、単一画像から不均一成分に由来する平均バックグラウンド光学特性の分離し、照明の空間周波数の選択に基づいて深部蛍光特徴から表層蛍光特徴を分離し、または空間コード化されたデータから定性的および定量的な構造、機能、および組成情報を抽出することと、

を特徴とする装置。

【請求項 25】

請求項 24 に記載の装置において、

前記光源および前記再構成手段は、組み合わさって、関心対象の励起および発光波長における空間分解光学特性を決定し、前記再構成手段は、さらに、測定された蛍光から散乱および吸収の影響を取り除くことを特徴とする装置。

10

【請求項 26】

請求項 24 に記載の装置において、

前記再構成手段は、さらに、表面および表面下の媒体の構造、機能、および組成を同時にマッピングすることを特徴とする装置。

【請求項 27】

請求項 24 に記載の装置において、

前記光源および前記再構成手段は、組み合わさって、広範囲の画像化を実行することを特徴とする装置。

20

【請求項 28】

請求項 24 に記載の装置において、

前記再構成手段は、単一画像から不均一成分に由来する平均バックグラウンド光学特性を分離する

ことを特徴とする装置。

【請求項 29】

請求項 24 に記載の装置において、

前記再構成手段は、照明の空間周波数の選択に基づいて深部蛍光特徴から表層蛍光特徴を分離する

ことを特徴とする装置。

30

【請求項 30】

請求項 24 に記載の装置において、

前記再構成手段は、空間コード化データから定性的および定量的な構造、機能および組成の情報を抽出する

ことを特徴とする装置。

【請求項 31】

請求項 26 に記載の装置において、

前記再構成手段は、光源空間周波数、波長選択および / または振幅変調の関数として、深度感度を評価する

ことを特徴とする装置。

40

【請求項 32】

請求項 27 に記載の装置において、

前記再構成手段は、広い領域にわたる光学特性決定を空間的に分解することを特徴とする装置。

【請求項 33】

請求項 30 に記載の装置において、

前記再構成手段は、蛍光データに加えて散乱および吸収特性を空間的に分解すること、および蛍光団スペクトルから散乱および吸収の影響を取り除くことの両方によって、蛍光

50

を定量的に測定する  
ことを特徴とする装置。

【請求項 3 4】

請求項 2 8 に記載の装置において、  
前記再構成手段は、照明の空間周波数の選択に基づいて標的蛍光からバックグラウンド  
蛍光を分離し、かつ照明の空間周波数の選択に基づいて深部蛍光特徴から表層蛍光特徴を  
分離する  
ことを特徴とする装置。

【請求項 3 5】

請求項 2 4 に記載の装置において、  
前記再構成手段は、組織の自己蛍光を組織内の他の外因性蛍光団または遺伝子工学によ  
って合成されたタンパク質蛍光の発現から深度で分解する  
ことを特徴とする装置。

【請求項 3 6】

請求項 2 4 に記載の装置において、  
前記再構成手段は、光源空間周波数、波長選択および／または振幅変調の関数として深  
度感度を評価する  
ことを特徴とする装置。

【請求項 3 7】

請求項 2 4 に記載の装置において、  
前記再構成手段は、照明の空間周波数の選択に基づいて深部蛍光特徴から表層蛍光特徴  
を分離する  
ことを特徴とする装置。

【請求項 3 8】

混濁媒体を選択された空間周波数の光の周期パターンに露光し、前記選択された空間周  
波数が、前記光のフルエンス率の制御された対応する深度プロファイルを決定することと、  
前記光を前記混濁媒体と相互作用させて、前記混濁媒体中の深度の制御された関数とし  
て、選択された副次的效果を創出することと、  
を含んでなる方法。

【請求項 3 9】

請求項 3 8 に記載の方法において、  
前記混濁媒体中の深度の制御された関数として前記選択された副次的效果は、前記混濁  
媒体中の制御された蛍光プロファイルを含む  
ことを特徴とする方法。

【請求項 4 0】

請求項 3 8 に記載の方法において、  
前記混濁媒体中の深度の制御された関数として前記選択された副次的效果は、前記混濁  
媒体中の制御された熱プロファイルを含む  
ことを特徴とする方法。

【請求項 4 1】

請求項 3 8 に記載の方法において、  
前記混濁媒体中の深度の制御された関数として前記選択された副次的效果は、前記混濁  
媒体中の制御された音響プロファイルを含む  
ことを特徴とする方法。

【請求項 4 2】

請求項 3 8 に記載の方法であって、さらに、  
前記混濁媒体中の制御された深度関数として前記選択された副次的效果を、画像化、治  
療上の処置、または診断検査に用いることを含む  
ことを特徴とする方法。

【請求項 4 3】

10

20

30

40

50

請求項 3 8 に記載の方法であって、さらに、

前記混濁媒体中の深度の制御された関数として前記選択された副次的効果に関するデータを受け取ることと、前記データに逆アルゴリズムを適用して吸収、散乱、蛍光、または光と前記混濁媒体との相互作用を示す他の光学パラメータの定性的または定量的な高分解能三次元表示を提供することを含んでなり、

当該アルゴリズムは、前記混濁媒体の算出された平均光学特性を用いて光の横方向拡散について計算し、また、当該アルゴリズムは、前記光のフルエンス率の制御された深度プロファイルの深度感度を計算するものであることを特徴とする方法。

#### 【請求項 4 4】

請求項 3 8 に記載の方法であって、さらに、

前記混濁媒体の光学特性の計算された平均バックグラウンドを生成することと、

前記混濁媒体の光学特性の前記計算された平均バックグラウンドを用いて前記混濁媒体中の副次的効果を制御することを含んでなることを特徴とする方法。

#### 【請求項 4 5】

混濁媒体中の関心対象物の深度区分された反射率または透過率のデータ検出を行うための方法であって、

前記混濁媒体を選択された空間変調された周波数の光に露光し、前記選択された空間周波数が前記光のフルエンス率の対応する制御された深度プロファイルを決定することと、

前記光を前記混濁媒体と相互作用させて、前記混濁媒体中の制御された深度関数として選択された副次的効果を創出することと、

前記混濁媒体中の前記選択された副次的効果を前記光の前記選択された空間変調の周波数において測定することと、

前記測定された選択副次的効果を変換してスペクトルを取得することと、

前記スペクトルを副次的効果カーネルで除算して、再構成された対象物スペクトルを取得することと、

前記再構成された対象物スペクトルを逆変換して、再構成された対象物データを取得することと

を含んでなる方法。

#### 【請求項 4 6】

請求項 4 5 に記載の方法において、

前記スペクトルを副次的効果カーネルで除算して再構成された対象物スペクトルを取得することは、関心対象物がその中に含まれ、かつ関心対象物の深度が分かっている前記混濁媒体のバックグラウンドを多周波数光学特性測定して決定した光学特性を用いて、前記スペクトルを前記副次的効果カーネルで除算することを含むことを特徴とする方法。

#### 【請求項 4 7】

請求項 4 5 に記載の方法において、

前記測定された選択副次的効果を変換してスペクトルを取得すること、および前記再構成された対象物スペクトルを逆変換して再構成された対象物データを取得することは、前記測定された副次的効果をフーリエ変換してスペクトルを取得すること、および前記再構成された対象物スペクトルを逆フーリエ変換して再構成された対象物画像を取得することを含むことを特徴とする方法。

#### 【請求項 4 8】

請求項 4 5 に記載の方法において、

前記測定された選択副次的効果を変換してスペクトルを取得すること、および前記再構成された対象物スペクトルを逆変換して再構成された対象物データを取得することは、前記測定された副次的効果をヒルベルト変換またはウェーブレット変換してスペクトルを取

10

20

30

40

50

得すること、および前記再構成された対象物スペクトルを、それぞれ逆ヒルベルト変換または逆ウェーブレット変換して再構成された対象物画像を取得することを含むことを特徴とする方法。

【請求項 4 9】

請求項 4 5 に記載の方法において、

前記混濁媒体の前記副次的効果を前記光の空間変調の選択された周波数において測定することと、前記測定された副次的効果を変換してスペクトルを取得することと、前記スペクトルを副次的効果カーネルで除算して再構成された対象物スペクトルを取得することと、前記再構成された対象物スペクトルを逆変換して再構成された対象物画像を取得することとの各ステップは、それぞれのステップを、固定された平均深度に対応する前記空間変調された周波数において二次元で実行して、前記混濁媒体中の関心対象物の二次元画像を取得することを含む

ことを特徴とする方法。

【請求項 5 0】

請求項 4 9 に記載の方法において、

前記混濁媒体を空間変調された周波数の光に露光し、その選択された空間周波数が前記光のフルエンス率の対応する制御された深度プロファイルを決定することと、前記混濁媒体中の前記副次的効果を前記光の前記選択された空間変調の周波数において測定することと、前記測定された副次的効果を変換してスペクトルを取得することと、前記スペクトルを副次的効果カーネルで除算して再構成された対象物スペクトルを取得することと、前記再構成された対象物スペクトルを逆変換して再構成された対象物データを二次元に取得して画像を取得することとの各ステップは、さらに、

前記ステップのそれぞれを、空間変調された周波数を変更しながら繰り返して、変更される固定平均深度に対応する複数の画像を取得すること、および

変更される固定平均深度に対応する複数の画像から減算画像を生成して、前記混濁媒体中の対応する単一の固定平均深度だけに実質的に由来する画像を取得することを含むことを特徴とする方法。

【請求項 5 1】

請求項 4 5 に記載の方法において、

前記混濁媒体中の前記副次的効果を前記光の前記選択された空間変調の周波数において測定することは、前記混濁媒体中の前記関心対象物からの複数の副次的効果を前記対応する深度において同時に測定することを含むことを特徴とする方法。

【請求項 5 2】

請求項 5 1 に記載の方法において、

前記混濁媒体中の前記関心対象物からの複数の副次的効果を前記対応する深度において同時に測定することは、深度の関数としてフルエンス率を決定する順方向モデルおよび逆方向技法を用いて、前記混濁媒体中の前記関心対象物に関連する前記複数の副次的効果を前記対応する深度において取得することを含むことを特徴とする方法。

【請求項 5 3】

請求項 5 2 に記載の方法において、

前記複数の副次的効果は、前記光の吸収および散乱を含み、

前記深度の関数としてフルエンス率を決定する順方向モデルおよび逆方向技法を用いて前記混濁媒体中の前記関心対象物に関連する前記複数の副次的効果を前記対応する深度にある取得することは、次式で与えられる順方向モデルを用いてフルエンス率を深度の関数として決定し、

10

20

30

40

$$\varphi_0(z) = 3P_0 \left( \frac{\mu_s'}{\mu_{tr}} \right) \left( \frac{\mu_{eff}^{'2}}{\mu_{tr}^2} - 1 \right)^{-1} \exp(-\mu_{tr}z) + C \exp(-\mu_{eff}^{'} z)$$

ここに、 $\varphi_0(z)$  は深度  $z$  の関数としてのフルエンス率であり、 $P_0$  は平面照明の入射光パワーであり、 $C$  は境界条件の選択によって決まる定数であり、 $\mu_s'$  は減少した散乱係数であり、 $\mu_{tr}$  は輸送係数であり、そして  $\mu_{eff}^{'}$  は実効散乱係数であり、そして、

前記関心対象物に関連する前記副次的効果を取得する逆方向技法は、最小二乗回帰または線形一般逆行列乗法を用いることを含むことを特徴とする方法。

10

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

この発明は、混濁媒体の光学計測に関し、とりわけ、組織吸収、散乱パラメータ、および組織画像化の光学計測に関する。

#### 【0002】

この発明は、N I H ( 国立衛生研究所 ) により付与された認可番号 P R 0 1 1 9 2 の下に、政府支援を受けて行われた。政府は、この発明に関し一定の権利を有する。

#### 【0003】

この出願は、2005年1月20日に出願の米国仮特許出願第60/645,430号に関連し、当該仮出願はここに援用し、かつ、それについて米国特許法第119条に基づいて優先権を主張する。

20

#### 【背景技術】

#### 【0004】

構造照明を利用して、小動物における蛍光ベースの分子画像化（画像描写）を行う先行技術は多数存在する。照明の構造特性は、一般的に単一の空間周波数で標的に対し提示され、非常に簡単な方法で使用して、照射された標的の表面の空間的位置およびトポロジ（幾何学的位相）の情報を伝え、対象物の三次元描出を作成する。本質的に、このアプローチは、照明から対象物までと、対象物からセンサまでとの間の距離の変化を修正するための方法である。いくつかの例を以下に示す。

30

#### 【0005】

第1の例は、「Visualization Of Antitumor Treatment By Means Of Fluorescence Molecular Tomography With An Annexin V-Cy5.5 Conjugate」、Ntziachristos V他著、Proc Natl Acad Sci USA、2004年8月17日、101(33):12294-9頁掲載、電子出版2004年8月10日、Center for Molecular Imaging Research, Massachusetts General HospitalおよびHarvard Medical School, Boston, MA 02115, USA、vasili.s@helix.mgh.harvard.edu に記載されている。分子レベルでの治療反応のインビボ(in vivo)画像化が、薬剤発見の速さおよび最終的にはテラーメイド医療に重大な影響を与える可能性が認識されてきている。組織および動物全体を通して、非侵襲の3D画像化のための分子特異性および分子感度に優れた蛍光ベースの定量技術を開発する必要性が認識されている。化学療法に対する腫瘍反応は、修飾アネキシンに基づくホスファチジルセリン感知蛍光プローブを用いる蛍光分子断層撮影法(FMT)により、正確に解像(分解)できる。対照研究と比較して、シクロホスファミド感受性の腫瘍においては少なくとも10倍の蛍光色素濃度の増加が、かつシクロホスファミド耐性の腫瘍においては7倍の蛍光色素濃度の増加が観察されている。蛍光分子断層撮影法は、一般的に使用される平面照明法の限界を克服するために開発された光学画像化技術であり、組織学により確認された高い定量化精度を実証している。バックグラウンド吸収不均一における3倍の変化が、平面画像化では100%の誤差を生じるであろうのに対し、蛍光分子断層撮影法では20%の誤差しか生じない場合がある。したがって、組織における蛍光プローブの定量的調査にとって、断面画像化(断層撮像)が好適なツールであることが確認されている。断層撮影法に

40

50

よるアプローチは、小動物の光学画像化にとって必要不可欠であることが発見されており、臨床的薬剤開発およびモニタリングにとって非常に好適である可能性がある。

#### 【0006】

第2の例は、「In vivo Tomographic Imaging Of Near-infrared Fluorescent Probes」、Ntziachristos V他著、Mol Imaging.、2002年4月～6月、1(2)：82-8頁掲載、Center for Molecular Imaging Research, Massachusetts General HospitalおよびHarvard Medical School, Bldg149 13th Street 5406, Charlestown, MA 02129-2060, USA、vasillis@helix.mgh.harvard.eduに記載されている。蛍光画像化が、生きた動物内でのタンパク質の作用および遺伝子の発現を探索するために、ますます使用されつつある。この技術は、病因、薬剤開発、および治療介入の研究を強化する技術分野に見られる。蛍光媒介式分子断層撮影法(FMT)を用いた三次元蛍光観察が開発されてきている。インビボでの蛍光プローブ分布を再構成することによって深部組織における分子機能を解像できる画像化技術が、実証されてきている。蛍光媒介式分子断層撮影法による研究結果は、表面下に腫瘍を移植したヌードマウスにおけるプロテアーゼ機能を研究するための蛍光反射率画像化法(FRI)と比較されてきている。蛍光媒介式分子撮影法を蛍光反射率画像化法と比較して確認すると、この二つの技術によって判定されるように、蛍光色素活性化の空間的一致が実証されている。

10

#### 【0007】

第3の例は、「Experimental Fluorescence Tomography Of Tissues With Noncontact Measurements」、Schulz RB他著、IEEE Trans Med Imaging. 2004年4月、23(4)：492-500頁掲載、German Cancer Research Center (DKFZ)のDepartment of Medical Physics in Radiology, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Germany、r.schulz@dkfz.deに記載されている。拡散媒体から非接触の光学測定を行うと、拡散光学断層撮影法の応用において、複数の角度での大型検出器アレイの使用が容易になることが発見されている。このような画像化戦略(作戦、方策)は、各個々のファイバーが組織、制限された形状、および整合流体と接触する必要性を排除する。したがって、実験的手順ならびにインビボでの機能および分子の過程を可視化する能力は、小動物画像化を行うための実験的実装に見られるように改良される。

20

#### 【0008】

超音波を用いると、ある程度まで表面下の情報にアクセスすることができる。しかしながら、超音波は、組織の機構的特性に関するデータを与えてくれるにすぎない。光コヒーレンス断層撮影法は、現在、組織表面下の構造を探索するために開発されつつあるが、非常に小さな組織体積について教えてくれるにすぎない。標準的な写真撮影は、表面構造に関する半定量的な情報を提供するような方法で行えるが、表面下の構造に関しては提供してくれない。

30

#### 【0009】

最近まで、蛍光断層撮影法によるアプローチは、関心対象物の断層撮影画像を作り上げるために、順次に切り替わる単一のソースおよび検出器のアレイに限定されていた。典型的には、これらの形状は、多種多様な標的に適合しない。モデルに基づくアプローチが、データから意味を抽出するために必要とされている。

40

#### 【0010】

近年、広範囲の画像化および単一の空間周波数での構造照明を採用して、関心の標的の三次元範囲を推定する努力がなされている。この研究の大半は、小動物画像化に的を絞っている。研究者は、対象物表面による投影された静的照明パターンの空間的歪みを頼りに、関心対象物の三次元範囲に起因する試料と検出器との間の距離の変化を「修正」する。

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0011】

米国特許出願2003/0184757号は、混濁媒体の広範囲、広帯域にわたる空間変調照明を開示した。このアプローチは、媒体の構造、機能、および組成の表面および表

50

面下の同時マッピングの可能性を有する。この方法は、広範囲にわたって媒体に対し非接触で応用でき、広範囲の画像特性を要する様々な応用に使用することが可能である。生物医学分野における多数の潜在応用が、蛍光を利用した応用を含めて示された。定量変調蛍光画像化については、ついでに言及されてはいるが、詳細な具体説明は提供されなかった。

【課題を解決するための手段】

【0012】

この発明の具体的に詳解する実施態様は、混濁媒体中で深度区分された反射率または透過率の画像化を行うための方法に向けられており、その方法は、混濁媒体を複数の空間周波数で平面照明の周期パターンに露光するステップであって、前述の平面照明がデータ検出の固定平均深度に対応しており、かつ前述の複数の空間周波数がデータ検出の深度感度を変化させるステップと、前述の複数の空間周波数の各々について、前述の混濁媒体からのデータ画像を受け取るステップと、前述の混濁媒体の選択された深度に在る前述の混濁媒体の関心対象領域を選択するステップと、前述の選択された深度に在る前述の混濁媒体の選択された関心対象領域のデータ画像を変換するステップと、前述の選択された深度に在る前述の混濁媒体の関心対象選択領域の前述の変換されたデータ画像を空間フィルタリングするステップと、前述の選択された深度に在る前述の混濁媒体の関心対象選択領域の、前述のフィルタリングされた変換データ画像を再構成するステップとを含んでいる。

【0013】

この発明の具体的に詳解する実施態様は、また、混濁媒体を空間変調周波数の平面照明に露光するステップであって、前述の平面照明がデータ検出の固定平均深度に対応しており、かつ前述の空間周波数がデータ検出の深度感度に対応するステップと、前述の混濁媒体の拡散反射率または透過率を平面照明の選択周波数の空間変調として測定するステップと、前述の測定された拡散反射率または透過率を変換して拡散反射率または透過率のスペクトルを取得するステップと、前述の拡散反射率または透過率スペクトルを拡散カーネルによって除算して再構成された対象物スペクトルを取得するステップと、前述の再構成された対象物スペクトルを逆変換して再構成された対象物データを取得するステップとを含んでいることを特徴とすることもできる。

【0014】

この実施態様では、拡散反射率または透過率スペクトルを拡散カーネルによって除算して再構成された対象物スペクトルを取得するステップは、その中に関心対象物が含まれ、かつ前述の関心対象物の深度が既知である混濁媒体の、バックグラウンドの多周波数光学特性を測定して決定した光学特性を用いて、拡散カーネルにより前述の拡散反射率または透過率スペクトルを除算することを含む。

【0015】

一つの実施では、測定した拡散反射率または透過率を変換して拡散反射率または透過率スペクトルを取得するステップ、および再構成された対象物スペクトルを逆変換して再構成された対象物画像を取得するステップは、前述の測定した拡散反射率または透過率をフーリエ変換して拡散反射率または透過率スペクトルを取得すること、および前述の再構成された対象物スペクトルを逆フーリエ変換して再構成された対象物画像を取得することを含む。

【0016】

他の実施では、測定した拡散反射率または透過率を変換して拡散反射率スペクトルまたは透過率スペクトルを取得するステップ、および再構成した対象物スペクトルを逆変換して再構成された対象物画像を取得するステップは、前述の測定した拡散反射率または透過率をヒルベルト変換またはウェーブレット変換して拡散反射率または透過率スペクトルを取得すること、および前述の再構成した対象物スペクトルを逆ヒルベルト変換または逆ウェーブレット変換して再構成された対象物画像を取得することを含む。

【0017】

一つの実施態様では、平面照明の選択周波数の空間変調として混濁媒体の拡散反射率ま

10

20

30

40

50

たは透過率を測定するステップ、前述の測定した拡散反射率または透過率を変換して拡散反射率または透過率スペクトルを取得するステップ、前述の拡散反射率または透過率スペクトルを拡散カーネルで除算して再構成された対象物スペクトルを取得するステップ、前述の再構成された対象物スペクトルを逆変換して再構成された対象物画像を取得するステップは、各ステップを、二次元で、固定平均深度に対応する空間変調周波数で実施し、前述の混濁媒体中の関心対象物の二次元画像を取得することを含む。

#### 【0018】

上記の最後の実施態様では、上記の露光、測定、変換、除算、および逆変換の各ステップを、空間変調周波数を変更しながら繰り返し、変更される固定平均深度に対応する複数の画像を取得して、変更される固定平均深度に対応する前述の複数の画像から減算画像を生成し、混濁媒体中の、対応する单一の固定平均深度だけに実質的に由来する画像を取得する。

10

#### 【0019】

平面照明の選択周波数での空間変調として混濁媒体の拡散反射率または透過率を測定するステップは、対応深度に在る前述の混濁媒体中の関心対象物からの前述の平面照明の蛍光、吸収、および散乱を同時に測定することを含む。同時測定のステップは、深度の関数としてフルエンス率を決定する順方向モデルを用いて、前述の対応深度に在る前述の混濁媒体中の関心対象物の蛍光、吸光、および散乱の特性を得ることを含む。深度の関数としてフルエンス率を決定する順方向モデルのステップは、次式で与えられる。

20

$$\phi_0(z) = 3P_0 \left( \frac{\mu_s'}{\mu_{tr}} \right) \left( \frac{\mu_{eff}^2}{\mu_{tr}^2} - 1 \right)^{-1} \exp(-\mu_{tr}z) + C \exp(-\mu_{eff}z)$$

#### 【0020】

式中  $\phi_0(z)$  は、深さ  $z$  の関数としてのフルエンス率であり、  $P_0$  は、平面照明の入射光パワーであり、  $C$  は、境界条件の選択によって決定される定数であり、  $\mu_s'$  は、低減された散乱係数であり、  $\mu_{tr}$  は、輸送係数であり、そして  $\mu_{eff}$  は、実効散乱係数である。逆方向技法を用いて関心対象物の蛍光、吸光、および散乱の特性を得るステップは、最小二乗回帰または疑似逆線形行列乗法を用いることを含む。

30

#### 【0021】

定量変調蛍光撮像について、混濁媒体、典型的にはヒトまたは動物組織の中での深度区分された蛍光および反射率の撮像を行う方法を改良する。前述の改良が行われる方法は、空間周波数によって特徴付けられた照明の周期パターンに前述の混濁媒体を露光することと、前述の混濁媒体からのデータ画像を受け取ることと、前述の混濁媒体の関心対象領域を選択することと、前述の混濁媒体の選択した関心対象領域のデータ画像を変換することと、前述の混濁媒体の選択した関心対象領域の前述の変換したデータ画像を空間フィルタリングすることと、前述の混濁媒体の選択した関心対象領域の、前述のフィルタリングされた変換データ画像を再構築することとを含む。

30

#### 【0022】

この改良は、混濁媒体を周期パターンに露光するときに、照明の周期パターンを蛍光励起波長とともにコード化して、混濁媒体内の蛍光構造を深度分解して弁別すること、および混濁媒体内の蛍光の非接触三次元画像を再構築することを含む。結果として、空間コード化されたデータから、広い範囲の画像化ができ、单一画像から不均一成分の平均バックグラウンド光学特性を分離でき、照明の空間周波数の選択に基づいて深部蛍光特徴から表層蛍光特徴を分離でき、または定性的および定量的な構造、機能および組成情報を抽出できる。

40

#### 【0023】

コード化および再構成のステップは、さらに、関心対象の励起および発光波長で空間分解された光学特性を提供し、測定された蛍光から散乱および吸収の影響を取り除くことを

50

含む。

【0024】

この方法は、さらに、表面および表面下の媒体の構造、機能および組成を同時にマッピングするステップも含む。そのステップは、反射率および発光周波数に関する光学特性マップおよびその変換物を用いてコンピュータで実施する。

【0025】

この方法は、ファイバ光学または他の分野を制限するモダリティを用いることなく、広範囲の画像化（撮像）技術として実施される。広い範囲の画像化のステップは、広域にわたって光学特性の決定を空間的に分解することを含む。

【0026】

この方法は、さらに、不均一成分に由来する平均バックグラウンド光学特性を单一画像から分離することを含む。

【0027】

この方法は、さらに、照明の空間周波数の選択に基づいて深部蛍光特徴から表層蛍光特徴を分離することを含む。

【0028】

この方法は、さらに、空間コード化データから、定性的および定量的な構造、機能および組成の情報を抽出することを含む。

【0029】

表面および表面下の媒体の構造、機能および成分を同時にマッピングするステップは、光源の空間周波数、波長の選択、および／または振幅変調の関数として、深度感度を評価することを含む。

【0030】

空間コード化データから、定性的および定量的な構造、機能および組成の情報を抽出するステップは、蛍光データに加えて散乱および吸収特性を空間的に分解すること、ならびに蛍光団スペクトルから散乱および吸収の影響を取り除くことの両方によって、蛍光を定量的に測定することを含む。この場合も、この発明の教示に従ってコンピュータで実施される、データ処理ステップである。

【0031】

この方法は、さらに、照明の空間周波数の選択に基づいて標的蛍光からバックグラウンド蛍光を分離するステップ、および照明の空間周波数の選択に基づいて深部蛍光特徴から表層蛍光特徴を分離するステップを含む。

【0032】

この方法は、さらに、組織の自己蛍光を、組織内の他の外因性蛍光団または遺伝子工学によって合成されたタンパク質の蛍光の発現から深さで分けることを含む。

【0033】

この方法は、さらに、光源の空間周波数、波長選択および／または振幅変調の関数として、深度感度を評価することを含む。

【0034】

この方法は、さらに、照明の空間周波数の選択に基づいて深部蛍光特徴から表層蛍光特徴を分離することを含む。

【0035】

一つの実施態様では、コード化のステップおよび再構成のステップは、小動物撮像に応用される。

【0036】

様々な実施態様において、コード化のステップおよび再構成のステップは、蛍光内視鏡、蛍光気管支鏡、蛍光腔鏡（子宮頸癌）を用いた前癌および癌の検出およびモニタリング、組織のタイプを識別するための手術中ガイダンス、モーズの外科手術ガイダンス（蛍光および／もしくは反射率に基づく皮膚腫瘍輪郭の描写）、または蛍光および／もしくは反射率に基づく腫瘍輪郭描写などのような脳腫瘍切除のうち少なくとも一つに応用される。

10

20

30

40

50

**【 0 0 3 7 】**

別の実施態様では、コード化のステップおよび再構築のステップは、薬剤開発などの治療の有効性のモニタリングに応用される。

**【 0 0 3 8 】**

さらなる実施態様では、コード化のステップおよび再構築のステップは、年齢、疾患関連の変化、および皮膚化粧品のモニタリング、広範囲の組織の水分補給、光老化、および治療（化学物質、レーザー、高周波、または焼灼）に対する光老化した皮膚の反応の使用、または日焼け止め剤の効果の定量化（様々な日焼け止め剤を使用した場合の日焼け止め剤としての適切性と日光に対する生理反応の両方の調査）のうち少なくとも1つに応用される。

10

**【 0 0 3 9 】**

より更なる実施態様では、コード化のステップおよび再構成のステップは、糖化最終産物に関連する蛍光の変化などのような、糖尿病に関連する組織内の変化に応用される。

**【 0 0 4 0 】**

さらに別の実施態様では、コード化のステップおよび再構成のステップは、移植のための火傷の重症度／火傷の深さの評価に応用される。

**【 0 0 4 1 】**

別の実施態様では、コード化のステップおよび再構成のステップは、光線力学療法の線量測定に応用される。

20

**【 0 0 4 2 】**

別の実施態様では、コード化のステップおよび再構成のステップは、火傷評価、末梢血管疾患の診断および管理のための広い範囲の組織の酸素測定、または新生児の酸素測定に応用される。

**【 0 0 4 3 】**

別の実施態様では、コード化のステップおよび再構成のステップは、医薬品および定量的なプロセス工学の品質管理の手段としての蛍光、反射率、またはそれらの組合せを用いた化学的画像化に応用される。

**【 0 0 4 4 】**

この発明の具体的に詳解された実施態様は、また、定量変調蛍光撮像のための装置に改良を加え、ヒトまたは動物の組織などの混濁試料の深度区分された蛍光および反射率を撮像することも含む。混濁試料はまた、その天然構成要素の蛍光を利用するか、または蛍光タグもしくは色素の浸透あるいはそれとの結合を利用した蛍光物質のいずれでもよい。この改良が加えられる装置は、混濁試料を照明の周期パターンに露光する光源、前述の試料からのデータ画像を受け取るカメラ、および前述の試料のデータ画像をフーリエ変換し、前述の変換した試料のデータ画像を空間フィルタリングし、かつ前述のフィルタリングした変換された試料のデータ画像を再構成するシグナルプロセッサを含む。前述のシグナルプロセッサは、ソフトウェア／ファームウェア制御コンピュータ、デジタル信号プロセッサ、論理回路、または任意の他のシグナル処理回路もしくは装置を含む。この改良は、光源が蛍光励起波長とともにコード化された照明の周期パターンを提供して、混濁媒体内の蛍光構造を深度分解して弁別するものである。この装置は、前述の混濁試料内の、発光周波数での蛍光の非接触三次元画像を再構成するための手段に結合される。この手段は、前述の装置の前述のシグナルプロセッサであってもよく、あるいは追加のソフトウェア／ファームウェア制御コンピュータ、デジタル信号プロセッサ、論理回路、または他の任意の信号処理回路もしくは装置であってもよい。結果として、空間コード化データから、広い範囲で画像化し、単一画像から不均一成分に由来する平均バックグラウンド光学特性を分離し、照明の空間周波数の選択に基づいて深部蛍光特徴からの表層蛍光特徴を分離し、または定性的および定量的な構造、機能および組成の情報が抽出される。

30

**【 0 0 4 5 】**

光源および再構成のために組み合わされる手段は、関心対象の励起波長および発光波長における空間分解された光学特性を決定し、かつ再構成のための手段は、さらに、測定さ

40

50

れた蛍光から散乱および吸収の影響を取り除く。

【0046】

再構成手段は、さらに、表面および表面下の媒体の構造、機能および組成を同時にマッピングする。

【0047】

光源および再構成手段の組合せは、広範囲の画像化を実施する。

【0048】

再構成手段は、単一画像から、不均一成分に由来する平均バックグラウンド光学特性を分離する。

【0049】

再構成手段は、照明の空間周波数の選択に基づいて、深部蛍光特徴から表層層蛍光特徴を分離する。

【0050】

再構成手段は、空間コード化データから、定性的および定量的な構造、機能および組成の情報を抽出する。

【0051】

再構成手段は、光源の空間周波数、波長選択および／または振幅変調の関数として、深度感度を評価する。

【0052】

再構成手段は、広い領域にわたって光学特性決定を空間的に分解する。

【0053】

再構成手段は、蛍光データに加えて散乱および吸収特性を空間的に分解すること、ならびに蛍光団スペクトルから散乱および吸収の影響を取り除くことの両方によって、蛍光を定量的に測定する。

【0054】

再構成手段は、照明の空間周波数の選択に基づいて標的蛍光からバックグラウンド蛍光を分離し、かつ照明の空間周波数の選択に基づいて深部蛍光特徴から表層蛍光特徴を分離する。

【0055】

再構成手段は、組織の自己蛍光を組織内の他の外因性蛍光団または遺伝子工学によって合成されたタンパク質の発現から深度で分解する。

【0056】

再構成手段は、光源の空間周波数、波長選択および／または振幅変調の関数として、深度感度を評価する。

【0057】

再構成手段は、照明の空間周波数に基づいて深部蛍光特徴から表層蛍光特徴を分離する。

【0058】

この発明の装置および方法は、文法的な流暢さのために作用面からの説明でもって記述してきたし、また記述していくが、各請求項は、米国特許法第112条でことさらに規定されていない限り、いかなる形でも「手段」または「ステップ」の限定解釈により必然的に限定して解釈されるべきでないこと、各請求項により規定される定義の意味および均等の全範囲が司法上の均等論の下に与えられるべきであること、そして各請求項が米国特許法第112条の下で明言的に規定されている場合は、米国特許法第112条の下で法定均等物が与えられるべきであることを、正にその旨理解されたい。ここで図面に移ることにより、この発明はよりよく思い描くことができ、そこでは同じ要素は同じ番号で参照されている。

【0059】

次に、各請求項に定義されるこの発明の具体的な詳解例として提示する好適な実施態様についての以下の詳細な説明に移ることにより、この発明およびその種々の実施態様をよ

10

20

30

40

50

りよく理解することができよう。各請求項により定義される発明は、以下に記述する具体的に詳解された実施態様よりも範囲が広くあり得ると、ここでは正にそのように理解している。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0060】

ある光のパターンを有する照明は、混濁媒体または組織の表面下の撮像（画像化）および広域にわたる光学特性の決定を可能にする。光学特性の平均および空間的変動は、ともに非侵襲的に決定できる。試料との接触またはスキャンニングは必要ではないが、望ましいこともある。表面下の撮像は、照明のスペクトルをフーリエドメインにフィルタリングすることで実施されるが、ウェーブレット変換、主成分フィルタリングといった他のフィルタリングアプローチも同様に実行可能であろう。深度感度(depth sensitivity)は、照明の空間周波数を変更することによって最適化される。平均光学特性および光学特性の空間変動の定量分析を得る。光学特性、すなわち低減された散乱および吸収係数は、変調伝達関数、MTF、（ここに援用する）、開示された混濁媒体の広範囲、広帯域の、空間変調された照明から決定される。本書において、この方法および装置のさらなる改良、すなわち変調された撮像（画像化）を提供する。

10

##### 【0061】

これに加えて、蛍光指向のこの技術の応用によって導き出される情報コンテンツについて説明する。この発明の目的は、1) 混濁媒体内で深度区分された蛍光および反射率を撮像すること、および2) 空間的に分解された蛍光および光学特性を導き出すことを実施する手段を含む。このアプローチは、媒体の構造、機能および組成の表面および表面下の同時マッピングを提供できる。ここに開示する方法は、広い範囲の撮像、および単一画像から不均一成分に由来する平均バックグラウンド光学特性を分離することを可能にする。これに加えて、この方法は、照明の空間周波数の選択に基づいて表面の蛍光特徴を深部蛍光特徴から分離する手段も提供する。空間的にコード化されたデータから、定性的および定量的な構造、機能および組成の情報を抽出することができる。

20

##### 【0062】

空間変調蛍光撮像および断層撮影のためのこの方法および装置では、混濁媒体中に導入された光分布は、変調撮像を介して照明の空間周波数によってコード化され、それによって混濁媒体内の蛍光構造を深度分解して弁別できるようになる。これにより、混濁媒体内の蛍光を、簡単に非接触で三次元に再構成できる。

30

##### 【0063】

さらには、この技術は、関心対象の励起波長および発光波長において空間的に分解（解像）された光学特性を提供する能力を有していることから、このアプローチを用いて、測定された蛍光（内因性、外因性、または両者の組合せでもよい）から散乱および吸収の影響を取り除くことができる。

30

##### 【0064】

このアプローチは、媒体の構造、機能および組成の表面および表面下を同時マッピングする可能性を有している。開示された方法によって、広い範囲の撮像、および単一画像から不均一成分に由来する平均バックグラウンド光学特性を分離することを可能にする。これに加えて、この方法は、照明の空間周波数の選択に基づいて、深部蛍光特徴から表層蛍光特徴を分離する手段も提供する。空間的にコード化されたデータからは、定性的および定量的な構造、機能および組成の情報を抽出することができる。

40

##### 【0065】

空間周波数ドメインにおける理論

均一媒体について時間非依存的な拡散方程式は、式 [ 数 1 ] で与えられる。

##### 【0066】

##### 【数 1】

$$\nabla^2 \varphi - \mu_{\text{eff}}^2 \varphi = -3\mu_{\text{tr}} q$$

50

## 【0067】

式中の $\mu_{tr}$ は、フルエンス率であり、 $q$ は、光源であり、 $\mu_{tr} = \mu_a + \mu_s'$ は、輸送係数であり、 $\mu_{eff} = (\mu_a \mu_{tr})^{1/2}$ 、 $\mu_a$ は、吸収係数であり、 $\mu_s' = \mu_s(1 - g)$ は、低減された散乱係数であり、そして、 $g$ は、平均散乱角度のコサインである。図13に示すように、半無限幾何を導入して、次式[数2]の正規化入射角を有し、周期変動する平面波光源を導いた。

## 【0068】

## 【数2】

$$q = q_0(z) \cos(kx + \Phi)$$

10

## 【0069】

このとき、空間周波数（または、反復性） $f_x = k / 2$  および空間位相 $\Phi$ は、深度 $z$ に若干任意依存的に、正接空間寸法 $x$ に無限大に延長されている。光が媒体の中へと伝播するとき、それは正負の $x$ 方向に等しく散乱され、ACの波振幅は減衰する。線形媒体を仮定すると、この正弦波光源は、 $x$ 方向に同一の振動拳動をするフルエンス率を生じる（すなわち、垂直入射光については横方向の位相シフトがない）。

## 【0070】

## 【数3】

$$\varphi = \varphi_0(z) \cos(kx + \Phi)$$

20

## 【0071】

式[数2]および式[数3]を式[数1]に入れると、深度 $z$ でのフルエンス率に関する一元二次のヘルムホルツ方程式が得られる。

## 【0072】

## 【数4】

$$\frac{d^2}{dz^2} \varphi_0(z) - \mu_{eff}^2 \varphi_0(z) = -3\mu_{tr} q_0(z)$$

## 【0073】

上式中、次式[数5]の関係にある。

30

## 【0074】

## 【数5】

$$\mu_{eff} = \left( \mu_{eff}^2 + k^2 \right)^{1/2} = \frac{1}{\delta_{eff}}$$

## 【0075】

ゼロ空間周波数( $k = 0$ )では、有効貫通深度 $\delta_{eff}$ は、平面照明光源の有効貫通深度、 $\delta_{eff} = 1 / \mu_{eff}$ に等しい。しかしながら、一般的には、 $\mu_{eff}$ および $\delta_{eff}$ は、照明の光学特性と空間周波数の両方の関数である。一元型の式[数4]は、周期的波の振幅、 $\varphi_0(z)$ が横方向次元 $x$ に対する真の依存性は有していないことを暗示している。式[数4]は、平面照明の拡散方程式と同一であることから、 $\mu_{eff}$ を新規項の $\mu_{eff}'$ で単純に置き換えることによって、既存の平面幾何についての解を得ることができる。

40

## 【0076】

以下の平面光子密度波反射率の標準的な導出に続いて、拡張光源を次式[数6]とモデル化し、

## 【0077】

【数6】

$$q_0(z) = P_0 \mu_s' \exp(-\mu_{tr} z)$$

【0078】

フルエンス率について1つの表現として、次式【数7】を得る。

【0079】

【数7】

$$\varphi_0(z) = 3P_0 \left( \frac{\mu_s'}{\mu_{tr}} \right) \left( \frac{\mu_{eff}^2}{\mu_{tr}^2} - 1 \right)^{-1} \exp(-\mu_{tr} z) + C \exp(-\mu_{eff} z)$$

10

【0080】

ここに、 $P_0$ は、入射光パワーであり、 $C$ は、境界条件の選択によって決定される定数である。フラックス  $j$  が境界面  $z = 0$  におけるフルエンスに比例するとして、部分的な現境界条件を用いると、次式【数8】が導かれる。

【0081】

【数8】

$$j|_{z \rightarrow 0^+} = A \varphi|_{z \rightarrow 0^+}; A = \frac{1 - R_{eff}}{2(1 + R_{eff})}$$

20

【0082】

このとき、実効反射係数  $R_{eff}$  は、次式【数9】となり、

【0083】

【数9】

$$R_{eff} \approx 0.0636n + 0.668 + \frac{0.710}{n} - \frac{1.440}{n^2}$$

30

【0084】

次式【数10】の拡散反射率、 $R_d(k)$  を得る。

【0085】

【数10】

$$R_d(k) = \frac{3A\alpha'}{\left(\mu_{eff}'/\mu_{tr} + 1\right)\left(\mu_{eff}'/\mu_{tr} + 3A\right)}; \alpha' = \frac{\mu_s'}{\mu_{tr}}$$

40

【0086】

式中  $\alpha'$  は、低下アルベドである。示した式は、純粋に一元の正弦波照明パターンについてのものであるが、2方向に正弦波を線形重合せすることによって、任意の照明機能をモデル化することができる。

【0087】

式【数7】および式【数10】には、2つの重要な意味がある。第1は、平面照明を用いることは疑問の平均深度が固定されていることを意味するが、照明パターンの空間周波数を変更することで混濁媒体中の検出の深度感度を制御できることである。第2は、周波数依存的な反射率を分析することによって、媒体の光学特性を定量的にサンプリングできることである。これは、周波数ドメインの光子移動アプローチに似ており、各時間周波数および空間周波数の測定値は、フーリエ変換によってそれぞれ時間分解されたおよび空間分解された測定値に関連付けられる。

【0088】

50

これらの基本概念を拡散という文脈の中で公式化したが、それらは、確率論のモンテカルロシミュレーションなどの完全放射輸送方程式に対するより正確な解、または直接の数値解の中に定性的に残されており、それは、光輸送モデルを低散乱、高吸収、および/または高空間周波数のレジームに拡張する。

## 【0089】

空間周波数ドメインにおける測定

混濁システムの拡散変調伝達関数(diffuse modulation transfer function) (MTF) は、透過または反射幾何学内で測定できる。実際には、照明は、負のスカラー強度で照射することは物理的に不可能であることから、AC(空間的に変調)とDC(平面的)反射率の項を重ね合わせなければならない。それ故に、次式 [数17] の形の空間パターンで試料を照明する。

10

## 【0090】

## 【数17】

$$S = \frac{S_0}{2} [1 + M_0 \cos(2\pi f_x x + \Phi)]$$

## 【0091】

式中、 $S_0$ 、 $M_0$ 、 $f_x$ 、および $\Phi$ は、それぞれ照明光源強度、変調深度、空間周波数、および空間位相である。この単純な例では、パターンは、直交するy方向については一定である。反射モードでは、拡散反射強度 $I$ は、次式 [数18] に示すように、AC成分とDC成分の和である。

20

## 【0092】

## 【数18】

$$I = I_{AC} + I_{DC}$$

## 【0093】

式中、測定された反射強度のAC成分 $I_{AC}$ は、次式 [数19] のようにモデル化できる。

## 【0094】

## 【数19】

$$I_{AC} = M_{AC}(x, f_x) * \cos(2\pi f_x x + \Phi)$$

30

## 【0095】

ここで $M_{AC}(x, f_x)$ は、周波数 $f_x$ での反射光子密度「定在波」の振幅を表す。第一に、 $M_{AC}$ は、図14の上部に示した位置 $x$ の関数であってよいことに留意されたい。これに加えて、二次元カメラを使って、各yピクセル行について、平行に複数の $M_{AC}(x, f_x)$ 曲線をサンプリングすることができ、何百万もの反射率値を同時に空間的にサンプリングすることができる。

## 【0096】

多数ある従来の信号処理スキームのうちの任意の一つを用いて、 $M_{AC}(x, f_x)$ を得ることができる。具体的に詳解する実施態様では、単純な時間ドメイン振幅復調法を採用して、同一の空間周波数で、位相オフセットをそれぞれ $= 0, 2/3, 4/3$ ラジアンとして、正弦波パターンを3回照射した。すると、 $M_{AC}(x, f_x)$ を次式 [数20] により、各空間位置 $x_i$ について代数学的に算出できる。

40

## 【0097】

## 【数20】

$$M_{AC}(x_i, f_x) = \frac{2^{1/2}}{3} \left\{ [I_1(x_i) - I_2(x_i)]^2 + [I_2(x_i) - I_3(x_i)]^2 + [I_3(x_i) - I_1(x_i)]^2 \right\}^{1/2}$$

50

## 【0098】

式中、 $I_1$ 、 $I_2$ 、および $I_3$ は、空間位相をシフトさせた各位置の $I_{AC}$ 画像値を表す。この差分アプローチは、1)三つの画像全てに共通し、平均画像ノイズおよびデジタル化オフセットを含む特性を自動的に取り除くこと、および2)空間周波数が既知であり、潜在的空間キャリブレーション誤差を取り除くことを必要としないこと、から便利である。空間的に変化するDC振幅、 $M_{DC}(x)$ は、 $f_x = 0$ として上記の式から、または次式[数21]を用いて任意の照明周波数について算出できる。

## 【0099】

## 【数21】

$$M_{DC}(x_i) = \frac{1}{3} [I_1(x_i) + I_2(x_i) + I_3(x_i)]$$

10

## 【0100】

ここで、復調に関する上記の位相シフト時間ドメイン法は、同じ目的を果たすことができる、すなわち空間的に変化する拡散光子密度波の空間局在的振幅を算出できる、数多くある様々な従来の方法の一つにすぎないことに留意されたい。復調のための、他の時間ドメインおよび周波数ドメインでの信号処理法としては、ヒルベルト変換、ウェーブレット変換、およびフーリエ変換 除算 ベースドフィルタリング 逆フーリエ変換をする方法が挙げられる。

## 【0101】

周波数ドメインでは、次式[数22]に示すように、測定値 $M_{AC}(f_x)$ は、1)光源強度、 $I_0$ と、2)照明および撮像の光学システムのMTF、 $MTF_{system}$ と、3)真の混濁システムのMTF、 $R_d$ の積である。

20

## 【0102】

## 【数22】

$$M_{AC}(x_i, f_x) = I_0 \cdot MTF_{system}(x_i, f_x) \cdot R_d(x_i, f_x)$$

## 【0103】

その結果、光学特性が分かっている混濁ファントムについて、参照測定、 $M_{AC, ref}(x, f_x)$ を実施することによって、光源の絶対強度と撮像システムのMTFを同時にキャリブレートできる。ファントムの拡散反射率のモデル予測値、 $R_{d, ref, pred}(f_x)$ を用いると、各空間位置の拡散反射率を次式[数23]のように書くことができる。

30

## 【0104】

## 【数23】

$$R_d(x_i, f_x) = \frac{M_{AC}(x_i, f_x)}{M_{AC, ref}(x_i, f_x)} \cdot R_{d, ref, pred}(f_x)$$

## 【0105】

システムの周波数応答についての直接の除算に基づく修正は、他の空間分解測定に比して空間フーリエドメイン(SFD)測定の方が優れており、測定ノイズおよび不確定性を増幅する可能性のある真の空間ドメイン内でのシステム点広がり関数(PSF)を回避する。

40

## 【0106】

最後に、ある所与の変調周波数について、式[数10]には、二つの未知項、すなわち $\mu_a$ および $\mu_s'$ が存在する。それ故に、2個という少ない空間周波数を用いて測定して吸収と散乱を分離することができる。例示の実施態様では、広帯域周波数ドメイン光子移動(frequency domain photon migration)(FDPM)アプローチと同様に、空間周波数空間に「スイープ(sweep)」を用いて、最小二乗法最小化を用いて式[数10]に近似でき

50

る測定値の優決定集合(over-determined set)を作成した。

【0107】

ファントム10を図解する図1aおよび図1bに図式的に描かれているように、実験データは、図12に図式的に描かれ、ここに援用する米国特許第6,958,815号に詳細に記載されている、システム内照明用にデジタルマイクロミラー装置32を採用したデジタルプロジェクタ30を用いて取得した。様々な空間周波数の正弦波パターンを、不均一ファントム10に投影し、ペルチ工冷却した16ビットCCDカメラ34を使って捕獲した。データをカメラ34から集めてコンピュータ36に入力した。

【0108】

図1aの上面図に示すファントム10は、三角形の吸収対象物14の上部に斜めに位置決めされた四角形の散乱・吸収対象物12を備え、それらはともにTiO<sub>2</sub>を加えたシロキサンのブロック16内に浸漬されている。ファントム10は、図1bでは側面図として示されており、そこでは四角形の散乱・吸収材料12の上面が、三角形の吸収材料14の上部2mmのところに配置されている。シロキサンブロック16は、TiO<sub>2</sub>を含有するよう変更されており(640nmにおいて $\mu_a = 0.003 / \text{mm}$ 、 $\mu_s' = 1 / \text{mm}$ )、2つの異成分、すなわち対象物12および対象物14に適合している。対象物14は、吸収マスク(三角形)で、試料の内側2mmのところに置かれている。対象物12は、シロキサンブロック(厚さ=0.5mm、 $\mu_a = 0.006 / \text{mm}$ 、 $\mu_s' = 1 / \text{mm}$ )の表面に置かれた散乱・吸収素子(四角形)である。

【0109】

正反射は、垂直の方向(放線方向)に対して小さな角度でファントム10を照射すること、および交差させた直線偏光子を用いて注意深く回避する。干渉フィルタは、狭い波長域(ここに示す実施例では、λ = 640nm、Δλ = 20nm半値全幅(full width at half maximum))の選択を可能にする。シロキサンの反射率標準体を用いて、測定した強度をキャリブレートし、照明および撮像システムの両方について空間不均一性を修正する。

【0110】

実際には、照明はM \* cos(2πf<sub>x</sub> + φ) + 1の形をしており、DC(平ら)成分を含み、0~1の変調を可能にしている。ACおよびDC成分に起因する反射率を別々に見るために、信号処理の従来技術を採用する。この作業では、試料を0、120、および240度で位相オフセットしながら、3回、同一の空間周波数で照射することを必要とする。AC変調された反射率の画像は、前記式[数5](下記に再掲する)を用いて算出できる。

$$AC = \frac{\sqrt{3}}{2} \sqrt{(A-B)^2 + (B-C)^2 + (C-A)^2}$$

【0111】

式中A、B、およびCは、空間位相をシフトした反射率画像を表す。この方法は、共焦点顕微鏡用に当技術分野で近年採用されている。

【0112】

図2は、異なる対象物12および対象物14の有効コントラストが照明の空間周波数に依存することを実証している。図2は、42種類の空間周波数でのファントムの変調画像を示す二次元データの写真を配列したものである。図2の左上から始まり、変調画像に用いた空間周波数を、右下に向かって0/mm(DC)から0.63/mmまで増加した。DC画像18では、表面対象物と深部対象物の両方が出現する。しかしながら、照明の空間周波数が増加すると(右下に向かう)、下部対象物は徐々に不鮮明になり、最終的には表層対象物のみ認識できるようになる。これは、高周波数光子密度波が表層部だけ貫通するという我々の公式と一致する。

【0113】

図2のデータにコード化されているのは、深度分解(depth-resolved)された光学特性で

10

20

30

40

50

ある。混濁媒体に利用できる様々な定量的断層撮影再構成技術が、空間不均一性逆問題を3Dで解くのに応用できる。しかしながら二つの隣接する空間周波数間の単純な差分画像によって、空間周波数に伴って変化する情報を可視化できる。図3には、図2のデータセット（データ集合）の差分画像を示している。図3は、図2のデータ写真的配列に対応する、異なる空間周波数の変調画像の間で単純に減算して得た深度区分された断層撮影像を配列したものである。この場合、35枚の画像の各々は、深度感度の大まかな変化を捕獲するための、移動周波数窓内のデータ（ $f_1 - f_9$ 、 $f_2 - f_{10}$ 等）間減算の結果である。図3の各画像では、ピクセル値を個々の画像の平均値を0.5~1.5倍してプロットし、周波数空間全体で画像を比較しやすくしている。この単純な再構成は、下方対象物14および上方対象物12をそれぞれ低周波数および高周波数に限定して描き出しており、この技術の深度分解力を実証している。

10

## 【0114】

## 光学特性マッピングの例：均一ファンタム

第2の実験のセットは、均一になるように設計されたシロキサンファンタムの撮像である。図4は、四角で示した多周波数データ、および実線で示した対応する近似曲線のグラフである。混濁媒体は、低域通過フィルタとして働く。640nmについて既知の「バルク」光学特性は、次のとおりである。大型の光源・検出器分離周波数ドメイン光子移動(frequency domain photon migration) (F D P M)によって測定した $\mu_a = 0.00736 / \text{mm}$ 、 $\mu_s' = 0.901 / \text{mm}$ 。 $5 \times 5 \text{ cm}^2$ の表面全体から、空間周波数が0/mmから0.6/mmまでの範囲の、11組の3画像セットを取得した。各周波数での変調画像は、前述したようにして取得した。取得した11組の画像は、混濁ファンタムの拡散反射率の定量的「周波数応答」、または変調伝達関数(M T F)を提供する。さらに、このM T Fは、各ピクセルについて入手できる。拡散反射率対周波数は、空間分解された反射率モデルを空間フーリエ変換することによって分析的に予測できる。これにより、ファンタムに基づくキャリブレーションおよび最小二乗法回帰が可能となり、試料の絶対的な光学特性を得ることができるようにになる。ここでは、ファンタムキャリブレーションは、ランプ強度および撮像光学のM T Fの両方に関係している。

20

## 【0115】

MFTデータの例は、図4に、中抜きの四角として図示された点として識別できるように示されている。各データ点は、変調画像全体の平均を表している。組織試料が低域通過フィルタとして働き、空間周波数が増加するほど反射率をより強く減衰することに留意されたい。これらのデータを、非線形最小二乗法最適化ルーチンを用いる分析的拡散反射率モデルに当てはめた。回収された光学特性は、 $\mu_a = 0.00796 / \text{mm}$ 、 $\mu_s' = 0.965 / \text{mm}$ であり、既知の「バルク」値 $\mu_a = 0.00736 / \text{mm}$ 、 $\mu_s' = 0.901 / \text{mm}$ に非常に近かった。

30

## 【0116】

AC変調は、各ピクセルについて決定されるが、ピクセルごとの周波数近似が可能である。これを $5 \times 5 \text{ cm}^2$ の領域全体について実施した（約 $500 \times 500$ ピクセル）。回収された吸収特性 $\mu_a$ および散乱特性 $\mu_s'$ の二次元データマップを図5に示す。各マップの右は、ピクセル値のヒストグラムであり、黒の破線は、既知のバルク値 $\mu_a = 0.00736 / \text{mm}$ 、 $\mu_s' = 0.901 / \text{mm}$ を示している。回収された特性は、既知のバルク特性、すなわち対応するヒストグラム内にきちんと収まるバルク特性に非常によく一致した。このことは、既知のバルク特性が大型の光源・検出器分離F D P M測定から決定されたものであるので、特に興奮させる。このことは、この発明の力が、照射された試料の光学特性に反映できることを実証している。

40

## 【0117】

次に、深度依存的な蛍光撮像を実証する、不均一ファンタムの実験に移る。この実験は、これまでに示した反射率/吸収/散乱に関しては、蛍光についても同じタイプの深度分化および断層撮影が可能であることを検証するために実施された。そのために、図6の左側に示すような、固体のシロキサンファンタム20を、シロキサン24内に埋め込まれ

50

た、表面から深さ 8 mmまでの範囲の様々な深さで蛍光発光している 5 本の円筒状の液体撮動 22 用いて構成した (100 nM : 1 nM = 摄動 : バックグラウンド)。ファントム 20 は、 $\mu_a = 0.0016 / \text{mm}$ 、 $\mu_s' = 1.3 / \text{mm}$  の均一なバックグラウンドと蛍光、1 nM の Cy5.5 dye を提供した。蛍光励起は、660 nm であり、DC 反射データを励起(透過)および発光帯(720 nm 帯域通過フィルタ)の両方で収集した。660 nm ± 10 nm の DC 反射データを図 6 の右に示す。

#### 【0118】

660 nm の励起光学特性マップ、すなわち  $\mu_a$  および  $\mu_s'$  データマップを、図 7 上部に示す。図 7 の下部は、対応する  $\mu_a$  および  $\mu_s'$  の定量的ヒストグラムである。励起波長の光学特性マップは、予想どおりであった。測定された吸収は、撮動の領域で明らかに高い。散乱の減少は小さいが、これは液体および固体ファントムの反射指數の変化によると思われる。吸収は、撮動が深いほど弱く、またより拡散した。

10

#### 【0119】

720 nm での蛍光変調画像は、図 8 に示すように表面対象物強度に対し正規化した。ここには 720 nm で算出された、等間隔 8 つの周波数の変調画像がプロットされている。低変調周波数から高変調周波数に進むと、蛍光反応は、表面対象物に比べて深部対象物について低下することに留意されたい。この特徴は、データセットを表面対象物強度に対し正規化することによって解消される。高変調周波数では、深部に埋め込まれた対象物の明瞭化によって、空間分解能が明らかに上昇することにも留意されたい。このことは、他の非蛍光データセットでも明らかである。画像形成の観点からは、最終画像は照明および対象物機能を実空間にコンボリューション(たたみ込み)したものである。通常は、生物学的撮像では空間周波数モーメントの非常に低い平面照明が行われ、そのため最初から最終分解能が制限され、画像分解能は全て検出側に負担させている。ここでは、高周波数照明が画像再構成により大きな基本セットを提供することによって、混濁試料画像の「鮮銳化」を可能にしている。周波数空間の値域が、これまで達成可能であった以上に高い混濁媒体中の空間分解能構成を可能にするであろう。

20

#### 【0120】

次に Cy5.5 標識された創傷標的ペプチドを用いた予備的なインビボ蛍光実験について検討する。左冠動脈を永久的に結紮した 3 週後のマウスの腹部像を、創傷領域内に局在させ、かつ膀胱、肝臓、および腎臓により全身クリアランスされると信じられている蛍光標識を投与した 4 時間後に撮像した。図 9 の DC 反射率画像では、胸部域全体に形成された瘢痕 26 が明瞭に認められる。

30

#### 【0121】

図 9 のマウスの励起光学特性マップ(660 nm の  $\mu_a$  および  $\mu_s'$  マップ)を図 10 の上部に示す。対応する  $\mu_a$  および  $\mu_s'$  マップの定量的ヒストグラムを図 10 の下部に示す。マウスの光学特性マップの興味深い特徴の中でも、骨および軟骨領域全体で散乱の減少が明らかに低下していた。股関節部が特に暗いことに留意されたい。カメラに対して極端に曲がっているために、腕部の下側は若干変則である。この変則は、トポロジーが既知であれば修正することが可能であり、それは構造化された光反射率をさらに分析することで達成可能である。

40

#### 【0122】

720 nm で図 9 のマウスの正規化した蛍光(F/R)変調画像を図 11 に示す。それが安定した、再現性のある、定量的な結果をもたらすことが既に示されていたことから、ピクセルごとに反射率で蛍光画像を除算した。実際には、これは、反射率および蛍光が表面角度の関数として似た「反射係数」を有することから、良好なフラットフィールディング(flat-fielding)も提供する。低周波数から高周波数までの規格化蛍光シグナルの変化に留意されたい。低周波数画像では、膀胱 28 および瘢痕 26 の両方が明瞭であるが、高周波数画像では瘢痕 26 のみが明らかである。瘢痕 26 は、表面から心臓まで、少なくとも 2 mm の深さで伸びているはずである。しかし、膀胱 28 は、腹腔内に埋没しており、それ故に、高周波数のシグナル(浅い問合せ)を有することはないであろう。

50

## 【0123】

このように吸収、散乱、および蛍光の光学特性の定量的、機能的な断層撮影が実証された。ハイパースペクトル技術も撮像手段に加えることができるることは、この発明の範囲内であると意図している旨を、明言する。とりわけ、ここでは、周波数ドメイン光子移動を行ったものと類似して、波長依存的な吸収（メラニン、hb、hb<sub>o2</sub>、h<sub>2</sub>O、外因性吸収体）、散乱（細胞構造、火傷深度、大きな組織／マトリックスの構造）、および蛍光（EEM発生、色素濃度／親和性／結合の定量的測定）を研究することに关心がある。変調された光源は、このようなシステムに重要な自由度を付加し、殆どの空間分離／3D撮像を照明の空間周波数に負担させて処理されるようにし、かつ機能的定量的数値の決定に空間情報を役立てることが可能となる。

10

## 【0124】

結論として、混濁媒体中での、広い三次元の視野全体にわたって、深度の区分化および定量的光学特性の決定をなし得る迅速かつ経済的な方法を実証した。この技術は、共焦点／多光子顕微鏡、または光学コヒーレント断層撮影 OCT などのミリメートル以下の撮像技術と拡散光学断層撮影との間の隔たりを埋めるであろう。

20

## 【0125】

図15は、変調された撮像のインビボ蛍光区分化および断層撮影能力を明瞭に実証している。基本概念は、図9および図10に関連する説明と同じであるが、図15のデータセットを深度区分化処理して、動物全体を通して個々のコントラスト断面を可視化している。この図は、断層撮影切片を直接示している。

30

## 【0126】

変調撮像（MI）は、空間周波数によって入力強度変調波の深度範囲を決定できる。このことは、結果としてこの波によって励起される蛍光の深度依存性を制御できるようにもする。このことは、インビボのマウスモデルでのこの能力を実証しており、変調撮像がインビボでも外因性の蛍光コントラストを拡散光学断層撮影できることを実証している。一つの実験では、心臓虚血を誘導した30分後に蛍光標識アネクシン-5を静脈内注射した。次に、前述の実験と同じ空間周波数を用いて、全身について変調撮像を用いて蛍光を測定した。全測定時間は約30分であり、より高感度の強化電荷結合素子（ICCD）検出器を使って改良が加えられた。動物の平面蛍光を図15の最も左側の写真に示す。再構成されたデータを図15の右側の写真に、左から右に向かって、マウス上面（深度 = 0 mm）から底面（深度 = 8 mm）まで約2 mm厚の切片を全身（50 × 20 × 2 mm）の光学切片（断面）として示す。深度依存的な蛍光コントラストは明瞭であり、深くなるに伴って胃および肺の蛍光は消失し、同時に膀胱が出現している。これらの画像は、表面下1 cmまでしか探索していないが、撮像システムの高い感度と広いダイナミックレンジは、反射率モードで最大2~3 cm深度まで、透過モードでは4~5 cm深度まで蛍光コントラストを届けるであろう。

30

## 【0127】

次に、定量的断層撮影への使用を例示するこの発明の実施態様について検討し、シミュレーションと実際の測定および再構成の両方について、深部での高分解能撮像を実証する。ここでは、混濁媒体中における高分解能断層撮影再構成のための回折断層撮影の概要を示す。最初に、数学モデルの表面の下の所与の深さにある薄層に純粋な吸収体が含まれている単純なケースについて検討する。表面下4 mmに置かれた直径1.5 mmの対象物をモデルとした。また、実際の混濁システムでの拡散反射率のデータを取得し、同じようにシミュレーション幾何学を映し出すように設計した。そのために、1%のイントラリピド液の中に4 mmの深さの所に沈められた、直径1.5 mm ± 0.1 mmの吸収ドットを有する、10ミクロンの透明なマイラー層を用いた。660 nmの測定を、0~0.5 / mmの間の42の空間周波数について行った。

40

## 【0128】

図16は、順（上）および逆（下）フーリエ変換を用いた、直径1.5 mmのシミュレーションおよび測定した摂動の結果をそれぞれ示す図である。図面の左上には、深さ4 m

50

mでのシミュレーション撮動が $30 \times 30\text{ mm}$ の視野にプロットされている。すぐ右に図示されている対象物のフーリエスペクトルの内容を見るために、二次元高速フーリエ変換(FFT)を適用した。照明の高い空間周波数が試料内を通過する時に減衰するのと同じように、対象物の高い空間周波数も表面を伝播するとき減衰するが、このとき図面中央に示すような拡散減衰カーネルが広く受け入れられており、かつそれは式[数7]の第2項(均一)に比例する。最終の逆変換によって、あたかも表面で見られるような対象物の撮動が得られる。

#### 【0129】

逆に図面下部を右から左方向に進んで、单一の照明周波数(0/mm)での拡散反射率の測定を示し、二次元FFTを行って拡散撮動スペクトルを見た。拡散の影響を取り除くために、次に多周波数から決定した光学特性を用いて、バックグラウンドの光学特性測定値および理論的な対象物深度を拡散カーネルで除算した。スペクトルウインドウイングを行い、左側にある次の図面に見られる高周波数のノイズ増幅を回避し、最後に逆変換して撮動の高分解能画像を回収した。

10

#### 【0130】

図17では、再構成された対象物のFWHMが、既知の対象物のサイズと定量的に一致することを示している。図18では、42全ての、回収した空間照明周波数について拡散反射率プロファイルをプロットし、空間周波数が増加したときの深度4mmの対象物に対する感度の変化を示した。この挙動は、式[数7]から分析的に予測されるフルエンスプロファイルの変更によるものである。この影響をさらに示すために、図19に深度4mmにある対象物の最大振幅撮動を、空間周波数の関数としてプロットし、バックグラウンドフルエンスの深度プロファイルが変化することを示した。この対象物との相互作用の感度の差は、式[数7]などの順モデル、および最小二乗法回帰または疑似逆線形行列乗法などの断層撮影逆技術を用いることで、定量的な光学特性(蛍光、吸収、または散乱)のデータを空間(x-y)および深度(z)について同時に回収できる可能性を示している。

20

#### 【0131】

最後に、これら概念を拡散の観点で公式化したが、それらは確率論のモンテカルロシミュレーションなどの完全放射輸送方程式のより正確な解、または直接の数値解の中に定性的に残されており、光輸送再構成モデルを低散乱、高吸収、および/または高空間周波数レジームにまで拡張する。このように、この発明は、蛍光、深度制御された光治療の線量測定、深度制御された熱効果を含むが、これらに限定されず、「下流」の光に依存した現象について一般化された「深さ方向探知」を想定していることを理解できるであろう。これらの概念は、美容治療におけるFraxel技術を含め、既存の事業において現実的な意味を持っている。

30

#### 【0132】

この発明の様々な実施態様の応用としては、様々な組織内の医学的診断および治療モニタリング、ならびに小動物の蛍光撮像が挙げられるが、これらに限定されない。この技術は、あらゆる生物学的研究に、深部組織の自己蛍光を、組織内の他の外因性蛍光団または遺伝子工学によって合成されたタンパク質発現から分解(弁別)する能力を提供する。

40

#### 【0133】

ここに至り、この発明が、空間変調された光と混濁媒体との相互作用の深度選択性/深度感受性を活用する方法および装置、より具体的には、入射光の空間周波数を選択して光フルエンス率の深度プロファイルの変更を活用するための方法および装置を広く指向していることが理解できるであろう。物質または混濁媒体とのこの相互作用の一般的な挙動は、1つの可能な解を示すここに開示の分析方程式の中で、最初に証明された。活用される相互作用は、図18および図19に示す制御されたファントム測定の中で明瞭に実証されている。

#### 【0134】

光と混濁媒体との相互作用のこの深度プロファイルの「下流」効果の後続制御としては、

50

ファンтомまたはここに開示のインピボで実証されたような蛍光プロファイル、混濁媒体中の熱プロファイル、および聴覚周波数のみに限定されない任意の周波数の混濁媒体中の音響プロファイルまたは媒体圧力波が挙げられるが、これらに限定されない。光と混濁媒体の物質との相互作用がもたらす任意の副次的効果は、撮像、治療上の処置、または診断検査といった任意の目的に採用することができる。

#### 【0135】

この発明は、また、発明のアルゴリズムを用いて、吸収、散乱、蛍光、または光と混濁媒体との相互作用を指示する他のパラメータの定性的または定量的な高分解能の三次元表示も提供することを特徴とし、このときアルゴリズムは、図17および図18に示され、以下に説明する光学特性の平均算出値として使用されるような横方向の拡散、および上記の深度感度を扱う。

10

#### 【0136】

この発明は、データまたは画像を正確に、高分解能で再構成するための重要な基礎として、算出された光学特性の値を使用する。図17の高分解能の再構成は、平均のバックグラウンド特性を正確に知ることなしには不可能である。これは、「下流」効果の後続制御と組み合わせるか、または上記の逆アルゴリズムを使用するときに、特に新規であるこの発明の例示した実施態様の顕著な能力である。

20

#### 【0137】

このように、この発明は、光と物質との相互作用を活用して、混濁媒体中の深度の関数として混濁媒体中に副次的効果を創出する方法および装置として特徴付けることができる。副次的効果を操作して、選択した深度での混濁媒体の高分解能画像を提供し、選択した深度に治療的仲介を提供し、または選択した深度に診断的情報を提供する。

20

#### 【0138】

広範囲の撮像に加えて、この発明の方法は、次の応用を提供できるが、これらに限定されない。

#### 【0139】

a. 表面下撮像 / 断層撮影：深度感度は、光源空間周波数、波長選択、および／または振幅変調の関数として評価される。

30

#### 【0140】

b. 広い表面全体の光学特性の決定

c. 定量的な反射率、透過、および蛍光撮像：典型的な生物学的試料では、定量的な蛍光測定は、散乱および吸収の影響によって乱される。ここに開示した方法は、蛍光データに加えて、空間分解された散乱および吸収特性の両方も提供できる。したがって、適切な光伝達モデルを用いることにより、蛍光団スペクトルから散乱および吸収の影響を取り除くことができる。

30

#### 【0141】

d. 単一の画像からの不均一成分に由来する平均バックグラウンド光学特性の分離

e. 照明の空間周波数の選択に基づく、標的蛍光からのバックグラウンド蛍光の分離

f. 照明の空間周波数の選択に基づく、深部蛍光特徴からの表層蛍光特徴の分離

g. この発明の有用性として、次のものが挙げられるが、これらに限定されない。

40

#### 【0142】

h. 小動物の撮像

i. 前癌または癌の検出およびモニタリング

i. 蛍光内視鏡

i i. 蛍光気管支鏡

i i i. 蛍光腔鏡（子宮頸癌）

i v. 組織のタイプを識別するための手術中ガイダンス

v. モーズの手術ガイダンス：蛍光および／または反射率に基づく皮膚腫瘍輪郭描写

v i. 脳腫瘍切除：蛍光および／または反射率に基づく腫瘍輪郭描写

j. 治療効果のモニタリング：これには薬剤開発も含まれる

50

k . 皮膚の年齢、疾患に関連する変化、および化粧品のモニタリング

i . 広範囲の組織の水分補給

i i . 光老化および治療（化学物質、レーザ、高周波、または焼灼）に対する光老化した皮膚の反応

i i i . 日焼け止め剤の効果の定量化（様々な日焼け止め剤使用時の日焼け止め剤としての適切性と日光に対する生理反応の両方についての調査）

l . 組織状態での糖尿病関連変化（例えば、進行した糖化最終産物に関連する蛍光の変化）

m . 火傷重症度 / 火傷の深さの評価（移植にとって重要）

n . 光線力学療法の線量測定

o . 広範囲の組織の酸素測定（火傷評価、末梢血管疾患の診断および管理、新生児の酸素測定にとって有用）

p . 品質管理（医薬品）および定量的なプロセス工学の手段としての化学撮像（蛍光、反射率、またはそれらの組み合わせ）

多くの変更や修正が、この発明の精神および範囲から逸脱することなしに、当業者によってなし得るであろう。したがって、ここに具体的に詳解した実施態様は、単に例示の目的として記載されたものであり、前掲の発明および様々な実施態様により定義される発明を制限するものと受け取ってはいけないと理解されなければならない。

#### 【 0 1 4 3 】

よって、ここに具体的に詳解した実施形態は、単に例示の目的で記載されたものであり、前掲の請求項により定義される発明を限定するものと受け取ってはいけないと理解されなければならない。例えば、ある請求項の複数要素が一つの特定の組合せで前掲に記載されているという事実にかかわらず、この発明は、より少ない要素、より多い要素、または異なる要素での他の組合せをも含み、たとえそのような組合せが当初請求されていなくても、ここに開示されているものは含むものであるということを、篤と理解されたい。2つの要素が組み合わされて請求項で一つの組合せ物となっているという教示は、さらに、請求項の組合せ物においてその2つの要素が互いに組み合わされていなくて、単独で用いられたり、他の組合せに組み合わされてもよいという組合せ物をも許容していると理解されたい。この発明の開示されたいかなる要素の除去も、この発明の範囲内にあることを、明らかに意図している。

#### 【 0 1 4 4 】

この発明およびその各種実施態様を記述するためにこの明細書で使用された語は、その一般的に定義された意味においてだけでなく、この明細書における特別の定義により、その一般的に定義されている意味の範囲を超えた構造、材料または働きを含むと理解すべきである。したがって、ある要素がこの明細書の文脈の中で二つ以上の意味を包含すると理解できる場合には、特許請求の範囲でのその使用は、この明細書およびその語自体により裏付けられる全ての可能な意味について包括的であると理解しなければならない。

#### 【 0 1 4 5 】

したがって、前掲の各請求項の語および要素の定義は、この明細書において、文言どおりに記載された要素の組合せだけでなく、実質的に同一の要領で実質的に同一の作用をして実質的に同一の結果を得る全ての均等な構造、材料または働きを包含するものとして、定義されている。したがって、この意味で、各請求項におけるどの一つの要素を二つ以上の要素で等価的に置換してもよいこと、または請求項における二つ以上の要素を单一の要素で置き換えてよいことを、筆者は意図している。複数の要素が特定の組合せで働くように上述され、そのように当初請求されているかも知れないが、請求された組合せからの一つまたは複数の要素は、場合によっては、その組合せから外すことができ、また請求された組合せは部分的組合せにまたは部分的組合せの変形に向かってもよいことを、篤と理解されたい。

#### 【 0 1 4 6 】

当業者から見て、請求された主題からの非実質的な変更は、現在知られているものでも

10

20

30

40

50

今後案出されるものでも、特許請求の範囲内の均等物であると意識的に意図している。したがって、当業者にとって現在知られておりまたは今後知られる自明な置換は、定義された要素の範囲内であるものと定義されている。

#### 【0147】

したがって、各請求項は、上記に具体的に図解および記述されたもの、概念的に均等なもの、自明に置き換えできるもの、およびこの発明の必須の思想を本質的に取り込んでいるものをも包含していると理解されるべきである。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0148】

【図1a】第一のファントムの上面図である。

10

【図1b】図1aのファントムの側面図である。

【図2】42個の空間周波数におけるファントムの変調画像を示すデータ写真の配列である。

【図3】図2のデータ写真の配列に由来する差分画像であるデータ写真の配列である。

【図4】複数の空間周波数に対してAC振幅をプロットして実線で結んだ、空間周波数の関数としての多周波数データのグラフである。

【図5】左側の上下は、それぞれ回収された吸収特性 $\mu_a$ および散乱特性 $\mu_s'$ の二次元データマップであり、右側の上下は、それぞれ対応するピクセルヒストグラムである。

【図6】左側は、第二の深度のファントムの概略図であり、右側は、対応する反射率の深度画像である。

【図7】上部に、図6のファントムの660nmにおける励起光学特性マップ、すなわち $\mu_a$ および $\mu_s'$ のデータマップを示す。図7の下部は、対応する $\mu_a$ および $\mu_s'$ の定量的ヒストグラムである。

【図8】図6のファントムの720nmでの蛍光変調画像であり、周波数を等間隔に開けた8つの変調画像についての表面対象物強度に対して正規化されている。

【図9】胸部/心臓瘢痕を外科的に作成したマウスの腹部のDC反射率画像である。

【図10】上部に、図9のマウスの励起光学特性マップ(660nmでの $\mu_a$ および $\mu_s'$ マップ)を示す。対応する $\mu_a$ および $\mu_s'$ マップの定量的ヒストグラムを図10の下部に示す。

【図11】図9のマウスの720nmにおける標準化された蛍光(F/R)変調の2枚の画像を示す。上部の画像は、0/mmの空間変調におけるものであり、下部の画像は、0.1140/mmの空間変調におけるものである。

30

【図12】上記の画像が提供された実験用セットアップの概略図である。

【図13】変調された照明の光源、および組織を含む混濁媒体中に生じた変調された内部フルエンス率を象徴的に描いた図である。

【図14】図面の上部に変調された反射率のグラフを示し、図面の下部に復調されたACおよびDC振幅を示す。

【図15】インビボのマウスマodelにおける外因性蛍光コントラスト測定を示す一連の写真6枚である。最も左の写真に平面蛍光を示し、そのすぐ右側に、深さ0から8mmまで、2mm区切りの深さごとに全身(50×20×2mm)の光学的断面図を示す。これらの断面写真は、インビボでの深度分解された蛍光構造の断層画像を実証している。

40

【図16】平面画像化のための回折断層撮影フレームワークを示す。図面の上部には、左側から始まり右側に向かって、30×30mmの視野を有する散乱媒体の深さ4mmにおける直径1.5mmの吸収摂動の順フーリエ変換モデルを示す。図面の下部には、右側から始まり左に向かって、深さ4mmの1%イントラリビドに浸漬された、30×30mmの視野について測定された1.5mmの吸収摂動を再構成する逆フーリエ変換問題を示す。スペクトルウインドウ表示を用いて、高周波ノイズの影響を制限している。

【図17】左側は、測定された拡散反射率から再構成した深さ4mmにある吸収対象物を示す写真である。図面右側は、対応する空間プロファイルのグラフであり、高い分解能と空間精度を示し、既知の1.5mm対象物直径に比べて最大半値1.7mmで全幅を測定し

50

ている。

【図18】最も左側の部分に、測定された拡散反射率から再構成した深さ4mmにある吸収対象物の写真を示す。図面の中央部分は、各照明周波数における対応の空間プロファイルを示すグラフである。図面の最も右側の部分は、対応する正規化した空間プロファイルのグラフであり、高い分解能と空間精度を示し、既知の1.5mm対象物直径に比べて最大半値1.7mmで全幅を測定している。図18はまた、最も左側の部分に、平面照明（空間周波数=0/mm）について測定した拡散反射率画像の写真も示す。中央部分は、0/mmから0.5/mmの範囲に42ある空間周波数の各々における吸収摂動の空間プロファイルの写真である。最も右側の部分は、正規化した摂動プロファイルであり、吸収対象物に対する感度が、深度分解バックグラウンドフルエンスプロファイルの変化による空間周波数の増加に伴って変化することを示す。

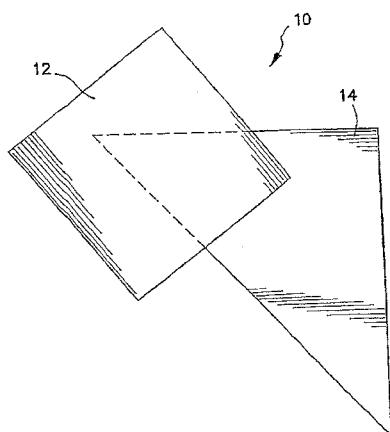
【図19】測定された拡散反射率から得た、深さ4mmにある対象物の、空間周波数の関数としての振幅摂動の写真であり、バックグラウンドフルエンスの深度プロファイルの変化を示す。この対象物との相互作用の感度差は、式[数7]によってモデル化されるような順方向モデルと、最小二乗回帰または疑似逆線形行列乗法のような断層撮影逆方向技法を用いることにより、対象物の大きさ、深さ、および光学特性（蛍光、吸収、または散乱）を定量的に断層撮影できる可能性があることを実証している。

#### 【符号の説明】

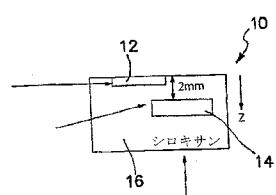
##### 【0149】

- |     |   |               |
|-----|---|---------------|
| 1 0 | … | ファントム         |
| 1 2 | … | 散乱・吸収対象物      |
| 1 4 | … | 吸収対象物         |
| 1 6 | … | シロキサンブロック     |
| 3 0 | … | デジタルプロジェクタ    |
| 3 2 | … | デジタルマイクロミラー装置 |
| 3 4 | … | C C D カメラ     |
| 3 6 | … | コンピュータ        |

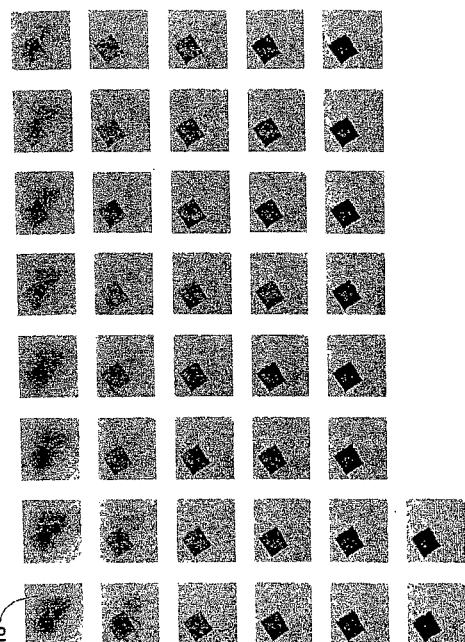
【図 1 a】



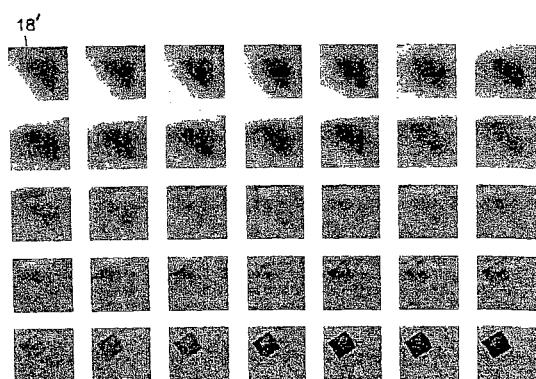
【図 1 b】



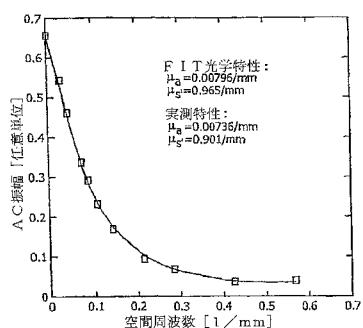
【図 2】



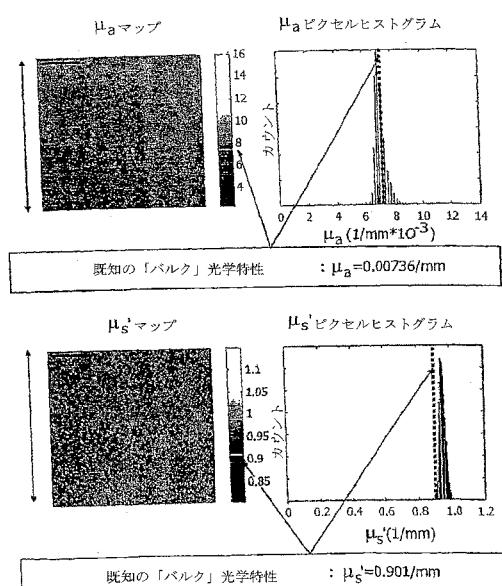
【図 3】



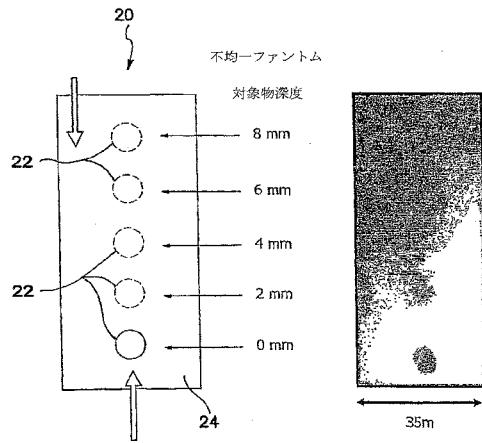
【図 4】



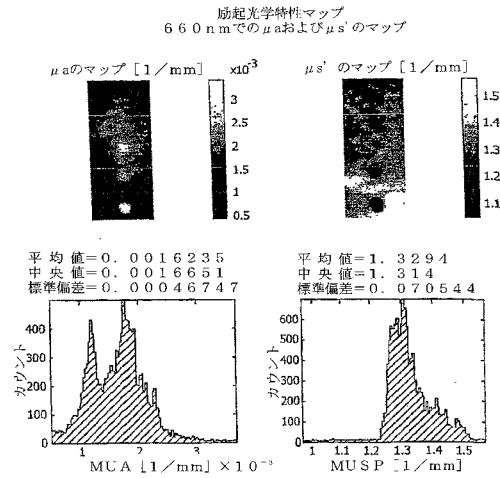
【図 5】



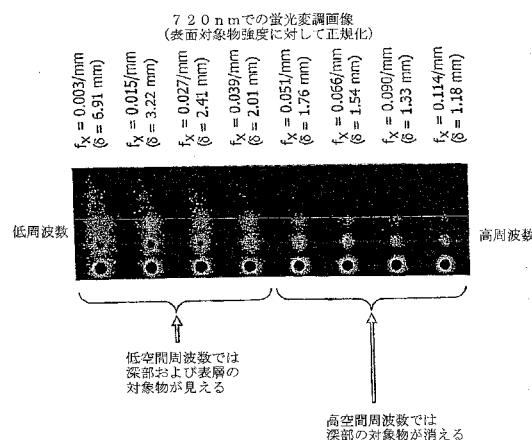
【図6】



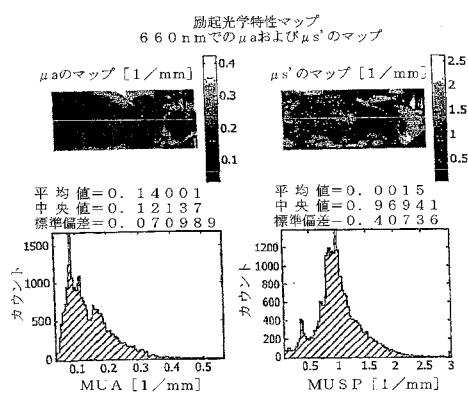
【図7】



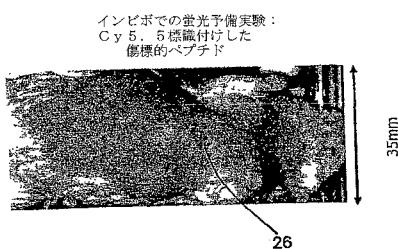
【図8】



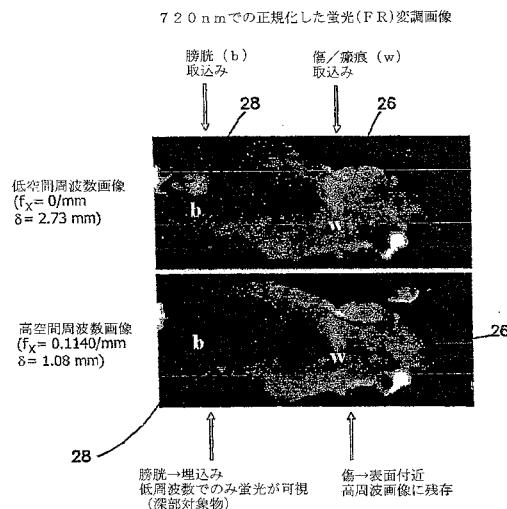
【図10】



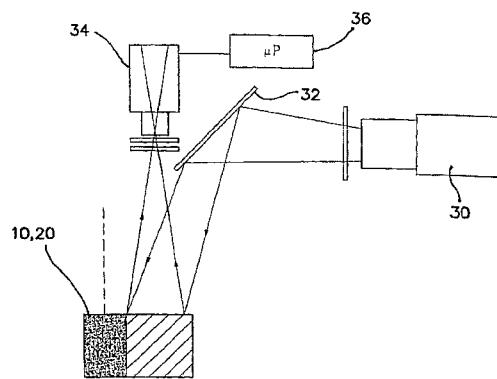
【図9】



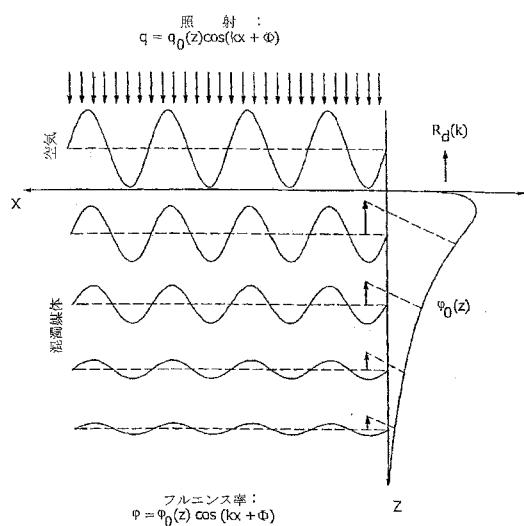
【図 1 1】



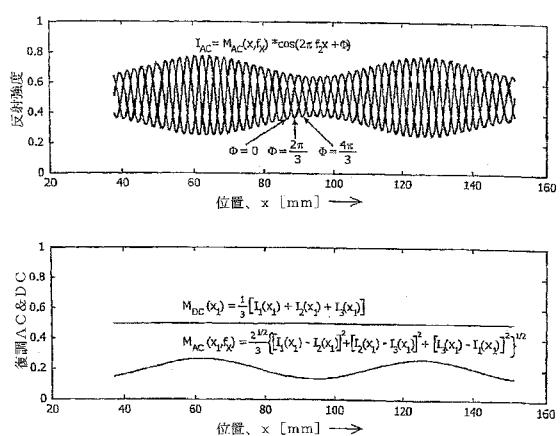
【図 1 2】



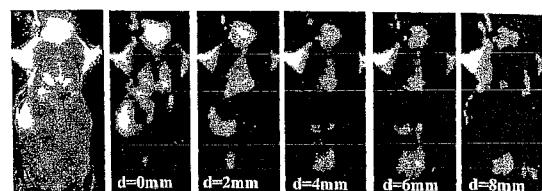
【図 1 3】



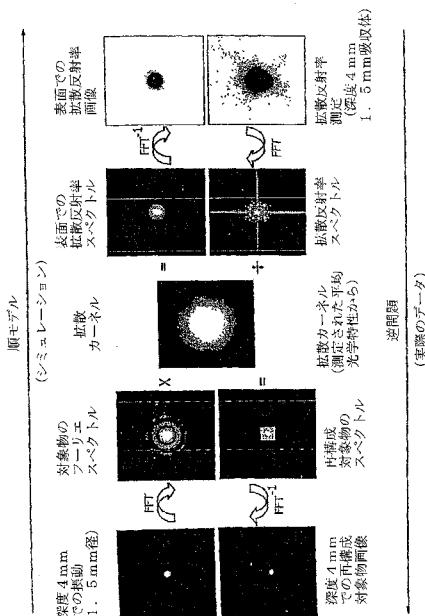
【図 1 4】



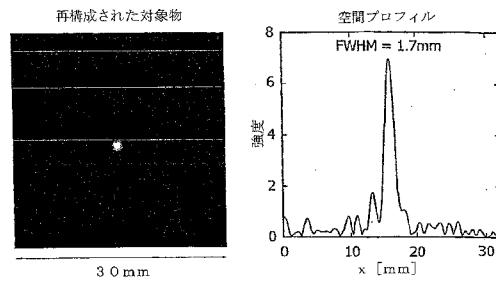
【図 1 5】



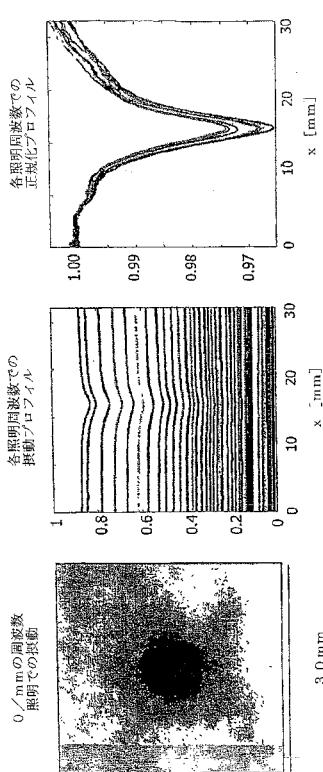
【図16】



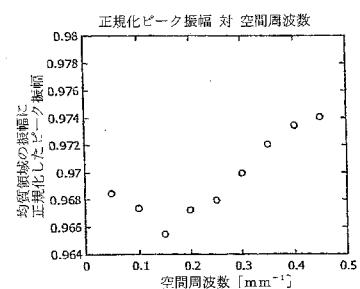
【図17】



【図18】



【図19】



【国際調査報告】

60700820009



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US06/02165

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC(8) - G01N 21/55 (2007.01)  
 USPC - 356/445

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(8) - A61B 5/00, 6/00; G01N 21/55 (2007.01)  
 USPC - class 250; 356/445; 600/473, 477

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 MicroPatent, GOOGLEPATENTS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,321,111 B1 (PERELMAN et al) 20 November 2001 (20.11.2001) entire document	38-39, 42-49, 51-52
Y		1-37
X	US 6,406,069 B1 (ORAEVSKY et al) 11 June 2002 (11.06.2002) entire document	38, 41
X	US 6,122,042 A (WUNDERMAN et al) 19 September 2000 (19.09.2000) entire document	38, 40
Y	US 2003/0184757 A1 (BEVILCQUA et al) 02 October 2003 (02.10.2003) entire document	1-37
Y	US 6,208,886 B1 (ALFANO et al) 27 March 2001 (27.03.2001) entire document	17-23
A	US 5,886,754 A (SEVICK-MURACA et al) 02 February 1999 (02.02.1999) entire document	1-53
A	US 6,825,928 B2 (LIU et al) 30 November 2004 (30.11.2004) entire document	1-53

Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 April 2007	13 AUG 2007
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4260 PCT QSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

13.12.2007

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,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,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ダーキン , アンソニー , ジェイ .

アメリカ合衆国 92626 カリフォルニア州 コスタメーサ メサバードドライブイースト  
2775 アパートH105

(72)発明者 クッチャ , デイビッド

アメリカ合衆国 92660 カリフォルニア州 ニューポートビーチ ネイブルズ 2442

(72)発明者 ベヴィラカ , フレデリック

フランス F - 75001 パリ リュベルジェ 12

F ターム(参考) 2G043 AA03 EA01 FA01 FA02 FA06 HA02 LA03

专利名称(译)	用于高分辨率空间调制荧光成像和断层摄影的方法和设备		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008537995A</a>	公开(公告)日	2008-10-02
申请号	JP2007552306	申请日	2006-01-20
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
[标]发明人	トロンバーグブルースジェイ ダーキンアンソニージェイ クッチャディビッド ベヴィラカフレデリック		
发明人	トロンバーグ, ブルース, ジェイ. ダーキン, アンソニー, ジェイ. クッチャ, ディビッド ベヴィラカ, フレデリック		
IPC分类号	G01N21/64 A61B10/00		
CPC分类号	G01N21/4795 A61B5/0071 A61B5/0073 A61B5/0091 A61B5/7257 A61B5/726 G01N21/6456 G01N2021/6417 G01N2021/6423 G01N2021/6491		
FI分类号	G01N21/64.Z A61B10/00.E		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/EA01 2G043/FA01 2G043/FA02 2G043/FA06 2G043/HA02 2G043/LA03		
优先权	60/645430 2005-01-20 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

用于在诸如人或动物组织的混浊介质中执行深度剖面反射或透射成像的定量调制成像的方法的改进涉及在暴露混浊介质时优选地利用荧光激发波长编码周期性照射图案的步骤。周期性模式，以提供混浊介质内结构的深度分辨率;并在混浊介质中重建结构的非接触三维图像。因此，宽场成像，平均背景光学特性与单一图像中的非均匀性成分分离，基于照明空间频率选择的表面特征与深部特征的分离，或定性和定量结构，功能和成分信息从空间编码数据中提取。

