(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2005-522293
(P2005-522293A)
(43)公表日　平成17年7月28日(2005.7.28)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
A61B 1/00	A61B 1/00	300D	2G043
G01N 21/65	G01N 21/65		4C061

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 116 頁）

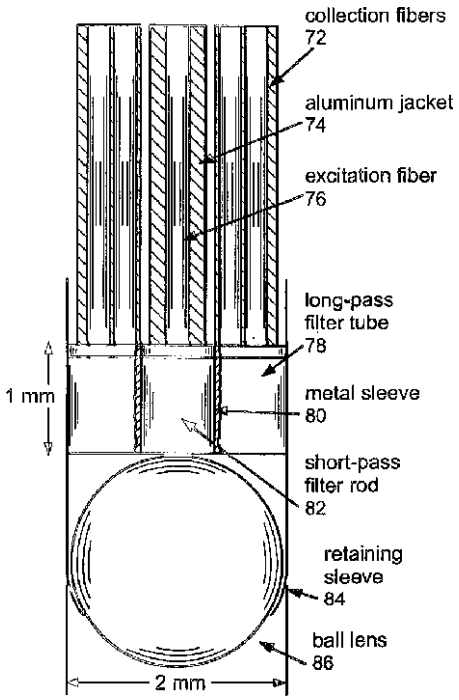
(21)出願番号	特願2003-584690 (P2003-584690)
(86)(22)出願日	平成15年4月4日 (2003.4.4)
(85)翻訳文提出日	平成16年10月5日 (2004.10.5)
(86)国際出願番号	PCT/US2003/010307
(87)国際公開番号	WO2003/087793
(87)国際公開日	平成15年10月23日 (2003.10.23)
(31)優先権主張番号	60/370,197
(32)優先日	平成14年4月5日 (2002.4.5)
(33)優先権主張国	米国 (US)
(31)優先権主張番号	10/178,062
(32)優先日	平成14年6月21日 (2002.6.21)
(33)優先権主張国	米国 (US)

(71)出願人　591275056
マサチユセツツ・インスチチユート・オブ・テクノロジイ
ＭＡＳＳＡＣＨＵＳＥＴＴＳ　ＩＮＳＴＩＴＵＴＥ　ＯＦ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ
アメリカ合衆国マサチユセツツ州０２１３９・ケンブリツジ・マサチユセツツアベニユー７７
(74)代理人　100060782
弁理士　小田島　平吉
(72)発明者　モツツ，ジエイソン・テイ
アメリカ合衆国マサチユセツツ州０２１４０ケンブリツジ・アパートメント５・ダベンポートストリート１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】生物学的組織の分光法のための系および方法

(57)【要約】
組織測定用の系は２mm若しくはそれ未満の直径を有する光ファイバープローブを包含する。この小直径は、該系が最小限の外傷を伴い冠動脈疾患若しくは他の小管腔または軟組織の診断に使用されることを可能にする。送達光ファイバーが光源の近位端に接続されるプローブに包含される。送達ファイバー用フィルターが遠位端に包含される。該系は、組織からのラマン散乱放射を収集するプローブ中の収集光ファイバー（１本若しくは複数）を包含し、該収集光ファイバーは近位端で検出器に接続される。第二のファイバーは収集ファイバーの遠位端に配置される。送達ファイバーに接続された送達導波管、収集ファイバーに接続された収集導波管およびレンズを包含する光学レンズ系がプローブの遠位端に配置される。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
近位端および遠位端を有する光ファイバープローブ；
近位端で光源に接続されかつ遠位端に第一のフィルターを有するプローブ中の送達光ファイバー；
近位端で検出器に接続されかつ遠位端に第二のフィルターを有する、組織からのラマン散乱光を収集するプローブ中の収集光ファイバー；ならびに
送達ファイバーに接続された送達導波管および収集ファイバーに接続された収集導波管を包含するプローブの遠位端の光学系
を含んでなる組織測定用プローブ。
【請求項２】
送達導波管がロッドを含んでなりかつ収集導波管がロッドの周囲に同心円状である円筒形チューブを含んでなる、請求項１に記載のプローブ。
【請求項３】
レンズが送達ファイバーおよび収集ファイバーに光学的に接続されたボールレンズを含んでなる、請求項１に記載のプローブ。
【請求項４】
送達導波管を収集導波管から光学的に隔離するスリーブをさらに含んでなる、請求項１に記載のプローブ。
【請求項５】
送達ファイバーの周囲に第一の半径で同心円状に配置された第一の複数の収集ファイバー、および送達ファイバーの周囲に第一の半径より大きい第二の半径で同心円状に配置された第二の複数の収集ファイバーをさらに含んでなる、請求項１に記載のプローブ。
【請求項６】
２秒未満である収集時間をゲートする制御装置をさらに含んでなる、請求項１に記載のプローブ。
【請求項７】
光学系が１０ｍｍ未満の長さを有する、請求項１に記載のプローブ。
【請求項８】
光学系が４ｍｍ未満の長さを有する、請求項１に記載のプローブ。
【請求項９】
光源が７５０ｎｍより長い波長を有する、請求項１に記載のプローブ。
【請求項１０】
光学系が放射状方向の光を送達かつ収集する、請求項１に記載のプローブ。
【請求項１１】
プローブが心組織のスペクトルの特徴を測定する、請求項１に記載のプローブ。
【請求項１２】
遠位端が２ｍｍ若しくはそれ未満の直径を有する、請求項１に記載のプローブ。
【請求項１３】
送達光ファイバーの近位端に光学的に接続されている光源をさらに含んでなる、請求項１に記載のプローブ。
【請求項１４】
光学系が屈折光学素子を含んでなる、請求項１に記載のプローブ。
【請求項１５】
光学系が反射光学素子を含んでなる、請求項１に記載のプローブ。
【請求項１６】
光学系がボールレンズの一部分を含んでなる、請求項１に記載のプローブ。
【請求項１７】
プローブが挿入されるチャンネルを有する内視鏡をさらに含んでなる、請求項１に記載のプローブ。

【請求項１８】
近位端、遠位端を有する光ファイバープローブ；
遠位端に第一のフィルターを有する、遠位端に放射を送達するための光源に近位端で接続されたプローブ中の送達光ファイバー；
近位端で検出器系に接続され、遠位端に第二のフィルターを有する、組織からのラマン散乱放射を収集するプローブ中の収集光ファイバー；ならびに
送達光ファイバーに接続された送達導波管ならびに収集光ファイバーおよびレンズ系に接続された収集導波管を包含するプローブの遠位端の光学レンズ系
を含んでなる、組織測定用の分光学的診断系。
【請求項１９】
送達導波管がロッドを含んでなりかつ収集導波管がロッドの周囲に同心円状である円筒形チューブを含んでなる、請求項１８に記載の分光学的診断系。
【請求項２０】
送達導波管が第一の円筒形チューブを含んでなりかつ収集導波管が第一の円筒形チューブの周囲に同心円状である第二の円筒形チューブを含んでなる、請求項１８に記載の分光学的診断系。
【請求項２１】
レンズ系が、送達光ファイバーおよび収集光ファイバーに光学的に接続された楕円形アキシコンを含んでなる、請求項１８に記載の分光学的診断系。
【請求項２２】
送達導波管を収集導波管から光学的に隔離するスリーブをさらに含んでなる、請求項１８に記載の分光学的診断系。
【請求項２３】
送達ファイバーの周囲に第一の半径で同心円状に配置された第一の複数の収集ファイバー、および送達ファイバーの周囲に第一の半径より大きい第二の半径で同心円状に配置された第二の複数の収集ファイバーをさらに含んでなる、請求項１８に記載の分光学的診断系。
【請求項２４】
周囲の画像を生成させる、請求項１８に記載の分光学的診断系。
【請求項２５】
２秒未満である収集時間をゲートする制御装置をさらに含んでなる、請求項１８に記載の分光学的診断系。
【請求項２６】
光学レンズ系が１０ｍｍ未満の長さを有する、請求項１８に記載の分光学的診断系。
【請求項２７】
光学レンズ系が４ｍｍ未満の長さを有する、請求項１８に記載の分光学的診断系。
【請求項２８】
光源が７５０ｎｍより長い波長を有する、請求項１８に記載の分光学的診断系。
【請求項２９】
光学レンズ系が放射を放射状方向で送達かつ収集する、請求項１８に記載の分光学的診断系。
【請求項３０】
近位端および遠位端を有する光ファイバープローブ；
光源の近位端に接続されかつ遠位端に第一のフィルターを有するプローブ中の最低１本の送達光ファイバー；
検出器の近位端に接続されかつ遠位端に第二のフィルターを有する、組織からのラマン散乱放射を収集するプローブ中の最低１本の収集光ファイバー；ならびに
送達光ファイバーに接続された送達導波管、収集光ファイバーに接続された収集導波管、ならびに反射および屈折光学素子の一つを包含するプローブの遠位端の光学系
を含んでなる、測定用の分光学的カテーテル系。

【請求項３１】
光ファイバープローブの周囲に配置された膨張可能なバルーンをさらに含んでなる、請求項３０に記載の分光学的カテーテル系。
【請求項３２】
バルーンを膨張させるためのチャンネルをさらに含んでなる、請求項３０に記載の分光学的カテーテル系。
【請求項３３】
送達導波管がロッドを含んでなりかつ収集導波管がロッドの周囲で同心円状である円筒形チューブを含んでなる、請求項３０に記載の分光学的カテーテル系。
【請求項３４】
送達導波管が第一の円筒形チューブを含んでなりかつ収集導波管が第一の円筒形チューブの周囲で同心円状である第二の円筒形チューブを含んでなる、請求項３０に記載の分光学的カテーテル系。
【請求項３５】
光学素子が、送達光ファイバーおよび収集光ファイバーに光学的に接続された楕円形アキシコンを含んでなる、請求項３０に記載の分光学的カテーテル系。
【請求項３６】
送達導波管を収集導波管から光学的に隔離するスリーブをさらに含んでなる、請求項３０に記載の分光学的カテーテル系。
【請求項３７】
送達ファイバーの周囲に第一の半径で同心円状に配置された第一の複数の収集ファイバー、および送達ファイバーの周囲に第一の半径より大きい第二の半径で同心円状に配置された第二の複数の収集ファイバーをさらに含んでなる、請求項３０に記載の分光学的カテーテル系。
【請求項３８】
周囲の画像を生成させる、請求項３０に記載の分光学的カテーテル系。
【請求項３９】
光学素子が、送達光ファイバーおよび収集光ファイバーに光学的に接続されたボールレンズを含んでなる、請求項３０に記載の分光学的カテーテル系。
【請求項４０】
２秒未満である収集時間をゲートする制御装置をさらに含んでなる、請求項３０に記載の分光学的カテーテル系。
【請求項４１】
近位端、遠位端、近位端で光源に接続されかつ遠位端に第一のフィルターを有するプローブ中の最低１本の送達光ファイバー、および近位端で検出器に接続されかつ遠位端に第二のフィルターを有するサンプルからのラマン散乱放射を収集するプローブ中の最低１本の収集光ファイバーを有する光ファイバープローブを提供すること；そして
送達光ファイバーに接続された送達導波管および収集光ファイバーに接続された収集導波管を包含するプローブの遠位端の光学系を用いてサンプルからの光を収集すること
を含んでなる、サンプルの測定方法。
【請求項４２】
光ファイバープローブの周囲に配置されたバルーンを膨張させることをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
プローブ中のチャンネルを通してバルーンを膨張させることをさらに含んでなる、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
ロッドを含んでなる送達導波管を提供すること、およびロッドの周囲で同心円状である円筒形チューブを含んでなる収集導波管を提供することをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。

【請求項４５】
第一の円筒形チューブを提供すること、および第一の円筒形チューブの周囲で同心円状である第二の円筒形チューブを含んでなる収集導波管を提供することをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項４６】
送達光ファイバーおよび収集光ファイバーに光学的に接続された楕円形アキシコンを包含する光学素子を提供することをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項４７】
送達導波管を収集導波管から光学的に隔離するスリーブを提供することをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項４８】
送達ファイバーの周囲に第一の半径で同心円状に配置された第一の複数の収集ファイバー、および送達ファイバーの周囲に第一の半径より大きい第二の半径で同心円状に配置された第二の複数の収集ファイバーを提供することをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項４９】
周囲の画像を生成させることをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項５０】
送達光ファイバーおよび収集光ファイバーに光学的に接続されているボールレンズを用いて光を伝播させることをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項５１】
２秒未満である収集時間を制御することをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項５２】
プローブの遠位端を回転させて光を複数の方向で放射状に向けることをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項５３】
組織からのラマンデータの処理方法をさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項５４】
癌組織を診断するためにデータを処理することをさらに含んでなる、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
スペクトルデータのリアルタイムｉｎ　ｖｉｖｏ解析を実施することをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項５６】
６５ミクロン未満の厚さを有する動脈の線維性被膜を検出することをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項５７】
脂質プール、炎症細胞、泡沫細胞若しくは血栓を検出することをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項５８】
１．５ｍｍ若しくはそれ未満の直径を有するプローブを用いて検出することをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項５９】
体腔若しくは動脈中にプローブを挿入すること、およびプローブを抜去する際にプローブを回転させて該体腔若しくは動脈を走査することをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項６０】
乳房組織を診断することをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項６１】

針を通してプローブを挿入することをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項６２】
プローブの遠位端の鏡上にハーフボールレンズを提供することをさらに含んでなる、請求項４１に記載の方法。
【請求項６３】
近位端で光源に接続されかつ第一のフィルターを有する送達路；
分配要素および検出器を包含する検出器系に近位端で接続されかつ第二のフィルターを有する、組織からのラマン散乱光を収集する収集路、ならびに
検出器系からのラマンスペクトルデータを処理するデータプロセッサ
を含んでなる、組織測定用の顕微鏡系。
【請求項６４】
電荷結合素子センサーをさらに含んでなる請求項６３に記載の系。
【請求項６５】
データプロセッサが複数の組織成分の存在を決定する、請求項６３に記載の系。
【請求項６６】
ＣＣＤカメラをさらに含んでなる請求項６３に記載の系。
【請求項６７】
レーザー光源、シャッターおよび検出器を制御する制御装置をさらに含んでなる、請求項６３に記載の系。
【請求項６８】
４００～２０００ｃｍ$^{-1}$の範囲のラマンシグナルを検出することをさらに含んでなる、請求項４１に記載の系。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は全体として若しくは部分的に国立保健研究所（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ）からの助成金第Ｐ４１－ＲＲ－０２５９４号および同第Ｒ０１－ＨＬ－６４６７５号により援助された。米国政府は本発明においてある種の権利を有する。
【０００２】
本出願は、２００２年４月５日出願の米国仮出願第６０／３７０，１９７号明細書の利益を主張する２００２年６月２１日出願の米国一部継続出願第１０／１７８，０６２号明細書の一部継続出願である。上の出願の内容全体はそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００３】
光学的方法は疾患の検出にますます使用されている。とりわけ近赤外ラマン分光法はその化学的特異性の故に疾患の診断および疾患の進行の研究の双方に有用なツールであることが判明してきている。過去１０年にわたり、ラマン分光法は、多くの疾患および生物学的問題に適用され、また、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで大きな進歩がなされた。より最近、ｉｎ　ｖｉｖｏ研究の報告が存在しているが、それらはしかしながら、皮膚若しくは他の容易に到達可能な器官の研究に限られているか、または実際の臨床使用に対し理屈にあわないほど長い収集時間を必要とする光ファイバー構成を使用しているかのいずれかである。応用の大多数は光ファイバーを介する遠隔サンプリングを必要とし、また、プローブおよびファイバー束の大きさは応用により厳格に制限されている。現在の商業的系が提供できない特定の一例は、血管造影カテーテルによりリアルタイムでｉｎ　ｖｉｖｏのアテローム硬化性病変を評価して従って各個々の症例での最も適切な処置の指図において心臓専門医を補助する能力である。これらの目的は現在の系により満たされていない。
【０００４】
加えて、ファイバーのスペクトルバックグラウンドのいくつかの異なるフィルタリング

方法を使用する遠隔ラマン検知のための従来技術のプローブは、極めて低い光学的スループットを表すか若しくは血管内で使用するには嵩高過ぎるかのいずれかである。従来技術の設計での一問題は、冠動脈に到達するための経皮カテーテル中へのそれらの組み込みを妨げる４ｃｍ長の剛性先端を有することを包含する。第二に、これらのプローブを用いて収集したデータにおいて、ファイバーのラマンスペクトルのかなりの構成部分がなお留まっている。さらに、許容できるＳ／Ｎ比（ＳＮＲ）をもつシグナルの収集のために、３０秒若しくはより長い次数のデータ収集時間が典型的に必要とされる。

【０００５】

例えば、医学における応用向けに大きさを決められかつ組織からの改良されたスペクトルシグネチャ（ｓｉｇｎａｔｕｒｅ）を提供するラマン分光法のためのプローブを包含する改良された系および方法に対する必要性がなお存在する。

【発明の開示】

【０００６】

本発明の系および方法は、血管疾患若しくは癌のような組織状態の診断のため分光学、例えばラマン分光学的方法を使用することに関する。本発明の系および方法はいくつかの応用、すなわち乳管内視鏡検査による光学的乳房生検および乳房分析、経皮的血液分析およびモニタリング、血管狭窄、胃腸癌の評価、膵管中の異形成に対する走査ならびに皮膚分析を有する。

【０００７】

本発明の好ましい一態様によれば、組織測定用の系は、近位端、遠位端および２ｍｍ若しくはそれ未満の直径を有する光ファイバープローブを包含する。この小さい直径は、最小限の外傷を伴う冠動脈疾患または他の小管腔若しくは軟組織の診断に本系が使用されることを可能にする。送達光ファイバー（１本若しくは複数）は近位端で光源に接続されたプローブ中に包含される。送達ファイバーのフィルターは遠位端に包含される。該系は、組織からのラマン散乱放射を収集するプローブ中の収集光ファイバー（１本若しくは複数）を包含し、該収集光ファイバーは近位端で検出器に接続される。第二のフィルターは収集ファイバーの遠位端に配置される。送達ファイバーに接続された送達導波管、収集光ファイバーに接続された収集導波管およびレンズを包含する光学レンズ系がプローブの遠位端に配置される。

【０００８】

送達導波管はロッドを含んでなりかつ収集導波管はロッドの周囲で同心円状である円筒形チューブを含んでなる。代替の好ましい一態様において、送達導波管は第一のチューブを含んでなりかつ収集導波管は第一のチューブの周囲で同心円状である第二の円筒形チューブを含んでなる。さらに、レンズは送達ファイバーおよび収集ファイバーに光学的に接続されたボールレンズを包含する。

【０００９】

好ましい一態様において、該プローブは、送達導波管を収集導波管から光学的に隔離するスリーブをさらに含んでなる。該スリーブはパラジウム、銀若しくは金のような金属であり得る。ガラス製ロッドチューブおよびスリーブは接着剤で一緒に取り付け得る。外側の保持スリーブは遠位光学系を光ファイバーに取付け得る。

【００１０】

該プローブはさらに、送達ファイバーの周囲に第一の半径で同心円状に配置された第一の複数の収集ファイバー、および送達ファイバーの周囲に第一の半径より大きい第二の半径で同心円状に配置された第二の複数の収集ファイバーを含んでなる。

【００１１】

本発明の別の局面によれば、該プローブは２秒未満である収集時間をゲートする制御装置を包含する。一態様において光学レンズ系は１０ｍｍ未満の長さを有する。好ましい一態様において光学レンズ系は４ｍｍ未満の長さを有する。遠位光学系の直径は好ましくは１～２ｍｍの範囲にある。該光学レンズ系は放射状方向（いずれかの軸外方向と定義し得る）の放射を送達かつ収集する。光源は７５０ｍｍより長い波長を有し、好ましい一態様

は８３０ｎｍで発射するアルゴンレーザーポンピングＴｉ：サファイアレーザーを使用する。代替の一態様において、７８５ｎｍ若しくは８３０ｎｍで発射するＩｎＧａＡｓレーザーのようなダイオードレーザーを使用してもよい。

【００１２】

好ましい一態様において、アテローム硬化症の診断における使用のための本発明の放射状ラマンプローブは、例えば血管造影に使用される型のカテーテルに組み込まれる。それは血液および他の液体と入れ換わりかつカテーテルを動脈中に配置するためのバルーンを包含する。好ましい一態様はバルーン膨張のためのチャンネルを包含する。さらに、該カテーテル系は血液を一時的に液体、例えば生理的食塩水で洗い流すための能力を包含する。側に若しくは４５°から９０°の範囲にわたる角度でのいずれかで放射状方向に励起光を向けるように１若しくは数本の光ファイバーを構成し得る。こうした一態様において、側に配置されたバルーンを使用してファイバーを動脈壁に隣接して接触させ、そして血液若しくは他の介在する液体を立ち退かす。

【００１３】

あるいは、送達ファイバーは、プローブの軸に対してある角度の円形パターンに光を向けるように配置し得る。多様な収集ファイバーが、照明される周囲領域の多様な部分から同時に光を収集する。本態様において、該プローブは、光送達および／若しくは収集前に膨張されて血液および他の液体と入れ換わる膨張可能なバルーン中に囲まれる。好ましい態様において、バルーンは例えば血管造影のような動脈の応用で使用される型のものであり、そして、励起光を動脈壁まで通過させかつ動脈壁で生成されたラマン光にバルーンを通過させて収集ファイバーに戻らせるように薄い素材で作成される。

【００１４】

本発明は、ラマン分光法を使用するそれらの形態学的組成の定量的評価によるヒト冠動脈中のアテローム硬化性斑の診断的分類を包含する。ラマン分光法の迅速かつ非破壊的性質は、光ファイバー技術を使用して臨床の情況で応用される場合に冠動脈斑をｉｎ　ｖｉｖｏで診断する機会を提供する。そのように使用されれば、本発明の好ましい態様はアテローム硬化性病変を分類し、そして斑の不安定性および疾患の進行の程度を評価するのに使用しうる泡沫細胞（ＦＣ）、壊死中心（ＮＣ）およびコレステロール結晶（ＣＣ）の存在のようなその形態学的特徴、ならびにそれにより血栓症および急性斑出血のような生命を脅かす合併症の危険のｉｎ　ｖｉｖｏの定量的評価を提供し得る。そのように使用されれば、本発明の方法は、アテローム硬化性病変の進展における今までのところは十分に理解されていないダイナミクスならびに脂質低下および他の治療法の効果への洞察を提供しうる。

【００１５】

解剖学（狭窄の程度）よりもむしろ化学的組成および形態学がアテローム硬化性斑の不安定性を決定しかつ疾患の進行を予測する。好ましい一態様において、ラマン分光法の参照データの改変もまた、斑を含んでなる微視的形態学的構造を同定するのに使用し得、また、巨視的動脈ラマンスペクトルに対するこれらの微視的形態学的構造の相対的寄与に基づく診断アルゴリズムを使用して、動脈の病理学的状態を正確に評価し得る。

【００１６】

好ましい一態様において、主成分分析（ＰＣＡ）および化学物質参照データを使用する以前の研究との比較に８種のアテローム硬化症の分類を使用する。これら８分類を３分類まで減少させる。病理学的検査に際して、ＦＣ、ＮＣおよびＣＣの存在は斑の不安定性および疾患の進行の重要な予測因子である。本発明の態様は、これらの同一の形態学的構造のラマン分光学的解析が、顕微鏡検査に対する必要性を伴わずに無傷の冠動脈中のアテローム硬化性病変を診断するのに使用し得ることを示す。これは、ラマン分光法が、量的な化学的情報のみならずしかしまた血管内超音波（ＩＶＵＳ）、磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）および血管造影法のような現在の診断的画像化技術で容易に入手可能でないＣＣの存在のようなアテローム硬化性病変の組成に関する量的な形態学的情報もまた提供し得ることを示唆する。

【００１７】
好ましい一態様において、正常およびアテローム硬化性動脈組織のｉｎ　ｓｉｔｕの細胞および細胞外の形態学的成分のスペクトルのシグネチャを、共焦点ラマン顕微鏡検査を使用して測定する。特異的な形態学的構造は、正常な動脈の構造（例えば弾性板）中でのそれらの役割および／若しくはアテローム硬化性斑形成（例えば泡沫細胞、壊死中心、コレステロール結晶）により選択される。１２種の生化学的成分の基礎スペクトルの一次結合の最小二乗法最小化は、多様な形態学的構造の生化学的組成に関する情報を提供する。これらの生化学的成分は、それらが正常動脈組織および／若しくはアテローム硬化性斑中で高濃度で存在することが既知であった（例えばコラーゲン、エラスチン、ならびに遊離およびエステル化コレステロール）ため、またはそれらが強いラマン散乱体である（例えばβ－カロチン）ために選択される。動脈の乾燥重量の３％に寄与しうるグリコサミノグリカン（例えばヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸およびヘパラン硫酸）は、おそらくそれらが弱いラマン散乱体であり（すなわちそれらは小ラマン断面を有し）かつ参照データから排除されたため、生化学的モデルおよび参照データのフィットに有意に寄与しなかった。

【００１８】
本発明の態様はラマンスペクトルを形態学に関して解釈する。例えば、ラマンスペクトルは形態学的構造、例えば特定の化合物と関連し得る泡沫細胞と関連付けることができる。さらに、例えば多数の化学物質スペクトルから形態学的構造と関連するわずか８種の独特のスペクトルまでスペクトルの数を減少させてそれによりフィット（ｆｉｔ）の誤差を減少させ得る。本発明の光ファイバーカテーテル系を使用して脆弱な斑を同定かつモニターするのに利用可能である診断法は、化学的組成、形態学的構造、内膜層の肥厚化および上にかぶさるコラーゲン層の薄化についての情報の使用を包含する。好ましい態様はコラーゲンの割合を測定することによるコラーゲンの深さの決定を包含する。さらに、石灰化の存在をモニターし、また、いかなる縁も潜在的破裂および血餅の指標として同定かつコラーゲンに関して位置を突き止める。さらに、非石灰化斑中のコラーゲン線維の減少した部分的な（ｆｒａｃｔｉｏｎａｌ）フィットの寄与率は、低下した斑安定性の表示である。

【００１９】
ｉｎ　ｖｉｖｏの生物学的組織の分光法のための系および方法の前述のおよび他の特徴および利点は、付随する図面に具体的に説明されるところの該系および方法の好ましい態様の以下のより具体的な記述から明らかであろう。図面において、同様の参照文字は異なる図面を通じて同一の部品を指す。図面は必ずしも一定の率で縮尺／拡大しておらず、代わりに本発明の原理の具体的説明に力点を置いている。

［発明の詳細な説明］
本発明は組織のラマン分光法を使用するための系および方法に向けられる。適切な処置の指図において心臓専門医を補助するための血管造影カテーテルを使用するｉｎ　ｖｉｖｏの応用のための系および方法を開発するための属性は、ｉｎ　ｖｉｖｏ組織に低エネルギーレーザー光を送達しかつそれからの生じるラマンスペクトルシグネチャを効率的に収集することが可能なラマン分光法のための光ファイバープローブの開発である。好ましい態様のプローブは小型でありかつ微小光学の設計原理を使用する。

【００２０】
組織の診断および処置のためのラマン分光法の実施方法は、１９９７年４月１日交付の米国特許第５，６１５，６７３号明細書、１９９４年４月１９日交付の米国特許第５，３０４，１７３号明細書、１９９２年９月３日公開の国際特許出願第ＷＯ　９２／１５００８号明細書および１９９６年１０月３日公開の国際特許出願第ＷＯ　９６／２９９２５号明細書（全部の参考文献の教示全体は引用することにより本明細書に組み込まれる）に記述されている。

【００２１】
こうしたプローブの製造において克服されるべき少なくとも２つの困難が存在する。第

一のものは送達および収集ファイバーそれら自身中で生成されるスペクトルのバックグラウンドシグナルにより、それらは検査されている組織部位からのシグナルより１桁より大きいことがある。このバックグラウンドシグナルは、フューズドシリカコアからのラマン光、不純物および特定の開口数（ＮＡ）のファイバーを設計するのに使用されるドーパントからの蛍光、ならびに多様なジャケット素材からのシグナルを包含する。送達ファイバーからのレーザー光は、典型的には３ないし４メートルのファイバー中を横切る長い光路長により強いファイバーのバックグラウンドを生成させる。このファイバースペクトルは組織表面から散乱されかつ収集ファイバーにより組織のラマンスペクトルと一緒に収集され、しばしば、組織中への光の比較的短い透過によりわずかおよそ１ｍｍのサンプルから生成される組織のラマンシグナルを遮蔽する。

【００２２】

加えて、組織から後方散乱されるレーザー光もまた収集ファイバーにより収集され、そしてこの散乱されたレーザー光は収集ファイバー中で発する付加的なファイバースペクトルを生じさせ、それは検出器に達する組織のスペクトルの質をさらに損なう。目的のスペクトルを不鮮明にしかつ歪ませることに加え、強いファイバーのバックグラウンドはシグナルにあるレベルのショートノイズを付加し、そしてこのノイズはしばしば組織のラマンバンドより大きくなり得る。送達および収集ファイバー双方を解析することは、それら双方がほぼ等しい量のこのファイバースペクトルのバックグラウンドを生じさせることを示す。好ましい一態様において、２種の異なるフィルター（一方は送達向けおよび一方は収集向け）を使用して、望ましくないファイバーのバックグラウンドを抑制する。さらに、送達ファイバー中で生成されるより長波長のスペクトルのバックグラウンドを遮断しつつレーザー励起光を伝播する短波長通過型若しくは帯域通過フィルターで送達ファイバーを終端させることが望ましい。好ましい一態様において、収集ファイバーは、組織から後方散乱されるレーザー光を遮断しつつ組織のラマンスペクトルを伝播する長波長通過型フィルターすなわちノッチフィルターにより先行され得る。使用されるいかなるフィルターも、それらが接続されるファイバーの許容角度（ＮＡ）に対応するある範囲の角度にわたって適切な機能もまた発揮する。

【００２３】

第二の困難はシグナル収集に関する。これは２成分を有し、その第一のものはラマン効果の固有に弱い性質に関する。１０億の励起光子ごとからおよそただ１個がラマン光子に変換される。好ましい一態様において、ハイスループット光プローブ装置は、臨床上現実的な時間枠で有用であるのに十分なＳ／Ｎ比（ＳＮＲ）でシグナルを収集する。臨床上有用かつ商業的に実現可能であるために、好ましい一態様はおよそ１～２秒で高ＳＮＲスペクトルを収集する。第二の成分もまた、光を大きな面積および角度にわたって広範に拡散させることをもたらす組織中の吸収および散乱によりさらに損なわれる収集の至適化を取り扱う。

【００２４】

好ましい一態様において、光学系の収集能力は、ほぼ収集面積（Ａ）および立体角（Ω）の積（ＡΩ積）により与えられるそのスループットにより制限される。ＡΩ積は系全体で保存される。典型的なラマン分光法の系において、スループットは分光器／ＣＣＤ収集検出系により決定される。好ましい一態様において、分光器は、１６ｍｍの最大スリット高を伴いΩ＝０．２４２ｓｒの立体角に対応するｆ／１．８（ＮＡ＝０．２７８）である。生物学的ラマン分光法に十分なスペクトル分解能を達成するために０．２ｍｍのスリット幅を使用する。従って、最大収集面積はＡ＝３．２ｍｍ^{2}であり、ＡΩ＝０．７７ｍｍ^2－ｓｒの理論的最大スループットをもたらす。好ましい一態様において、輝度がどうあろうとも入射励起光により組織中で生成される有効なラマン光源が至適に収集されることを確実にするためにＣＣＤ検出器を使用する。光は１つの大きな面積および４πの立体角にわたり発射されると考えられるが、しかし、収集角２πにより制限される。従って、収集立体角と面積との間の至適のトレードオフが本発明の好ましい態様において決定される。

【００２５】
好ましい一態様の系において、分光器／ＣＣＤはよりハイスループットの系により置換される。例えば１つのこうした配置は一連のダイクロイックビームスプリッター、フィルターおよびフォトダイオードよりなる。フィルター波長は、最小数の波長で多変量スペクトル解析を至適化するように決定される。検出器要素の波長および帯域幅の正確な数は検知されるべき化学的／形態学的構造のスペクトルの特徴に依存する。こうした系は、従来技術の分光器／ＣＣＤ系よりはるかにより大きなスループットをもたらし、かつ、より小さく、より安価で、そして冷却を必要とせず、嵩高さおよび費用をさらに排除する。

【００２６】
図１Ａおよび１Ｂは、本発明の好ましい一態様のラマン散乱光のそれぞれ放射状および角度の分布についての血液組織の混濁サンプルのラマン発射データの論理、シミュレーションおよび結果の比較を図で具体的に説明する。生物学的組織は類似の細胞およびそれらを取り巻く細胞間物質の集合体である。体内の４種の基本的組織は、上皮組織；血液、骨および軟骨を包含する結合組織；筋組織；ならびに神経組織を包含する。角膜を除く大部分の組織は混濁している。それらが微視的構造およびそれらの中に含有される屈折係数の変動により高度の弾性散乱を表し、そして従ってこうした組織に入る光が大きく拡散されるためである。従って、該サンプルは図１Ａ、１Ｂ、１０Ａ～１０Ｃ、３８Ａ～３８Ｅで混濁サンプルと特徴付けられる。好ましい一態様において、例えばモンテカルロシミュレーションのようなシミュレーションを実施して、励起光およびラマン散乱光双方の空間的および放射状の分布を予測する。好ましい一態様において、放射状の分布は図１Ａに示されるとおりほぼガウス分布である一方、角度の分布は図１Ｂに示されるとおりランバーティアンである。これらのパラメータ、および光学系を通って伝播されている光の面積および立体角の積の変換を包含する光学的スループット定理を使用して、至適の収集面積および角度が決定される。積ＡΩは一定でありかつＡおよびΩの至適の組合せの選択は図１０Ａ～１０Ｃに示されるとおり重要であることが認識されるべきである。好ましい一態様において、およそ０．３５ｍｍの半径および５５°の収集パラメータが血液組織に至適である。動脈組織の至適の収集パラメータはおよそ０．４ｍｍの半径および２０°である。その後に、解析の結果を例えばＺｅｍａｘプログラムのような光学的設計プログラムに取り込んで最大のシグナル収集に適切な光学系を決定する。

【００２７】
図３８Ａは、本発明の好ましい一態様の励起およびラマン散乱光の放射状の分布についての図１Ａに関して記述された血液組織と対照的な動脈組織の混濁サンプルのラマン発射データ１３６０の結果を図で具体的に説明する。曲線１３６２は３種のガウス分布フィットを使用するフィットを具体的に説明する。さらに、図３８Ｂは、本発明の好ましい一態様の励起およびラマン散乱光の角度分布についての動脈組織の混濁サンプルのラマン発射データ１３６０の結果を図で具体的に説明する。血液組織の分布および収集効率を具体的に説明する図１０Ａ～１０Ｃと同様に；図３８Ｃ～３８Ｅは、本発明の好ましい一態様の動脈組織のそれぞれ積分済放射状分布、積分済角度分布および至適化した収集効率の図解である。

【００２８】
光学素子を使用して、組織から収集された光をプローブ中の光ファイバーの遠位端に伝達する。その後、ファイバー束の近位端を分光器の形状、面積およびＮＡと一致するように再成形する。光透過効率を減少させずかつ有効なカップリングを提供するようにこれらの手順に従う。収集ファイバーのＮＡおよび収集ファイバーの直径の選択は、分光計のＮＡ、所望のスペクトル分解能、および光学系の整合の考慮、ならびにフィルター入射角により設定される限界により決定される。系のトレードオフは選ばれた分光器を包含し、また、所望の分解能がスリット幅を決定する。出力端では収集ファイバーが一直線に配置され、これは整合光学系により入口スリット上に画像化される。スループット定理を考慮すれば、収集ファイバーに対する要件は、ファイバーのＮＡおよび直径の積が分光計のＮＡおよびスリット幅の積に等しいことを包含する。ファイバー直径がスリット幅に等しくか

つファイバーのＮＡが分光計のＮＡに等しいという、より強い条件を満足するファイバーを選択する場合は整合光学系を使用する必要性が排除され、そしてプローブが分光計中に直接接続される。積の要件のみが満足され得る場合には整合光学系が必要とされる。代替の一態様において、分光計は湾曲スリットを使用し、そして収集ファイバーの出力端はいかなるスリット形状にも一致するよう改変し得る。収集ファイバーの数の上限は、スリット高若しくはＣＣＤチップのいずれか小さい方より小さいファイバーアレイ画像の高さにより定義される。しかしながら、収集先端中で利用可能な空間により、より小さい限界が設定されるかもしれない。

【００２９】

図２Ａ～２Ｃは、該系の好ましい一態様の冠動脈の形態学的モデルおよび参照のグラフ表示３０、４０、５０である。該研究は斑の安定性および斑の進行の決定で生化学的組成を使用する。形態学的因子は、Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ １０（２００１）６９－８２に発表されたところのＨｅｎｄｒｉｋ Ｐ．Ｂｕｓｃｈｍａｎらによる“Ｒａｍａｎ ｍｉｃｒｏｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｃｏｒｏｎａｒｙ ａｔｈｅｒｏｓｃｌｅｒｏｓｉｓ：Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｓｓｅｓｓｍｅｎｔ ｏｆ ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｄ ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｍｏｒｐｈｏｌｏｇｉｃ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ｉｎ－ｓｉｔｕ”およびＣａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ １０（２００１）５９－６８に発表されたところのＨｅｎｄｒｉｋ Ｐ．Ｂｕｓｃｈｍａｎらによる“Ｄｉａｇｏｎｏｓｉｓ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｃｏｒｏｎａｒｙ ａｔｈｅｒｏｓｃｌｅｒｏｓｉｓ ｂｙ ｍｏｒｐｈｏｌｏｇｙ－ｂａｓｅｄ Ｒａｍａｎ ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ”（それらの完全な教示は引用することにより本明細書に組み込まれる）で論考されている。

【００３０】

図３は、本発明の好ましい一態様の冠動脈のラマン形態計測法のグラフ表示６０である。正常動脈、非石灰化斑を有する動脈および石灰化斑中の多様な状態に対して相対的フィット係数をプロットする。

【００３１】

血管内の応用の好ましい態様により、例えば限定されるものでないが拡散源から収集するように設計された光学的フィルタリングおよび高スループット光学系を挙げることができるパラメータの全部が、先端の直径を増大させること若しくはその可撓性を損なうことなく達成される。多くの従来技術の商業的プローブは７８５ｎｍの励起で使用されるように設計されている。本発明の方法は、７８５ｎｍの励起で組織中で生成される蛍光バックグラウンドが８３０ｎｍの励起で生成されるものより少なくとも４倍より大きいという認識を包含する。７８５ｎｍで稼働させることはより長いデータ取得時間を必要とし、それはｉｎ ｖｉｖｏの応用を禁止する。稼働波長が長くなるほど蛍光バックグラウンドに関して良好になる。好ましい一態様において、８３０ｎｍの使用は、シリコンの帯域ギャップにより支配されるシリコンベースの電荷結合素子（ＣＣＤ）検出器の基礎的な長波長限界（１１００ｎｍ）により支配される。代替の好ましい態様は、適切な検出器技術とともに７８５ｎｍ若しくは１０６４ｎｍの励起光を使用し得る。

【００３２】

本発明の好ましい一態様は、数秒若しくはそれ未満のデータ収集時間を可能にするための、光ファイバーのバックグラウンドを除去し、例えば冠動脈カテーテル留置での使用を助長するために剛性の遠位先端の長さを数ｍｍ未満におよび直径を約２ｍｍに制限し、８３０ｎｍの励起を使用し、そして拡散源からのシグナル収集を最大にする光ファイバーラマンプローブを包含する。

【００３３】

好ましい一態様はロッドおよびチューブの構成を包含し、そこでは光学フィルターモジュールのロッドおよびチューブは個別に被覆され、それは２種の個別のコーティングすなわち励起光をフィルタリングするための中央の１個および収集した光をフィルタリングするための縁の１個を有する単一円板をコーティングすることより容易である。これらの態

様は個々のファイバーを被覆することより好ましい。フィルターは増大された表面積によりより良好に付着し得るためである。加えて、ツートーンの円板は単一円板を被覆することより好ましい。段差若しくは重なる領域を伴わずに滑らかな円形界面をもつ小さな直径上に同心円状コーティングを付着させることが困難であるためである。さらに、３メートルのファイバー長を付着コーティングチャンバーに入れることは困難である。各フィルターは多量の誘電体薄膜を包含し得る。こうした薄膜フィルターはＲｅｓｅａｒｃｈ Ｅｌｅｃｔｔｒｏ－Ｏｐｔｉｃｓ Ｉｎｃ，コロラド州ボールダーにより二次加工され得る。

【００３４】

図４Ａ～４Ｂはラマンプローブを包含する好ましい一態様の装置のそれぞれ長軸方向および横断面図である。装置７０は、送達および収集ファイバー中のファイバーのラマンバックグラウンドを最小にしかつ好ましくは排除するための２片の多（例えば二）波長の微小光学誘電体フィルターモジュールを包含する。このモジュールは、チューブの１平面上に収集誘電体コーティングを運搬するチューブ７８中に嵌合された、１平面上に励起誘電体フィルターコーティングを運搬するロッド８２よりなる。ロッドおよびチューブは、集成前にそれらのそれぞれのフィルターで個別に被覆されているサファイア若しくはフューズドシリカのいずれかから製造される態様で使用される。ロッドは構成部品間の至適の隔離を提供するように金属の薄いシート８０で包まれ若しくは被覆される。その後、該モジュールを、プローブの遠位端に、ファイバー束と例えばボールレンズのようなレンズ８６を有する光線を平行にするためのレンズ系との間に配置する。レンズは励起および収集領域に効果的に重なる大きな角度かつ大きな面積から光を収集する。ボールレンズはＥｄｍｕｎｄ Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ Ｏｐｔｉｃｓ、ニュージャージー州により二次加工かつ供給される。好ましい一態様において、抗反射コーティングで被覆されかつ適切な角度の許容度指数例えば１．７７を有するサファイアレンズは、ＭＫ Ｐｈｏｔｏｎｉｃｓ、ニューメキシコ州アルバカーキにより二次加工される。このスケールの高品質干渉フィルターを得ることは高価であるとは言え、フィルターの費用は被覆される片の数に依存せず、従って、一度に多くのフィルターを被覆してそれにより各プローブの組立費用を低下させることが可能である。さらに、付加的なコーティング作業により多様な応用のためのより小さな直径のプローブを創製するようにフィルターの大きさを調節し得る。好ましい一態様において、ファイバーとの適正なレジストレーションのために、フィルターをサファイア若しくはクォーツ製のロッドおよびチューブに付着させる。

【００３５】

図４Ｃおよび４Ｄは、レンズ系に付着された放物面状鏡を有する代替の好ましい一態様のそれぞれ長軸方向図および横断面図である。収集角は０ないしおよそ５５°の範囲にあることができ、およそ１ｍｍの収集直径を伴う。放物面状鏡はより広範な角度およびより大きな面積から光を収集する。

【００３６】

これらのフィルターを組み込む励起および収集ファイバーの透過特性を図５に示し、ここで$0\,cm^{-1}$＝８３０ｎｍである。

【００３７】

好ましい態様により、ファイバー直径および開口数（ＮＡ）の選択は、以下の考慮、例えばファイバーのラマンシグナル（望ましくないバックグラウンドを生じさせる）がＮＡの二乗に比例しかつファイバー直径に依存しないこと、低いＮＡがより良好であること、および直径は影響を有しないことにより支配される。

【００３８】

励起ファイバーについてはより低いＮＡのファイバーを使用することが有用であるが、しかしながら、それと論争する論点が存在する。入力端で、それはファイバー中へのエネルギーのカップリングをより困難にする。好ましい一態様において、低ビーム発散を伴うレーザーで励起する場合、ファイバーおよび整合光学系の取付における理にかなった注意がこの問題を回避する。出力端ではビームはより制限される。これはファイバーの構成をより単純かつより効率的にするが、しかし、より小さい面積（スポット）に入射ビームの

出力を限定することにより組織損傷の可能性を最小にするためにより大きな面積を照明することもまた重要であり得る。しかしながら、組織上に入射するより小さい直径のレーザー励起光スポットさえ、前述の弾性散乱の混濁性によりより大きな面積（典型的には１／２～１ｍｍ直径）を包含するよう広がり、従ってこの考慮を緩和する。好ましい一態様において、より大きな直径のファイバー若しくは分配された多数のより小さなファイバーを使用する。好ましい態様は、低ＮＡファイバーが、コアで使用されているドーパントおよびＮＡを低下させるファイバーのクラッドにより引き起こされる増大したスペクトルバックグラウンドを典型的に表し、そしてこれゆえに励起ファイバーについて穏当なコアサイズおよびＮＡを使用するという事実と釣り合わせる。

【００３９】

収集ファイバーについては状況は異なる。収集されたラマンエネルギーはＮＡの二乗に比例する。従って、シグナル対バックグラウンド解析から、その大きさが分光器のＮＡにより制限される高ＮＡ収集ファイバーを使用することに一利点が存在する。ここで、ファイバーのＮＡおよびファイバーの直径の最良の選択は、分光計のＮＡ、所望のスペクトル分解能および整合光学系の考慮、ならびにフィルターの許容角度により設定される限界により決定される。好ましい一形状においては１若しくは数本の送達ファイバーを使用する。レーザー源のエネルギーが送達ファイバー（１本若しくは複数）中に効率的にカップリングされ得るからである。しかしながら、図４Ｂに示されるとおり、収集面積を増大させるためにより多数の収集ファイバーが重要である。ラマン光の収集を至適化することが重要であるため、収集面積が最大にされる。全部のこれらの考慮を考慮に入れて、送達ファイバー（１本若しくは複数）の数および直径を最小に保ち、同じだけの収集ファイバーのための光ファイバープローブの利用可能な断面積を使用することが最良である。

【００４０】

好ましい態様は以下のトレードオフを包含する。選ばれた分光計について、所望の分解能がスリット幅を決定する。再度スループット定理を考慮すれば、収集ファイバーに対する要件は、ファイバーのＮＡおよび直径の積が分光計のＮＡおよびスリット幅の積に等しいことである。ファイバー直径がスリット幅に等しくかつファイバーのＮＡが分光計のＮＡに等しい、より攻撃的な条件を満足するファイバーを選ぶことが可能である場合は整合光学系を使用する必要性が排除され、そしてプローブを分光計に直接接続し得る。積の要件のみが満足され得る場合には整合光学系が必要とされる。出力端では収集ファイバーが一直線に配置され、それは整合光学系により入口スリット上で画像化される。ときに分光計は湾曲スリットを使用し；収集ファイバーの出力端はいかなるスリット形状にも一致するように改変し得る。収集ファイバーの数に対する上限は、ファイバーアレイ画像の高さがスリット高さ若しくはＣＣＤチップのいずれか小さい方よりも小さいことである。しかしながら収集先端中で利用可能な空間により、より小さい限界が設定されるかもしれない。

【００４１】

好ましい一態様において、プローブのファイバー区分は０．２２のＮＡおよび２００μｍのコア直径をもつ単一の中央励起ファイバーを包含する。ファイバーの緩衝層は、適正なファイバー／フィルターのレジストレーションを助長するために励起フィルターロッドの直径に合致され、そして収集ファイバーからの光学的隔離を提供するためのアルミニウム製ジャケットを有する。２００μｍのコア直径の収集ファイバーは代替の二態様において２種の異なる形状に配置される。第一の態様はそれぞれ内側および外側環の１０および１７本のファイバーの２個の同心円状リングよりなる。第二の態様は１５本の収集ファイバーの単リングを有する。第二の設計はわずかに低下した収集効率を有するとは言え、それはより可撓性でありかつ短い曝露時間に高ＳＮＲスペクトルを収集することがなお可能である。収集ファイバーは全部、それらが図４Ａ～４Ｄに具体的に説明されるところの至適のスループットのために分光器にｆ／＃整合されるような０．２６のＮＡを有する。好ましい一態様におけるプローブの直径は、冠動脈への到達のために２ｍｍ未満である。

【００４２】

好ましい一態様は、多様な光学素子を使用して所望のＡΩ積を収集し得るようなハイスループット収集のための光学系の特定の選択に関する柔軟性を提供する。好ましい一態様において、ボールレンズは、図１Ａ～１Ｂおよび４Ａ～４Ｂに示されるところの大きな角度にわたってなお収集しつつ血液組織について０．３５ｍｍ（動脈組織について０．４ｍｍ）の半径にわたる計算された収集に緊密に合致する前面観察（ｆｒｏｎｔ　ｖｉｅｗｉｎｇ）光ファイバープローブに高度に効率的な収集を提供する。サンプルとレンズとの間に小空間が維持される場合に３０％より大きい収集効率が、組織と接触する（ありうるかつより再現可能なｉｎ　ｖｉｖｏの配置）場合に１０％より大きい収集効率が達成される。組織と接触したプローブを用いる好ましい一態様で得られる高質のスペクトルを図６に提示し、これは１００ｍＷの励起力で１秒で収集した非石灰化アテローム硬化性斑のラマンスペクトルを示す。対照的に、図７は、同一の励起力で１０秒での別の好ましい態様の系で取った正常動脈のスペクトルを示す。

【００４３】

図８は、本発明の好ましい一態様の組織測定系を具体的に説明する図解である。アルゴンポンピングＴｉ：サファイアレーザー系若しくはダイオードレーザーのような７５０ｎｍより長い波長で発射する光源２０６を使用する。ダイオードレーザーは、例えばＰｒｏｃｅｓｓ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、ユタ州ソルトレークシティにより二次加工されるような７８５ｎｍ若しくは８３０ｎｍで発射するＩｎＧａＡｓレーザーであってもよい。レーザー出力は帯域通過フィルタリングされ、そしてプローブ２０４中に包含される送達光ファイバー中にカップリングされる。プローブ２０４を動脈２０２に挿入して例えば動脈中の斑の蓄積を診断かつおそらく治療する。図１５は、本発明の好ましい一態様のプローブを示す冠動脈の一部分の部分断面図である。該系はガイドワイヤおよび大きな動脈を通すためのガイドカテーテルを包含してよい。好ましい一態様において、脂肪物質４１６により部分的に遮断されている動脈中で、ガイドワイヤが最初に次いでバルーン４２０を包含するカテーテルが動脈中に伸長される。プローブアセンブリはカテーテルの先端に収容されており、そして収集ウィンドウ４１８を有する。バルーンが動脈４１４に一旦進入すれば、プローブアセンブリは外科医に動脈の断面図を提供する。バルーンは一時的に血流を遮断して明瞭な視野を提供し、プローブを安定させかつ心の動きの影響を最小にする。好ましい態様においては蛍光マーカーを使用してもよい。光が組織に入射し、そして組織からのラマン散乱光を収集光ファイバーにより収集する。収集された光はノッチフィルタリングされかつ分光計の入口スロットに投影される。ノッチフィルターはＲａｙｌｅｉｇｈ散乱レーザー光を除去する。分光器の内側で回折格子が光をＣＣＤ検出器２２８に分散させる。ＣＣＤインターフェースならびにデータ記憶および処理がパーソナルコンピュータのようなコンピュータで提供される。Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓにより提供されるＷｉｎｓｐｅｃソフトウェアのようなプログラムを使用して、データ処理および記憶機能を実行するパーソナルコンピュータにＣＣＤインターフェースを接続し得る。代替の態様においては、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、テキサス州オースチンによるＬａｂｖｉｅｗプログラムを使用してＣＣＤインターフェースをパーソナルコンピュータに接続する。ラマンシグナルをＣＣＤから読み取り、コンピュータにより収集し、そして後の解析のためのコンピュータで読み出し可能媒体に記憶させるか、若しくは臨床の情況ではリアルタイム解析に使用してもよい。

【００４４】

図９は、本発明の好ましい一態様の組織を通って拡散する励起光を具体的に説明する。図１０Ａ～１０Ｃは、本発明の好ましい一態様の血液組織についてのそれぞれ積分済放射状分布、積分済角度分布、および至適化した収集効率の図解である。図１０Ｃはそれぞれ図１０Ａおよび１０Ｂに具体的に説明されるＡおよびΩを変動させるがしかし積ＡΩを一定にかつ分光器のものに等しく保つことにより収集効率を具体的に説明する。スループット定理によりエタンデュが保存され、ここでエタンデュは面積および立体角の積である。放射状および角度の分布が積分され、そしてそれらの積が至適化曲線３００を決定する。収集光学系は効率曲線３００の極大で実施するよう設計される。動脈組織についての類似

のグラフでの具体的説明を図３８Ｃ～３８Ｅに提供する。

【００４５】

図１１は本発明の好ましい一態様の励起スポットの直径のグラフ表示３２０である。図１２は本発明の好ましい一態様の組織中の励起光の分布の光線図３４０の具体的説明である。図１３は本発明の好ましい一態様のプローブの収集効率の光線図３６０の具体的説明である。

【００４６】

図１４は本発明の好ましい一態様のプローブの収集効率を図で具体的に説明する。組織および空気について測定された分布からの効率を具体的に説明する。プローブの全部の構成部品は、標準的な冷気体、エチレンオキサイド滅菌に耐え得る医療等級素材から構成される。例えば低温滅菌処理系のようなＳｔｅｒｉｓ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｏｈｉｏにより提供されるところの代替の滅菌方法を使用し得る。プローブ先端中のフィルターモジュールが集成されかつ指数整合セメントのような高純度ケイ酸ナトリウムを使用してファイバー束に接着される。ラマン分光法における指数整合セメントとしてのケイ酸ナトリウムの利点は独特であり、そしてその利用性は現在の応用の先を行く。該利点は、干渉ラマンスペクトルを生じさせないこと、フューズドシリカのものに近い屈折指数を有しておりそれにより合せ面からの反射の喪失を大きく低下させること、近ＩＲで低い光吸収を有し、従ってそれは認識しうる吸収の喪失を導入しないこと、関与する小型光学系構成部品の集成を助長する結合特性を有すること、およびそれが多くの工業的応用での使用と取引において許容される物品であることを包含する。

【００４７】

ケイ酸ナトリウムは、代替の酸化ナトリウム中で、水、二酸化ケイ素および水酸化ナトリウムの多様な組合せを混合することにより創製される三元の化合物である。最終生成物の光学的および機械的特性はこれらの比を変動させることにより調節し得る。他のアルカリケイ酸塩、例えばケイ酸リチウム、ケイ酸カリウムは類似の特性を有し、そしてある種の応用でまた使用し得る。

【００４８】

レンズの湾曲により提供されるレンズの効果を損ない得る指数整合が存在しないようにボールレンズとフィルターとの間にいかなる接着剤も有しないことが重要である。レンズは、本発明の好ましい一態様に従って、襞付け保持スリーブで保護されかつ液体がプローブ先端中に漏出することを防止するために医療等級エポキシで封止される。

【００４９】

好ましい態様のプローブのモジュールの性質は非常に融通が利きかつ多くの光学的態様を適応させ得る。側方観察プローブ（ｓｉｄｅ－ｖｉｅｗｉｎｇ ｐｒｏｂｅ）の付加的な態様、ならびに代替の応用のための他の前方観察の態様が本発明の系に包含される。例えば、角度を付けられかつ鏡を付けられたボールレンズ、プリズム若しくは微小光学的放物線状鏡の使用が効率的な側方観察プローブを可能にする。テーパー付き先端は光学的乳房生検のためのニードルプローブへの組み込みを可能にし、また、代替の好ましい一態様におけるわずかにより小さい直径は乳管内視鏡検査による乳房分析を可能にする。他の潜在的用途は、皮膚分析、経皮的血液被検体モニタリングおよび胃腸癌の評価のためである。

【００５０】

図１６は、本発明の好ましい一態様のレーザー出力のボールレンズからのシグナル４５０および関数を具体的に説明する。前方観察ラマンプローブは、励起光を集中させかつ組織からのラマンシグナルを収集するのにサファイアボールレンズを使用する。サファイアレンズからのラマンスペクトルは、収集されたシグナルを励起レーザー出力に関して較正してそれにより強度情報を得るための内部標準として使用し得る。この強度情報は典型的には生物学的ラマン分光法で活用されないが、しかし高められた診断力を提供し得る。グラフのプロットは、好ましい一態様のラマンプローブおよび臨床的ラマン系で取ったデータを使用して生成され、そして、サファイアレンズからのシグナルの大きさをプローブが

空中で保持される際の励起力の関数として表す。それは本発明の好ましい一態様を使用して組織に送達される出力を測定するための天然の内部標準を暗示する。

【００５１】

図１７は、好ましい一態様のプローブ４７２および実験系４７４を使用して収集した正常動脈からのデータの比較を図で具体的に説明する。ラマンプローブの機能を示しかつ検証するために類似の型の組織を検査する。類似のスペクトルが得られることが示され、そして該スペクトルのＳ／Ｎ比（ＳＮＲ）（より大きなＳＮＲがより少ないノイズを有する系に変わりかつより良好な性能を示すために系の性能の一表示である）もまた検査される。

【００５２】

図１８は、本発明のプローブを用いて検査した正常乳房組織のラマンスペクトル４９０を図で具体的に説明する。該プローブが疾患の診断のための複数の用途を有することを示すために動脈以外の組織を検査した。該プローブは乳癌の早期診断のための乳管内視鏡検査手順で使用し得る。

【００５３】

図１９は、本発明の好ましい一態様により悪性であると診断されかつ本発明の参照データにより予測されるところの乳癌のラマンスペクトルの比較を図で具体的に説明する。好ましい一態様のプローブを使用して収集したところのデータ５０２を参照データにより生成させたデータ５０４と比較する。参照データ係数を表１に表にまとめる。

【００５４】

【表１】

表1

成分	係数(%)
ｼｭｳ酸ｶﾙｼｳﾑ	11
ﾊｲﾄﾞﾛｷｼｱﾊﾟﾀｲﾄｶﾙｼｳﾑ	14
ｺﾚｽﾃﾛｰﾙ	2
水	0
β-ｶﾛﾁﾝ	0
脂肪	15
ｺﾗｰｹﾞﾝ	45
核	0
細胞質	12

【００５５】

図２０は　本発明の好ましい一態様のプローブを用いて収集した石灰化大動脈のデータとの形態学的参照データの比較を図で具体的に説明する。図２０は、１００ｍＷの励起力で１秒でラマンプローブおよび臨床的ラマン系を用いて得た石灰化大動脈のラマンスペクトル５２２を具体的に説明する。形態学的参照データとのフィットをスペクトル５２４として示す。残差スペクトル５２６を同一スケールで下にプロットする。残差中の特徴の欠如は観察されたデータと参照データとの間の高レベルの一致を示し、実験的ｉｎ　ｖｉｔｒｏ系を用いて発生させた本発明の好ましい態様の参照データを好ましい態様のラマンプローブで取ったデータに適用し得ることを証明する。残差スペクトル５２６中にいかなるプローブバックグラウンドに対応する特徴も存在しないこともまた注目すべきであり、いかなる残りのフィルタリングされていないバックグラウンドノイズも正確に除去し得ることを示す。さらに、疾患に罹った動脈から得たラマンスペクトルは、正常動脈から得たス

ペクトルに比較して同じくらい拡散せず、従ってより良好なレベルのＳ／Ｎ比（ＳＮＲ）をもつスペクトルを提供する。ＳＮＲは組織のラマン断面および光の分布の双方により影響を受けることに注目すべきである。

【００５６】

好ましい一態様において、アテローム硬化症の診断における使用のための本発明の非アキシャルラマンプローブが、例えば血管造影に使用される型のカテーテルに組み込まれる。それは血液および他の液体を立ち退かし、かつ動脈中にカテーテルを配置するためのバルーンを包含する。好ましい一態様はバルーン膨張のためのチャンネルを包含する。さらに、該カテーテル系は液体例えば生理的食塩水で一時的に血液を洗い流すための能力を包含する。側若しくは４５°から９０°の範囲にわたる角度のいずれかで非軸方向に励起光を向けるように１若しくは数本の光ファイバーを構成し得る。こうした好ましい一態様において、側に配置されるバルーンを使用してファイバーを動脈壁に隣接して接触させ、また、血液若しくは他の介在する液体を立ち退かす。

【００５７】

あるいは、送達ファイバーはプローブの軸に対しある角度で円形のパターンで光を向けるよう配置し得る。多様な収集ファイバーが、照明された外周領域の多様な部分から同時に光を収集する。本態様において、プローブは、光送達および／若しくは収集前に膨張されて血液および他の液体を立ち退かす膨張可能なバルーン中に封入される。好ましい態様において、バルーンは例えば血管造影のような動脈の応用で使用される型のものであり、そして励起光に動脈壁を通過させかつ動脈壁で生成されたラマン光にバルーンを通過させて収集ファイバーに戻らせるように薄い素材で作成される。

【００５８】

図２１Ａは、本発明の系の組織測定用の側方観察プローブの代替の好ましい一態様の長軸方向図５５０を具体的に説明する。該態様は角度を付けられた側の表面が楕円形にされている改変アキシコン５５６を包含する。図２１Ｂおよび２１Ｃは、周囲の画像を提供するための角度を付けられた表面上の湾曲の最低２種の異なる半径を包含する好ましい代替の態様である。周囲の画像化は、一態様において、およそ４５°から９０°の角度の範囲にわたるビームを提供すること、および周囲の画像を得るようにプローブを回転させることにより得られる。あるいは、送達ファイバーは組織に光を提供し得、そして例えば６画像のような画像を収集ファイバーで収集して周囲の画像を得る。好ましい一態様において、フィルター５５４とアキシコン５５６の角度を付けられた部分との間の容積は固体ガラス、好ましくはサファイアを含んでなり、ここで光の再方向付け（ｒｅｄｉｒｅｃｔｉｏｎ）が全体内部反射を介して発生する。

【００５９】

図２１Ｂに具体的に説明されるところの代替の好ましい態様において、アキシコン５５６の角度を付けられた表面５６２が映され、それは反射を可能にする。レーザー光は組織５６４上に放射状にすなわち非軸方向に向けられる。さらに、表面５６５は楕円形でありかつサファイアを使用して二次加工される。フィルター５５４とアキシコン５５６との間の容積は満たされていても若しくは空であってもいずれでもよい。図２１Ｃに具体的に説明されるところの本態様は、スペクトルのデータが取得されている間に動脈中に液体例えば生理的食塩水を流すため若しくはバルーンを膨張させて血流を一時的に遮断するために使用し得る開放の中央チャンネル５５８、５６６を提供する。中央チャンネル５５８、５６６が使用される場合には、プローブは、中央チャンネルの外周の周囲に数本の励起ファイバーを配置することを包含する。アキシコンの焦点は調節可能である。前の態様に記述されたフィルターのチューブ中ロッドの形状は、チューブ中チューブの形状、すなわち中央チャンネルのための中央の孔をもつ励起フィルターの中央チューブおよび収集フィルターのための外側のチューブに改変される。

【００６０】

図２１Ｄは、本発明の好ましい一態様の側方観察プローブすなわち非軸方向観察プローブ、ならびに組織６１２の一部分上に光を送達するカテーテル６１０、および組織から収

集されかつ第二の表面上の１点で再画像化されるラマン光の好ましい一態様の図を具体的に説明する。該側方観察プローブはその観察開口部から横断する側方を見る素子に隣接して設置された膨張可能なバルーン６１４若しくは可撓性ワイヤを包含する。バルーンの膨張若しくはワイヤの屈曲に際して、該開口部が押されて動脈壁６１６と接触して、血液と入れ換わりかつ／若しくは十分に定義された収集形状を確立する。

【００６１】

上に簡潔に論考したとおり、最近の研究は、解剖学（狭窄の程度）よりはむしろ化学的組成および形態学がアテローム硬化性斑の不安定性を決定しかつ疾患の進行ならびに血栓および急性斑出血のような生命を脅かす合併症の危険を予測することを示している。例えば、コレステロールエステルの存在は斑を軟化させるかもしれない一方、結晶を含まないコレステロールは反対の影響を有するかもしれない。ラマン分光法は、図３５Ｆおよび３５Ｇに具体的に説明されるとおり遊離コレステロールからコレステロールエステルを同定し得る。従来技術の臨床診断技術は斑の解剖学の正確な評価を提供するが、しかしｉｎ　ｖｉｖｏの斑の形態学を評価する限られた能力を有する。さらに、血管内超音波（ＩＶＵＳ）、ＭＲＩおよび血管造影法のような従来技術の診断的画像化技術は、管腔の狭窄の程度についての解剖学的情報を優勢に提供するが、しかし病変の組成について限られた情報のみを生じる。冠動脈血管造影法（未だ、冠動脈疾患を診断するための「黄金基準」）は管腔の狭窄の程度を示すが、しかし斑についての化学的若しくは形態学的情報を提供しない。事実、不安定なアテローム硬化性斑はしばしば血管造影において「無症状」である。臨床使用で現在最も正確かつ定量的な技術、ＩＶＵＳは、血管内カテーテルにより送達される音波の反射を使用して組織密度を精査し、そして画像化情報を提供する。それは、血管造影上正常に見える冠動脈中の広範囲のアテローム硬化症を示すことによりアテローム硬化症の理解を大きく前進させた。しかしながら、ＩＶＵＳは粥腫中心の存在を同定し得るとは言え、それは泡沫細胞（ＦＣ）若しくはコレステロール結晶（ＣＣ）を特異的に同定し得ず、そしていかなる化学的情報も提供しない。ＭＲＩは非侵襲的技術であるという利点を有し、そして、磁場勾配を適用することにより生成される電波を使用して再度、組織密度を精査しかつ画像化情報を提供する。ＩＶＵＳと同様、それは解剖学およびより小さい程度まで形態学を解析するのに使用し得る。しかしながら、臨床で使用される慣習的なプロトンＭＲＩ技術は化学シフト情報をほとんど無視かつしばしば抑制する。従って、現在、斑の形態学および化学的組成は、動脈内膜切除術若しくは粥腫切除術後の摘出された組織の顕微鏡検査によってのみ評価し得る。

【００６２】

本発明の好ましい態様は、光ファイバー技術を使用して潜在的にｉｎ　ｖｉｖｏで実施し得るラマン分光法を使用する冠動脈中のアテローム硬化症の形態学に基づく診断方法を包含する。好ましい一態様において、正常なおよび外植された移植レシピエントの心（ｎ＝１６）からの多様な疾患進行段階のアテローム硬化症の冠動脈サンプル（ｎ＝１６５）からラマン組織スペクトルを収集する。弾性板（ＥＬ）、コラーゲン線維（ＣＦ）、平滑筋細胞（ＳＭＣ）、外膜脂肪細胞（ａｄｉｐｏｃｙｔｅ）（ＡＡ）すなわち脂肪細胞（ｆａｔ　ｃｅｌｌ）、泡沫細胞（ＦＣ）、壊死中心（ＮＣ）、コレステロール結晶（ＣＣ）、β－カロチン含有結晶（β－Ｃ）およびカルシウム鉱質化（ＣＭ）からのラマンスペクトルを線形最小二乗法最小化（ＬＳＭ）モデルの基礎スペクトルとして使用して、該冠動脈組織スペクトルへのこれらの形態学的構造の寄与を計算する。好ましい態様は、多様な形態学的構造のフィットの寄与率（ｆｉｔ－ｃｏｎｔｒｉｂｕｔｉｏｎ）を使用して非アテローム硬化性、石灰化斑、若しくは非石灰化粥腫斑のいずれかとして一組の初期較正データ中の９７種の冠動脈サンプルを分類する一連の診断のインストラクションを包含する。該一連のインストラクションは現在、６８種の冠動脈サンプルのうち６４種（９４％）をプロスペクティブに分類する。ラマン分光法は、摘出および顕微鏡検査に対する必要性を伴わずに無傷のヒト冠動脈の形態学的組成についての情報を提供する。従って、好ましい一態様は、ラマン分光法を使用して、ｉｎ　ｖｉｖｏでアテローム硬化性の冠動脈病変の形態学的組成を解析しかつ斑の不安定性および疾患の進行を評価する。

【００６３】
本発明は数学的参照データの改変を使用するラマン分光法による冠動脈からの病変の組成に関する定量的な形態学的情報を取得することを包含する。この形態学的情報を診断の目的上使用し得る。ラマン分光法により得られた化学的および形態学的情報は、ヒト冠動脈疾患の診断的評価の基礎となり得る。
【００６４】
原則として、アテローム硬化性病変の組成に関する定量的な化学的および形態学的双方の情報を同一のラマンスペクトルから得ることができる。本発明の好ましい一態様は、基本の組として生化学的成分よりもむしろ形態学的構造のスペクトルを使用してラマン組織スペクトルをモデル化することにより、冠動脈組織を解析する。参照データの基礎スペクトルは、コラーゲン線維（ＣＦ）、内部および外部弾性板（ＥＬ）、平滑筋細胞（ＳＭＣ）、外膜脂肪細胞（ａｄｉｐｏｃｙｔｅ）（ＡＡ）すなわち脂肪細胞（ｆａｔ　ｃｅｌｌ）、泡沫細胞（ＦＣ）、壊死中心（ＮＣ）、コレステロール結晶（ＣＣ）、β－カロチン含有結晶（β－Ｃ）およびカルシウム鉱質化（ＣＭ）を包含する正常動脈壁およびアテローム硬化性斑中で普遍的に観察される形態学的構造から得られる。その後、これらの基礎スペクトルを使用して冠動脈試料の一組の初期較正のスペクトルを直線的に当てはめ得る。多様な形態学的構造のフィットの寄与率を使用して、動脈を生化学的モデル中でのようにアテローム硬化性若しくは非アテローム硬化性に分類するアルゴリズムが、好ましい一態様に包含される。好ましい態様の診断性能は、形態学に基づく参照データを、冠動脈の第二のプロスペクティブな検証の組に適用することにより試験し得る。
【００６５】
好ましい一態様において、組織の調製は、心移植後１時間以内の外植されたレシピエントの心から、多様な段階のアテローム硬化症を表す１６例の患者からのヒト冠動脈サンプル（ｎ＝２００）を得ることを包含する。７例の患者が拡張型心筋症による、および９例が重症の虚血性心疾患による心不全を有した。外植心からの切開直後に動脈区分を中性緩衝生理的食塩水溶液ですすぎ、液体窒素中で急速凍結し、そして使用まで－８５℃で保存した。動脈サンプルは２組で収集し、第一の組は１１３（較正組）、そして第二は８７サンプル（プロスペクティブ検証組）を含有した。
【００６６】
これらの大動脈サンプルは巨視的および微視的ラマン分光法検査で使用し得そして使用した。巨視的検査のためにはサンプル（第一および第二の組からそれぞれ９７および９８）を受動的に室温に加温し、長軸方向に切り開き、管腔側を上向きにアルミニウム製ホルダーに置き、そして評価されるべき領域の選択のため１０倍拡大下で検査した。分光学的検査後に、検討した（ｉｎｔｅｒｒｏｇａｔｅｄ）各スポットにコロイド状インクの小さな染みで印を付け、そして１０％中性緩衝ホルマリン中で固定した。
【００６７】
顕微分光計を使用するラマンスペクトルの収集のために、未染色の横断組織切片（６～８μｍ）を冠動脈サンプルから切断した。各サンプルの４切片をガラス製顕微鏡スライドガラス上にマウントしそして光学顕微鏡検査のため染色した一方、連続的な未染色の横断切片をBaF_2若しくはMgF_2フラット（Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、ニューヨーク州タリータウン、およびＳｐｅｃｔｒａ－Ｔｅｃｈ、コネチカット州スタンフォード）にマウントし、リン酸緩衝生理的食塩水（ｐＨ７．４）で湿らせたまま保ち、そして分光学的実験のため顕微鏡ステージに移した。カバーガラスは使用しなかった。白色光照明下で主要な形態学的構造を選択しかつ１０倍および６３倍拡大下でビデオテープに録画した。
【００６８】
ホルマリン固定した巨視的組織サンプルを処理し、パラフィンに包埋しかつ印を付けた位置を通って５μｍ厚の切片に切断し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、そして２名の経験を積んだ心血管系病理学者により検査した。組織切片は、改訂されたＳｙｓｔｅｍｉｚｅｄ　Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ　ｏｆ　Ｈｕｍａｎ　ａｎｄ　Ｖｅｔｅｒｉｎ

ａｒｙ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（医学および獣医学の体系化命名法）（ＳＮｏＭｅｄ）に従って分類した。較正および検証双方のデータ組中のサンプルは（１）正常（それぞれｎ＝１２および１）、（２）内膜線維増殖（ｎ＝６１および２５）、（３）アテローム硬化性斑（ｎ＝３および０）、（４）粥腫斑（ｎ＝６および１６）、（５）石灰化アテローム硬化性斑（ｎ＝１および３）、（６）石灰化粥腫斑（ｎ＝７および１３）、（７）石灰化線維硬化性斑（ｎ＝５および１０）若しくは（８）石灰化内膜線維増殖（ｎ＝２および０）のいずれかと診断した。これらの範疇のいくつかは少ないサンプル数を有したため、診断アルゴリズムの開発のために該８範疇を３診断分類に簡約した。すなわち、分類Ｉ、非アテローム硬化性組織（範疇１および２；ｎ＝７３および２６）；分類ＩＩ、非石灰化アテローム硬化性斑（範疇３および４；ｎ＝９および１６）；ならびに分類ＩＩＩ、石灰化アテローム硬化性斑（範疇５～８；ｎ＝１５および２６）。

【００６９】

巨視的および微視的ラマンスペクトルは図２２に示すラマン分光法系を使用して得た。近赤外（ＮＩＲ）レーザー光（８３０ｎｍ）はAr^{+}－ポンピングＴｉ：サファイアレーザー系５７２、５７４（Ｃｏｈｅｒｅｎｔ　Ｉｎｎｏｖａ　９０／Ｓｐｅｃｔｒａ　Ｐｈｙｓｉｃｓ　３９００Ｓ、Ｃｏｈｅｒｅｎｔ、カリフォルニア州サンタクララ）により生成させる。レーザー出力は帯域通過フィルタリング（Ｋａｉｓｅｒ　Ｏｐｔｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　ＨＬＢＦ、ミネソタ州アナーバー）し、そして、プリズム５７８の挿入により、巨視的情況で組織サンプル上に投影したか、若しくは共焦点顕微鏡６００中に投影しかつ６３倍無限補正液浸対物レンズ（Ｚｅｉｓｓ　Ａｃｈｒｏｐｌａｎ、ＮＡ　０．９）を用いて組織切片上に集中させたしたかのいずれかであった。巨視的情況では、組織（サンプリング体積１～２mm^{3}）からのラマン散乱光をレンズで収集し、ノッチフィルタリング５８８し、そしてＣｈｒｏｍｅｘ　２５０ＩＳ／ＳＭ分光測光計（Ｃｈｒｏｍｅｘ、ニューメキシコ州アルバカーキ）の入口スリットに集中させた。顕微鏡の情況（サンプリング体積およそ２×２×２μm^{3}）では、組織から散乱されたラマン光を、サンプル上に光を集中させるのに使用する同一の対物レンズで収集し、ピンホール（系にその共焦点の特徴を与える）を通過させ、ノッチフィルタリングし、そして分光測光計の入口スリットに投影した。分光器５８０の内側で、回折格子が光を－１１０℃に冷却された深空乏型（ｄｅｅｐ－ｄｅｐｅｌｅｔｉｏｎ）ＣＣＤ検出器５８２（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、ニュージャージー州プリンストン）上に分散させる。ＣＣＤインターフェース（ＳＴ１３０、Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）が、データ記憶および処理と一緒にパーソナルコンピュータ５８４上に与えられる。

【００７０】

巨視的測定についてはレーザー出力は３５０ｍＷであり、そしてシグナル収集時間は範囲１０～１００ｓにある。微視的測定についてはレーザー出力は８０～１２０ｍＷであり、そしてシグナル収集時間は６０～３６０ｓであり、また、ラマンスペクトルは４００と２０００cm^{-1}との間の範囲で収集する（分解能８cm^{-1}）。

【００７１】

各スペクトルを周波数較正し、また、分光計系の検出における色の変動について補正する。４次の多項式を各スペクトルに当てはめ、そしてスペクトルから減算して残りの組織蛍光について補正する。巨視的組織スペクトルは、ＬＳＭによる形態学的構造の基礎スペクトルの一次結合として６８０～１８００cm^{-1}のラマンシフト範囲でモデル化し得る。このラマンシフト範囲は、この範囲がほとんどのスペクトル情報を含有するために選ばれる。

【００７２】

形態学的構造のラマンスペクトルはそれらの最大ピーク強度に関して正規化し得る。２組のデータ中の全スペクトルは、最後の組の８種の形態学的基礎スペクトルを用いて正確にモデル化し得る。ラマンスペクトル参照データは形態学的構造の７種の部分的なフィットの寄与率を計算した。第８の構造、β－カロチンは、冠動脈のラマンスペクトルにしばしば寄与する強いラマン散乱体であるがしかし低濃度でのみ存在する。この理由から、そ

のスペクトルをスペクトルの参照に包含するが、しかし部分的なフィットの寄与率は計算しない。

【００７３】

石灰化アテローム硬化性斑中で、ＣＭはしばしばラマン分光法により検査される組織の大きな容積を占有する。残りの非石灰化領域についての情報を得るため、および、多様な疾患分類のなかで形態学的構造の部分的なフィットの寄与率を比較するため、カルシウム鉱質化の寄与を無視して石灰化斑のスペクトルを再正規化し、そして非石灰化領域（X_{NCR}により示される）の形態学的構造の部分的なフィットの寄与率を計算する。

【００７４】

較正データ組中のスペクトルに対する各形態学的構造の相対的なフィットの寄与率を使用して、３種の診断分類の１種に組織を分類するための説明のアルゴリズム若しくは一連の説明を開発する。ロジスティック回帰分析の方法を使用して、各形態学的構造ｌの相対的なフィットの寄与率（C_l）の一次結合に基づき鑑別スコアR_Iを$R_i = \alpha_i + \beta_{1i} C_1 + \beta_{2i} C_2 + \cdots$（$\alpha_i$は一定でありかつ$\beta_{li}$は各形態学的構造についての調節可能な係数である）として生成させることができる。ロジスティック回帰分析がフィットの寄与率の正常性についていかなる仮定も行わないため、鑑別解析にこの方法が選ばれる。

【００７５】

解析ツール、例えばソフトウェアパッケージＳＴＡＴＡ（リリース５．０、Ｓｔａｔａ、テキサス州カレッジステーション）を用いる最大最尤度推定を使用して、動脈サンプルｊが非アテローム硬化性である（P_{jI}）、若しくは非石灰化アテローム硬化性斑を含有する（P_{jII}）、若しくは石灰化アテローム硬化性斑を含有する（P_{jIII}）確率は、総和が１になる

【００７６】

【数１】

$$P_{jI} = \frac{1}{1 + e^{Rj1} + e^{Rj2}} \qquad (1)$$

$$P_{jII} = \frac{e^{Rjt}}{1 + e^{Rj1} + e^{Rj2}}, \text{ および } P_{jIII} = 1 - P_{jII} - P_{j1} \qquad (2)$$

【００７７】

として決定される。さらに、初期の較正データ組での最尤度比検定を使用して、どの形態学的構造の相対的なフィットの寄与率が診断に対し重要であるか、およびこれらの相対的なフィットの寄与率に対するどの診断上の閾値が最も多いサンプルを正確に分類するかを決定し得る。その後、そのように開発されたアルゴリズムを使用して、第二の検証データ組中の動脈サンプルをプロスペクティブに分類し得る。

【００７８】

参照データ中の誤差のレベルを決定するために、使用されているスペクトルのＳ／Ｎ比（ＳＮＲ）を解析することが必要である。形態学的参照データの微視的ラマン動脈スペクトルは自由裁量で長時間収集し得るため、それらは、本発明の好ましい一態様の８種の選択された冠動脈の形態学的構造のラマンスペクトルを図で具体的に説明する図２３に具体的に説明されるとおり事実上ノイズを含まない。従って、参照中の誤差の制限する根源は無傷の動脈の巨視的スペクトル中のノイズによる。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ系はショットノイズが制限され、そして従っていかなる所定のサンプルについてのノイズもシグナルの平方根に等しい。標準的多変量解析技術に従えば、濃度の誤差はスペクトル中のノイズに比例する。

【００７９】

$$E = N \times B \qquad (3)$$

式中、$B = P^T (PP^T)^{-1}$は目的の形態学的基礎スペクトルの較正ベクトルであり、また、Ｎはサンプル中のノイズである。

【００８０】

上述された図２Ａ～２Ｃは、ＬＳＭ参照データと一緒の３種の診断分類（正常冠動脈（図２Ａ）、非石灰化アテローム硬化性斑（図２Ｂ）および石灰化アテローム硬化性斑（図２Ｃ））のそれぞれを表す冠動脈サンプルから収集した巨視的ラマンスペクトルを示す。実線は巨視的スペクトルでありかつ点線は参照データを暗示する。残差（データーフィット）を同一スケール上に示す。全部のスペクトルについて、計算されるフィットは測定されたスペクトルと良好に一致し、形態学的基礎スペクトルが巨視的組織サンプルのラマンスペクトルの理にかなって完全な表示であることを示唆する。

【００８１】

病理学者により３種の診断分類の１種に分類された較正データ組の全９７種の冠動脈サンプルのラマンスペクトルを同一の方法で解析し得る。非アテローム硬化性組織（Ｉ）、非石灰化アテローム硬化性斑（ＩＩ）および石灰化アテローム硬化性斑（ＩＩＩ）中の全８種の選択された形態学的構造の相対的なフィットの寄与率の平均±平均の標準誤差をそれぞれ図２４Ａ～２４Ｃに示す。これらの図は、ラマン分光法のモデル化が冠動脈組織中の形態学的変化を検出することが可能であることを明瞭に示す。形態学的ラマン参照データは、予期されたとおり、非アテローム硬化性組織が主としてＡＡ、ＣＦ、ＥＬおよびＳＭＣよりなったことを示した（図２４Ａ）。非アテローム硬化性動脈において、内膜は薄く、そして、従って分光学的に検査した組織体積への外膜層（比較的大量の脂肪組織を含有する）の寄与は大きい。ＮＩＲレーザー光が血管壁全体に浸透するからである。非石灰化および石灰化アテローム硬化性斑中では、形態学的ラマン参照データは疾患の進行とともに形態学的組成の劇的な変化を示した。内膜が肥厚化されている非石灰化アテローム硬化性斑においてはＡＡの寄与が減少した一方、ＦＣ／ＮＣおよびＣＣの寄与は斑中の脂質の蓄積により増大した（図２４Ｂ）。石灰化アテローム硬化性斑のラマンスペクトルはＣＭの寄与により支配される（図２４Ｃ）。石灰化アテローム硬化性斑中のAA_{NCR}およびCF_{NCR}の寄与は、非石灰化アテローム硬化性斑中のＡＡおよびＣＦのものより大きい。非石灰化斑中の低下したCF_{NCR}は低下した斑の安定性の表示である。

【００８２】

動脈組織中のβ－カロチンの濃度は低いとは言え、モデル化の結果は、図２５に具体的に説明されるとおり疾患分類の間でのカロチノイドの寄与の大きな差異を示した。最大の寄与は非石灰化アテローム硬化性斑で見出される。β－カロチンはＮＣに容易に溶解する親油性物質であるためである。

【００８３】

ロジスティック回帰分析を使用して、３種の診断分類へのデータの至適の分離を、最尤度比検定を使用してＰ＜．０００１を伴うＣＭおよび$CF/NC_{NCR}+CC_{NCR}$のフィットの寄与率を使用して得ることができる。加えて、最尤度比検定は、分類の向上が残りの形態学的構造のいずれの包含からも生じなかったことを決定した（Ｐ＜．０５）。鑑別スコアは、$R_{j1} = -420.4 + 1870.0 \times (FC/NC_{NCR}+CC_{NCR}) - 6094.3 \times CM$、および$R_{j2} = -8.3 + 23.3 \times (FC/NC_{NCR}+CC_{NCR}) + 47.6 \times CM$であることが決定される。

【００８４】

各動脈サンプルのＣＭおよび$CF/NC_{NCR}+CC_{NCR}$のフィットの寄与率を、対応するR_1およびR_2値を使用して図２６Ａに具体的に説明されるところの判定図にプロットし得る。非アテローム硬化性組織および非石灰化アテローム硬化性斑の領域を分離する境界はＰＩ＝ＰＩＩにより与えられ、これは等式$CM = -0.07 + 0.31 \times (FC/NC_{NCR}+CC_{NCR})$により記述される直線である。非アテローム硬化性組織および石灰化アテローム硬化性斑の領域を分離する境界はＰＩ＝ＰＩＩＩにより与えられ、そして等式$CM = 0.17 - 0.48 \times (FC/NC_{NCR}+CC_{NCR})$を有する。非石灰化アテローム硬化性斑および石灰化アテローム硬化性斑の領域を分離する直線はＰＩＩ

＝ＰＩＩＩにより与えられ、そして等式ＣＭ＝－０．０７＋０．３０×（ＦＣ／NC_{NCR}＋CC_{NCR}）を有する。初期較正データ組中の９７サンプルの９５（９８％）について、ラマンに基づく診断アルゴリズムにより決定した判定は病理学者のものと相関した。

【００８５】

このアルゴリズムは、図２６Ｂに具体的に説明されるところの３種の診断分類の１種に第二の検証データ組の動脈サンプルを分類するための好ましい態様においてもまたプロスペクティブに使用した。プロスペクティブに、アルゴリズムの結果は６８のうち６４（９４％）について病理学者のものと一致した。双方のデータ組についての病理学的およびラマン分光学的診断の比較を表２に示す。

【００８６】

【表２】

表2

形態学に基づくﾗﾏﾝ診断ｱﾙｺﾞﾘｽﾞﾑとの病理学的診断の比較

ﾗﾏﾝ診断				
病理学診断	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	合計
較正ﾃﾞｰﾀ組				
Ⅰ	72	0	1	73
Ⅱ	0	9	0	9
Ⅲ	1	0	14	15
合計	73	9	15	97
ﾌﾟﾛｽﾍﾟｸﾃｨﾌﾞﾃﾞｰﾀ組				
Ⅰ	26	0	0	26
Ⅱ	0	12	4	16
Ⅲ	0	0	26	26
合計	26	12	30	68

【００８７】

分類は（Ｉ）非アテローム硬化性組織、（ＩＩ）非石灰化斑および（ＩＩＩ）石灰化斑である。

【００８８】

巨視的動脈スペクトルを収集するために使用したｉｎ　ｖｉｔｒｏラマン系はショートノイズが制限されるため、データ取得で使用したＮＩＲ技術は極めて高ＳＮＲのスペクトルをもたらした。平均のピーク対ピークノイズは正規化したスペクトル上で０．０４カウント未満である。診断的形態学的成分のフィットの寄与率に対する誤差の計算は、ＣＭについて０．０４１という３標準偏差（ＳＤ）の誤差およびＦＣ／NC_{NCR}＋CC_{NCR}について０．０３６の３ＳＤの誤差を生じる。

【００８９】

別の好ましい態様において、１６の外植された移植レシピエントの心から３５の冠動脈サンプルを採取しそして薄切片を調製した。８３０ｎｍレーザー光を用いる高分解能共焦点ラマン顕微分光計の系を使用して、高Ｓ／Ｎラマンスペクトルを以下の形態学的構造すなわち内部および外部弾性板、コラーゲン線維、脂肪、泡沫細胞、平滑筋細胞、壊死中心、β－カロチン、コレステロール結晶およびカルシウム鉱質化から得た。それらのラマンスペクトルは、コラーゲン、エラスチン、アクチン、ミオシン、トロポミオシン、コレステロール一水和物、コレステロールリノレエート、ホスファチジルコリン、トリオレイン、ハイドロキシアパタイトカルシウム、炭酸カルシウムおよびβ－カロチンを包含する動脈組織中に存在する主要生化学物質からの基礎ラマンスペクトルの一次結合を使用することによりモデル化し得る。

【００９０】

該結果は、多様な形態学的構造が特徴的ラマンスペクトルを有することを示し、それらは構造間でおよび動脈間でほとんど変動しない。該生化学的モデルは各形態学的構造のスペクトルを十分に記述し、大部分の必須の生化学的成分が参照データに包含されていることを示す。さらに、形態学的構造スペクトルの生化学的基礎スペクトルのフィットの寄与率により示される各構造の生化学的組成は非常に一貫している。従って、正常およびアテローム硬化症の冠動脈中の多様な形態学的構造のラマンスペクトルを、アテローム硬化性冠動脈病変の形態学的組成を解析するための一次結合モデルで基礎スペクトルとして使用してよい。

【００９１】

ラマン分光法は、巨視的および微視的双方の尺度での組織の生化学的解析に対する大きな潜在能力を有する。この方法の大きな利点の１つは、ホモジェナイズ、抽出、または色素、標識若しくは他のコントラスト増強剤の使用を伴わずに非破壊的に無傷の細胞および組織内（すなわちｉｎ－ｓｉｔｕ）でそれらの微小環境中の生化学的分子の濃度、構造および相互作用についての情報を提供するその能力である。加えて、ラマン分光法は、上述されたところの光ファイバー技術を使用してｉｎ　ｖｉｖｏで実施し得る。

【００９２】

形態学的因子が斑の安定性および進行の決定において生化学的組成と同じくらい重要でありうるという属性を使用して、本発明の好ましい一態様は、ラマン分光法を使用する動脈組織中のアテローム硬化性病変の形態学に基づく診断を包含する。その目標のために、上述された共焦点ラマン顕微分光法（ｍｉｃｒｏｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ）を使用して、正常およびアテローム硬化症のヒト冠動脈組織の個々の細胞および細胞外成分のｉｎ－ｓｉｔｕラマンスペクトルをｉｎ　ｖｉｔｒｏで得た。その後、これらの微視的形態学的構造の生化学的組成を、無傷の組織について以前に使用されたと類似の様式で生化学物質の基礎ラマンスペクトルの一次結合を使用してそれらのラマンスペクトルをモデル化することにより決定した。巨視的ラマン分光法の生化学的解析と同様、これらの巨視的ラマン分光法の形態学的解析は、最終的に、アテローム硬化性斑の安定性および疾患の進行をｉｎ　ｖｉｖｏで評価するための診断アルゴリズムで使用し得る。様々な段階のアテローム硬化症を表すヒト冠動脈サンプル（ｎ＝３５）を、外植されたレシピエントの心（ｎ＝１６）から心移植１時間以内に得た。外植心からの切開後直ちに動脈サンプルを中性緩衝生理的食塩水ですすぎ、液体窒素中で急速凍結しかつ－８５Ｃで保存した。

【００９３】

凍結冠動脈サンプルをヒストプレップ（Ｈｉｓｔｏｐｒｅｐ）（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、ニューヨーク州オレンジバーグ）を用いてクライオスタットチャック上にマウントした。光学顕微鏡検査およびラマン顕微分光法のための薄い横断組織切片（６～８μｍ）をクライオスタット／マイクロトーム（Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｅｑｕｉｐｍｅｎｔ、マサチューセッツ州ニーダムハイツ）を使用して切断した。各サンプルの４切片をガラス製顕微鏡スライドガラス上にマウントし、そしてヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。その後、連続した未染色の切片をBaF_2若しくはMgF_2フラット（Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、ニューヨーク州タリータウン、およびＳｐｅｃｔｒａ－Ｔｅｃｈ、コネチカット州スタンフォード）にマウントし、リン酸緩衝生理的食塩水（ｐＨ７．４）で湿らせたまま保ち、そして室温で実施する分光学的実験のため顕微鏡ステージに移した。分光学的測定にはカバーガラスを使用しなかった。多数の形態学的構造からスペクトルを収集した場合、各切片をおよそ２時間後に新たに切断した切片により置き換えて酵素的分解の結果としての組織中の生化学的変化を回避した。この２時間の検査時間内ではラマンスペクトルに有意の変化はみられなかった。検査した形態学的構造は、正常動脈中で：動脈壁の多様な層中のコラーゲン線維、内部および外部弾性板、中膜平滑筋細胞および外膜脂肪細胞、ならびに内膜アテローム硬化性病変中で：線維性被膜中のコラーゲン線維、泡沫細胞、壊死中心、コレステロール結晶、β－カロチン含有結晶およびカルシウム鉱質化であった。

【００９４】

本発明の好ましい態様のシステムの図解を図２７に示す。全ラマン分光学的測定は、選択した形態学的構造の目的の領域以外の周辺表面にある特徴からのシグナルラマン光を抑制するために共焦点の構成を使用して実施する。観察および解析は位相差系およびステージ制御装置（Ｐｒｉｏｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、マサチューセッツ州ケンブリッジ）を備えた顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ　Ａｘｉｏｓｋｏｐ　５０、Ｚｅｉｓｓ、ニューヨーク州ソーンウッド）を使用した。サンプルの初期検鏡は１０倍拡大（Ｚｅｉｓｓ　Ａｃｈｒｏｐｌａｎ対物レンズ）の位相差顕微鏡を用いて実施した。詳細な検鏡および顕微分光法は、６３倍無限補正液浸対物レンズ（Ｚｅｉｓｓ　Ａｃｈｒｏｐｌａｎ、ＮＡ　０．９）を用いて実施した。位相差組織検鏡、および顕微分光法のための形態学的構造の選択は、顕微鏡７５０に接続されたＣＣＤカラービデオカメラ７５８（Ｓｏｎｙ、マサチューセッツ州ケンブリッジ）を使用して録画しかつビデオテープ（ＶＣＲ）７６４に保存し、それからフレームをディジタル化した（ＰＣＶｉｓｉｏｎ－ｐｌｕｓ、Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、マサチューセッツ州ベッドフォード）。

【００９５】

近赤外（８３０ｎｍ）レーザー光はAr^{+}レーザー７４２－ポンピングＴｉ：サファイアレーザー系７４４（Ｃｏｈｅｒｅｎｔ　Ｉｎｎｏｖａ　９０／Ｓｐｅｃｔｒａ　Ｐｈｙｓｉｃｓ　３９００Ｓ、Ｃｏｈｅｒｅｎｔ、カリフォルニア州サンタクララ）により生成させた。レーザー出力は帯域通過フィルタリングし７４６（Ｆ１）（Ｋａｉｓｅｒ　Ｏｐｔｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　ＨＬＢＦ、ミネソタ州アナーバー）、そして５０～１００ｍＷのサンプル７５６上のレーザー出力で、調節可能な鏡（ｍ１）７４８およびダイクロイックビームスプリッター（ｍ２）７５４を使用してサンプル上に集中させた。組織サンプルから発射される光を同一の対物レンズにより収集し、ビームスプリッターを通過させ、そして取り外し式の鏡（ｍ３）７５２によりピンホール（Ｐ：１００μｍ直径）を通過させた。この鏡を使用し、サンプルから発射される光を分光計／ＣＣＤ系若しくは白色光画像をビデオカメラ系のいずれかに向けた。ＣＣＤ／分光計に向けられた光はその後、ノッチフィルタリングしてＲａｙｌｅｉｇｈ散乱光（Ｆ２；Ｋａｉｓｅｒ　Ｏｐｔｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　ＨＳＮＦ）を排除し、そして色消しレンズ（Ｌ）を用いてＣｈｒｏｍｅｘ　２５０ＩＳ／ＳＭ分光器－モノクロメーター（Ｃｈｒｏｍｅｘ、ニューメキシコ州アルバカーキ）に集中させた。分光器７６６は、－１１０℃に冷却した裏面照射型の深空乏型ＣＣＤ検出器７６８（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、ニュージャージー州プリンストン）上の回折格子分散光を包含する。ＣＣＤインターフェース（ＳＴ１３０、Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）を、データ処理および記憶を実施するＷｉｎｓｃｏｐｅソフトウェア（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、バージョン１．４．３）を使用するパーソナルコンピュータ７７４に接続した。１００～２０００cm^{-1}（８cm^{-1}分解能）の範囲にわたって最低３個のラマンスペクトル（サンプリング時間１０と１００ｓとの間）を、選択した各部位から得た。

【００９６】

共焦点ラマン顕微分光計の光収集若しくはサンプリング体積の推定方法は、個々のコラーゲン線維のような小さい若しくは薄い微視的構造からラマンスペクトルを収集するのに十分な分解能を保証するために小さな（１～２μm^{3}）収集体積を使用する。要約すれば、１．０μｍ直径のポリスチレンビーズ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ、フィラデルフィア州ワリントン）を集中させたレーザー光線により移動させ、そしてラマンシグナルをレーザー焦点の中心に関するビーズ位置の関数として収集した。水平面での顕微鏡ステージの段階的分解能は１μｍであった。垂直移動を１．１μｍ段階で進めた。ビーズの最大のラマンシグナルを得るように位置を至適化する。側方分解能は、中心位置、およびビーズの中心から１若しくは２μｍの段階を使用してＸ若しくはＹ方向への８位置の１つのラマンシグナルを交互に測定することにより決定する。強い１００４cm^{-1}のポリスチレンのラマンバンドの強度を、平面方向および軸方向の双方でレーザー焦点への距離の関数として測定する。その後、各方向の結果をガウス分布関数と当てはめ、そして集中された光線の直径を半値幅（ＦＷＨＭ）での幅全体から決定する。双方の側方向について直径は約１μ

mである一方、軸方向は２μmである。サンプリング体積は約２μm^3であると計算される。

【００９７】

形態学的構造からのラマンスペクトルのデータ解析は、Ｍｉｃｒｏｃａｌ Ｏｒｉｇｉｎソフトウェア（バージョン４．１０、Ｃｌｅｃｏｍ、英国バーミンガム）を用いて実施する。この解析は、宇宙線の除去、トルエンのスペクトルの特徴を使用する波数シフト較正（Ｍａｌｌｉｎｃｋｒｏｄｔ Ｓｐｅｃｉａｌｔｙ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、ケンタッキー州パリス）および較正済タングステン光源を伴うフィルター／分光計／ＣＣＤ検出器系中の色の変動の補正よりなる。その後、組織スペクトルを適切なスペクトルの減算によりBaF_2若しくはMgF_2のバックグラウンドの寄与率について補正し、そして最小二乗法最小化（ＬＳＭ）によりスペクトルに当てはめられる４位の多項式の減算により組織蛍光について補正する。

【００９８】

各形態学的構造スペクトルは、

$$r_{total} = C_1 r_1 + C_2 r_2 + C_3 r_3 \cdots \quad (4)$$

［式中ｒはラマンスペクトルである］として、１２種の生化学的成分のそれぞれについての部分的なフィットの寄与率（C_1）を生成させるための単純な一次結合参照を使用して７００～１８００cm^{-1}のラマンシフト範囲でモデル化する。７００～１８００cm^{-1}のラマンシフト範囲は、この範囲がほとんどのスペクトル情報を含有するために選ばれる。

【００９９】

試薬等級の商業的化学物質（Ｓｉｇｍａ、ミズーリ州セントルイス）を使用して、タンパク質（ＩＩＩ型コラーゲン、エラスチン、アクチン、ミオシンおよびトロポミオシン）、非エステル化コレステロール（コレステロール一水和物）、コレステロールエステル（コレステロールリノレエート）、リン脂質（ホスファチジルコリン）、トリグリセリド（トリオレイン）、カロチノイド（β－カロチン）ならびにカルシウム塩（ハイドロキシアパタイトカルシウムおよび炭酸カルシウム）を包含する１２種の生化学的成分の基礎スペクトルとしての使用のためのラマンスペクトルを得る。これら１２種の生化学的成分は、正常動脈組織およびアテローム硬化性斑中で見出される最も普遍的なラマン活動性の生化学種として選択される。加えて、類似の一組の生化学的構成要素が、以前の巨視的組織検査において観察されたスペクトルに対する参照データの良好なフィットを提供した。これらの化学物質からのラマンスペクトルは、形態学的構造からのラマンスペクトルと類似の方法で記録する。

【０１００】

参照データ成分は化学的重量で比較し得ない。多様な形態学的構造中の生化学物質の実際の濃度が未知であるためである。従って、１４４０～１４５５cm^{-1}（タンパク質および脂質中のCH_2結合の結合を表す）のスペクトルの特徴の強度を単一に設定する。この領域中にスペクトルの特徴を欠くβ－カロチン、炭酸カルシウムおよびハイドロキシアパタイトカルシウムのラマンスペクトルは、それぞれ１１５９、１０８０および９６１cm^{-1}のスペクトルの特徴に関して単一に設定する。この参照はこうして、多様な形態学的構造のラマンスペクトルに対するこれらの化学的成分の相対的なフィットの寄与率についての情報を提供する。各生化学的成分のフィットの寄与率は最大（すなわち１）の画分として表す。

【０１０１】

図２８Ａは位相差下で見られる内部弾性板を示す未染色冠動脈切片の顕微鏡写真である。この構造は２１個の冠動脈サンプル中の合計５４部位で検査する。これらのサンプルのうち９個では外部弾性板からスペクトルを収集した。図２８Ｂに、６種の異なる内部弾性板のラマンスペクトルを示す。１６６４および１２６４cm^{-1}のバンドは、エラスチンおよびコラーゲンのような構造タンパク質のそれぞれアミドＩおよびＩＩＩの振動に帰される。１４４９cm^{-1}の強いバンドはタンパク質のCH_2およびCH_3結合モードに割

り当て得る一方、１００４ｃｍ$^{-1}$のバンドはフェニルアラニンによる。１３３６および１１０４ｃｍ$^{-1}$のバンドはデスモシン／イソデスモシンに帰され、そしてエラスチンに特異的である。９３３および８５５ｃｍ$^{-1}$のバンドはプロリンのＣ－Ｃ伸長モードに割り当て得、そしてコラーゲンに存在する。これらの結果は内部弾性板がエラスチンおよびコラーゲン双方を含有することを示す。さらに、視覚的検査でこれらのスペクトルは構造間でほとんど変動を示さず、内部弾性板の生化学的組成が冠動脈サンプル内および間で非常に一貫していることを示す。外部弾性板から得られるスペクトルは内部弾性板から得られるものに同一である。

【０１０２】

図２９Ａは、外膜の結合組織中のコラーゲン線維（長さおよそ１０μｍ、直径およそ２μｍ）を示す位相差顕微鏡写真である。全体で１０サンプル中の１７のコラーゲン線維を検査した。図２９Ｂは３種の異なる動脈サンプルからのコラーゲン線維からのラマンスペクトルを示す。再度、視覚的検査で、外膜（ａ、ｂ）から収集したこれらのスペクトルは、冠動脈サンプル内若しくはそれらのあいだで線維ごとにほとんど変動を示さず、また、内膜のアテローム硬化性病変の線維性被膜（ｃ）中のコラーゲン線維から取ったものに同一である。これらのスペクトルはまた、デスモシンおよびイソデスモシンのバンド（エラスチンに特異的）の非存在を除いて弾性板からのものにも非常に類似している。コラーゲン線維のスペクトルはコラーゲンに特異的な非常に目立つヒドロキシプロリンの寄与（８５５ｃｍ$^{-1}$）もまた含有する。

【０１０３】

図３０は、本発明の好ましい一態様の正常およびアテローム硬化性の冠動脈サンプルの中膜中の平滑筋細胞から記録された４種のラマンスペクトルを示す。合計で３２のスペクトルを１０個の冠動脈サンプルから記録した。視覚的検査で、個々の平滑筋細胞から取ったスペクトル間で有意の差異は観察されなかった。平滑筋細胞のスペクトル中の主スペクトルの特徴は弾性板およびコラーゲン線維のスペクトル中で観察されたものに類似であり、そして１６６０および１６２８ｃｍ$^{-1}$（それぞれアミドＩおよびＩＩＩの振動）、８５３、９４０、１０３４、１３３６ならびに１４５１ｃｍ$^{-1}$（Ｃ－Ｃ若しくはＣ－Ｈ屈曲）、ならびに１００４ｃｍ$^{-1}$（フェニルアラニン）のタンパク質のバンドにより優位を占める。タンパク質が優位の平滑筋細胞、弾性板およびコラーゲン線維のスペクトル間の主な差異は、フェニルアラニン（１００４ｃｍ$^{-1}$）、デスモシン／イソデスモシン（１３３６および１１０４ｃｍ$^{-1}$）ならびにアミドＩＩ（１２６８ｃｍ$^{-1}$）のバンドの強度の変動にある。

【０１０４】

図３１は、本発明の好ましい一態様の外膜中の脂肪細胞（ｆａｔ　ｃｅｌｌ）（脂肪細胞（ａｄｉｐｏｃｙｔｅ））から収集したラマンスペクトルの例を示す。合計で８個の脂肪細胞を６個の冠動脈サンプルから検査した。脂肪細胞から収集したスペクトルは非常に類似であり、そしてエステルのバンド（１７４７ｃｍ$^{-1}$）、不飽和炭素／炭素のバンド（Ｃ＝Ｃ；１６５４ｃｍ$^{-1}$）、ならびに組合さってトリグリセリドを示すＣＨ$_2$／ＣＨ$_3$のバンド（１４４０および１３０１ｃｍ$^{-1}$）により優位を占められる。

【０１０５】

図３２Ａは粥腫斑の内膜中の泡沫細胞の位相差顕微鏡写真である。これらの細胞中の個々の脂質小滴は容易に同定し得る。合計で８個の冠動脈サンプル中の３０個の泡沫細胞を検査した。図３２Ｂに３個の泡沫細胞からのラマンスペクトルを示す（ａ－ｃ）。視覚的検査で同様とは言え、これらのスペクトルはコラーゲン線維、内部および外部弾性板ならびに平滑筋細胞のスペクトルより大きい泡沫細胞のあいだでの変動を示す。より具体的には、泡沫細胞のスペクトルは、とりわけ１１００ｃｍ$^{-1}$より下の多数のバンドに関して弾性板、コラーゲン線維および平滑筋細胞のタンパク質が優位のスペクトルと明確に異なる。７０２、８７８、９２３および９５７ｃｍ$^{-1}$のバンドは、エステル化されていない（遊離）コレステロールおよびコレステロールエステル双方のステロイド核に割り当て得る。１６７１、１４３９、１２９９および１２７０ｃｍ$^{-1}$の強いバンドはＣ＝Ｃ伸長お

よびＣＨ$_2$／ＣＨ$_3$屈曲モードによる。１７３５および１０２６ｃｍ$^{-1}$（コレステロールエステルに特異的）ならびに１０５８および１３２８ｃｍ$^{-1}$（遊離コレステロールに特異的）のバンドの存在は、これらの泡沫細胞がエステル化および未エステル化双方のコレステロールを含有することを示す。以前に論考されたとおり、非石灰化斑中の低下したＣＦ$_{NCR}$は低下した斑の安定性を暗示する。７１９ｃｍ$^{-1}$（対称のコリンの伸長）、７６２ｃｍ$^{-1}$（対称のＯ－Ｐ－Ｏ伸長）および８７８ｃｍ$^{-1}$（非対称のＯ－Ｐ－Ｏ伸長）のバンドはリン脂質の存在を、また、１５２３および１１６０ｃｍ$^{-1}$のものはβ－カロチノイドの存在を示す。しかしながら、泡沫細胞のスペクトルは、外膜脂肪細胞中でみられた１７４７、１６５４、１４４０および１３０１ｃｍ$^{-1}$のトリグリセリドのバンドを欠く。

【０１０６】

合計で、１６個の冠動脈サンプルの３１個の壊死中心領域を検査した。図３２Ｂは壊死中心から収集したラマンスペクトルの２例（ｄおよびｅ）もまた示す。泡沫細胞のスペクトルに類似に、壊死中心内の構造ごとに若干の変動が存在する。しかしながら泡沫細胞および壊死中心からの平均的スペクトルは極めて類似しており、双方の形態学的構造の化学物質含量が極めて類似していることを示す。

【０１０７】

図３３は、粥腫斑の壊死中心の異なる大きさのコレステロール結晶から取ったラマンスペクトルの例を示す。全体で７個の冠動脈サンプル中のコレステロール結晶を検査した。コレステロール結晶のスペクトルの主なスペクトルの特徴は、１６６８ｃｍ$^{-1}$（Ｃ＝Ｃ伸長）、１４４３、１２３８および１２７４ｃｍ$^{-1}$（ＣＨ$_2$、ＣＨ$_3$屈曲）ならびに１１７６および１０８５ｃｍ$^{-1}$（Ｃ－Ｃ伸長）である。１０００ｃｍ$^{-1}$より下のスペクトルの特徴はステロイドに帰され、エステル化されていないコレステロールの存在を示す。主として結晶それら自身若しくは結晶を取り巻く組織の成分中のエステル化コレステロールに対する遊離コレステロールの比の差異を暗示するバンド強度の変動により、個々の結晶からのスペクトル間でわずかにより多い変動がみられた。

【０１０８】

壊死中心領域では、黄色結晶がときに位相差下で同定され得た。図３３（ｄおよびｅ）は２個の異なる冠動脈サンプルからの２個のこうした結晶のラマンスペクトルを示す。合計で３サンプルからのこれらの結晶のうち７個を検査した。主スペクトルの特徴は１５２３および１１６０ｃｍ$^{-1}$にあり、これらはＣ－ＣおよびＣ＝Ｃ伸長によりかつβ－カロチンを暗示する。１４４９および９５６ｃｍ$^{-1}$のバンドの存在を考えれば、これらの黄色結晶は若干の構造タンパク質およびコレステロールエステルもまた含有するようである。

【０１０９】

図３４Ａは石灰化を含有するアテローム硬化性斑の顕微鏡写真である。合計で６個の冠動脈サンプル中の１５個のカルシウム鉱質化を検査した。２個のアテローム硬化性斑中の異なる段階の石灰化を表すラマンスペクトルを図３４Ｂに示す。これらのスペクトルの主な特徴は、それぞれ炭酸カルシウムおよびハイドロキシアパタイトカルシウムを暗示するＣＯ$_3^{2-}$（対称）／ＰＯ$_4^{3-}$（非対称）およびＰＯ$_4^{3-}$（対称）伸長に帰される１０７１および９５９ｃｍ$^{-1}$のバンドである。大型のカルシウム鉱質化（図３４Ｂ、ａおよびｂ）は、壊死中心の微小点状カルシウム鉱質化のもの（図３４Ｂ、ｃ）と異なるスペクトルの特徴を示す。主な差異は、最もありそうには取り巻く壊死中心による脂質および／若しくはリン脂質（１４３３ｃｍ$^{-1}$）に帰される点状カルシウム鉱質化のスペクトル中の付加的な特徴の存在である。

【０１１０】

図３５に具体的に説明されるところの純粋な化学物質の基礎スペクトルを使用して、個々の形態学的構造のスペクトルを生化学的モデルに当てはめた。図３６Ａ－Ｈの各図は、形態学的構造の１つのラマンスペクトル、および生化学的モデルの最小二乗法最小化のフィットの結果を示す。残差（データ－フィット）を同一スケールで示す。泡沫細胞および

壊死中心からのラマンスペクトルが非常に類似であったため泡沫細胞のフィットの結果のみを示す。ノイズの桁でありかつスペクトル間で一貫したパターンを示さない、観察されたスペクトルへのフィットの残差から判断して、各形態学的構造のラマンスペクトル（図Ａ～Ｈ）は１２種の生化学物質の基礎スペクトルを使用して十分に記述される。

【０１１１】

検査した各形態学的構造について、各生化学的成分の寄与を決定した。図３７Ａ～Ｈは各形態学的構造が特徴的な生化学的組成を有することを確認する。一般に、各形態学的構造は、主として、１種若しくはそれ以上のより少なく豊富な生化学的成分と組合せた１若しくは２種の主要生化学的成分から構成される。

【０１１２】

内部および外部弾性板（図３７Ａ）は主としてより少ないコラーゲン成分を伴うエラスチンから構成される一方、正常動脈およびアテローム硬化性病変の線維性被膜双方のコラーゲン線維（図３７Ｂ）は主として少ないエラスチン成分を伴うコラーゲンから構成される。平滑筋細胞（図３７Ｃ）はアクチンおよび少ないトロポミオシン成分によりほぼ完全にモデル化された。ミオシンは全く寄与しなかった。

【０１１３】

外膜脂肪細胞（図３７Ｄ）は、ほとんど独占的に、リン脂質（ホスファチジルコリン）の少ない寄与を伴うトリグリセリド（トリオレイン）を含有する。対照的に、泡沫細胞および壊死中心（図３７Ｅ）は、コラーゲン、リン脂質およびβ－カロチンのより少ない寄与を伴い、主として約２：１の比のコレステロールエステル（リノレエート）および遊離コレステロール（一水和物）を含有する。泡沫細胞は現在のデータで同様のようであり、そして、それらの生化学的組成に基づいて壊死中心と区別し得ない。しかしながら以下の評価においてそれらは区別し得る。例えば、およそ１７５０ｃｍ$^{-1}$のスペクトルの特徴を使用して泡沫細胞を壊死中心と区別し得る。コレステロール結晶（図３７Ｆ）は約３：１の比で遊離コレステロールおよびコレステロールエステルを含有する。黄色結晶（図３７Ｇ）は、コレステロールの少ない寄与を伴いほぼ完全にβ－カロチンからなる。これは、これらの結晶が実際は高濃度のβ－カロチンを含有するコレステロール結晶であることを示すかもしれない。カルシウム鉱質化（図３７Ｈ）は、コラーゲン、トリグリセリドおよび炭酸カルシウムの少ない寄与を伴い主としてハイドロキシアパタイトカルシウムから構成される。

【０１１４】

泡沫細胞および他の炎症細胞の存在もまた斑の不安定性である役割を演じているかもしれない。従って、結晶を含まないコレステロール若しくは泡沫細胞の存在のような形態学的因子が、アテローム硬化性斑の安定性および進行の決定において生化学的組成と同じくらい重要であるかもしれない。

【０１１５】

図３６に示されるとおり、図３５の生化学的モデルは各形態学的構造のスペクトルを十分に記述し、このことは、大部分の不可欠の生化学的成分が参照中に包含されていることを意味する。形態学的構造のスペクトルに対する生化学的基礎スペクトルのフィットの寄与率により示される各構造の生化学的組成は非常に一貫している（図３６Ａ～Ｈ）。最大の生化学的変動は泡沫細胞、壊死中心、コレステロール結晶およびカルシウム鉱質化で見出された。カルシウム鉱質化、コレステロール結晶およびβ－カロチン含有結晶の双方における生化学的変動は（大きさにより反映されるところの）それらの進行段階の差異によるかもしれない。泡沫細胞および壊死中心内の生化学的変動（コラーゲン、β－カロチンおよびコレステロールエステルの差異）の原因はより少なく明らかである。多様な進行段階でのアテローム硬化性斑の脂質組成の変動は、ホモジェナイズ若しくは抽出した組織および培養単球由来泡沫細胞のｉｎ　ｖｉｔｒｏ研究で以前に記述されている。しかしながら、これらの生化学的データは、組織調製の混乱させる影響を伴わないｉｎ　ｓｉｔｕの若しくはｉｎ　ｖｉｔｒｏ細胞培養モデルのアテローム硬化性斑成分解析の結果である。疾患の多様な進行段階でのアテローム硬化性斑中の泡沫細胞および壊死中心のより詳細な

ｉｎ　ｓｉｔｕラマン顕微分光法研究が、この変動の起源をさらに解明するのに役立つかもしれない。

【０１１６】

生化学的モデルは微視的な細胞および細胞外の形態学的構造の生化学的組成に関する価値のある情報を提供したとは言え、それはその限界を有する。このモデルおよび／若しくは参照の主な限界の１つは平滑筋細胞スペクトルのフィットにより具体的に説明された。以前のｉｎ　ｖｉｔｒｏ研究は、冠動脈のような筋肉性動脈の中膜の大多数を含んでなる平滑筋細胞はミオシンよりもおよそ３倍より多いアクチンを含有するが、しかしほぼ等量のミオシンおよびトロポミオシンを含有することを示した。しかしながら、生化学的モデルでのフィットの寄与率は、平滑筋細胞が少量のトロポミオシンを伴いかつ事実上ミオシンを伴わずにほとんど独占的にアクチンを含有したことを示した。これらの予期しない結果は、組織抽出したミオシンとｉｎ　ｓｉｔｕの細胞内ミオシンとの間のミオシンの分光学的特徴のコンホメーションの差異によるかもしれない。加えて、グリコサミノグリカンでみられるとおり、弱いラマン散乱体の寄与が過小評価されているかもしれない。

【０１１７】

観察された変動はまた、参照に包含されていない生化学的化合物の寄与にもよるかもしれない。例えば１分類のコラーゲンのみを包含した。異なる分類のコラーゲンのラマンスペクトルにｉｎ　ｖｉｔｒｏでほとんど差異が観察されなかったため、これは大きな懸念となるはずはない。しかしながら、アテローム硬化性病変が進行する際の増大する架橋により、ｉｎ　ｖｉｖｏのコラーゲンのラマンスペクトルに有意の変化が存在するかもしれない。

【０１１８】

これらの限界にもかかわらず、同一の生化学的モデルを使用する正常およびアテローム硬化症の動脈組織の以前の定量的ラマン分光法による生化学的分析の結果は、標準的分析技術に十分に匹敵した。以前の研究はまた、これらの定量的ラマン分光法の生化学的分析が、非アテローム硬化性または石灰化若しくは非石灰化アテローム硬化性斑のいずれかに動脈組織を正確に分類した診断アルゴリズムの基礎として使用し得ることもまた示している。本発明の好ましい態様の結果は、生化学的モデルの改変を使用して、正常およびアテローム硬化症の動脈組織の細胞および細胞外の形態学的成分の相対的比較を実施し得ることを示す。さらに、別の好ましい態様は、冠動脈のアテローム硬化症の診断を可能にするアルゴリズムの基礎としてこれらの相対的な形態学的比較を使用し得ることを示す。これは、ｅｘ　ｖｉｖｏで正常動脈およびアテローム硬化性斑を正確に分類しかつ将来はｉｎ　ｖｉｖｏで斑の安定性および疾患の進行を予測する目的を伴う定量的ラマン分光法の形態学的分析の開発における第一段階である。

【０１１９】

好ましい態様の生化学的モデル参照を使用して、慣習的分析的技術を使用して単離若しくは精製し得ない無傷の動脈組織中の（泡沫細胞および壊死中心のような）個々の微視的形態学的構造のｉｎ　ｓｉｔｕの生化学的分析を実施するのに使用されるべき共焦点ラマン顕微分光法が具体的に説明される。さらに、多様な形態学的構造は特徴的なラマンスペクトルを有し、それらは期待されるとおり構造ごとに若しくは動脈ごとにほとんど変動せずかつｅｘ　ｖｉｖｏで正常のおよびアテローム硬化症の冠動脈の形態学の相対比較を実施するための形態学的参照の基礎スペクトルとして使用し得る。この非破壊的技術は、最終的には、ヒトにおける斑の安定性および疾患の進行をｉｎ　ｖｉｖｏで評価するため、ならびに動物モデルでの粥腫発生およびｉｎ　ｖｉｔｒｏの細胞培養物中の脂質代謝を研究するために使用されるかもしれない。

【０１２０】

本発明の態様はラマンスペクトルを形態学に関して解読する。例えばラマンスペクトルは形態学的構造、例えば特定の化合物と関連し得る泡沫細胞と関連し得る。さらに、スペクトルの数を、例えば多数の化学物質スペクトルから形態学的構造に関連するわずか８種の独特のスペクトルまで減少させて、それによりフィットの誤差を低下させ得る。本発明

の光ファイバーカテーテル系を使用して脆弱な斑を同定かつモニターするために利用可能である診断法は、化学的組成、形態学的構造、内膜層の肥厚化および上にかぶさるコラーゲン層の薄化についての情報の使用を包含する。好ましい態様はコラーゲンの割合を測定することによるコラーゲンの深さの決定を包含する。さらに、石灰化の存在をモニターし、そしていかなる縁も同定しかつ潜在的な破裂および血餅の指標としてコラーゲンに関して位置を突き止める。以前に論考されたとおり、非石灰化斑中のコラーゲン線維の低下した部分的なフィットの寄与率が不安定な斑の指標である。

【０１２１】

好ましい態様は、組織からのラマン分布を特徴付けることにより系のスループットを完全に利用するような光学系の設計を実施する。該態様は収集効率を至適化し、ノイズを最小にし、そして１秒で高品質のデータを収集することが可能な小直径の高度に効率的なラマンプローブをもたらした。該態様の性能は組織モデルおよびいくつかのｉｎ　ｖｉｔｒｏ組織型を用いたシミュレーションおよび実験により試験され、これらの態様が臨床的に実現可能な技術としてラマン分光法を進歩させ得ることを示す。

【０１２２】

ラマン分光法は疾患を診断しかつ生物学的組織を研究するための価値あるかつ正確なツールであることが判明してきている。分子結合の振動および回転についての詳細な情報を提供するのにレーザー励起が使用される。サンプル中の各化学的部分は独特の分子構造を有するため、その組成は非弾性散乱励起光の分光学的分析により評価し得る。

【０１２３】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ研究はラマン分光法の医学的潜在能力を確立した。事実、ラマンスペクトルは、他の分光学的方法で得ることができない広範な化学的および形態学的構成要素についての特定の情報を提供する能力を有するため、多くの疾患が検討されている。例えば、冠動脈中の不安定なアテローム硬化性斑の破裂は大多数の致死的心筋梗塞の原因である。斑の破裂の見込みが化学的組成に関係することが確立されており、そして、ラマン分光法はこれに基づく大部分の犯人の病変を識別する独特の能力を有するかもしれない。この方法がリアルタイム解析を伴い臨床で成功裏に実施され得る場合は、心血管系疾患の診断および効果的な治療の指導、若しくは悪性腫瘍の特徴付けならびに切除縁をモニターすることによるそれらの完全な切除の確認のような広範な応用にそれを使用し得る。

【０１２４】

多くの医学的応用は、解剖学的考慮によりプローブおよびファイバー束の大きさが厳格に制限される光ファイバーを使用する遠隔サンプリングを必要とする。例えば、冠動脈のアテローム硬化症および乳癌を臨床的に評価する能力は、それらが標準的心血管カテーテル中に組み込まれ得るか若しくは光学的針生検のため構成され得るように直径がおよそ２ｍｍ若しくはそれ未満であるプローブを必要とする。加えて、データ取得時間は多くても数秒に制限されなければならない。

【０１２５】

冠動脈アテローム硬化症に関して、脆弱なアテローム硬化性斑の検出は心事象の予測および予防に決定的に重要である。これらの脆弱な斑は臨床上無症状の血管中に存在し、そして生化学的変化すなわち泡沫細胞、脂質プール、炎症細胞、厚さ６５μｍ未満である薄い線維性被膜および血栓症の存在を特徴とし得る。本発明の好ましい態様は、脆弱な斑を特徴付けるための前述の因子の存在に関して定量的な生化学的情報および形態学的解析を提供するためにラマンプローブを使用する。ラマンスペクトルの使用は狭い振動バンドの使用で分光学上有利であり、化学物質特異的でありかつ情報が豊富である。

【０１２６】

診断上、ラマン分光法の使用は生検が必要とされないため有利であり；また、それは低濃度の分子を直接測定して該分子の化学的組成および形態学的特徴を提供する。ラマン分光法を使用して、斑の安定性を評価し得、疾患の進行をモニターし得、また、斑の退縮および再狭窄を確認することにより治療的介入を評価し得る。

【０１２７】

過去十年にわたって光ファイバープローブの設計において大きな進歩が存在し、ラマン分光法が潜在的に有用な臨床技術であることを示している。低－ＯＨフューズドシリカが、近赤外での使用のための至適のファイバー支持体と決定された。適正な光学的フィルターの必要性は確立されており、そして多数のプローブ構成が探究されている。

【０１２８】

多くは商業的に入手可能なプローブを使用するｉｎ　ｖｉｖｏ研究は、皮膚および他の容易に到達可能な器官に制限されているか若しくは組織の研究に最適化されていない光学系の構成を有するかのいずれかであった。励起波長の選択のような他の困難に加え、最適でないプローブ設計は、実際の臨床使用には長すぎる収集時間をもたらしている。従って、ラマン分光法の臨床的潜在能力を実現することに対する重要な妨害は、ｉｎ　ｖｉｖｏ組織に励起レーザー光を送達しかつラマン散乱光を効率的に収集することが可能な小直径の光ファイバーラマンプローブの開発である。

【０１２９】

ラマンプローブの好ましい態様は、遠隔器官に到達するために可撓性である小さな（およそ２ｍｍ）プローブを包含する。該プローブは、分析に使用されるスペクトルモデルの正確な臨床応用のためにおよそ１秒で高いＳ／Ｎ比（ＳＮＲ）のスペクトルを収集することが可能である。これは安全なレベルのレーザー曝露で達成され、また、スループットおよび効率を最大にしつつ全ノイズ源を最小にすることにより達成される。

【０１３０】

いくつかのノイズ源が存在し、それらは好ましい態様において最小にされる。検出器の暗電荷および読み取りノイズは低温で冷却した電荷結合素子（ＣＣＤ）検出器を使用することにより低下される。励起波長の選択もまたＳＮＲに影響する。多くのラマンプローブ設計で行われるところの７８５ｎｍでの励起は、８３０ｎｍの励起に比較した場合に組織蛍光の最低４倍の増大をもたらす。この増大された蛍光はデータに有意のショットノイズを付加する。より長い励起波長が組織蛍光をさらに低下させるとは言え、ラマン断面が同時に減少される。それらは第四の力に対する励起周波数に依存するからである。さらに、水の吸収係数はより長波長で急速に増大し、それにより浸透の深さを減少させかつシグナルを減弱させる。８３０ｎｍより大きい励起波長はまたＣＣＤ検出器の使用も妨害し、それにより単一の曝露で完全なラマンスペクトルを収集する能力を損なう。

【０１３１】

光ファイバーラマンプローブに特異的な主要な一ノイズ源は、送達および収集ファイバーそれら自身で生成されるスペクトルのバックグラウンドの長い間認識されている問題である。このバックグラウンドは検査されている組織部位からのシグナルより数桁より大きい。それはフューズドシリカコアからのラマン光、不純物および特定の開口数（ＮＡ）のファイバーを製造するのに使用されるドーパントからの蛍光、ならびに多様なジャケット素材からのシグナルより構成される。送達ファイバー中のレーザー光はファイバー中を横切る長い光路長（典型的には３ないし４メートル）による強いファイバーバックグラウンドを生成させる。このファイバースペクトルが組織表面から散乱され、そして収集ファイバーにより組織のラマンスペクトルと一緒に集められる。バックグラウンドはしばしば、組織中への光の比較的短い浸透によりわずかおよそ１ｍｍのサンプルから生成される組織のラマンシグナルを遮蔽する。組織から後方散乱されたレーザー光はまた収集ファイバーにも進入し、追加のファイバーバックグラウンドを生じさせ、そして検出器に達する組織スペクトルの質をさらに損なう。目的のスペクトルを不明瞭にしかつ歪ませることに加え、強いファイバーバックグラウンドはシグナルにショートノイズを付加する。このノイズはしばしば組織のラマンバンドより大きい可能性があり、そして従って、光学的フィルターを使用することにより可能な限り多くのバックグラウンドを除去することが必要である。

【０１３２】

スループットを最適化しかつ収集効率を最大にする好ましい態様のプローブの設計での他の考慮は２成分を有する。第一のものはラマン効果の固有に弱い性質に関する。１０億

個の励起光子ごとからおよそわずか１個がラマン光子に変換される。従って、臨床上現実的な時間枠での正確な分析に十分なＳＮＲをもつシグナルを収集するためにハイスループット光学系を設計することが決定的に重要である。第二の成分は組織それ自身の光学的特徴に関する。目的のシグナルは、励起レーザーの吸収および生成されたラマン光を介して直接減弱される。さらに、ラマン光の収集は、大きな面積および角度にわたって光子を広範囲に拡散させる光散乱により混乱される。従って、他の型の分光計若しくは非混濁（ｎｏｎ－ｔｕｒｂｉｄ）サンプルを検査するのに使用される単純なプローブの設計は、本応用に理想的でない。

【０１３３】

好ましい態様は、光ファイバーのバックグラウンドの大部分を除去し、８３０ｎｍの励起を使用し、組織中で生成されるラマン源からのシグナル収集を最大にして数秒若しくはそれ未満（１若しくは２秒）でのデータ収集を可能にし、そして剛性の遠位先端を長さ数ｍｍ未満および直径約２ｍｍ未満に制限しつつ安全なフルエンスレベルで作動する光ファイバーラマンプローブを包含する。

【０１３４】

分析は、検出されたファイバーのスペクトルのバックグラウンドが励起および収集双方のファイバーで等しく生じていることを示している。望ましくないシグナルを抑制するため、２種の異なるフィルター（すなわち送達用に１個および収集用に１個）がプローブの遠位端で必要とされる。送達ファイバーは、ファイバーからのより長波長のスペクトルのバックグラウンドを遮断しつつレーザー励起光を伝播する短波長通過型若しくは帯域通過フィルターで終端する。収集ファイバーは、組織から後方散乱されたレーザー光を遮断しつつ組織のラマンスペクトルを伝播する長波長通過型フィルターすなわちノッチフィルターにより先行される。フィルターは、それらが作用するファイバーのＮＡに対応する角度の範囲にわたってこれらの機能を実施する。

【０１３５】

プローブの遠位端にフィルターを適応させるために、好ましい態様はフィルターモジュールを包含する。このモジュールは、また一平面上にロングパス誘電体コーティングを運搬するチューブ中に嵌合された、一平面上にショートパス誘電体フィルターコーティングを運搬するロッドよりなる。集成前にそれらのそれぞれのフィルターとともに別個に被覆されかつ例えばコロラド州ボールダーのＲｅｓｅａｒｃｈ　Ｅｌｅｃｔｒｏ－Ｏｐｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．により二次加工されるサファイア若しくはフューズドシリカのいずれかから作成されるロッドおよびチューブが好ましい態様で使用される。ロッドは構成部品間の光学的隔離を提供することによりクロストークを予防するために金属製の薄いシートで包まれ若しくは被覆される。該モジュールはファイバー束と収集光学系との間にプローブの遠位端に配置される。好ましい態様のラマンプローブで使用されるフィルターの性能曲線を図５に示す（０ｃｍ－１＝８３０ｎｍ）。ピーク伝播は典型的には９０％より大きい一方、望ましくない光の拒絶は９６％より大きい。

【０１３６】

一般に、光学系のスループット（すなわちエタンデュ）はその収集面積（Ａ）および投影される立体角（Ω’）の積により与えられ、ここで

$$\Omega' = \pi \sin^2(\theta) \qquad (5)$$

かつ、光学軸に関して測定される収集の半角値（θ）について評価される。全部の光学系構成部品の反射および伝播の喪失（容易に至適化される因子）と一緒にファイバーカップリングの限界を無視すれば、系の収集能力はその最大の制限要素のスループットにより制限され、そしてこの量は系全体で保存される。

【０１３７】

理想的な分光法の系においてスループットは分光器／ＣＣＤ検出機器により決定される。好ましい態様において、分光器は$\Omega'_D = 0.225$ srのようなＮＡ＝０．２７８を有する（Ｈｏｌｏｓｐｅｃ　ｆ／１．８ｉ、Ｋａｉｓｅｒ　Ｏｐｔｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．、ミネソタ州アナーバー）。これは、また８ｍｍの高さも有しかつ従って

スループットを損なわない裏面照射型の深空乏型ＣＣＤ検出器（Ｓｐｅｃ－１０：４００ＢＲ、Ｒｏｐｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ニュージャージー州トレントン）に接続される。生物学的ラマン分光法に十分なスペクトル分解能（およそ８ｃｍ$^{-1}$）を達成するために、分光器の入口で０．２ｍｍのスリット幅を使用する。従って、収集の最大面積ＡＤ＝１．６ｍｍ^{2}であり、検出系についてＡ$_{D}$Ω’$_{D}$＝０．３６０ｍｍ^{2}－ｓｒの理論上の最大スループットをもたらす。ラマン光源からの光の検出はこの積により制限され、また、収集光学系は系のスループットを保存するように設計される。

【０１３８】

組織中の拡散散乱は、それぞれ特定の分布を伴う大きな面積および４πの立体角にわたるラマン光の発射をもたらす。こうした光源からのシグナル収集の至適化は２段階を必要とする。第一に、混濁媒体から出るラマン光の分布を決定する。この分布は、収集の面積（若しくは角度）が変動される際にスループットの制約内での所定のラマン光源についての潜在的な光収集効率を規定する。これらの特性を使用して、収集光学系の設計のための効率を最大にするように、収集立体角と面積との間の至適のトレードオフを決定する。

【０１３９】

光ファイバープローブについて、該プローブの遠位端の光学系はまた、分光器と同一のＮＡを有するように選ばれる収集ファイバーへの効率的なカップリングのためラマン散乱光を変換するようにも設計する。さらに、シグナル収集を至適化するために、収集ファイバーに利用される遠位プローブ先端の面積を最大にすることが必要である。これは、分光器／ＣＣＤにより適応され得かつプローブ直径中に組み込まれ得るものまでの可能な限り多くの収集ファイバーの緊密に充填された環により囲まれる単一の中央励起ファイバーを使用することにより達成される。その後、遠位端のファイバーの円形束を、分光器への接続のため近位端で一列の直線に再成形する。

【０１４０】

励起光学系の適正な選択もまた決定的に重要である。フューズドシリカ光ファイバー中で生成されるバックグラウンドの強度はＮＡの二乗に比例するが、しかしコア直径に比較的依存しない。従って、収集ファイバーのＮＡを分光器に一致させることが望ましいとは言え、より小さいＮＡをもつ励起ファイバーを使用することが好ましい。このＮＡを低下させることはまた遠位端での減少されたビーム発散も提供し、それによりショートパスフィルター性能を向上させる。結果は、非常に小さいＮＡ（０．１２）をもつファイバーが、おそらくクラッドで使用されるドーピング素材から生成される実質的に増大された広帯域ファイバーバックグラウンドを表すことを示す。従って、中程度のＮＡ（０．２２）を使用することが最も効果的である。その場合、効率的な収集を助長するようにスポットサイズを制限しつつ組織での安全な照明フルエンスを確実にするのに適切な励起ファイバー直径を選び得る。

【０１４１】

至適の収集形状の決定は組織からのラマン光の分布の特徴付けを必要とする。この光源は光源半径ｒおよび発射角θ双方への回旋状の依存を伴う表面から発する所定の輝度Ｂ（ｒ，θ）を有する。組織からの収集に利用可能なラマン光の総量は

【０１４２】

【数２】

$$I_{Raman}(r,\theta) = \iint_{A_S\Omega_S} B(r,\theta)\,dA\,d\Omega, \qquad (6)$$

【０１４３】

により与えられ、ここでｄＡ＝（２πｒ）ｄｒおよびｄΩ＝２πｓｉｎ（θ）ｄθ。該積分は光源の全面積および立体角に持ち越され、その後者は後方散乱の幾何学について２πに制限される。

【０１４４】

Ｂ（ｒ，θ）が個別の分布Ｂ$_1$（ｒ）（励起光からの半径方向距離のみの関数）およびＢ$_2$（θ）（正規表面（ｓｕｒｆａｃｅ　ｎｏｒｍａｌ）からの角度にのみ依存する）に独立に分離し得ることが想定される場合には、それぞれを実験的に測定し得る。これらの分布を使用して、

【０１４５】

【数３】

$$I_{Raman}(r,\theta) \approx \int_{A_S} B_1(r)dA \int_{\Omega_S} B_2(\theta)d\Omega = I_1(r)I_2(\theta) \qquad (7)$$

【０１４６】

［式中Ｉ$_1$（ｒ）およびＩ$_2$（θ）は組織から発する積分済放射状および角度分布である］

のように、光源から発射される光を近似する。

【０１４７】

このラマン光源についての光学系の効率は、光源から発射される光全体により正規化されかつスループットの保存により制約される収集光学系の特性にわたって放射状および角度の輝度を積分することにより計算する。この生じる効率曲線

【０１４８】

【数４】

$$\eta_T(r,\theta) \approx \eta_1(r)\eta_2(\theta) = \frac{\int_{r=0}^{r_c} rB_1(r)dr}{\int_{r=0}^{\infty} rB_1(r)dr} \bullet \frac{\int_{\theta=0}^{\theta_c} \sin(\theta)B_2(\theta)d\theta}{\int_{\theta=0}^{\pi/2} \sin(\theta)B_2(\theta)d\theta} \qquad (8)$$

【０１４９】

を使用して、収集半径と立体角との間の至適のトレードオフを指定することによりプローブ光学系の設計を導く。角度効率η$_2$（θ）はスループットの保存を使用することにより半径の関数η$_2$（ｒ（θ））に変換し得、総収集効率の単一変数関数η$_T$（ｒ）をもたらす。

【０１５０】

アテローム硬化症を診断する応用により導かれて、動脈組織からのラマン光の放射状および角度分布を検査した。正常動脈組織が典型的にその光学特性（例えば散乱および吸収係数）ならびに相対的ラマン断面により他の動脈疾患状態に比較して最も弱いシグナルを表すためにそれを使用した。

【０１５１】

ラマン光の空間的分布Ｂ$_1$（ｒ）の特徴付けを本発明の好ましい態様で決定した。簡潔には、小型プリズムを介して８３０ｎｍの励起を集中させかつサンプルに向けた。励起スポット直径はおよそ１００μｍでありかつサンプルはリン酸緩衝生理的食塩水（ＰＢＳ、ｐＨ７．４）を含有するクォーツ製キュベット中に保持した。１４°ないし３３°の角度範囲でカセグレン対物レンズにより後方散乱光を収集した。ラマン光のこの範囲全体を収集し、平行にしかつノッチフィルタリングしてＲａｙｌｅｉｇｈ散乱光を排除した。単一の１００μｍの中心光ファイバーは、２５０μｍのステップサイズでビームを側方に横切り移動させて（ｔｒａｎｓｌａｔｅ）離れた空間領域の画像を収集した。該対物レンズからの拡大を説明して、これはサンプル表面でのおよそ１０４μｍのステップサイズに対応する。ファイバーをｆ／１．８分光器に接続しそして光をＣＣＤ検出器上に分散させた。－ＣＨ$_2$屈曲モードからの１４５０ｃｍ$^{-1}$のラマンバンドの強度を積分し、最大シグナルに正規化し、そして励起光源からの放射状方向の距離の関数としてプロットした。励起ビームのいずれの側での結果もほぼ対称であり、そして、２つの側についての平均Ｂ$_1$（ｒ）を図３９Ｂ（○）に提示する。

【０１５２】

この放射状分布を多ガウス分布に至適に当てはめ（図３９Ｂ、線）、

【０１５３】

【数５】

$$B_1(r) = 0.348e^{-r^2/0.025} + 0.113e^{-r^2/0.200} + 0.557e^{-r^2} \qquad (9)$$

【０１５４】

をもたらす（ｒはｍｍ）。最初の項により表される狭い分布は、最も強いラマンエネルギー分布を生じさせる弾道レーザー光により生成されるラマン光に関することがありそうである。他の項は動脈組織の層構造によってもまた影響される拡散光の原因である。その後、このデータを積分しかつ正規化して、期待されたガウス分布依存性（線）を示す最小二乗法フィットと一緒に励起ビームからの距離の関数として（○）図３９Ｃに示される放射状の収集効率η_1（ｒ）を決定する。

【０１５５】

角度分布は開放（ｏｐｅｎ－ａｉｒ）光学系のラマン系のわずかな改変を用いて決定した。別個の角度分布B_2（θ）を測定するよりもむしろI_2（θ）を直接測定した。簡潔には、８３０ｎｍの励起光が収集レンズとサンプルとの間の小さな鏡により組織上に直接入射した。ノッチフィルタリング前にビームを平行にするｆ／１．２カメラレンズにより後方散乱ラマン光を収集しそしてその後ＣＣＤ検出器による検出のためｆ／＃整合レンズを介してｆ／４分光器上に集中させた。励起光はおよそ１００μｍ直径まで集中させ、また、収集半径はおよそ１ｍｍであった。収集レンズは、収集角度の変動および積分済角度ラマン分布の直接測定を見込む開き絞り虹彩により先行された。図４０Ｂは組織からのラマン光の実験的に決定されたη_2（θ）（○）をプロットする。分布はレンズにより収集される制限された角度により２０°付近で平坦となる。組織から出る光は一般にｃｏｓ（θ）すなわちランバーティアン依存に従い、式中θは正規表面に関する角度である。積分済分布は従って図４０Ｂ中にもまたプロットされる（線）$\sin^2$（θ）依存を有するはずであり、収集角度の範囲にわたる実験と理論との間の理にかなった良好な一致を示す。

【０１５６】

図３９Ｃおよび４０Ｂからη_1（ｒ）および変換されたη_2（θ）→η_2（ｒ（θ））の積を取ることは、系のスループットおよび組織のこの特定の組合せについての効率曲線η_T（ｒ）（図４１）をもたらす。８．６２％という至適の効率は、０．１９１ｍｍの収集半径および対応する９０°の角度で発生する。これは、分布の縁でより弱いテーリングに伸長しつつより小さい範囲の角度を収集するよりもむしろ最も強い照明領域からのラマン光の完全な角度範囲を収集することが好ましいことを示す。

【０１５７】

その後、ラマン光源の特徴付け研究の結果をＺｅｍａｘ　ｖ．１０．０、アリゾナ州トゥーソンのＦｏｃｕｓ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．により提供される光学的設計基準に組み込み、光ファイバーへの効率的なカップリングのための集められた光の最大のシグナル収集および変換に最適な光学系を決定する。これらの特定のパラメータ近くで作動するように洗練された光学系を設計することが可能であるとは言え、所定の応用により課せられる空間的制約が構築をひどく困難にするとみられる。事実、Ｚｅｍａｘを用いた検討は、高い屈折率を使用する場合に単純なボールレンズの使用が理にかなった性能をもたらすことを示した。いくつかの支持体が検討され、そして、最も高屈折率のガラスがドーピング素材により極めて蛍光性であることが決定された。しかしながら、屈折率が１．７７であるサファイアは広角の収集を見込む。サファイアは蛍光を表さず、単一の鋭いラマンバンドのみを有し、そして非常に広範な波長領域を通じて光学的に透明である。加えてサファイアは極めて硬質であり、従ってそれを複数回使用のラマンプローブに対する優れた選択とする。

【０１５８】

生じるラマンプローブの設計を図４Ａおよび４Ｂに提示する。左側はプローブ先端の長

軸方向図を示す一方、右側はファイバーとフィルターの界面の水準での断面図を示す。収集ファイバーとのクロストークを防止するための光学的隔離のためのアルミニウム製ジャケットをもつ中央励起ファイバーが存在する。このファイバーはショートパス励起ロッドとレジストレーションに配置される。ロッドはロングパス収集フィルターチューブの内側に配置され、２者は金属製スリーブにより光学的に隔離される。その後、励起ファイバーは、レジストレーションされている収集ファイバーのロングパスフィルターチューブの中央との適正なアライメントを確実にするように緩衝される。中央励起ファイバーは０．２２のＮＡを伴う２００μｍのコアを有する。収集ファイバーもまた２００μｍのコアを有するが、しかし０．２７のＮＡ（分光器のものに緊密に整合されている）を有する。フィルターは、屈折率整合光学的セメントでファイバーに固定され、そしてファイバー束／フィルターモジュール全体は接続および保護のためのブラックテフロンで包まれる。プローブ長は４メートルである。

【０１５９】

フィルターロッドおよびチューブは長さ１ｍｍであり、サファイアボールレンズの適正な空間配置を確実にする。この形状は２つの考慮を取り扱う。第一に、このファイバーとレンズの分離では、励起光は大まかに平行にされかつ組織上の密なスポットに集中されず、それによりサンプルに入射するエネルギー密度を低下させかつ可能な損傷を予防する。第二に、ボールレンズが組織から出る大きな角度分布をファイバーのＮＡ内にある十分に平行にされたビームに変換するため、ラマン散乱光の収集ファイバーへの優れたカップリングが確実にされる。ボールレンズは、ひだ付けステンレス鋼チューブにエポキシで固定され、液体が先端に漏出しないことを確実にする。該ステンレス鋼チューブはその後ファイバー束／フィルターアセンブリに固定される。ボールレンズの収集効率を最大にするために、内表面上で使用される接着剤は存在しない。

【０１６０】

このプローブの総直径は３ｍｍより下である。現在の大きさを制限する因子はボールレンズの直径（フィルターチューブの幅全体を収容するために２ｍｍである）である。分光器のスループットをより完全に利用する収集ファイバーの２個のリング合計２７本のファイバー）をもつラマンプローブを構築するのにこの形状が使用されているため、このフィルターの大きさが選ばれた。実務において、単リングプローブは優れたシグナル収集を提供しかつはるかにより可撓性かつ構築するのが容易であるため、それを使用し得る。最近の研究は、収集効率を大きく低下させることなくプローブの直径を減少させ得ることを示した。中央収集ロッドの直径は構築の容易さのため０．５５ｍｍであるように選んだ。プローブの全構成部品は、外科的処置のための標準的冷気体エチレンオキサイド滅菌に耐え得る医用等級素材から構築される。

【０１６１】

ラマンプローブの設計をシミュレーションによりおよび実験的に試験した。シミュレーション実験はＺｅｍａｘのプローブモデルを用いて実施し、プローブ設計の２局面を検討した。第一に、安全性を確実にするために励起スポット直径を検討した。第二に、多様なラマン光源についての収集効率を検査してある範囲の条件にわたるプローブ性能を決定した。

【０１６２】

励起スポットサイズのシミュレーションの結果を図４２に示す。空中に配置されたプローブを伴う１種（○）およびシミュレーション組織モデルに浸積したプローブを伴う１種（□；よりありそうな臨床での形状）の２構成を検討した。組織モデルは、水の屈折率および人工組織の散乱特性すなわちｇ＝０．９、平均自由光路＝０．２７ｍｍを用いて構築した。図から見ることができるとおり、プローブが空中にある場合、レンズからおよそ１ｍｍ離れておよそ１７５μｍの半値幅（ＦＷＨＭ）へのわずかな集中が存在する。しかしながら、散乱の場合にはビームはボールレンズの表面から直ちに発散し始め、２００μｍ未満のＦＷＨＭより下にならない。このスポットサイズは、臨床の情況で使用されるレーザー出力および曝露時間でのいかなる報告された損傷の閾値よりも十分に下のフルエンス

を生じさせる。データ収集プロトコルは５秒未満の時間におよそ１００ｍＷの励起を使用して設計され、従って典型的に報告されているものよりもはるかに下のフルエンスを生じさせる。

【０１６３】

収集効率を類似の方法でＺｅｍａｘモデルから決定した（図１４）。多様な半径のランバーティアン光源をプローブと接触させて配置し、そして収集ファイバーの近位端から出る光の割合を測定した。これらのシミュレーションについて、２７本の収集ファイバーを伴う二重リングプローブのモデルを実装した。これが分光器のスループットをより完全に利用しているためである。再度、２つの状況を検討した。第一のものはプローブと接触する光源を有したがしかしボールレンズの外表面がいかなる屈折率整合も経験しないようにレンズを空中で維持した（実線を伴う○）。第二のものもまたプローブと接触する光源を有したが、しかし今やレンズおよび光源は双方とも上述されたシミュレーション組織モデル中に浸積した（破線を伴う○）。プローブは小光源について高い収集効率（３５％まで）を表すが、しかし、光源がより大きくなる際に効率は下落した。該組織モデルの結果もまた優れており、プローブが屈折率整合性でなかった場合についてより約１．７５倍より小さい効率を生じさせた。

【０１６４】

光源からの測定されたラマン分布をモデル化しかつプローブの端に配置した、別の好ましい態様の付加的な一構成もまた検討した。これは空気および組織界面についてそれぞれ３．５％および１．７％の収集効率をもたらした。８．６％という最大の収集効率はスループットを完全に利用することから生じるが、しかしながら、光ファイバーを使用することにより分光器スリット領域の５３％のみが使用される。従って、期待される最大の収集効率は４．６％であり、ボールレンズがピーク近くで作動していることを示す。低下したスループットにより引き起こされる同一の５３％により効率曲線を乗算することにより、ボールレンズの効率が４５°の収集角に対応する０．２７ｍｍの収集半径を示すことをみることができる。改善の余地はあるものの、これは優れた収集効率でありかつ実行の容易さは非常に実際的である。

【０１６５】

ラマンプローブの性能を３方法で実験的に試験した。第一に、多様な既知のラマン散乱体を検査してフィルター性能を評価した。第二に、組織ファントムを開発してシグナルおよびバックグラウンド収集に対する散乱および吸収の影響を評価した。最後に、動脈および乳房組織のｉｎ　ｖｉｔｒｏスペクトルを分光学的モデルで収集かつ評価した。

【０１６６】

これらの検討で使用した実験系の図解を図４３に示す。８３０ｎｍのダイオードレーザー（Ｐｒｏｃｅｓｓ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、ユタ州ソルトレークシティ）からの光を２個の円筒形レンズ（ｃ１、ｃ２）により平行にし、帯域通過フィルター（ＢＰ、Ｋａｉｓｅｒ）を通して方向付けし（ｄｉｒｅｃｔｅｄ）、金被覆鏡（Ｍ）により再方向付けし、そして１０倍顕微鏡対物レンズ（Ｎｅｗｐｏｒｔ、カリフォルニア州アーヴィン）によりラマンプローブ励起ファイバーに集中させた。ラマンプローブからの収集ファイバー近位の一列の直線は、光がノッチフィルタリングされ（ＮＦ）、スリット上に集中されかつホログラフィックゲート（ＨＧ）による分散のため再度平行にされる前にそれを平行にするｆ／１．８分光器に入力される。最後に、分散された光を、ラップトップコンピュータとインターフェースされている液体窒素冷却した裏面照射型の深空乏型ＣＣＤ検出器に集中させる。スリット（Ｓ）はデータ取得中のプローブからのレーザーの励起を可能にする。これは患者へのレーザー曝露を低下させかつ使用者に対する安全性を増大させる。さらに、レーザーは、レーザー出力のより正確な制御、レーザー出力のモニタリング、および系の光学系アライメントに依存しない設定レベルにプローブからの出力を自動的に設定するフィードバックループの組み込みのために、コンピュータとインターフェースされる。

【０１６７】

組織ファントム研究は、人工組織の散乱および吸収特性の範囲を模倣するよう設計した

。サンプルは、散乱のための単分散１．０３μｍラテックスミクロスフェア（Ｄｕｋｅ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｃｏｒｐ．、カリフォルニア州パロアルト）、吸収のためのヘモグロビン（Ｓｉｇｍａ、ミズーリ州セントルイス）およびインディアインク（Ｔｒｉａｎｇｌｅ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、ノースカロライナ州ダーラム）ならびに脱イオン水の組合せを使用して調製した。$NaClO_4$のストック溶液を標的ラマン分子として一定濃度でサンプルに添加した。構成要素の多様な組合せを混合して、一定容量ならびにそれぞれ１．３１、１．７９および２．２５cm^{-1}、ならびに２２、２９および３６cm^{-1}の吸収および低下された散乱係数をもつClO_4^-濃度の９個のファントムを製造した。これらの光学特性を生じさせるための濃度はＢｏｈｒｅｎとＨｕｆｆｍａｎのＭｉｅ基準の改変版を用いて決定した。

【０１６８】

ファントムは２”深さ、３／４”幅のガラス製バイアルに入れ、そしてプローブ先端をサンプリング用液体の表面のすぐ下に浸積した。サンプルは磁気攪拌子により連続的に循環させてミクロスフェアの沈殿を予防した。二重リングラマンプローブを用いて１００ｍＷの励起を使用して、１０秒の総積算時間の間、スペクトルを収集した。ClO_4^-の９２８cm^{-1}のバンドを積算してこれらの変動する条件下でのプローブのラマン収集能力を決定した。プローブのバックグラウンドは収集した最大シグナル（およそ４２０cm^{-1}）の強度を検査することにより評価した。バックグラウンドの代替の評価方法は、クォーツのバックグラウンドからの８００cm^{-1}のラマンバンド若しくはサファイアボールレンズにより生じられる７５０cm^{-1}のラマンバンドを積算する。これらの全部は類似の結果を生じた。

【０１６９】

最後に、ｉｎ ｖｉｔｒｏ組織試料を、１００ｍＷの励起出力および１から６０秒までの範囲にわたる収集時間を使用して単リングラマンプローブを用いて検査した。大動脈組織のサンプルは死後に収集した一方、乳房サンプルは外科的切除中に収集した。サンプルを収集直後に液体窒素中で急速凍結しそして検査の時間まで－８５℃で保存した。サンプルは検査前にＰＢＳ浴中で受動的に室温に温まらせた。スペクトルはタングステン白色光源を使用してフィルターおよびＣＣＤのスペクトル応答について補正した。残りのファイバーバックグラウンドは、粗くしたアルミニウム表面で励起光を向けることにより生成されたシグナルを減算することにより除去した。組織蛍光は５位の多項式を減算することにより除去した。最後に、実験室で開発した分光学的モデルにスペクトルを当てはめた。乳房のデータは下述されるモデルに当てはめた一方、動脈のスペクトルは形態学的モデルに当てはめた。残差はデーターフィットとして計算し、そして同一スケールで示す。

【０１７０】

生物学的組織の分光学については６００から１８００cm^{-1}のラマンの特徴が重要である。図４４は、充填された$BaSO_4$（十分に特徴付けられたラマン散乱体）のラマンスペクトルを示す。最小限の後方散乱が存在するために検出されるファイバーバックグラウンドを典型的にほとんど生成させない液体サンプルと異なり、$BaSO_4$は充填される場合に高度に反射性であり、そしてフィルタリングされないプローブ中で強いファイバーバックグラウンドを生成させる。このスペクトルは、５５０cm^{-1}より上ではわずかに増大した傾斜するバックグラウンド以外にファイバーバックグラウンドの検出可能な特徴がほとんど存在しないため、フィルターモジュールの有効性およびプローブの光学的隔離を示す。８００cm^{-1}の強いシリカのバンドさえ認識できない。

【０１７１】

組織ファントム検査の結果を図４５に提示する。過塩素酸（○および実線）ならびにプローブのバックグラウンド（□および破線）からのシグナルを輸送長の関数としてプロットする。プロットされた線は一定の吸収を描き、そして、散乱が増大する際にシグナル収集がどのように増大するかを示すように描かれる。逆に、収集されたシグナルは所定の散乱値についての増大する吸収を伴い減少する。類似の傾向がファイバーバックグラウンドおよびラマンシグナル双方でみられるが、しかしながら、散乱の影響はバックグラウンド

についてより劇的である。

【０１７２】

図４６Ａおよび４６Ｂは、正常大動脈（部位ごとの変動を非常にわずかしか示さない組織型）を見ることによる、単リングラマンプローブの性能と前述された実験系との間の比較である。該実験系は、微小光学系の要求により制約されない開放の光学系の構成であり、そして多くの有用なラマンスペクトルモデルを開発するために使用されてきた。

【０１７３】

図４６Ａは、同等な励起出力および収集時間を伴う開放の光学系（点）および単リングラマンプローブ（線）で取ったデータを示す。該データは系のスペクトル応答およびＣＣＤ検出器のゲインについて補正されている。組織の蛍光バックグラウンド上のラマンバンドを分離することは困難であるとは言え、－CH_2屈曲の１４５０ｃｍ$^{-1}$のバンド若しくはフェニルアラニンによる１００４ｃｍ$^{-1}$のバンドの観察結果は、ラマンプローブからのわずかに増大したシグナル収集を示す。ラマンプローブ中の効率的なフィルタリングにもかかわらず、このデータで観察されるプローブのバックグラウンドのなお若干の証拠が存在する。$BaSO_4$と異なり、組織からのラマンシグナルが極めて弱いためである。しかしながら、図４６Ｂは、ファイバーバックグラウンドおよび組織の蛍光を減算した後の結果を示す。ファイバーバックグラウンドの全部のスペクトルの特徴が正確に除去されており、そして、正常大動脈のこれらのスペクトルは、サファイアボールレンズからのラマン散乱による７５０ｃｍ$^{-1}$のピーク、およびレンズを固定するために使用したエポキシからの１６００ｃｍ$^{-1}$の直ぐ下の小さなピーク以外はほぼ同一に見える。ラマンプローブからの生データ中のわずかに増大したバックグラウンドにもかかわらず、平均して、２種の処理されたスペクトルはプローブの増大された収集効率のため同一のＳＮＲを有する。二重リングバージョンのラマンプローブは、該実験系を上回る大きく高められた性能を示す。

【０１７４】

ここでは、弱くラマン散乱する正常大動脈が均質であるためにそれを評価した。より高度に散乱する組織での実験は、該プローブが正常組織についてよりも実験的すなわち実験室の系でなおより良好な性能を示すことを示唆する。しかしながらこれらの差異は組織の不均質性のため直接比較することが困難である。

【０１７５】

好ましい態様のラマンプローブは、臨床上適切な時間尺度で組織の解釈可能なスペクトルを収集する能力を提供する。図２Ａ～２Ｃおよび４７Ａ～４７Ｂは１００ｍＷの励起を用いてわずか１秒で該ラマンプローブで収集された処理済みスペクトルを示す。データは点で提示し、モデルのフィットを重なる線で示し、また、残差は同一スケールで下にプロットする。図４７Ａは正常乳房組織のスペクトルを示す一方、４７Ｂは悪性乳癌のものを示す。低下されたシグナル収集を伴うスペクトル（すなわち正常大動脈および悪性乳癌）についてさえモデルのフィットは優れており、そして残差に残存する全部の特徴はノイズである。

【０１７６】

光ファイバープローブについて、シグナルを最大にすることは、本発明の好ましい一態様の分光器／ＣＣＤ検出器系の制約内で収集効率を至適化することを伴う。これは、ラマン光の収集に利用可能なプローブの面積を最大にすること、および収集光学系の適正な設計のためにラマン光源を特徴付けすることによりなされる。ノイズの最小化は本発明の好ましい一態様によるいくつかの考慮もまた必要とする。第一に、ＣＣＤ検出器からの固有のノイズ源は極低温に冷却した裏面照射型検出器を使用することにより低下される。第二に、励起波長は組織蛍光からのショットノイズを最小にするように慎重に選択した。生物学的サンプルについて、８３０ｎｍの励起が理想的であることが判明している。最後に、光ファイバープローブの場合、その関連するショットノイズを低下させるために、ファイバーバックグラウンドを可能な限り排除する。

【０１７７】

本発明の好ましい一態様のラマンプローブで使用される二目的フィルターモジュールは、残りのバックグラウンドが一旦除去されれば、最小のスペクトルの歪みが存在するレベルまでファイバーバックグラウンドを効果的に低下させる。数種の組織型の高品質スペクトルは、組織損傷閾値の十分に下の励起出力を使用してわずか１秒で収集し得る。図２Ａ～２Ｃおよび４７Ａ～４７Ｂに具体的に説明されるフィットからの残差の大きさは組織から収集されたラマンシグナルの強度に依存するが、しかし、大部分の場合はそれらは純粋にノイズであり、そしてスペクトルの構造を示さない。これに対する唯一の例外は非石灰化アテローム硬化性斑についてであり、その場合はデータとモデルとの間のスペクトル分解能の矛盾により残差に若干の小さな構造が存在する。

【０１７８】

ファントム研究からの結果は、該プローブが励起およびラマン光双方の減弱による増大された吸収を伴い収集を減少させたことを示す。増大された散乱とともに、より大きなシグナル収集効率が観察される。高度に散乱するサンプルからのこの増大されたシグナルは、ボールレンズが最も効率的に収集する励起ビームにより近くに制限されているラマン光源の結果である。ファイバーのバックグラウンドについての類似の傾向もまた観察されているが、しかし散乱の影響はより強められている。従って、ラマン散乱体の濃度および断面が一定である場合は、多様な散乱および吸収特性をもつ組織についてわずかなＳＮＲ変化のみが見られる。加えて、とりわけサファイアボールレンズからのバックグラウンドシグナルのさらなる解析は、サンプルの散乱および吸収特性についての内的較正をもたらして疾患の診断についての付加的情報を生じさせるかもしれない。

【０１７９】

本発明の好ましい一態様の単一リングプローブはプローブ直径を低下し得る。より小さい直径は、プローブ中のファイバーの数が低下されてそれにより収集面積を低下させなければならないことを意味する。しかしながら、ファイバーの数が減少される際に、それらはまた、最強の散乱が起こる励起ビームにより近づけられる。また、ボールレンズの直径の減少はより大きなレンズの湾曲をもたらし、それはラマン光源のより中央の領域からの増大された収集につながる。従って、ラマンプローブの収集面積とラマン光源のサンプリング体積との間のトレードオフに関する付加的な効率曲線が存在する。最悪でも該収集効率はファイバーの数とともに直線的に低下するかもしれない。合計９本の収集ファイバーに減少させることは、臨床業務に合理的なＳＮＲを生じさせる１．５ｍｍの総外径および１．２％の収集効率のラマンプローブをもたらす。

【０１８０】

本発明の好ましい一態様のラマンプローブは一般的応用性を有しかつ動脈および乳房双方について十分に能力を発揮する。該設計のモジュールの性質は、標的組織からの所望の空間的および角度分布を収集するのに多様な光学素子を使用し得るようにハイスループット収集のための光学系の特定の選択に関して大きな柔軟性を可能にする。

【０１８１】

側方観察プローブは本発明の好ましい一態様の代替の応用に使用し得る。例えば、角度を付けられかつ鏡を付けられたハーフボールレンズ、プリズム、若しくは微小光学的放物線状鏡の使用が効率的な放射状収集を可能にする。テーパー付き先端は光学的乳房生検のためのニードルプローブへの組み込みを可能にし、また、わずかにより小さい直径は異形成の検出のための乳管内視鏡検査による乳房分析を可能にする。本発明の好ましい一態様のラマンプローブの収集能力により、他の潜在的用途は、皮膚分析、経皮血液被検体モニタリングおよび胃腸癌の評価を包含する。

【０１８２】

図４８Ａおよび４８Ｂは、本発明の好ましい一態様の３ｍｍ未満の総直径を有する臨床的プローブを具体的に説明する。

【０１８３】

本発明の好ましい態様は臨床データの収集に使用されている。レーザー出力較正はテフロンを用いて設定され、かつ、およそ１００ｍＷであり、そして８２～１３２ｍＷの間の

範囲にわたる。血管内視鏡と同様に手術室中を消灯した。末梢血管手術中にデータを収集した。頸動脈の動脈内膜切除術中に粥腫のスペクトルを収集した。大腿動脈バイパス手術中に吻合部位および後動脈壁のスペクトルを収集した。

【０１８４】

図４９Ａおよび４９Ｂは、本発明の好ましい一態様の正常動脈の内膜線維増殖の臨床データを具体的に説明し、ここで図４９Ａは取得したラマンスペクトルでありかつ図４９Ｂは対応する組織学を具体的に説明する。スペクトルは動脈壁に対して直交に保持されているプローブで合計５秒間収集した。それぞれ０．２５秒の２０の蓄積が存在した。１秒および５秒双方のデータを解析した。全データは１秒間積算した。

【０１８５】

図５０Ａ～５０Ｃは、本発明の好ましい一態様の粥腫斑の臨床データを具体的に説明し、ここで図５０Ａはラマンスペクトルを、また、図５０Ｂおよび５０Ｃは対応する組織学の動脈を具体的に説明する。収集した全臨床データに、正常動脈に関してと同一のデータ解析方法を適用した。図５１Ａおよび５１Ｂは、本発明の好ましい一態様の石灰化斑について取得した臨床データを具体的に説明し、ここで図５１Ａはラマンスペクトルを、また、図５１Ｂは対応する組織学を具体的に説明する。図５２Ａ～５２Ｃは、本発明の好ましい一態様の破裂した斑について取得した臨床データを具体的に説明し、ここで図５２Ａはラマンスペクトルを、また、図５２Ｂおよび５２Ｃは対応する組織学を具体的に説明する。図５３Ａ～５３Ｃは、本発明の好ましい一態様の血栓を伴う石灰化斑について取得した臨床データを具体的に説明し、ここで図５３Ａはラマンスペクトルを、また、図５３Ｂおよび５３Ｃは対応する組織学を具体的に説明する。

【０１８６】

【表３】

表3

ﾓﾃﾞﾙ成分	内膜線維増殖	粥腫斑	石灰化斑	破裂した斑	血栓斑
ｺﾗｰｹﾞﾝ(%)	9	0	7	0	0
ｺﾚｽﾃﾛｰﾙ(%)	0	44	2	27	14
石灰化(%)	0	16	71	1	12
弾性板	0	4	3	0	0
外膜脂肪(%)	50	13	0	1	0
脂質中心(%)	13	16	0	0	0
β-ｶﾛﾁﾝ(%)	0	7	4	23	13
平滑筋(%)	28	0	12	47	61
ﾍﾓｸﾞﾛﾋﾞﾝ(自由裁量単位)	3	0	0	13	27

【０１８７】

表３は多様な動脈状態を表す臨床データの解析の結果であったモデル成分を具体的に説明する。

【０１８８】

図５４は、本発明の好ましい一態様の単一の中央励起ファイバー１９０２を包含する側方観察ラマンプローブ１９００を具体的に説明する。該ファイバーの緩衝層は適正なファイバー／フィルターのレジストレーションを助長するように励起フィルターロッド１９１６の直径に整合され、かつ、収集ファイバー１９０８からの光学的隔離を提供するためのアルミニウム製ジャケット１９１０を有する。該側方観察プローブの構成は図４Ａ～４Ｄに関して記述された前方観察プローブに類似である。プローブ１９００は送達および収集

ファイバー中のファイバーのラマンバックグラウンドを最小にしかつ好ましくは除外するための誘電体フィルターを包含し、また、収集誘電体コーティングを運搬するチューブ１９１２に嵌合されたロッド１９１６を包含する。該モジュールは、ハーフボールレンズ１９１８を有する光線を平行にするためファイバー束とレンズ系との間にプローブの遠位端に配置される。該プローブの直径はおよそ１．５ｍｍであり、そしてそれの周囲に配置された鞘を有する。

【０１８９】

図５５Ａ～５５Ｃは本発明の好ましい一態様のシグナル収集に対する血液の影響を具体的に説明する。

【０１９０】

図５５Ａは本発明の好ましい一態様のラマンプローブを有する系を使用して収集した生データを具体的に説明する。

【０１９１】

図５５Ｂは蛍光が一旦除去されたスペクトルを具体的に説明する一方、図５５Ｃはデータが一旦正規化かつ処理されたスペクトルを具体的に説明する。石灰化動脈を血液で灌流してシグナル収集に対する血液の影響を確かめた。血液スペクトルは動脈スペクトルの１０％未満であり、また、血液の存在による吸収および散乱は動脈シグナルをおよそ１／３だけ減少させる。

【０１９２】

図５６は、本発明の好ましい一態様の臨床実務で使用し得る系の図解を具体的に説明する。示される態様は、シャッター２００２により切り替えられかつ内視鏡２００８の生検チャンネルに挿入されたラマンプローブ２００６中にレンズ２００４で集中されるレーザー出力２００１を使用して、それが領域２０１２にわたって組織を照明し得るように組織部位２０１０にそれを送達する。収集光学系２２３１は、プローブから分光器／ＣＣＤの組合せであるプロセッサ２２３６へのラマンシグナルの戻りを提供する。ラマンシグナルおよび内視鏡カメラは系２２３６中で個別に操作される。

【０１９３】

内視鏡カメラ２２２０は、広帯域キセノンアークランプ２２２４からそれ自身の光ファイバー照明器２２２２によりその白色光照明を得る。コンピュータ２２３０の制御２２３２下の非標準的シャッター２２２８を取り付け得る。画像シグナル２２３４はプロセッサ２２３６により処理されて標準的ビデオシグナル２２３８（コンピュータ２２３０中のフレームグラバによりディジタル化される）を生じ得る。観察された組織の状態に関するその情報を伴う処理された画像シグナル２２４０がモニター２２４２に送信される。診断手順全体は、ケーブル２２４６によりコンピュータに接続されたフットスイッチ２２４４により開始し得る。

【０１９４】

図５７は、本発明の好ましい一態様のｉｎ　ｖｉｖｏラマンスペクトル診断のためのデータの取得において使用される方法２３００の流れを具体的に説明する。上ループ２３０１は無菌手術室中の適正な励起レーザー出力を確実にするために使用する。臨床処置の前に較正スペクトルを取得してシステム性能を特徴付ける。テフロン標準のスペクトルを得て、所望の励起出力をもつ期待されるシグナルを決定する。処置の間に、このフィードバックアルゴリズム内で滅菌済ラマンプローブを用いて同一の滅菌済テフロンブロックのスペクトルを測定する。段階２３１２によるレーザー出力に対する自動化補正を、標的のテフロン強度が得られるまで、若しくは予め決められた閾値出力に達するまで継続する。正しい出力が一旦設定されれば、組織スペクトルの取得が可能にされる。レーザーはデータ蓄積が開始されるまでシャッターにより遮断される。取得の開始は段階２３１６によりシャッターを開放し、段階２３１８によりスペクトルを収集し、そして段階２３２０によりシャッターを閉鎖する。その後、収集されたデータは、スペクトル診断と一緒にリアルタイムで処理かつ表示される。その後システムは次の組織部位を検査する準備ができる。データ取得および処理の詳細は下に提示する。

【０１９５】
図５８は、本発明の好ましい一態様のリアルタイム解析ラマン系で使用されるデータの流れを描く。レーザー、シャッターおよびＣＣＤ検出器の制御は全部、限定されるものでないがＬａｂＶｉｅｗを挙げることができるソフトウェアを用いて達成される。検出器制御のためのドライバはR^3－ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．により提供されるようなソフトウェアに書かれている。いかなるフィルタリングされないプローブバックグラウンドも、アルミニウム製ブロックにより反射される励起レーザー光を収集することにより特徴付けする。系のスペクトル応答は、反射率標準（$BaSO_4$）により拡散的に散乱される較正済白色光源のスペクトルを収集することにより特徴付けする。４－アセトアミドフェノール（タイレノール（Ｔｙｌｅｎｏｌ））のスペクトルをラマンシフト較正のため取得する。
【０１９６】
生の組織スペクトルおよびアルミニウムスペクトルは、双方とも正規化白色光スペクトルでの除算により系のスペクトル応答について補正する。その後、残りのプローブのバックグラウンドを、アルミニウムスペクトルを減算することにより組織データから除去する。組織蛍光は、５位の多項式フィット、または例えば限定されるものでないがフーリエフィルタリング、点差分導関数、スプライン当てはめ、Ｓａｖｉｔｓｋｙ－Ｇｏｌａｙの導関数若しくは重み付け減算を挙げることができるいくつかの他の手段を介して除去する。
【０１９７】
組織の特徴付けは、確立されたラマンスペクトルモデルを用いるデータの通常の最小二乗法当てはめにより実施する。結果として生じるフィット係数を使用して、ロジスティック回帰分析で発生させたｉｎ　ｖｉｔｒｏ診断アルゴリズムに基づく診断を提供する。その後、処理済みデータ、モデルフィットおよび残差（データフィット）を、診断およびフィット係数と一緒にリアルタイムでプロットする。臨床医はリアルタイムデータを使用して診断および処置の決定を行い得る。
【０１９８】
１９９９年には、米国単独でおよそ１７６，０００の乳癌の新規症例が診断され、４４，０００例が死亡をもたらした。過去２０年間に、乳癌をｉｎ　ｓｉｔｕで診断するための光学的技術の使用における増大する興味が存在している。
【０１９９】
ｘ線マンモグラフィーおよび超音波のような現在の方法論は乳房中の密度変化を探す。これらの技術は良性および悪性腫瘍を確実に区別し得ず、そして従って疑わしい病変を検出するためにのみ使用し得かつ診断に使用し得ない。病変が悪性であるかどうかを決定するためには組織生検を実施しなくてはならず、そして乳房生検の７０～９０％は病理学的分析に際して良性であることが見出される。しかしながら、病理学的分析のために組織を取り出す代わりに、疑わしい病変についての診断情報をｉｎ　ｓｉｔｕで提供するためにラマン分光法のような光学的技術を使用することが可能である。上述されたところのラマン分光法は、単色励起光で照明されたサンプルから散乱される光により生成されるスペクトル側波帯を検査する。存在する各化学物質はそれ自身の独特なラマンスペクトルシグネチャを有する。乳房に光ファイバー針装置を挿入することにより、病変からラマン分光学的測定値を収集しかつ化学的情報をほとんど即時に抽出することが可能である。ラマン針装置を使用してこうした情報を得ることは、より客観的かつ迅速な（リアルタイムの）診断および現在使用されている生検技術に比較して患者に対する減少した外傷をもたらす。
【０２００】
ラマン分光法に加えて、いくつかの他の光学的技術が現在探究されている。これらは光学的断層撮影法、光ファイバー乳管内視鏡検査および蛍光分光法を包含する。光学的断層撮影法は可視若しくは近赤外光を使用して乳房の表面上の一点を照明する一方、検出器は他の点での拡散的に反射若しくは伝播された光を記録する。それが乳房を横断する際に光シグナルの減弱に関する情報を提供することに加え、散乱および吸収の情報はまた抽出もされて水、脂質およびオキシ／デオキシヘモグロビン濃度を定量的に測定し得る。良性お

よび悪性腫瘍を区別するためのこの情報の使用は研究中である。さらに、多数の光源および検出器を使用して測定カップを形成し得、三次元画像化を可能にする。

【０２０１】

光ファイバー乳管内視鏡検査は、結腸、子宮頸部および食道のような器官中の癌を検出するために開発された内視鏡を乳管の検査に改造している。大部分の乳房の癌および前癌は乳管および小葉の内層で開始するため、非常に小型のファイバースコープ（直径１ｍｍ未満）を乳頭を通して乳管に導入して管内の異常（主として乳頭状病変）を探す。光ファイバーを介して乳管の内部を照明しかつ見る。該装置を使用して乳管およびその分枝を観察し得る。

【０２０２】

蛍光分光法は、食道、結腸、膀胱および口腔中の癌性病変をｉｎ　ｖｉｖｏで検査するのに成功裏に使用されてきた。乳房の蛍光分光法もまたｅｘ　ｖｉｖｏで研究されており、診断に対する若干の有望性を示しているとは言え、これまでのところ、これらの結果の後ろにある化学の理解がほとんど存在しない。蛍光に基づく診断は、癌と結びつけられる乳房組織中に存在する内在性の蛍光発色団（主としてコラーゲンおよびＮＡＤＨ）の数により制限される。対照的に、癌の発生と関連付けられている組織中に存在する多くのよりラマン活性の分子、例えばコラーゲン、フィブリノーゲン、ＤＮＡ、ハイドロキシアパタイトカルシウムおよび多様なグリコサミノグリカンが存在する。

【０２０３】

ラマン分光法は長年化学分析に使用されてきたが、しかし最近になってのみ研究者たちにそれを生物医学的問題に応用し始めさせた。臨床の情況でラマンスペクトルを取得する能力は、小型ダイオードレーザー、ＣＣＤ検出器およびホログラフィックノッチフィルターのような新技術の開発により可能とされた。これらの構成部品のそれぞれが、以前は達成不可能な医学的診断のための小型の高効率の系の二次加工に貢献している。

【０２０４】

正常、良性（線維嚢胞性疾患）および悪性（浸潤型乳管癌）乳房組織からラマンスペクトルを収集するのに７８４ｎｍの励起を使用して、正常組織中の１４３９ｃｍ$^{-1}$のバンドの１４５０ｃｍ$^{-1}$へのシフトが悪性組織中で観察された（CH_2屈曲モードの化学環境中での変化による）。１６５４（Ｃ＝Ｃ伸長およびアミドＩのバンドの組合せによる）ならびに１４３９ｃｍ$^{-1}$のバンドの面積比を使用することにより悪性組織と正常組織を区別することが可能である。この差異は悪性サンプル中の増大したタンパク質濃度に帰することができる。しかしながらこの検査は良性病変を悪性病変と区別するのに使用し得ない。

【０２０５】

従来技術の検査はホルマリン中に固定された摘出生検試料を使用した。固定過程は主としてコラーゲンタンパク質を架橋して組織を化学的に変え、そして従って組織のラマンスペクトルのシグネチャに影響を及ぼす。ラマン分光法を使用して、凍結されかつ固定されていない組織を使用して組織をｉｎ　ｖｉｖｏで診断し得る。８３０ｎｍの励起を使用する正常、良性および悪性の乳房組織サンプル（およそ０．５ｃｍ^3）のラマンスペクトルは以前に報告されている。このデータの主成分分析は、重要な分光学的特徴に基づく正常、良性および悪性組織の区別を可能にした。しかしながら、主成分分析はこれらの分光学的シグネチャの化学的若しくは形態学的起源の同定を可能にせず、また、その時点でのデータ組がクロスバリデーションには少なすぎた（１３例の患者からの６１サンプル）。

【０２０６】

光ファイバーラマンニードルプローブを使用する乳房組織の臨床測定は、典型的には体積１ｍｍ^{3}の組織領域をサンプリングする。乳房中の癌関連の変化は組織の生化学的および形態学的組成のわずかな変化を伴う。これらの変化は微視的レベルで起こる。結果として、組織の微視的状態への洞察を提供する診断アルゴリズムを開発するために、個々の形態学的成分のラマンスペクトルの特徴を特徴付けることが重要である。その場合、巨視的スペクトルを記述するための構成要素としてこれらの微視的スペクトルの特徴を使用する

モデルを、微視的レベルで該組織の組成についての情報を抽出するのに使用し得る。ラマンスペクトルへの特定の寄与因子を同定することにより、確固たる診断アルゴリズムを開発し得る。

【０２０７】

以前の態様において、ラマン分光法は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで大動脈および冠動脈組織中のアテローム硬化性病変の定量的生化学的解析に使用された。これらの研究において、組織のラマンスペクトルは動脈組織中に存在する主要生化学物質から収集したラマン基礎スペクトルの一次結合を使用してモデル化した。関連するアプローチは、代わりに、大動脈で普遍的に見出される個々の形態学的特徴のラマンスペクトルを基礎としてモデルを作成すること、およびモデル化のための基礎スペクトルとしてこれらを使用することであった。乳癌診断のための類似の形態学的モデルを、本発明の好ましい態様で使用する。

【０２０８】

ある形態学的特徴を表すためにどの化学物質を使用すべきかの決定が非常に困難である可能性があるため、形態学的に派生する基礎スペクトルを主に使用する。例えば、細胞若しくは組織中で見出されるもののような複雑な混合物中の全ての化学物質を同定することは可能でないかもしれない。より重要なことは、コラーゲンのような同定し得る成分が多くの異なる形態でヒト組織中に存在しうることであり、それぞれのものがわずかに異なるラマンスペクトルをもつ。乳房組織中で見出されるコラーゲンは、実際、数種の異なる型のコラーゲンの組合せであるが、しかし、それぞれの型のコラーゲンが個別にモデルに包含される場合、これは過適合（ｏｖｅｒ－ｆｉｔｔｉｎｇ）につながり得る。単一の、形態学的に派生するコラーゲンスペクトルを使用することにより、正常若しくは疾患に罹った組織内のその微小環境中のその化学物質成分の像を得る。最後に、実験室で精製される若しくは商業的供給元からもたらされる化学物質はそれらの天然の状態にない。例えば、コラーゲンのようなタンパク質は腐食性の酸若しくは他の有機溶媒中にさらされていたかもしれない。これらの問題の全部は、乳房組織それ自身から得られるラマンスペクトルを使用することにより回避される。しかしながら、必要な場合は、合成された若しくは商業的に入手可能な化学物質を使用し得る。

【０２０９】

ヒト乳房組織の形態学的モデルが、本発明の好ましい一態様のラマン共焦点微小画像化系を使用して開発される。このモデルは、正常および疾患に罹ったの双方の乳房組織の巨視的サンプル中で観察される分光学的特徴の全部を特徴付け得る。それはそれらの独特のラマンスペクトルにより乳房組織中に存在する形態学的成分を同定し、そして巨視的サンプルの形態学的特徴を記述するためにそれらを構成要素として使用する。

【０２１０】

乳房組織のサンプルは外科的生検試料から得た。サンプルを液体窒素中で急速凍結し、そして分光学的検査まで－８５℃で保存した。その後、サンプルをヒストプレップ（Ｈｉｓｔｏｐｒｅｐ）（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、米国ニューヨーク州オレンジバーグ）を使用してクライオスタットチャック上にマウントし、そしてマイクロトーム（Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｅｑｕｉｐｍｅｎｔ、米国マサチューセッツ州ニーダムハイツ）を使用して６～８μｍ厚の切片にスライスした。その後、それらの小さいラマンバックグラウンドシグナルにより選択されるＭｇＦ$_2$フラット（Ｍｏｏｓｅ　Ｈｉｌｌ　Ｅｎｔｅｒｐｒｉｓｅｓ、米国バージニア州スペリービル）上にこれらの切片をマウントし、そしてリン酸緩衝生理的食塩水（ｐＨ７．４）で湿らせたまま保った。

【０２１１】

共焦点ラマン顕微鏡検査を使用して生じたラマンスペクトル画像を未染色組織切片から収集し、そして、同一切片ならびに連続的ヘマトキシリンおよびエオシン染色切片の位相差画像と相互に関連付けた。画像を比較のため重ねた。可能な場合は、各形態学的要素の例を多様な患者および疾患状態から同定した。その後、それらの形態学的起源（すなわちコラーゲン線維若しくは上皮細胞のような）および組織サンプルの疾患分類に従ってスペクトルを分類した。例えば、最初に、正常および悪性サンプルからの細胞外のマトリック

スのスペクトルを分離したまま保った。各形態学的要素のスペクトルのライブラリーが一旦取得されれば（通常５～６例の患者からの６０～８０個のスペクトル）、それらをそれらの変動の程度について解析した。形態学的要素のスペクトルが大きく若しくは一貫して変動しなかった場合は、該スペクトルを平均し、モデルで使用される形態学的に派生した基礎スペクトルを創製した。細胞成分について真実であったように、一貫した差異が観察された場合は、独立に変動する寄与因子の数を同定し、そして独立した基礎スペクトルを抽出するのに使用した。単一スペクトルが、その形態学的範疇の他のスペクトルと比較した場合に付加的なラマンバンドを有した場合は、それらのスペクトルをその範疇から除去しかつ独立に解析して、該付加的なスペクトルの特徴がモデル中の他の要素により説明し得ることを確実にした。スペクトルの特徴がモデルの他の要素により説明され得なかった場合は、新たな基礎スペクトルをモデルに追加し、そして類似のスペクトルシグネチャについてラマン微小画像のデータベースを検索した。この新たなスペクトルを含有する全部の微小画像の位相差画像および連続染色切片を再評価した。この方法論は新たな形態学的特徴が同定されることを可能にした。

【０２１２】

ラマンスペクトルはまた、巨視的乳房組織サンプルおよび実験室で合成されたか若しくは商業的供給源から得られたかのいずれかの多様な化学物質からも収集した。ラマンスペクトルは、モデル開発および画像解析での使用のため以下の商業的に入手可能な化学物質（Ｓｉｇｍａ、米国ミズーリ州セントルイス）、すなわちアクチン（ニワトリ砂嚢）、β－カロチン、ハイドロキシアパタイトカルシウム、コレステロール、コレステロールリノレエート、コラーゲン（ウシアキレス腱、Ｉ型）、デオキシリボ核酸（仔ウシ胸腺）、リボ核酸（仔ウシ肝）、ホスファチジルコリンおよびトリオレイン、ならびにまた実験室で合成したシュウ酸カルシウムから得た。

【０２１３】

実験装備の図解を図２２に示す。同一の系を巨視的組織サンプルおよび微小画像化の双方に使用した。アルゴンイオンレーザーポンピングＴｉ：サファイアレーザー（Ｃｏｈｅｒｅｎｔ　Ｉｎｎｏｖａ　９０／Ｓｐｅｃｔｒａ－Ｐｈｙｓｉｃｓ　３９００Ｓ、Ｃｏｈｅｒｅｎｔ、米国カリフォルニア州サンタクララ）により提供されるラマン励起光（８３０ｎｍ）は、帯域通過フィルター（Ｋａｉｓｅｒ　Ｏｐｔｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、米国ミネソタ州アナーバー）を横断し、そして２個の鏡を使用してのラマン微小画像化のためのプリズムを介する巨視的組織サンプルのためのアルミニウム製ホルダー若しくは上照明顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ　Ａｘｉｏｓｋｏｐ　５０、Ｚｅｉｓｓ、米国ニューヨーク州ソーンウッド：軸方向分解能およそ１μｍ）のいずれか中に発射した。顕微鏡対物レンズは、励起を集中かつラマン散乱光を後方散乱の形状で収集の双方を行った。ダイクロイックビームスプリッタおよび鏡の組合せが可変性直径の共焦点ピンホールを通して顕微鏡からのラマン散乱光を再方向付けして軸方向分解能を増大させた。巨視的アセンブリを使用した場合はカメラレンズがラマン散乱光を収集した。巨視的組織サンプル上の光のスポットの直径はおよそ１ｍｍであり、また、サンプリングした組織体積は典型的に１ｍｍ３であった。双方の構成について、光はホログラフィックノッチフィルター（Ｋａｉｓｅｒ　Ｏｐｔｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を通過させ、そしてその後、液体窒素冷却ＣＣＤ検出器（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、米国ニュージャージー州プリンストン）に接続した０．２５ｍのｆ／４画像化分光器（モデル２５０ＩＳ／ＳＭ分光器モノクロメータ、Ｃｈｒｏｍｅｘ、米国ニューメキシコ州アルバカーキ）に集中させた。最小の共焦点開口部直径（およそ１００μｍ）で、該顕微鏡系の空間分解能はおよそ２μm^3であった。

【０２１４】

分光器それ自身は調節可能なスリットおよび測定の範囲について３個の回折格子（Ｃｈｒｏｍｅｘ）を保持したタレットを有した。ラマン検査のため、１ｍｍあたり１μｍで刻みを入れた（ｂｌａｚｅｄ）６００溝の回折格子を１４０μｍの分光器入口スリット設定と一緒に使用しておよそ８cm^{-1}の分解能を提供した。大部分の生物学的サンプルは１

０ｃｍ$^{-1}$より狭いラマン帯域幅を表さなかったため、分光器の入口スリットの１４０μｍの幅を一般に使用して、最大にされた光学的スループットを提供した（ときに、巨視的測定のために７０μｍの入口スリットを使用した）。

【０２１５】

顕微鏡の上のＣＣＤカメラ（Ｓｏｎｙ、米国マサチューセッツ州ケンブリッジ）は、白色光徹照画像との集中されたレーザースポットのレジストレーションおよびビデオテープへの画像の録画を見込んだ。顕微鏡それ自身は、ノーマルおよび位相差双方のある範囲の対物レンズを装備した。典型的には、ラマン検査には６３倍無限補正液浸対物レンズ（Ｚｅｉｓｓ　Ａｃｈｒｏｐｌａｎ、開口数０．９）を使用した。検出器および顕微鏡双方のトランスレーションステージはコンピュータにより制御した。完全なラマンスペクトルを各組織位置で収集し、そしてその後、顕微鏡対物レンズ下でのラスター走査パターンでトランスレーション状態（Ｐｒｉｏｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、米国マサチューセッツ州ケンブリッジ）を移動させることにより組織のスペクトルの微小画像を創製した。この方法は典型的には５０×５０μｍ^{2}の画像を生じさせ、その各画素が４００から１８５０ｃｍ$^{-1}$までのラマンスペクトル全体を含有した。ｘおよびｙ双方の方向のステップサイズは典型的に２μｍであり、共焦点顕微鏡の空間分解能と一致した。スペクトルは通常、５０と１００ｍＷとの間の出力で各画素位置で２０秒間収集し、これゆえに画像全体ではおよそ３．５時間を必要とした。一滴のリン酸緩衝生理的食塩水が、データ収集中、組織切片を湿ったまま保った。組織に対する光化学的損傷を試験するための検査もまた実施した。２２０ｍＷで、蛍光シグナルの強度は増大する曝露時間（数分にわたる）とともに減少することが観察された一方、ラマンシグナルは影響を受けないまま留まった。この出力でフォトブリーチングが発生したが、しかしラマンスグナルに対するその影響は無視できた。このフォトブリーチング効果はより低い励起出力で観察されなかった。結果として、分光学的データの収集中のフォトブリーチングの影響を低下せるために、出力を２０～３０秒の曝露の間、１００ｍＷより下に保った。

【０２１６】

取得したラマンスペクトルを、日ごとのデータの再現性を確実にするための処理にかけた。最初に、それらは、タングステン光源を使用して系のスペクトル応答について補正した。その後、トルエンの既知のラマン線を使用してデータを周波数較正した。その後MgF_2バックグラウンドスペクトルを減算し、そして、スペクトルの５位の多項式（波数の）への当てはめ、およびその後この多項式のスペクトルからの減算により、幅広いゆっくりと変動する蛍光バックグラウンドを除去した。また、必要な場合は微分フィルターを使用して宇宙線からの寄与を除去した。

【０２１７】

微小画像化若しくは巨視的組織分光学的データを、ＭＡＴＬＡＢの正項最小二乗法当てはめアルゴリズム若しくは命令のシーケンス（ＭａｔｈＷｏｒｋｓ、米国マサチューセッツ州ナティック）を使用して、モデル基礎スペクトルに同時に当てはめた。独立変動成分の数の推定値には主成分分析を使用した（ＭＡＴＬＡＢ）。最小二乗法当てはめ技術若しくは主成分分析のいずれかを使用するために、各ラマンスペクトルを各波長に対応する強度値のベクトルとして表した。

【０２１８】

線形モデルを使用する場合の別の重要な論点は基礎スペクトルの直交性であった。要素の直交性の程度は、等式

【０２１９】

【数６】

$$\frac{x^T y}{(x^T x)(y^T y)} \qquad (10)$$

【０２２０】

［式中ｘおよびｙは各波長でのラマン強度として配置される２種の形態学的成分の基礎スペクトルを表す（x^Tはｘの転置行列である）］
を使用して検定した。ゼロの値は該ベクトルが直交であることを示し、また、１の値はそれらが同一であることを意味する。

【０２２１】

形態学的モデルでの誤差のレベルは、使用されているスペクトルのＳ／Ｎ比により決定される。モデル基礎スペクトルがノイズの限界内で同一でない（すなわちそれらはノイズにより「変えられた」同一のスペクトルより直交性である）ことを条件とすれば、通常の最小二乗法を使用してそれらを分離し得る。基礎スペクトルは必要なだけ長時間収集した多くのデータ点の平均であるため、それらは事実上ノイズがない。従って、モデル中の誤差の制限する起源は、当てはめられているデータ中のノイズによる。特定の基礎スペクトルのフィットの寄与率の誤差は、当てはめられているスペクトル中のノイズに比例する：

$$E = NB \qquad (11)$$

式中$B = P^T (PP^T)^{-1}$は形態学的基礎スペクトルＰの較正ベクトルであり、また、Ｎはサンプル中のノイズである。

【０２２２】

ここで総論された乳房組織中に比較的大きな豊富さで存在する形態学的および化学的成分についての情報を抽出するのにラマン分光法を使用した。乳房は２種の型の組織すなわち腺および間質を含有する。腺要素は小葉および管よりなる。小葉は上皮細胞の密集した集団であり、乳を産生かつ管の系に分泌し、管は乳を乳頭に輸送する。管は一層の筋上皮細胞により囲まれた上皮細胞の一内層よりなる。双方の層は主としてコラーゲンから作成される基底膜により囲まれる。間質要素はこれらの腺単位に支持的網状構造を提供し、そして細胞外マトリックス、線維芽細胞、脂肪および血管を包含する。乳房の腺要素はほとんど細胞性である一方、間質中には少数の細胞のみ存在する。これらの細胞の大部分は、細胞外マトリックス（構造タンパク質および炭水化物の支持的網状構造、主としてコラーゲンおよびグリコサミノグリカン）の産生を司る線維芽細胞である。脂肪は存在する唯一の他の主要な形態学的構造であり、そして正常乳房組織の嵩を構成する。ときに、β－カロチン（ビタミンＡへの親油性前駆体）の結晶性沈着物もまた存在する。

【０２２３】

良性および悪性の乳房病変中の形態学的構造の多くは正常乳房組織中のものと類似である。例えば、線維症は良性および悪性双方の乳房病変中で発生しかつ間質の増殖を伴う。線維組織は、細胞外マトリックスの大部分と同様に組成が主としてコラーゲンであり、フィブリノーゲンおよびフィブロネクチンのようなタンパク質の存在の増大を伴う。

【０２２４】

しかしながら、疾患に罹った乳房の形態学的特徴のいくつかは正常乳房組織中のものと異なる。例えば、乳癌は最も普遍的には、核の拡大、多態性（大きさおよび形状の変動）ならびに過染色性（より濃く染色する）、異型性の有糸分裂ならびにＤＮＡの異数性（染色体の増加若しくは喪失）を伴う上皮細胞の急速な増殖として小葉および管で発する。これらの形態学的変化は新たな化学物質の大スケールの産生と関連しないが、しかしむしろ、乳房中に既に存在する化学物質の相対濃度の変化と関連する。例えば、上の形態学的変化は核対細胞質比（病理学者により使用される悪性の質的指標）の変化を伴う。

【０２２５】

乳癌で観察され得る２種の付加的な形態学的特徴は石灰化および壊死である。石灰化は、それらが放射密度が高く、マンモグラフィーで検出し得、そしてしばしば癌とともに見られるため、重要である。乳房Ｘ線像上で類似の形態学的特徴を有する２種の主要な型が存在する。Ｉ型石灰化はシュウ酸カルシウム二水和物結晶である一方、ＩＩ型石灰化は主としてハイドロキシアパタイトカルシウムであるがしかし他のリン酸カルシウムおよびおそらくまた炭酸カルシウムも含有する。シュウ酸カルシウム結晶は悪性病変中よりも良性でよりしばしば見出され、そして細胞の分泌の産物であると考えられている一方、ハイドロキシアパタイトカルシウム沈着物は良性および悪性双方の病変中で見出され、そして細

胞の分解若しくは壊死（死亡）の結果であると考えられている。

【０２２６】

乳房の化学および構造ならびに疾患の進行により誘導される変化のこの基礎的な知識で、正常および疾患に罹った乳房組織の主要なラマンスペクトルの特徴の全部を説明することが可能である。

【０２２７】

正常、良性および悪性の乳房組織のサンプルから６０以上のラマン画像を収集した。正常乳管のラマン画像を図５９Ａ～５９Ｂに示す。コラーゲン、細胞質および細胞核の微小画像をこれらの基礎スペクトルとの画像中の各データ点の通常の最小二乗法当てはめにより生じさせる。連続染色切片を比較のため示す。ラマン画像で観察された構造が組織構造と良好に相関することが明らかである。

【０２２８】

微小画像化データから、９種の重要な基礎スペクトルすなわち細胞質、細胞核、コラーゲン、脂肪、コレステロール様、β－カロチン、ハイドロキシアパタイトカルシウム、シュウ酸カルシウム二水和物および水を同定した。細胞膜のようないくつかの特徴はラマン画像化を使用して同定したが、しかし、それらが大量で存在せずかつ小さなラマン断面を有し、そして従って巨視的組織スペクトルに有意に寄与しないため、モデルには包含しなかった。他者はモデル中で既に要素と同一の化学的組成を事実上有することが見出され、そして従って、基底膜（細胞外マトリックスと同様ほとんどコラーゲン様から構成される）の場合に真実であったように別個の形態学的特徴として包含し得なかった。モデル成分スペクトルを決定するのに使用したスペクトルの数はその形態学的要素の豊富さおよびまたＳ／Ｎ比の論点にも依存した。例えば脂肪は極めて強いラマン断面を有する。結果として、清浄なスペクトルを生じさせるため各患者から脂肪スペクトルはほとんど必要としなかった。論考した細胞外マトリックスおよび細胞成分双方がＳ／Ｎ比を増大させるためにより多くのスペクトルを必要とした。乳房組織の完全なモデルに使用した基礎スペクトルを図６０に示す。

【０２２９】

図６１で、正常、線維嚢胞性および悪性の乳管から取った線維芽細胞および上皮細胞のスペクトルを比較する。統計学的解析は、細胞質および細胞核から発する２種の主要な独立に変動する成分が存在することを示した。ＤＮＡのスペクトル［図６２Ａ］は細胞核［図６２Ｂ］のものに非常に類似であったとは言え、細胞核のスペクトルはＲＮＡおよびヒストンに関する小さな特徴もまた含有した。同様に、アクチンのスペクトル［図６２Ｃ］は、細胞質のスペクトル［図６２Ｄ］への主寄与因子であった。細胞質のスペクトルは、細胞質中で見出される他の要素に関する小さな特徴もまた包含した。

【０２３０】

細胞質および細胞核から純粋なスペクトルを収集する能力がラマン共焦点顕微鏡の収集体積により制限されたため、２種の基礎スペクトルを数学的に分離した。２成分を分離するために、ラマン画像化系を使用して８例の患者からの数百の細胞（全部の型）のスペクトルを収集した。最初に、スペクトルを、低核含量（ラマンシグナルを見ることにより決定した）を伴う細胞領域から取った１種および精製ＤＮＡからの１種の２種の基礎スペクトルに当てはめた。その後、核領域から取ったスペクトルに対応するとりわけ高いＤＮＡフィット係数（ＤＮＡが豊富）をもつスペクトルを、細胞質中の領域から収集したＤＮＡをほとんどないし全く含まない（ＤＮＡが乏しい）スペクトルから分離した。その後、ＤＮＡが豊富なスペクトルの平均をスケーリングしかつＤＮＡが乏しいスペクトルの平均から減算して、ＤＮＡ含量を伴わない新たな細胞質のみのスペクトルを生じさせた。その後、この新たな細胞質のみのスペクトルをＤＮＡが豊富なスペクトルの平均から減算して全部の細胞質の特徴を除去し、核物質のみを表すスペクトルを残した。その後、元のデータ（ＤＮＡが豊富およびＤＮＡが乏しいの双方）をこれらの２種の改変基礎スペクトルと当てはめた。精製ＤＮＡおよび低核含量のスペクトルよりむしろ２種の改変基礎スペクトルを使用して該手順を反復して、最終的な細胞質および細胞核のスペクトルを生じさせた。

この反復処理を使用して、核（ＤＮＡ、ＲＮＡ、ヒストンおよびその他を含有する）をモデル化する精製ＤＮＡスペクトルの無能によるアーチファクトを最小にした。これら２種の基礎スペクトルを使用して、核対細胞質比のような細胞についての重要な診断情報を抽出し得る。

【０２３１】

細胞外マトリックスおよび基底膜双方は主としてコラーゲンで構成されている。フィブリノーゲンおよびフィブロネクチンのような他の構造タンパク質ならびにプロテオグリカンもまた存在するが、しかし、それらが全体的ラマンスペクトルに有意に寄与しなかったほど微小な量でかつ小さなラマン断面でである。図６３は形態学的に派生したコラーゲン（ほとんどＩ型、しかし若干のＩＩＩ、ＩＶおよびＶ型もまた存在した）のスペクトルおよび精製コラーゲン（Ｉ型）のものを比較する。それらは非常に類似しているとは言え、いくつかの小さな差異を８００と１２００ｃｍ$^{-1}$との間の領域で観察し得る。形態学的に派生したコラーゲンスペクトルは、７例の患者から、主に細胞外マトリックスの領域から取った２１５のスペクトルの平均であった。

【０２３２】

脂肪は正常乳房組織のラマンスペクトルに対する最強の寄与因子の１つである。それは大量で存在しかつ強いラマン断面を有する。ヒト中でのその貯蔵は主にトリグリセリド、とりわけトリオレインの形態をとる。図６４は、乳房組織から取得した脂肪のラマンスペクトルをトリオレインのものと比較し、期待されたとおり、トリオレインがスペクトルに対する主寄与因子であったことが示された。モデルに包含されかつ図６４に示された脂肪のスペクトルは、５例の患者からのデータを使用して収集した２８のスペクトルの平均であった。

【０２３３】

悪性の乳管の管腔若しくは悪性腫瘍の中心内の壊死は具体的には細胞分解の生成物である。結果として、その組成は単一乳管内でさえ位置ごとに大きく変動した。３例の患者からのラマンスペクトルの解析は、壊死性物質が細胞性物質（細胞質および細胞核双方）に加えて脂肪、コラーゲン、石灰化（ハイドロキシアパタイトカルシウム）、遊離コレステロールおよびコレステロールエステル（リノレエート）を含有したことを示した。これらの要素の比は大きく変動し得るため、モデルに包含されるスペクトル（「コレステロール様」）は、単一患者から収集したモデル中の別の場所で表されないこれらのスペクトルの共通要素（主としてコレステロール成分）を表す。化学的モデル化は、「コレステロール様」スペクトルが、細胞性物質（細胞質および細胞核）ならびに脂肪からの小さな寄与を伴いコレステロールおよびコレステロールリノレエートからの大きな寄与を有することを告げる。図６５はこれら５要素を使用したデータへの通常の最小二乗法当てはめを示す。個別に決定し得ない１以上の型のコレステロールエステルが存在するため、コレステロールおよびコレステロールリノレエートの純粋な化学的スペクトルは使用しなかった。コラーゲンについて真実であったとおり、１若しくは２種の純粋な成分を用いるよりも生物学的に派生した混合物を使用して組織をモデル化することが最良である。壊死性物質はコレステロールおよびコレステロールエステルを含有する乳房組織中の唯一の要素でなかった。細胞膜もまたこれらの化学物質の双方を含有するとは言え、それらはまたリン脂質のような他の化学物質も包含する。従って「コレステロール様」に基づくスペクトルは（ただ悪性試料だけでなく）全組織スペクトル中に少量で存在することが見出された。

【０２３４】

ハイドロキシアパタイトカルシウムおよびシュウ酸カルシウム二水和物双方は非常に強いラマンスペクトルを有する［図６６Ａおよび６６Ｂ］。しかしながら、それらは凍結乳房組織試料中で普遍的に見出されなかった。石灰化は医学的診断に重要でありかつ従って石灰化を含有する組織は一般に科学的研究のため放出されないためである。石灰化はたまの凍結試料中で見出されたとはいえ、それらはしばしば点状石灰化でありかつ研究することが困難であった。これらの理由から、石灰化がより大きくかつより多数であったホルマリン中に固定された乳房組織の６μｍ厚の脱パラフィン化切片から得たスペクトルを包含

した。固定過程が組織タンパク質を変えたが、しかし石灰化の比較的不活性の鉱物沈着物には影響を及ぼさなかった。従って、脱パラフィン化切片を、ある範囲の患者および疾患状態からの、経験を積んだ病理学者によりわれわれのために同定されたより多数の石灰化を解析するのに使用することが可能であった。

【０２３５】

ハイドロキシアパタイトカルシウムは、３例の患者から凍結切片で、および追加の１１例の患者の脱パラフィン化組織切片から同定された。凍結および脱パラフィン化サンプルからのスペクトルは同一であった。使用したハイドロキシアパタイトカルシウムに基づくスペクトルはこれらのスペクトルの組合せから取得した。シュウ酸カルシウムは、その希少性により１個の脱パラフィン化組織切片で観察されたのみであった。乳房組織中でのその存在は十分報告されているとは言え、シュウ酸カルシウム二水和物は乳房組織中でハイドロキシアパタイトカルシウムより有意により少なく普遍的である。従って、シュウ酸カルシウム二水和物を本発明の好ましい一態様のモデルへの組み込みのため実験室で合成した。双方の石灰化スペクトルは以前に公表されたスペクトルと一致した。

【０２３６】

β－カロチンは８３０ｎｍの放射で励起される場合に共鳴増強される。結果としてそれは極めて強いラマンシグナルを有する。そのピークは目立つとは言え、それはしばしば乳房全体で脂肪とともに見出される。形態学的に派生したβ－カロチンスペクトルから脂肪内容物を抽出する必要性を排除するために、商業的に入手可能なβ－カロチンから取得したスペクトル［図６６Ｃ］を使用した。β－カロチンの形態学的に派生したラマンスペクトルを使用して、商業的に入手可能なサンプルが組織中で見出されるβ－カロチンの正確な表示であったことが確認された。

【０２３７】

水は弱いラマン散乱体であるとは言え、それは莫大な量によりスペクトルに寄与する。水はヒト組織のおよそ８０重量％を構成し、また、組織を湿らせたまま保つのに使用されるリン酸緩衝生理的食塩水中に存在する。以前、動脈の研究で、水がヒト組織のラマンスペクトルに有意に寄与しなかったことが決定された。しかしながら、乳房組織のこれらの研究において、その包含はデータを適正に当てはめるために不可欠であることが見出された。水は１６５０ｃｍ$^{-1}$に集中される単一の比較的幅広いラマンバンドを有する。水がモデルに包含されなかった場合、他の形態学的成分によるこのバンドの当てはめは不完全であった。

【０２３８】

成功裏の形態学的モデル化の重要な要件の１つは、所定の形態学的構造のラマンスペクトルで患者間の変動がほとんどないことであった。多くの患者からのいくつかのスペクトルを平均することによりモデルを開発することにより、該モデルが全部の形態学的特徴の共通要素を包含することを確実にし得る。細胞外マトリックスのスペクトルは同様であった。細胞外マトリックスのスペクトルは患者に関係なく主としてコラーゲンである。図６７に、５例の患者からの細胞外マトリックスのスペクトルを示す。患者間の変動性は全部の形態学的特徴について同様である。観察された小さな差異は他の形態学的特徴の緊密な近接によった。すなわち、検査されているコラーゲン線維に近い脂肪の小滴が、コラーゲンに加えて観察されている少量の脂肪をもたらしたかもしれない。乳房組織のラマンモデルの開発において、モデル中の他の基礎スペクトルにより説明されない線形変動性が有意でなかったことが見出された。

【０２３９】

モデル成分の直交性を解析する場合、４成分すなわち細胞質、脂肪、コラーゲンおよびコレステロール様が相互と比較した場合に０．５より大きい値を有することが見出された（表４）。

【０２４０】

【表４】

表4

	細胞質	細胞核	ｺﾗｰｹﾞﾝ	脂肪	β-ｶﾛﾁﾝ	ｺﾚｽﾃﾛｰﾙ様	ﾊｲﾄﾞﾛｷｼｱﾊﾟﾀｲﾄｶﾙｼｳﾑ	ｼｭｳ酸ｶﾙｼｳﾑ	水
細胞質	1								
細胞核	0.22	1							
ｺﾗｰｹﾞﾝ	0.83	0.29	1						
脂肪	0.73	0.08	0.58	1					
β-ｶﾛﾁﾝ	0.27	0.36	0.35	0.29	1				
ｺﾚｽﾃﾛｰﾙ様	0.88	0.07	0.68	0.89	0.28	1			
ﾊｲﾄﾞﾛｷｼｱﾊﾟﾀｲﾄｶﾙｼｳﾑ	0.11	0.10	0.06	0.06	0.07	0.13	1		
ｼｭｳ酸ｶﾙｼｳﾑ	0.11	0.12	0.06	0.10	0.10	0.13	0.00	1	
水	0.26	0.61	0.46	0.01	0.16	0.14	0.20	0.17	1

【０２４１】

これら４要素は同一官能基の多くを有する（CH_2屈曲、Ｃ－Ｃ伸長など）それでもなお、それらは、通常の最小二乗法当てはめを使用する場合にとりわけ区別されるのに十分直交性であった。水および細胞核もまたかなり重なっていた。にもかかわらず、成功裏の当てはめへの秘訣は、スペクトルの過決定（ｏｖｅｒｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ）を回避するために適切なスペクトル情報を保持しつつ可能な限り少ない要素を使用することであった。最高の程度の重なり（０．８９）を有するにもかかわらず、脂肪とコレステロール様のスペクトル間の差異は、図６８Ａ～６８Ｃおよび６９Ａ～６９Ｃのモデルを用いるデータフィットのノイズ成分より大きい。これゆえにモデルへのそれらの取り込みは合理的である。前に論考されたとおり、この状況では、モデルの予測値は当てはめられているデータのＳ／Ｎ比に依存する。

【０２４２】

ここで開発された形態学的モデルを使用して、ある範囲の巨視的組織サンプルのスペクトルの特徴を各サンプルの形態学的組成に関して説明し得る。図６８Ａ～６８Ｃおよび６９Ａ～６９Ｃで、正常、線維症、腺疾患、線維症／嚢胞症、線維腺腫および浸潤型乳管癌組織サンプルからのラマンスペクトルを形態学的モデルの基礎スペクトルの一次結合に当てはめた。１への総和に正規化したモデルにより生じられたフィット係数（図６８Ａ～６８Ｃおよび６９Ａ～６９Ｃにもまた示される）は、組織全体のスペクトル（独立に変動する水を除外する）への正規化した化学的および形態学的基礎スペクトルの寄与の割合を表す。例えば、図６９Ａ～６９Ｃに示される線維腺腫および悪性サンプルは双方とも大きな細胞質含量（それぞれ３１および３４％）を有する一方、ここで示される正常サンプルは有しない。この観察結果は正常組織若しくは他の良性病変さえとも比較した場合に浸潤型癌および線維腺腫のより大きな細胞性を反映し、それは経験を積んだ病理学者による該サンプルのその後の微視的解析により確認された。モデルのフィット係数と疾患に不随することが既知の形態学的変化との間の強い相関は、該モデルの正確さを証明する。図６８Ａ～６８Ｃおよび６９Ａ～６９Ｃで観察される小さな残差は、主要な分光学的特徴の全部が該モデルにより説明されることを示す。同様に、小さな残差は、ある範囲の疾患状態を表す３７例の患者から収集した１０１の巨視的組織スペクトルを形態学的モデルと当てはめた場合に観察された。

【０２４３】

ラマン画像を位相差画像およびまた同一画像の連続染色切片と比較することにより、スペクトルおよび従って組織表面にわたる化学的変化をモニターすることが可能である。例えば、悪性組織中で見出される乳管上皮細胞のスペクトルを正常若しくは良性組織中で見出されるものと比較し得るのみならず、しかし浸潤型癌の一領域と同一組織切片内の疾患過程により影響を受けないものとの間で移動を行う際にこれらのスペクトル中の進行性の変化もまたモニターし得る。画像化はまた、位相差若しくは染色により可視的にされない

化学的／形態学的差異の同定も可能にする。こうした情報を用い、疾患過程ならびにそれが組織の形態学および化学双方にどのように影響を及ぼすかのより良好な理解を獲得し得、そして形態学的モデルを開発し得る。

【０２４４】

乳房組織の形態学的モデルの構築は３つの仮定、すなわち、第一に、混合物のラマンスペクトルが該混合物の個々の成分の重み付け線形和に等しかったこと；第二に、細胞のような生物学的形態学的特徴が患者間で同一のラマンスペクトルを有したこと；および第三に、モデルに包含した基礎スペクトルがそれらのラマンスペクトルに基づくそれらの識別を可能にするのに十分性質が異なったこと、に頼った。

【０２４５】

収集したラマン微小画像のいくつかのみを、提示されたモデルを創製するのに使用したとは言え、それらの全部はモデルの包括性を試験するのに使用した。多様な病理学を伴う広範な患者からのスペクトルデータを使用することにより、該モデルが乳癌を包含する乳房組織中で見出される全部の主要なスペクトルの特徴を説明することが確実にされた。優れたモデルフィットはまた、乳房組織のラマンスペクトルがモデルに包含した９種の形態学的／化学的要素のスペクトルの重み付け線形和に等しいことも確認した。包含された要素のそれぞれは強い分光学的シグネチャを有し、患者間でほとんど変動せず、そしてシュウ酸カルシウム二水和物を除き大量で存在した。数種の要素は、それらのラマンスペクトルが他の要素のものと大きく重なりすぎたために独立に考慮されなかった。この重なりは、多くの細胞型（上皮細胞、線維芽細胞など）、基底膜および細胞膜（組織のスペクトルには弱く寄与するがしかし壊死性物質のスペクトルに非常に類似していた）に対する問題点であった。乳房組織中に存在する他の化学物質は、それらが有意でなかったほど総ラマンスペクトルにほとんど寄与しなかった。例えば、グリコサミノグリカンは細胞外マトリックス中に多量に存在するが、しかし非常に弱いラマン断面を有する一方、マトリックスメタロプロテイナーゼは少量で存在する。いずれも乳房組織のラマンスペクトル中では観察されなかった。

【０２４６】

ラマン微小画像化により同定される形態学的特徴の化学的組成は期待されたとおりであった。例えば、細胞外マトリックスはほとんどコラーゲンであることが見出された一方、脂肪小滴は主としてトリオレインであった。検査した細胞型（線維芽細胞、ある範囲の正常および疾患に罹った状態からの上皮細胞、ならびに炎症細胞）は全部、同一の基礎的成分すなわちコレステロールおよびコレステロールリノレエート、アクチンならびにＤＮＡより構成された。各細胞は細胞膜（主にリン脂質、コレステロール、トリグリセリドおよび数種のタンパク質から構成される脂質二重層）により囲まれている。細胞質（主にサイトゾルすなわち細胞を満たす水性溶液）が細胞の嵩を構成している。細胞質内に、細胞内の制御された動きおよび組織化を可能にする主としてアクチンフィラメントより構成される細胞骨格；細胞の機械系（主により多くのタンパク質の作成および産生の調節）に関与するＲＮＡおよびタンパク質；ならびに多様なオルガネラがある。これらのオルガネラの最大のものは細胞核である。核はＤＮＡ、ＲＮＡおよびヒストン（ＤＮＡが小型構造を形成するのを補助することに関与する）が豊富である。

【０２４７】

細胞の機能に依存して、それは変動する量のこれらの成分およびおそらくいくつかの付加的なもののそれぞれを有する。例えば、線維芽細胞は細胞外マトリックスの作成および維持を司る。そうするために、それらは、それらの細胞質内でコラーゲン、フィブリノーゲンおよびグリコサミノグリカンを産生しかつ細胞外空隙にそれらを輸送しなければならない。しかしながら、乳房組織のラマンモデルの開発に関しては、これらの成分は既にコラーゲンのスペクトルに包含されており、そして従って独立に考慮される必要はない。

【０２４８】

型内若しくは型間のいずれかの細胞の間で最も大きな差異は、細胞核に対する細胞質の比で観察し得る。この比に何らかの変動が存在することは自然であるが、しかしそれは異

数性の発生により悪性細胞中で大きく誇張されているはずであり、そして悪性を診断するために病理学者により使用される。核対細胞質比のようなパラメータが将来、巨視的組織試料中で測定可能となるかもしれない。

【０２４９】

多数の非細胞性成分、すなわちコラーゲン（細胞外マトリックスおよび基底膜）、脂肪、コレステロール様（壊死）、ハイドロキシアパタイトカルシウム、シュウ酸カルシウムおよびβ－カロチンもまた、乳房組織のラマンスペクトルのモデル化に重要であることが見出された。β－カロチンのような、これらのうちいくつかは強いラマン散乱体でありかつ従って良好なモデルフィットに必要とされたためにのみ重要であった。「コレステロール様」のようは他者もまた悪性を診断するために病理学者により使用される重要な特徴である。

【０２５０】

乳房組織のラマンスペクトルに最も多く寄与するタンパク質はコラーゲンおよびアクチンである。コラーゲンは細胞外マトリックスを代表する一方、アクチンは細胞中で見出される。双方はタンパク質であるため、それらのラマンスペクトルは、とりわけ研究者が以前に正常、良性および悪性病変の間の差異を探していた１４４０～１６６０ｃｍ$^{-1}$の領域で非常に類似している。しかしながら、これらの基礎スペクトルに含有される情報をモデルの巨視的組織スペクトルの当てはめに使用する場合は、特定のサンプル中の細胞性物質（アクチン）および細胞外マトリックス（コラーゲン）の相対量についての情報を抽出することが可能である。この情報を使用して、下で説明される乳癌を診断するためのラマン分光法に基づくアルゴリズムを開発する。

【０２５１】

スクリーニングマンモグラフィーは乳癌の早期検出における重要なツールである。特定の診断的意義の一特徴は乳房Ｘ線像上の微細石灰化の存在である。２種の主要な型の微細石灰化が乳房組織中で見出される。Ｉ型沈着物はシュウ酸カルシウム二水和物（複屈折性無色結晶）よりなる一方、ＩＩ型沈着物はカルシウムリン酸塩、主としてハイドロキシアパタイトカルシウムより構成される。ＩＩ型の微細石灰化は、典型的にはＨ＆Ｅ染色の光学顕微鏡検査で好塩基性かつ非複屈折性である。

【０２５２】

臨床的乳房Ｘ線像でＩ型とＩＩ型の微細石灰化を区別するための信頼できる方法は存在しないが、しかし該型は疾患と相関すると考えられる。シュウ酸カルシウム二水和物結晶は良性乳管嚢胞中で最も頻繁にみられ、そして癌の病巣では稀に見出される一方、リン酸カルシウム沈着物は癌腫を包含する増殖性病変で最もしばしばみられる。この分布は、Ｉ型の微細石灰化が分泌の生成物である一方、ＩＩ型のカルシウム沈着物が細胞の分解若しくは壊死由来であるという仮説と矛盾しない。

【０２５３】

ＩＩ型の微細石灰化はＩ型より２ないし３倍より頻繁に発生すると推定されている。マンモグラフィーにより発見される触知不可能なＩＩ型の微細石灰化は、頻繁に乳房内の最も重要な異常の場所を幾何学的に標的とする。であるから、石灰化は放射線医が乳房Ｘ線像中で探す重要な成分である。マンモグラフィーで検出された微細石灰化の形状、大きさ、数および粗さのようなパラメータを疾患と相互に関連付けることを試みるいくつかのアルゴリズムが提案された。しかしながら、これらの研究は、濃いマンモグラフィーのバックグラウンド、低密度の石灰化斑点若しくは密に集団となった石灰化により症例をしばしば排除し、そして従ってある種の患者および乳房Ｘ線像のみに制限されている。マンモグラフィーに基づくクロスバリデーションアルゴリズムについての最高の報告された感度および特異性はそれぞれ７１％および７４％である。これらの研究は有望な結果を示すとは言え、マンモグラフィーで検出された微細石灰化を使用する乳癌の診断は定義しがたいままである。微細石灰化のマンモグラフィー上の外見は病変の組織学的型に何らかの関係をもつ一方、現在、診断はこれに基づいて確実になし得ない。

【０２５４】

乳房組織中のカルシウム沈着物は形態学的にのみ分類されているため、より厳密な方法を使用してそれらを検査することにより重要な洞察が得られるかもしれない。ラマン分光法は、光と物質との間のエネルギー交換に基づく技術である。それは、サンプルに入射する光子がサンプルの振動若しくは回転モードへ若しくはそれからエネルギーを移動させる非弾性散乱過程である。それは２光子過程でありかつ入射する光子の同時の吸収およびラマン光子の発射と見なし得る。これら２光子のエネルギー間の差異は１エネルギーレベルから別のものへの分子の遷移に対応する。エネルギーレベルはすべての分子に独特であるため、ラマンスペクトルは化学物質特異的である。ラマンスペクトル中の個々のバンドは特定の分子の動きに特徴的である。ラマン分光法は、使用される出力および励起波長が組織に対し非破壊的であるためにｉｎ　ｖｉｖｏ測定にとりわけ扱いやすい。ラマン分光法はｉｎ　ｖｉｔｒｏでこれらの形態学的構造の決定的な化学的解析を提供し得るため、それは乳房組織中の微細石灰化の研究にさらに十分に適する。事実、ラマン分光法は、腎および尿路のようないくつかの他の器官中のカルシウム沈着物を検査するのに成功裏に使用されている。

【０２５５】

本発明の好ましい態様は、乳房中の異なる病変に存在する微細石灰化の化学的組成若しくは構造の差異を強調するためにラマン分光法を使用する。該態様からの結果は、乳房疾患の発症および進行に付随する化学的変化の理解を進め、かつ、ラマン分光法を使用する乳房疾患の診断に重要なパラメータを提供する。

【０２５６】

ラマンスペクトルを、ホルマリン固定したパラフィン包埋乳房組織の６μｍ厚の脱パラフィン化切片から取得した。それらの診断の重要性のため、新鮮乳房組織中の微細石灰化は典型的に科学的研究のため残しておくことができず、そして従って好ましい態様の系は固定組織切片中の微細石灰化の検査に制限された。微細石灰化は比較的不活性であるため、固定剤のタンパク質架橋効果は最小限であるはずである。さらに、検査された石灰化からのラマンスペクトルの線の形状は、他の器官系の固定されない組織から取得した以前に発表されたデータと矛盾しない。サンプルをMgF_2フラット（Ｍｏｏｓｅ　Ｈｉｌｌ　Ｅｎｔｅｒｐｒｉｓｅｓ　Ｉｎｃ．、バージニア州スペリービル）上にマウントした。検査した各微細石灰化は位相差顕微鏡を使用して写真撮影した。位相差画像およびＨ＆Ｅ染色した連続切片を、経験を積んだ病理学者（分光法の結果に対し盲検化された）により再評価し、そしてデータを取得した領域の疾患状態の組織学的診断をした。１１例の患者からの乳房生検中の合計３０個のＩ型および６０個のＩＩ型の微細石灰化を、ラマン分光法を使用して検査し、７４個は組織学的に良性の乳管および１６個は組織学的に悪性の乳管からであった。良性乳管についての組織学的診断は、乳管上皮過形成、硬化性腺疾患、線維嚢胞性疾患および線維腺腫からメンケベルク動脈硬化症までの範囲にわたった一方、悪性乳管の全１６個は腺管上皮内癌（ＤＣＩＳ）と診断された。侵襲性癌はデータを取得した領域で遭遇されなかった。患者の全１１例が平均年齢５３．４歳（範囲４１～８５歳）の白人女性であり、そしてマンモグラフィーで見出された疑わしい微細石灰化について摘出乳房生検を受けていた。これらの患者は触知可能な乳房病変を有さず、また、線維腺腫を除いてマンモグラフィー上に他の重要な知見の塊状病変を有しなかった。

【０２５７】

図７０に示されるラマン顕微鏡検査系（以前に記述されている）を使用してデータを取得した。簡潔には、ラマン励起光（８３０ｎｍ）を共焦点顕微鏡に発射し、そしておよそ２μｍのスポットサイズに集中させた。対物レンズ、６３倍（ＮＡ０．９）；Ｚｅｉｓｓ　Ａｃｈｒｏｐｌａｎ）双方は励起を集中させかつラマン散乱光を後方散乱の形状で収集する。顕微鏡の上の電荷結合素子カメラは集中されたレーザースポットの白色光徹照画像とのレジストレーションを見込む。ダイクロイックビームスプリッタおよび鏡の組合せがラマン散乱光を分光器系に再方向付けし、ここでそれは－１００℃に冷却した深空乏型ＣＣＤ検出器（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、ニュージャージー州プリンストン）により記録される。ＣＣＤ上へのラマン散乱光の分散は画素あたり１．６ｃｍ$^{-}$

^{1}をもたらす。ラマンスペクトルの全部を６０秒の積算時間および８ｃｍ$^{-1}$の空間分解能で取得した。使用した平均レーザー励起出力は１００と１５０ｍＷとの間で変動した。

【０２５８】

データ処理の全部は例えばＭＡＴＬＡＢ　５．３０中のようなソフトウェアアルゴリズムを使用して実施した。スペクトルは、トルエンの既知のスペクトル線を使用してラマンシフト周波数較正した。５次の多項式を最小二乗法最小化によりスペクトルに当てはめ、そしてその後減算して、ゆっくりと変動する蛍光バックグラウンドを除去した。宇宙線は微分フィルター使用により除去した。

【０２５９】

図７１Ａは微細石灰化の存在を暗示する特徴を表す試料のＸ線写真である一方、図７１Ｂはこの試料の薄片から収集した位相差画像を表示する。図７１Ｂ中の小さな囲みにより強調されている沈着物から取得したＩ型の微細石灰化のラマンスペクトルを図７１Ｃに示す。このサンプルの全体的組織学ならびに位相差画像中で明らかな特異的な特徴に基づき、この病変を線維嚢胞性疾患と診断した。シュウ酸カルシウム二水和物に特徴的な振動の特徴は９１２ｃｍ$^{-1}$、１４７７ｃｍ$^{-1}$および１６３２ｃｍ$^{-1}$に見ることができる。これらのラマンの特徴はそれぞれＣ－Ｃ伸長、ならびにＣ－Ｏ対称および非対称伸長に帰され、そして、シュウ酸カルシウム二水和物の以前に発表されたラマンスペクトルと矛盾しない。

【０２６０】

図７２Ａおよび７２Ｂは悪性乳管中のＩＩ型の微細石灰化の位相差画像および対応する試料のＸ線写真を表示する。図７２Ｃは図７２Ａ中で小さな囲みにより強調されている沈着物から取得したラマンスペクトルを示す。このスペクトルの検査により、微細石灰化が純粋なハイドロキシアパタイトカルシウムより構成されないことが明らかである。純粋な化学量論的ハイドロキシアパタイトカルシウムのラマンスペクトルは、４種のリン酸内部振動モードならびにヒドロキシルイオンの伸長および振動モードによるバンドを含有する。リン酸振動モードのうち２種は、検査するために選ばれたスペクトル範囲ならびにヒドロキシルイオンモードの双方からである。９６０ｃｍ$^{-1}$の大きなバンドは「遊離」四面体リン酸イオンのν_1（PO_4）の完全に対称な伸長モードである。もう１つのリン酸ν_1モードは９４８ｃｍ$^{-1}$に存在するが、しかし９６０ｃｍ$^{-1}$の幅広いリン酸伸長モードにより不明瞭にされている。５個のν_3（PO_4）バンド由来の重なるラマン構造を１０２８ｃｍ$^{-1}$と１０６１ｃｍ$^{-1}$の間で見ることができる。第六のν_3（PO_4）モードが１０８５ｃｍ$^{-1}$に出現する。存在するリン酸の特徴は以前に発表されたハイドロキシアパタイトカルシウムのラマンスペクトルと矛盾しない。ハイドロキシアパタイトカルシウム由来のリン酸ピークに加え、このスペクトル中に存在するいくつかの他の振動モードが存在する。タンパク質の寄与を１４４５ｃｍ$^{-1}$および１６５０ｃｍ$^{-1}$に見ることができる。また、１００４ｃｍ$^{-1}$に存在する鋭いピークはフェニルアラニンに帰され得る。脂質からの小さな寄与はＣ－Ｃ伸長およびＣ－Ｈ（CH_2）屈曲としてそれぞれ１１３０ｃｍ$^{-1}$および１３００ｃｍ$^{-1}$に明らかである。

【０２６１】

最初に、Ｉ型およびＩＩ型の微細石灰化から取得したデータをそれらのラマンスペクトルに基づき分離した。特定の波数での振動強度の存在若しくは非存在を使用してＩ型とＩＩ型の微細石灰化を区別した。シュウ酸カルシウム二水和物に特徴的な９１２ｃｍ$^{-1}$および１４７７ｃｍ$^{-1}$の大きなピークを含有するスペクトルをＩ型の範疇にグループ分けした一方、ハイドロキシアパタイトカルシウムに特徴的な９６０ｃｍ$^{-1}$に強度を表すスペクトルをＩＩ型の範疇にグループ分けした。好ましい一態様で実施した解析において、Ｉ型およびＩＩ型の微細石灰化への分離は視覚的検査により実施した。しかしながら、スペクトルを正規化しかつ存在するものの強度値に基づいてそれらを９６０ｃｍ$^{-1}$（ＩＩ型）若しくは１４７７ｃｍ$^{-1}$（Ｉ型）のいずれかに区別する自動化コンピュータアルゴリズムを代替の一態様で実行し得る。検査したＩ型の微細石灰化の全３０個が線維嚢胞性疾患の病巣で形成されており、そして従ってＩ型の微細石灰化の全３０個が良性と診断さ

れた。これは、Ｉ型の微細石灰化が分泌の生成物として形成されかつ典型的には嚢胞性病変中に位置するという事実と矛盾しない。Ｉ型の微細石灰化は悪性病変、とりわけ上皮内小葉癌で見出されているとは言え、それは非常に稀である。

【０２６２】

良性および悪性乳房病変中に存在するＩＩ型の微細石灰化を区別するために、主成分分析（ＰＣＡ）と呼ばれる多変量統計学的解析方法。いくつかの他の器官系の疾患に罹った組織サンプルを分類するのに類似の方法が使用されている。ＰＣＡはラマンスペクトル全体を使用し、そして組織の化学的組成についていかなる知識も想定しない。それは一組のスペクトルデータ全体をいくつかの直交主成分（ＰＣ）スペクトルに解像するケモメトリクスの技術である。これらのＰＣスペクトルは正および負の成分を有し得、そしてＰＣが適正な重み付け係数により乗算される場合にデータ（ノイズにより課される限界内）の全部を正確に記述する一組の完全なｃａｓｉｓを形成し得る。スコアと呼ばれるこれらの重み付け係数は化学的画分に類似である。因子分析／ケモメトリクスに基づく一方法として、ＰＣＡは小さなスペクトルの変動を認識し得、そして従って類似性に基づきサンプルを区別する。この解析方法はＩＩ型の乳房の微細石灰化の検査によく適する。それらが生物学的不純物による微小の化学的変動を伴うハイドロキシアパタイトカルシウムより主に構成されるためである。ＰＣＡは元来および自ずからほとんど物理的情報を提供しないが、しかしながらそれは物理的情報と相関するスペクトルの傾向の単離に熟練しており、そしてそれにより診断アルゴリズムの開発の基礎を提供する。さらに、診断的ＰＣスペクトルの線の形状を純粋な化学物質のスペクトルと比較することにより、意味するところをそれらに帰することが可能である。より重要なことには、好ましい一態様のこの解析方法は、ＩＩ型の微細石灰化のラマンスペクトル内に含有される本当に重要な診断情報が存在するという原理の証拠を提供する。

【０２６３】

一組のＰＣデータを決定するための特異値分解アルゴリズムを好ましい一態様で使用する。該一組のデータを９６０ｃｍ$^{-1}$のピーク高に正規化していかなる可能な強度の偏りも除去し、そしてその後、ＰＣＡを実施する前に平均を中央としてスペクトルの全部に共通の特徴を除去し、それによりスペクトルの分散を強調した。スペクトルの全６０個を、９個のＰＣを使用してノイズレベルより上に正確にモデル化し得た。最初の６ＰＣがデータ中の全分散の９７％以上の原因である。次に、ロジスティック回帰分析（一判別分析法）を使用して診断アルゴリズムを生成させ、乳房病変を良性および悪性の範疇に分類するのにそれを使用した。ロジスティック回帰分析は、各ラマンスペクトルについて計算されたＰＣの重み付け係数（スコア）を診断の範疇と相互に関連付ける。診断は盲検化された病理学者により提供した。１個抜きクロスバリデーション解析を使用して確固たるアルゴリズムを得た。

【０２６４】

線維腺腫は検査された他の病変の全部と完全に異なる系統の良性腫瘍である。それは葉状腫瘍（その悪性の対蹠物は上皮よりむしろ間質が悪性である）に緊密に関係する。さらに、臨床医は、乳房の病変は身体検査に基づき線維腺腫／葉状腫瘍のファミリーにあることを典型的に知っており、そしてマンモグラフィーで微細石灰化以外を特徴付ける。これらの病変は処置のために外科的に摘出されなければならないため、医師が線維腺腫の診断のための補助のツールとしてラマン分光法のような技術を使用することはありそうにないとみられる。これらの理由から、線維腺腫と診断されたサンプルを解析から除外した後に、アルゴリズムの性能を評価する。

【０２６５】

ＰＣＡおよびロジスティック回帰分析の組合せを使用して、ＩＩ型の微細石灰化のラマンスペクトルのシグネチャを検査して、乳房疾患の診断がこれに基づいてなされ得るかどうかを決定した。３種のＰＣスコアを用いて高レベルの診断の正確さを得た。重要なスコアはPC_2、PC_3およびPC_5に関連する。PC_5はデータ中の全分散の１．０％を説明する一方、PC_2およびPC_3はそれぞれ８．８％および５．２％を説明する。これら

３種のＰＣおよび１個抜きクロスバリデーション法を使用して、１６個のＤＣＩＳのうち１４個および３９個の良性サンプルのうち３４個を正確に予測し得た。従って、良性および悪性の乳管で発生するＩＩ型の微細石灰化は８８％の感度および８７％の特異性で区別し得た。サンプルの全部が保持された場合、感度および特異性はわずかにのみ劣化され、８０％への感度の下落を伴い８８％の感度を維持する。ＩＩ型の微細石灰化の診断アルゴリズムの一図解を図７３に示す。アルゴリズムを２次元表示に簡約するために、PC_5およびPC_2（良性微細石灰化について双方ともより高スコアを有する）を一緒に追加して単一軸を形成した。このアルゴリズムに基づき、乳管上皮過形成および硬化性腺疾患（最も普遍的に癌と形態学的に混同される良性状態）と診断されたサンプルの全部が正確に予測された。線維腺腫中に存在する５個のＩＩ型の間質石灰化のうち４個、ならびにメンケベルク動脈硬化症の４個の動脈石灰化のうち２個および線維嚢胞性疾患中の１３個の乳管石灰化のうち３個が誤診断された。

【０２６６】

一般に、ただ１つの微細石灰化を各病変について検討した。しかしながら、２サンプルで同一病変からの複数の微細石灰化を検討し、そして各所定の病変のスペクトル中に有意の差異はみられなかった。データがＩ型およびＩＩ型双方の微細石灰化からの組合せられたデータである場合、８８％の全体的感受性および７４％の特異性、ならびに９７％の負の予測値が得られた。これらの結果から生成させた受診者動作特性（ＲＯＣ）曲線を図７４に示す。固定組織中でのこれらのｉｎ　ｖｉｔｒｏの結果に基づき、ラマン分光法は、良性悪性乳房病変に関連する微細石灰化をマンモグラフィーより正確に区別する潜在能力を有することが示される。新鮮組織でｉｎ　ｖｉｔｒｏで、および究極的にｉｎ　ｖｉｖｏで実施された付加的な研究は、乳癌の診断についてＸ線マンモグラフィーと比較したラマン分光法の臨床的有用性をより良好に評価し得る。

【０２６７】

３種の診断的ＰＣスペクトルの検査により、この識別を司る物理的基礎への洞察を得ることができる。最も診断上重要なＰＣスペクトルは図７５Ａに示されるPC_5であった。このＰＣスペクトルの検査は$960cm^{-1}$のリン酸の伸長ピークのブロードニングを示す。このブロードニングは図７５Ｂに明瞭に示され、ここでPC_5はＩＩ型の微細石灰化の全部からの平均スペクトルが重ねられている。このピークのブロードニングは炭酸カルシウムの存在に由来することが文献で報告されている。これらの態様において、炭酸化アパタイトモデル系へのラマン分光法の応用は、増大した炭酸含量を伴うリン酸ピークのブロードニングを示した。アパタイト構造への炭酸イオンの導入はその単位小室の対称性を低下させる。ピークのブロードニングは、サンプルの炭酸含量が増大する際のアパタイト構造中の長範囲の移動秩序の喪失から生じる。該解析は、$960cm^{-1}$のリン酸の伸縮モードのＦＷＨＭとサンプルの炭酸カルシウム含量との間の直線関係を見出した。PC_5中の$960cm^{-1}$のブロードニングが微細石灰化の炭酸カルシウム含量の変動に由来するかもしれないという証拠は、炭酸カルシウムのν_1（CO_3）モードに帰される$1070cm^{-1}$のピークで明らかである。しかしながら、正および負双方の特徴の包含により賦与されるＰＣスペクトルの解釈における困難は付加的な検討を必要とする。

【０２６８】

本当にPC_5が存在する炭酸カルシウムの量の変動の原因である場合には、PC_5についてより高スコアを有するスペクトルは、より小さい重み付け係数をもつスペクトルより多量の炭酸カルシウムを含有する。良性スペクトルは典型的に悪性スペクトルより大きなPC_5のスコアを有するため、乳房の良性病変に存在するＩＩ型の微細石灰化はＤＣＩＳで見出される沈着物より多量の炭酸カルシウムを含有すると仮定し得る。この仮説を確認するために、半値幅（ＦＷＨＭ）を各ラマンスペクトル中の$960cm^{-1}$のリン酸の伸長ピークについて計算した。良性病変で形成されたＩＩ型の微細石灰化はより高い炭酸カルシウム含量を有するという理論に従い、良性の乳房病変中に存在するＩＩ型の微細石灰化は$18.0\pm0.5cm^{-1}$の平均ＦＷＨＭを有したことが見出された。この差異の有意性は０．０３というＰに反映されている。この値はＷｉｌｃｏｘｏｎの順位和検定（デ

ータの正規分布を想定しない）に基づいて計算した。さらに、誤って診断されたサンプルのＦＷＨＭを検査する場合には反対の傾向が見出される。悪性と誤って診断された良性サンプルのＦＷＨＭは１５．８±０．５ｃｍ$^{-1}$であった一方、良性と誤って診断された悪性サンプルのものは１７．５±０．５ｃｍ$^{-1}$であり、リン酸の伸長モードの幅が重要な診断的特徴であることを示す。しかしながら、１０７０ｃｍ$^{-1}$の炭酸の伸長モードのピーク高は良性サンプル中で平均して４倍より大きいとは言え、それは９６０ｃｍ$^{-1}$のリン酸の伸長モードのＦＷＨＭと直線的に相関しない。これは、アパタイト構造中の付加的な不純物が対称性の破壊、およびそれにより９６０ｃｍ$^{-1}$のピークのブロードニング寄与することを示す。これらの不純物はPC_5の複雑な振動構造中で明らかであるが、しかし現在のところ同定されていない。PC_5はまた、１４４５ｃｍ$^{-1}$のCH_2、CH_3の屈曲モードおよび１６５０ｃｍ$^{-1}$のアミドＩの振動のようなタンパク質を表すいくつかの特徴も含有する。正の強度を有する炭酸カルシウムの特徴と異なり、タンパク質の特徴は負の方向をもつ。これは、タンパク質および炭酸含量が逆相関すること、および従って良性サンプルは悪性サンプルより低いタンパク質含量を有することを示す。

【０２６９】

良性および悪性病変中のＩＩ型の微細石灰化中に存在するタンパク質および炭酸カルシウムの量は、図７６に示されるPC_2の検査により付加的に確認される。このスペクトルは、正に向けられる炭酸カルシウムの特徴（とりわけ１０７０ｃｍ$^{-1}$）ならびに負に向けられるタンパク質の特徴を含有するようにもまた見え、そして、平均して良性乳管中で形成される微細石灰化のラマンスペクトルにより大きく寄与する。加えてPC_2は９６０ｃｍ$^{-1}$付近に大きな第二の誘導体様の特徴を表す。この型の構造はデータ中のピークのブロードニングを説明し、そして、加えて、良性乳管中で形成されるＩＩ型の微細石灰化が悪性乳管中で形成されるものよりもより多量の炭酸カルシウム、および従って９６０ｃｍ$^{-1}$のピークのより大きなブロードニングを有する傾向があるという仮説を裏付ける。

【０２７０】

PC_3もまた診断上重要であることが見出され、そして図７７に示される。しかしながら、PC_3は、悪性乳管中でＩＩ型の微細石灰化から取得されるラマンスペクトルにより大きく寄与する。それは正に向けられるタンパク質の特徴を有し、従って、悪性乳管中で形成された微細石灰化が良性乳管中の沈着物よりもより多量のタンパク質を有するという理論に付加的な支持を与える。良性および悪性乳管中の微細石灰化中のタンパク質の量は、１６５０ｃｍ$^{-1}$のアミドＩの振動のピーク高をモニターすることにより確認される。このモードの強度は、悪性病変で形成されたＩＩ型の微細石灰化中でおよそ１．５倍より大きい。加えて、フェニルアラニン（コラーゲンおよび他のタンパク質に関連してしばしば見出されるアミノ酸）からの寄与をPC_3中で１００４ｃｍ$^{-1}$に見ることができる。PC_3はおよそ９６０ｃｍ$^{-1}$に大きな第一の誘導体様の特徴を表す。この特徴はリン酸の伸長モードのピークのシフトの原因であり、タンパク質の特徴と正に相関する。これらのタンパク質の特徴の存在は、ＤＣＩＳで発生する細胞の分解に類似の間質若しくは動脈の分解の結果であるところの線維腺腫における間質石灰化およびメンケベルク動脈硬化症における動脈石灰化の誤診断を説明するかもしれない。

【０２７１】

ラマンプローブを包含する好ましい態様は、良性および悪性病変で見出される微細石灰化を区別するラマン分光法の診断的潜在能力を示した。加えて、ＰＣＡを使用して、良性および悪性の乳房病変中に存在するＩＩ型の微細石灰化の化学的組成のわずかな差異が発見されている。該結果に基づき、乳房の良性病変中に存在するＩＩ型の微細石灰化は、悪性病変中で形成されるものより低いタンパク質およびより高い炭酸カルシウムの双方の化学物質含量を有すると仮定し得る。好ましい態様は、ほとんど組織が得られずかつ病変が十分に表されていないかもしれないがしかし微細石灰化が存在している乳房の生検で、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでラマン技術を使用する。さらに、該態様は、続いて生検を受ける必要がある微細石灰化を伴う患者の選択を補助するためにマンモグラフィーへのｉｎ　ｖｉｖｏ付属物として使用されるかもしれない。

【０２７２】
ラマン分光法は、検討されているサンプルについての詳細な質的および量的情報を提供し得る。ラマン画像化データの組を取得するためのいくつかのアプローチが使用されている。３種の標準的アプローチは、点走査、線走査および直接画像化である。直接画像化は単一スペクトル成分をもつ完全な画像の収集を必要とする。波長選択性は、それぞれでフレームを捕獲する指定された波数間隔により掃引する音響光学的若しくは液晶の調節可能なフィルターのいずれかを使用することにより達成される。線走査および点走査は、線若しくは単一点のいずれかを画像化する際に完全なスペクトル（通常、生物学的媒体について４００と１８００ｃｍ$^{-1}$との間のラマンシフトを包括する）を収集する。これらのアプローチのそれぞれからの結果として得られるデータの組は、ラマンシフトおよび２本の空間軸の関数としてのラマン強度のハイパーキューブと見なし得る。

【０２７３】
組織構造のマッピングに加え、ラマン画像化は疾患過程のｉｎ　ｓｉｔｕの化学的検討に使用し得る。１つのこうした例がアテローム硬化症であり、該疾患の最終生成物（セロイド）は化学組成が未知である自己蛍光脂質生成物と同定されている。画像化を伴う表面増強ラマン分光法を使用して生存細胞の化学的組成を検討し得る。とりわけ、細胞のＤＮＡおよびフェニルアラニン含量をモニターし得る。

【０２７４】
スペクトル画像の創製のための古くからの一技術は特定のピーク高の検査による。このアプローチにおいて、各空間的位置の特定の１ラマンバンドの強度をプロットして画像を製作する。このモデルは広範に使用されており、そして選ばれた振動周波数に強度を与えるサンプル中のすべての分子の空間的位置についての情報を提供する。しかしながら、このアプローチは利用可能なデータの小部分のみを利用する。いくつかの別個の部分が特定の１ラマンバンドに強度を与えるとみられる複雑な生物学的サンプル中では、それらを区別するためにスペクトル情報の全部を取り込むことが必要である。これは、画像を創製する場合に点および線走査を用いてなされるような完全なスペクトルを利用するモデルの応用により達成される。秘訣は管理可能でそれでもなお情報を提供する形態に情報を圧縮することである。いくつかの普遍的データ圧縮技術は、主成分分析（ＰＣＡ）、多変量曲線解像（ＭＣＲ）およびユークリッド距離である。形態学的モデル化は、本発明の好ましい態様でもまた使用されるアプローチである。

【０２７５】
これらの方法の１つ１つは、化学物質の混合物のラマンスペクトルを混合物の成分のスペクトルの一次結合として表し得るという基礎的仮定に頼る。ラマン画像は、モデル内に含有される基礎スペクトルを画像中の各位置で得られるラマンスペクトルに当てはめることにより生成される。一般に、より多くの基礎スペクトルがデータスペクトルに寄与するほど、フィット係数がより大きくなりかつそのスポットが検査されている成分の画像中でより明るくなる。ＰＣＡおよびＭＣＲの場合、基礎スペクトルは数学的に導かれる一方、ユークリッド距離および形態学的モデル化については、基礎スペクトルは実験的に決定される。

【０２７６】
ＰＣＡでは特異値分解を使用して基礎スペクトルを計算する。第一の基礎スペクトル（すなわち主成分）は、データが解析前に平均を中心にされている場合はデータ中の最大分散を説明する。第二の基礎スペクトルは次の最も大きい分散を説明し、そして基礎スペクトルがデータ中のノイズのみを説明するまでそれが続く。それらが相互に直交しかつ従って重なるスペクトル情報を含有しないようなこれらの基礎スペクトルが創製される。これらの主成分が画像化データの組に当てはめられる場合に得られるフィット係数を使用して二次元画像を創製し得る。この画像は、主成分により表されるスペクトルの特徴がサンプル中にどのように分布されているかのマップを提供する。順に、このマップは、組織学的染色を用いた位相差顕微鏡検査若しくは光学顕微鏡検査のような別の光学技術により観察される形態学的特徴と相互に関連付け得る。主成分の線形もまた既知の化学物質のラマン

スペクトルと相互に関連付けられるかもしれないが、しかしながら、主成分は負および正双方のスペクトルの特徴を含有するためにこれは困難である。

【０２７７】

ＭＣＲはサンプル中に存在する化学物質の現実のラマンスペクトルに類似である基礎スペクトルを抽出するよう設計されている。サンプル中に存在する濃度若しくは基礎スペクトルの初期推定値を制約付き交互最小二乗法至適化で使用する。基礎スペクトルおよび濃度についての最小二乗法の解の間を反復することにより濃度および基礎スペクトルの新たな推定値を生成する。これらの等式は非負性制約に従って解き、基礎スペクトルおよび濃度の双方が全部正でありかつ従って物理的に関連することを確実にし得る。至適化は、１反復から次のものまでの濃度および基礎スペクトルの変化が最小となるまで継続する。系がより複雑になるほど、これらの等式に対する意味のある解を得るために初期推定値がより良好である必要がある。データに固有の多様な成分およびノイズのスペクトルの特徴における高度の重なりにより、ＭＣＲは常に正しい解に収束し得るわけではない。しかしながら、解が見出される場合は、生じられた基礎スペクトルはサンプル中に存在する個々の化学物質のラマンスペクトルに似ている。もう一度、基礎スペクトルのフィット係数を使用して画像を製作し得る。

【０２７８】

サンプルについて推測的にほとんど未知である場合はＰＣＡおよびＭＣＲ双方が有用な技術となる。それらはその化学的起源を知ることなくスペクトル情報を抽出することを可能にする。ユークリッド距離測定および形態学的モデル化の双方は、双方がサンプルの既知の化学についての情報を使用して画像を創製する。ユークリッド距離は存在する数種の化学物質の知識のみを必要とする一方、形態学的モデル化はサンプルのラマンスペクトルへの主要な寄与因子の全部の知識を必要とする。サンプルの大部分の前知識を必要とするにもかかわらず、形態学的モデル化は最も容易に解釈可能な結果を生じさせる。

【０２７９】

ユークリッド距離は、データの幾何学的距離に従い、基礎スペクトル（通常は純粋な化学物質スペクトル）からの画像データのスペクトル分散を分類する。該距離は、等式：

【０２８０】

【数７】

$$\sqrt{\sum_{\lambda}(S(\lambda)-P(\lambda))^2}$$

【０２８１】

［式中、ｄはユークリッド距離であり、Ｓはサンプルデータであり、Ｐは純粋な化学物質スペクトルであり、そしてλはスペクトルが取得される波長を表す］を使用して計算される。画像のスペクトルが基礎スペクトルと大きく異なるほど、該距離はより大きくなる。

【０２８２】

形態学的モデル化はラマン画像を解析するための新技術であり、通常の最小二乗法を使用して一組の基礎スペクトルをデータに当てはめる。基礎スペクトルの起源はこのアプローチを非常に有用にするものである。基礎スペクトルは、ラマン共焦点顕微鏡を使用して一組の代表的サンプルで見出される主要な形態学的特徴から取得する。ｉｎ　ｓｉｔｕで取得したある範囲の形態学的特徴を使用することにより、ｉｎ　ｓｉｔｕの化学的微小環境でその形態学的成分を表すスペクトルを得る。基礎スペクトルはサンプル中に存在する主要化学物質の全部を説明すべきであるが、しかし、どの基礎スペクトルが正確に解像され得るかを決定するために、データのＳ／Ｎならびに基礎スペクトルの重なりの程度の双方を考慮しなければならない。基礎スペクトルは純粋な化合物から取得し得るとは言え、形態学的に派生した成分が好ましい。それらは実際のサンプル由来であり、そして従って純粋な化学物質スペクトルよりもｉｎ　ｓｉｔｕで観察されるものにより近いからである。ときに、目的の化学物質がサンプル内で独立に存在しない場合は純粋な化学物質成分および形態学的に派生した成分の組合せが最良の結果を生じさせる。モデルが良好に選択さ

れている場合、生じられた画像はサンプル中の詳細な形態学的および化学的構造を示し得る。

【０２８３】

好ましい態様は、形態学的モデル化をヒト結腸癌細胞ならびにヒト乳房および動脈サンプルのラマン画像に適用する。この形態学的モデル化方法を、他の普遍的に使用される技術、主として：ピーク高解析、ＰＣＡ、ＭＣＲおよびユークリッド距離と比較する。

【０２８４】

乳房組織サンプルを摘出生検試料から得た一方、動脈サンプルは移植の時点で外植心から得た。一旦取り出されれば組織は液体窒素中で急速凍結しそして－８０℃で保存した。その後、組織サンプルをヒストプレップ（Ｈｉｓｔｏｐｒｅｐ）（Ｆｉｓｈｅｒ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、ニューヨーク州オレンジバーグ）を使用してクライオスタットチャック上にマウントし、そしてクライオマイクロトーム（Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｅｑｕｉｐｍｅｎｔ Ｃｏｍｐａｎｙ、マサチューセッツ州ニーダムハイツ）を使用して６μｍ厚の切片に切断した。いくつかの連続切片を切断し、１つをラマンデータ取得のためMgF_2スライド（Ｍｏｏｓｅ Ｈｉｌｌ Ｅｎｔｅｒｐｒｉｓｅｓ Ｉｎｃ．、バージニア州スペリービル）上に、そして最低２個の他者を組織学的染色のためガラス製スライドガラス上にマウントした。染色したスライドガラスはラマンマップで観察された特徴の病理学的確認に使用した。測定中、組織はＰＢＳ、ｐＨ＝７．４で湿らせたまま保った。ラマン微小画像に加え、ＣＣＤカメラを介して未染色組織の位相差画像を録画した。

【０２８５】

細胞の検討はヒト結腸癌細胞株ＨＴ２９を使用して実施した。それらは１０％ウシ胎児血清、１００単位／ｍｌのペニシリンおよび１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（全部Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ製品、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ニューヨーク州グランドアイランド）を補充した高グルコースダルベッコの改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）を使用して増殖させた。細胞は空気中５％CO_2の加湿雰囲気中３７℃でコンフルエンシーまで増殖させ、そしてトリプシンを使用して懸濁液に分散させた。細胞懸濁液をMgF_2フラット上に置き、リン酸緩衝生理的食塩水（ＰＢＳ、ｐＨ＝７．４で緩衝される）ですすぎそして風乾させた。サンプルの乾燥はマッピング実験の間中細胞を固定するために必要であった。その後、乾燥したサンプルをＰＢＳで再度湿らせ、そしてその後ラマンマップを取得した。乾燥細胞から収集したラマン画像化顕微鏡データを、バルクラマン系を使用して懸濁液中でなお生存可能な細胞から収集したデータと比較した。乾燥細胞から取得したスペクトルを使用して、生存可能な細胞から得たスペクトルをモデル化した。モデルフィットからの残差は観察されなかった。

【０２８６】

ここに提示された画像のデータを収集するのに使用したラマン微小画像化の設定は点走査系であった。ラマン励起はアルゴンイオンレーザーポンピングＴｉ：サファイアレーザー（Ｃｏｈｅｒｅｎｔ Ｉｎｎｏｖａ ９０／Ｓｐｅｃｔｒａ－Ｐｈｙｓｉｃｓ ３９００Ｓ、Ｃｏｈｅｒｅｎｔ Ｉｎｃ．、カリフォルニア州サンタクララ）により提供した。典型的に、５０～１５０ｍＷの８３０ｎｍの励起光を、顕微鏡対物レンズ（６３倍Ｚｅｉｓｓ Ａｃｈｒｏｐｌａｎ、無限補正液浸、開口数０．９）により２μｍ未満の直径をもつサンプル上のスポットに集中させた。スペクトル分解能はおよそ$8\,cm^{-1}$であった。組織のスペクトルマップは顕微鏡対物レンズ下でトランスレーションステージ（Ｐｒｉｏｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ Ｌｔｄ．、マサチューセッツ州ケンブリッジ）をラスター走査することにより創製した。マップは通常、共焦点顕微鏡の空間分解能に一致する２μｍのステップサイズを用いて取得した。データ収集時間は、画像のステップサイズ、ステップ数およびスペクトル取得時間のようないくつかのユーザー定義パラメータに依存したとは言え、ラマン画像全体は典型的には２～５時間で生成された。顕微鏡の上のＣＣＤカメラは、白色光徹照若しくは位相差画像との集中されたレーザースポットのレジストレーションを見込んだ。

【０２８７】

全部のスペクトルデータ処理はソフトウェア、例えばＭＡＴＬＡＢ（ＭａｔｈＷｏｒｋｓ，Ｉｎｃ．、マサチューセッツ州ナティック）を使用して実施した。データは、タングステン光源を使用してシステムのスペクトル応答について補正し、そしてその後トルエンの既知のラマン線を使用して周波数較正した。宇宙線は微分フィルターを用いて除去し、また、MgF_2フラットからの小さなバックグラウンドを減算した。その後、データを４次、若しくは５次の多項式と当てはめ、いかなる蛍光バックグラウンドも除去するためにそれをスペクトルから減算した。全データはピーク高を１に正規化した。最後に、ＭＡＴＬＡＢを使用して、多様なデータ圧縮技術すなわちＰＣＡ、ＭＣＲ、ユークリッド距離および形態学的モデル化を実行した。好ましい態様において、形態学的モデル化のための当てはめアルゴリズムとして使用したＰＣＡおよび通常の最小二乗法のアルゴリズムは、限定されるものでないがＭＡＴＬＡＢのようなソフトウェアから提供された一方、ＭＣＲのアルゴリズムはＰＬＳ＿Ｔｏｏｌｂｏｘ（Ｅｉｇｅｎｖｅｃｔｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｉｎｃ、ワシントン州マンソン）の一部であった。ＨＴ２９細胞の分光学的モデル化に使用した純粋な化学物質すなわちトリオレイン、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびＤＮＡ（仔ウシ胸腺）はＳｉｇｍａ（ミズーリ州セントルイス）から購入した。

【０２８８】

向上された画像コントラストを得るために、空間的フィルタリングに基づく平滑化アルゴリズムを好ましい態様のデータに適用した。空間的フィルタリングは、ディジタル画像中の隣接する画素が関係した情報を含有するという仮定に頼る。中央の画素を取り囲みかつ包含する一群の画素をカーネルと呼ぶ。平滑化アルゴリズムは３×３のカーネルサイズに基づく。好ましいアルゴリズムはカーネルの中心からのそれらの幾何学的距離の逆数により寄与する画素を重み付けするマスクを使用する。結果として生じるマスクは：

【０２８９】

【表５】

表5

2/28	3/28	2/28
3/28	8/28	3/28
2/28	3/28	2/28

【０２９０】

であり、ここで各画分はカーネル中の画素の加重を表す。

【０２９１】

形態学的モデル化は小スケールに関する構造的および化学的情報の収集のための強力なツールである。図７８Ａ～７８Ｇで、ヒト結腸癌細胞（ＨＴ２９）のスペクトルをホスファチジルコリン（Ａ）、ＤＮＡ（Ｂ）、コレステロール（Ｃ）、トリオレイン（Ｄ）、および「細胞質」（Ｅ）（乳房組織モデルについて開発された形態学的に派生したスペクトル、主としてアクチン）の純粋な化学物質スペクトルと当てはめる場合に細胞膜、核および細胞質のような特徴が容易に同定される。図７８Ｅ中に示されたボクセルに対応するスペクトルは対応するフィットおよび残差と一緒にＧで見ることができる。個々のモデル要素のフィットの寄与率もまた示す。該スペクトル画像は位相差画像と一致し、５種の基礎スペクトルの単純なモデルを使用して、サンプルについての構造的および化学的情報を細胞以下のレベルで得ることが可能であることを示す。画像中に示される細胞は共焦点顕微鏡の焦点の面により水平に二分されるため、細胞膜（主としてホスファチジルコリンおよびコレステロール）は環状構造として観察され、細胞質およびＤＮＡの寄与はそれ内の別個の特徴として明瞭に観察される。ＨＴ２９細胞の平均的な核の大きさは１０μｍであり、細胞のＤＮＡ含量のラマン画像により提供される寸法と矛盾しない。

【０２９２】

形態学的モデル化はヒト組織サンプルに同様に適用し得る。図７９Ａ～７９Ｇは、形態

学的構造のいくつか（７９Ｂ～Ｆ）の分布を描くラマン画像と一緒に軽度にアテローム硬化性の動脈の位相差画像（７９ＡおよびＧ）を示す。該画像は、コレステロール（７９Ｂ）、泡沫細胞および壊死中心（７９Ｃ）が内膜にのみ制限される一方、平滑筋細胞（７９Ｅ）がより優勢に中膜で見出されることをはっきりと示す。この知見はアテローム硬化性の血管の既知の構造と一致する。１個の平滑筋細胞と次のものとの間にわずかな分界のみが存在する。それらは中膜中で非常に緊密に間隔を置いて配置されかつ重なりさえしているためである。該画像はこの技術の高空間分解能を示し、また、弾性板の穿孔（アテローム硬化症の発症とともに発生することが既知の過程）の証拠を示す。穿孔は内部弾性板（ＩＥＬ）のラマン画像すなわち図７９Ｄで観察され得る。図７９Ｅに示される平滑筋細胞はＩＥＬ中の裂け目を通って内膜に移動するのを見ることができる。平滑筋細胞の移動はアテローム硬化性疾患の進行の一特徴である。加えて、散在する結合組織のバックグラウンドの上の内膜中の顕著なコラーゲン線維（２Ｆ）（位相差画像からは完全に認識することが困難である特徴）を同定し得る。

【０２９３】

図８０Ａ～８０Ｇは乳房組織（図８０Ａ～Ｄ）をとりわけ解析するために創製した形態学的モデルを使用して得られる正常ヒト乳管のラマン画像を示す。これらの画像は、ＤＮＡのリン酸の伸長（１０９４ｃｍ$^{-1}$）およびアミドＩのバンド（１６６４ｃｍ$^{-1}$）に特徴的な２種のラマンバンドの強度をプロットすることにより創製したもの（図８０ＥおよびＦ）と比較し得る。形態学的に基づくラマン画像は、特定の成分（細胞質（８０Ａ）、細胞核（８０Ｂ）、脂質（８０Ｃ）若しくはコラーゲン（８０Ｄ））がスペクトルに強く寄与する領域（明るい領域）を表す。組織サンプルの組織学的分析はおよそ２５μｍの直径をもつ正常乳管を示した。この大きさの典型的な乳管は基底膜（主としてコラーゲン）により囲まれる上皮細胞の環よりなる。管内におよびそれを囲み若干の脂肪がある。形態学的モデルの画像は乳管の構造をはっきりと示す一方、１０９４および１６６４ｃｍ$^{-1}$で見出されるラマンバンドを使用して製作したピーク高画像ははるかにより少なく情報を提供する。ＤＮＡのリン酸の伸長（１０９４ｃｍ$^{-1}$、図８０Ｅ）は主として細胞領域で見出されるはずである一方、タンパク質を暗示するアミドＩのバンド（１６６４ｃｍ$^{-1}$、図８０Ｆ）は主に膠原領域で見出されるはずであるとは言え、生じられた画像は細胞成分もコラーゲンも形態学的モデル画像が示すほど明瞭に示さない。これは、アミドＩのバンドが細胞骨格を形成するものを包含する多くのタンパク質中で見出され得る一方で、リン酸の伸長がコラーゲンスペクトル中に存在するバンドと重なるためである。スペクトルの重なりによる形態学的特徴を正確に区別することのピーク高分析の無能は、はるかにより少なく情報を提供する画像をもたらす。

【０２９４】

図８０Ｇのラマンスペクトルはラマン画像中の単一点を表す。該スペクトルは多くの化学的成分の混合物であり、その全部がラマンスペクトルに寄与している。該スペクトルを形態学的モデルと当てはめることにより、データ中の主要なスペクトルの特徴を説明することが可能である。図８０Ｇ中にまた示されるフィットの残差は圧倒的にノイズであり、ラマン画像化データのハイパーキューブ中の情報の全部がモデルに基づく画像により表し得ることを示す。

【０２９５】

形態学的モデル化はラマン画像を表示する有効な一手段であるとは言え、それは検査されているサンプルのはるかに高度な知識を必要とする。前に論考されたとおり、ＰＣＡ、ＭＣＲおよびユークリッド距離もまたデータを管理可能な形態に圧縮するのに使用し得、かつ、系についてほとんど未知である場合にはるかにより有効である。図８１Ａ～８１Ｅは、ＰＣＡ、ＭＣＲ、ユークリッド距離および形態学的モデル化の並置した比較を示す。同一のデータ組から生成させた画像は、コラーゲンマトリックスにより囲まれた３個の乳管単位（主に細胞）を含有する正常乳房組織のサンプルのものである。見ることができるとおり、全４種の技術により創製された画像は同様である。ユークリッド距離画像は、他の技術との容易な比較のために反転として示される（それらは他の方法が表すような類似

性よりはむしろ入力スペクトルとの差異を表すため）。左にコラーゲンに帰することができる寄与が示される一方、右には細胞核（主にＤＮＡ）のよりわずかな寄与を表す。ＰＣＡ（図８１Ａ）およびＭＣＲ（図８１Ｂ）双方とも、７種の独立に変動する基礎スペクトルを見出すことが可能であった。乳房組織の完全な形態学的モデルは９種の基礎スペクトルを有するが、しかしながら、これは、病理学上非常に重要であるがしかしヒト乳房組織中では稀にのみ観察されかつこの試料中で全く観察されない微細石灰化のようないくつかの要素を包含している。

【０２９６】

第一の２主成分（ＭＣＲを使用して派生したスペクトルのうち２種）、ならびにコラーゲンおよび細胞核の基礎スペクトルを図８１Ｅに示す。最初の主成分およびＭＣＲのスペクトルはコラーゲンのスペクトル（該画像への最大の寄与因子）に類似である。第二の主成分およびＭＣＲにより製作したスペクトルは、双方とも、細胞核のスペクトルのいくつかの特徴を（負のピークとして）含有するが、しかし製作された画像（図８１ＡおよびＢ、右）から見ることができるとおり、それらは乳管単位内の核内容物の抽出において形態学的モデル（図８１Ｄ、右）よりもはるかにより少なく効果的である。図８１Ｄ（右）で観察される乳管単位の満たされた円形は、この組織薄片の病理学と一致する。

【０２９７】

図８２Ａおよび８２Ｂは、図８１Ａ～Ｄの左（図８２Ａで示される列）で使用したラマン画像の特定の一列の正規化したフィット係数を示す。ＰＣＡ（△）、ＭＣＲ（□）、ユークリッド距離（○）および形態学的モデル（×）は全部、フィット係数の強度の変化により示される組織の膠原領域から細胞領域へのいくつかの形態の遷移を表し、該遷移は形態学的モデルを使用した場合に最も鋭い。従って、形態学的モデルはサンプルの構成要素（例えば細胞核）のより多くについての情報を提供するのみならず、しかしそれはまたより高分解能を伴う画像も生じさせる。

【０２９８】

ラマン画像の最も単純な表示方法は特定の一ラマンバンドの強度あるいは２個のラマンバンドの比をプロットすることである。この解析方法はデータの小さい一部分のみを利用し、そして、大部分の生物学的サンプルは類似のスペクトルの特徴をもつ多くの化合物を含有するために、生物学的系に応用可能でない。スペクトルの重なりは、ピーク高のみに基づくラマン画像からサンプルについての構造的若しくは化学的情報を得ることを困難にする。

【０２９９】

これらの画像化技術すなわちＰＣＡ、ＭＣＲ、ユークリッド距離および形態学的モデル化は、ラマンのみならず、しかしまた蛍光のような多くの他の分光学的画像化方法にも応用可能である。各方法はその利点および欠点を有する。いくつかは検査されているサンプルの前知識を全く（ＰＣＡ）若しくはほとんど（ＭＣＲ）必要としない一方、他者は若干の（ユークリッド距離）若しくは完全な（形態学的モデル化）知識を必要とする。製作される画質は通常、どれだけ多くの情報が既知であるかと関連する。

【０３００】

ＰＣＡは使用者からの最小の入力を必要とし、そしてその結果、新たな型のサンプルを検査するための最良のツールである。ＰＣＡはそれらのスペクトル分散に基づく領域を精密に示すのに使用される。それらが創製される数学的過程により、主成分はデータ中に存在するスペクトルの特徴の全部を説明する。しかしながら、主成分それら自身は数学的構築物であるため、それらは既知の化学物質と相互に関連付けることが困難若しくは不可能であり得る。この欠点にもかかわらず、ＰＣＡから得られる情報を使用して、乳房および動脈組織について開発された形態学的モデルのようなより洗練されたモデルを構築し得る。

【０３０１】

ＭＣＲもまた数学的に派生される一方、非負性制約を適用して、発生された基礎スペクトルがＰＣＡにより生じられたものより多くの同定可能な特徴を有することを確実にし得

る。事実、ＭＣＲを使用して決定されるスペクトルは真の化学物質スペクトルに非常に類似し得る。ＭＣＲの欠点は、検査されている系が複雑になるほど（とりわけスペクトルの特徴に大きな重なりが存在する場合）、解析を実施することがより困難になることである。当業者は、系が十分に単純である場合はＭＣＲが失敗した場合に認識し得かつパラメータを相応して調節し得るが、しかし、これはより多くの成分スペクトルがサンプル混合物に追加される際により困難になる。加えて、より多くの曲線が複雑な系で解像される際にノイズがますますより大きな役割を演じる。にもかかわらず、ＭＣＲはサンプルのさらなる解析を指図するのに使用し得るスペクトルの線形を得るのに極めて有用である。

【０３０２】

サンプルの成分のいくつか（しかし全部ではない）が既知の場合、ユークリッド距離が非常に有効である。例えば、検査中の特定の化学物質のスペクトルが既知であるがしかしバックグラウンド化学物質が未知であるサンプルを有することは珍しいことではない。この場合、ユークリッド距離は、バックグラウンドの知識の欠如により邪魔されずにサンプル内のその特定の化学物質の分布をマッピングし得る。

【０３０３】

系の詳細な分析のため、とりわけ病理学のスライドガラスに類似の情報内容をもつ画像を製作するためには、形態学的モデル化が最良の技術である。しかしながら、良好な形態学的モデルの開発は時間がかかる可能性があり、かつ、他に依存しない多量のデータの取得を必要とする。モデルが不完全である場合、該画像はより少なく正確な情報を与える。従って、形態学的モデル化は、徹底的な研究が実施されておりかつモデル開発が実験の一部である場合に最良に使用される。ラマンスペクトル画像化は生物学的試料中の化学物質情報を決定するための強力なツールである。困難は、スペクトル情報の全部を十分に利用して最大の情報内容をもつ画像にそれを簡約することである。好ましい態様は、形態学的モデル化および画像化のアプローチ方法すなわちＰＣＡ、ＭＣＲおよびユークリッド距離を包含する。

【０３０４】

組織若しくは細胞の画像を製作するため画像化の様相とラマン共焦点顕微鏡検査を組合せる能力が好ましい態様に包含される。本発明の態様は、ラマン画像化を使用してリアルタイムで細胞以下の過程をモニターするために使用される。

【０３０５】

図７８Ａ～７８Ｇは、本発明の好ましい一態様の、対応する位相差画像（Ｆ）とともにＨＴ２９細胞のラマン画像（Ａ～Ｅ）を具体的に説明する。ラマンスペクトルを、ホスファチジルコリン（Ａ）、ＤＮＡ（Ｂ）、コレステロールリノレエート（Ｃ）、トリオレイン（Ｄ）および形態学的に派生した細胞質（Ｅ）スペクトルと当てはめて細胞の化学的地図を製作する。Ｇ：対応するフィット（－）および残差（下、ゼロ線が引かれている）と一緒に画像Ｅに示された囲み内から取得したスペクトル（・）を示す。各モデル要素のフィットの寄与率を横に列挙する。

【０３０６】

図７９Ａ～７９Ｇは、本発明の好ましい一態様の、軽度にアテローム硬化性の動脈の位相差画像（ＡおよびＧ）を具体的に説明し、内部弾性板（ＩＥＬ）およびコラーゲン線維をＧ中で強調している。コレステロール（Ｂ）、泡沫細胞および壊死中心（Ｃ）、ＩＥＬ（Ｄ）、平滑筋細胞（Ｅ）、ならびにコラーゲン（Ｆ）のラマン画像もまた示す。ＩＥＬの穿孔のような重要な形態学的特徴が観察され得る。

【０３０７】

図８０Ａ～８０Ｇは、本発明の好ましい一態様の、形態学的に派生した成分すなわち細胞質（Ａ）、細胞核（Ｂ）、脂肪（Ｃ）およびコラーゲン（Ｄ）の通常の最小二乗法当てはめに基づく正常乳管のラマン画像を具体的に説明する。画像ＥおよびＦは単一のバンドすなわちそれぞれＤＮＡのリン酸（１０９４ｃｍ$^{-1}$）およびタンパク質に基づくアミドＩ（１６６４ｃｍ$^{-1}$）ピークの強度をプロットする。ラマン画像（－）中の個々の画素（細胞性の内容物を含む領域に位置する）のスペクトルへの形態学的に基づくモデル（・

）の当てはめの立証をＧに示す。フィットの残差をスペクトルの下にプロットする（ゼロ線が引かれている）。

【０３０８】

図８１Ａ～８１Ｅは、本発明の好ましい一態様の、コラーゲンにより分離されている複数の乳管単位を含む領域のラマン画像の４種の異なる解析方法の比較を具体的に説明する。最初の２主成分のフィット係数により製作した画像をＡに示す。Ｂ：これは多変量曲線解像（ＭＣＲ）により製作した２種の対応する画像を示す。Ｃ：これは形態学的モデルからのコラーゲン（左）および細胞核（右）のスペクトルを使用するユークリッド距離に基づく画像を示す。Ｄ中の画像は、形態学的モデルとの通常の最小二乗法当てはめにより生じさせたフィット係数を使用して製作し、コラーゲン（左）および細胞核（右）のみを示すが、しかし完全なモデルを使用した。Ｅ：画像を創製するために使用した基礎ベクトルを、上から下へ：最初の２主成分、ＭＣＲにより製作した対応するスペクトル、コラーゲンの形態学的に派生したスペクトルおよび細胞核の形態学的に派生したスペクトルを示す。最後の２スペクトルはユークリッド距離測定および形態学的モデル化双方で使用した。

【０３０９】

図８２Ａおよび８２Ｂは、本発明の好ましい一態様のＡ：第３列が白線により示されるラマン画像、ならびに（Ｂ）４種の異なるモデルすなわちＰＣＡ（△）、ＭＣＲ（□）、ユークリッド距離（○）および形態学的モデル（×）を使用して得た示される列についての対応するフィット係数の高さを具体的に説明する。

【０３１０】

本発明の原理を適用し得る広範な態様を鑑み、具体的に説明された態様は例示のみでありかつ本発明の範囲を制限すると解釈されるべきでないことが理解されるべきである。例えば、流れ図の段階は記述されたもの以外の順序で起きてよく、また、より多い若しくはより少ない要素をブロック図で使用してよい。好ましい態様の多様な要素はソフトウェアに実装されているとして記述した一方、ハードウェア若しくはファームウェアの実装の他の態様をあるいは使用してもよく、そして逆もまた真である。

【０３１１】

汚染を測定および制御するための系および方法に関与する方法が、コンピュータで使用可能な媒体を包含するコンピュータプログラム製品で例示されうることが当業者に明らかであろう。例えば、こうしたコンピュータで使用可能な媒体は、その上に保存されたコンピュータで読み出し可能なプログラムコードセグメントを有するハードドライブ装置、ＣＤ－ＲＯＭ、ＤＶＤ－ＲＯＭ若しくはコンピュータディスケットのような読み出し可能な記憶装置を包含し得る。コンピュータで読み出し可能な媒体は、ディジタル若しくはアナログ信号としてその上に運搬されるプログラムコードセグメントを有する光、有線若しくは無線のいずれかのバス若しくは通信リンクのような通信若しくは伝送媒体もまた包含し得る。

【０３１２】

生物学的組織の分光法のための系および方法についての作動環境は、最低１個の高速処理装置および記憶システムをもつ処理システムを包含する。コンピュータプログラミングの当業者の実務により、本発明は、別の方法で示されない限り、処理システムにより実行される操作若しくは命令の行動（ａｃｔ）および記号表示を参照して記述される。こうした行動および操作若しくは命令はときに「コンピュータ実行」若しくは「処理装置実行」されると称される。

【０３１３】

行動および記号で表示される操作若しくは命令は処理装置による電気的信号の操作を包含することが認識されるであろう。データビットをもつ電気的システムは、電気的信号表示の生じる変換若しくは低下、およびそれにより処理装置の作動を再設定若しくは別の方法で変えるための記憶装置中のメモリ位置のデータビットの管理、ならびに信号のその他の処理を生じさせる。データビットが管理されているメモリ位置は、該データビットに対応する特定の電気的、磁気的、光学的若しくは有機的特性を有する物理的位置である。

【０３１４】
本発明の好ましい態様は、ラマンスペクトルを収集するための側方観察プローブおよびあるいは前方観察プローブを包含する。好ましい態様は、組織からのラマン分布を特徴付けることにより系のスループットを完全に利用するための光学的設計を実装する。該態様は収集効率を至適化し、ノイズを最小にし、そして１秒で高品質データの収集が可能な小直径の高度に効率的なラマンプローブをもたらした。該態様の性能は、組織モデルおよび数種のｉｎ　ｖｉｔｒｏ組織型を用いるシミュレーションおよび実験で試験されて、これらの態様が臨床上実現可能な技術としてラマン分光法を進歩させ得ることを示した。本発明の好ましい態様は、乳房中の多様な病変に存在する微細石灰化の化学的組成若しくは構造の差異を強調するためにラマンスペクトルを使用する。該態様からの結果は、乳房疾患の発症および進行に付随する化学的変化の理解を進め、かつ、ラマン分光法を使用する乳房疾患の診断に重要なパラメータを提供する。

【０３１５】
ラマンプローブを包含する好ましい態様は、良性および悪性病変で見出される微細石灰化を区別するラマン分光法の診断的潜在能力を示した。加えて、主成分分析（ＰＣＡ）を使用して、良性および悪性の乳房病変に存在するＩＩ型の微細石灰化の化学的組成のわずかな差異を発見した。該結果に基づき、われわれは、乳房の良性病変に存在するＩＩ型の微細石灰化が、悪性病変で形成されるものより低いタンパク質およびより高い炭酸カルシウムの双方の化学物質含量を有すると仮定する。

【０３１６】
データビットは、磁気ディスク、光ディスク、有機ディスク、および処理装置により読み出し可能ないずれかの他の揮発性若しくは不揮発性の大容量記憶システムを包含するコンピュータで読み出し可能な媒体に管理してもまたよい。コンピュータで読み出し可能な媒体は、処理システムで独占的に終了するかまたは処理システムに対しローカル若しくはリモートでありうる相互接続した処理システム間で分配される、共同若しくは相互接続コンピュータで読み出し可能な媒体を包含する。

【０３１７】
請求の範囲はそれを遂げることが述べられない限り、記述された順序若しくは要素に制限されるとして読まれるべきでない。従って、以下の請求の範囲およびそれに対する同等物の範囲および技術思想内にある全部の態様が本発明として特許請求される。

【図面の簡単な説明】

【０３１８】
【図１Ａ】本発明の好ましい一態様のラマン散乱光の放射状分布についての血液組織の混濁サンプルのラマン発射データの論理、シミュレーションおよび結果の比較を図で具体的に説明する。
【図１Ｂ】本発明の好ましい一態様のラマン散乱光の角度分布についての血液組織の混濁サンプルのラマン発射データのシミュレーション、論理および結果の比較を図で具体的に説明する。
【図２Ａ－２Ｃ】本発明の好ましい一態様のそれぞれ正常冠動脈、非石灰化斑および石灰化斑についての冠動脈の形態学的参照データの図解である。
【図３】本発明の好ましい一態様の冠動脈のラマン形態計測法の図解である。
【図４Ａ】本発明の好ましい一態様の組織測定用プローブを包含する装置の長軸方向図である。
【図４Ｂ】本発明の好ましい一態様の図４Ａに具体的に説明されるプローブの横断面図である。
【図４Ｃ－４Ｄ】本発明の系の放物面状鏡を伴う組織測定用プローブの代替の一態様のそれぞれ長軸方向図および横断面図である。
【図５】本発明の好ましい一態様のラマンシフトに関してのフィルターを組み込む励起および収集ファイバーの透過の特徴を図で具体的に説明する。
【図６】本発明の好ましい一態様の１００ｍＷの励起力で１秒で収集された非石灰化アテ

ローム硬化性斑のラマンスペクトルを図で具体的に説明する。
【図７】本発明のｉｎ　ｖｉｔｒｏ系の好ましい態様の正常動脈のラマンスペクトルを図で具体的に説明する。
【図８】本発明の好ましい一態様の組織測定用の系を具体的に説明する図解である。
【図９】本発明の好ましい一態様の組織を通って拡散する励起光を具体的に説明する。
【図１０Ａ－１０Ｃ】本発明の好ましい一態様の血液組織についてのそれぞれ積分済放射状分布、積分済角度分布、および至適化した収集効率の図解である。
【図１１】本発明の好ましい一態様の励起スポットサイズの図解である。
【図１２】本発明の好ましい一態様の組織中の励起光の分布の光線図の具体的説明である。
【図１３】本発明の好ましい一態様のプローブの収集効率の光線図の具体的説明である。
【図１４】本発明の好ましい一態様のプローブの収集効率を図で具体的に説明する。
【図１５】本発明の好ましい一態様のプローブを示す冠動脈の一部分を具体的に説明する部分断面図である。
【図１６】本発明の好ましい一態様のレーザー出力の関数としてのボールレンズからのシグナルを具体的に説明する。
【図１７】本発明の好ましい一態様のプローブおよび正常大動脈の実験系を使用して収集されたところのデータの比較を図で具体的に説明する。
【図１８】本発明の好ましい一態様のプローブを用いて検査した正常乳房組織のラマンスペクトルを図で具体的に説明する。
【図１９】本発明の好ましい一態様のプローブを使用して収集されたところのおよび本発明の参照データにより予測されるところの悪性乳癌のラマンスペクトルの比較を図で具体的に説明する。
【図２０】本発明の好ましい一態様のプローブを用いて収集された石灰化大動脈データとの形態学的参照データの比較を図で具体的に説明する。
【図２１Ａ－Ｃ】本発明の系の組織測定用の側方観察プローブの代替の好ましい態様の長軸方向図を具体的に説明する。
【図２１Ｄ】本発明の好ましい一態様の組織の一部分上で画像化される光を送達する側方観察プローブおよび組織から収集されるラマン光の好ましい一態様の図を具体的に説明する。
【図２２】本発明の好ましい一態様の複合ラマン肉眼分光法および共焦点顕微鏡系の図解である。
【図２３】本発明の好ましい一態様の８種の選択された冠動脈の形態学的構造のラマンスペクトルを図で具体的に説明する。
【図２４Ａ－２４Ｃ】本発明の好ましい一態様の較正データ組および診断アルゴリズム分類への７種の形態学的構造のフィットの寄与率の結果を図で具体的に説明し、ここで図２４Ａは非アテローム硬化性組織を具体的に説明し、図２４Ｂは非石灰化アテローム硬化性斑を具体的に説明し、そして図２４Ｃは石灰化アテローム硬化性斑を具体的に説明する。
【図２５】本発明の好ましい一態様の３診断範疇に関する較正データ組におけるβ－カロチンのスペクトルの寄与を具体的に説明し、ここでカロチノイドレベルは自由裁量単位で表される。
【図２６Ａ－２６Ｂ】本発明の好ましい一態様のそれぞれ初期較正データ組およびプロスペクティブ検証データ組の結果を用いて開発したアルゴリズムの結果を図で具体的に説明する。
【図２７】本発明の好ましい一態様の共焦点ラマン顕微分光計を包含する系の図解である。
【図２８Ａ－２８Ｂ】本発明の好ましい一態様のそれぞれ位相差下で見られる６μｍの未染色冠動脈切片中の内部弾性板の顕微鏡写真および該内部弾性板のラマンスペクトルである。
【図２９Ａ－２９Ｂ】本発明の好ましい一態様のそれぞれ位相差下で見られる６μｍの未

染色冠動脈切片中のコラーゲン線維を伴う外膜の顕微鏡写真および該線維のラマンスペクトルである。
【図３０】本発明の好ましい一態様の中膜中の４種の異なる平滑筋細胞のラマンスペクトルを図で具体的に説明する。
【図３１】本発明の好ましい一態様の外膜中の４種の脂肪細胞（ｆａｔ　ｃｅｌｌ）（脂肪細胞（ａｄｉｐｏｃｙｔｅ））のラマンスペクトルを図で具体的に説明する。
【図３２Ａ－３２Ｂ】本発明の好ましい一態様のそれぞれ位相差下でみられる６μｍの未染色冠動脈切片中の内膜アテローム硬化性斑中の泡沫細胞の顕微鏡写真ならびに泡沫細胞および壊死中心のラマンスペクトルである。
【図３３】本発明の好ましい一態様の内膜のアテローム硬化性斑中のコレステロール結晶のラマンスペクトルを図で具体的に説明する。
【図３４Ａ－３４Ｂ】本発明の好ましい一態様の位相差下でみられる６μｍの未染色冠動脈切片中の内膜アテローム硬化性斑の壊死中心中の石灰化の顕微鏡写真および対応するラマンスペクトルである。
【図３５】本発明の好ましい一態様の形態学的スペクトルへの直線的当てはめに使用した１２種の生化学物質のラマン基礎スペクトルを図で具体的に説明する。
【図３６Ａ－３６Ｈ】本発明の好ましい一態様の冠動脈中の多様な形態学的構造のスペクトルの観察データと参照データとの間のグラフ比較を提供する。
【図３７Ａ－３７Ｈ】本発明の好ましい一態様の各形態学的構造の生化学的組成を図で具体的に説明する。
【図３８Ａ】本発明の好ましい一態様のラマン散乱光の放射状分布についての動脈組織の混濁サンプルのラマン発射データの結果を図で具体的に説明する。
【図３８Ｂ】本発明の好ましい一態様のラマン散乱光の角度分布についての動脈組織の混濁サンプルのラマン発射データの結果を図で具体的に説明する。
【図３８Ｃ－３８Ｅ】本発明の好ましい一態様の動脈組織のそれぞれ積分済放射状分布、積分済角度分布および至適化した収集効率の図解である。
【図３９Ａ－３９Ｃ】本発明の好ましい一態様の、正常大動脈から発射されるラマン光の空間的分布を特徴付け、ここで、図３９Ｂは、測定した（○）個別の放射状分布B_1（ｒ）および励起ビームからの距離の関数としてのデータへの多ガウス分布のフィット（線）を示し、放射状の収集効率（η_1（ｒ）、○）を、ガウス分布プロファイルを確認する最小二乗法フィット（線）と一緒に図３９Ｃにプロットする。
【図４０Ａ－４０Ｂ】図４０Ｂに具体的に説明される積分済角度分布（η_2（θ）、（○）、およびランバーティアン光源についての理論的$\sin^2$（θ）分布（線）を特徴付け、ここで、理論および実験は本発明の好ましい一態様により測定された角度範囲について良好に一致する。
【図４１】本発明の好ましい一態様のラマンプローブの効率を具体的に説明し、ここで半径の関数としての角度（破線）および放射状（細線）の収集効率を示し、また、これらの曲線の積は総収集効率η_T（ｒ）（太線）である。
【図４２】本発明の好ましい一態様のラマンプローブの励起スポットサイズのシミュレーション結果を具体的に説明し、ここで、わずかな集中が散乱を伴わずにボールレンズから１ｍｍで発生する（○および実線）がしかしプローブが散乱媒体と接触している場合に即座の発散が起こる（□および破線）。
【図４３】本発明の好ましい一態様のラマンプローブの実験的試験に使用したラマン分光法装置の図解を具体的に説明する。
【図４４】本発明の好ましい一態様のフィルターモジュールの効率を示す単リングプローブで収集した$BaSO_4$のラマンスペクトルを具体的に説明し、ここでこのスペクトル中にファイバーバックグラウンドの最小限の証拠が存在する。
【図４５】本発明の好ましい一態様のシグナル収集を輸送長さの関数として示す組織ファントム検査の結果を具体的に説明し、ここで、目的の過塩素酸シグナルの強度（○および実線）を、増大した散乱を伴うシグナル収集の効果を示すために描かれる一定吸収のファ

イバーバックグラウンド（破線を伴う□）の線と一緒にプロットする。
【図４６Ａ－４６Ｂ】本発明の好ましい一態様のラマンプローブとの伝統的な開放光学的ラマン系の比較を具体的に説明し、ここで、残りのファイバーバックグラウンドと一緒にラマンプローブからのわずかに増大した収集を示す生データを図４６Ａに示し、ファイバーバックグラウンドおよび組織蛍光の除去は、７５０ｃｍ$^{-1}$のピークを除き、プローブ先端の構成部品からの１６００ｃｍ$^{-1}$の直ぐ下の同一のスペクトル図４６Ｂをもたらす。
【図４７Ａ－４７Ｂ】それぞれ正常乳房組織および悪性乳癌のラマンスペクトルを具体的に説明し、ここでデータは対応するモデルフィット（線）とともに点として示され、また、残差は同一スケール上で下にプロットされる。
【図４８Ａ－４８Ｂ】本発明の好ましい一態様の３ｍｍ未満の総直径を有する臨床的プローブを具体的に説明する。
【図４９Ａ－４９Ｂ】本発明の好ましい一態様の正常動脈、内膜線維増殖の臨床データを具体的に説明し、ここで図４９Ａは取得したラマンスペクトルでありかつ図４９Ｂは対応する組織学を具体的に説明する。
【図５０Ａ－５０Ｃ】本発明の好ましい一態様の粥腫斑の臨床データを具体的に説明し、ここで図５０Ａはラマンスペクトルを、また、図５０Ｂおよび５０Ｃは対応する組織学を具体的に説明する。
【図５１Ａ－５１Ｂ】本発明の好ましい一態様の石灰化斑について取得した臨床データを具体的に説明し、ここで図５１Ａはラマンスペクトルを、また、図５１Ｂは対応する組織学を具体的に説明する。
【図５２Ａ－５２Ｃ】本発明の好ましい一態様の破裂した斑について取得した臨床データを具体的に説明し、ここで図５２Ａはラマンスペクトルを、また、図５２Ｂおよび５２Ｃは対応する組織学を具体的に説明する。
【図５３Ａ－５３Ｃ】本発明の好ましい一態様の血栓を伴う石灰化斑について取得した臨床データを具体的に説明し、ここで図５３Ａはラマンスペクトルを、また、図５３Ｂおよび５３Ｃは対応する組織学を具体的に説明する。
【図５４】本発明の好ましい一態様の側方観察プローブの図を具体的に説明する。
【図５５Ａ－５５Ｃ】本発明の好ましい一態様のシグナル収集に対する血液の影響を具体的に説明し、ここで該図はそれぞれ血液を伴わない動脈、血液を伴う動脈および血液単独のスペクトルを具体的に説明する。
【図５６】本発明の好ましい一態様のラマンプローブを有する内視鏡系の図解を具体的に説明する。
【図５７】本発明の好ましい一態様のｉｎ　ｖｉｖｏラマンスペクトル診断のためのデータの取得方法を具体的に説明する流れ図である。
【図５８】本発明の好ましい一態様のリアルタイム解析ラマン系で使用されるデータの処理を具体的に説明する流れ図である。
【図５９Ａ－５９Ｄ】本発明の好ましい一態様の対応する連続染色切片（Ｄ）を伴う正常乳管［（Ａ）－（Ｃ）］のラマン画像を具体的に説明する。各画像は検討されている領域への特定の形態学的要素の寄与を表す。（Ａ）コラーゲン；（Ｂ）細胞質；（Ｃ）細胞核。
【図６０】本発明の好ましい一態様の乳房の形態学的モデルで使用される基礎スペクトルを具体的に説明する。（Ａ）細胞質；（Ｂ）細胞核；（Ｃ）脂肪；（Ｄ）β－カロチン；（Ｅ）コラーゲン；（Ｆ）ハイドロキシアパタイトカルシウム；（Ｇ）シュウ酸カルシウム；（Ｈ）コレステロール様；（Ｉ）水。
【図６１】本発明の好ましい一態様の正常若しくは疾患に罹ったヒト乳房組織で観察された４種の型の細胞のラマンスペクトルを具体的に説明する。（Ａ）線維芽細胞（正常間質）；（Ｂ）上皮細胞（線維嚢胞性疾患）；（Ｃ）上皮細胞（正常乳管）；（Ｄ）悪性細胞。
【図６２】本発明の好ましい一態様の細胞中で観察された商業的に入手可能な［（Ａ）、

（Ｃ）］および形態学的に派生した［（Ｂ）、（Ｄ）］ラマンスペクトルの比較を具体的に説明する。（Ａ）ＤＮＡ（Ｓｉｇｍａ）；（Ｄ）細胞核（乳房組織）；（Ｃ）アクチン（Ｓｉｇｍａ）；（Ｄ）細胞質（乳房組織）。

【図６３】本発明の好ましい一態様の（Ａ）精製コラーゲンおよび（Ｂ）形態学的に派生したコラーゲンの比較を具体的に説明する。

【図６４】本発明の好ましい一態様の（Ａ）精製トリオレインおよび（Ｂ）形態学的に派生した脂肪の比較を具体的に説明する。

【図６５】本発明の好ましい一態様の細胞質、細胞核、脂肪、コレステロールリノレエエートおよびコレステロールと当てはめた壊死中心（「コレステロール様」）のスペクトルを具体的に説明する。

【図６６】本発明の好ましい一態様の乳房沈着物のスペクトルを具体的に説明する。（Ａ）シュウ酸カルシウム脱水物；（Ｂ）ハイドロキシアパタイトカルシウム；（Ｃ）β－カロチン。

【図６７】本発明の好ましい一態様の５例の患者の細胞外マトリックスから収集したラマンスペクトルを具体的に説明する。

【図６８Ａ－Ｃ】本発明の好ましい一態様の巨視的乳房組織サンプルへのモデルのフィット、すなわちモデル（－－）、線維症および腺疾患との正常（●）のフィットの質を具体的に説明する。各スペクトルの下にフィットの残差をプロットする（ゼロ線が引かれている）。横に示したパーセントは、１への総和に正規化した基礎スペクトルのフィット係数を表す（水のフィット係数は総和に包含されない）。

【図６９Ａ－Ｃ】本発明の好ましい一態様の巨視的乳房組織サンプルへのモデルのフィット、すなわちモデル（－－）、線維腺腫および浸潤型乳管癌との線維症＋嚢腫（●）のフィットの質をさらに示す（残差は下にプロットされている）。

【図７０】本発明の好ましい一態様の共焦点ラマン顕微鏡検査機器系の図解である。

【図７１Ａ－Ｃ】本発明の好ましい一態様の同一サンプルの切片から取ったａ、試料のＸ線写真およびｂ、位相差画像を具体的に説明する。ｃ、線維嚢胞性疾患の病巣中の乳管嚢胞の管腔中の分泌に関連して生じるＩ型の石灰化のラマンスペクトル。ラマンスペクトルを取得した領域を囲みにより強調する。

【図７２Ａ－７２Ｃ】本発明の好ましい一態様の同一サンプルの切片から取ったａ、試料のＸ線写真およびｂ、位相差画像を具体的に説明する。ｃ．悪性乳房病変中のＩＩ型の石灰化のラマンスペクトル。ラマンスペクトルを取得した領域を囲みにより強調する。

【図７３】本発明の好ましい一態様の３種のＰＣ（▲、良性；○、悪性）のスコアに基づくＩＩ型の微細石灰化の診断アルゴリズムの結果を具体的に説明する。

【図７４】本発明の好ましい一態様の良性および悪性乳房病変中に存在する微細石灰化を分離するラマン分光法の能力を具体的に説明するＲＯＣ曲線を具体的に説明する。破線により表される２種の識別不可能な集団のシミュレーションしたＲＯＣ曲線を比較のため包含する。

【図７５Ａ－７５Ｂ】本発明の好ましい一態様のａ、ＰＣスペクトル５。ｂ、９６０ｃｍ$^{-1}$のピーク（矢印）のブロードニングを具体的に説明するために全部のＩＩ型の微細石灰化からのスペクトルの平均（点線）と重ねたＰＣスペクトル５（実線）を具体的に説明する。

【図７６】本発明の好ましい一態様の９６０ｃｍ$^{-1}$（矢印）周辺の大きな第二の誘導体様の特徴を表すＰＣスペクトル２を具体的に説明する。

【図７７】本発明の好ましい一態様の１４４５ｃｍ$^{-1}$のピーク、１６５０ｃｍ$^{-1}$のアミドＩの振動、および１００４ｃｍ$^{-1}$（矢印）のフェニルアラニンの特徴のような正に向けられたタンパク質の特徴を表すＰＣスペクトル３を具体的に説明する。

【図７８Ａ－７８Ｇ】本発明の好ましい一態様の対応する位相差画像（Ｆ）を伴うＨＴ２９細胞のラマン画像（Ａ－Ｅ）を具体的に説明する。ラマンスペクトルをホスファチジルコリン（Ａ）、ＤＮＡ（Ｂ）、コレステロールリノレエート（Ｃ）、トリオレイン（Ｄ）および形態学的に派生した細胞質（Ｅ）スペクトルと当てはめて細胞の化学的地図を製作

する。Ｇは対応するフィット（－）および残差（下、ゼロ線が引かれている）と一緒に画像Ｅに示された囲み内から取得したスペクトル（●）を示す。各モデル要素のフィットの寄与率を横に列挙する。

【図７９Ａ－７９Ｇ】本発明の好ましい一態様の軽度にアテローム硬化性の動脈の位相差画像（ＡおよびＢ）を具体的に説明し、内部弾性板（ＩＥＬ）およびコラーゲン線維をＢ中で強調する。コラーゲン（Ｃ）、コレステロール（Ｄ）、内部弾性板（Ｅ）、泡沫細胞および壊死中心（Ｆ）ならびに平滑筋細胞（Ｇ）のラマン画像もまた示す。内部弾性板の穿孔のような重要な形態学的特徴が観察され得る。

【図８０Ａ－８０Ｇ】本発明の好ましい一態様の形態学的に派生した成分すなわち細胞質（Ａ）、細胞核（Ｂ）、脂肪（Ｃ）およびコラーゲン（Ｄ）の通常の最小二乗法当てはめに基づく正常乳管のラマン画像を具体的に説明する。画像ＥおよびＦは単一バンドすなわちそれぞれＤＮＡのリン酸（１０９４ｃｍ$^{-1}$）およびタンパク質に基づくアミドＩ（１６６４ｃｍ$^{-1}$）のピークの強度をプロットする。ラマン画像（－）中の個々の画素（細胞性の内容物を含む領域に位置する）のスペクトルへの形態学的に基づくモデル（・）の当てはめの立証をＧに示す。フィットの残差をスペクトルがプロットされる下にプロットする（ゼロ線が引かれている）。

【図８１Ａ－８１Ｅ】本発明の好ましい一態様のコラーゲンにより分離される複数の乳管単位を含む領域のラマン画像の４種の異なる解析方法の比較を具体的に説明する。最初の２主成分のフィット係数により製作した画像をＡに示す。Ｂは多変量曲線解像（ＭＣＲ）により製作した２種の対応する画像を示す。Ｃは形態学的モデルからのコラーゲン（左）および細胞核（右）のスペクトルを使用するユークリッド距離に基づく画像を示す。Ｄ中の画像は形態学的モデルとの通常の最小二乗法当てはめにより生じさせたフィット係数を使用して製作し、コラーゲン（左）および細胞核（右）のみを示すがしかし完全なモデルを使用した。Ｅは画像を創製するために使用した基礎ベクトルを上から下へ：最初の２主成分、多変量曲線解像により製作した対応するスペクトル、コラーゲンの形態学的に派生したスペクトルおよび細胞核の形態学的に派生したスペクトルを示す。最後の２スペクトルはユークリッド距離測定および形態学的モデル化双方で使用した。

【図８２Ａ－８２Ｂ】本発明の好ましい一態様の（Ａ）第３列が白線により示されるラマン画像（図８１Ｄ、左に同一）、ならびに（Ｂ）４種の異なるモデルすなわちＰＣＡ（△）、ＭＣＲ（□）、ユークリッド距離（○）および形態学的モデル（×）を使用して得た示された列の対応するフィット係数の高さを具体的に説明する。

【図１Ａ－１Ｂ】

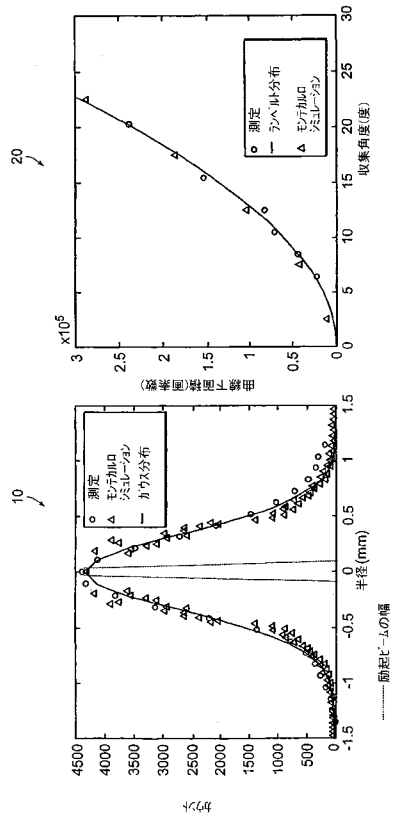


Figure 1B

Figure 1A

【図２Ａ】

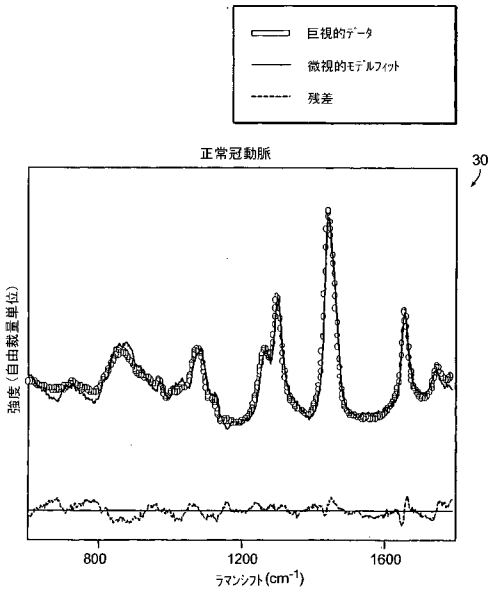


Figure 2A

【図２Ｂ】

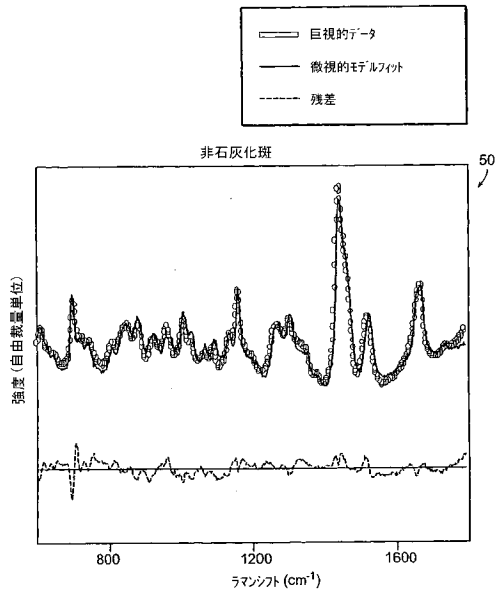


Figure 2B

【図２Ｃ】

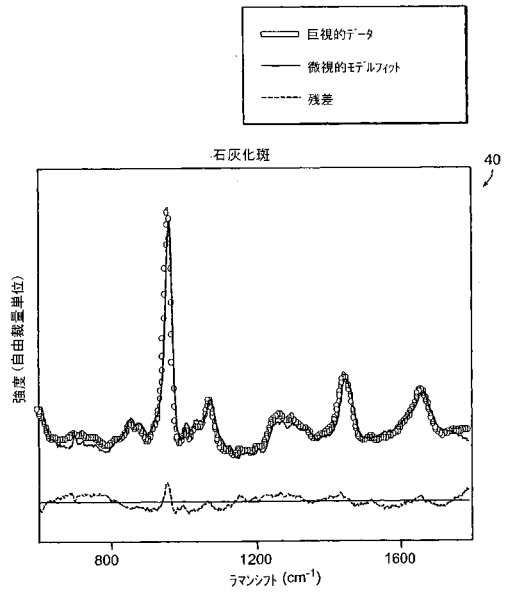


Figure 2C

【図３】

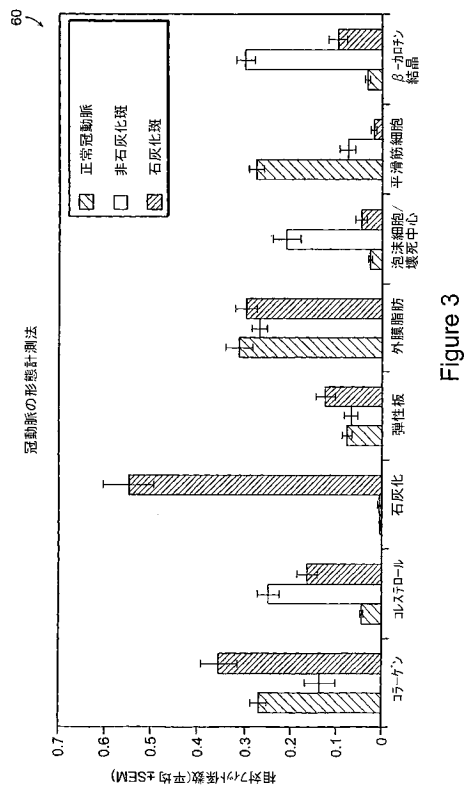


Figure 3

【図４Ａ－４Ｂ】

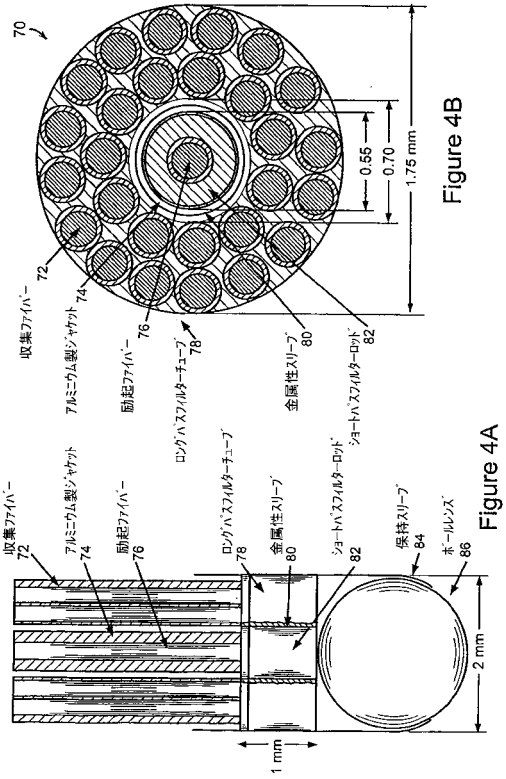


Figure 4B

Figure 4A

【図４Ｃ－４Ｄ】

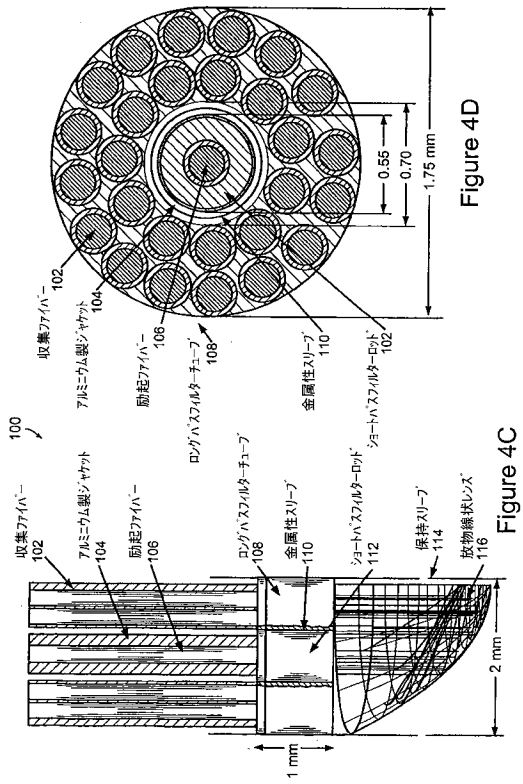


Figure 4D

Figure 4C

【図５】

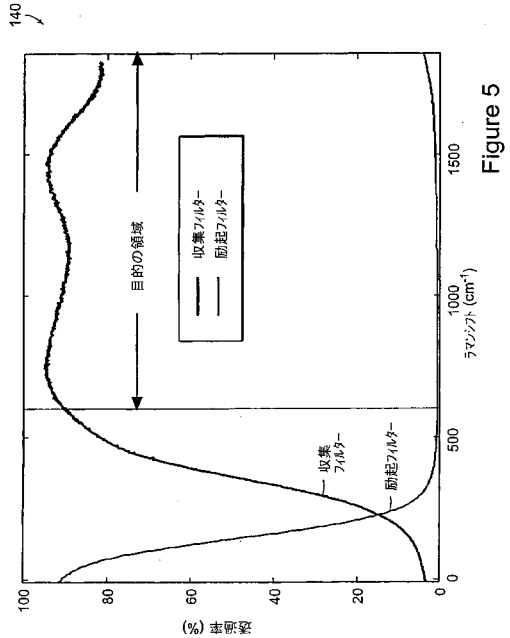


Figure 5

【図６】

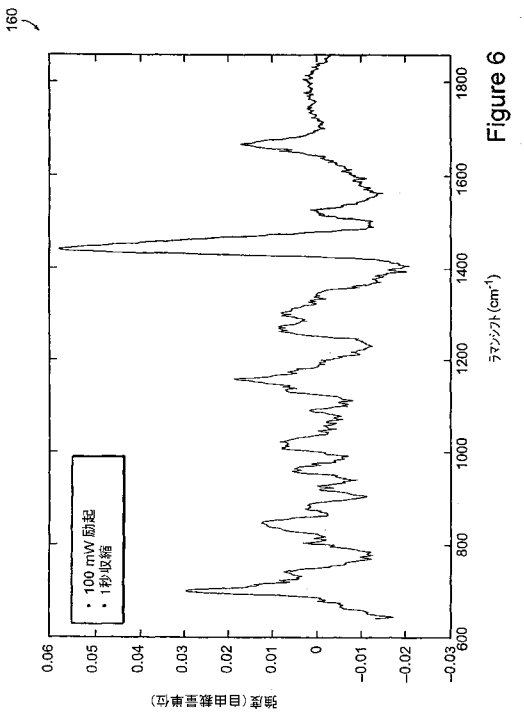


Figure 6

【図７】

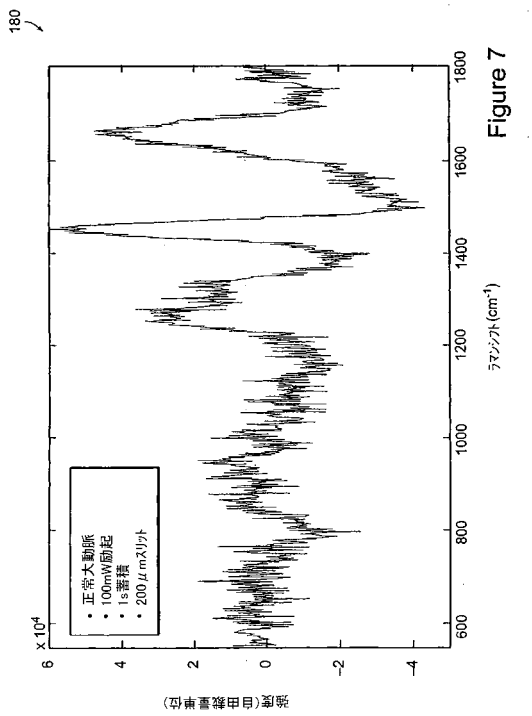


Figure 7

【図８】

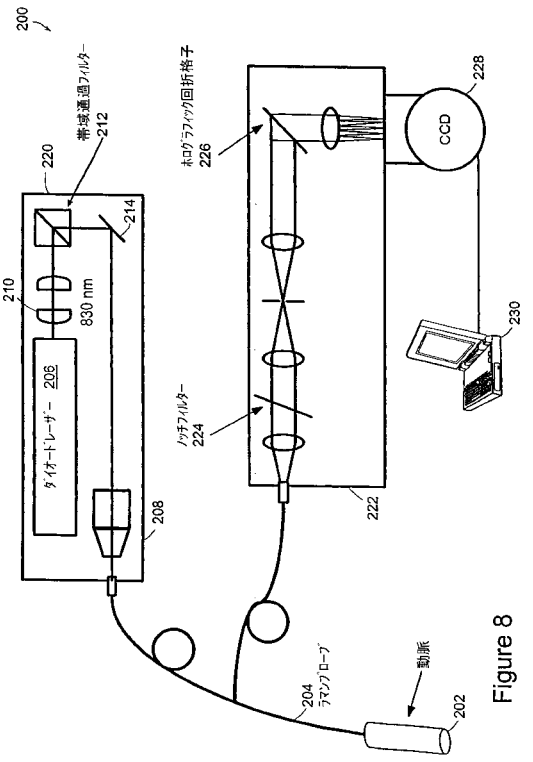


Figure 8

【図１０Ａ－１０Ｃ】

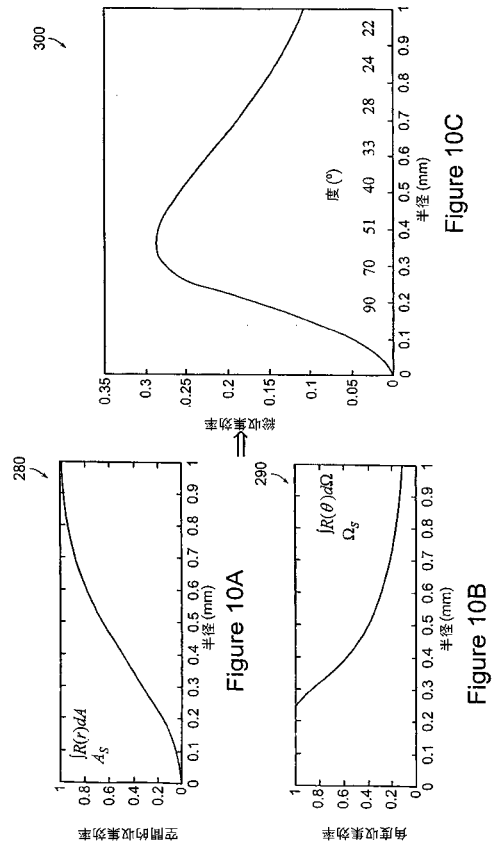


Figure 10C

Figure 10A

Figure 10B

【図１１】

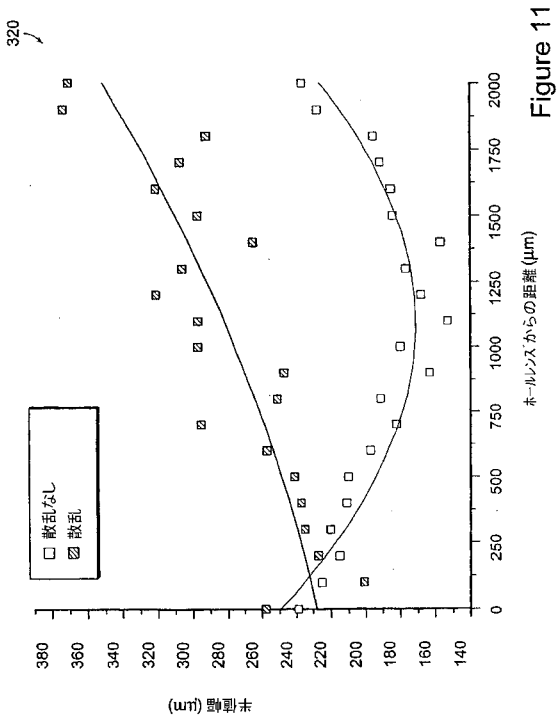


Figure 11

【図１２】

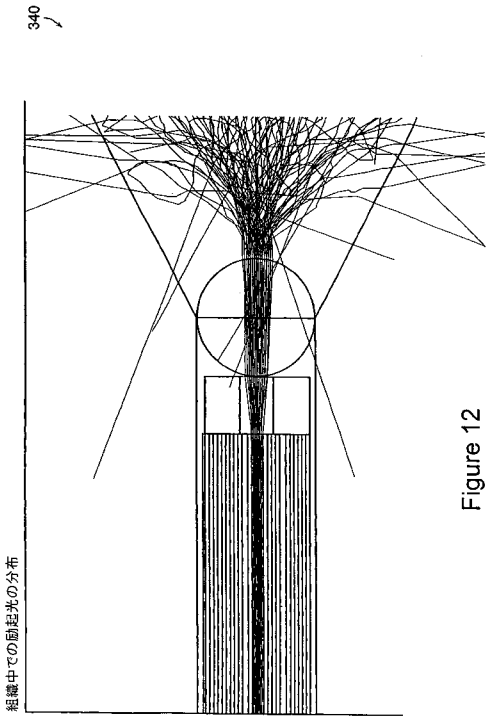


Figure 12

【図１３】

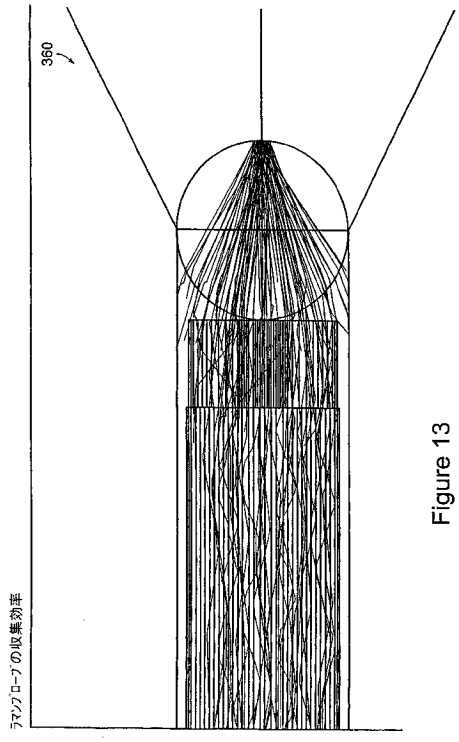


Figure 13

【図１４】

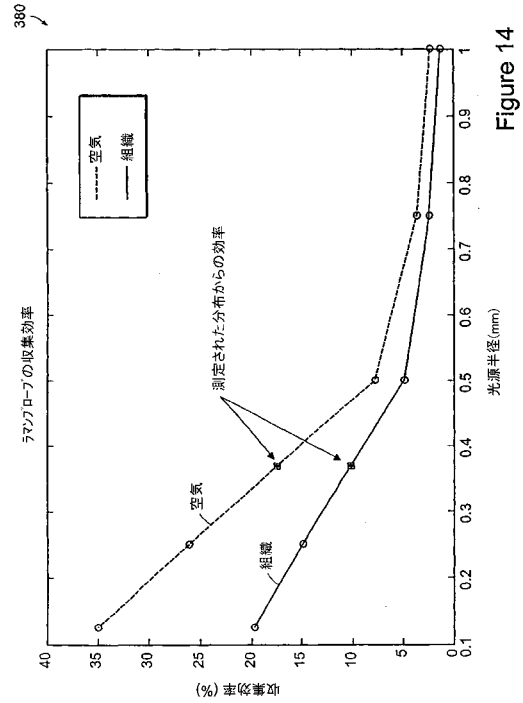


Figure 14

【図１５】

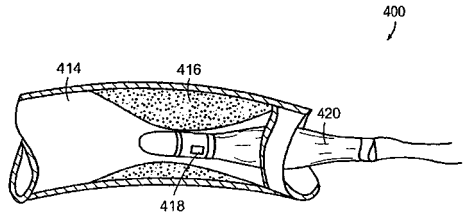


Figure 15

【図１６】

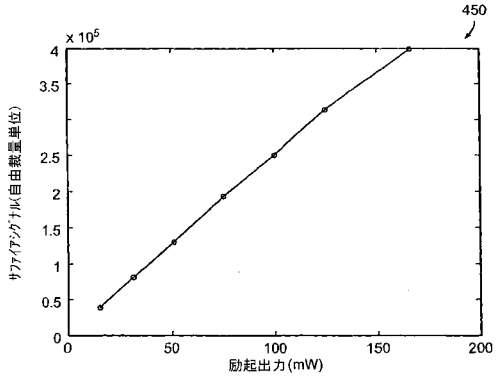


Figure 16

【図１７】

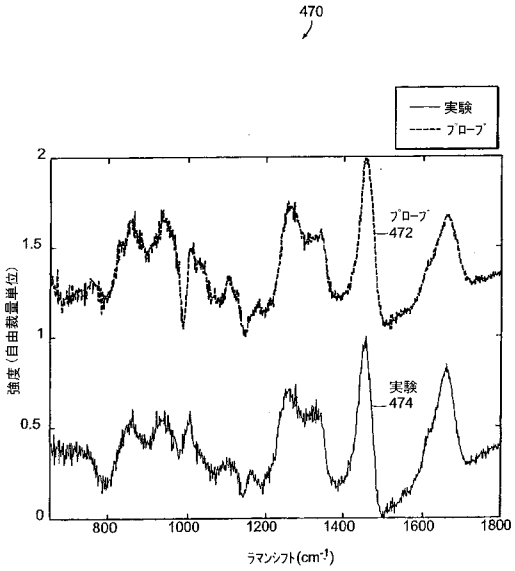


Figure 17

【図１８】

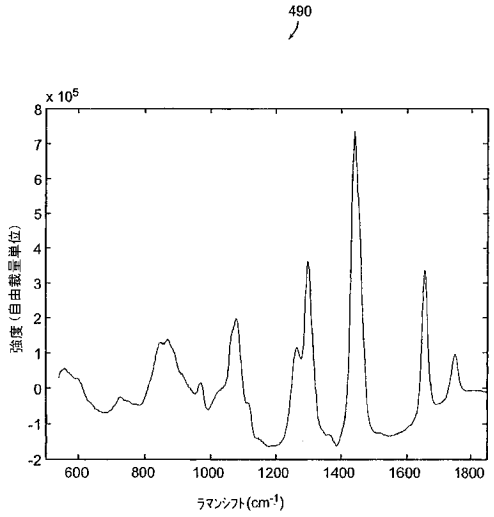


Figure 18

【図１９】

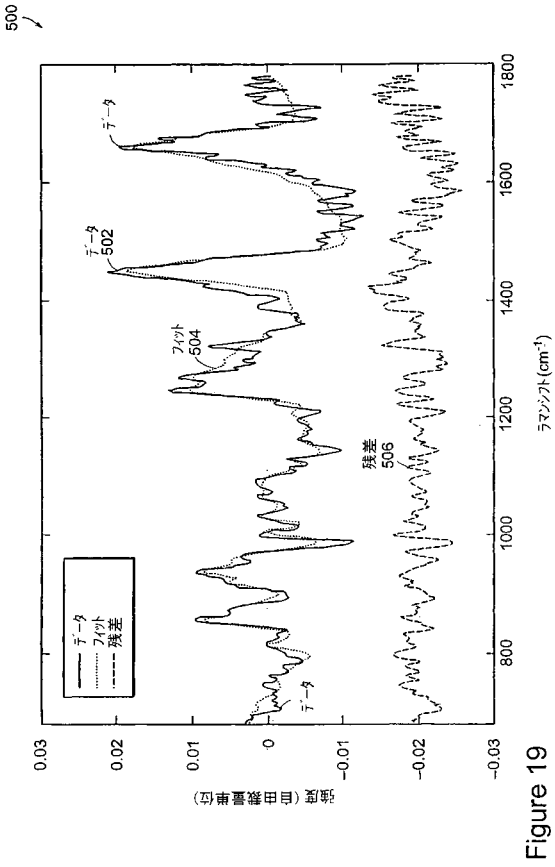


Figure 19

【図２０】

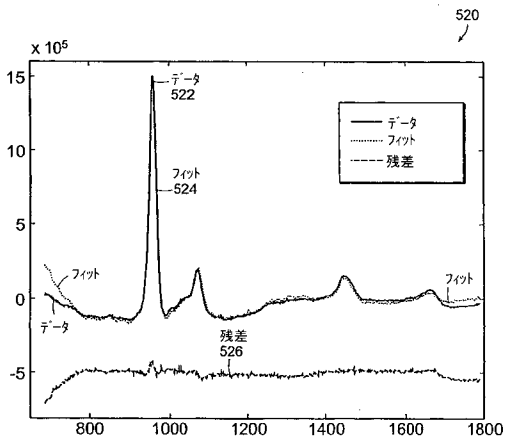


Figure 20

【図２１Ａ】

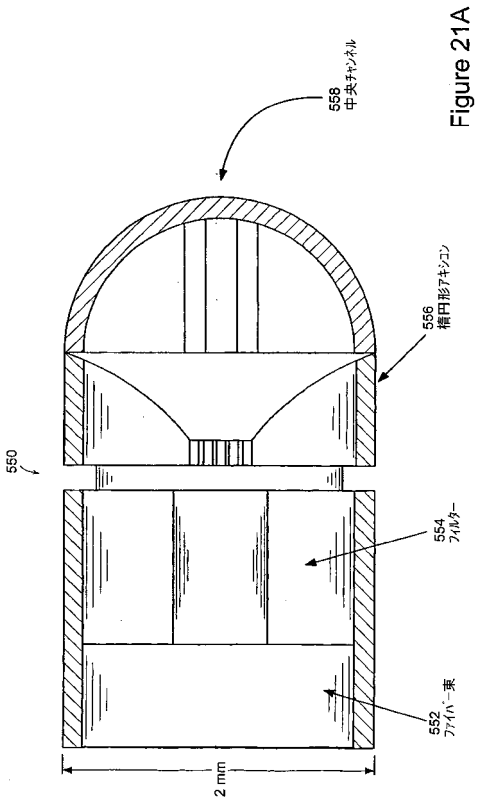


Figure 21A

【図２１Ｂ】

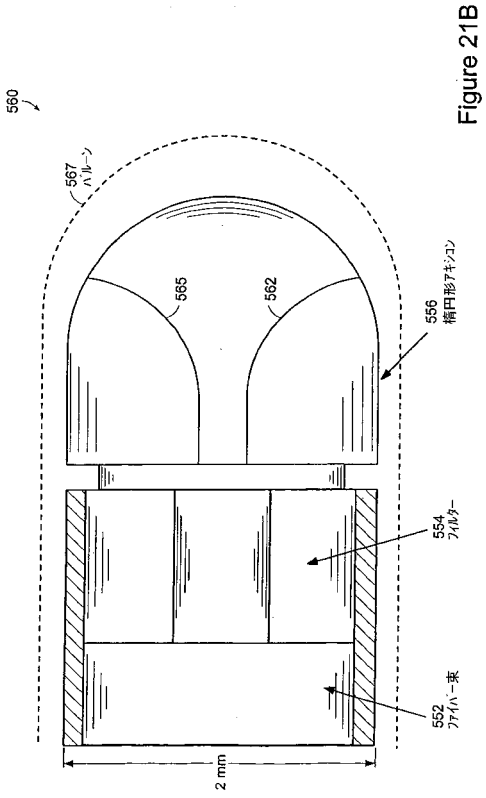


Figure 21B

【図２１Ｃ】

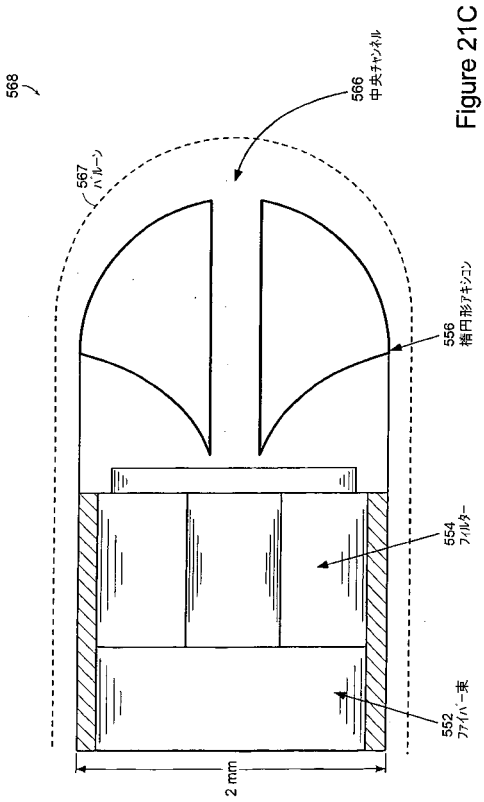


Figure 21C

【図２１Ｄ】

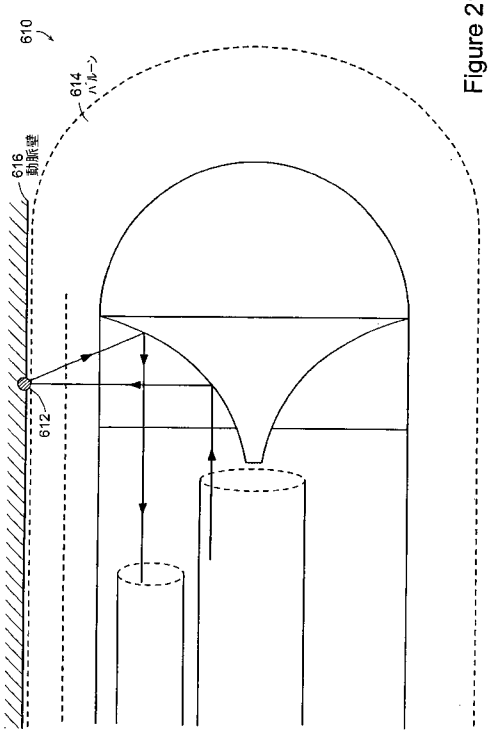


Figure 21D

【図２２】

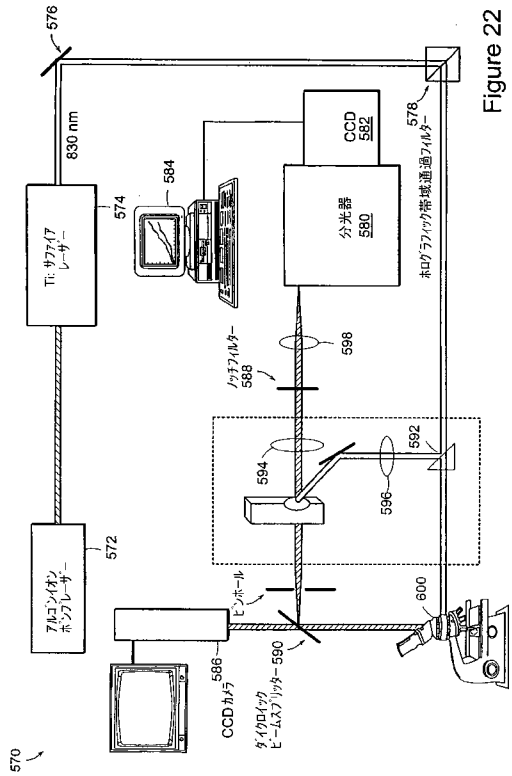


Figure 22

【図２３】

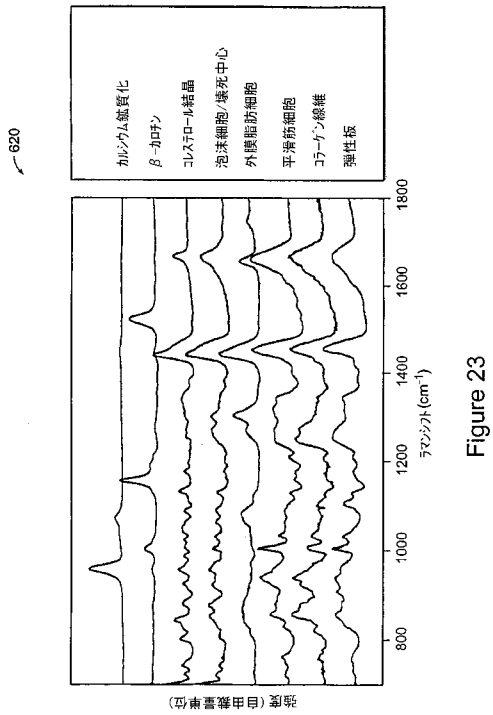


Figure 23

【図２４Ａ－２４Ｃ】

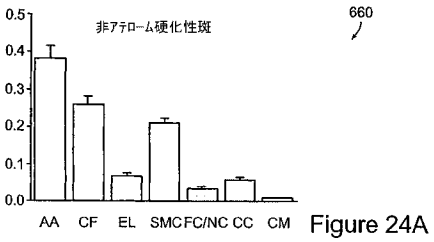


Figure 24A

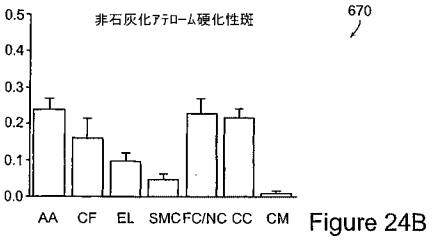


Figure 24B

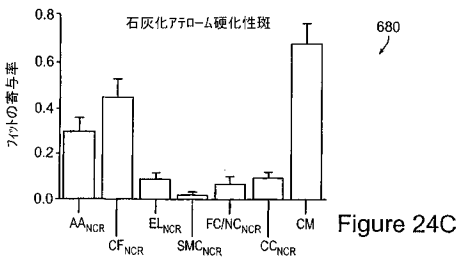


Figure 24C

【図２５】

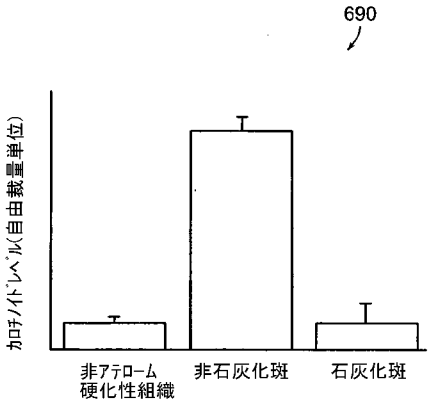


Figure 25

【図２６Ａ－２６Ｂ】

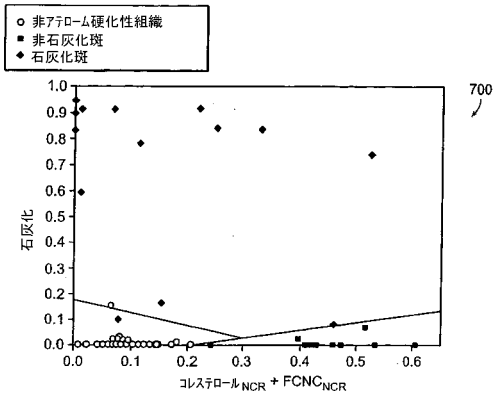


Figure 26A

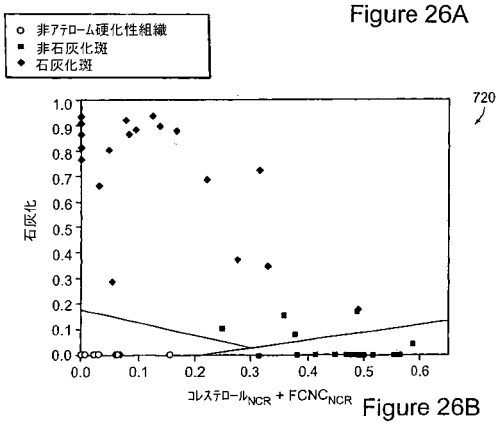


Figure 26B

【図２７】

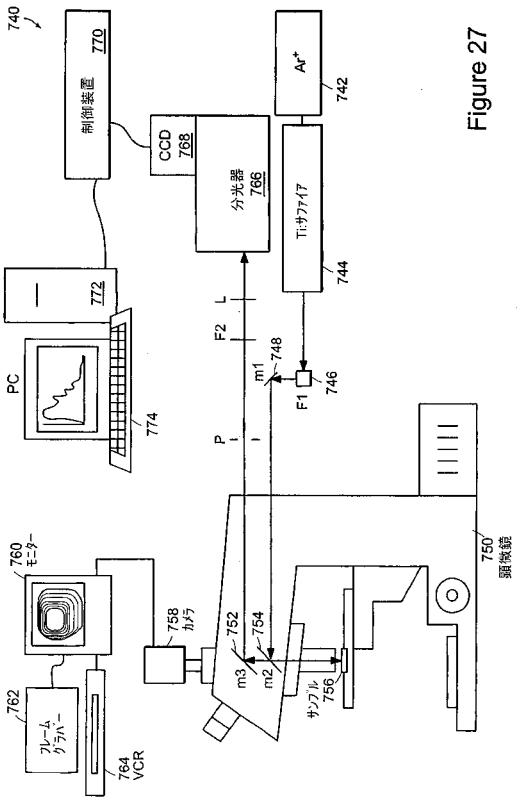


Figure 27

【図２８Ａ】

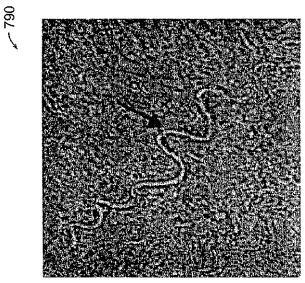


Figure 28A

【図２８Ｂ】

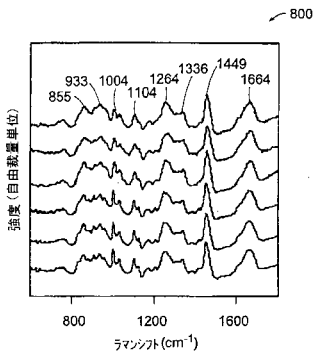


Figure 28B

【図２９Ａ】

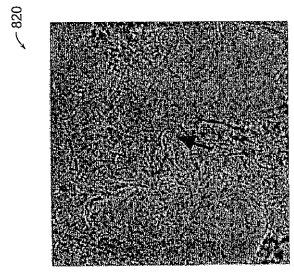


Figure 29A

【図２９Ｂ】

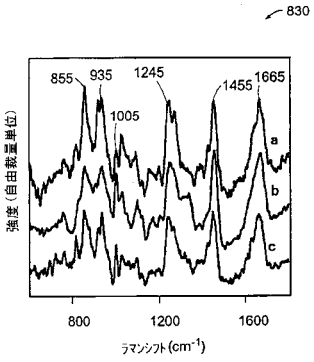


Figure 29B

【図３０】

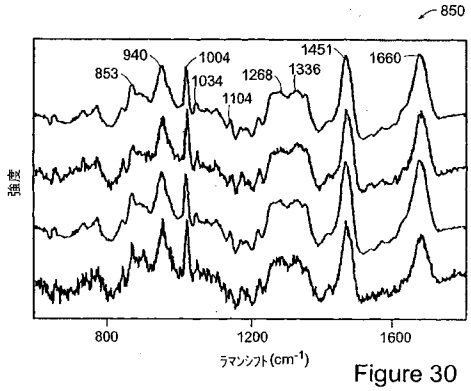


Figure 30

【図３１】

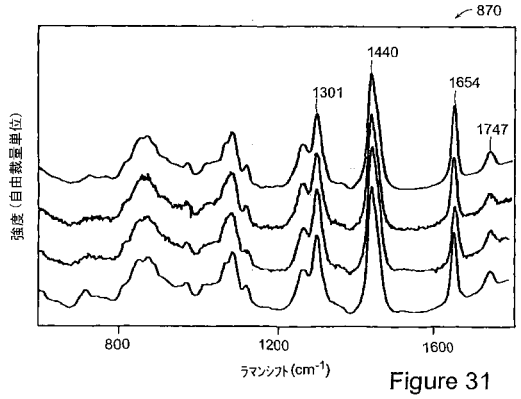


Figure 31

【図３２Ａ】

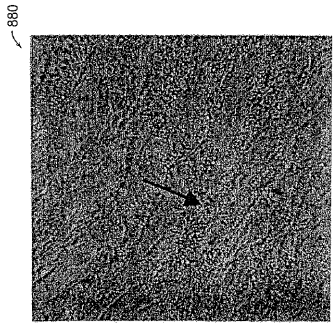


Figure 32A

【図３２Ｂ】

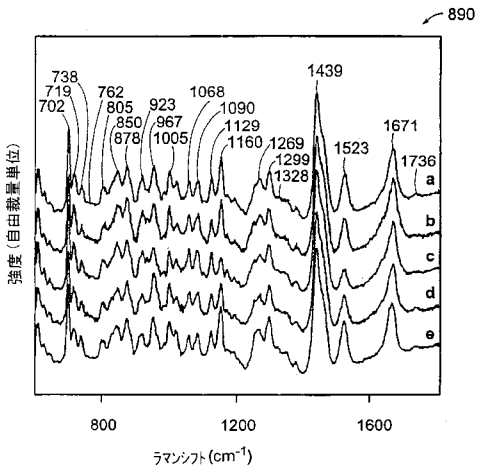


Figure 32B

【図３３】

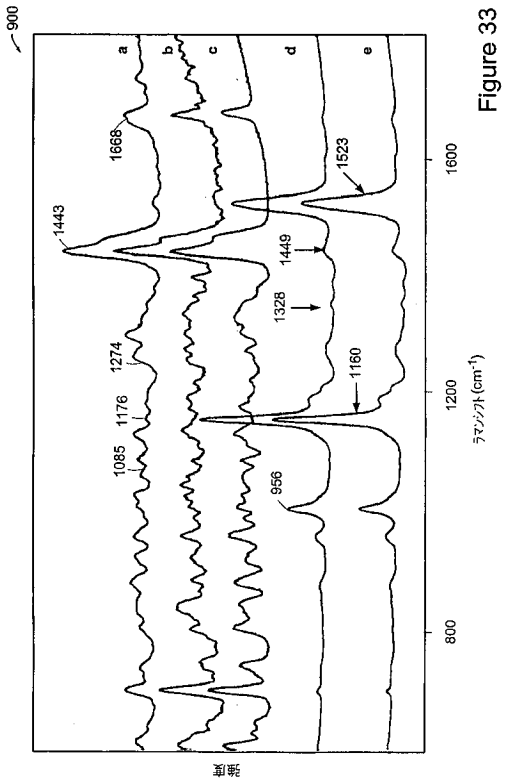


Figure 33

【図３４Ａ】

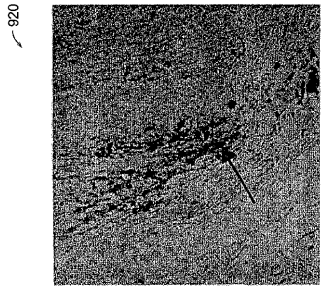


Figure 34A

【図３４Ｂ】

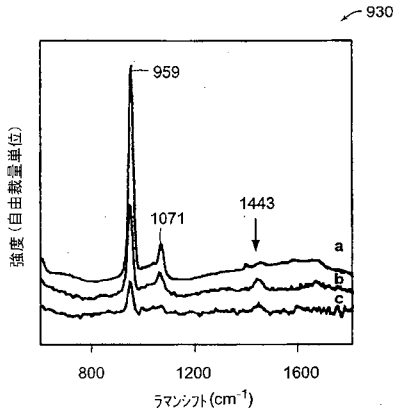


Figure 34B

【図３５】

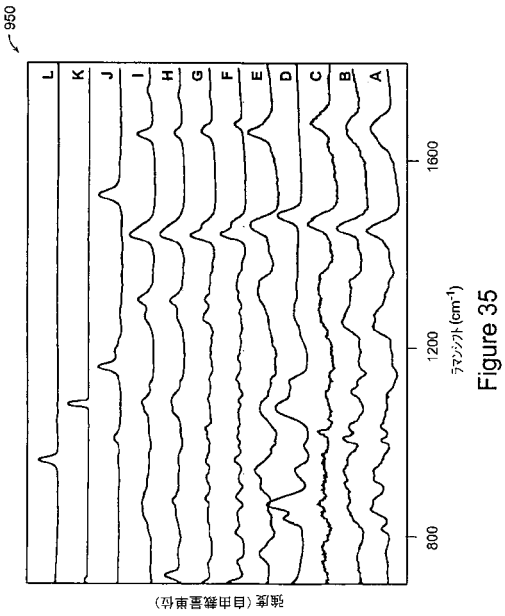


Figure 35

【図３６Ａ－３６Ｂ】

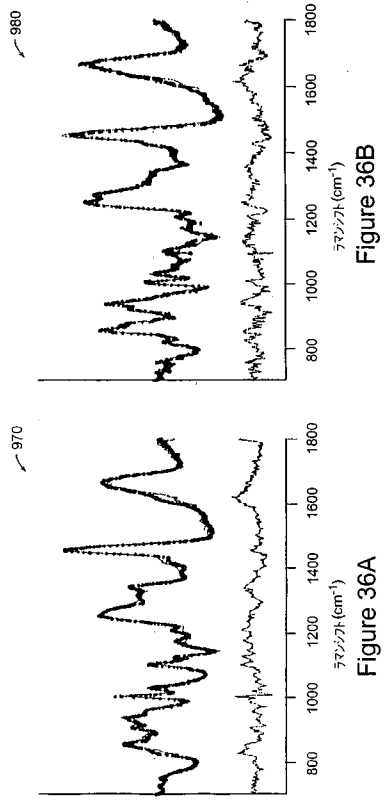


Figure 36B

Figure 36A

【図３６Ｃ－３６Ｄ】

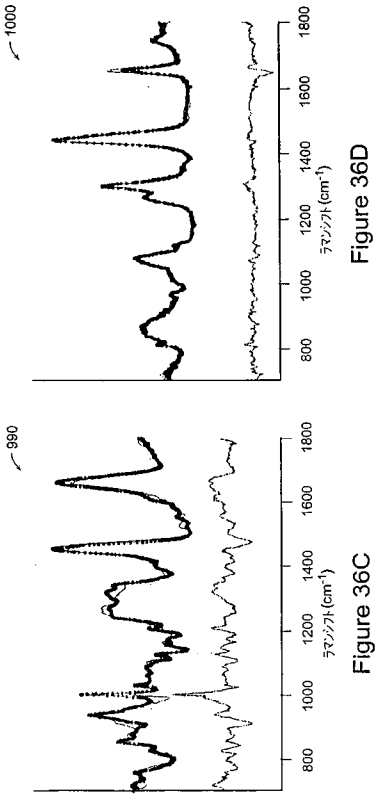


Figure 36C

Figure 36D

【図３６Ｅ－３６Ｆ】

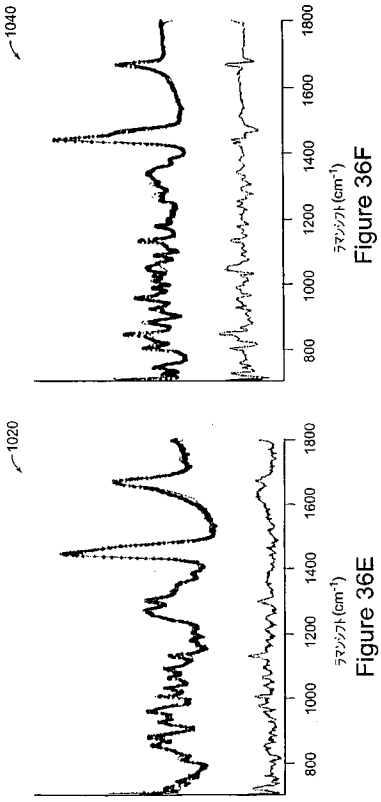


Figure 36E

Figure 36F

【図３６Ｇ－３６Ｈ】

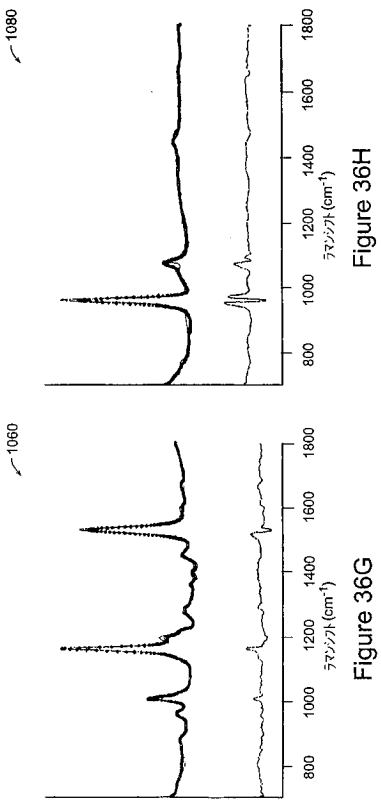


Figure 36G

Figure 36H

【図３７Ａ－３７Ｂ】

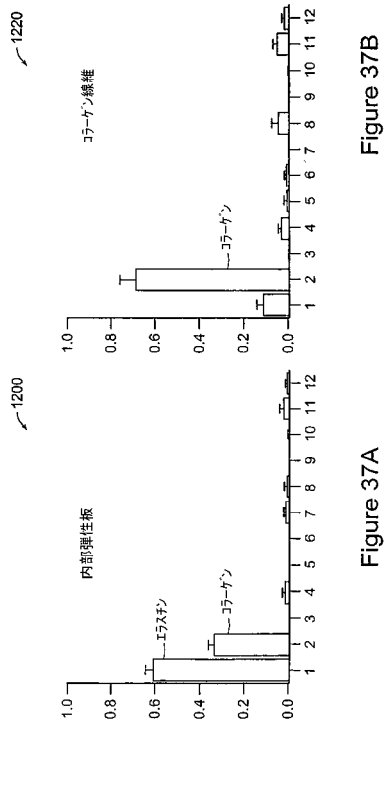


Figure 37A

Figure 37B

【図３７Ｃ－３７Ｄ】

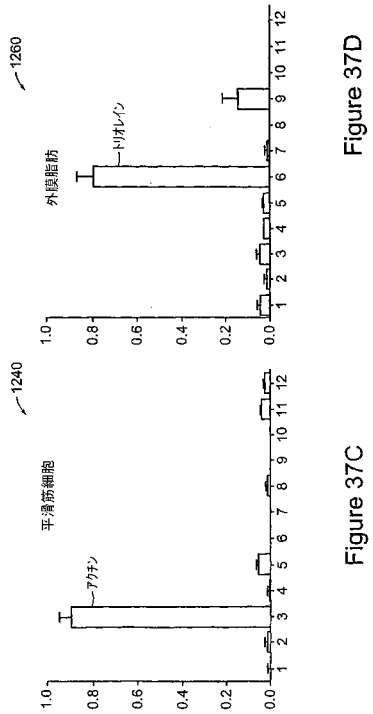


Figure 37C

Figure 37D

【図３７Ｅ－３７Ｆ】

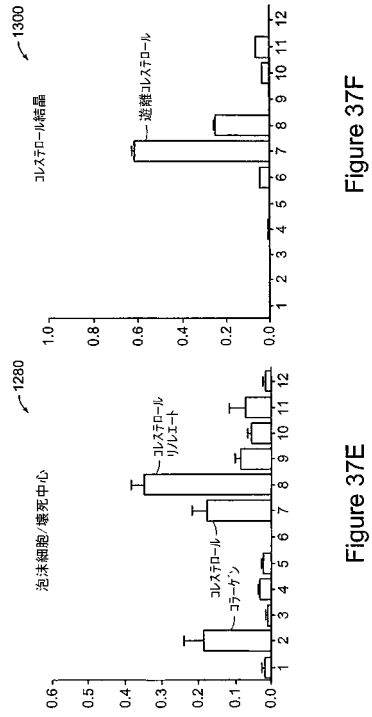


Figure 37E

Figure 37F

【図３７Ｇ－３７Ｈ】

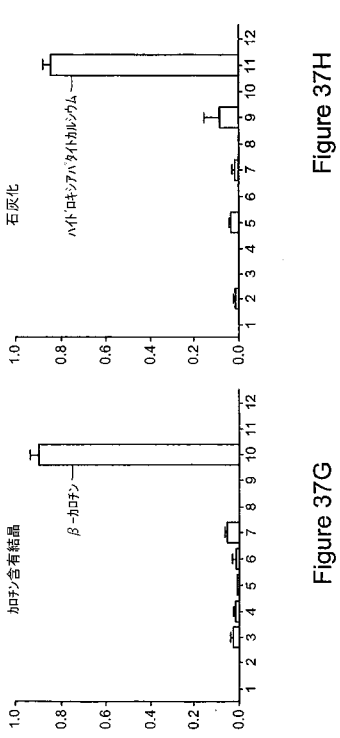


Figure 37G

Figure 37H

【図３８Ａ】

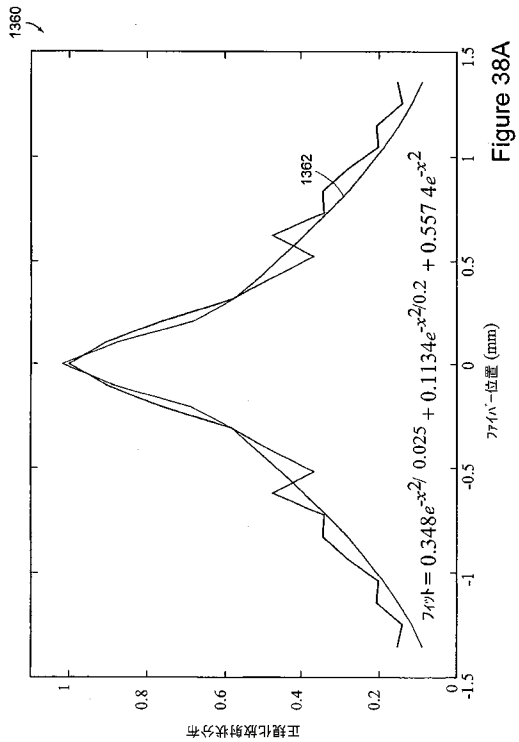


Figure 38A

【図３８Ｂ】

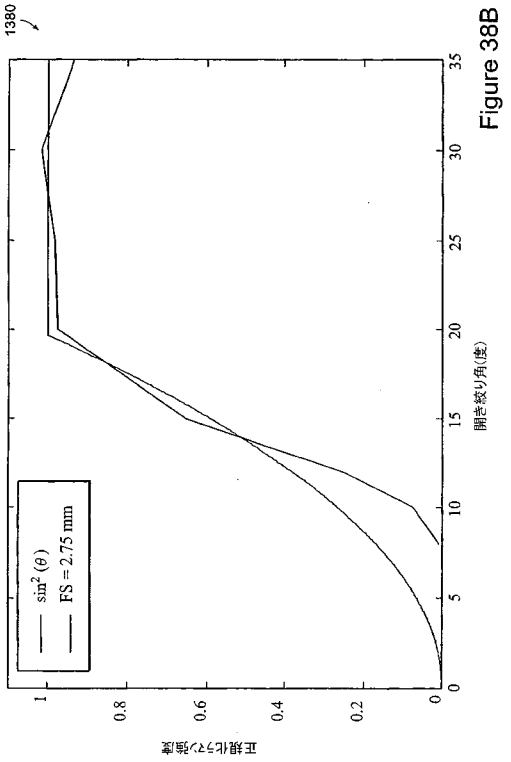


Figure 38B

【図３８Ｃ－３８Ｅ】

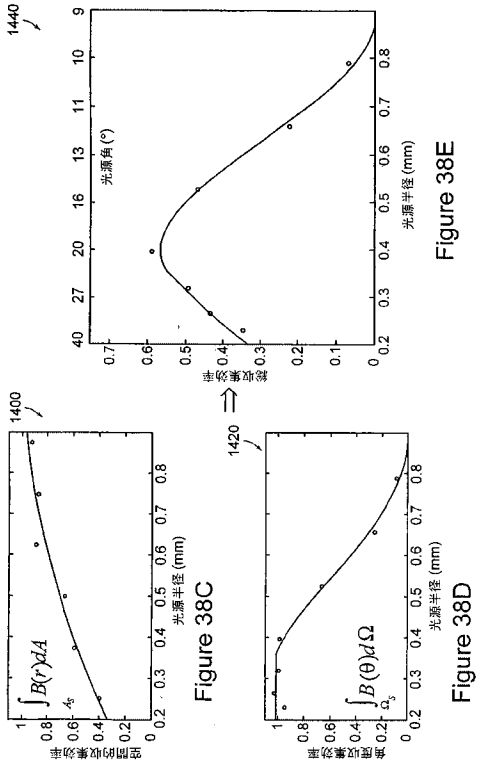


Figure 38C

Figure 38D

Figure 38E

【図４２】

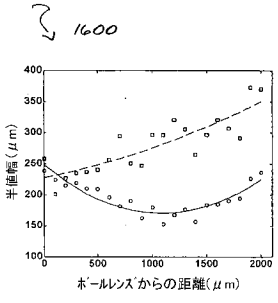


Figure 42

【図４３】

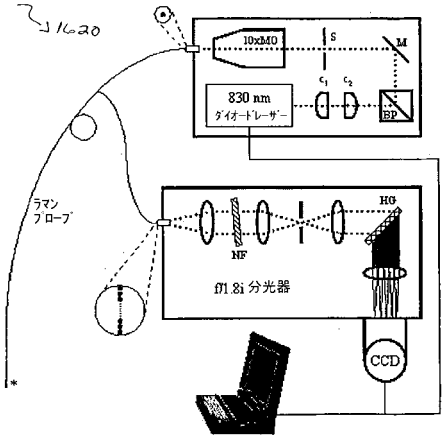


Figure 43

【図４４】

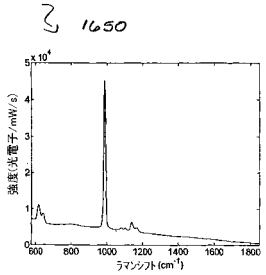


Figure 44

【図４５】

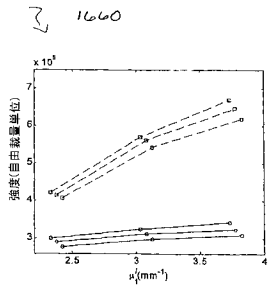


Figure 45

【図４６Ａ】

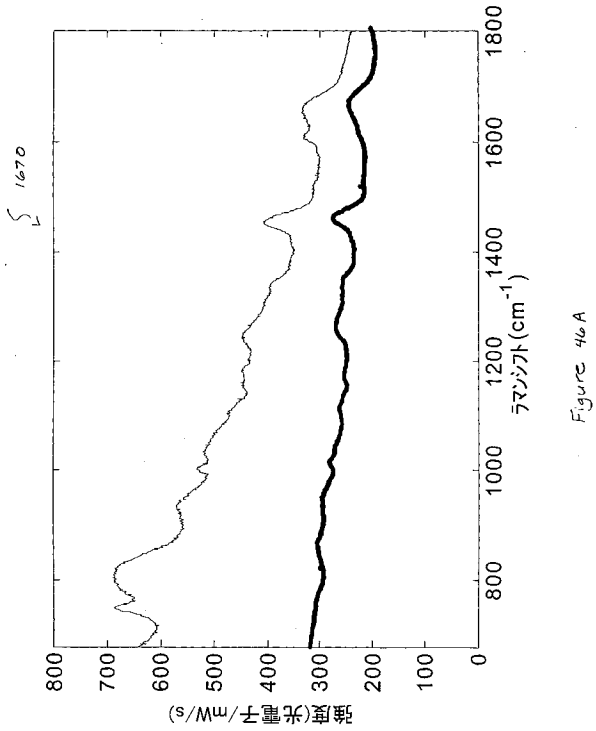


Figure 46A

【図４７Ａ－４７Ｂ】

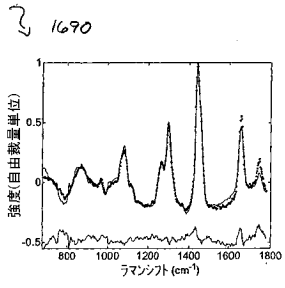


Figure 47A

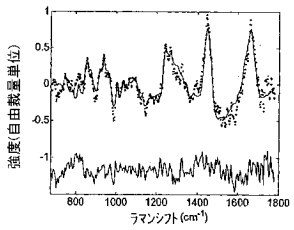


Figure 47B

【図４８Ａ】

Figure 48A

【図４８Ｂ】

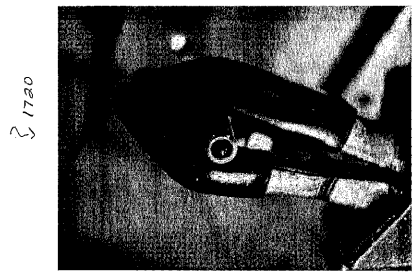


Figure 48B

【図４９Ｂ】

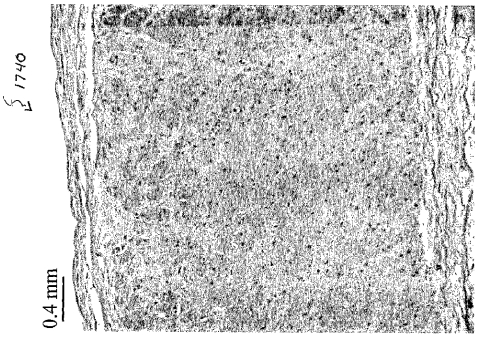


Figure 49A

【図５０Ｂ】

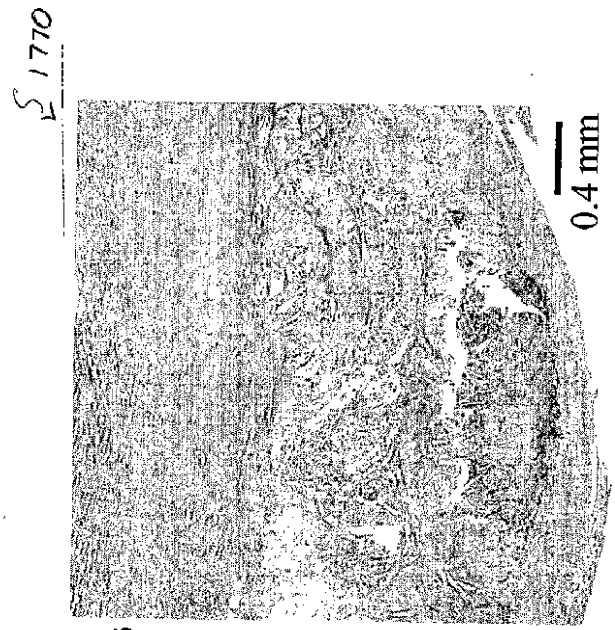


Figure 50B

【図５０Ｃ】

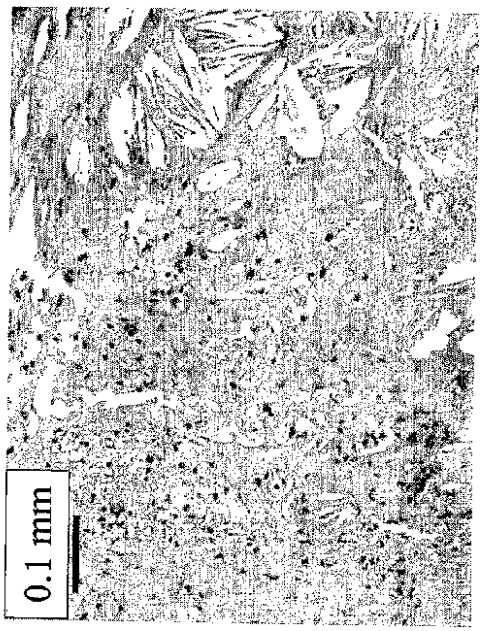


Figure 50C

【図５１Ｂ】

Figure 51B

【図５２Ｂ】

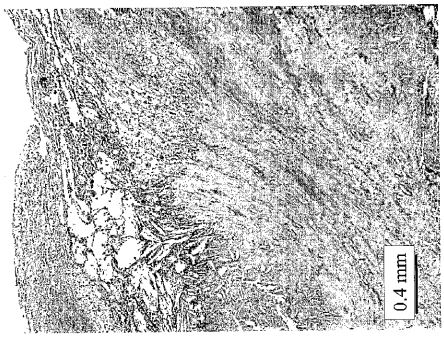


Figure 52B

【図５２Ｃ】

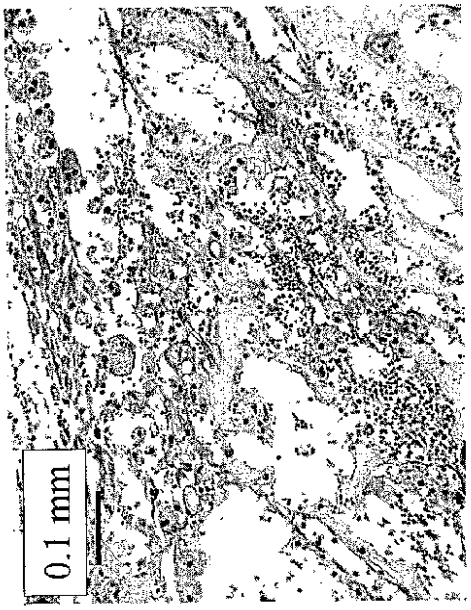


Figure 52C

【図５３Ｂ】

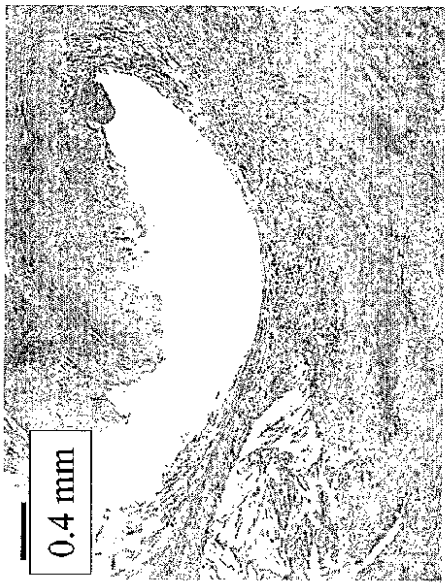


Figure 53B

【図５３Ｃ】

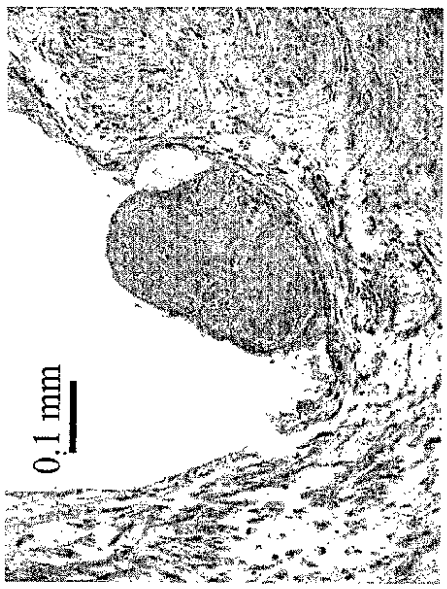


Figure 53C

【図５４】

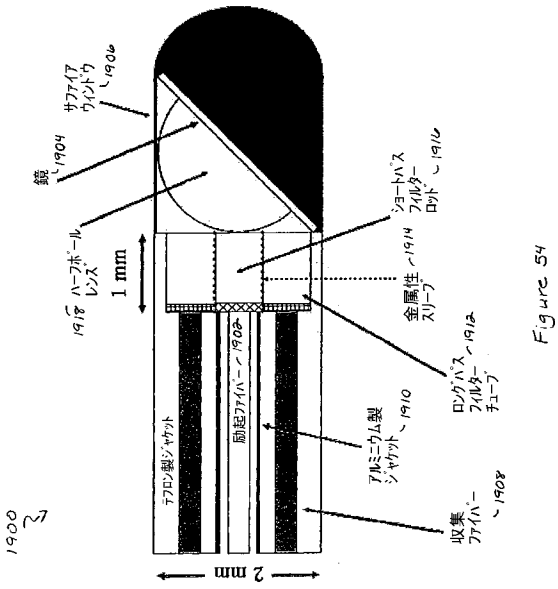


Figure 54

【図５５Ａ－５５Ｃ】

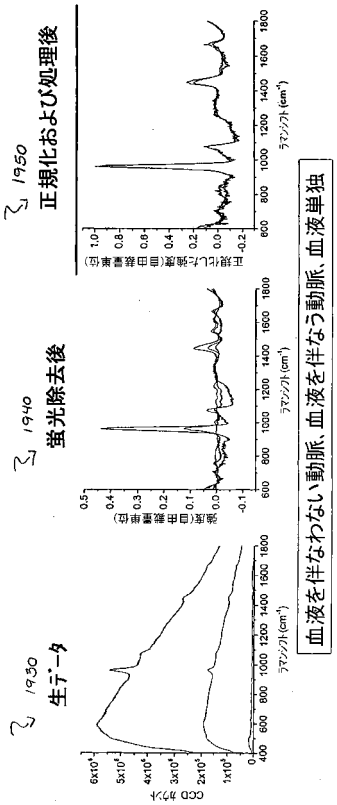


Figure 55C

Figure 55B

Figure 55A

【図５６】

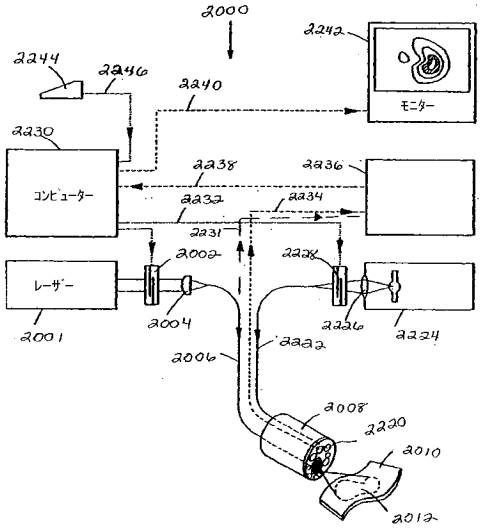
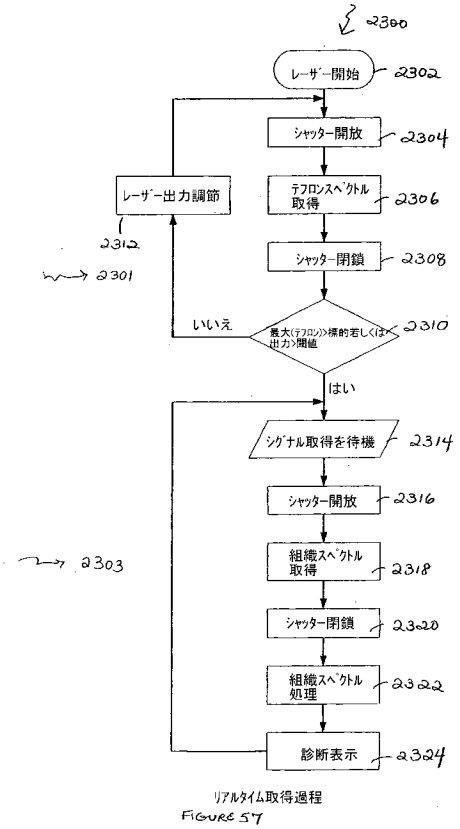


Figure 56

【図５７】



リアルタイム取得過程

FIGURE 57

【図５８】

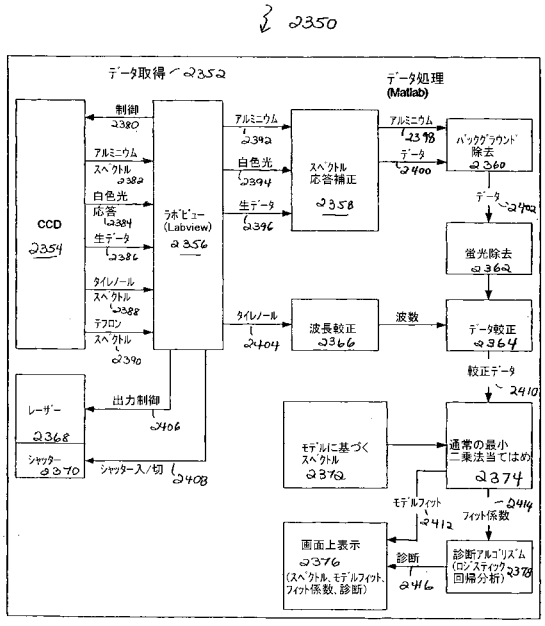


FIGURE 58

【図６０】

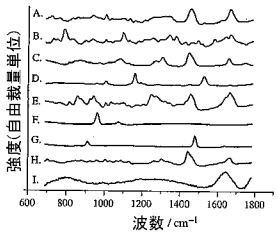


Figure 60

【図６１】

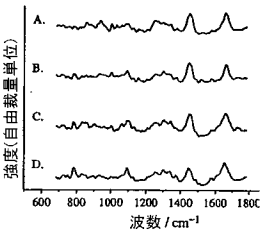


Figure 61

【図６２】

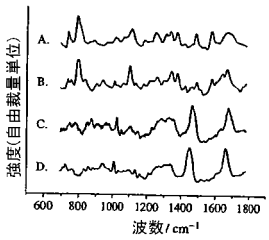


Figure 62

【図６３】

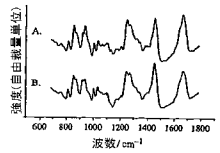


Figure 63

【図６４】

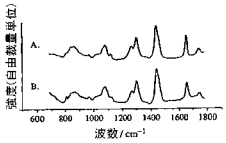


Figure 64

【図６５】

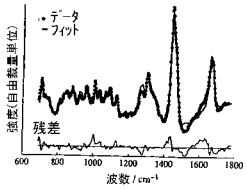


Figure 65

【図６６】

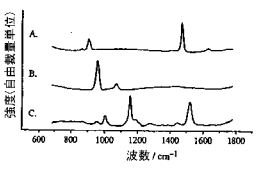


Figure 66

【図６７】

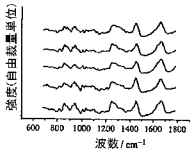


Figure 67

【図６８Ａ－６８Ｃ】

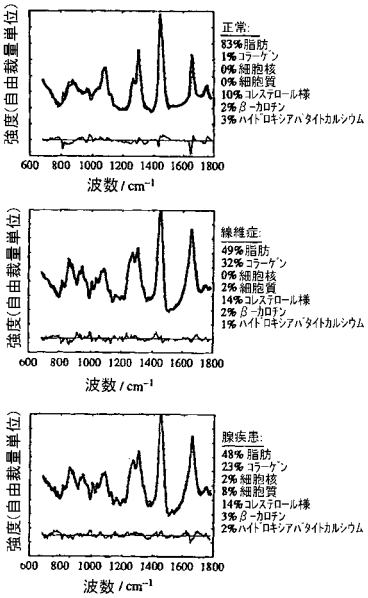


Figure 68A-C

【図６９Ａ－６９Ｃ】

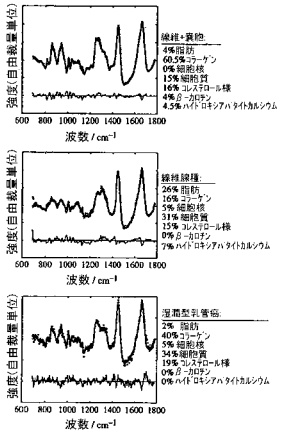


Figure 69 A-C

【図７３】

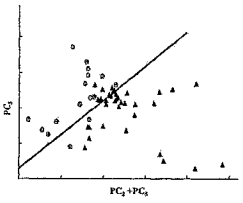


Figure 73

【図７４】

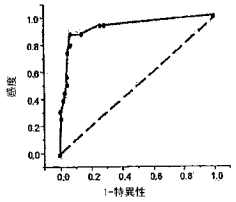
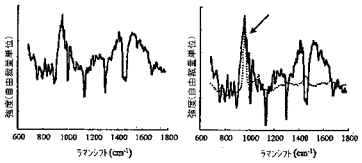


Figure 74

【図７５Ａ－７５Ｂ】



Figures 75A-B

【図７６】

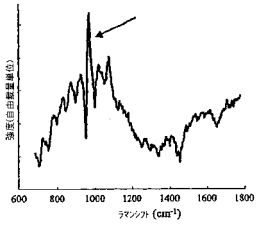


Figure 76

【図７７】

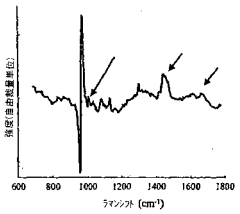


Figure 77

【図９】

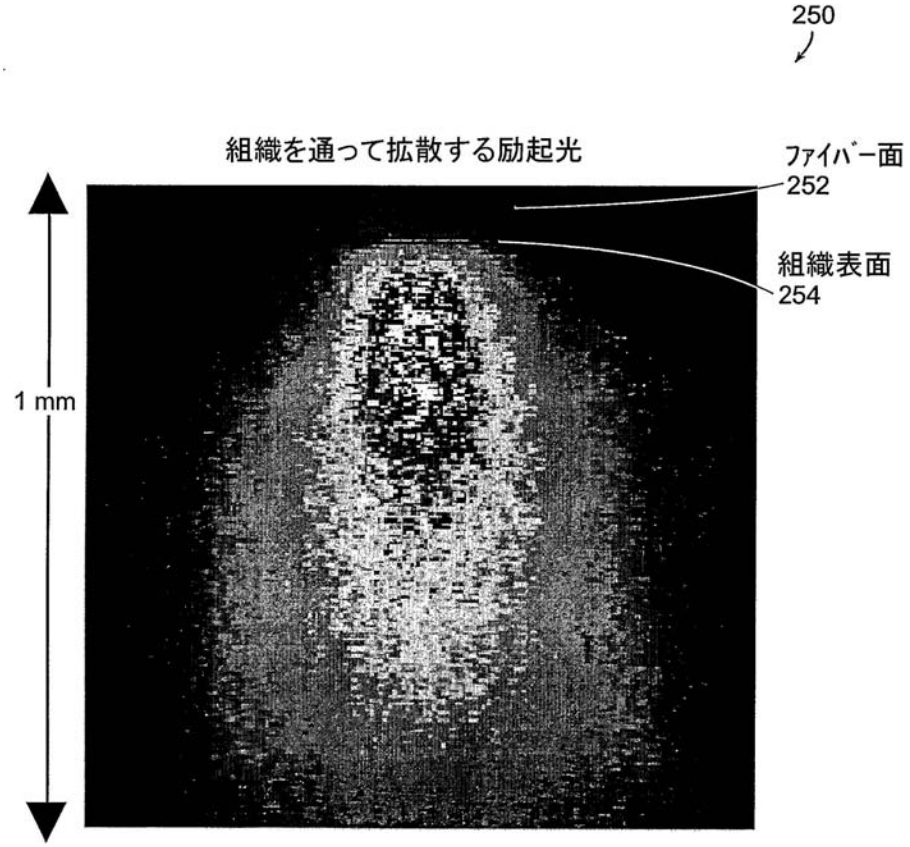


Figure 9

【図３９Ａ－３９Ｂ】

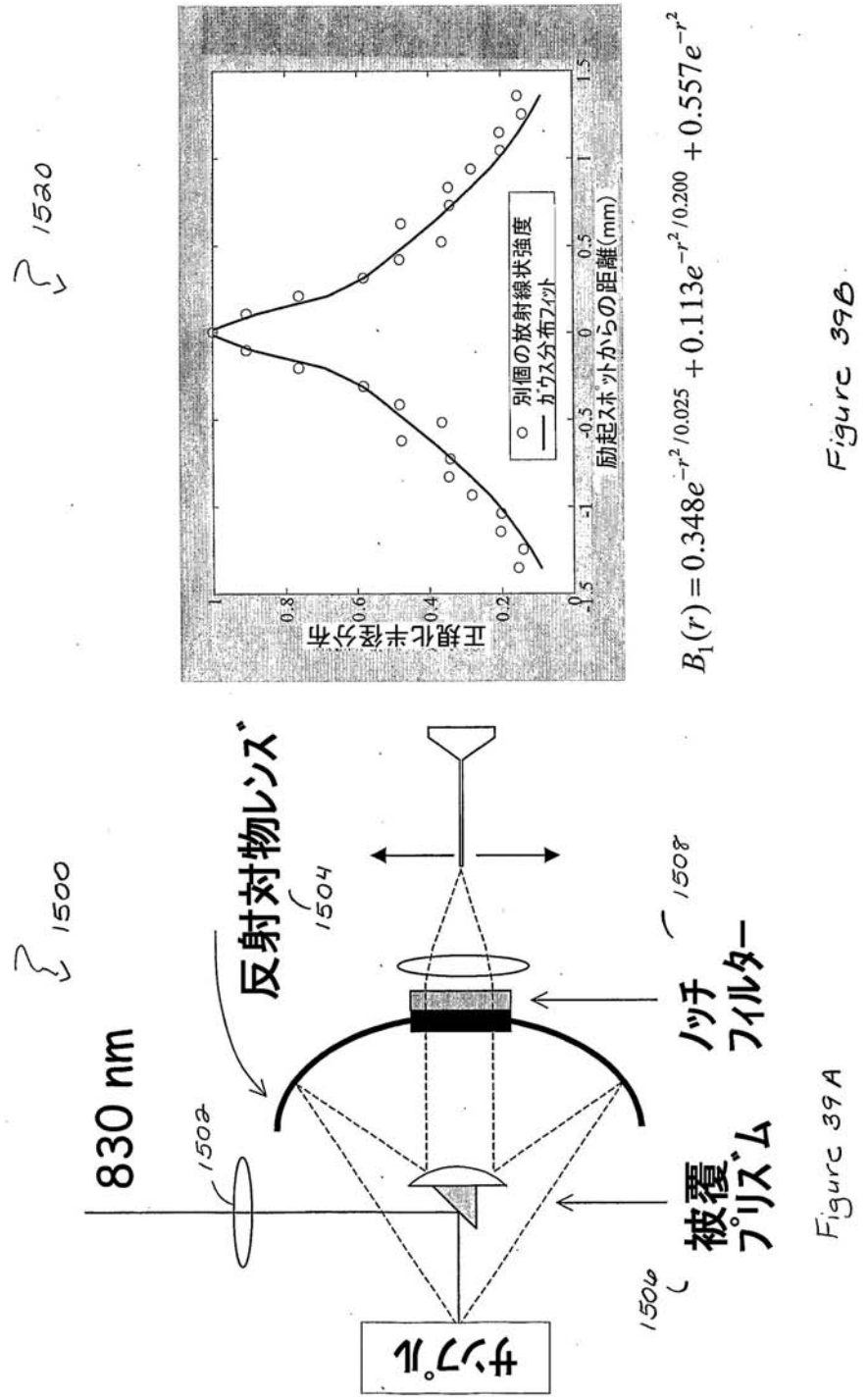


Figure 39A

Figure 39B

【図３９Ｃ】

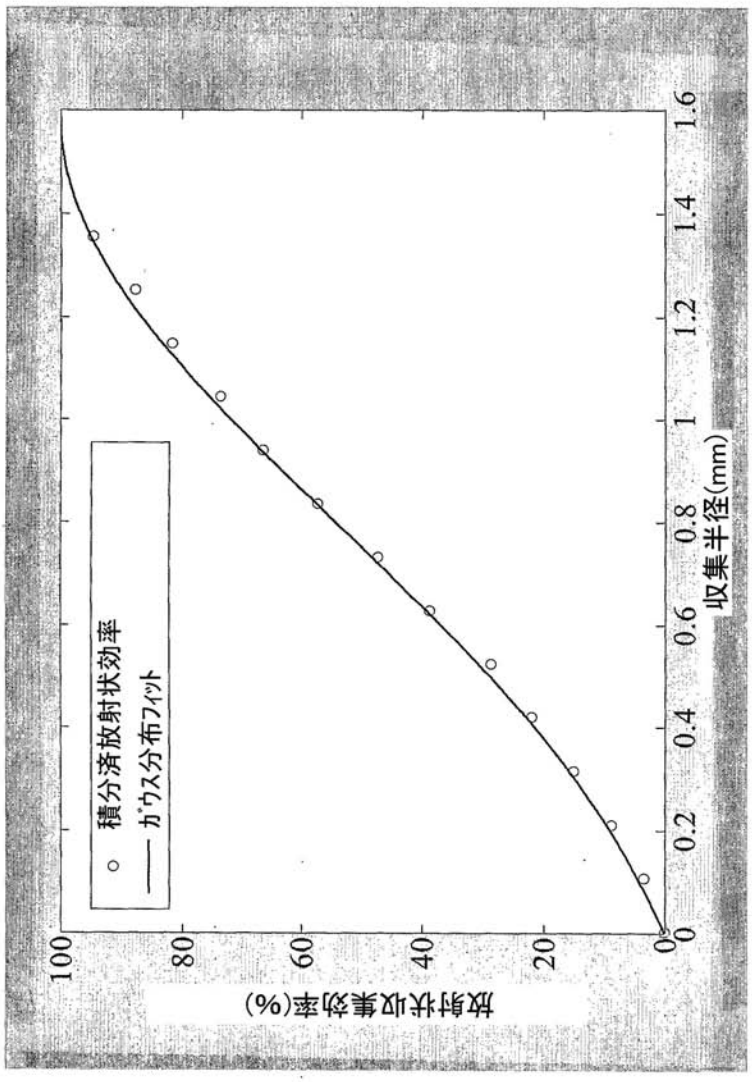


Figure 39C

【図４０Ａ－４０Ｂ】

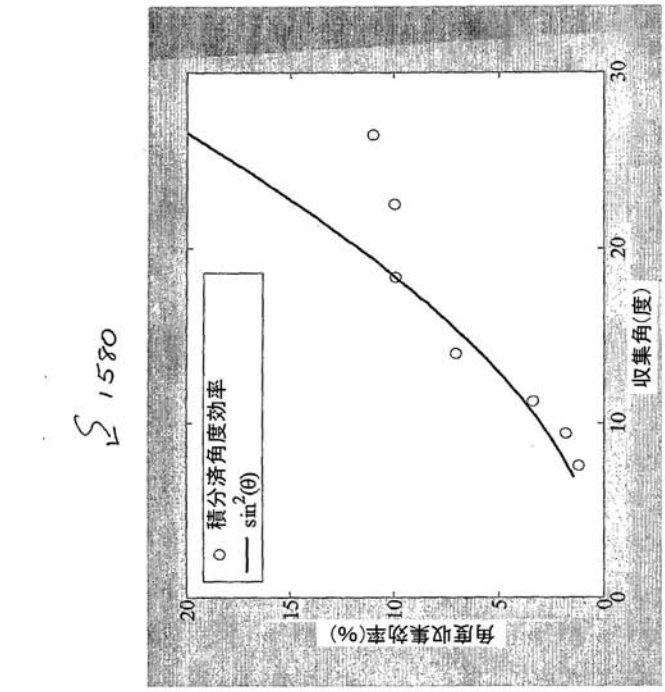


Figure 40B

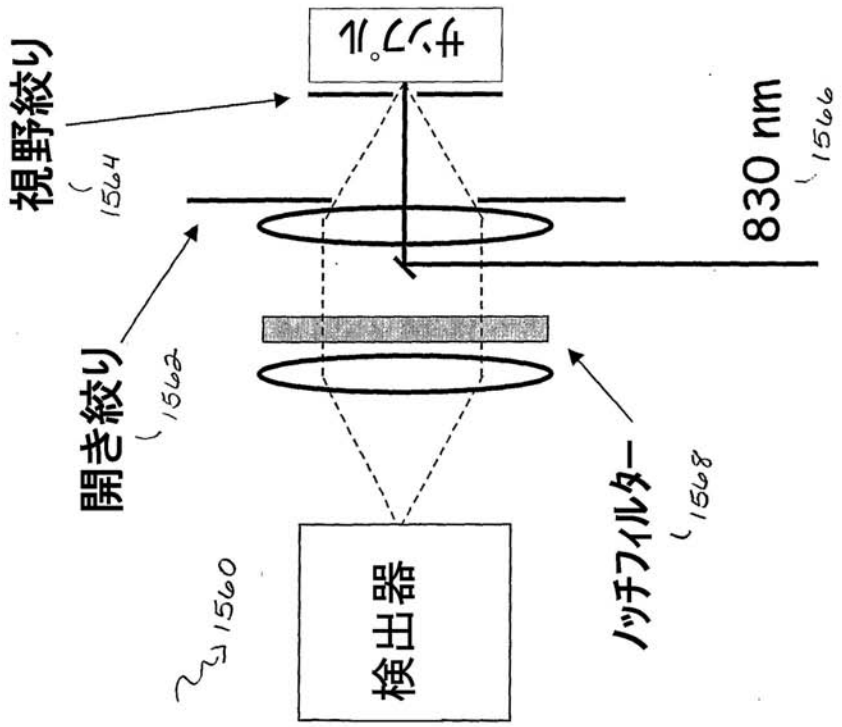


Figure 40A

【図４１】

1590

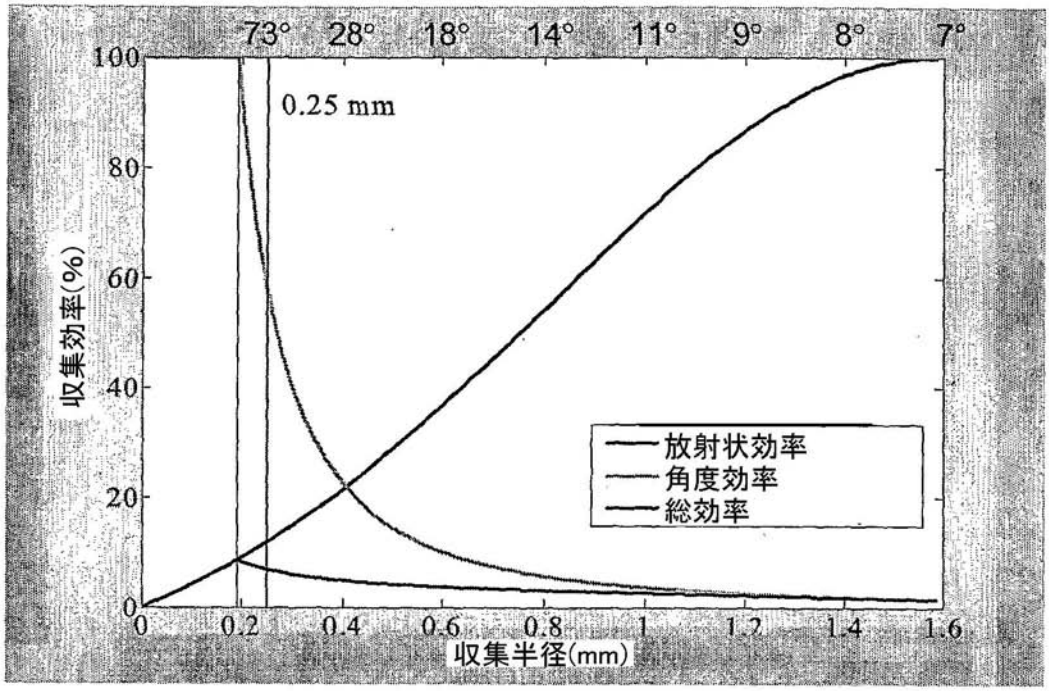


Figure 41

【図４６Ｂ】

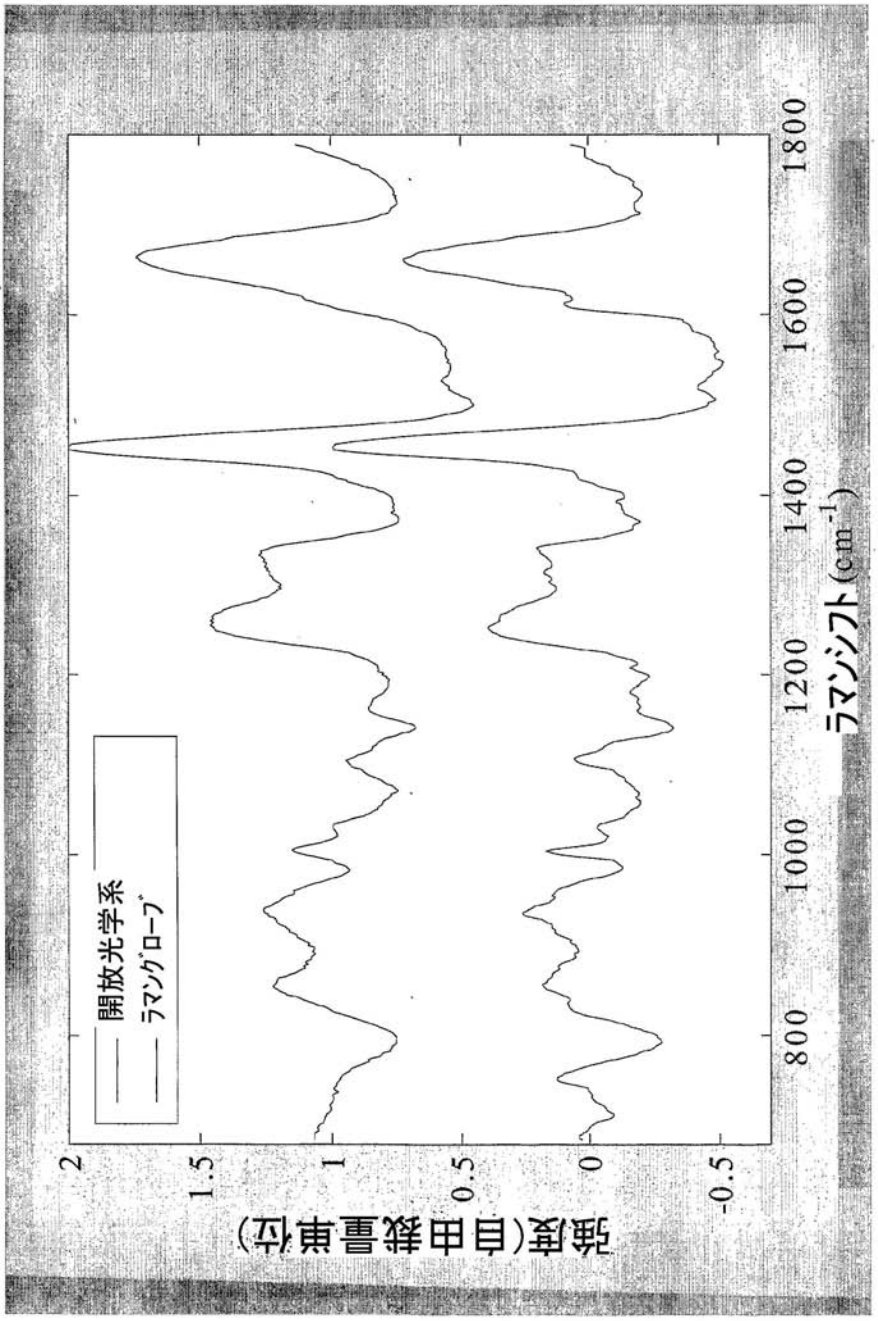


Figure 46B

【図４９Ａ】

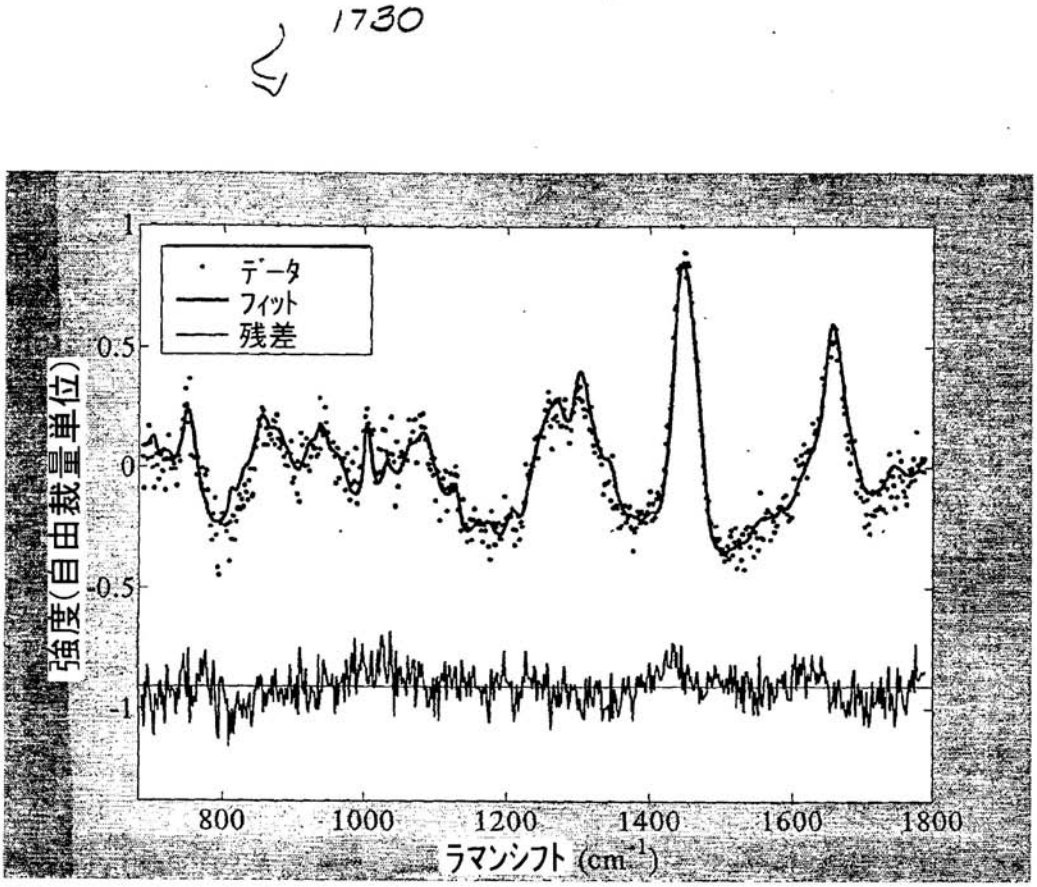


Figure 49A

【図５０Ａ】

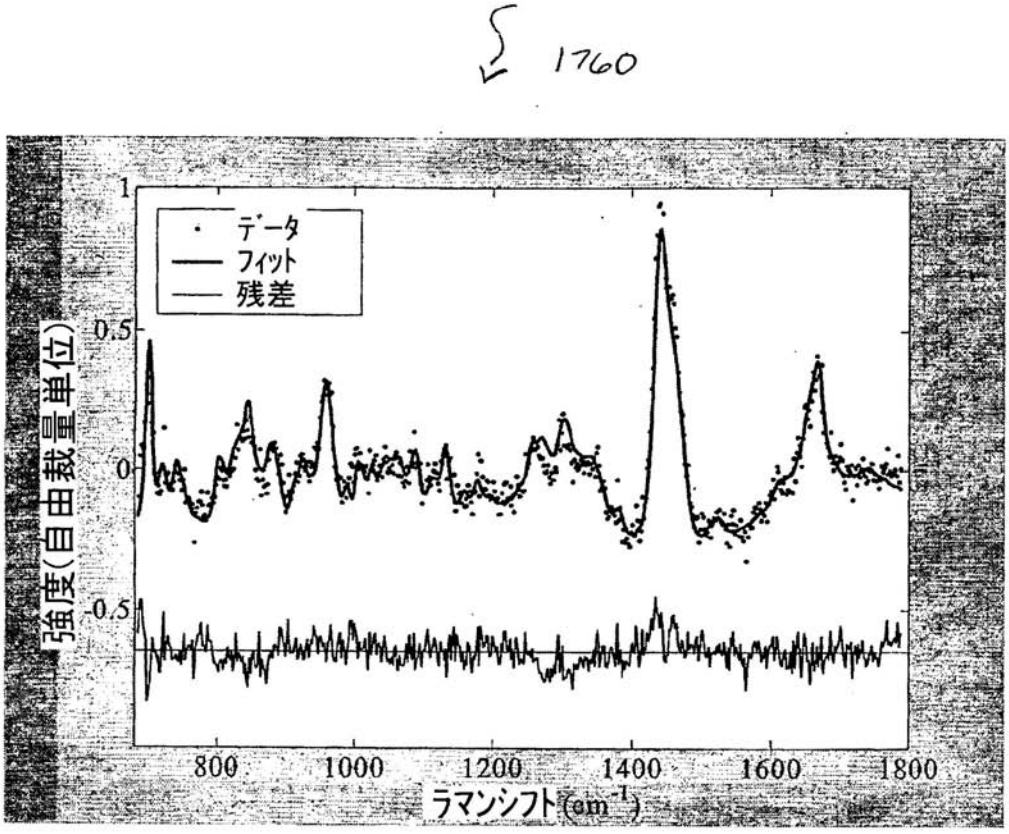


Figure 50A

【図５１Ａ】

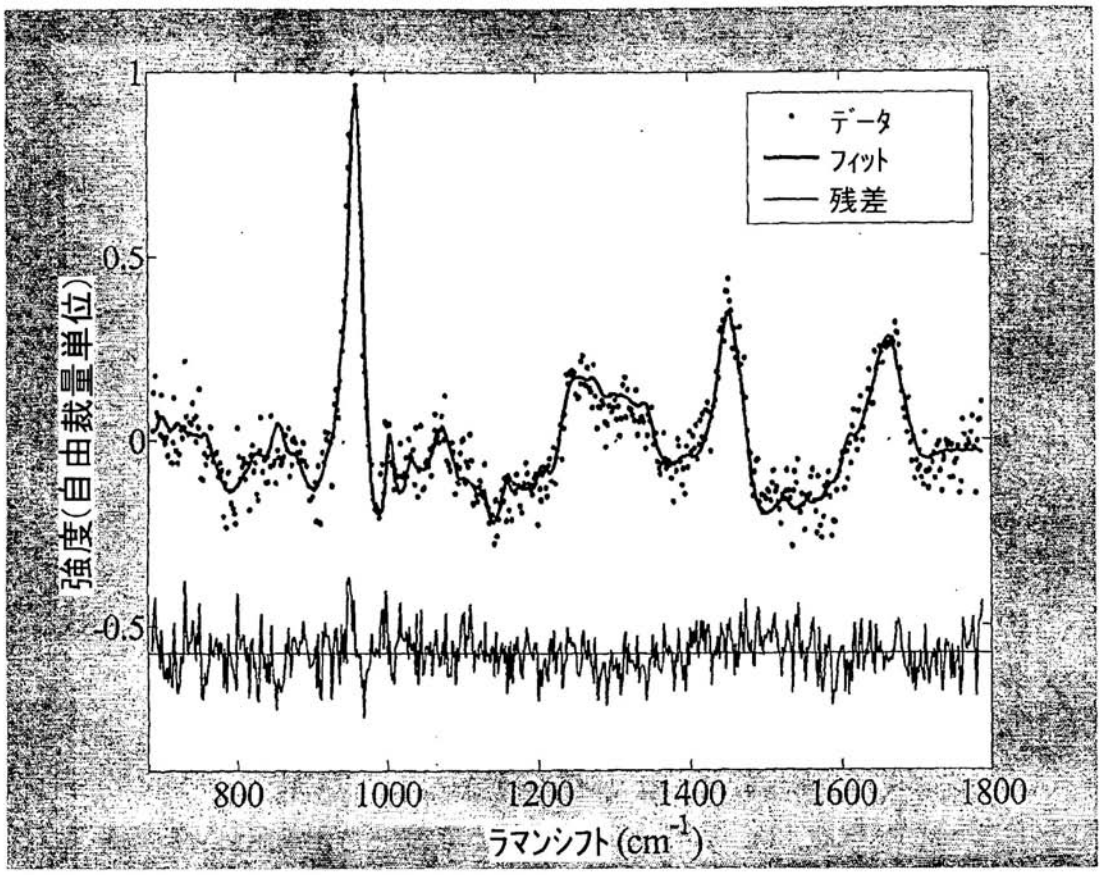
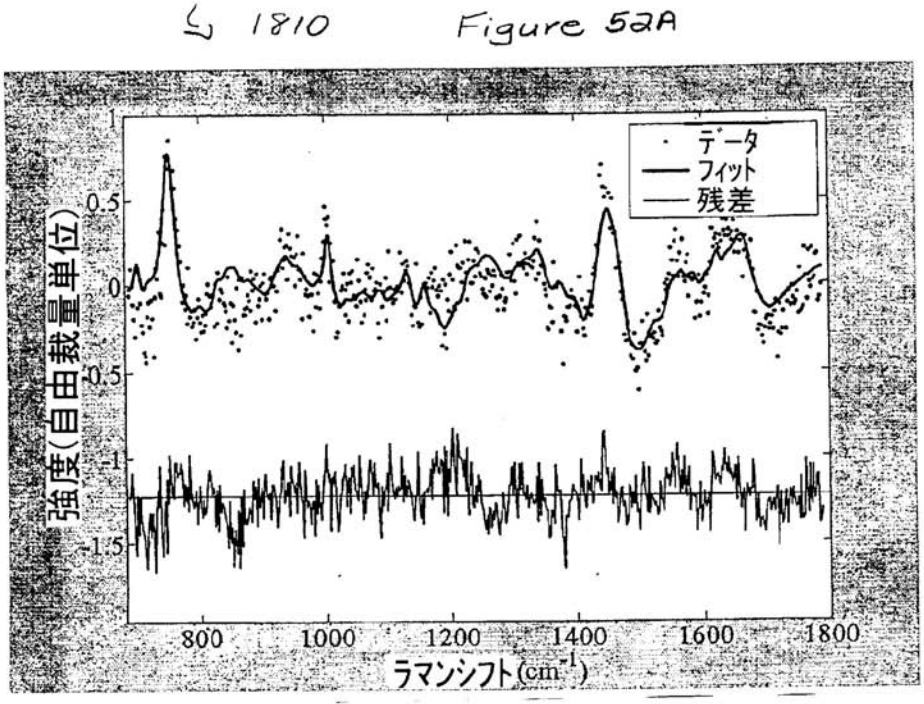


Figure 51A

【図５２Ａ】



【図５３Ａ】

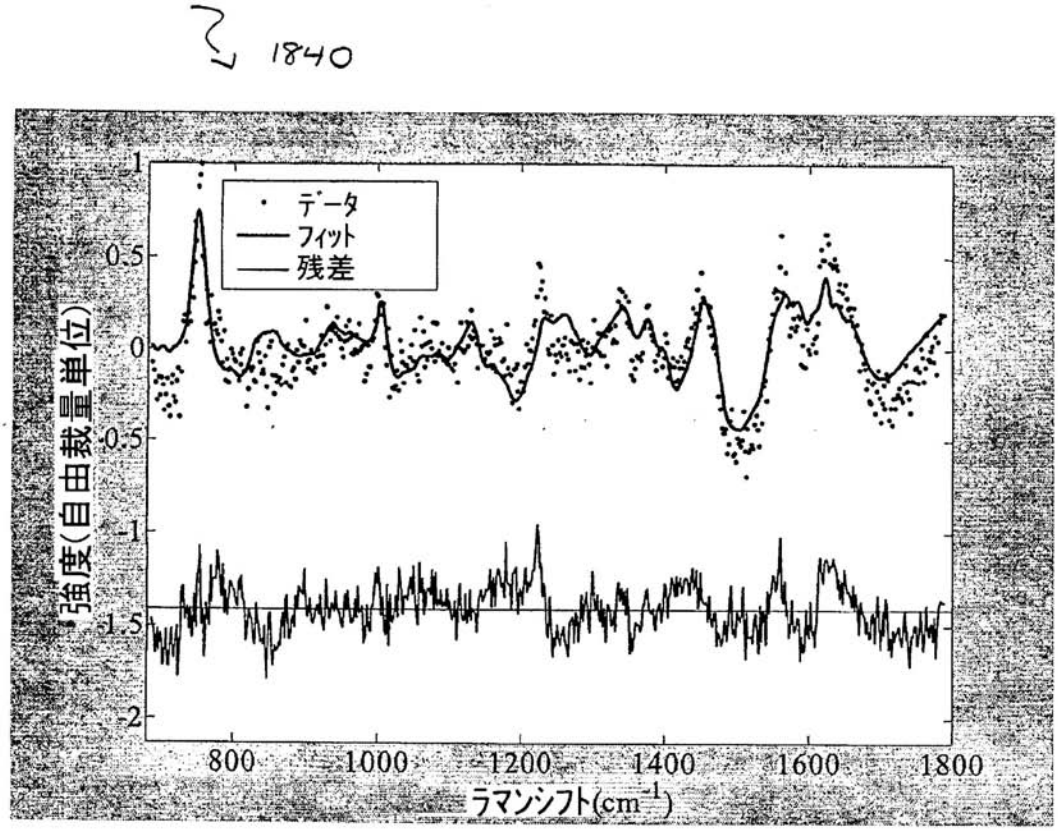
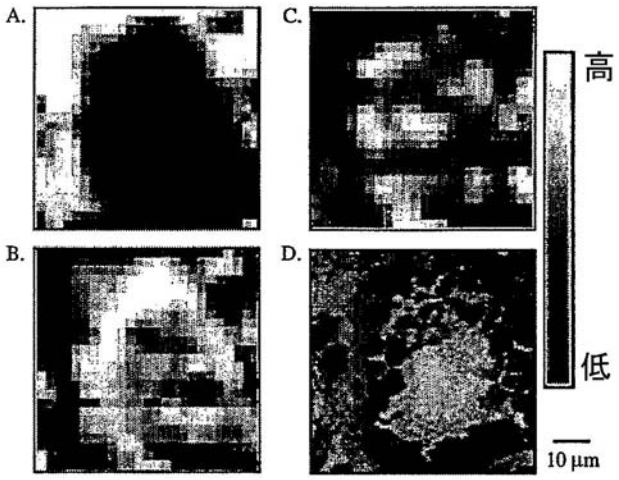


Figure 53A

【図５９Ａ－５９Ｄ】



Figures 59A-D

【図７０】

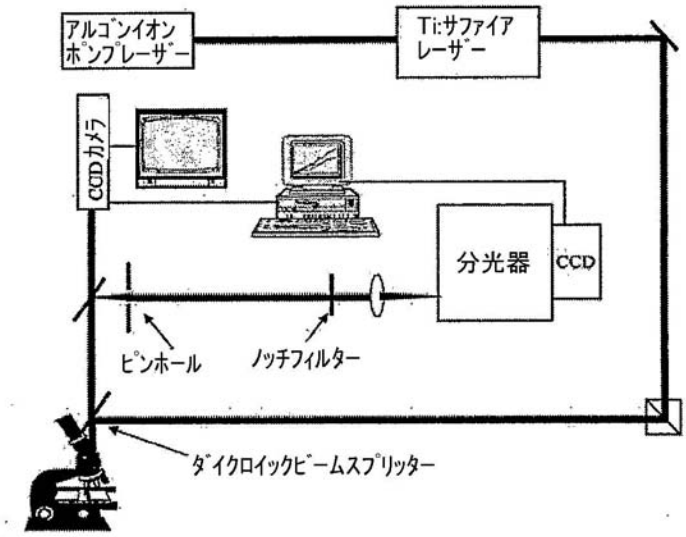
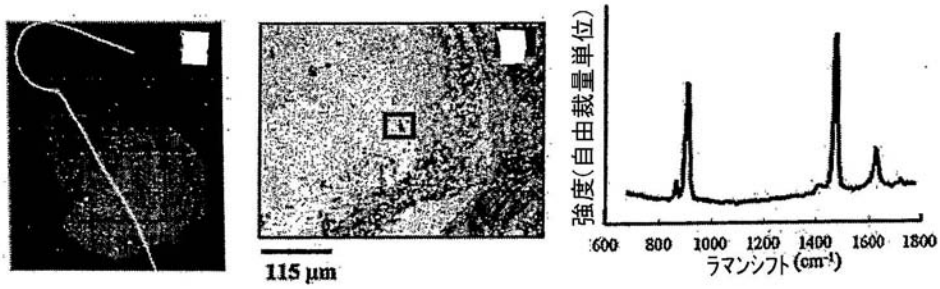


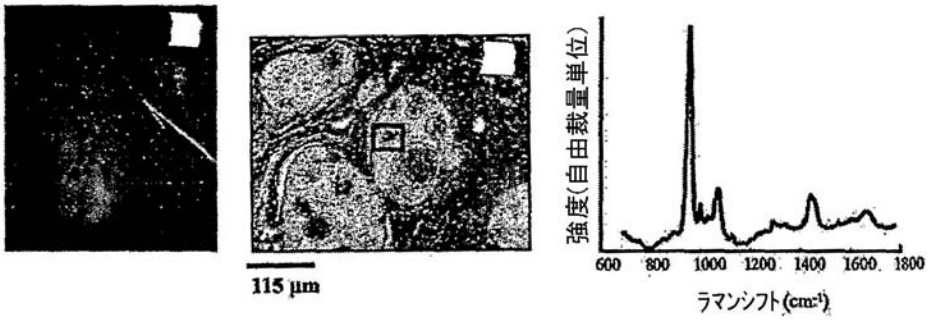
Figure 70

【図７１Ａ－７１Ｃ】



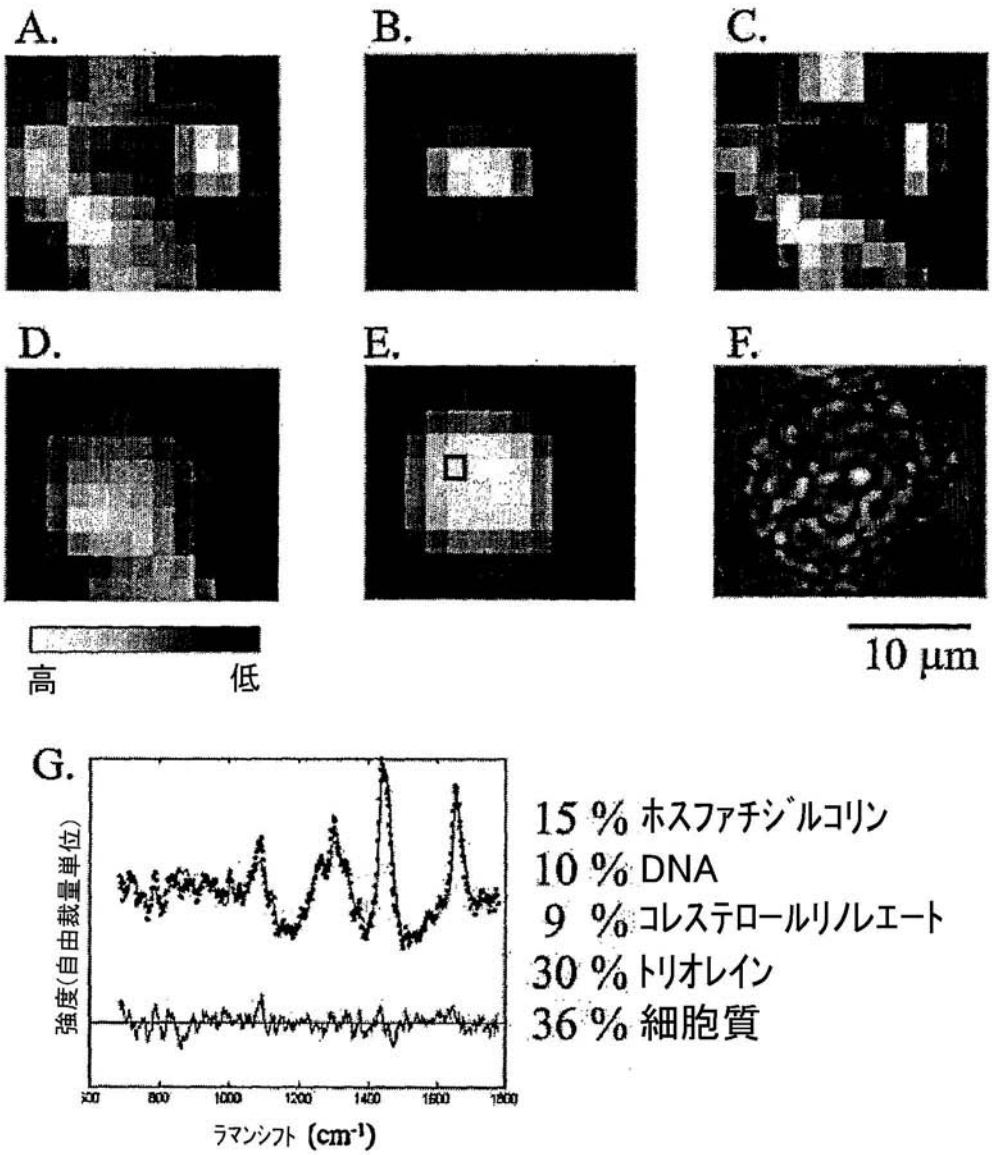
Figures 71A-C

【図７２Ａ－７２Ｃ】



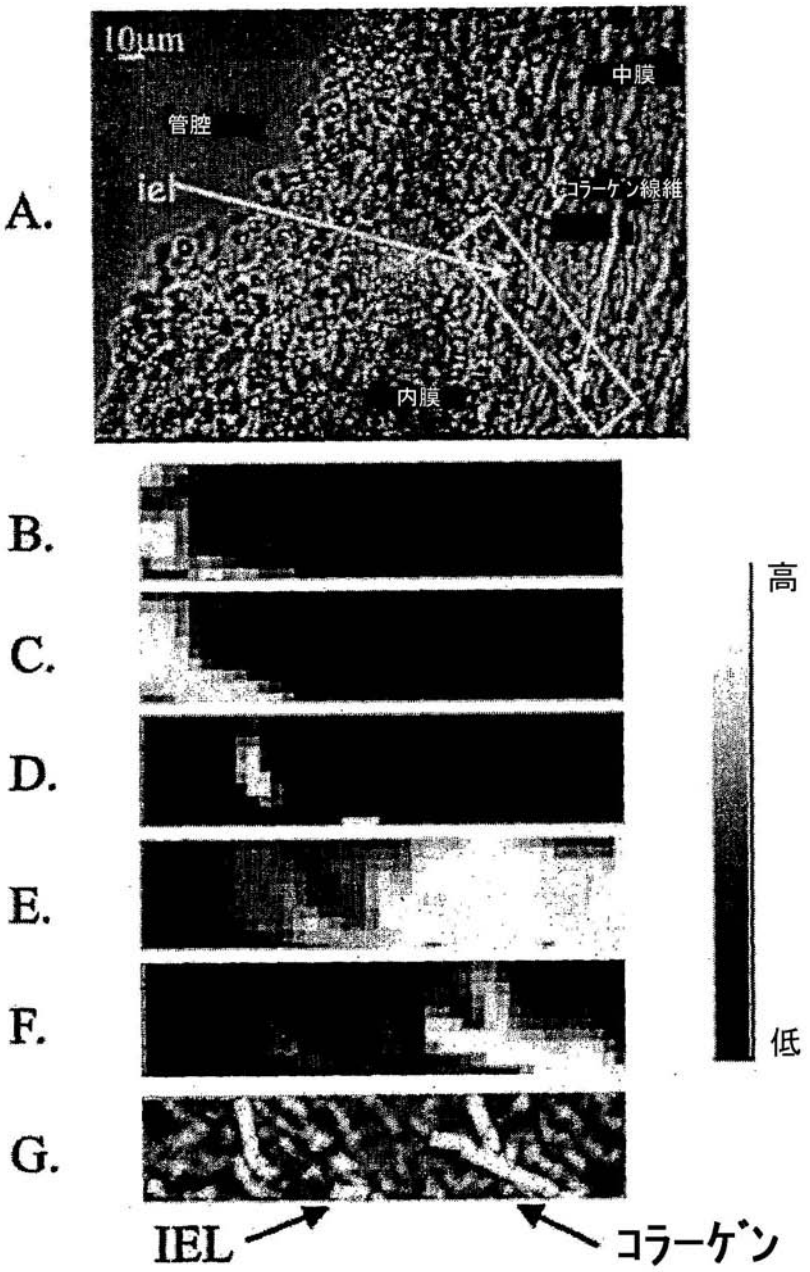
Figures 72A-C

【図７８Ａ－７８Ｇ】



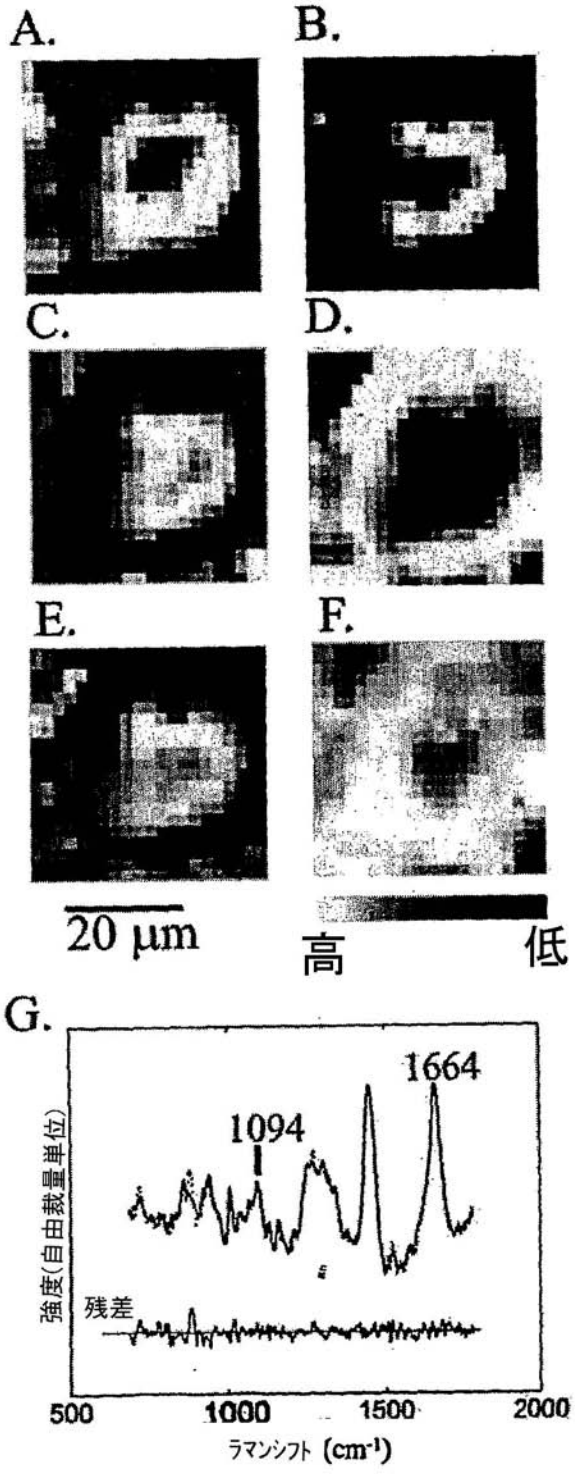
Figures 78A -G

【図７９Ａ－７９Ｇ】



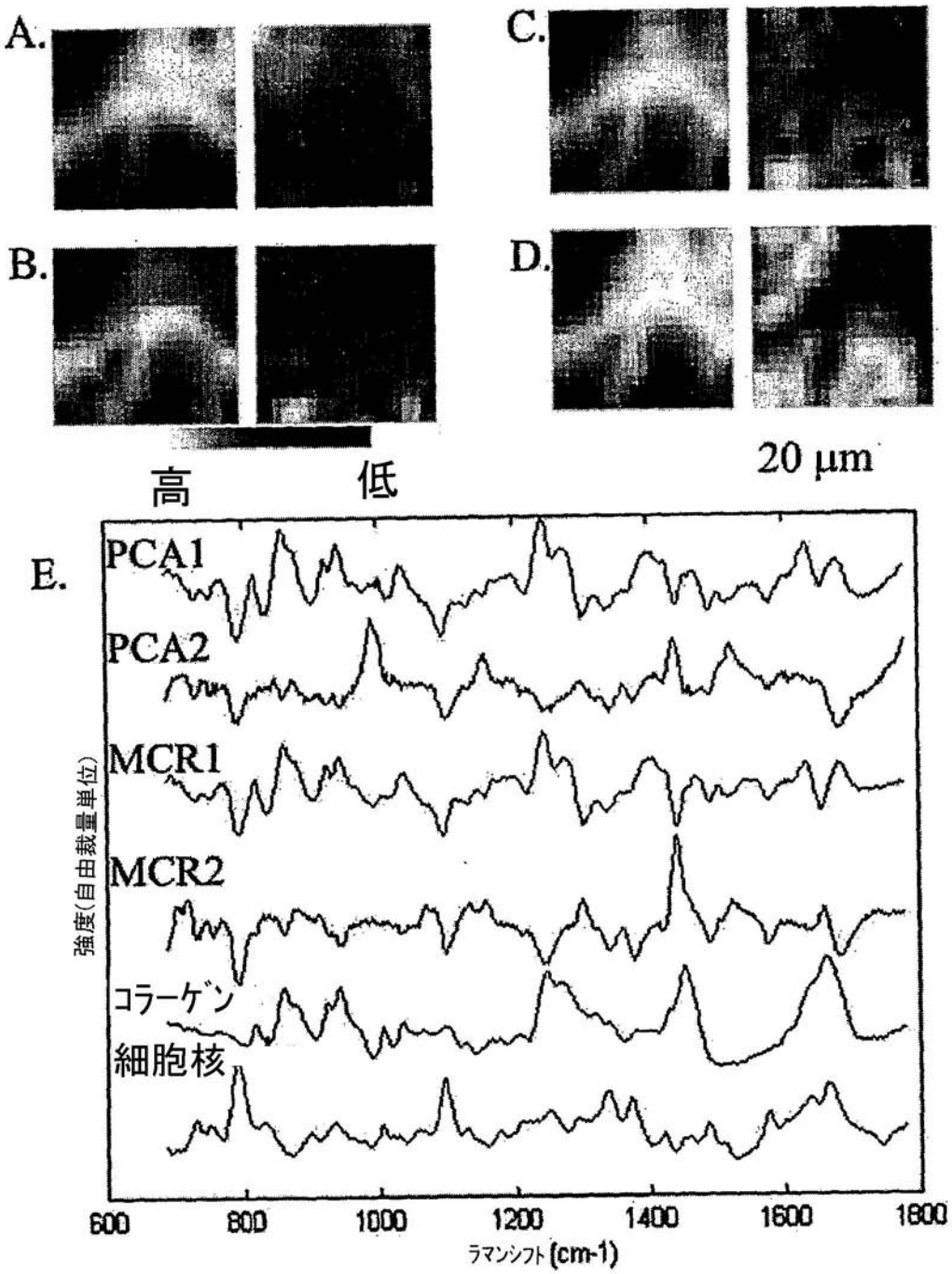
Figures 79A-G

【図８０Ａ－８０Ｇ】



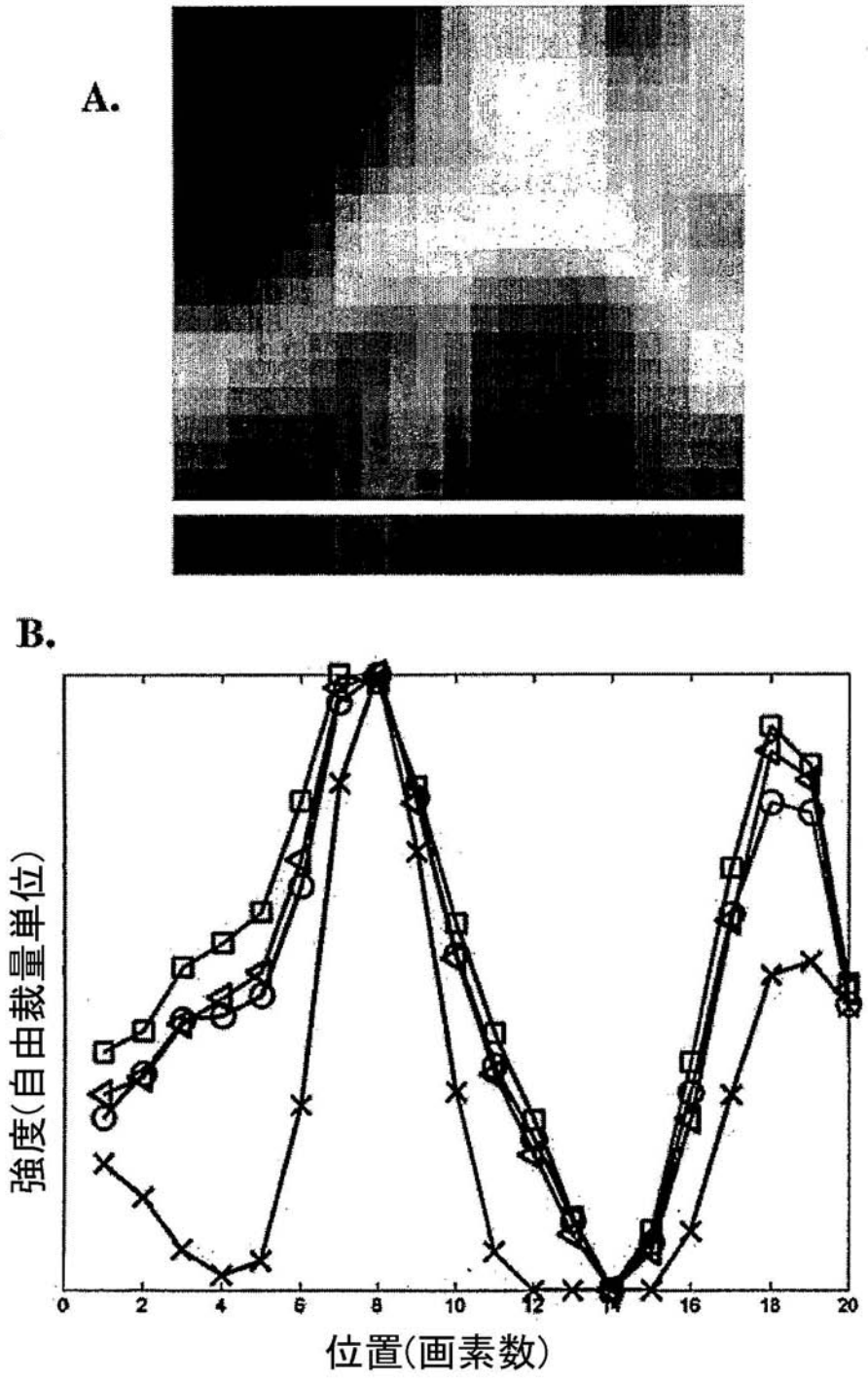
Figures 80A-G

【図８１Ａ－８１Ｅ】



Figures 81A-G

【図８２Ａ－８２Ｂ】



Figures 82A - B

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 03/10307

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N21/65 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)
WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2001/012429 A1 (MARPLE ERIC TODD ET AL) 9 August 2001 (2001-08-09) paragraph '0073! - paragraph '0094! paragraph '0213! paragraph '0299! paragraph '0526! - paragraph '0527! claims 1,4,8,9; figures 23,34 --- -/--	1,3-5, 14-16, 18,22, 23,30, 36,37, 39,41, 47,48, 50,63

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] 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 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
3 September 2003	11/09/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
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	Krametz, E

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 03/10307

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 230 679 A (DOW CHEMICAL CO) 5 August 1987 (1987-08-05) column 3, line 35 - line 45 figure 1	1,5,18, 23,30, 37,41, 48,63
A	US 5 293 872 A (LIU CHENG H ET AL) 15 March 1994 (1994-03-15) column 1, line 9 - line 12 column 4, line 54 -column 9, line 8 claim 1; figures 6,9	1,5,9, 11,13, 14,17, 18,23, 28,30, 37,41, 48,53, 59,63,68
A	US 5 615 673 A (BRENNAN III JAMES F ET AL) 1 April 1997 (1997-04-01) cited in the application column 5, line 16 -column 6, line 62 figures 1,2	1,9,18, 28,30, 41,53, 63,64, 66,68
A	US 5 217 454 A (KHOURY ADIB I) 8 June 1993 (1993-06-08) claim 1	30-32, 41-43
A	US 5 510 894 A (PITT G DAVID ET AL) 23 April 1996 (1996-04-23) column 2, line 54 - line 60	63,64,66

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 03/10307

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2001012429 A1	09-08-2001	US 6222970 B1	24-04-2001
		US 5953477 A	14-09-1999
		US 5764840 A	09-06-1998
		US 6580935 B1	17-06-2003
		US 6174424 B1	16-01-2001
		US 6144791 A	07-11-2000
		US 6208783 B1	27-03-2001
		US 6404953 B1	11-06-2002
		US 6370406 B1	09-04-2002
		US 6366726 B1	02-04-2002
		US 6416234 B1	09-07-2002
		US 6542673 B1	01-04-2003
		US 5878178 A	02-03-1999
		AU 2534197 A	01-10-1997
		CA 2248912 A1	18-09-1997
		EP 0886796 A1	30-12-1998
		JP 2000510604 T	15-08-2000
		WO 9734175 A1	18-09-1997
EP 0230679 A	05-08-1987	EP 0230679 A1	05-08-1987
		DE 3673378 D1	13-09-1990
		US 4573761 A	04-03-1986
US 5293872 A	15-03-1994	NONE	
US 5615673 A	01-04-1997	AU 5373396 A	16-10-1996
		CA 2216641 A1	03-10-1996
		EP 0821563 A2	04-02-1998
		JP 11508033 T	13-07-1999
		WO 9629925 A2	03-10-1996
US 5217454 A	08-06-1993	NONE	
US 5510894 A	23-04-1996	DE 69203830 D1	07-09-1995
		DE 69203830 T2	23-11-1995
		EP 0542962 A1	26-05-1993
		WO 9222805 A1	23-12-1992
		WO 9222793 A1	23-12-1992
		JP 3377209 B2	17-02-2003
		JP 6500637 T	20-01-1994
		ZA 9204145 A	31-03-1993
		DE 68919078 D1	01-12-1994
		EP 0404901 A1	02-01-1991
		WO 9007108 A1	28-06-1990
		JP 2733491 B2	30-03-1998
		JP 3504046 T	05-09-1991
		US 5689333 A	18-11-1997
		US 5194912 A	16-03-1993
		US 5442438 A	15-08-1995

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

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,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,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,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,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
テフロン

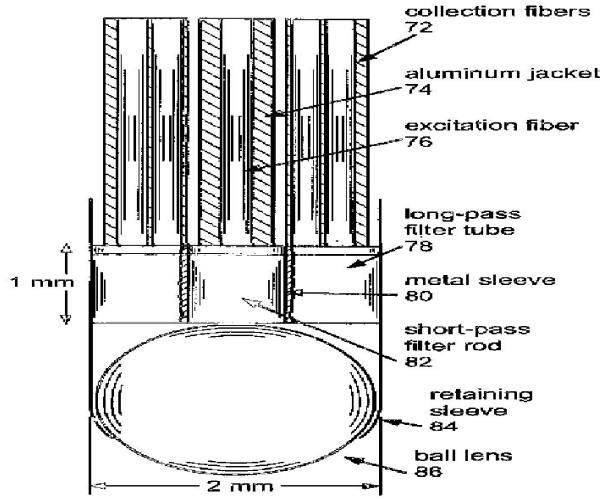
(72)発明者 ガリンド，ルイス・エイチ
アメリカ合衆国マサチユセツツ州０１４２０フイツチバーグ・フエアマウントストリート３８９
(72)発明者 ハンター，マーテイン
アメリカ合衆国マサチユセツツ州０２４７８ベルモント・コルビイストリート３８
(72)発明者 ハカ，アビゲイル・エス
アメリカ合衆国マサチユセツツ州０２１４１ケンブリツジ・アパートメント２０２・ソーンダイクプレイス２１８
(72)発明者 ガンデイ，ソーミル
アメリカ合衆国マサチユセツツ州０２１１５ボストン・アパートメント１２エイ・マールボロストリート４２１
(72)発明者 ダサリ，ラマチヤンドラ
アメリカ合衆国マサチユセツツ州０２４２１－６３３４レキシントン・グレートロツクロード６
(72)発明者 フエルド，マイケル・エス
アメリカ合衆国マサチユセツツ州０２４６８ニユートン・アツプランドロード６２

Ｆターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA05 FA01 FA02 FA05 GA04 GB01 HA01 HA02
HA05 JA04 KA09 LA03
4C061 AA22 BB08 CC04 DD03 LL03 NN01 PP02

专利名称(译)	用于生物组织的光谱学的系统和方法		
公开(公告)号	JP2005522293A	公开(公告)日	2005-07-28
申请号	JP2003584690	申请日	2003-04-04
[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	モツツジエイソンテイ ガリンドルイスエイチ ハンターマーテイン ハカアビゲイルエス ガンデイソーミル ダサリラマチヤンドラ フエルドマイケルエス		
发明人	モツツ,ジエイソン·テイ ガリンド,ルイス·エイチ ハンター,マーテイン ハカ,アビゲイル·エス ガンデイ,ソーミル ダサリ,ラマチヤンドラ フエルド,マイケル·エス		
IPC分类号	A61B1/00 A61B5/00 G01N21/47 G01N21/65		
CPC分类号	A61B5/0086 A61B5/0071 A61B5/0075 A61B5/0084 A61B5/0091 A61B5/415 A61B5/4519 G01N21/474 G01N21/65 G01N2021/4745 G01N2021/4759 G01N2021/656		
FI分类号	A61B1/00.300.D G01N21/65		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/CA05 2G043/FA01 2G043/FA02 2G043/FA05 2G043/GA04 2G043/GB01 2G043/HA01 2G043/HA02 2G043/HA05 2G043/JA04 2G043/KA09 2G043/LA03 4C061/AA22 4C061/BB08 4C061/CC04 4C061/DD03 4C061/LL03 4C061/NN01 4C061/PP02		
优先权	60/370197 2002-04-05 US 10/178062 2002-06-21 US		
其他公开文献	JP2005522293A5 JP4588324B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于组织测量的系统包括直径为2mm或更小的光纤探针。这种小直径允许该系统用于诊断冠状动脉疾病或其他小腔或软组织，并且创伤最小。输送光纤包括在连接到光源近端的探针中。用于输送纤维的过滤器包括在远端。该系统包括在探针中的收集光纤，其收集来自组织的拉曼散射辐射，收集光纤在近端连接到检测器。第二纤维位于收集纤维的远端。包括连接到输送光纤的输送波导，连接到收集光纤的收集波导和透镜的光学透镜系统位于探针的远端。


collection fibers
72
aluminum jacket
74
excitation fiber
76
long-pass
filter tube
78
1 mm
metal sleeve
80
short-pass
filter rod
82
retaining
sleeve
84
ball lens
86
2 mm