

(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2015-526135

(P2015-526135A)

(43) 公表日 平成27年9月10日(2015.9.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 B 1/00</b> (2006.01)	A 6 1 B 1/00 3 0 0 D	2 G 0 4 3
<b>G 0 1 N 21/65</b> (2006.01)	G 0 1 N 21/65	2 G 0 5 9
<b>G 0 1 N 21/27</b> (2006.01)	G 0 1 N 21/27 B	4 C 1 6 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 86 頁)

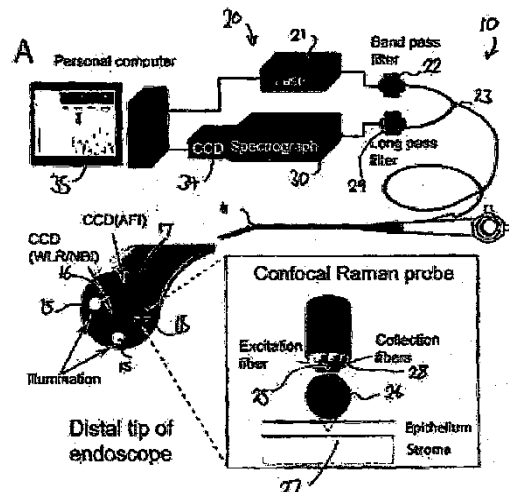
(21) 出願番号 特願2015-520131 (P2015-520131)  
 (86) (22) 出願日 平成25年7月2日(2013.7.2)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年2月26日(2015.2.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/SG2013/000273  
 (87) 国際公開番号 W02014/007759  
 (87) 国際公開日 平成26年1月9日(2014.1.9)  
 (31) 優先権主張番号 61/667,384  
 (32) 優先日 平成24年7月2日(2012.7.2)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 1307338.2  
 (32) 優先日 平成25年4月23日(2013.4.23)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 507335687  
 ナショナル ユニヴァーシティー オブ  
 シンガポール  
 シンガポール・119077・シンガポ  
 ル・ローワー・ケント・リッジ・ロード・  
 21  
 (74) 代理人 110000523  
 アクシス国際特許業務法人  
 (72) 発明者 ジーウェイ・ファン  
 シンガポール国119077シンガポール  
 、ロウアー・ケント・リッジ・ロード21  
 、デパートメント・オブ・バイオエンジニ  
 アリング、ファカルティ・オブ・エンジニ  
 アリング、シー/オー・ナショナル・ユニ  
 バーシティ・オブ・シンガポール  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光ファイバーラマン分光法を利用する内視鏡検査でのリアルタイム癌診断に関連する方法

(57) 【要約】

光ファイバーラマン分光システムの定量的分析のための機器独立測定方法を実施する方法であって、該システムは、レーザー光源と、分光器と、該レーザー光源からの光をターゲットに透過させかつ散乱光を該分光器に戻すための光ファイバースプロブとを備え、該方法は、該レーザー光源からの光を既知のスペクトルを有する標準的なターゲットに透過させ、該標準的なターゲットからの散乱光の較正スペクトルを記録し、該既知のスペクトルと該校正システムとを比較してプロブ及び/又はプロブシステム伝達関数を生成し、そして該伝達関数を記憶することを含む方法を提供する。さらに、任意に開示された他の方法と組み合わせたリアルタイム診断ラマン分光法を実施する方法も提供する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

癌の分光学的同定のためのコンピュータ実施方法であって、  
組織と関連する少なくとも 1 のスペクトルを受信し；  
該スペクトルを使用してスコアを決定するモデルにおいて該少なくとも 1 のスペクトル  
を分析し、ここで、該スコアは、組織が癌性である可能性を示し、及び  
該スコアを出力すること  
を含む方法。

**【請求項 2】**

前記モデルが、部分最小二乗法・判別分析、主成分分析、線形判別分析、蟻コロニー最  
適線形判別分析、分類及び回帰ツリー、サポートベクターマシン及び適応的ブースティン  
グよりなる群から選択される解釈機能を使用して生成される、請求項 1 に記載の方法。

10

**【請求項 3】**

前記少なくとも 1 のスペクトルをラマン分光法によって生成する、請求項 1 に記載の方  
法。

**【請求項 4】**

前記モデル内での少なくとも 1 のスペクトルを分析することが、第 1 モデル及び第 2 モ  
デルにおける少なくとも 1 のスペクトルを分析することを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記モデルが組織に基づいて選択される、請求項 1 に記載の方法。

20

**【請求項 6】**

前記スコアは、組織が正常、異形成又は新生物であるかどうかを示す、請求項 1 に記載  
の方法。

**【請求項 7】**

前記少なくとも 1 のスペクトルを分析することが、異常値分析を実行すること；及び  
該少なくとも 1 のスペクトルが異常値であると判断する異常値分析に応じて、そのスペ  
クトルを拒絶することを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 8】**

異常値分析を実行することが主成分分析を含む、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記少なくとも 1 のスペクトルが異常値であると判断する異常値解析に回答して、オー  
ディオ発出素子にオーディオ信号を発することを指示することをさらに含む、請求項 7 に  
記載の方法。

30

**【請求項 10】**

前記少なくとも 1 のスペクトルが異常値であると判断する異常値分析に回答して、分光  
計に少なくとも一つの追加のスペクトルを取得することを指示し、そして該少なくとも一  
つの追加のスペクトルを受信することをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 11】**

さらに、オーディオ発出素子に前記組織を正常、異形成又は新生物と同定するオーデ  
ィオ信号を発出することを指示することをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

40

**【請求項 12】**

正常、異形成又は新生物のそれぞれに関連するオーディオ信号が異なる、請求項 6 に記  
載の方法。

**【請求項 13】**

正常、異形成又は新生物のそれぞれに関連するオーディオ信号が異常値スペクトルに関  
連するオーディオ信号とは異なる、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 14】**

光ファイバラマン分光システムを較正する方法であって、該システムは、レーザー光  
源と、分光器と、該レーザー光源からの光をターゲットに透過させ、そして該分光器に散  
乱光を戻すための光ファイバプローブとを備え、該方法は、該レーザー光源からの光を

50

既知のスペクトルを有する基準ターゲットに透過させ、該基準ターゲットからの散乱光の較正スペクトルを記録し、該既知のスペクトルと該較正システムとを比較し、そして伝達関数を生成し、そして該伝達関数を格納することを含む方法。

【請求項 15】

複数の光ファイバプローブのそれぞれについて較正スペクトルを記録し、該プローブのそれぞれを含むシステムについて伝達関数を計算し、そして該伝達関数を対応するプローブと関連付けることを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

その後試験対象に照射し、スペクトルを記録し、そして前記記憶された伝達関数に従ってスペクトルを補正するステップを含む、請求項 14 又は 15 に記載の方法。

10

【請求項 17】

前記分光器が関連する分光伝達関数を有し、前記プローブが関連するプローブ伝達関数を有し、該伝達関数は、分光器の伝達関数及びプローブ伝達関数の関数である、請求項 14 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

一次分光器システムで、一次光ファイバプローブにより第 1 伝達関数を算出し、二次光ファイバプローブで第 2 伝達関数を算出し、そして、該第 1 伝達関数及び第 2 伝達関数に基づいて較正関数を算出することを含む、請求項 14 ~ 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

較正関数を二次光ファイバプローブと関連付けることを含む、請求項 18 に記載の方法。

20

【請求項 20】

二次分光計システムで、一次光ファイバプローブを使用し、二次システム伝達関数を生成し、そして二次システム伝達関数を保存することを含む、請求項 18 又は 19 に記載の方法。

【請求項 21】

二次光ファイバプローブを二次分光計システム共に使用し、そして較正関数に従って、記憶された二次システム伝達関数を修正することを含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

一次分光計システムに従って二次分光計システムの波長軸較正を実行する初期ステップを含む、請求項 18 ~ 21 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 23】

ラマン分光システムを動作させる方法であって、

該システムは、レーザー光源と、分光器と、該レーザー光源からの光をターゲットに透過させ、かつ、散乱光を該分光器に戻すための光ファイバプローブとを備え、

該方法は、該レーザー光源からの光を既知のスペクトルを有するターゲットに透過させ、該ターゲットからの散乱光のスペクトルを記録し、そして格納された伝達関数に従って該記録されたスペクトルを変更すること

を含む方法。

40

【請求項 24】

前記格納された伝達関数が前記分光器及び前記光ファイバプローブに相当する、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記格納された伝達関数が前記分光器及び前記一次光ファイバプローブに相当し、しかも、前記方法は、該光ファイバプローブに関連付けられた格納較正関数に従って該格納された伝達関数を修正することをさらに含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

レーザー光源と、分光器と、該レーザー光源からの光をターゲットに透過させかつ散乱光を該分光器に戻すための光ファイバプローブと、記憶された伝達関数とを備えるラマ

50

分光システムであって、該レーザー光源からの光を既知のスペクトルを有するターゲットに透過させ、該ターゲットからの散乱光のスペクトルを記録し、そして該記憶された伝達関数に従って該記録されたスペクトルを変更するように動作可能であるシステム。

【請求項 27】

前記格納された伝達関数が前記分光器及び前記光ファイバプロープに相当する、請求項 26 に記載のシステム。

【請求項 28】

前記格納された伝達関数が前記分光器及び前記一次光ファイバプロープに相当し、しかも、前記方法は、該光ファイバプロープに関連付けられた格納較正関数に従って該格納された伝達関数を修正することをさらに含む請求項 26 に記載のシステム。

10

【請求項 29】

光ファイバラマン分光システムで伝送されるレーザーパワーを推定する方法であって、該システムは、レーザー光源と、分光器と、該レーザー光源からの光をターゲットに透過させ、かつ、該分光器への散乱光を戻すための光ファイバプロープとを備え、該方法は、該レーザー光源からの光を複数のターゲットに透過させ、それぞれの試験ターゲットについて、レーザー光源からの光の透過力及び散乱光のスペクトルを該分光器で測定し、従属変数として測定され送信パワーにより該取得スペクトルの多変量解析を実行し、そして得られたモデルを格納することを含む方法。

【請求項 30】

試験ターゲットにレーザー光を伝送し、取得したスペクトルをモデルに送り、そして、伝送パワーの推定値を算出するステップを含む、請求項 29 に記載の方法。

20

【請求項 31】

光ファイバプロープを有する光ファイバラマン分光システムからバックグラウンド信号を除去する方法であって、次のステップ：

- (a) バックグラウンドスペクトルを保存し、
  - (b) 試験スペクトルを受信し、
  - (c) 1 以上の基準ピークを使用してバックグラウンドの寄与を推定し、
  - (d) 推定されたバックグラウンドの貢献に基づいて補正係数によりバックグラウンドスペクトルを乗算し、そしてこれを試験スペクトルから減じ、
  - (e) 残りのバックグラウンドの寄与についての試験スペクトルを確認し、そして
  - (f) 該バックグラウンドの寄与が無視できる程度である場合には該試験スペクトルを出力し、そうでなければ工程 (c) から (e) を繰り返すこと
- を含む方法。

30

【請求項 32】

前記 1 つ以上の基準ピークが光ファイバプロープにおけるシリカ又はサファイアに相当する 1 以上のピークを含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

その後請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の方法を行う、請求項 14 ~ 18 のいずれかに記載の較正方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本願は、2012年7月2日に出願された米国仮出願 61 / 667384 号及び 2013年4月23日に出願された英国特許出願第 1307338 . 2 号の利益を主張する。これらの両方を、全ての目的のためにその全体を引用により含める。

【0002】

分野

本発明は、光ファイバラマン分光法での定量分析のための独立した測定用の内視鏡及び機器でのリアルタイム癌診断のためのオンライン生物医学的分光ソフトウェアプラットフォームに関する。

50

## 【背景技術】

## 【0003】

背景

ラマン分光法は単色光の非弾性又はラマン散乱を使用する技術である。従来から、単色光源は、可視又は近赤外（「NIR」）領域内のレーザーである。散乱光子のエネルギーは、照射された材料における振動モード又は励起との相互作用に応答して、シフトアップ又はシフトダウンし、散乱光子の波長を変化させる。したがって、散乱光のスペクトルは、散乱物質に関する情報を提供することができる。

## 【0004】

NIRラマン分光法は、多数の器官における生体内での前癌性及び癌性の細胞及び組織の特徴付け及び診断の可能な潜在技術として知られている。この技術は、非侵襲的又は低侵襲性であることができ、生検又は他の組織除去を必要としないときに望ましい。2つの波長領域でのNIRラマン分光法を使用することが知られている。第1のものは、 $800 \sim 1800^{-1}$ の波数のいわゆるフィンガープリント（「FP」）範囲である。これは、非常に特異的な二分子、例えば、組織性状及び診断のためのこのスペクトル領域に包含されるタンパク質、DNA及び脂質内容物の豊富な情報のためである。この波長範囲の不利益は、一般的に使用される785nmレーザー光源を使用した場合、強力な組織自己蛍光バックグラウンドシグナルを生成する可能性があることである。さらに、プローブが光ファイバーを使用する場合には、ラマン信号は、光ファイバー内の溶融シリカから散乱される。特に電荷結合素子（「CCD」）を使用して散乱スペクトルを測定する場合、自己蛍光信号は、CCDを飽和させ、かつ、この波長範囲において本来的に非常に弱いラマンシグナルの検出を妨害する。

10

20

## 【0005】

技術としての光ファイバーラマン分光法の別の問題は、機器の標準化の問題である。光ファイバーラマン分光法は、主として、単一のシステムに限定されており、多施設臨床試験又は日常的な医療診断に移転するための試みは何ら行われてこなかった。これは、主として、ラマン分光計機器が一般に類似しておらず（すなわち、光学部品、応答関数、アライメント、スルーットなど）、しかも一般に非常に異なるラマンスペクトルを生成するからである。さらに、光ファイバーラマンプローブは、寿命が限られているため、定期的に置換又は交換しなければならない。残念ながら、様々な光ファイバープローブを用いて得られたラマンデータを比較することはできない。というのは、それぞれの光ファイバープローブは、その独自の背景を持つのみならず、異なる透過スペクトル特性とも関連するからである。異なる透過特性は、スペクトル強度を有意に歪ませ、異なる光ファイバープローブを用いて得られた組織ラマンスペクトルを比較できないものにする。その結果、一次臨床プラットフォームで開発された多変量診断アルゴリズムは、二次臨床プラットフォームには適用できない。特に、組織ラマン強度の定量的測定は、光ファイバーラマン生物医学用途における最も困難な問題の一つである。機器/ファイバープローブに依存しない強度較正及び標準化は、生物医学における光ファイバーラマン分光法のグローバルな利用の実現に不可欠である。この理由のため、「マスター」プローブを使用して構築された多変量統計的診断モデルは、「スレーブ」プローブで測定されたスペクトルには適用できない。ラマン技術が世界規模での癌スクリーニングのための広範なツールになるためには、特に生物医学的用途のためのラマン分光計と光ファイバープローブとの両方を標準化する必要がある。報告された研究のほとんどは、光ファイバープローブなしの単純な化学的混合物の測定のための相互ラマン分光計の標準化に焦点を当てている。一般に、単純な化学的混合物のラマン分光法は、異種生物学的組織サンプルの光ファイバーラマン分光法とは比較できない。

30

40

## 【0006】

機器にわたって結果を標準化する別の問題は、帯域通過フィルタ力に関連するスペクトル変動の問題である。従来から、一般的なスペクトル形状を保持するが、ただしこれが絶対的な定量分光特性を除去するラマンスペクトルが正規化されている。例えばファイバー

50

の先端にダイヤモンドを埋め込む又は基準としてレーザー光路中に重合体キャップを配置することによって光ファイバラマンプローブで送達レーザーパワーを監視しようとする事が知られている。しかしながら、これらの解決策は満足できるものではなく、必要なスペクトル領域で干渉を引き起こすことがある。

【0007】

癌及び前癌状態の生体内診断用の光学分光技術（反射蛍光及びラマン含む）を使用する際のさらなる問題は、データ分析が主として後処理及びオフラインアルゴリズム開発に制限されることである。これは、内視鏡分析についても同様である。というのは内視鏡検査中に収集された多数のスペクトルは異常値だからである。内視鏡検査のためのリアルタイム診断を可能にするシステムを獲得することが有用であろう。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

概要

第1の態様によれば、光ファイバラマン分光システムを較正する方法を提供し、該システムは、レーザー光源と、分光器と、該レーザー光源からの光をターゲットに透過させかつ散乱光を該分光器に戻すための光ファイバプローブとを備え、該方法は、該レーザー光源からの光を既知のスペクトルを有する標準的なターゲットに透過させ、該標準的なターゲットからの散乱光の較正スペクトルを記録し、該既知のスペクトルと該較正システムとを比較して伝達関数を生成し、そして該伝達関数を記憶することを含む。

20

【0009】

この方法は、その後に試験対象に照射し、スペクトルを記録し、そして前記記憶された伝達関数に従ってスペクトルを補正する工程をさらに含むことができる。

【0010】

この方法は、複数の光ファイバプローブのそれぞれについて較正スペクトルを記録し、該プローブのそれぞれを含むシステムについて伝達関数を計算し、そして該伝達関数を対応するプローブと関連付けることを含むことができる。

【0011】

分光計は、関連する分光伝達関数を有し、プローブは関連するプローブ伝達関数を有し、該伝達関数は、該分光計伝達関数及び該プローブ伝達関数の関数であることができる。

30

【0012】

この方法は、一次分光計システムで、第1伝達関数を一次光ファイバプローブで計算し、第2伝達関数を第2光ファイバプローブで計算し、そして該第1伝達関数及び第2伝達関数に基づいて（プローブ間）較正関数を計算することを含むことができる。

【0013】

この方法は、較正関数を二次光ファイバプローブと関連付けることを含むことができる。

【0014】

この方法は、二次分光器システムで、一次光ファイバプローブを使用し、二次システム伝達関数を生成、そして二次システム伝達関数を保存することを含むことができる。

40

【0015】

この方法は、二次光ファイバプローブを二次分光器システムと共に使用し、較正関数に従って保存二次システム伝達関数を変更することを含むことができる。

【0016】

この方法は、一次分光計システムに従って二次分光計システムの波長軸較正を実行する初期工程を含むことができる。

【0017】

第2の態様によれば、ラマン分光システムを動作させる方法が提供され、該システムは、レーザー光源と、分光器と、該レーザー光源からの光をターゲットに透過させかつ散乱光を該分光器に戻すための光ファイバプローブとを備え、この方法は、レーザー光源か

50

らの光を既知のスペクトルを有するターゲットに透過させ、該ターゲットからの散乱光のスペクトルを記録し、そして該記録されたスペクトルを記憶された伝達関数に従って変更することを含む。

【0018】

記憶された伝達関数を分析計及び光ファイバプロープに関連付けることができる。

【0019】

記憶された伝達関数を分光計及び一次光ファイバプロープに関連付けることができ、本方法は、記憶された伝達関数を該光ファイバプロープに関連付けられた記憶較正関数に従って変更することを含むことができる。

【0020】

第3の態様によれば、レーザー光源と、分光器と、該レーザー光源からの光をターゲットに透過させかつ散乱光を該分光器に戻すための光ファイバプロープと、記憶された伝達関数とを備えるラマン分光システムを提供し、このシステムは、該レーザー光源からの光を既知のスペクトルを有するターゲットに透過させ、該ターゲットからの散乱光のスペクトルを記録し、そして該記憶された伝達関数に従って該記録されたスペクトルを変更するように動作可能である。

【0021】

記憶された伝達関数を分光計及び光ファイバプロープに関連付けることができる。

【0022】

記憶された伝達関数を分光計及び一次光ファイバプロープに関連付けることができ、本方法は、該記憶された伝達関数を光ファイバプロープに関連付けられた記憶較正関数に従って変更することをさらに含むことができる。

【0023】

第4の態様によれば、ラマン分光システムで伝送されるレーザーパワーを推定する方法が提供され、該システムは、レーザー光源と、分光器と、該レーザー光源からの光をターゲットに透過させかつ散乱光を該分光器に戻すための光ファイバプロープとを備え、該方法は、レーザー光源からの光を複数のターゲットに透過させ、ターゲットごとにレーザー光源からの光の透過力及び分光器での散乱光のスペクトルを測定し、従属変数としての測定伝送力により、取り込まれたスペクトルの多変量解析を実行し、そして得られたモデルを保存することを含む。

【0024】

該方法は、テストターゲットにレーザー光を伝送し、取り込まれたスペクトルをモデルに供給し、該伝送力の推定値を計算する工程を含むことができる。

【0025】

第5の態様によれば、光ファイバプロープを有する光ファイバラマン分光システムからのバックグラウンドシグナルを減じる方法を提供し、該方法は次の工程を含む：(a)バックグラウンドスペクトルを保存し、(b)試験スペクトルを受信し、(c)1以上の基準ピークを使用してバックグラウンドの寄与を推定し、(d)推定されたバックグラウンドの貢献に基づいて補正係数によりバックグラウンドスペクトルを乗算し、そしてこれを試験スペクトルから減じ、(e)残りのバックグラウンドの寄与についての試験スペクトルを確認し、そして(f)該バックグラウンドの寄与が無視できる程度である場合には該試験スペクトルを出力し、そうでなければ工程(c)から(e)を繰り返すこと。

【0026】

1以上の基準ピークは、光ファイバプロープ中にシリカ又はサファイアに相当する1以上のピークを含むことができる。

【0027】

第6の態様によれば、内視鏡検査の間にラマン分光法を使用するリアルタイム診断のためコンピュータ実行方法を提供する。この方法は、組織に関連付けられた少なくとも1つのスペクトルを受信し；該スペクトルを使用するモデルにおいて該少なくとも1つのスペクトルを分析してスコアを決定し、ここで、該スコアは、組織が癌性である可能性を示し

10

20

30

40

50

;そしてスコアを出力することを含む。

【0028】

いくつかの実施形態では、モデルは、部分最小二乗 - 判別分析、主成分分析、線形判別分析、蟻コロニー最適化線形判別分析、分類及び回帰ツリー、サポートベクターマシン及び適応ブースティングよりなる群から選択される解釈機能を使用して生成される。

【0029】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのスペクトルは、ラマン分光法によって生成される。モデル内で少なくとも1つのスペクトルを分析することは、第1モデル及び第2モデルにおいて少なくとも1つのスペクトルを分析することを含むことができる。いくつかの実施形態では、モデルは、分析された組織に基づいて選択される。いくつかの実施形態では、スコアは、組織が正常か、腸上皮化生か、異形成か又は新生物かどうかを示す。

10

【0030】

いくつかの態様において、少なくとも1つのスペクトルを分析することは、異常値分析を実行し、そして該異常値分析に回答して、少なくとも1つのスペクトルが異常値であることを決定し、該スペクトルを拒否することを含む。異常値の分析を実行することは、主成分分析を含むことができる。

【0031】

いくつかの態様では、音声発信装置は、少なくとも1のスペクトルが異常値であることを決定する異常値分析に応じて音声信号を発する。スペクトルが異常値であるという決定に応じて、方法は、分析のためにシステムによって受信される少なくとも1の追加のスペクトルを取得するよう分光器に指示する。

20

【0032】

いくつかの実施形態では、音声発信装置は、組織を正常、異形成又は新生物と識別する音声信号を発信する。いくつかの実施形態では、各診断に関連した音声信号は異なり、また異常値スペクトルの決定に関連する音声信号とも異なる。

【0033】

いくつかの実施形態では、診断は、内視鏡手術の間に行われる。

【0034】

また、コンピュータ実行方法を実施するためのシステムのみならず、コンピュータ実行方法を実行するためにそれに関する指示による非一時的コンピュータ読み取り可能媒体も提供する。

30

【0035】

開示されたシステム及び方法の実施形態を、添付の図面を参照して単なる例示として説明する。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】図1は、一実施形態によるラマン分光システムの概略図である。図1 aは、図1の内視鏡の端部のより大きなスケールでの図である。図1 bは、図1 aの内視鏡のラマンプローブをさらに詳細に示す図である。

【図2】図2は、測定された蛍光スペクトルと参照標準との比較を示すグラフである。較正機能も示されている。

40

【図3】図3は、第1較正方法の概略図である。

【図4】図4 aは、第1較正方法で使用するための第1処理を示すフローチャートである。図4 bは、第1較正方法で使用するための第2方法の第1部分を示すフローチャートである。図4 cは、第1較正方法で使用するための第2方法の第2部分を示すフローチャートである。

【図5】図5は、一次分光器及び二次分光器のうちアルゴン/水銀ランプの波長配置を示すグラフである。

【図6】図6は、第2較正方法を使用した一次分光器及び二次分光器のスペクトル較正を示すグラフである。

50

【図 7】図 7 a は、第 1 較正方法で使用するための第 1 方法を示すフローチャートである。図 7 b は、第 2 較正方法で使用するための第 2 方法の第 1 部分を示すフローチャートである。図 7 c は、第 2 較正方法で使用するための第 2 方法の第 2 部分を示すフローチャートである。

【図 8】図 8 は、マスター及びスレーブプローブ並びにプローブ較正伝達関数で測定された蛍光基準を示すグラフである。

【図 9】図 9 A は、未較正一次及び二次分光計とそれぞれマスター及びスレーブプローブとを比較する組織ラマンスペクトルのグラフである。図 9 B は、第 1 較正方法を使用した再較正後におけるそれぞれマスター及びスレーブプローブによる一次及び二次分光器からの組織のラマンスペクトルのグラフである。図 9 C は、第 2 の較正方法を使用した再較正後におけるそれぞれマスター及びスレーブプローブによる一次及び二次分光器からのスペクトルを示すグラフである。

【図 10】図 10 は、較正前後における胃からの生体内組織ラマンスペクトルについての主成分分析スコアの散布図である。

【図 11】図 11 は、ラマンスペクトルにおけるファイバースレーブによるバックグラウンドスペクトルピークを示すグラフである。

【図 12】図 12 は、励起用レーザーパワーによるラマンスペクトルの変化を示すグラフである。

【図 13】図 13 A は、レーザーパワーを推定するためのモデルを生成する方法を示すフローチャートである。図 13 B は、レーザーパワーを推定する方法を示すフローチャートである。

【図 14 A】図 14 A は、任意の数の含まれる潜在変数についての自乗平均平方根誤差を示すグラフである。

【図 14 B】図 14 B は、図 10 の方法の潜在変数のための格納係数及び回帰係数を示している。

【図 15】図 15 は、生体内試験被験体における予測レーザーパワーに対する測定レーザーパワーを示すグラフである。

【図 16】図 16 は、プローブバックグラウンドシグナルを減じる方法を示すフローチャートである。

【図 17】図 17 は、パーム及び光ファイバースリカ及びサファイアバックグラウンドから受信したスペクトルを示すグラフである。

【図 18】図 18 は、図 16 のラマンスペクトルとバックグラウンド除去後のスペクトルとを比較したグラフである。

【図 19】図 19 は、方法の組み合わせを示すフローチャートである。

【図 20】図 20 は、一実施形態に係るリアルタイム癌診断のためのスペクトル取得及び処理フローのためのシステムのアーキテクチャ図である。

【図 21】図 21 は、一実施形態によるリアルタイム癌診断のためのスペクトルの取得及び処理フローの概略を示すフローチャートである。

【図 22 A】図 22 A は、2 つの実施形態に係るリアルタイム癌診断のためのシステムを使用するためのグラフィカルユーザインタフェース (GUI) である。

【図 22 B】図 22 B は、2 つの実施形態に係るリアルタイム癌診断のためのシステムを使用するためのグラフィカルユーザインタフェース (GUI) である。

【図 23】図 23 は、305 胃患者から取得した正常 ( $n = 2465$ ) 及び癌 ( $n = 283$ ) 胃組織の生体内平均ラマンスペクトルである。

【図 24】図 24 は、スペクトルトレーニングデータベースから計算された主成分 (PC) 負荷を示す。

【図 25】図 25 は、2 つの診断上重要な PC スコア (PC1 VS PC2) の散布プロットである。

【図 26】図 26 は、10 見込みの胃のサンプルから取得した 105 ラマンスペクトル (45 正常、30 癌、30 異常値) のためのホテリングの  $T^2$  対  $Q$  - 残差を示す。

10

20

30

40

50

【図 2 7】図 2 7 は、リーブ・ワン・スペクトラム・アウト・クロスバリデーション法と共に PLS-D A モデルに基づく見込みの正常 (n = 45) 及び癌 (n = 30) 胃組織に属する事後確率値の散布図である。

【図 2 8】図 2 8 は、遡及的予測のためのスペクトルデータベースから計算された受信者動作特性 (ROC) 曲線のみならず、正常及び癌胃組織の見込み予測のための ROC 曲線も示す。

【図 2 9】図 2 9 は、様々な 785 nm の帯域通過フィルタパワー (すなわち、10、30 及び 60 mW) を使用することによって内側リップの自家蛍光減算及び強度較正平均生体内組織ラマンスペクトル  $1 \pm SD$  を示す。

【図 3 0】図 3 0 a は、リーブ・ワン・サブジェクト・アウト・クロスバリデーション法並びにデータに対する線形適合に基づく PLS 回帰モデルを使用した実際の帯域通過フィルタパワーと予測の帯域通過フィルタパワーとの関係を示す図である。図 3 0 b は、独立した検証に基づく PLS 回帰分析を使用した実際の帯域通過フィルタパワーと予測帯域通過フィルタパワーとの関係を示す図である。

【図 3 1】図 3 1 は、60 mW 帯域通過フィルタパワーで測定された、種々の濃度 (すなわち、重量で 20、25、30、35、40、45、および 50%) で調製されたゼラチン組織ファントムのラマンスペクトルを示す。

【図 3 2】図 3 2 は、予測レーザパワーによる補正後の組織ファントムにおける実際のゼラチン濃度と予測ゼラチン濃度との相関関係を示す図である。

【図 3 3】図 3 3 は、臨床内視鏡検査中に 0.1 秒でローゼンミュラーの窩から取得した代表的な生体内生ラマンスペクトルを示す。図 3 3 の挿入図は、強い自己蛍光バックグラウンドを除去した後の処理組織ラマンスペクトルである。

【図 3 4】図 3 4 は、後部鼻咽頭 (PN) (n = 521)、ローゼンミュラー窩 (FOR) (n = 157) 及び喉頭声帯 (LVC) (n = 196) の試験管内 (被験者間) 平均ラマンスペクトル  $1 \pm$  標準偏差 (SD) を示す。平均ラマンスペクトルは、より良い視覚化のために垂直に移動されていることに留意されたい。また、白色光反射率 (WLR) 及び狭帯域 (NB) 画像誘導下での後部鼻咽頭 (上)、ローゼンミュラー窩 (中) 及び喉頭声帯 (下) から生体内光ファイバースペクトル取得物も示されている。

【図 3 5】図 3 5 は、PN の生体内 (被験体内) 平均ラマンスペクトル  $\pm 1 SD$  (n = 18)、FOR (n = 18) 及び LVC (n = 17) を示す。平均ラマンスペクトルは、より良い視覚化のために垂直に移動されていることに注意してください。

【図 3 6】図 3 6 は、様々な解剖組織タイプ (被験者間) : [後部鼻咽頭 (PN) - 喉頭声帯 (LVC)] ; [後部鼻咽頭 (PN) - ローゼンミュラー窩 (FOR)] 及び [喉頭声帯 (LVC) - ローゼンミュラー窩 (FOR)] の様々なスペクトル  $\pm 1 SD$  の比較を示す。

【図 3 7】図 3 7 は、ヒト体液 (鼻汁、唾液、血液) からの潜在的交絡因子の試験管内ラマンスペクトルを示す。

【図 3 8】図 3 8 は、スペクトル変動の合計 57.41% を占める (PC1 : 22.86% ; PC2 : 16.16% ; PC3 : 8.13% ; PC4 : 6.22% ; PC5 : 4.05%)、頭頸部における様々な組織間における生体分子のばらつきを解消する PC 負荷を示す。

【図 3 9 A】図 3 9 A は、様々な組織型 (すなわち、PN、FOR 及び LVC) のための 5 個の PCA スコアのボックスチャートを与える。各ノッチボックス内の線は中央値を表すが、ボックスの下限と上限の境界は、それぞれ第 1 (25.0% パーセンタイル) 及び第 3 (75.0% パーセンタイル) 四分位数を示す。エラーバー (ウィスカー) は 1.5 倍の四分位範囲を表し。また、p 値も様々な組織型において与えられている。

【図 3 9 B】図 3 9 B は、様々な組織型 (すなわち、PN、FOR 及び LVC) のための 5 個の PCA スコアのボックスチャートを与える。各ノッチボックス内の線は中央値を表すが、ボックスの下限と上限の境界は、それぞれ第 1 (25.0% パーセンタイル) 及び第 3 (75.0% パーセンタイル) 四分位数を示す。エラーバー (ウィスカー) は 1.5

10

20

30

40

50

倍の四分位範囲を表し。また、p 値も様々な組織型において与えられている。

【図 3 9 C】図 3 9 C は、様々な組織型（すなわち、PN、FOR 及び LVC）のための 5 個の PCA スコアのボックスチャートを与える。各ノッチボックス内の線は中央値を表すが、ボックスの下限と上限の境界は、それぞれ第 1（25.0%パーセンタイル）及び第 3（75.0%パーセンタイル）四分位数を示す。エラーバー（ウィスカー）は 1.5 倍の四分位範囲を表し。また、p 値も様々な組織型において与えられている。

【図 3 9 D】図 3 9 D は、様々な組織型（すなわち、PN、FOR 及び LVC）のための 5 個の PCA スコアのボックスチャートを与える。各ノッチボックス内の線は中央値を表すが、ボックスの下限と上限の境界は、それぞれ第 1（25.0%パーセンタイル）及び第 3（75.0%パーセンタイル）四分位数を示す。エラーバー（ウィスカー）は 1.5 倍の四分位範囲を表し。また、p 値も様々な組織型において与えられている。

【図 3 9 E】図 3 9 E は、様々な組織型（すなわち、PN、FOR 及び LVC）のための 5 個の PCA スコアのボックスチャートを与える。各ノッチボックス内の線は中央値を表すが、ボックスの下限と上限の境界は、それぞれ第 1（25.0%パーセンタイル）及び第 3（75.0%パーセンタイル）四分位数を示す。エラーバー（ウィスカー）は 1.5 倍の四分位範囲を表し。また、p 値も様々な組織型において与えられている。

【図 4 0 A】図 4 0 A は、臨床内視鏡検査中に取得された線のある扁平上皮（ $n = 165$ ）、線のある円柱上皮（ $n = 907$ ）、パレット食道（ $n = 318$ ）、高度異形成（ $n = 77$ ）上皮の平均生体内共焦点ラマンスペクトルを示す。

【図 4 0 B - E】図 4 0 B は、（B）測定された組織部位に相当する代表的な組織学的切片スライド（ヘマトキシリン及びエオシン（H & E）染色）を示す。図 4 0 C は、線のある扁平上皮（C）杯細胞の存在しない線のある円柱上皮、 $\times 200$ を示す。図 4 0 D は、（D）正常の層状扁平上皮を杯細胞を含有する腸上皮化生で置き換えたパレット食道、 $\times 200$ を示す。図 4 0 E は、（E）構造的及び細胞学的異型性の両方並びに分岐及び乳頭の形成、細胞学的多形性及び極性の喪失を有する密集陰窩を示す高度形成異常、 $\times 100$ を示す。

【図 4 1 A】図 4 1 A は、共焦点ラマン視鏡技術を使用した「正常」の線のある円柱上皮（CLE）、（ii）「低リスク」腸上皮化生（IM）（iii）の「ハイリスク」高度異形成（HGD）に属する見込みの事後確率の二次元三元プロットを示す。

【図 4 1 B】図 4 1 B は、「正常」CLE、（ii）「低リスク」IM、（iii）「高リスク」HGD の二分区別の受信者動作特性（ROC）曲線を示す。ROC 曲線下面積（AUC）は、それぞれ 0.88、0.84 及び 0.90 である。

【発明を実施するための形態】

【0037】

#### 好ましい実施形態の詳細な説明

ここで提供するものは、内視鏡検査で様々な器官（例えば、胃腸管（胃、食道、結腸）、膀胱、肺、口腔、咽頭、喉頭、子宮頸部、肝臓、皮膚、等）における腫瘍性病変のリアルタイム検出を実現する生物医学的分析（すなわち、反射率、蛍光及びラマン分光法）のためのオンラインシステム及び方法である。この診断方法は、総合的なスペクトルデータベース（すなわち、様々な器官のラマン、蛍光、反射率）に基づく多クラス診断を含めて、励起源同期、積分時間調整、データ収集、前処理、異常値分析及び確率変量診断（すなわち、部分最小二乗 - 判別分析（PLS - DA）、主成分分析（PCA） - 線形判別分析（LDA）、蟻コロニー最適化（ACO） - LDA、分類及び回帰ツリー（CART）、サポートベクターマシン（SVM）、適合ブースティング（AdaBoost）などを統合する。

【0038】

一実施形態では、開示されるシステム及び方法は、オンライン診断フレームワークを、内視鏡検査での上部消化管における前癌及び癌の早期診断及び検出のために近年開発されたマルチモーダル画像誘導（WLR / NBI / AFI）ラマン分光プラットフォームと統合する。組織のラマンスペクトル及び 0.5 秒の所定の上限値を有する積分時間の自動ス

10

20

30

40

50

ケーリングの蓄積により、SNRが改善した生体内組織スペクトルの瞬時取得が可能になると共に、CCDの信号飽和を防止することが可能になる。これは、自家蛍光強度が、おそらく組織内の個別の内因性蛍光団に起因する様々な解剖学的領域（例えば、胃における前庭部及び主要部、肺内気管支）間で大きく変動する場合には、内視鏡診断のために特に重要である。

#### 【0039】

ここで、図面を特に詳細に参照すると、示されている特定事項は、例示であり、かつ、好ましい実施形態の例示的な議論を目的とするものであり、そして最も有用であり、かつ、開示されたシステム及び方法の原理及び概念的態様の説明を容易に理解されると考えられるものを提供するために提示されていることを強調する。この点で、試みは、開示されたシステムの詳細及び方法の構造的な詳細を、開示されるシステム及び方法の基本的理解に必要である以上に詳細に示す試みは行っておらず、図面について行う説明は、開示されるシステム及び方法のいくつかの形態を実際に具体化することができる方法を当業者に明らかにするものである。

10

#### 【0040】

開示されるシステム及び方法の少なくとも1つの実施形態を詳細に説明する前に、本開示は、その適用の際に、次の説明に示された又は図面に示された構成要素の構成及び配置の詳細には限定されないことを理解すべきである。開示されるシステム及び方法は、他の実施形態に適用でき、又は様々な方法で実行若しくは実施されるものである。また、ここで使用する表現法及び用語法は、説明を目的とするものであり、限定とみなすべきではないことを理解されたい。

20

#### 【0041】

ここで図1を参照すると、一実施形態に係る内視鏡システムを備える診断用器具が10で示されている。内視鏡自体は11で示されており、内視鏡11の作業用ヘッドが図1aに一般的に示されている。試験される領域のガイダンス及び視覚的視野を提供するために、内視鏡11は、好適なビデオシステムを備える。キセノン光源からの光は、内視鏡12の端部にある照明窓15に伝達される。CCD16及び17は、白色光反射イメージング、狭帯域イメージング又は自己蛍光イメージングに応答して、反射光を受光し、そして映像データを送信して、試験組織の目視検査及び内視鏡の所望の位置への案内を可能にする。共焦点ラマンプローブヘッドを18で示しており、さらに詳しくは図1bに示している。

30

#### 【0042】

ラマン分光システムは、20で一般的に示されている。単色レーザー光源は21で示されており、本例では、約785nmでの出力波長を有するダイオードレーザーはである。レーザーダイオード21からの光は、近位帯域通過フィルタ22を通過し、±2.5nmの半値全幅を有する785nmの中心の狭帯域通過フィルタを含む。この光はカップリング23を通過してファイババンドルの一部として与えられる励起光ファイバ25に通る。励起ファイバ25は、200µmの直径及び0.22の開口数（「NA」）を有する。この励起ファイバ25を透過した光は、内視鏡11の端部にボールレンズ26に入射し、本例では約1.0mmの直径及び屈折率 $n = 1.77$ を有するサファイアボールレンズを含む。図1bに示すように、励起光ファイバ25からの透過光は、ボールレンズ26内において内部で反射される。ボールレンズが試験を受ける組織と接触している場合には、ここでは27で示されているように、励起ファイバ25からの透過光は、少なくとも部分的に、~140µmの深さまで組織27内でラマン散乱を受ける。散乱光は、再びボールレンズ26内部で反射され、繊維束の一部として与えられる複数の集光ファイバ28内で受信される。本例では26本の100µm集光ファイバを0.22のNAで使用する。集光ファイバ28は、任意の好適な構成、例えば励起ファイバ25を囲む円形の配置で配置できる。

40

#### 【0043】

集光ファイバ28により戻った収集散乱光は、ロングパスインライン捕集フィルタ2

50

9を通過し、これも同様に～800nmのカットオフを有する。サファイアボールレンズ26、励起及び集光ファイバー25、28、帯域通過フィルタ22、ロングパスフィルタ29の構成は、組織27から後方散乱ラマンファントムを選択的に収集するための良好なシステムを与える。

#### 【0044】

その後、戻った散乱光は分光器30で分離され、得られたスペクトルが光検出器アレイ34、本例では電荷結合素子(「CCD」)で画像化される。35で示されたコンピュータは、システム、プロセスの操作を制御し、そしてスペクトル及び制御データを記憶し、結果及びデータをユーザに対して提供する。

#### 【0045】

一実施形態では、コンピュータ35は、チップセットに接続された少なくとも1個のプロセッサを備える。また、チップセットに接続されるのは、メモリ、記憶装置、キーボード、グラフィックスアダプタ、ポインティングデバイス、音声素子及びネットワークアダプタである。グラフィックスアダプタにはディスプレイが接続されている。一実施形態では、チップセットの機能は、メモリコントローラハブ及びI/Oコントローラハブによって与えられる。別の実施形態では、メモリは、チップセットの代わりにプロセッサに直接接続されている。

#### 【0046】

記憶装置は、ハードディスクドライブ、コンパクトディスク読み出し専用メモリ(CD-ROM)、DVD、又はソリッドステート記憶装置のように、データを保持することができる任意の装置である。メモリは、プロセッサによって使用される命令及びデータを保持する。ポインティングデバイスは、マウス、トラックボール又は他のタイプのポインティングデバイスとすることができ、かつ、コンピュータシステムにデータを入力するためのキーボードと組み合わせて使用される。グラフィックスアダプタは、ディスプレイ上の画像及び他の情報を表示する。ネットワークアダプタは、コンピュータシステムをローカル又はワイドエリアネットワークに接続させる。

#### 【0047】

当該技術分野において知られているように、コンピュータ35は、前記のものとは異なる及び/又は他の構成要素を有することができる。さらに、コンピュータは所定の構成要素を欠くことができる。さらに、記憶装置は、ローカル及び/又はコンピュータからリモートであることができる(例えばストレージエリアネットワーク(SAN)内で具現化される)。

#### 【0048】

当該技術分野において知られているように、コンピュータは、ここで説明する機能を与えるためのコンピュータプログラムモジュールを実行するように構成されている。本明細書で使用するとき、用語「モジュール」とは、指定された機能を与えるために利用されるコンピュータプログラムロジックをいう。したがって、モジュールは、ハードウェア、ファームウェア及び/又はソフトウェアで実行できる。一実施形態では、プログラムモジュールは、記憶装置に記憶され、メモリにロードされ、そしてプロセッサによって実行される。

#### 【0049】

ここで説明する実体の実施形態は、他の及び/又はここで説明するものとは異なるモジュールを備えることができる。また、モジュールに起因する機能は、他の実施形態では他の又は異なるモジュールによって実行できる。さらに、この説明は、明瞭さ及び便利さの目的のために、用語「モジュール」を省略する場合がある。

#### 【0050】

また、コンピュータ35は、スペクトルデータを前処理することを実行する。測定された組織ラマンスペクトルが組織の自己蛍光バックグラウンドにより実質的に不明瞭になるときに、生体内組織ラマンスペクトルの前処理は、弱いラマン信号を抽出するために必要である。生体内組織から測定された生のラマンスペクトルは、弱いラマン信号と、強い自

10

20

30

40

50

己蛍光バックグラウンドと、ノイズとの組合せを表す。スペクトルは、まず積分時間及びレーザーパワーに正規化される。続いて、スペクトルを、一次サビツキー・ゴーレイ平滑化フィルタ（3画素のウィンドウ幅）を使用して平滑化してノイズを低減する。五次多項式は、自己蛍光バックグラウンドをノイズ平滑化スペクトルに適合させるのに最適であることが分かり、またこの多項式をその後生のスペクトルから減じて組織ラマンスペクトルを単独で生じさせる。また、コンピュータ35は、前癌及び癌検出のための診断アルゴリズムを有することもできる。

【0051】

#### 分光器及びファイバー光学プローブの較正

これは、異なる分光計は、異なる伝達関数を有すること、すなわち、同じ光源を使用して照らした場合であっても、スペクトル内において異なる強度変化を示すことが知られている。図2に示されているように、基準光源からのスペクトルが示されている。この例では、基準光源は、レーザー光源21などのレーザーによって励起される場合に既知の蛍光スペクトルを発する蛍光基準ターゲットである。蛍光基準ターゲットは、一貫しておりかつ安定であり、しかも帯域通過フィルタ（例えば、785nm）下で幅広い蛍光スペクトルを放射しなければならない。蛍光スペクトルは、経時的に安定でなければならず、かつ、問題の全スペクトル領域にわたって分光透過特性を効率的に特徴付けなければならない（例えば、 $400 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$ 、 $2000 \sim 3800 \text{ cm}^{-1}$ ）。例は、クロムがドーブされたガラスである。得られた2個の分光器からのスペクトルが示されているが、これらは明らかに異なる。分光応答又は伝達関数を償うために、分光計から受信したスペクトルを修正することになる較正機能を適用することが知られている。例及び較正機能を図2に示しており、この図は、分光計の対応するスペクトルに適用された場合、スペクトルを公知の基準スペクトルに一致させる。

【0052】

蛍光基準光源を使用して、伝達関数、すなわち、分光器の波長依存応答を次式により与えることができ：

【数1】

$$F(\lambda) = \frac{S(\lambda)}{T(\lambda)}$$

（式1）式中、 $F(\lambda)$  は正確な蛍光標準スペクトルであり、 $S(\lambda)$  は蛍光基準光源の測定スペクトルであり、 $T(\lambda)$  は分光計の伝達関数である。したがって、 $T(\lambda)$  が知られているときに、新たなサンプル  $R(\lambda)$  の正確に較正されたラマンスペクトルを次式により算出できる：

【数2】

$$R(\lambda) = \frac{S(\lambda)}{T(\lambda)}$$

（式2）式中、 $S(\lambda)$  は測定サンプルスペクトルである。

【0053】

伝達関数  $T(\lambda)$  は、分光器伝達関数  $T_s(\lambda)$  とプローブ伝達関数  $T_p(\lambda)$  の関数で

10

20

30

40

50

ある。したがって、式(2)を次のように書くことができる：

【数3】

$$R(\lambda) = \frac{S(\lambda)}{T_S(\lambda)T_P(\lambda)}$$

(式3)。光ファイバプローブは交換可能であり、しかも消耗品とすることができるため、新たなプローブ伝達関数 $T_P$ を有する新たなプローブが挿入されると、システム全体の伝達関数が変化することは明らかであろう。

10

【0054】

ここで図3を参照すると、一次又はマスター分光器が50で示されており、二次又はスレーブ分析計が51で示されている。分光器50、51は、それぞれ、図1に示したものと同様の構成を有するが、異なるファイバプローブ及び分光器特性を有することができる。理想的には、各分光器を制御するパーソナルコンピュータ35は、プログラムの共通のライブラリを使用してシステム及びデータ処理の制御を与えるため、また、一次及び二次分光器50、51の特性が整合していることが望ましい。この例では、一次分光器50は、一次又はマスタープローブ52に関連付けられており、二次分光器51は、53a、53a、53bで示された複数の二次又はスレーブプローブと関連づけられている。それぞれの場合において、較正は、54で図式に示した基準蛍光源を用いて実行される。

20

【0055】

較正の第1方法が図4aに示されている。ステップ60では、二次分光器は、一次分光器に従って波長較正される。この場合、二次分光器51の波長軸較正を、例えばアルゴン水銀スペクトルランプ又は規定スペクトル線を有する化学的試料を使用して実行し、その後線形補間を用いた画素解像度マッチングを実行して第2分光器の軸のサイズが一次分光器のサイズと一致することを確認する。この較正の結果を図5に示しており、ここでは、一次及び二次分光計50、51からのスペクトルは正確に整列されたランプからのスペクトル線を示す。ステップ61で、較正を、蛍光源54を使用して第2分光器及びプローブ53aについて実行する。図2のグラフと同様に、スペクトルを蛍光源から記録し、その後伝達関数を算出して測定されたスペクトルを既知のスペクトルラインに一致させ、そしてパーソナルコンピュータ35などによって保存できる。その後、ステップ62で、分光器51を生体内ラマン試験又は別の方法のために使用することができ、そして測定されたラマンスペクトルを、ステップ61で記録された較正関数を用いて補正することができる。

30

【0056】

プローブ53aを廃棄し、しかも新たな被験体で試験を実施することが望まれる場合には、代替プローブ53bを代わりに使用することができ、その場合には、図4aの方法を繰り返す。

【0057】

図4b及び4cに示されるように別の方法では、複数の較正機能を、まず二次分光器及び複数の二次プローブについて記録することができる。図4bのステップ60では、図4aのように、二次分光器51を、プライマリ分光器60との整合のために較正する。ステップ61では、二次プローブ53aについての較正機能を測定し、ステップ63において、この較正機能を保存し、そして何らかの方法、例えば二次プローブ53aに相当する参照番号でタグ付けされたコンピュータファイル56aとして較正機能を保存することによってプローブ53aに関連付けられる。矢印64で示すように、その後、このプロセスを任意の数のプローブ53b...、53nについて繰り返してプローブのストック又は予備を与える。図4cに示すように、分光器51を用いて試験を実施することが望まれる場合には、ステップ60で分光器を上記のように一次分光器50に従って較正する。ステッ

40

50

ブ 6 5 で、プローブ 5 3 n をシステムにインストールし、対応する格納伝達関数 5 6 n を取り出す。ステップ 6 6 で、二次分光器 5 1 を使用した試験を実施し、そして取り出した校正関数 5 6 n を使用して校正することができる。

【 0 0 5 8 】

別のアプローチを、図 6 を参照して示しており、該図では、スレーブ又は二次プローブ 5 3 a . . . 、 5 3 n を、一次又はマスター 5 0 で校正する。式 2 によれば、一次分光器を伝達関数  $T_{PP}(\quad)$  を有する一次又はマスタープローブ及び伝達関数  $T_{SP}(\quad)$  を有する二次又はスレーブプローブで試験する場合、蛍光源  $F(\quad)$  からのスペクトルは、一次プローブのためのスペクトル  $S_{PP}(\quad)$

【数 4】

10

$$F(\lambda) = \frac{S_{PP}(\lambda)}{T_S(\lambda)T_{PP}(\lambda)}$$

(式 4) 及び二次プローブを使用してスペクトル  $S_{SP}(\quad)$  :

【数 5】

20

$$F(\lambda) = \frac{S_{SP}(\lambda)}{T_S(\lambda)T_{SP}(\lambda)}$$

(式 5) をもたらす。式 4 及び 5 は、プローブ校正機能  $T_{CF}$  により 2 つのプローブ転送値を関連付けるために分割できる :

【数 6】

$$T_{CF} = \frac{T_{SP}(\lambda)}{T_{PP}(\lambda)} = \frac{S_{SP}(\lambda)}{S_{PP}(\lambda)}$$

30

(式 6) 。したがって、式 2 及び 6 から、二次分光器を二次プローブと共に使用する場合には、測定スペクトル  $S(\quad)$  及びラマンスペクトル  $R(\quad)$  は、次式によって関連付けられる :

【数 7】

$$R(\lambda) = \frac{S(\lambda)}{T_S(\lambda)T_{SP}(\lambda)} = \frac{S(\lambda)}{T(\lambda)T_{CF}}$$

40

(式 7) 。式中、 $T(\quad) = T_S(\quad) T_{PP}(\quad)$  は、マスタープローブを用いた二次分光器について測定された格納システム伝達関数である。

【 0 0 5 9 】

図 6 ~ 7 c に示すように、これは、任意の数の二次又はスレーブのプローブ 5 3 a、5 3 b、5 3 n を任意の数の二次分光器 5 1 a、5 1 b、5 1 n に一致させることを可能にする。図 7 a に示すように、第 1 ステップ 7 0 で、二次分光器 5 1 a は、マスタープローブ 5 2 を使用して、ステップ 6 0 に類似の方法で一次分光器 5 0 に従って校正される。シ

50

システム伝達関数 7 1 a は、図 3 ~ 4 c の方法と同様の態様で蛍光標準光源 5 4 に対して二次分光器を試験することによりステップ 7 2 で見出される。システム伝達関数 7 1 a は、ステップ 7 3 において任意の適切な方法、例えば、制御ソフトウェア又はその他のもので対応する分光器 5 1 a に関連付けられる。矢印 7 4 によって示されるように、これを任意の数の二次分光器システム 5 1 b、. . . 5 1 n について繰り返して、適切なシステムの伝達関数 7 1 b、. . . 7 1 n を生成することができる。

【 0 0 6 0 】

図 7 b に示すように、二次又はスレーブのプロープ 5 3 a、5 3 b . . .、5 3 n をマスタープロープ 5 2 に対して較正する。ステップ 7 5 では、一次分光計システム 5 0 は、蛍光源 5 4 に対してマスタープロープで好適に較正されるが、このステップが既に実行され、しかもマスタープロープに関連付けられた伝達関数が既に記憶されている場合にはこれを省略してもよい。ステップ 7 6 では、マスタープロープをプロープ 5 3 a で置き換え、その後一次分光器システムと対応するスレーブプロープとの組み合わせを、蛍光標準 5 4 に対して試験する。ステップ 7 7 では、較正機能  $T_{CF}$  を一次プロープスペクトルと二次プロープスペクトルとの比から計算し、そして 7 8 でこれを記録し、そして 7 9 a で示されるように二次プロープに関連付けて記憶させる。矢印 8 0 によって示されるように、これを、任意の数の二次プロープ 5 3 b、. . . 5 3 n について繰り返し、そして対応する較正関数  $T_{CF}$  を 7 9 b、. . . 7 9 b で示されるように記憶できる。

10

【 0 0 6 1 】

図 7 c に示すように、マスタープロープ 5 2 を使用したシステム伝達関数 7 1 a が知られており、しかも二次プロープ 5 3 n をマスタープロープ 5 2 に関連付ける較正機能  $T_{CF}$  が知られているため、二次分光器システム 5 1 n の一つは、二次プロープ 5 3 n のいずれかと共に使用することができる。ステップ 8 1 で示すように、二次分光器システム 5 1 n は、一次分光器システム 5 0 に従って較正される。ステップ 8 2 で、二次プロープ較正機能  $T_{CF}$  が取得され、そして記憶されたシステム伝達関数 7 1 n は、記憶された較正関数  $T_{CF}$  に応じて変更される。その後、ステップ 8 3 で、生体内ラマン試験又は他の試験を実行することができ、そして捕捉されたラマンスペクトルを補正することができる。

20

【 0 0 6 2 】

したがって、これらの方法のいずれかにおいて、二次分光器特性を一次分光器特性に戻して一致させ、そして分光器とプロープとの組み合わせについての伝達関数又は二次プロープと共に使用するためにマスタープロープ及び較正機能を組み込んだシステムの伝達関数のいずれかを記憶させることによって、様々な分光器とプロープとの組み合わせを使用して取得されたスペクトルは、それにもかかわらず一貫しておりかつ比較可能となる。

30

【 0 0 6 3 】

これは、図 8 及び図 9 a ~ 9 c から明らかである。図 8 は、マスタープロープ 5 2 と二次又はスレーブプロープ 5 3 n との間で異なる応答を示す。強度応答はスペクトルにわたって変化し、示されたような較正機能は、二次プロープのスペクトルをメイン又はマスタープロープのスペクトルに対してマップするであろう。一次分光器 5 0 及び二次分光器 5 1 からの未較正組織スペクトルを図 9 a に示しており、それらの間の相違は明らかである。図 9 b 及び 9 c は、上記の方法のそれぞれを用いた較正の結果を示しており、一次及び二次分光器からのスペクトルはほぼ一致している。

40

【 0 0 6 4 】

ラマンスペクトルを、2つの異なるプロープ ( $n = 902$  スペクトル) で胃から測定した。主成分分析 (PCA) を、二次プロープの較正前後に実施した。図 10 は、光ファイバプロープのみならず、様々なスコアでの 95% 信頼区間の較正前後の PCA 分析を示す。ファイバプロープの較正後に、スペクトルは、同じ信頼区間内に入ることは明らかであるが、これはマスター光ファイバラマンプロープとスレーブ光ファイバラマンプロープと間で転送が成功したことを示す。

【 0 0 6 5 】

レーザーパワーの監視

50

図 1 1 は、ファイバプロブからのバックグラウンドスペクトルを示す、すなわち、組織信号の非存在下でのグラフである。ファイバーのシリカ内におけるラマン散乱又は蛍光に相当するピーク及び遠位ボールレンズのサファイアに相当するピークが明らかである。図 1 2 は、様々なレベルの伝達出力光と共に生体内組織でから受け取ったラマンスペクトルのグラフを示す。図 1 1 のピークは、図 1 2 の様々なラインで明らかであるが、ピーク及び連続バックグラウンドの相対的な高さは、伝達出力光と共に変化することは明らかであろう。

#### 【 0 0 6 6 】

有利には、取得されたラマンスペクトルにおけるファイバプロブ及びサファイアボールレンズの分光特性は、光学縦列内の任意の追加成分の供給を必要とすることなく、透過したレーザパワーを導出するための内部基準として使用できることが分かった。図 1 3 A の方法に示されているように、ステップ 9 0 で、好適に多数のスペクトル（本例では 3 5 2）を収集し、そして透過レーザパワーを測定する。ステップ 9 1 で、好適な多変量統計解析、本例では部分最小二乗法（「 P L S 」）回帰を実行する。 P L S 回帰は、スペクトルデータの値を多数の潜在変数（「 L V 」）にまで減少させる。この場合には、スペクトル変化と従属変数との間の差異、レーザパワーが最大化され、その結果、潜在変数は、レーザパワーとよく相関するスペクトルピークにさらに高いウェイトを与える。潜在変数の適切な数を選択することにより、分光特性の関数としてのレーザパワーのモデルを導出することができ、かつ、ステップ 9 2 で示されるように記憶される。したがって、ステップ 9 3 で、図 1 3 b に示すような動作の際に、試験スペクトルは、例えば生体内被験体又はその他のものから取得され、そしてステップ 9 4 において、これらのスペクトル値を格納されたモデルに提供する。ステップ 9 5 では、レーザパワーを導出し、そして例えばパーソナルコンピュータ 3 5 でオペレータに表示する。

#### 【 0 0 6 7 】

本例では、自乗平均平方根誤差に対して含まれる潜在変数の数のグラフを図 1 4 a に示しており、4 つの変数は、誤差と複雑さとの間の最良のバランスを与えるように選択される。4 つの潜在変数及び回帰ベクトルの相対的な負荷を図 1 4 b に示す。図 1 5 では、5 人の被験者における 1 6 6 スペクトルの実時間測定値からの例示データが示されており、測定されたレーザパワーをモデルによって推定されたパワーに対してプロットしている。実質的に線形の近似は、推定パワーが実際に供給されるパワーの良好な指標であることを示していることは明らかであろう。

#### 【 0 0 6 8 】

##### 反復背バックグラウンド除去

蛍光、プロブのシリカ及びレンズのサファイアにおけるラマン散乱から得られるバックグラウンドラマンスペクトルを減じる方法は、図 1 6 ~ 1 8 を参照して示されている。このバックグラウンド信号は、各特定のファイバプロブに固有のものである。バックグラウンドを過剰又は過小除去することなく、組織ラマンスペクトルからバックグラウンドを除去することが望ましい。

#### 【 0 0 6 9 】

図 1 6 におけるステップ 1 1 0 に示すように、バックグラウンドスペクトルを取得し、そして例えばターゲットの非存在下でプロブを介してレーザ光源からの光を透過させることにより格納した。ステップ 1 1 1 において、試験対象からのラマンスペクトルを、例えば組織から受け取る。ステップ 1 1 2 において、被験者ラマンスペクトルにおけるファイババックグラウンドシグナルの量を、1 以上の別個の基準ピークの強度を用いて推定する。本例では、これらのピークは、シリカ及び / 又はサファイアによるものである場合がある（例えば、 $417$  又は  $490\text{ cm}^{-1}$ ）。バックグラウンド信号の推定量を使用して、格納されたバックグラウンドシグナルを、好適なおそらくは波長依存の補正係数で掛け、かつ、試験スペクトルから減じることができる（ステップ 1 1 3）。

#### 【 0 0 7 0 】

ステップ 1 1 4 で、スペクトルについて、残りのバックグラウンドの有無をチェックす

10

20

30

40

50

る。バックグラウンドが完全に除去されている場合（シリカ及びサファイア信号が組織ラマンスペクトルに対して無視できる程度に寄与する場合）に、スペクトルを、ステップ 115 に示すように出力又はさらなる分析のために合格させる。バックグラウンド信号がまだ存在する場合には、矢印 116 で示すように 112 ~ 114 を繰り返す。

#### 【0071】

この方法は、単一のシリカ/サファイアピークに限定される必要はない。また、多変量解析（例えば、部分最小二乗及び曲線解決法など）も、この目的のために使用できる。

#### 【0072】

一例として、図 17 は、掌組織から受信したラマンスペクトル及びプローブからのバックグラウンドスペクトルを示すグラフである。蛍光、プローブのシリカ及びレンズのサファイアでのラマン散乱からのピークは明らかであり、掌からのラマンスペクトルに重ねられる。このバックグラウンド信号は、それぞれ特定のファイバープローブに固有のものである。

10

#### 【0073】

図 18 に示すように、図 16 の反復プロセスを実行した後に、滑らかなラマンスペクトルがバックグラウンド信号の特徴的なピークなしに示すが、必要なラマン分光情報は保持する。

#### 【0074】

#### 複合システム

様々な開示された方法を併用してもよい。このような組み合わせの一実施形態を図 19 に示す。ステップ 100 で、較正方法を、システム伝達関数をマスター又は一次システム 50 に従って知り、その後のスペクトルを適切に補正することができるように実行することができる。ステップ 101 で、信号の前処理を、平滑及び組織バックグラウンド除去を含めて実行することができる。ステップ 103 では、パワー監視を上記のようにスペクトルについて実行することができ、並行して、ステップ 102 で、プローブのバックグラウンド除去を行うことができる。ステップ 104 で示すように、ステップ 102 及び 103 の情報をパーソナルコンピュータ 35 上の好適なプログラムに提供して他の診断又は出力ステップを実行する。

20

#### 【0075】

開示された較正方法を診断方法と組み合わせる際には、機器には依存しない光ファイバーラマン分光法が定量的な組織分析及び特徴付けのために可能である。これは、異なる機器によって撮影されたスペクトルのみならず、同じ機器で、ただし異なるプローブで撮影されたスペクトルの比較を可能にする。これは、異なる機械又は異なるプローブで撮影されたスペクトルが比較のために使用することを可能にするという点で、診断のために重要である。これは、診断の精度を高めるために重要である。

30

#### 【0076】

#### リアルタイム癌診断

オンライン生物医学分光法（すなわち、反射率、蛍光及びラマン分光法）システム及び方法は、臨床内視鏡検査でのリアルタイム癌診断を実現し、かつ、予測される病理に関する確率的診断アルゴリズムの結果の聴覚フィードバック並びにグラフィカルディスプレイを使用して臨床医とインタフェースで接続することができる。例として胃のラマン内視鏡検査を挙げる（図 22A）；この方法は、いくつかの病理を予測することができる：正常、腸上皮化生、異形成及び新形成。このオンライン診断方法は、臨床医に、生検ガイダンス又は腫瘍根絶などの意思決定のために使用できる組織病理学の情報をリアルタイムで提供する。このシステムは、GUIを含めて、迅速なデータ処理のために最適化され、例えば臨床内視鏡検査のためのリアルタイム診断（< 0.1 秒）が可能になる。

40

#### 【0077】

解剖間及び臓器間スペクトル差異に対処するために、オンラインのフレームワークは、臓器に特異的な診断モデルを実現し、かつ、様々な器官（例えば、食道、胃、大腸、子宮頸部、膀胱、肺、鼻咽頭、喉頭、及び口腔（硬口蓋、軟口蓋、頬、内唇、腹部及び舌））

50

のスペクトルデータベース間で切り替わる。したがって、開示ラマンプラットフォームは、内視鏡検査での癌の診断のための普遍的な診断ツールである。

【0078】

図20は、一実施形態に係るリアルタイムの癌診断のためのスペクトル取得及び処理フローについての診断システム115のアーキテクチャ図である。診断システム115は、パーソナルコンピュータ35上に実装できる。診断システム115は、スペクトル取得モジュール120、スペクトル前処理モジュール125、異常値分析モジュール130、多変量解析モジュール135、病理モジュール140及びデータベース142を備える。簡潔にするために、1個のみのスペクトル取得モジュール120、スペクトル前処理モジュール125、異常値分析モジュール130、多変量解析モジュール135、病理モジュール140及びデータベース142が示されているが、実際にはそれぞれの多くが実行中であることができる。

10

【0079】

図20~22参照すると、ステップ145において、スペクトル取得モジュール120は、CCDにより帯域通過フィルタ源を電子的に同期させ、そしてさらなる処理のためにデータベース142内のCCDからのビニング読み出しを格納する。スペクトル取得モジュールは、前の組織測定に基づいて総光子数の~85%以内にスケールリングすることによりスペクトルの露光時間及び蓄積をさらに自動的に調節する一方、0.5秒の上限を設定して臨床的に許容可能な条件を実現する。複数のスペクトルの蓄積及び露光時間の自動調整は、信号飽和を防止し、かつ、内視鏡の用途のために高い信号対ノイズ比を得るために迅速かつ簡単な方法を提供する。スペクトル信号が飽和した場合には、本方法は、飽和を防ぐために短縮された積分時間を使用して新たなデータ収集を開始する。スペクトルの取得後、この方法は、宇宙線を識別し排除する(例えば、スペクトルの一次導関数を、最大閾値として設定された全スペクトル範囲にわたって95%の信頼区間(CI)と共に使用して)。同定された宇宙線は、線形補間により除去される。短いスペクトル取得時間枠は、内視鏡用途に特に便利である。図22Aで示されたGUIは、スペクトル取得を180で示す。

20

【0080】

他の用途のために、スペクトル取得フレームワークを外部又は内部の外科的介入のために使用することができ、或いは手術中に組織型を評価するために使用することができるであろう。リアルタイム特性は、現場での診断を可能にするため、腫瘍切除のための切除余白を手引きするために使用できる。診断情報をオンラインで(すなわち、<0.5秒)与えて医療の意思決定を支援することができることが重要である。皮膚の測定について、測定時間に対する要求はそれほど厳しくない。というのは、皮膚のスペクトルは、より制御可能な実験設定下で、より長い露光時間の可能性でもって取得されるためである。また、オンラインソフトウェアアーキテクチャは、蛍光、反射分光法を含めた高速スペクトル測定を必要とする他の分野又は中断のないリアルタイムスクリーニングが必要とされるプロセス分析技術、食品科学、科学捜査などの様々な分野でも適用できる。ステップ150において、スペクトル取得モジュール120は信号が飽和しているかどうかを決定する。もしそうなら、このものは、飽和を防ぐために短縮された積分時間を使用して新たなデータ収集を開始する。ステップ155において、スペクトル取得モジュール120は宇宙線を識別し排除する(すなわち、スペクトルの一次導関数を、最大閾値として設定された全スペクトル範囲にわたって95%の信頼区間(CI)と共に使用して)。一実施形態では、識別された宇宙線を線形補間により除去する。宇宙線は、多変量解析、平滑化、平均フィルタリング、メディアンフィルタリング、フーリエ変換、ウェーブレットなどを含めた他の方法によって除去できる。

30

40

【0081】

ステップ160において、スペクトル前処理モジュール125は、取得したスペクトルを積分時間及びレーザパワーでスケールリングする。一次サビツキー・ゴレイ平滑化フィルタをさらに使用して強度補正スペクトルにおけるノイズを除去する。次いで、平滑化ス

50

ペクトルの下限に制限された5次修正多項式を差し引いて組織ラマンスペクトルを単独で分解するために差し引かれる。ラマンスペクトルを $800 \sim 1800 \text{ m}^{-1}$ の曲線下積分面積に最終的に正規化してスペクトルのライン形状及び相対強度を分解し、臨床内視鏡検査時におけるプローブ処理のばらつきを低減する。GUI(図22A)は、185で正規化スペクトルを示す。いくつかの実施形態では、スペクトル前処理モジュール125は、多重散乱補正(MSC)、FIRフィルタリング、加重ベースラインサブトラクション、ノイズリダクション、平均センタリング、微分(これらに限定されない)を含めて、前処理のための追加の方法を利用する。

#### 【0082】

ステップ165において、異常値分析モジュール130は、ホテリングの $T^2$ 及びQ-残余統計と接続された主成分分析(PCA)を使用して異常値スペクトルを検出する。GUI(図22A)は、190で異常値分析を示す。異常値検出の実装は、ホテリングの $T^2$ 及びQ-残余統計と接続された主成分分析(PCA)を使用するオンラインフレームワークにおける高レベルのモデル固有フィードバックツールとして機能する。ホテリングの $T^2$ 及びQ-残余は、モデル適合内外の情報を提供する二つの独立したパラメータである。スペクトル品質の指標としてのこれらのパラメータ(すなわち、プローブ接触モード、交絡因子、白色光干渉など)を使用して、聴覚フィードバックをオンラインラマン診断システムに統合し、臨床医に対するリアルタイム分光スクリーニング及びプローブの取り扱いのアドバイスを容易にする。ソフトウェアシステムは、異なる診断の結果に対して異なるサウンドフィードバックを提供する。例えば、スペクトルが異常値である場合には、所定の音が出る。スペクトルが診断的に「正常」に分類される場合には、第2の別個の音が出る。スペクトルが「前癌」又は「癌」に分類される場合には、第3又は第4の音が出る。音の周波数は、「事後確率」と比例することができるであろう。これは、非常に有用である。というのは、診断情報を受信しつつ内視鏡医にリアルタイムガイダンスを提供するからである。このようにして、内視鏡医は、ラマンプラットフォームモニターに注意を払う必要がなく、音のガイダンスによる内視鏡の操作手順に集中する。異常値解析モジュールが、取得したスペクトルが異常値であると判断した場合には、診断システム115がステップ145を開始する。

#### 【0083】

スペクトルがさらなる分析のために認証された場合には、これらを生体内癌診断のために確率モデルに供給する。ステップ170では、多変量解析モジュール135は、生体内癌診断のための確率モデルを適用する。多変量解析モジュール135は、多数の患者のスペクトルデータベースに基づいて、部分最小二乗判別分析(PLS-DA)、PCA-線形判別分析(LDA)、蟻コロニー最適化(ACO)-LDA、分類及び回帰ツリー(CART)、サポートベクターマシン(SVM)、適応的ブースティング(AdaBoost)などを含めた様々なプリレンダリングモデル間でスイッチする。

#### 【0084】

ステップ175では、病理モジュール140は、確率癌診断のための様々な器官のスペクトルのデータベース間で切り替えることができる器官固有診断モデルを実装する。オーディオフィードバックに加えて、GUI(図22A)は、臨床医に、195で病理モジュール140からのアウトプットを提供する。

#### 【0085】

図22Bは、第2実施形態に係るGUIを提供する。

#### 【0086】

データベース142は、取得したスペクトルを保存するのみならず、保存されたスペクトルは、診断のために使用される。

#### 【0087】

いくつかの実施形態では、複数のスペクトルを採取し分析する。例えば、5~15の間を取得する。それぞれを分析し、そして複数の閾値パーセンテージが同じ結果(正常対癌)を与える場合には、これが決定された診断である。例えば、10のスペクトルを取得す

る場合には、7以上が同じ回答を与えるが、これが診断である。5又は6のみが同じ回答を与える場合には、このプロセスを繰り返す。

【実施例】

【0088】

例

リアルタイム診断のために使用される統合ラマン分光及びトリモーダル広視野画像化システムは、USB6501デジタルI/O（米国テキサス州オースティンのナショナルインスツルメンツ）と電子的に同期されたスペクトル安定化785nmダイオードレーザー（最大出力：300mW、米国デラウェア州ニューアークのB&WTEK社）と、液体窒素で冷却されたNIR最適化裏面照射及びディープディプレッション型電荷結合素子（CCD）カメラ（ピクセル当たり20×20μmで1340400ピクセル；Spec-10：400BR/LN、米国ニュージャージー州トレントンのプリンストンインスツルメンツ）を備えた透過イメージングスペクトログラフ（Holospec f/1.8、米国ミシガン州アナーバーのKaiser Optical Systems）と、レーザー光デリバリ及び生体内組織ラマン信号収集の両方のために特別に設計されたラマン内視鏡プローブとを備える。

10

【0089】

1.8mmラマン内視鏡プローブは、組織ラマン信号の収集を最大にすると同時にレイリー散乱光、ファイバー蛍光及びシリカラマン信号の干渉を低減させるために、プローブの近位端及び遠位端に組み込まれた2段の光フィルタリングを有する中央光伝送ファイバーを取り囲む集光ファイバー32から構成される。ラマンプローブを医療用内視鏡の器具チャンネルに下方向に進めることができ、かつ、広視野内視鏡画像（WLR/AFI/NBI）モダリティの指導の下で、疑わしい組織部位に向けることができる。このシステムは、 $\sim 9\text{ cm}^{-1}$ のスペクトル分解能で、 $1.5\text{ W/cm}^2$ （200μmのスポットサイズ）の785nm励起パワーを使用して0.5秒以内に、生体内上部GI組織から800~1800 $\text{ cm}^{-1}$ の波数範囲のラマンスペクトルを取得する。

20

【0090】

ラマンシステムのハードウェア構成要素（例えば、レーザーパワー制御、分光計、CCDシャッター及びカメラ読み出し同期）を、異なる分光器/カメラ用のライブラリ（例えば、PVCAMライブラリ（プリンストン・インスツルメンツ、ローパーサイエンティフィック社、米国ニュージャージー州トレントン）及びオムニドライバー（オーシャンオプティクス社、米国フロリダ州ダニデン）など）を通じてMATLABソフトウェアにインターフェースで接続した。レーザーをCCDのシャッターと電子的に同期させた。レーザーパワー、露光時間及びスペクトルの蓄積の自動調整を、組織ラマン測定に基づいて総光子数の85%（例えば、65000の光子の55250）以内にスケールングすることによって実現させたのに対し、0.5秒の上限を設定して臨床的に許容可能な条件を実現することができる。複数のスペクトルの蓄積及び露光時間の自動調整は、CCDの飽和を防ぎ、かつ、内視鏡用途のための信号対雑音比（SNR）の高い信号を得るために迅速かつ簡単な方法を提供する。ラマンシフト軸（波長）を、水銀/アルゴン校正ランプ（オーシャンオプティクス社、米国フロリダ州ダニデン）を用いて校正した。システムの波長依存性のためのスペクトル応答補正を、標準ランプ（RS-10、EG&Gガンマサイエンティフィック、米国カリフォルニア州サンディエゴ）を用いて実施した。プラットフォームの再現性を、波数基準としてレーザー周波数並びにシクロヘキサン及びアセトアミノフェンのラマンスペクトルにより連続的に監視する。それに応じて、CCD温度、積分時間、レーザーパワー、CCDアライメントを含む全てのシステム性能基準を、SQLサーバーを介して中央データベースに記録する。

30

40

【0091】

ラマン信号のリアルタイム前処理は、一次導関数を、最大閾値として設定された全スペクトル範囲にわたって95%の信頼区間（CI）と共に使用して宇宙線の迅速な検出を実現した。閾値の外側にあるデータ点を2次に補間した。スペクトルを積分時間及びレーザ

50

パワーでさらにスケールした。一次 5 ポイントサビツキー・ゴーレイ平滑化フィルタを使用して強度補正スペクトルのノイズを除去すると共に、平滑化スペクトルの下限に制限される 5 次改変多項式を減算して組織ラマンスペクトルを単独で分解した。ラマンスペクトルを、 $800 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$ の曲線下積分面積に対して正規化し、異なる組織病理間でのスペクトル形状及び相対的ラマンバンド強度のより良好な比較を可能にした。その後、スペクトルを特定のデータベースに従ってローカルに平均中心としてデータ内の共通の変動を除去した。前処理後に、ラマンスペクトルをモデル固有の異常値分析に供給した。

#### 【0092】

異常値の検出スキームを、ホテリングの  $T^2$  及び  $Q$  - 残余統計と一緒にになった PCA を使用することによって、オンラインフレームワークにおける高レベルのモデル固有フィードバックツールとして生物医学分光法に組み込んだ。PCA は、ラマンスペクトルの大きさを、ラマンスペクトルを直交成分の線形結合に分解することにより減少させ（主成分（PC））、そして、データセット内のスペクトル変化を最大化させる。データ行列  $X$  の PCA モデルは次式により定義される：

#### 【数 8】

$$X = TP^T + E$$

ここで、 $T$  及び  $P$  はスコア及び負荷を表し、 $E$  は残差を含む。負荷は新たな回転軸に相当するのに対し、スコアはデータの投影値を表す。したがって、ホテリングの  $T^2$  統計は、PCA モデル（距離をモデル化するためのサンプル）によって取得される分散の尺度であり、かつ、次式によって定義される：

#### 【数 9】

$$T_{ik}^2 = t_{ik} (\lambda_k^{-1}) t_{ik}^T$$

ここで、 $T_{ik}$  は、成分  $k$  を使用した  $i^{\text{th}}$  サンプルスペクトルに対する PC スコアであり、 $\lambda_k^{-1}$  は、成分  $k$  の共分散行列の正規化された固有値の対角行列である。したがって、ホテリングの  $T^2$  は、PCA モデルに極値の指標を与える。一方、 $Q$  - 残余は、PCA モデル（モデル適合統計の欠如）によっては取得されない分散の尺度であり、かつ、次式によって定義される：

#### 【数 10】

$$Q_{ik} = \sum (x_i - t_{ik} P_k^T)^2$$

ここで、 $x_i$  はサンプルスペクトルであり、 $Q_{ik}$  は成分  $k$  を使用した  $i^{\text{th}}$  サンプルスペクトルに対する二乗再構成誤差の合計であり、 $P_k$  は PC 負荷である。ホテリング  $T^2$  及び  $Q$  - 残余の両方について、正規化された 99% の CI を、異常なラマンスペクトルを遮断するための上限閾値として利用した。したがって、ホテリングの  $T^2$  及び  $Q$  - 残余は、モデル適合についての定量的情報を提供する二つの独立したパラメータである。スペクトル品質（すなわち、プローブ接触モード、交絡因子、白色光干渉など）の指標としてこれらのパラメータを使用して、聴覚フィードバックをオンラインラマン診断システムに統合し、臨床内視鏡処置中に臨床医のためのリアルタイムプローブハンドリングアドバイス及び光スクリーニングを容易にする。

#### 【0093】

組織ラマンスペクトルの品質の検証に続いて、これらの検証されたラマンスペクトルをオンライン生体内診断及び病理予測のために確率モデルに直ちに送った。GUI は、臨床内視鏡的手順での潜在的な分類のために、部分最小二乗法 - 判別分析（PLS - DA）、PCA - 線形判別分析（LDA）、蟻コロニー最適化（ACO） - LDA、分類及び回帰ツリー（CART）、サポートベクターマシン（SVM）、適応的ブースティング（AdaBoost）などを含めた様々なモデル間で瞬時に切り替えることができる。一例として

、確率 PLS - DA を胃癌診断に使用した。PLS - DA は、PCA の基本的な原理を採用するが、スペクトルデータセット内での最も顕著な変動よりもむしろ診断関連の変動を得るために、スペクトル変化とグループ親和との間の共分散を最大化することによって成分をさらに交替させる。このシステムは、特定の組織病理を予測するためにバイナリ分類の one - against - all 及び one - against - one のマルチクラス (すなわち、良性、異形成及び癌) 確率 PLS - DA 判別分析をサポートする。

【0094】

#### 例 1

合計 2748 の生体内胃組織スペクトル (2465 正常及び 283 癌) を、胃癌の診断用の診断アルゴリズムを開発するためのスペクトルのデータベースを構築するために募集された 305 人の患者から取得した。組織病理は、生体内組織診断及びキャラクタリゼーションのためにラマン技術の性能を評価するためのゴールドスタンダードとして機能する。

【0095】

胃は、分光診断のために多くの交絡因子 (すなわち、胃液、食べ物のかす、出血、滲出液など) を提示する最も挑戦的な器官の 1 つを表す。アルゴリズムの開発のために 305 人の胃患者 (正常 (n = 2465) 及び癌 (n = 283)) から取得されたこの生体内平均ラマンスペクトルを図 23 に示す。胃組織のラマンスペクトルは、875  $\text{cm}^{-1}$  (ヒドロキシプロリンの (C - C))、936  $\text{cm}^{-1}$  (タンパク質の (C - C))、1004  $\text{cm}^{-1}$  (フェニルアラニンの s (CC) 環呼吸)、1078  $\text{cm}^{-1}$  (脂質の (C - C))、1265  $\text{cm}^{-1}$  (アミド I I I (CN) 及びタンパク質の (NH))、1302 及び 1335  $\text{cm}^{-1}$  (タンパク質及び脂質の (CH<sub>2</sub>) 変形)、1445  $\text{cm}^{-1}$  (タンパク質及び脂質の (CH<sub>2</sub>))、1618  $\text{cm}^{-1}$  (ポルフィリンの (C = C))、1652  $\text{cm}^{-1}$  (タンパク質のアミド I (C = O)) 及び 1745  $\text{cm}^{-1}$  (脂質の (C = O)) で顕著なラマンピークを示す。胃組織ラマンスペクトルは、胃壁における皮下脂肪のインタロゲーションを反映する可能性があるトリグリセリドからの大きな寄与を含む (すなわち、1078、1302、1445、1652 及び 1745  $\text{cm}^{-1}$  での主ピーク)。胃癌ラマンスペクトルは、前記ラマンスペクトル特性 (例えば、強度、スペクトル形状、帯域幅及びピーク位置) における著しい変化を明らかにするが、これは、我々の先行する生体内ラマン研究で再確認している。

【0096】

自動異常値の検出を、PCA をホテリングの T<sup>2</sup> 及び Q 残余統計 (99% CI) と共に使用して予測オンライン分析のために実現した。オンライン診断を効率的にするために、最大組織スペクトルの変化を含む二成分 PCA モデルを表現した。データセットにおける総変動 (n = 2748 ラマンスペクトル) の 38.71% (PC1 : 30.33%、PC2 : 8.38%) の最大分散を占めるこれらの選択された重要な PC (P < 0.0001) 及び対応する PC 負荷を図 24 に示す。

【0097】

図 25 は、癌スペクトルを正常から分離するために PC スコアの能力を例示する正常 (n = 2465) 及び癌組織スペクトル (n = 283) についてのスコア散布図を示す (すなわち、PC2 対 PC1)。それに応じて、ホテリングの T<sup>2</sup> 及び Q 残余の 99% CI を、トレーニングデータセットから計算し、そして見込まれるオンラインスペクトル検証のための閾値として固定した。次に、胃癌の予測のための確率 PLS - DA モデルを表現した。トレーニングデータベースを、学習 (80%) 及び試験 (20%) セットにランダムに複数回 (n = 10) 再サンプリングした。生成された PLS - DA モデルは、胃癌診断について、それぞれ、85.6% の予測精度 (95% CI : 82.9% ~ 88.2%)、(80.5% の感度 (95% CI : 71.4% ~ 89.6%) 及び 86.2% の特異性 (95% CI : 83.6% ~ 88.7%)) を与えた。その後、さらに 10 名の見込み胃患者において異常値検出並びに確率的 PLS - DA を試験した。また、見込み正常 (n = 45) 及び癌 (n = 30) 組織スペクトルについての PC のスコア散布図 (すなわち、PC

10

20

30

40

50

1 対 P C 2 ) も図 2 5 に示す。

【 0 0 9 8 】

図 2 6 は、見込み胃サンプル 1 0 から得られた 1 0 5 スペクトル ( 正常 4 5 、 3 0 癌、 3 0 異常値 ) についての 9 9 % C I の境界を有するホテリングの  $T^2$  ( 3 8 . 7 1 % ) 及び Q - 残余 ( 6 1 . 2 9 % ) の見込み散布図を示す。点線は、見込みラマンスペクトルが主成分分析 ( P C A ) モデルの一般的な組織変化の範囲内であるか否かを検証する 9 9 % 信頼区間 ( C I ) を表す。多数の非接触スペクトルは、 9 9 % C I の外側にあるため、組織診断に使われることなくリアルタイムで破棄されることが観察される。検証された組織のラマンスペクトルは、主に、  $T^2$  及び Q - 残余の 9 9 % C I の内部にあるが、これは、このオンラインデータ解析が生体組織スペクトルのリアルタイム検証の迅速かつ非常に効率的な手段を提供することを示す。

10

【 0 0 9 9 】

オンライン異常値分析により確認された、将来的に取得されるスペクトルを、本疾患を予測するために確率的 P L S - D A にさらに送り、病理組織学的検査によって確認されるように、胃癌の検出について 8 0 . 0 % ( 6 0 / 7 5 ) の診断精度を達成した ( 図 2 7 ) 。別々の点線は、生体内で正常胃組織から癌を分離するために 9 0 . 0 % の診断感度 ( 2 7 / 3 0 ) 及び 7 3 . 3 % ( 3 3 / 4 5 ) の特異性を与える。

【 0 1 0 0 】

受信者動作特性 ( R O C ) 曲線を群分離を評価するためにさらに作成した。図 2 8 は、将来予測のためのスペクトルデータベースの各ランダム分配から計算された R O C 曲線並びに将来データセット予測のために計算された R O C の平均を示す。遡及的及び将来的データセットについて作成された R O C 曲線下積分面積は、それぞれ 0 . 9 0 及び 0 . 9 2 であり、生体内での胃癌の診断のための P L S - D A アルゴリズムのロバスト性を示す。

20

【 0 1 0 1 】

組織病理学的予測に対する上記の全てのオンラインデータ収集のための合計処理時間は 0 . 1 3 秒であった。図 2 1 のフローチャートの各ステップの処理時間を表 1 に示す。 < 0 . 5 秒のフリーランニング光学診断及び処理時間を達成することができるが、これは、内視鏡検査でのリアルタイム生体内組織診断を実現するために重要である。

【 0 1 0 2 】

【表 1】

30

表 1. 64ビットI7クアッドコア4GBメモリを搭載したパーソナルコンピュータ35上でのオンライン生物医学ラマン分光フレームワークの平均処理時間

分析	計算時間(ミリ秒)
宇宙線排除	0.5
レーザー応答時間	10
前処理	40
異常値検出	10
確率的PLS-DA予測	70
総計算時間	100~130

40

【 0 1 0 3 】

例 2

ラマン分光システムは、スペクトル安定化 7 8 5 n m ダイオードレーザー ( 最大出力 : 3 0 0 m W 、 B & W T E K 社、米国デラウェア州ニューアーク ) 及び液体窒素冷却裏面照射及びディープディプレッション型 C C D カメラ ( ピクセル当たり 2 0 x 2 0 μ m で 1 3 4 0 x 4 0 0 ピクセル ; S p e c - 1 0 : 4 0 0 B R / L N 、 プリンストンインスツ

50

ルメンツ、ニュージャージー州トレントン)を搭載した透過イメージングスペクトログラフ(Holospec f/1.8、カイザーオプティカルシステムズ、ミシガン州アナバー)を備える。また、このシステムは、中心光送出ファイバー(直径200 $\mu\text{m}$ 、 $NA=0.22$ )を取り囲む9 $\times$ 200 $\mu\text{m}$ 集光ファイバー( $NA=0.22$ )を備える、特別に設計された溶融シリカ光ファイバースマン内視鏡プローブ(外径1.8mm及び長さ1.30メートル)からなる。1.0mmのサファイアボールレンズ(屈折率1.76)が上皮組織ラマン測定を向上させるためにラマンプローブのファイバー先端に連結されている。このシステムは、800~1800 $\text{cm}^{-1}$ の範囲にわたって9 $\text{cm}^{-1}$ のスペクトル分解能でラマンスペクトルを取得する。この研究における各ラマンスペクトルを785nm帯域通過フィルタ下において0.5秒の積分時間で測定した。この迅速なラマン分光法を、アルゴン/水銀スペクトルランプ(AR-1及びHG-1、オーシャンオプティクス社、フロリダ州ダニエデン)を使用して波長較正した。全ての波長較正スペクトルを、タングステン-ハロゲン較正ランプ(RS-10、EG&Gガンマサイエンティフィック、カリフォルニア州サンディエゴ)を使用してシステムの強度応答について補正した。

#### 【0104】

図20~22に記載されたシステム及び方法を使用して、リアルタイムデータ収集及び分析のためにラマン分光法システムを制御した。生体内組織から測定された生のラマンスペクトルは、弱いラマン信号と、強い自己蛍光バックグラウンドと、ノイズとの組合せを表す。生のスペクトルを一次サビツキー・ゴレイ平滑化フィルタ(スペクトル分解能を一致させるように選択された3つのピクセルのウィンドウ幅)によって前処理してスペクトルノイズを低減させる。指紋領域(800~1800 $\text{cm}^{-1}$ )において、五次多項式は、ノイズ平滑化スペクトルにおいて自己蛍光バックグラウンドを適合させるのに最適であることが分かり、その後、この多項式を生体のスペクトルから減算して組織ラマンスペクトルを単独で得る。上記の前処理の全てを100ミリ秒以内に完了し、そして処理結果をコンピュータ画面上にリアルタイムで表示することができる。

#### 【0105】

PLS回帰は、光ファイバースマンプローブからの特性内部基準バックグラウンド信号を抽出するための多変量法として使用した。簡単に言えば、PLSは、PCAの基本的な原理を利用するが、ただし、スペクトル変化と従属変数(例えば、帯域通過フィルタパワー)との間の共分散を最大化することによって成分LVを切り換え、それによって、LV負荷は、スペクトルデータセットにおける最も顕著な変動ではなく、関連する変動を説明する。帯域通過フィルタパワーに関連する重要なスペクトル基準信号を最初の数LVに保持した。この研究では、平均センタリングを実行してから、PLS回帰モデルの複雑さを軽減するためにモデル化した。PLS回帰モデルの最適な複雑さを、リーブ-1サブジェクトアウト相互検証を通じて決定し、そしてPLS回帰モデルの性能を、決定係数( $R^2$ )、較正の二乗誤差(RMSEC)を意味、較正の二乗平均平方根誤差(RMSEP)、クロスバリデーションの二乗平均平方根誤差(RMSECV)及び予測の二乗平均平方根誤差を算出することにより検討した。最適PLSモデルは、高い $R^2$ を有しているが、ただし、低いRMSEC、RMSECV及びRMSEPを有することに留意されたい。また、この研究における基準信号を分解するために開発されたPLS回帰モデルも、本発明のリアルタイム臨床ラマンソフトウェアのオンライン帯域通過フィルタ電力予測因子として実装し、そして公平な方法で将来的に試験した。多変量統計解析を、Matlab(マサチューセッツ州ナティック)のプログラミング環境で実施した。

#### 【0106】

合計30名の健常被験者(16名の女性及び14名の男性)を、口腔内での生体内組織ラマン測定のために募集した。生体内組織ラマン分光測定の前に、全ての被験者は、交絡因子(例えば、食物の残骸、微生物コーティング等)を低減するために大量のうがい薬を受けた。生体内組織のラマンスペクトル( $n=783$ )を25名の被験者の内唇から採取した。25名の被験者について、生体内口腔組織ラマンスペクトル( $n\sim 5$ )を5~65mW( $\sim 10$ mWの間隔)の範囲内にある6つのパワーレベルで取得した。各組織ラマ

10

20

30

40

50

ン測定の前に、帯域通過フィルタパワーレベルを $\pm 0.5\%$ の直線性及び $\pm 3\%$ の精度( $0.1 \sim 100 \text{ mW}$ の範囲)でパワー計を使用して光ファイバプローブの遠位先端で測定した。他の交絡因子(例えば、組織表面上のプローブ圧力、光退色、組織光学的特性及び光ファイバプローブの屈曲)を意図的には監視しなかったが、その場での基準信号のロバストな抽出のためにPLSモデルに組み込んだ。オンラインラマン取得フレームワークにおける開発PLSモデルの展開後に、帯域通過フィルタパワー監視のために内部基準信号の将来的かつ独立した検証を、新たな5名の被験者( $n = 166$ スペクトル)についてリアルタイムで行った。

#### 【0107】

この研究で開発された内部基準法の定量値をさらに検証するために、本発明者は、組織ファントム実験も行った。様々なゼラチン濃度の組織ファントムを、ウシ皮膚のタイプBゼラチン(G9391、Sigma、米国)から調製した。ゼラチンを蒸留 $\text{H}_2\text{O}$ で所定濃度(20、25、30、35、40、45、50質量%)で溶解した。溶解したゼラチンを、連続的に攪拌しながら水浴中において1時間にわたり50に加熱した。その後、溶解したゼラチンを予め冷却した型(4)に注ぎ、そして2~3時間保存して固体ゼラチンファントムを生成させた。次に、組織ファントムの定量的な光ファイバラマン分光分析を行った。合計 $n = 133$ のラマンスペクトルを、光ファイバラマンプローブを様々なレーザパワーで使用して様々な組織ファントムから測定した。帯域通過フィルタパワーを10~60 mWの範囲で変更し、そして測定されたスペクトルを内部基準法によって予測されるように帯域通過フィルタパワーに対して正規化した。

#### 【0108】

図11は、785 nmダイオードレーザーによって励起されたときに使用されるボールレンズ光ファイバラマンプローブのバックグラウンドスペクトルを示す。遠位ボールレンズに由来する異なるサファイア( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )ラマンピークを417及び646  $\text{cm}^{-1}$ ( $A_{1g}$ 対称を有するフォノンモード)、380及び751  $\text{cm}^{-1}$ ( $E_g$ フォノンモード)で見出すことができる。熔融シリカファイバからの2つの支配的なラマン成分並びに比較的弱いファイバ蛍光バックグラウンドが存在する。490及び606  $\text{cm}^{-1}$ で $D_1$ 及び $D_2$ と表記された熔融シリカの鋭い「欠陥ピーク」は、それぞれ、4及び3員環中における酸素原子の呼吸振動に割り当てられる。また、非晶質シリカ物質の一般的な特徴に関連する強いボソンラマンバンドの肩( $\sim 130 \text{ cm}^{-1}$ )も、光ファイバラマンプローブのバックグラウンドスペクトルから観察される。シリカボソンバンドは、 $\sim 60 \text{ cm}^{-1}$ 付近でピークに達しているが、本発明のラマンプローブ設計の光学的フィルタリングのため肩しか明らかにならなかった。光ファイバラマンプローブからのこれらの特性バックグラウンドラマンピーク(指紋領域よりも短い(800~1800  $\text{cm}^{-1}$ ))は、それ自身が生体内組織ラマン測定のための内部基準信号として役立ち得る。

#### 【0109】

PLS回帰モデルを開発し、かつ、内部基準信号を分解するために、本発明者は、独立したパラメータとして帯域通過フィルタパワーにより25名の被験者の口腔内での生体内ラマンスペクトルを測定した。各被験者について、生体内組織ラマンスペクトル( $n = \sim 5$ )を、5~65 mWの範囲内で様々なパワーレベル( $\sim 10 \text{ mW}$ の間隔)で取得した。図12は、様々な帯域通過フィルタパワー(例えば、10、30及び60 mW)を使用して内唇から測定された平均生体内生ラマンスペクトル $\pm 1$ 標準偏差(SD)の例を示す。変化する広範な自己蛍光バックグラウンドに重ねられた弱い組織ラマンシグナルを観察することができる。図29は、較正バックグラウンドのない平均ラマンスペクトル $\pm 1$ SDを示す。内唇の生体内ラマンスペクトルは、853  $\text{cm}^{-1}$ ( $\text{C-C}$ )、1004  $\text{cm}^{-1}$ ( $\text{C-C}$ )、1245  $\text{cm}^{-1}$ (タンパク質のアミドI I I ( $\text{C-N}$ )及び( $\text{N-H}$ ))、1302  $\text{cm}^{-1}$ ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ねじれ及び振り)、1443  $\text{cm}^{-1}$ ( $\text{C-CH}_2$ )変形)、1655  $\text{cm}^{-1}$ (タンパク質のアミドI ( $\text{C=O}$ ))及び1745  $\text{cm}^{-1}$ ( $\text{C=O}$ )の周辺にラマンピークを示す。一方、生の生体内組織ラマンスペクトル(図12)は、光ファイバラマンプローブからの顕著な熔融シリカ及びサファイアの

ラマンピーク、つまり：380、417、490、606、646、及び751  $\text{cm}^{-1}$ を有する。

#### 【0110】

PLS回帰モデルは、口腔組織ラマンスペクトルから広範な特性内部基準ピークを抽出する。レイリー散乱光をPLS分析から除外した。測定された生体内組織ラマンスペクトルを行方向スペクトル及び列方向波数を有するマトリックスに配置した。基準レーザーパワーレベルを、従属変数を表す列ベクトルに配置した。平均センタリング後に、PLS回帰モデルを、帯域通過フィルタパワー予測のためにロバストな基準信号を表現するのに最適なアルゴリズムを確立するために、リーブワンサブジェクトアウトクロスバリデーションを用いて開発した。図14aは、保持されたLVの関数としてのレーザーパワー予測のRMSEC及びRMSECVを示している。PLS回帰分析は、最適モデル(RMSECV = 2.5 mW)を、4 LVを使用して得ることができることを示した。図14bは、最大ラマンスペクトル分散(すなわち、LV1: 94.8%、LV2: 3.0%、LV3: 0.9%及びLV4: 0.2%)及び帯域通過フィルタパワーの分散(LV1: 80.1%、LV2: 16.8%、LV3: 0.8%、LV4: 0.7%)を説明する最初の4つのLV負荷を表す。また、計算されたPLS回帰ベクトルも示す。図30aは、リーブワンサブジェクトアウトクロスバリデーションを使用した生体内レーザーパワー監視結果(すなわち、予測レーザーパワー対測定レーザーパワー)を示す。データを次式( $y = 0.551 + 0.984x$ )で適合できるが、これは、かなりの直線関係( $R = 0.98$ )を示す。4 LVのPLSモデルの複雑さは、2.5 mWのRMSECV及び0.981の $R^2$ による帯域通過フィルタパワー監視のための正確な内部基準を付与した。その後、同じPLS回帰モデルを、5名の新たな被験者( $n = 166$  スペクトル)の独立した検証のためのラマンソフトウェアにオンラインでリアルタイムで実装した。図30bは、開発PLS回帰モデルを使用して、測定された実際の帯域通過フィルタパワーと予測された帯域通過フィルタパワーとの関係を示している。2.4 mWのRMSEP及び線形関係( $y = 0.342 + 1.011x$ ;  $R^2 = 0.985$ )を得ることができるが、これは、生体内組織ラマン測定中に内部基準法としてPLS回帰の適用を再確認するものである。

10

20

30

40

50

#### 【0111】

内部基準法の定量値を、組織ファントムの定量的スペクトル解析のために展開した。様々な濃度のゼラチンからなる7種の組織ファントム(すなわち、20、25、30、35、40、45及び50質量%)を構築し試験した。ゼラチンファントムからのラマンスペクトル( $n = 133$  スペクトル)を測定し、そして予測されたレーザーパワーに対してリアルタイムで正規化した。図31は、60 mWの励起レーザーパワーで様々な濃度のゼラチン組織ファントムから測定したラマンスペクトルを示す。予想通り、これらのラマンスペクトルは、ラマンピーク強度とゼラチン濃度との間で直線関係( $R = 0.992$ )を示す。図32は、様々な励起レーザーパワー(10~60 mWで変化する)での実際のゼラチン濃度と予測濃度との相関関係を示している。その場でのリアルタイム帯域通過フィルタパワー監視によりレーザーパワーの変動を補正することによって、ゼラチン組織ファントムの正確な定量分析を実現することができることは明らかである(RMSEP = 1.9%及び $R^2 = 0.985$ )。上記の結果は、多変量内部基準信号に基づいて開発されたリアルタイムパワー監視方法が、光ファイバー組織ラマン分光法における堅牢な定量的組成分析を達成することができることを示している。

#### 【0112】

例3：生体内リアルタイム経鼻画像誘導ラマン内視鏡検査：鼻咽頭及び喉頭におけるスペクトル特性の定義

この研究は、鼻内視鏡用途におけるラマン分光法の実現可能性を実証するものであり、頭頸部における大規模臨床研究のための基盤を提供する。開発された小型化ファイバースラマンプローブと統合された画像誘導ラマン内視鏡検査プラットフォームは、臨床内視鏡検査中に頭頸部の内因性組織成分の分子レベルでの迅速かつ低侵襲性の評価を提供する。これは、臨床医が頭頸部における組織の詳細な生体分子指紋を得るのを非常に容易にし、血

管破裂又は組織脱水、形態学的及び解剖学的効果等に起因する画像の乱れを導入することなく、本物の組成及び形態学的署名を反映する。

【0113】

ラマン分光システムは、スペクトル安定化785nmダイオードレーザー（最大出力300mW、B&WTEK社、デラウェア州ニューアーク）と極低温冷却（-120）NIR最適化裏面照射及びディープディプレッション型電荷結合素子（CCD）カメラ（ピクセル当たり20×20μmで1340×400ピクセル、Spec-10:400BR/LN、プリンストンインスツルメンツ）を備える透過イメージングスペクトログラフ（Holospec f/1.8、カイザーオプティカルシステムズ）とからなる。新規分光ファイバー入力結合は、スペクトル分解及びラマン信号の信号対雑音比の両方を改善するための分光画像の収差を補正するために58本のファイバー（100μm）の放物線整列アレイからなる。組織の励起及び生体内組織ラマン収集の両方を最大化する経鼻内視鏡用途のための1.8mm光ファイバーラマンプローブを利用した。ラマンファイバープローブは、柔軟な経鼻内視鏡の作業用チャンネルに適合し、かつ、異なる広視野イメージング（すなわち、白色光反射率（WLR）及び狭帯域イメージング（NBI））ガイダンス下で咽頭及び喉頭内の様々な位置に向けることができる。臨床ラマン内視鏡検査プラットフォームを本発明者が最近開発したオンラインデータ処理ソフトウェアと統合して、プローブの取り扱い・アドバイスを容易にし、リアルタイム（<0.1秒の処理時間）で臨床医にサウンドフィールドバックした。簡単に説明すると、オンラインラマン内視鏡フレームワークは、スペクトル取得（すなわち、レーザー露光、積分時間、CCDシャッター及び読み出しなど）を同期させ、かつ、平滑化、5次多項式ベースライン減算などを含めた確立された前処理方法を用いて生組織スペクトル（強い自己蛍光バックグラウンド及び弱いラマンシグナルを含む）からラマン信号を自動的に抽出する。生体内ラマンスペクトル及び多変量アルゴリズム（例えば、主成分分析）の結果を、臨床経鼻ラマン内視鏡検査中に理解可能なグラフィカル・ユーザー・インターフェース（GUI）にリアルタイムで表示することができる。

10

20

【0114】

異なる人種（22名のアジア人及び1名の白人）の合計23名の正常で健康な男性被験者を、経鼻内視鏡検査での生体内組織ラマン測定のために募集した。募集されたこれらの被験者では、WLR及びNB画像検査の下では疑わしい病変は全く特定されなかった。NPCが一般的に開始する真の喉頭声帯（LVC）、後部鼻咽頭（PN）及び咽頭陥凹すなわち、ローゼンミュラー窩（FOR）を含めた、想定された正常（又は良性）組織の合計3つの一次測定部位を、生体内でのラマン取得のためにあらかじめ定義した。光ファイバーラマンプローブを、リアルタイムで組織の内因性生体分子組成物と引テロゲートする内部組織と穏やかに接触した状態に置くことができる。生検組織部位に対する正確な位置決めを、担当の内視鏡医がWLR/NBIモニター上で確認した。このプローブは、ラマンスペクトルを約1mm<sup>3</sup>のプロービング体積及び~800μmの侵入深さを有する所定の領域（直径200μm）から収集した。各スペクトルを、組織表面上に約~50mWのパワーを有する785nmのレーザー光を用いて0.5秒内に取得した。

30

40

【0115】

ラマンスペクトルをオンラインで表示し、そして術後の検査のために保存した。この迅速なラマン内視鏡技術は、非破壊であり、かつ、臨床評価のための内視鏡的経鼻検査下で現在日常的に使用できる。内組織部位の分散を評価するために、いくつかのラマンスペクトル（~18）を各組織部位から取得した。その結果、47の部位からの合計874の生体内ラマンスペクトルを経鼻内視鏡検査で測定し、そして23名の被験者からスペクトル解析のために使用した[P N（n=521）、FOR（n=157）及びLVC（n=196）]。

【0116】

データ解析の前に、まず生のラマンスペクトルを、線形サビツキーゴーレイフィルタを用いて平滑化し、その後、組織の自己蛍光バックグラウンドを、5次多項式適合を使用し

50

て平滑化スペクトルから差し引いた。バックグラウンドを差し引いたラマンスペクトルを、様々な被験者及び組織部位に対する臨床的ラマン測定に及ぼすラマンプロープ処理変動の影響を最小にするために、曲線下積分面積に対して正規化した。処理された全てのラマンスペクトルをマトリックスに組み込み、次に全ラマンデータセットの平均センタリングを行った。スペクトルデータの次元を減少させるために、主成分分析（PCA）を使用して、組織特性決定のためのラマンスペクトルデータセットにおける最大分散を考慮する直交主成分（PC）のセットを抽出した。したがって、PC上の負荷は、分散を徐々に減少させる原因となるデータセットにおける最も顕著なスペクトル変化の直交基底スペクトルを表すのに対し、PC上でのスコアは、対応する負荷に関する組織ラマンスペクトルの投影値を表す。したがって、PCAを効率的に使用してスペクトル変化を分解できる共に、データセットの次元を最小限に低減させることができる。保持されたPCの数は、分散分析（ANOVA）及び0.05レベルでのスチューデントt検定に基づいて選択した。本発明者は、平均の差を評価するためにpost-hoc Fisherの最小二乗差（LSD）テストを用いた。多変量統計解析を、Matlab（マスワークス社、ナティック、MA）のプログラミング環境でPLSツールボックス（ Eigenベクトルリサーチ、ウエナチー、WA）使用して実施した。

10

## 【0117】

生体内ラマンスペクトルにおける高品質を、経鼻画像誘導（すなわち、WLR及びNBI）内視鏡検査中にリアルタイムで鼻咽頭及び喉頭において日常的に獲得することができる。図1は、内視鏡検査時に0.1秒の採取時間で後部鼻咽頭から取得した生体内ラマンスペクトル（大きな組織自己蛍光のバックグラウンドに重ねた弱いラマン信号）の一例を示す。>10の信号対雑音比（SNR）を持つバックグラウンド除去組織ラマンスペクトル（図33の挿入図）を得ることができ、そして臨床内視鏡測定中にオンラインで表示することができる。図34は、ラマンプロープをWLR/NBI画像ガイド下で組織と穏やかに接触させたときの正常の鼻咽頭 [PN (n = 521) 及びFOR (n = 157)] 並びに喉頭組織 [LVC (n = 196)] の被験者間生体内平均ラマンスペクトル ± 1標準偏差（SD）を示す。取得した鼻咽頭と喉頭組織のラマンスペクトルとの比較（図34）は、体液中の生化学物質が経鼻内視鏡検査時に生体内組織ラマンスペクトルに有意には寄与していないことを示している。また、対応する解剖学的位置から得られたWLR画像も示されている。暫定的な生体分子の割り当てで表2にまとめたように、タンパク質及び脂

20

30

## 【0118】

## 【表 2】

表2. 鼻咽頭及び喉頭組織のラマン散乱に関与する分子振動及び生化学物質の暫定的な割り当て(ここで、 $\nu$ は伸縮モード、 $\nu_s$ は対称伸縮モード、 $\delta$ は曲げモードである)

ラマンピークス ( $\text{cm}^{-1}$ )	振動	生化学物質
853	$\nu(\text{C}-\text{C})$	タンパク質
940	$\nu(\text{C}-\text{C})$	タンパク質
1004	$\nu_s(\text{C}-\text{C})$ 呼吸	タンパク質
1078	$\nu(\text{C}-\text{C})$	脂質
1265	アミドIII $\nu(\text{C}-\text{N})$ $\delta(\text{N}-\text{H})$	タンパク質
1302	$\text{CH}_2$ ねじれ及振れ	脂質/タンパク質
1450	$\delta(\text{CH}_2)$	脂質/タンパク質
1660	アミドI $\nu(\text{C}=\text{O})$	タンパク質

10

## 【0119】

20

図35は、ランダムに選択された被験者の被験者内平均スペクトル $\pm 1\text{SD}$ を示す。生体内組織ラマンスペクトルは、鼻咽頭及び喉頭において小さな被験者間及び内偏差( $< 10\%$ )で再現可能であることが分かった。さらに、ラマン内視鏡検査は、後部鼻咽頭内の様々な組織部位間の変動がわずかであることを示す( $< 5\%$ ) (データは示さず)。また、本発明者は、図36に示すように様々な組織型(すなわち、PN-LVC、LV-FOR及びPN-FOR)間における差異スペクトル $\pm 1\text{SD}$ を算出し、様々な解剖組織部位の独特の組成及び形態学的プロファイルを生体分子レベルで解明する。ANOVAは、812、875、948、986、1026、1112、1254、1340、1450、1558、1655及び1745  $\text{cm}^{-1}$ を中心とする3つの解剖組織部位間に有意な変動 [ $P < 0.0001$ ]を示す12の顕著で広範なラマンスペクトルサブ領域を明らかに、鼻咽頭及び喉頭のラマンスペクトル特性を正確な生体内組織診断の方向に特徴づけることの重要性を再確認した。

30

## 【0120】

図37に示すように、健康な志願者から得た血液、唾液、鼻粘液の試験管内ラマンスペクトルを測定した。唾液及び鼻水における最も顕著なラマンバンドは、1638  $\text{cm}^{-1}$ であるのに対し(水の $\nu_2$ 屈曲モード)、血液は、1560及び1620  $\text{cm}^{-1}$ 付近のポルフィリンラマンバンドを示す。頭頸部における様々な組織間でのスペクトル差異をさらに評価するために、全分散(PC1: 22.86%、PC2: 16.16%、PC3: 8.13%、PC4: 6.22%、PC5: 4.05%)の57.41%を占めるANOVA及びスチューデントt検定( $p < 0.05$ )に基づく5成分のPCAモデルを開発して、様々な解剖学的位置の有意なピーク変動を解明した。図38はPC負荷を示すが、これは、タンパク質(即ち、853、940、1004、1265、1450及び1660  $\text{cm}^{-1}$ )及び脂質(すなわち、1078、1302、1440、1655及び1745  $\text{cm}^{-1}$ )に関連した分解ラマンバンドを明らかにするものである。図39(A~E)は、異なる組織タイプ(すなわち、PN、FOR及びLVC)のためのPCAスコアのボックスチャートを示す。各ノッチボックス内の線は中央値を表し、ボックス上限及び下限は、それぞれ、第1(25.0%パーセンタイル)及び第3(75.0%パーセンタイル)四分位数を示す。エラーバー(ウィスカー)は、1.5倍の四分位範囲を表す。また、p値も異なる組織型間で表される。線形判別分析(LDA)と統合された二値PCAアルゴリズムは、それぞれPN対FOR及びLVC対PN間の差異についてリープ-1サブジェクトア

40

50

ウトクロスバリデーションを使用して77.0% (401/521)、67.3% (132/192)の感度及び89.2% (140/157)及び76.0% (396/521)の特異性を提供した。全体として、これらの結果は、頭頸部における鼻咽頭及び喉頭のラマンスペクトルを経鼻内視鏡で生体内で測定することができること、及び診断アルゴリズムの開発が最小のアルゴリズムの複雑性を確保するために組織部位特異的であるべきであることを実証する。

#### 【0121】

#### 例4：パレット食道における異形成のリアルタイム生体内診断のための光ファイバー共焦点ラマン分光法

光ファイバー共焦点ラマン診断は、リアルタイム (< 0.5秒)で達成でき、かつ、パレット発癌における上皮細胞及び組織の進行性生体分子及び機能変化をその場で見出す。組織病理により、円柱上皮 (n = 597スペクトル)として将来的に測定された組織部位の152、腸上皮化 (n = 123スペクトル)として48、高度異形成 (n = 77スペクトル)として9を特徴付けた。受信者動作特性 (ROC)分析を使用して、高度異形成の同定を成功裏に達成することができ、スペクトルベースで87.0%の感度及び84.7%の特異性をもたらした。ROC曲線下面積は0.90であった。リアルタイム機能を備えたこの新規生体分子特異的内視鏡のモダリティは、胃腸科医に、継続的な内視鏡検査中にパレット患者における高リスク組織領域を客観的に対象とするための信頼性の高いツールを提供する。

#### 【0122】

共焦点ラマン分光システムは、近赤外 (NIR)ダイオードレーザー ( $\lambda_{ex} = 785 \text{ nm}$ )と、液体窒素冷却NIR最適化電荷結合素子 (CCD)カメラを装備したハイスループット透過イメージング分光器と、特別に設計された1.8mmの光ファイバー共焦点ラマンプローブとから構成される。このシステムは、 $\sim 9 \text{ cm}^{-1}$ のスペクトル分解能で $800 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$ 範囲でラマンスペクトルを取得する。開発された光ファイバー共焦点ラマン内視鏡プローブは、レーザー光送達及び生体内組織ラマン信号の収集の両方に使用される。

#### 【0123】

1.8mm (外径)共焦点ラマン分光内視鏡プローブは、中心光伝送ファイバー (直径 $200 \mu\text{m}$ 、 $NA = 0.22$ )を取り囲む $9 \times 200 \mu\text{m}$ フィルター被覆集光ファイバー ( $NA = 0.22$ )を備える。小型の1.0mmサファイアボールレンズ ( $NA = 1.78$ )を共焦点プローブのファイバー先端に連結して組織に励起光をしっかりと集光させ、上皮層 (<  $200 \mu\text{m}$ )からの実効ラマンスペクトル収集を可能にする。光ファイバー共焦点ラマンプローブを従来の内視鏡作業用チャンネルに挿入し、そして生体内組織キャラクター化及び診断のために上皮と穏やかに接触した状態にすることができる。この共焦点ラマンプローブの深度選択性は、次の事項を含めて説得力のある実験的な利点を提供する：(i)光ファイバー共焦点ラマン分光法は、パレット発癌の早期発症に関連した上皮層を選択的にターゲットにし、このことは、より大きな組織容量を調べる従来の容積型光ファイバーラマンプローブよりも優れていること；(ii)共焦点ラマン技術の浅い組織インタロゲーション能力は、より深い組織層 (例えば、間質)からの組織自己蛍光寄与が大幅に低減されているため、より高い組織ラマン対自家蛍光バックグラウンド比を与えること、及び(iii)この新規光ファイバー共焦点ラマン分光法プラットフォームと十分に立証された多変量解析とを組み合わせることで、上皮分子情報を抽出し、そして生体内でリアルタイムに分析することを可能にすること。共焦点ラマン内視鏡システム全体は、内視鏡医に対する聴覚的確率フィードバックにより内視鏡スクリーニング設定において迅速な調査を可能にする直感的なソフトウェアフレームワークで制御されており、これは、ラマン分光法の最先端を日常的な臨床診断にする。

#### 【0124】

合計450人の患者を、消化不良及び上部消化管腫瘍形成を含めた種々の適応症のサーベイランスやスクリーニングのためにラマン内視鏡検査で登録した。疑われる病変の典型

的な検査の間に、各組織ラマン測定値を0.5秒以内に取得することができるが、これは、大組織領域の迅速な調査を可能にする。上部GIにおいて様々な組織学的サブタイプを有する373人の患者から得られた生体内ラマンスペクトルデータを使用して、包括的なラマンライブラリ(>12000ラマンスペクトル)を構築した。BEのスクリーニング及び監視のために募集された患者について、ラマンスペクトルを次の3つ病理組織学的リスククラスに分類する：(i)「正常」-円柱上皮(CLE)、(ii)杯細胞の存在として定義される「低リスク」BE、(iii)「高リスク」-低悪性度異形成(LGD)及び高度異形成(HGD)。例えば、図40Aは、組織病理学的特性評価によって確認されたように異なる組織型(すなわち、扁平上皮(n=165)、CLE(n=907)、腸上皮化(IM)(n=318)及びHGD(n=77))で提示する本発明のデータベースにおいて患者から測定された平均生体内共焦点ラマンスペクトルを示している。それぞれのラマンスペクトルを0.5秒以内に取得した。これらのスペクトルを比較目的のために $1445\text{ cm}^{-1}$ でのラマンピークに正規化した。顕著な組織ラマンピークが、 $936\text{ cm}^{-1}$ (C-Cタンパク質)、 $1004\text{ cm}^{-1}$ (フェニルアラニンの(C-C)環呼吸)、 $1078\text{ cm}^{-1}$ (脂質の(C-C))、 $1265\text{ cm}^{-1}$ (タンパク質のアミドI I I (C-N)及び(N-H))、 $1302\text{ cm}^{-1}$ (タンパク質の $\text{CH}_2$ ねじれ及び振り)、 $1445\text{ cm}^{-1}$ (タンパク質及び脂質の $(\text{CH}_2)$ 変形)、 $1618\text{ cm}^{-1}$ (ポルフィリンの $\text{V}(\text{C}=\text{C})$ )、 $1655\text{ cm}^{-1}$ (タンパク質のアミドI v (C=O))及び $1745\text{ cm}^{-1}$ (脂質の(C=O))周辺で観察できる。顕著なラマンスペクトルの相違(例えば、ピーク強度、シフト及びバンドの広がり)を異なる組織型間で識別することができる。これらの豊富なスペクトル特性は、バレット発癌に伴って上皮に発生する生体分子及び機能的変化を表現する。組織学が杯細胞並びに進行性の構造的及び細胞学的異型の存在を同定する(図40(B、C、D、E))一方で、光ファイバー共焦点ラマン分光法は、上皮がバレット発癌シーケンス全体にわたる主要な機能及び生体分子の変化を受けることを明らかにする。BEのラマン生体分子署名が異形成のそれとかなり似ていることは興味深く、これは、腸化生表現型への転換がバレット発癌における重要な事象であることを確認するものである。これらの非常に特異的な上皮分子署名は、おそらく、多数の内因性光学バイオマーカー(すなわち、腫瘍性タンパク質、DNA、ムチン発現、有糸分裂等)を反映する。したがって、上皮ラマンスペクトル特性と組織病理学又は組織化学との相関関係は、生体分子レベルでのその場でのバレット発症及び進行の理解を深めることができる。現時点では、他の競合の光学分光技術(例えば、蛍光弾性散乱分光法)は、内視鏡検査時において生体内でのこのような徹底的な分子特性を提供することはできない。

#### 【0125】

組織病理は、CLEとして将来的に(すなわち、独立して)測定された組織部位の152(n=597スペクトル)、IMとして48(n=123スペクトル)及びHGDとして9(n=77スペクトル)を特徴づけた。図41Aは、正常、低リスク及び高リスク病変の共焦点ラマンスペクトルに属する77人の患者における将来的測定リスクスコアの二次元三散布図を示している。また、対応する二値受信者動作特性(ROC)曲線(図41B)も図3Aから生成し、その曲線下面積(AUC)は、正常、低リスク及び高リスク病変間の識別のために、それぞれ、0.88、0.84及び0.90である。共焦点ラマン技術がBE(図41A)により低リスク病変を区別するのみならず、異形成上皮を含む特定の組織領域を客観的に局所化することができた。上記ROC分析は、高リスク組織の標的化検出をリアルタイムで達成することに成功でき、スペクトル基準で87.0%(67/77)の診断感度及び84.7%(610/720)の特異性を得ることができることを示す。

#### 【0126】

上記の説明では、実施形態は、開示されたシステム及び方法の例示又は実施である。「一実施形態」、「実施形態」又は「いくつかの実施形態」の様々な表現は、必ずしも同じ実施形態に言及しているとは限らない。

## 【0127】

開示されたシステム及び方法の様々な特徴を単一の実施形態の文脈で説明することができるが、これらの特徴は、別個に又は任意の好適な組み合わせでも提供できる。逆に、開示されたシステム及び方法は、明確にするために別個の実施形態の文脈において記載することができるが、開示されたシステム及び方法は、単一の実施形態でも実施できる。

## 【0128】

さらに、開示されたシステム及び方法を様々な態様で実施又は実現でき、かつ、上で概説した以外の実施形態で実施することができることを理解すべきである。

## 【0129】

本明細書で使用した技術用語及び科学用語の意味は、特に明記しない限り、一般的に、当業者が属するものとして解すべきである。

10

## 【0130】

本開示の特定の態様は、方法の形式で記載した処理ステップ及び命令を含む。本開示のプロセスステップ及び命令は、ソフトウェア、ファームウェア又はハードウェアで具現化でき、またソフトウェアで具現化する場合には、リアルタイムネットワークオペレーティングシステムによって使用される別のプラットフォーム上に常駐又はそれから操作されるようにダウンロードできるであろうことに留意すべきである。

## 【0131】

また、本開示は、ここでの動作を実行するための装置に関するものでもある。この装置は、要求される目的のために特別に構築してもよいし、コンピュータによってアクセス可能なコンピュータ可読媒体上に記憶されたコンピュータプログラムによって選択的に起動又は再構成された汎用コンピュータを備えてもよい。このようなコンピュータプログラムは、有形の非一時的なコンピュータ可読記憶媒体、例えば、フロッピー（登録商標）ディスク、光ディスク、CD-ROM、光磁気ディスクを含めた任意のタイプのディスク、リードオンリーメモリ（ROM）、ランダムアクセスメモリ（RAM）、EPROM、EEPROM、磁気若しくは光カード、特定用途向け集積回路（ASIC）又は電子命令を格納するのに好適な任意のタイプの媒体（これらに限定されない）であって、それぞれがコンピュータシステムバスに接続されたものに格納されてもよい。さらに、本明細書でいうコンピュータは、単一のプロセッサを包含することができ、又は計算能力増大のためのマルチプロセッサ設計を使用するアーキテクチャであることができる。

20

30

## 【0132】

本明細書で提示した方法及び操作は、本質的に任意の特定のコンピュータその他の装置に関連するものではない。また、様々な汎用システムを、本明細書の教示に従ってプログラムと共に使用することもでき、或いは必要な方法ステップを実行するためにより特化した装置を構築することが便利である。これらの様々なシステムに必要な構造は、均等のバリエーションと共に、当業者には明らかであろう。また、本開示は、特定のプログラミング言語を参照して説明されていない。様々なプログラミング言語を使用して本明細書に記載の本開示の教示を実施できること及び特定の言語に対する言及は、実施可能要件の開示及び本発明のベストモードのために提供されることを理解されたい。

## 【0133】

本開示は、多数のトポロジーにわたって広範囲のコンピュータネットワークシステムに適している。この分野では、大規模ネットワークの構成及び管理は、インターネット、公衆ネットワーク、プライベートネットワーク又はコンピューティング・システム間の通信を可能にする他のネットワークなどネットワークを介して異種のコンピュータ及びストレージデバイスに通信接続されるストレージデバイス及びコンピュータを備える。最後に、本明細書で使用する用語は、主として、意味の取りやすさ及び教示の目的から選択されたものであり、本発明の主題を限定するために選択されたものではないことに留意すべきである。したがって、本発明の開示は、例示することを意図するものであり、特許請求の範囲に記載された開示の範囲を限定するものではない。

40

## 【符号の説明】

50

【 0 1 3 4 】

- 1 0 診断用器具が
- 1 1 内視鏡自体
- 1 6 C C D
- 1 7 C C D
- 2 1 単色レーザー光源
- 2 2 帯域通過フィルタ
- 2 5 励起光ファイバー
- 2 6 サファイアボールレンズ
- 2 8 集光ファイバー
- 2 9 ロングパスインライン捕集フィルタ
- 3 0 分光器
- 3 5 コンピュータ

【 図 2 2 A 】

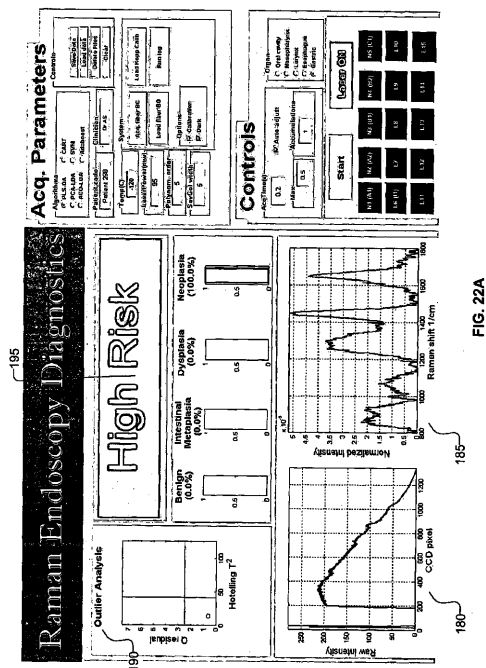


FIG. 22A

【 図 2 2 B 】

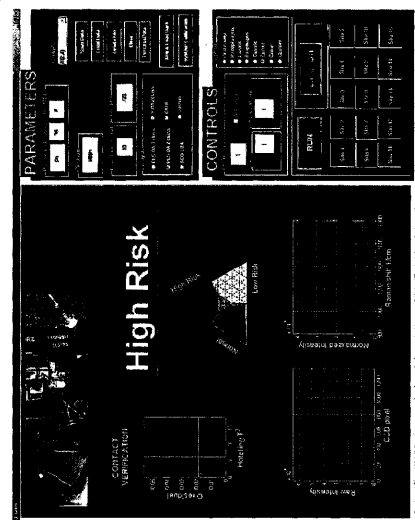
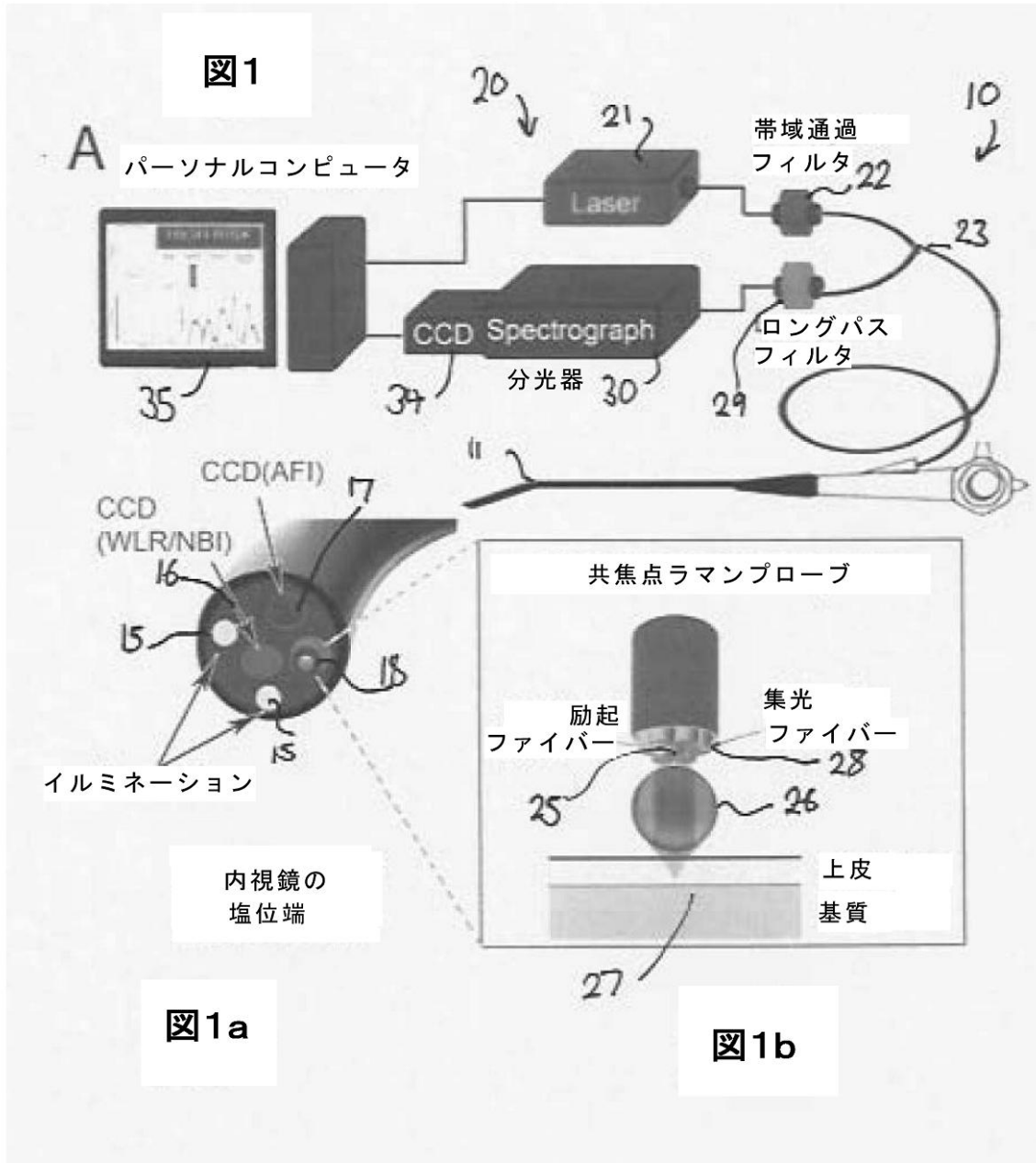
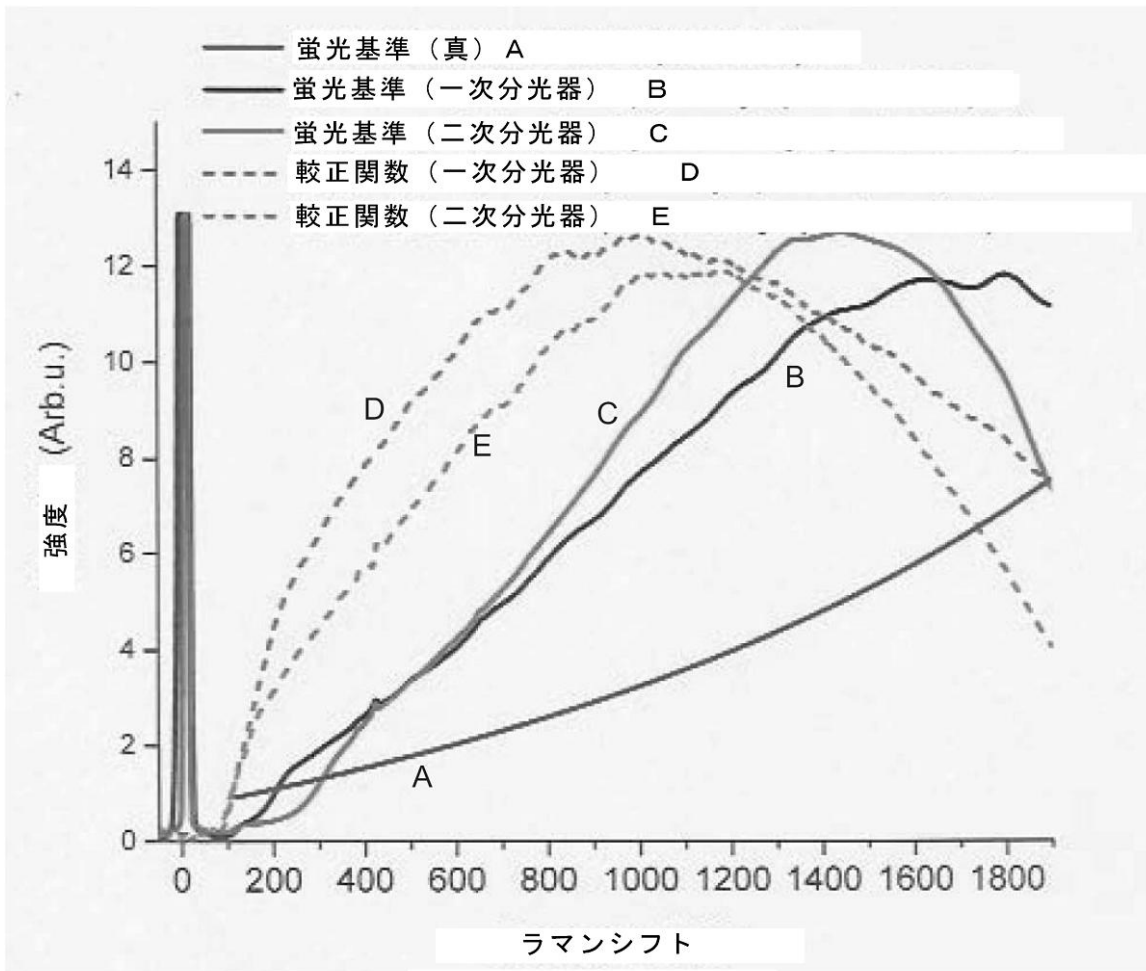


FIG. 22B

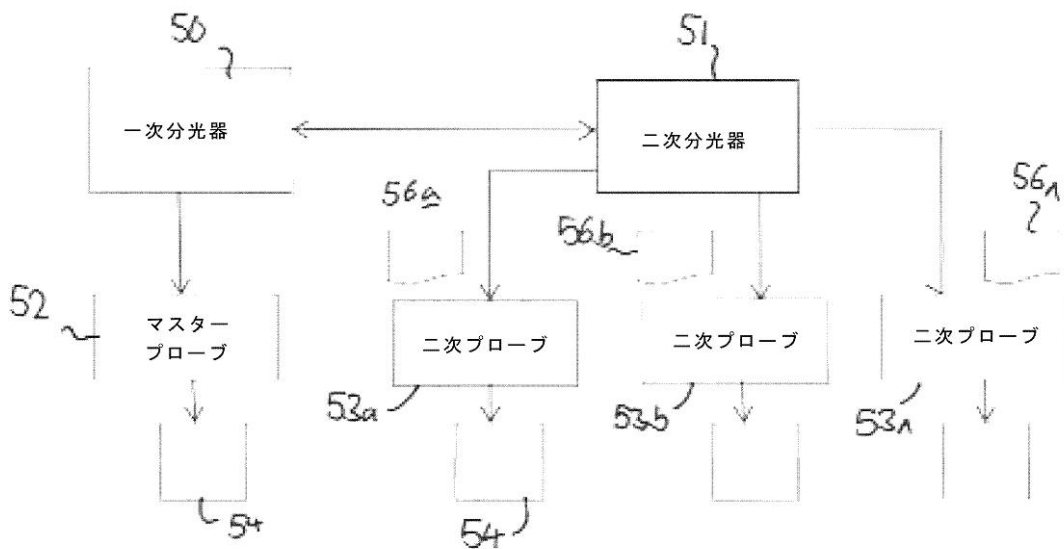
【図1】



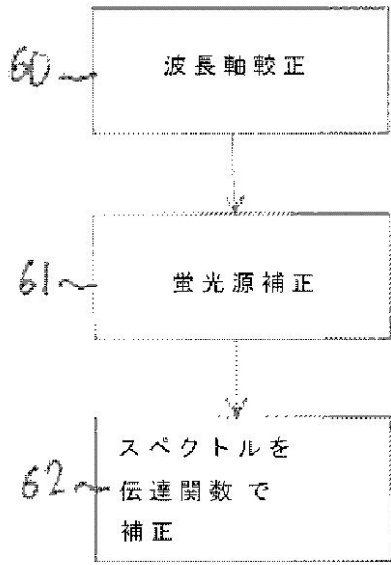
【 図 2 】



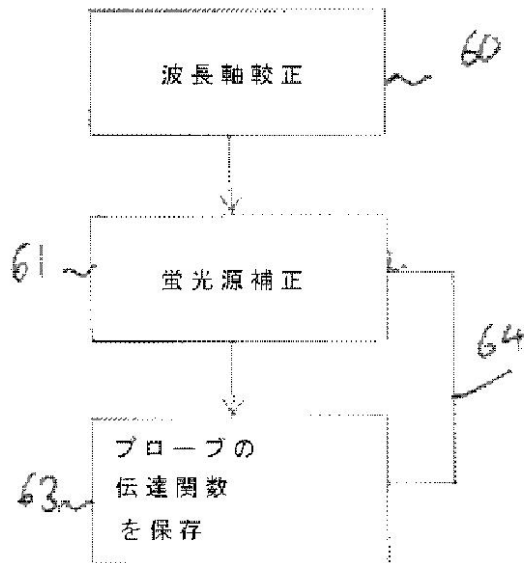
【 図 3 】



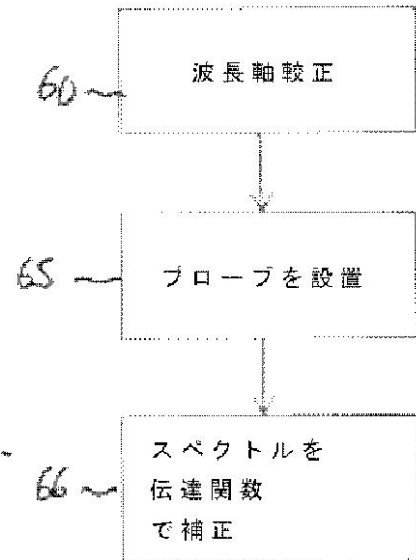
【図4】



a

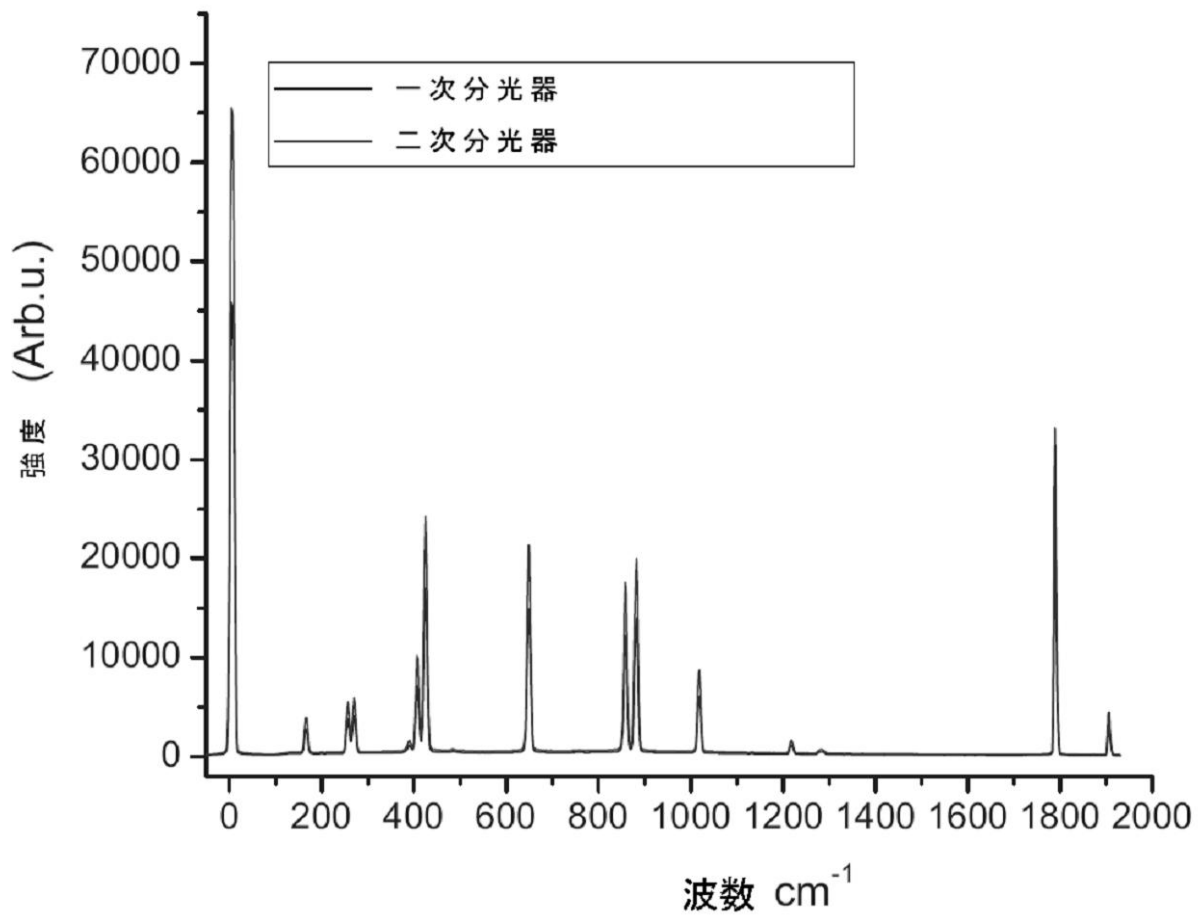


b

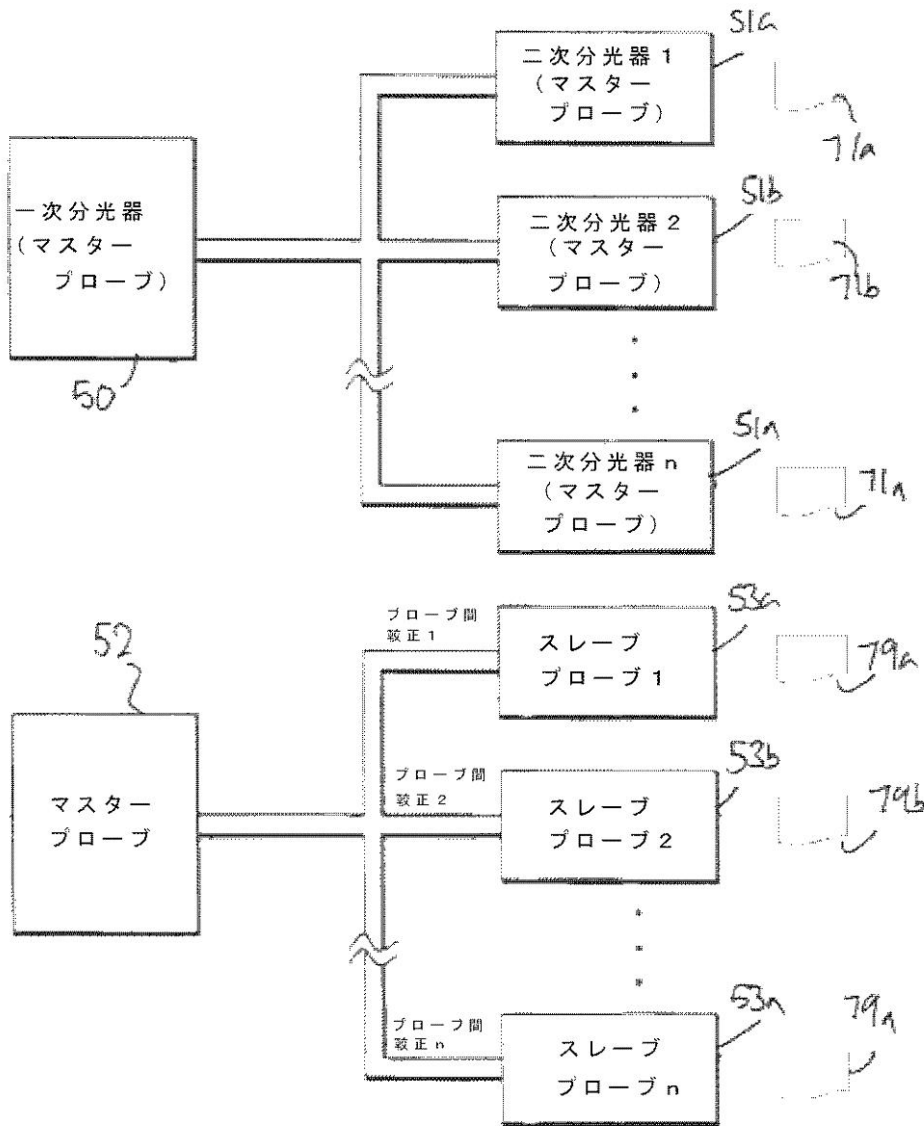


c

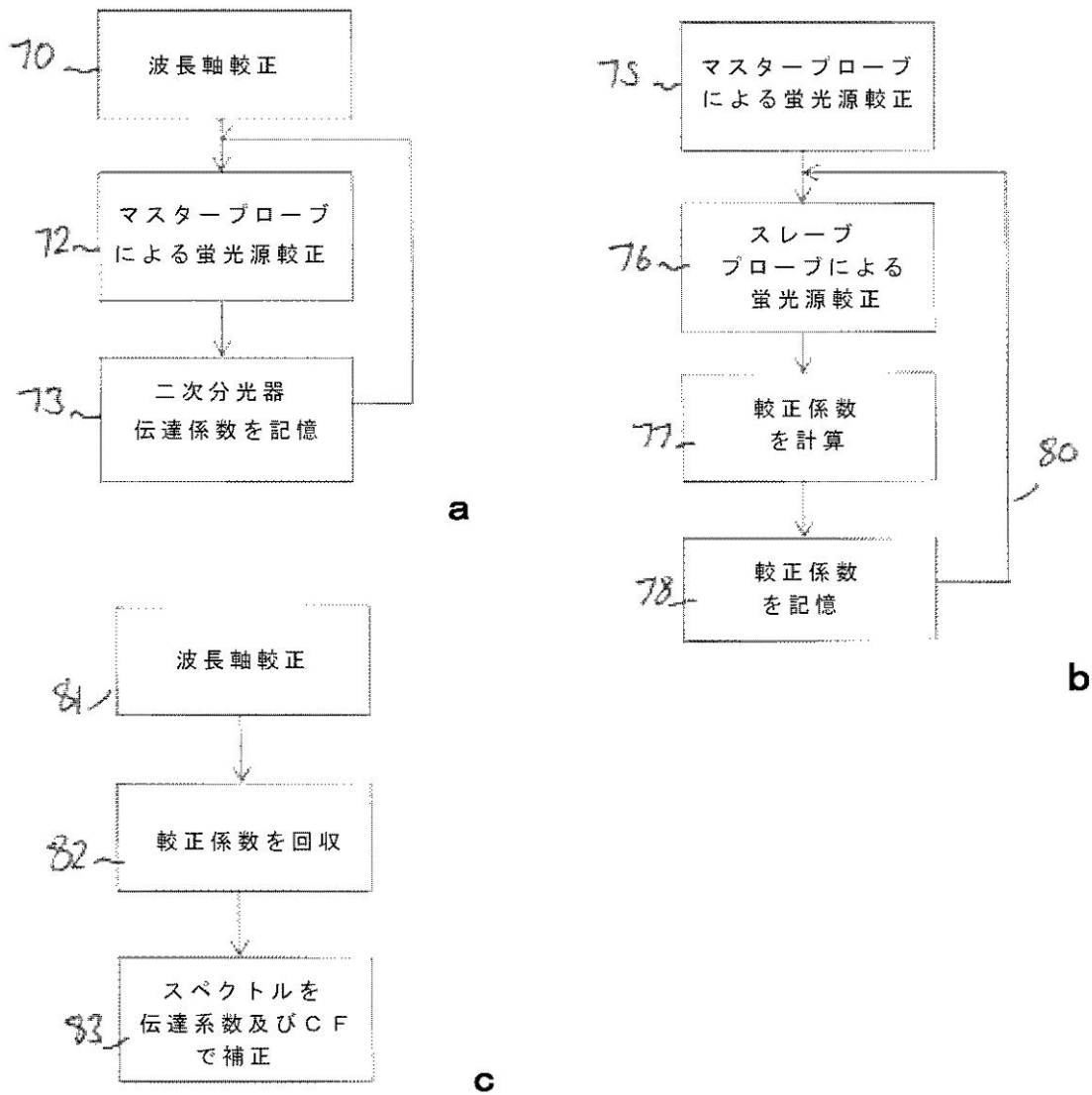
【 图 5 】



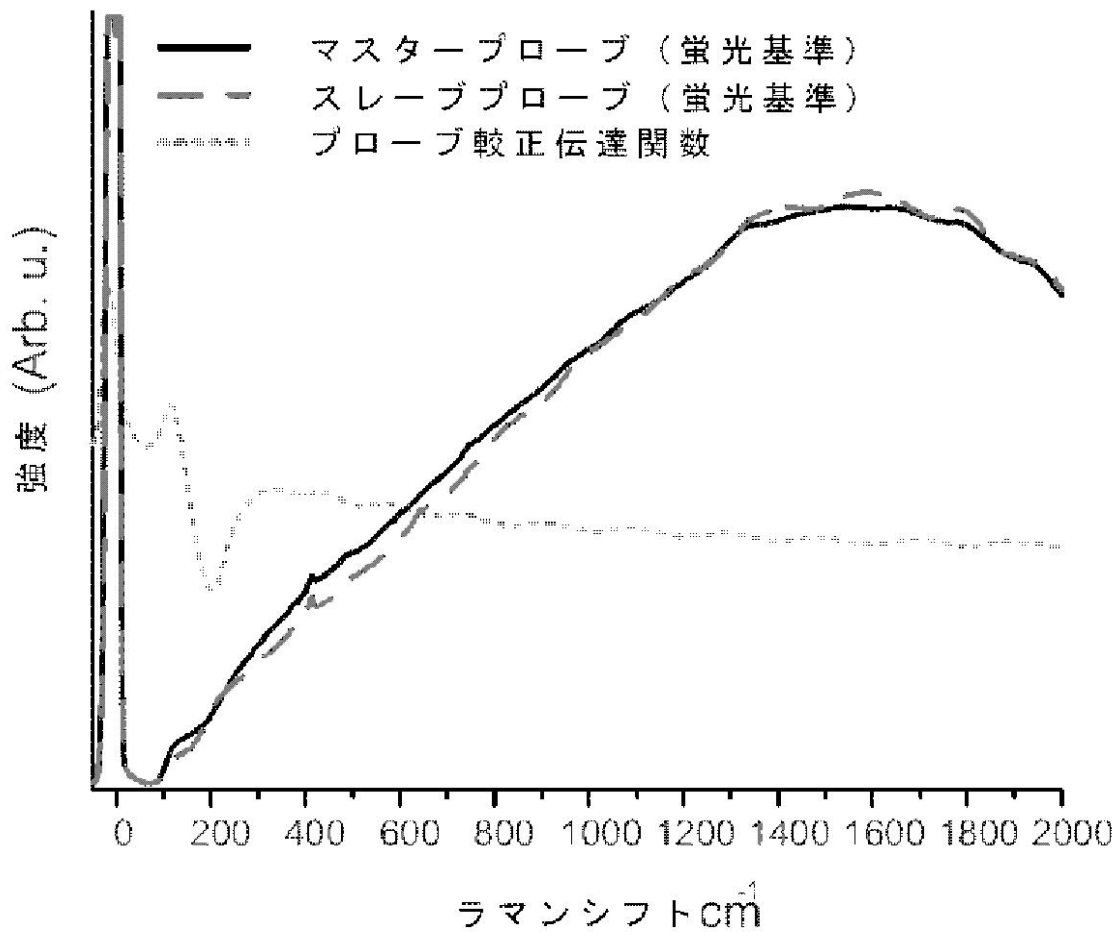
【図6】



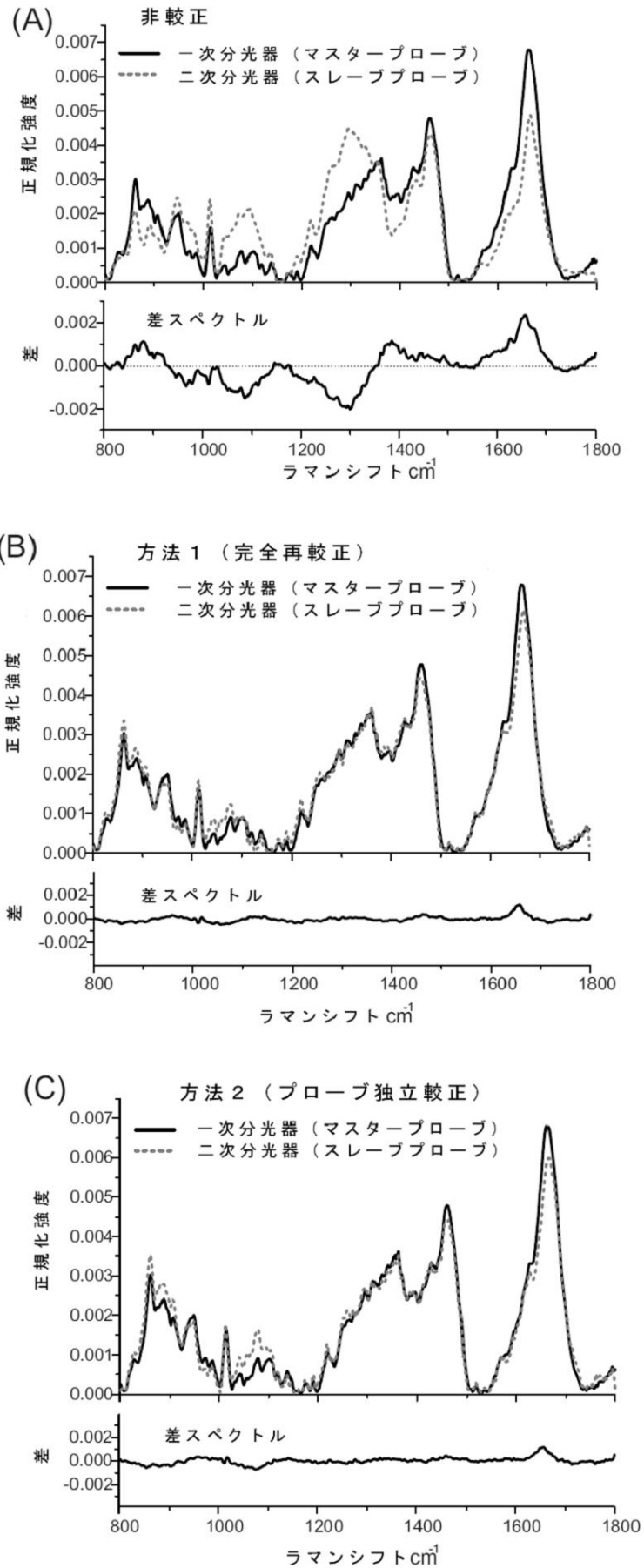
【図7】



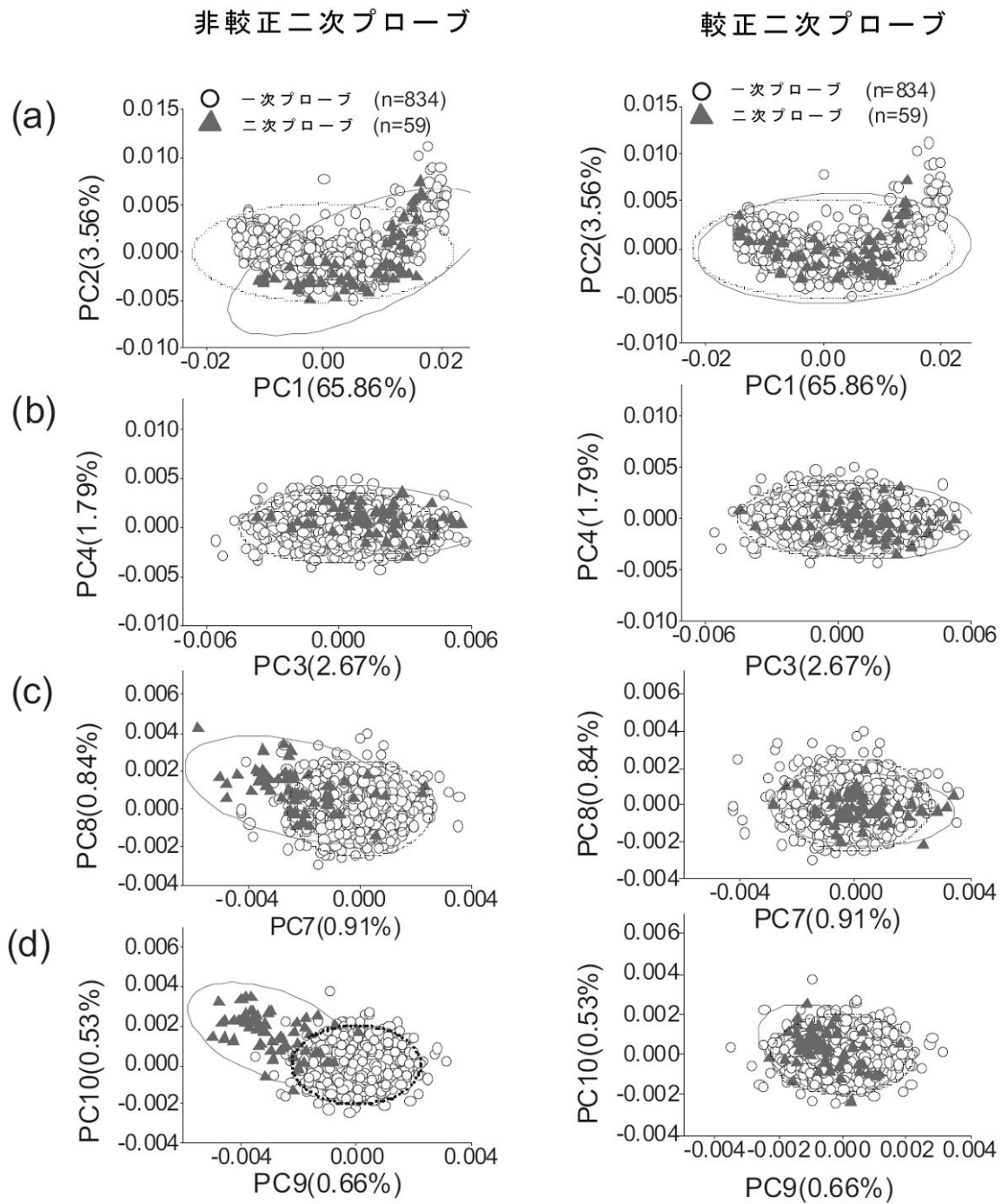
【図 8】



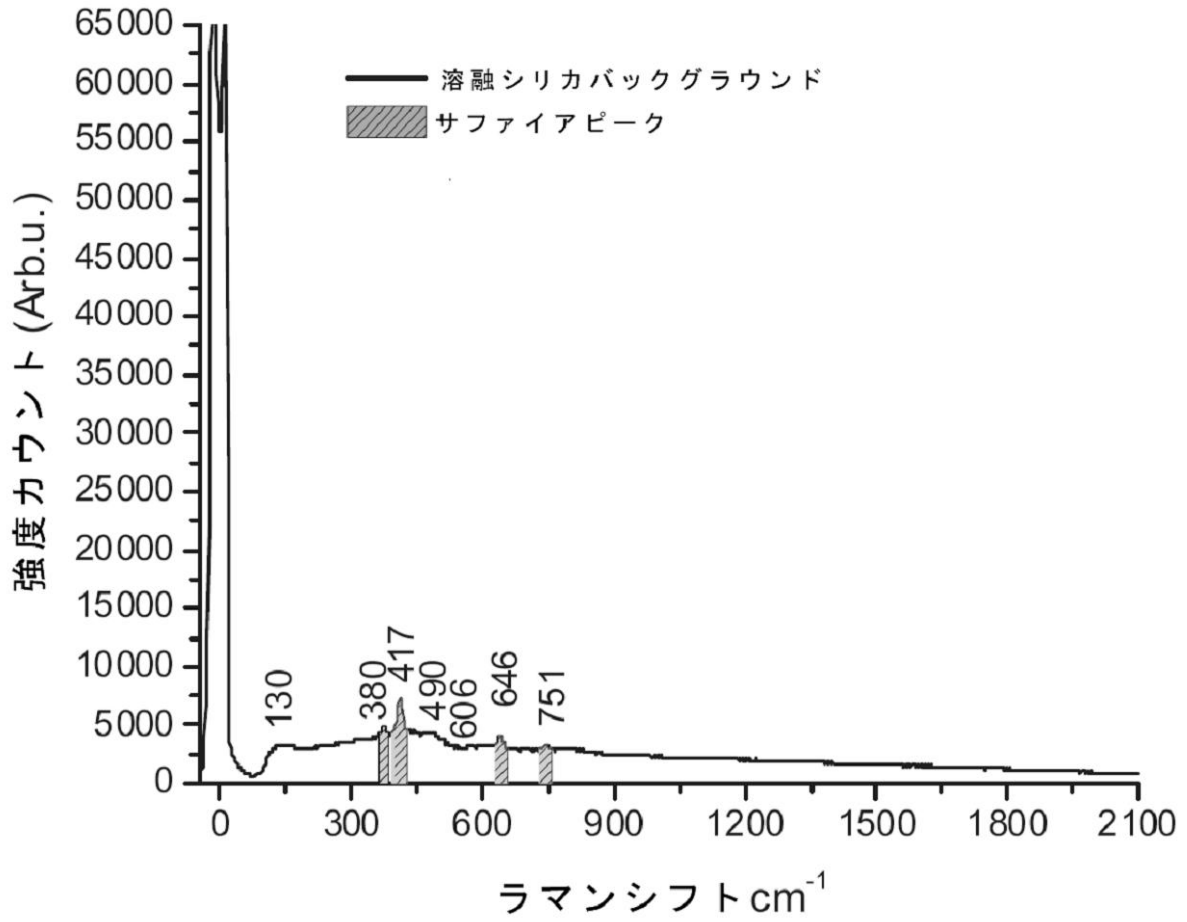
【図9】



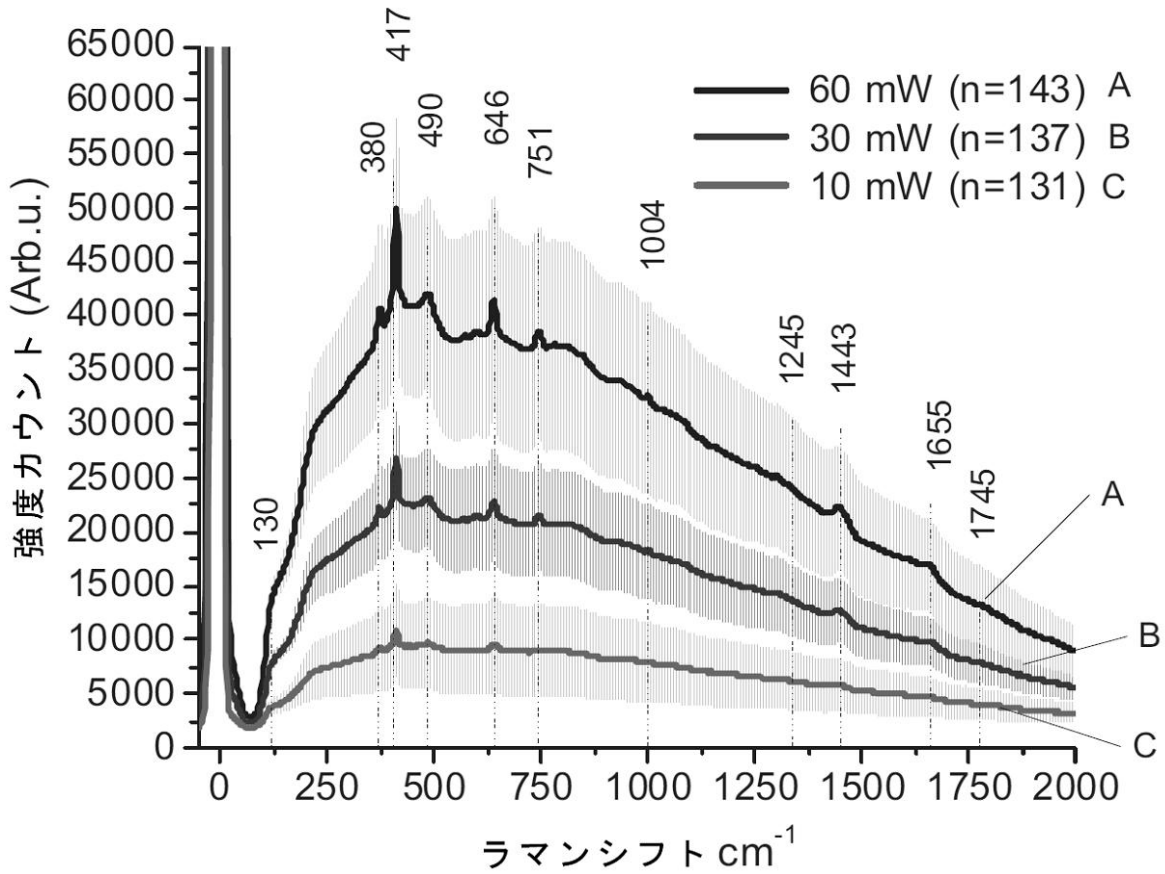
【 図 1 0 】



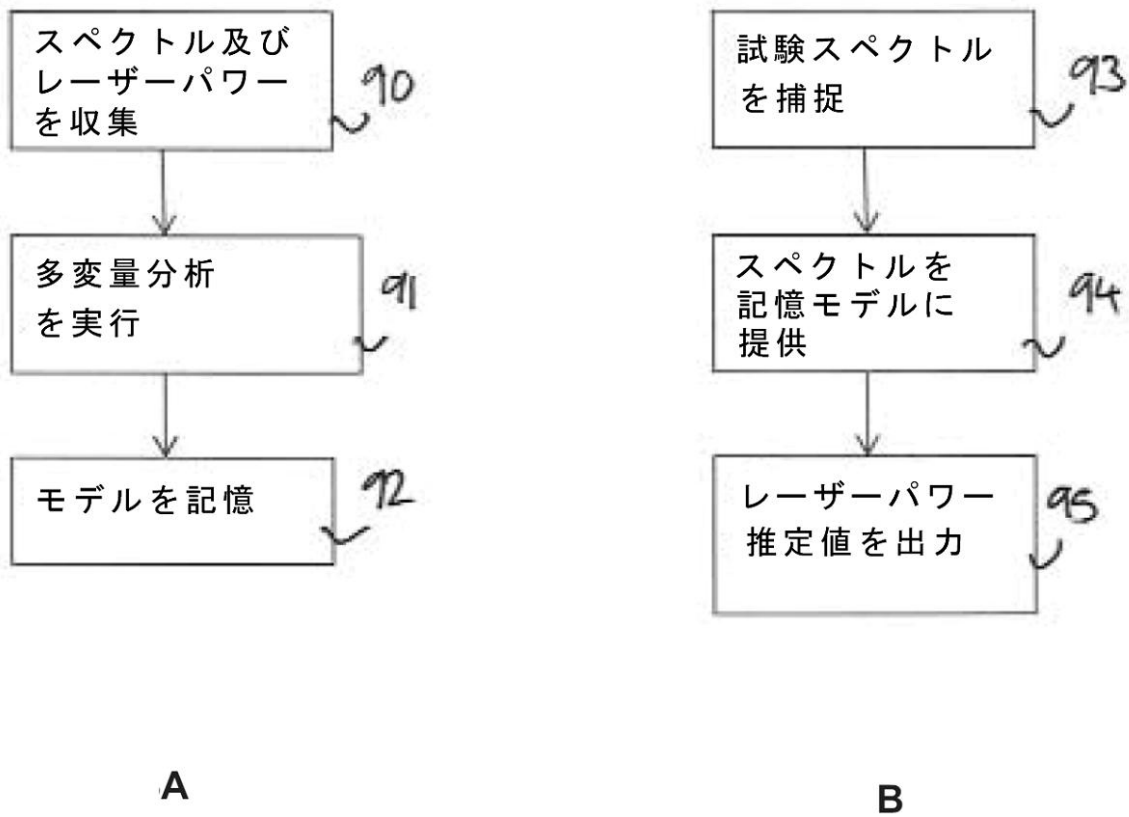
【図 1 1】



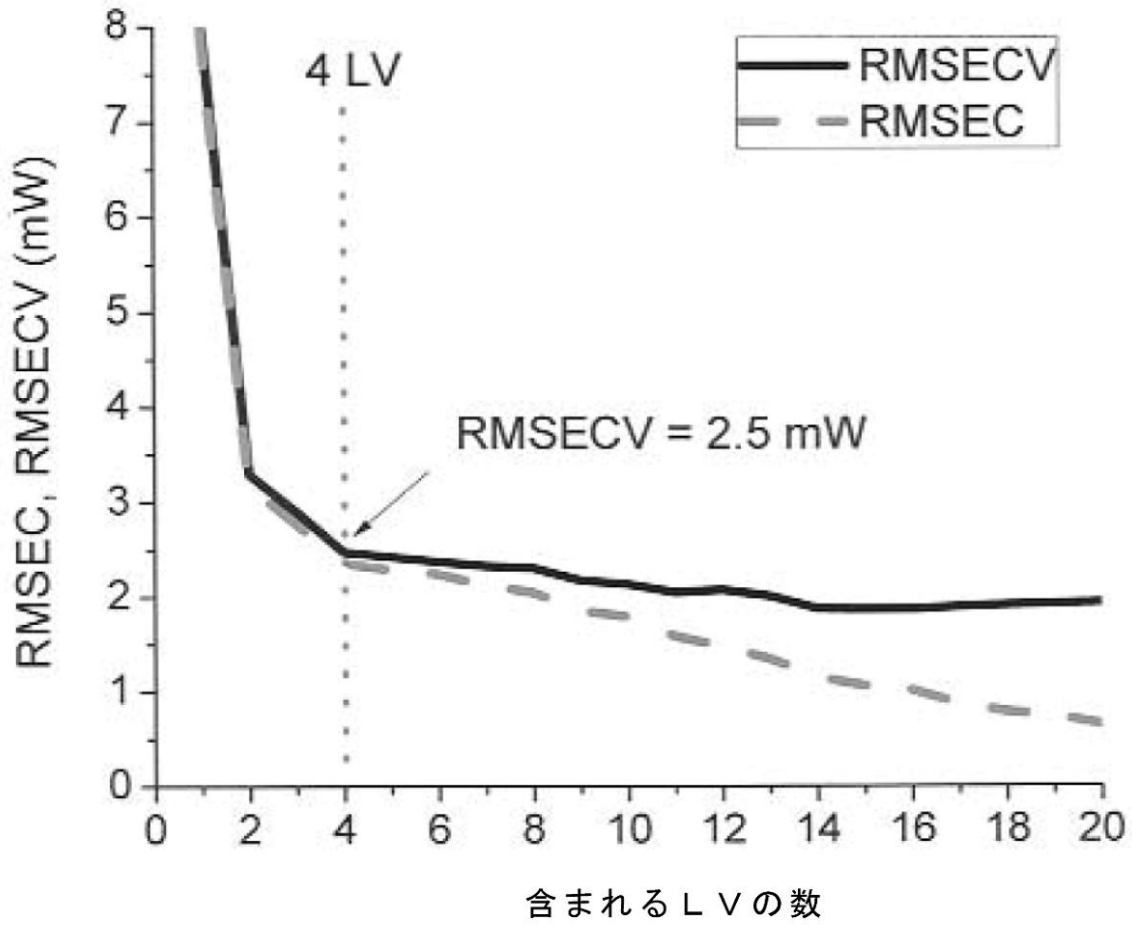
【図 1 2】



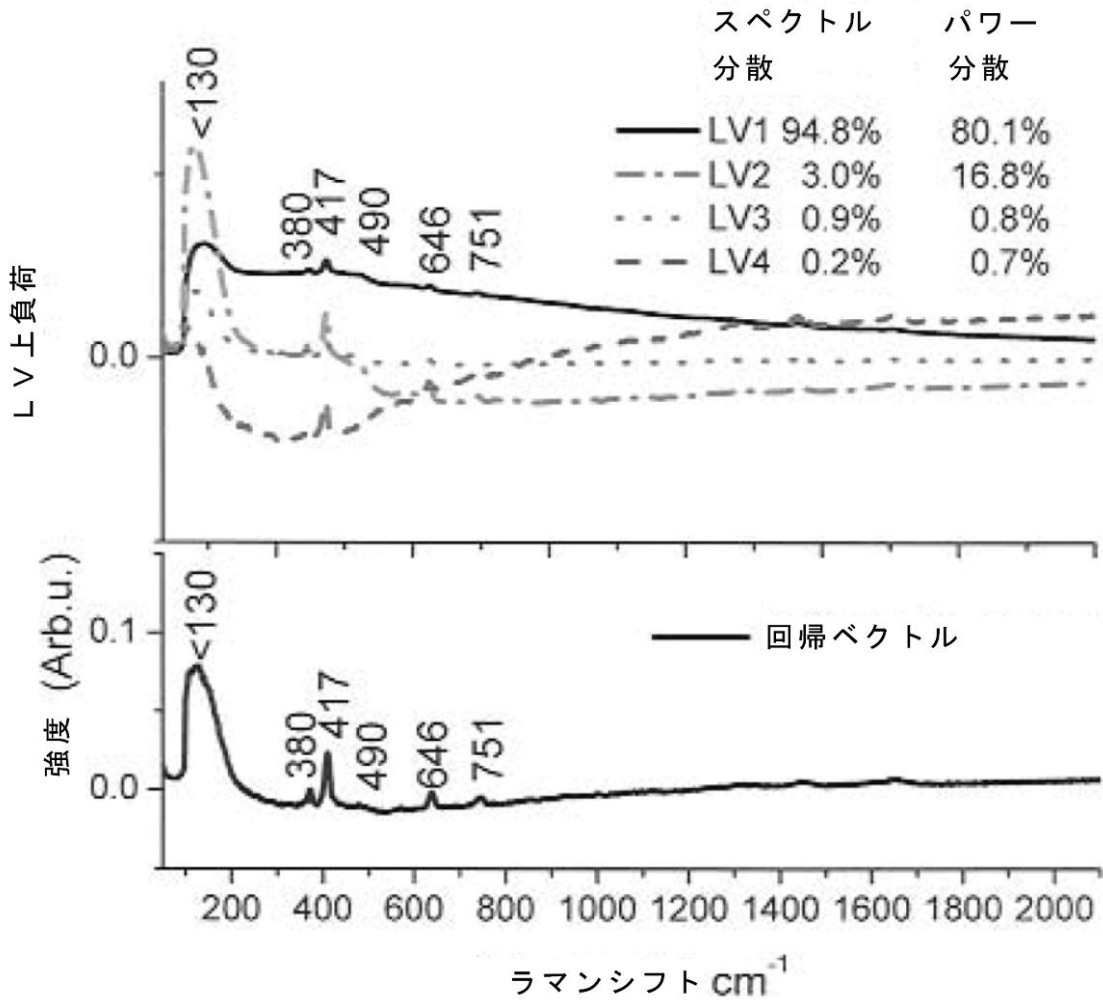
【図 1 3】



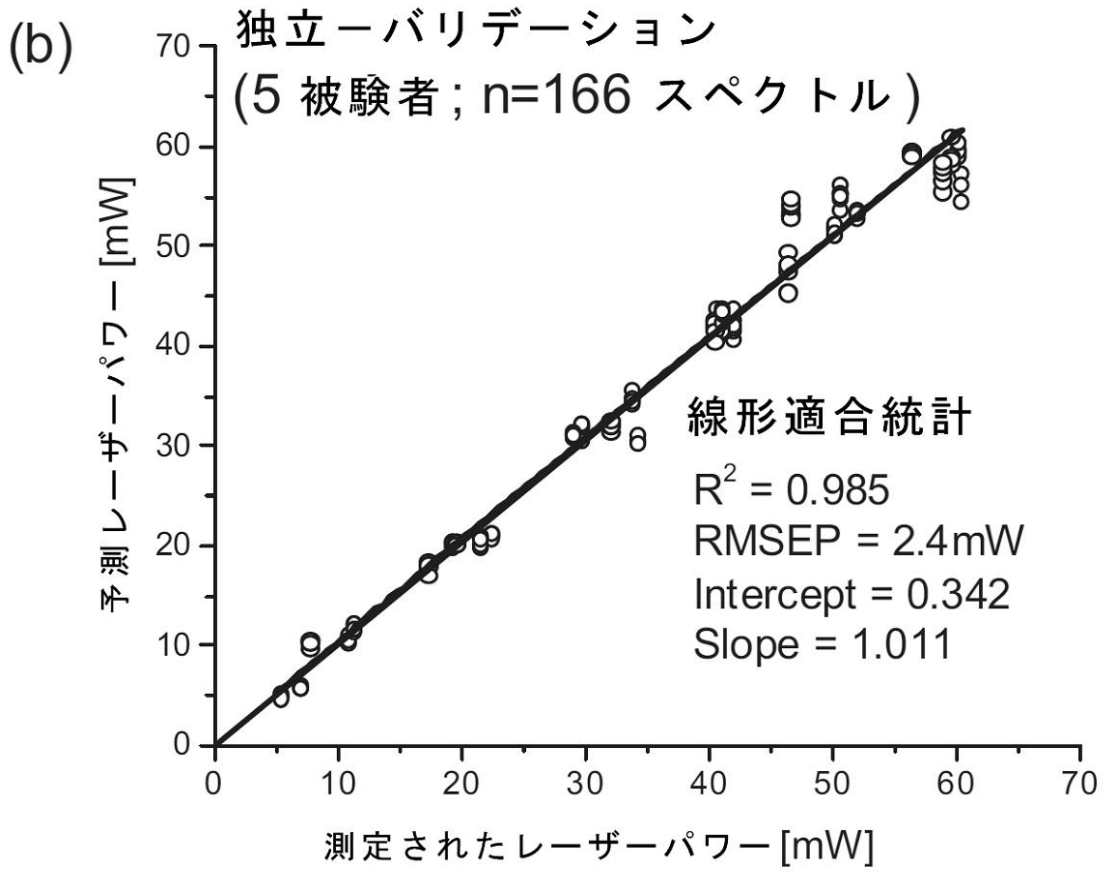
【図 14 A】



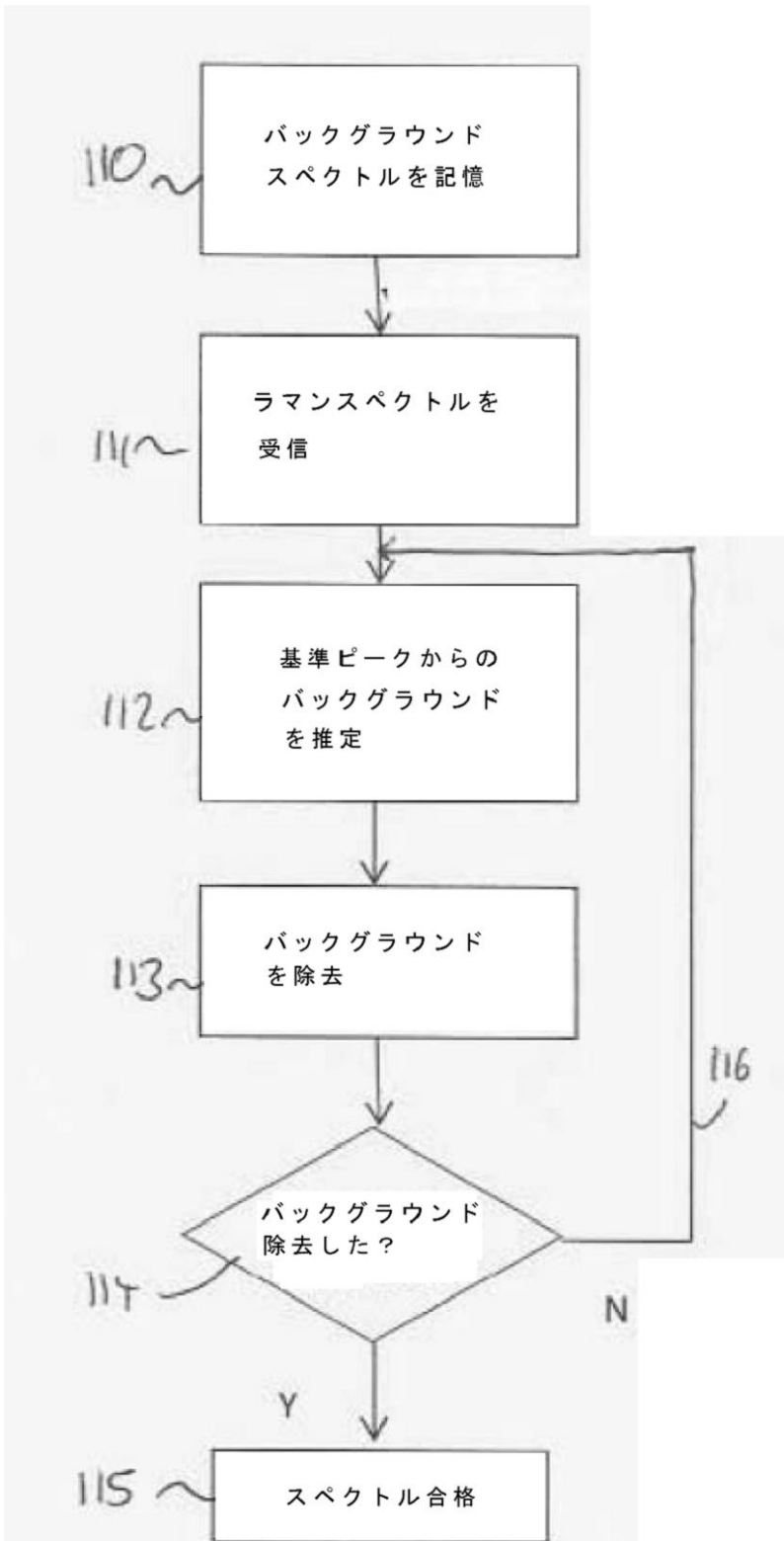
【図 1 4 B】



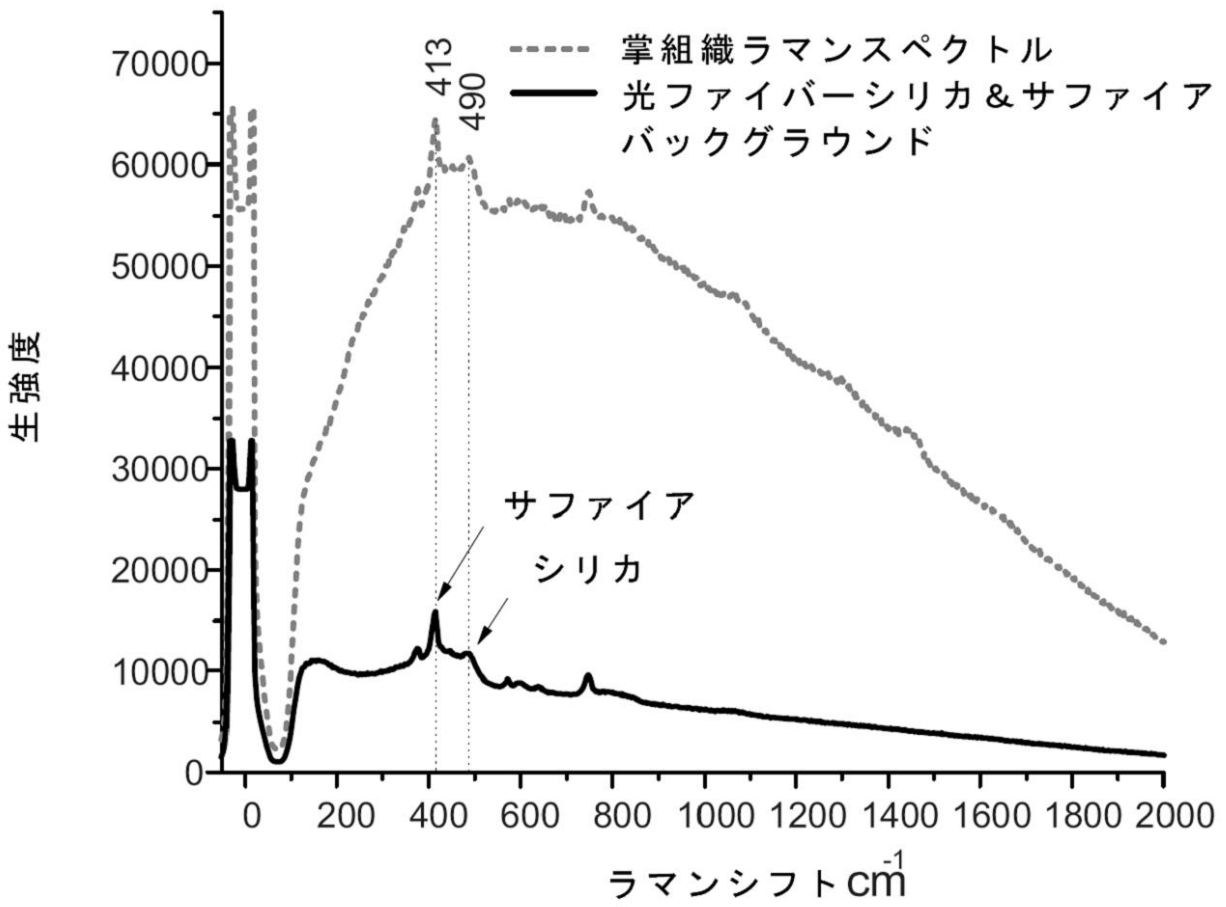
【 図 1 5 】



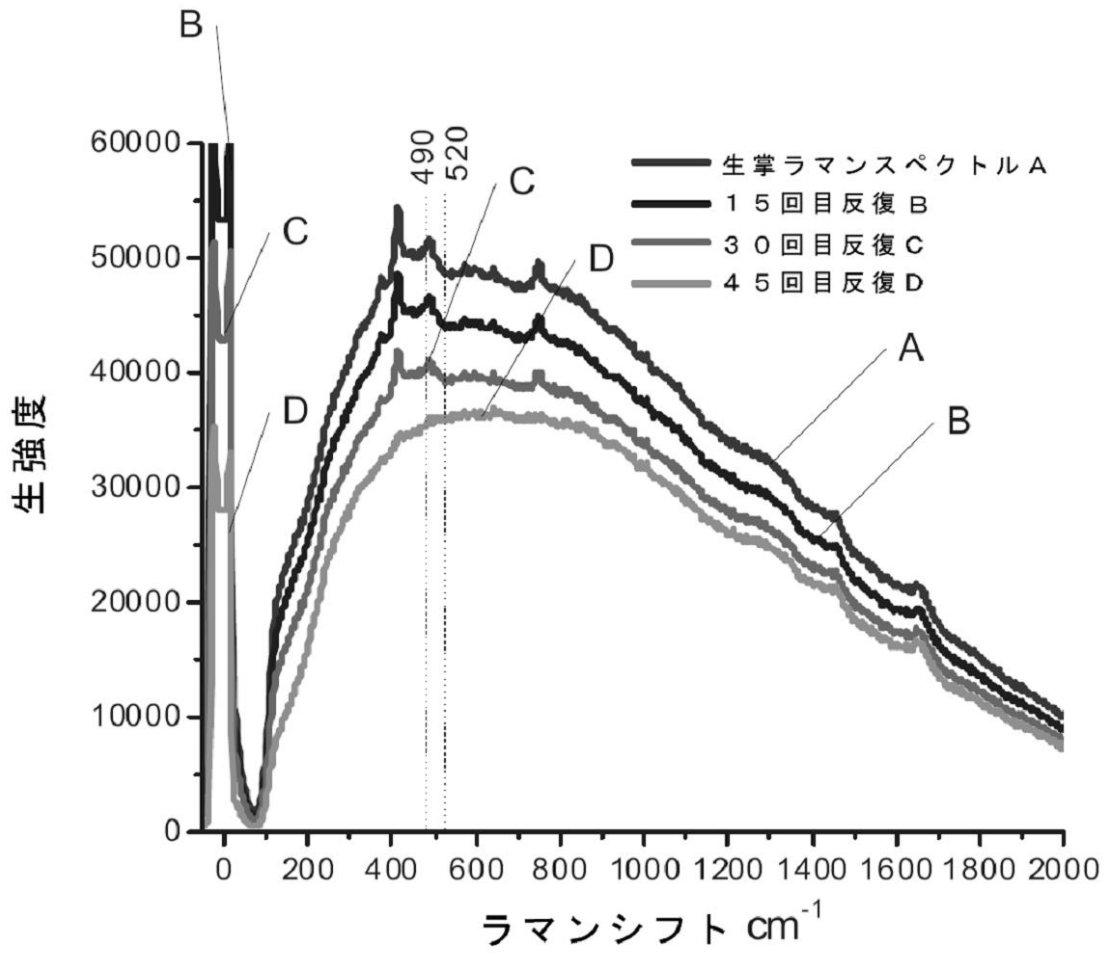
【図16】



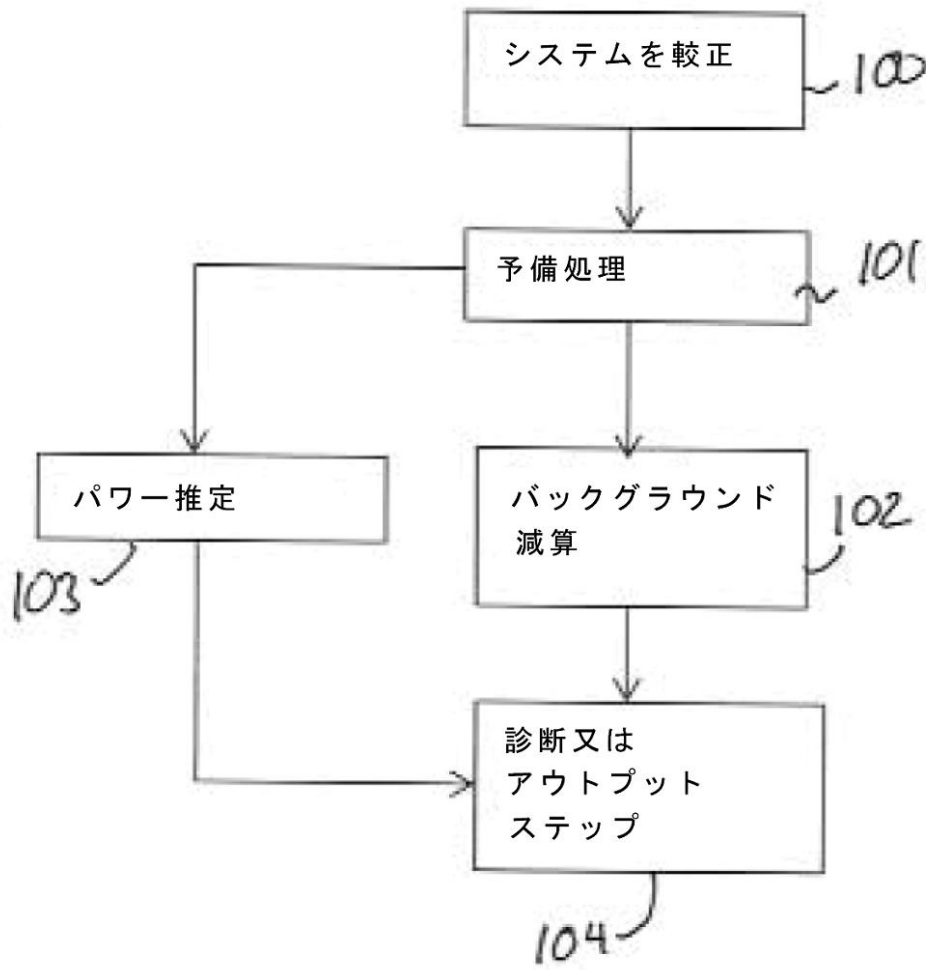
【 図 1 7 】



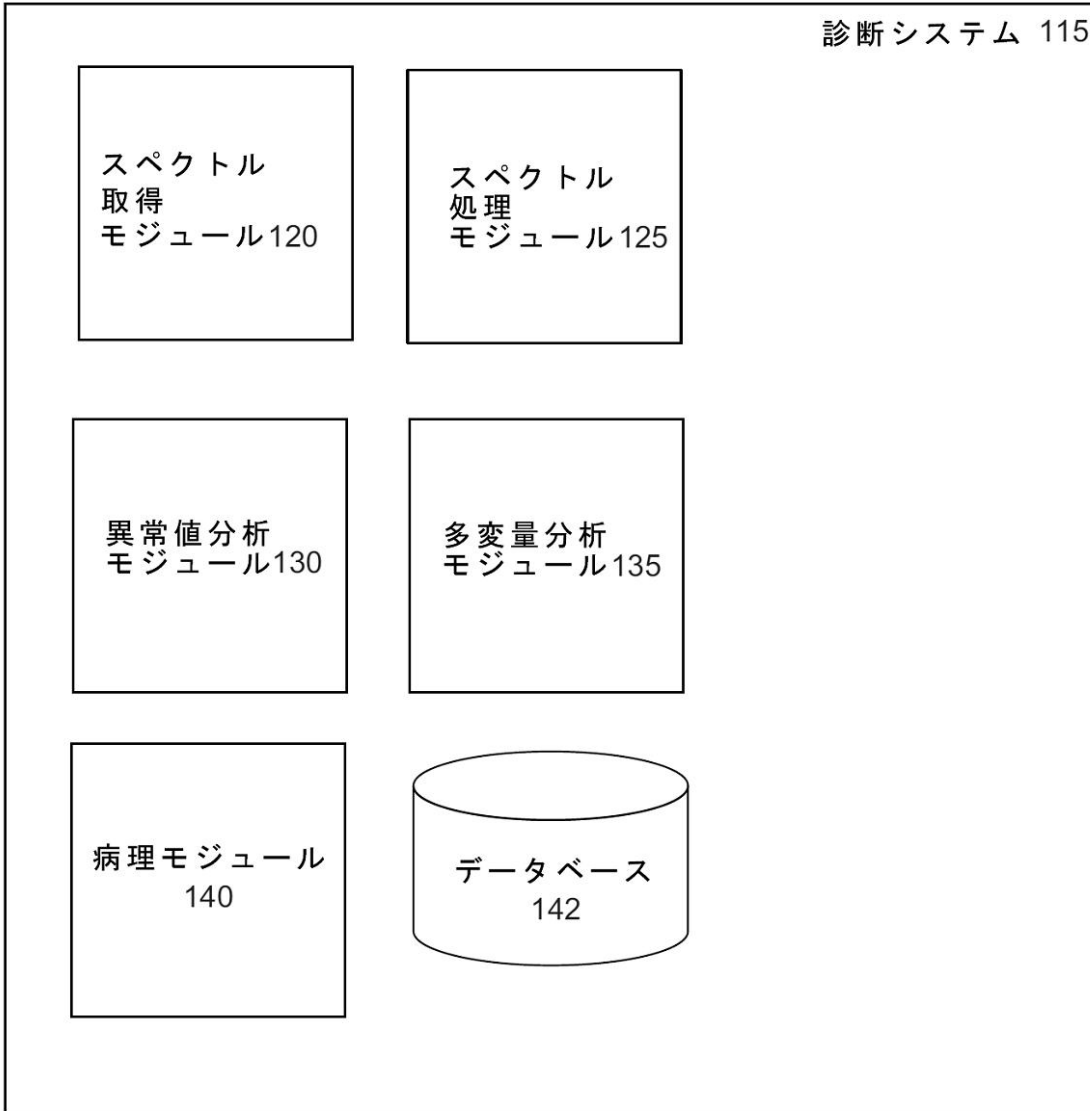
【 図 1 8 】



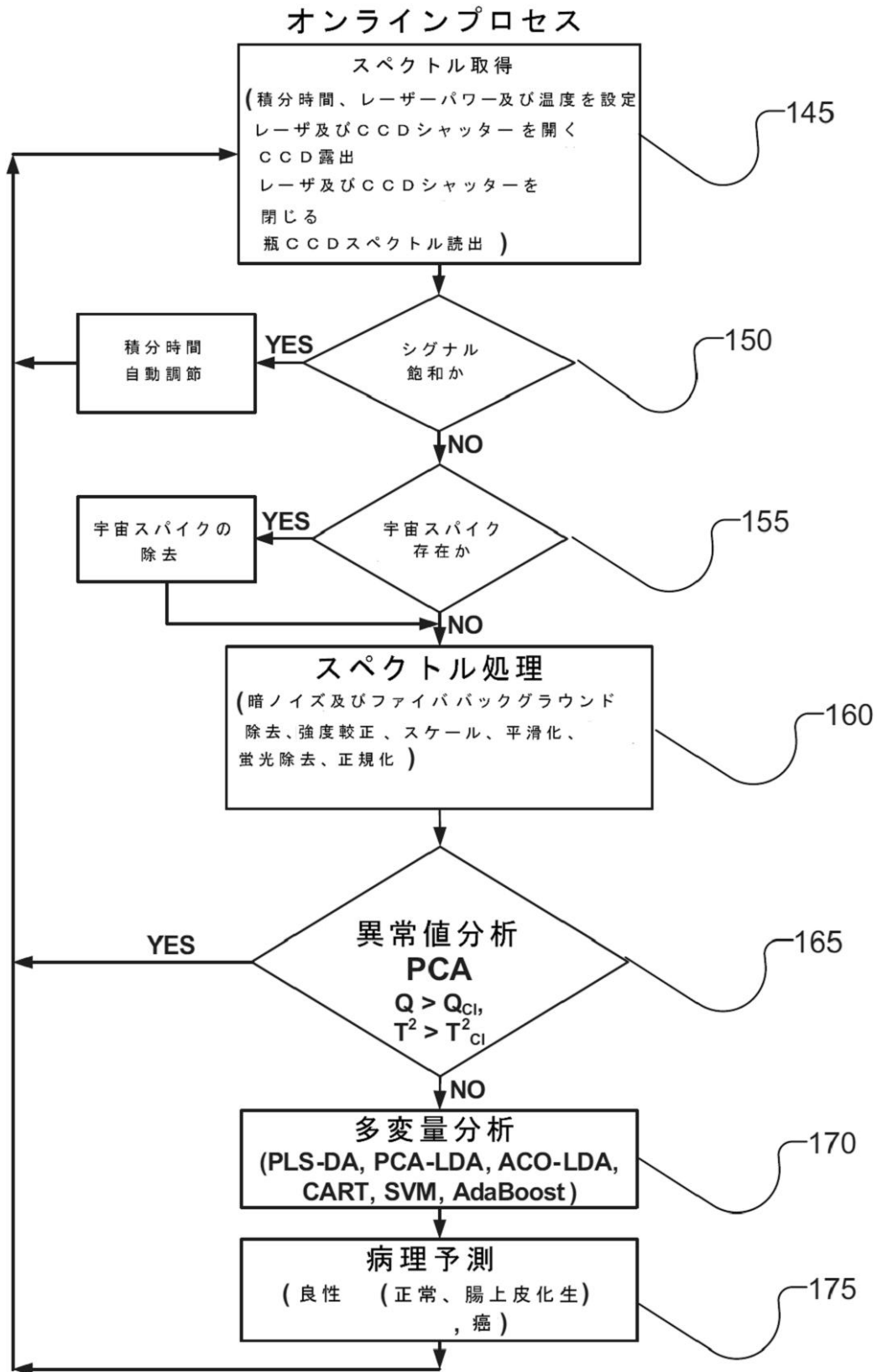
【図19】



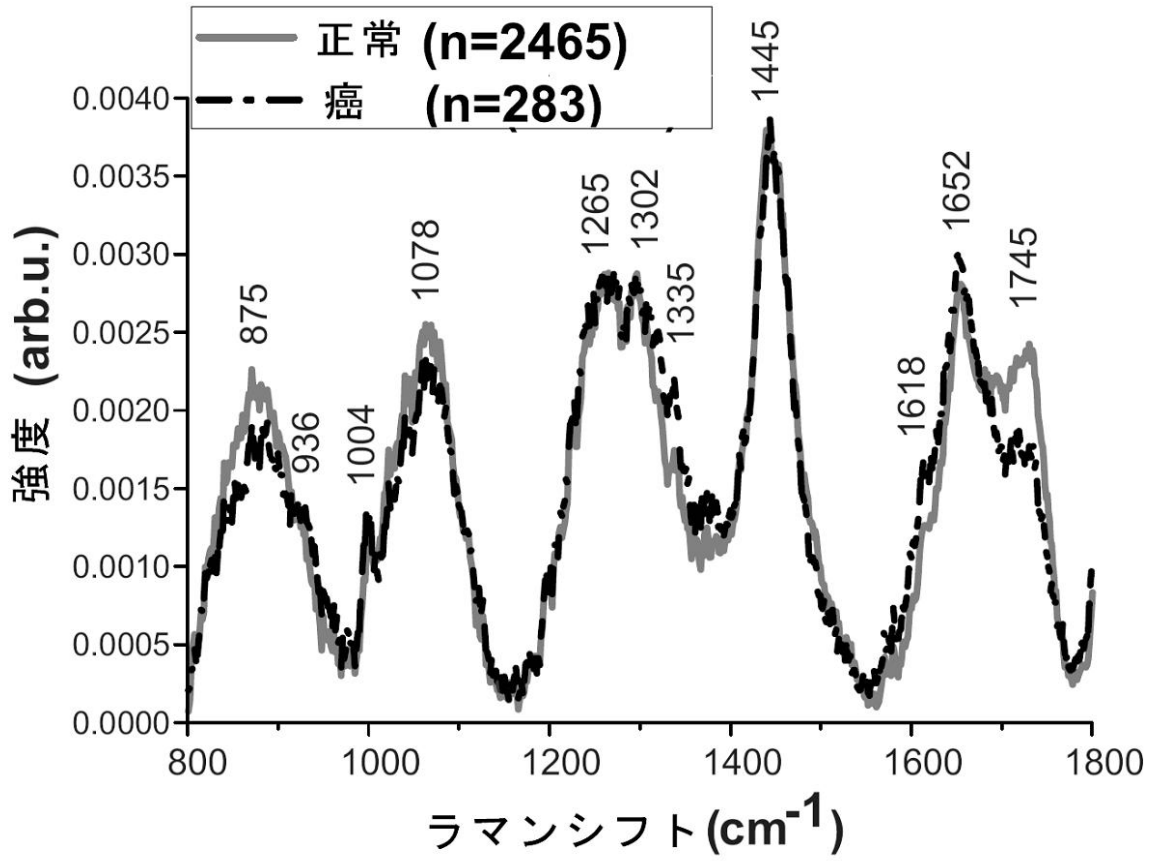
【図 20】



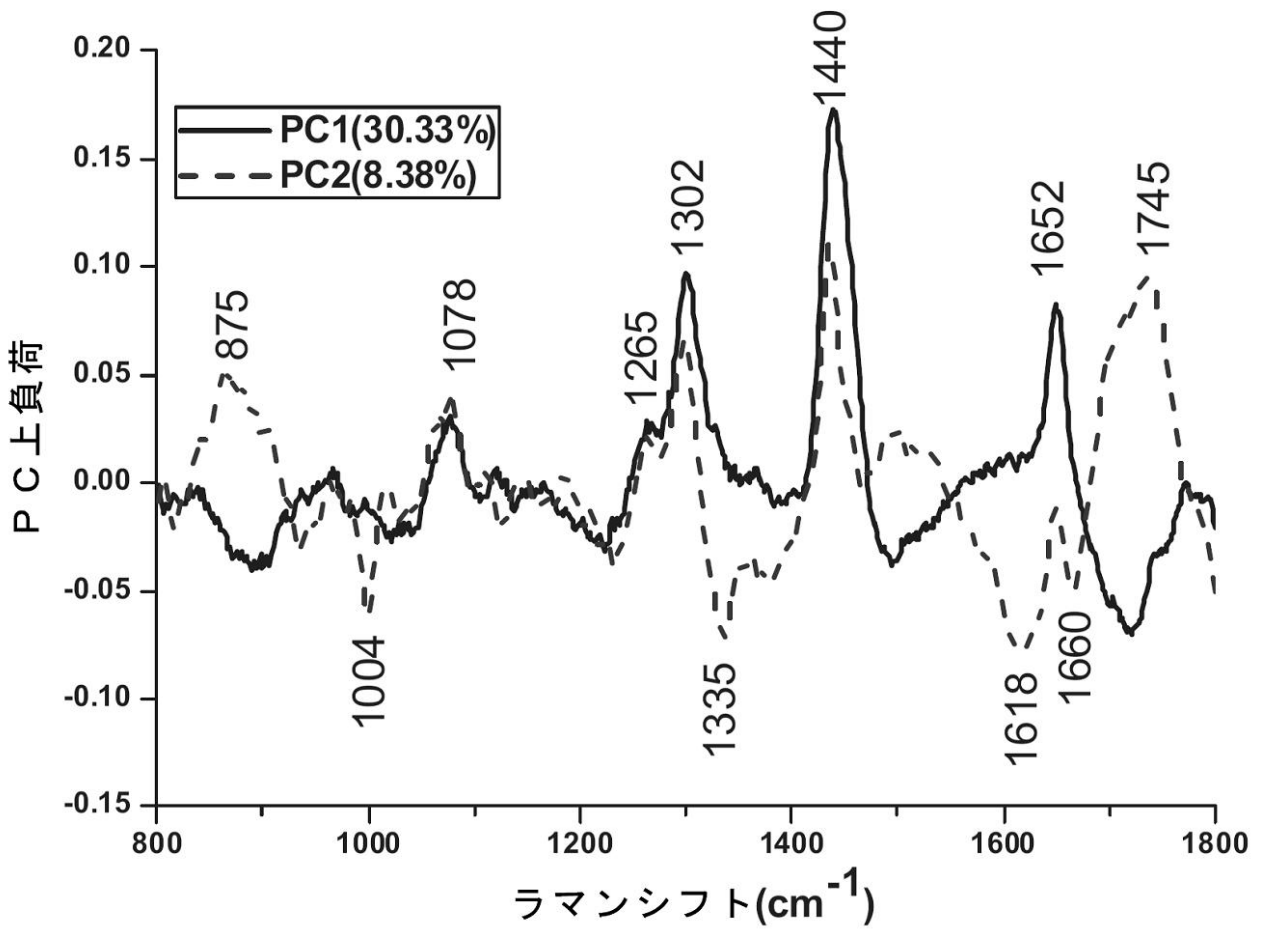
【図 2 1】



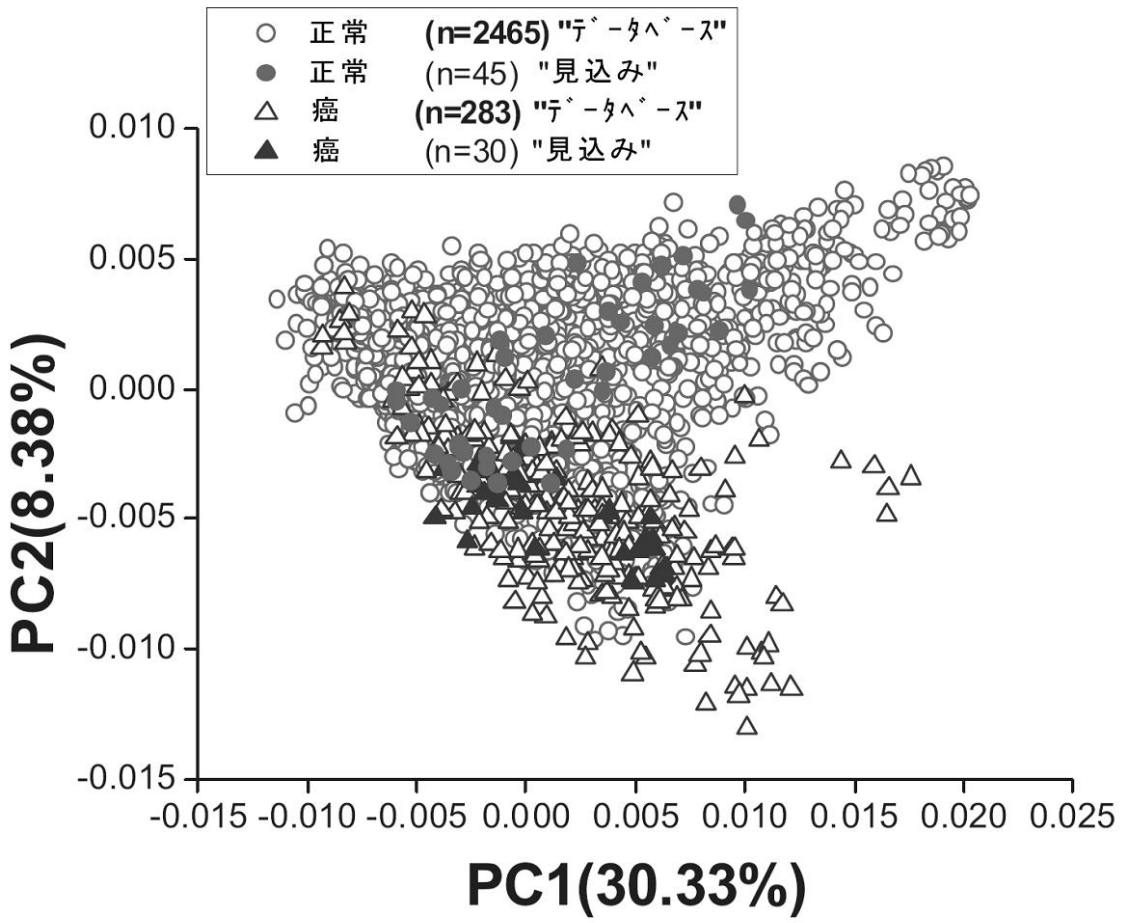
【 図 2 3 】



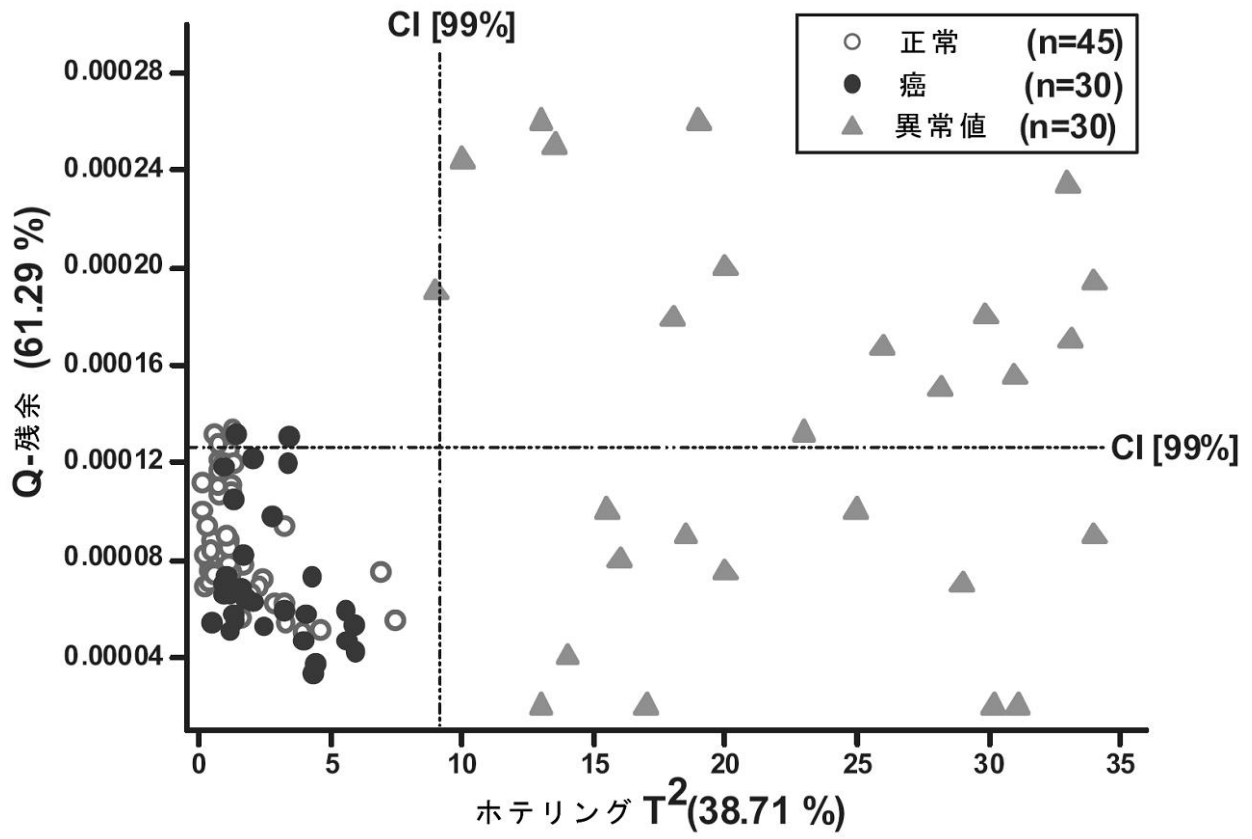
【 図 2 4 】



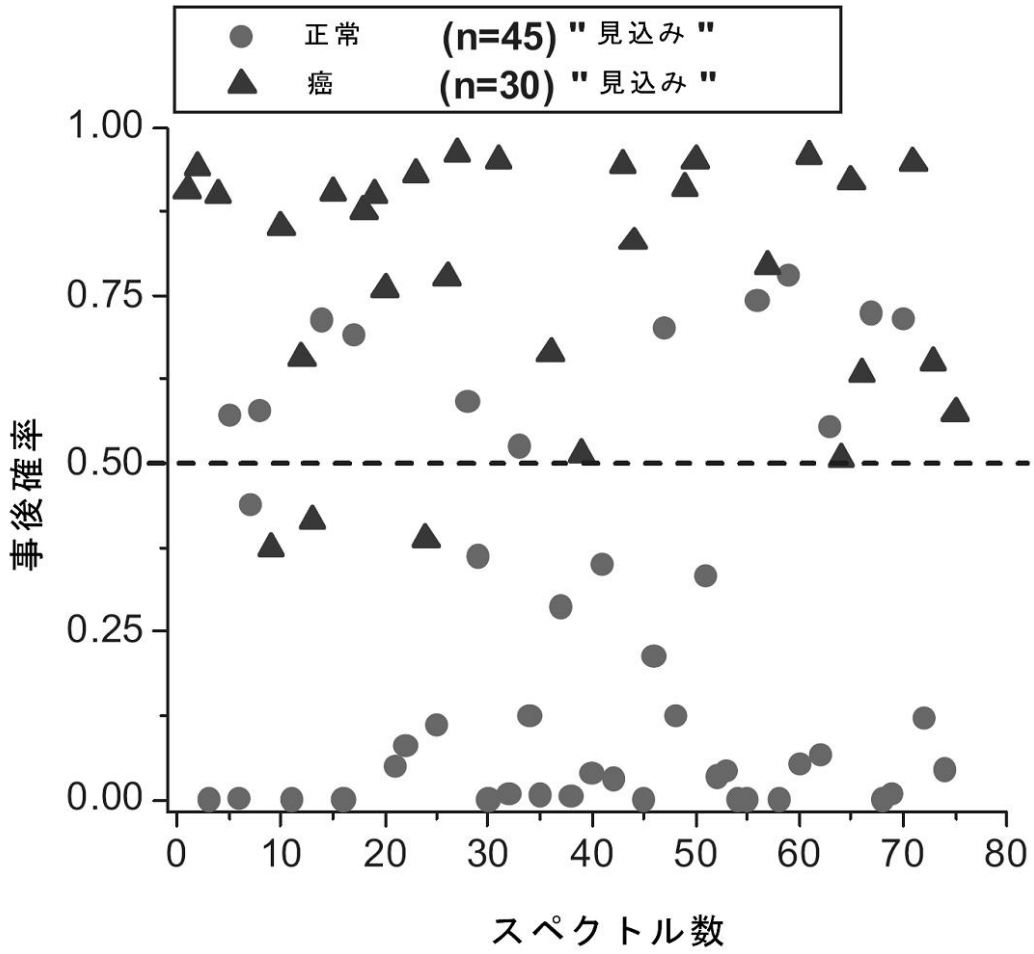
【 図 2 5 】



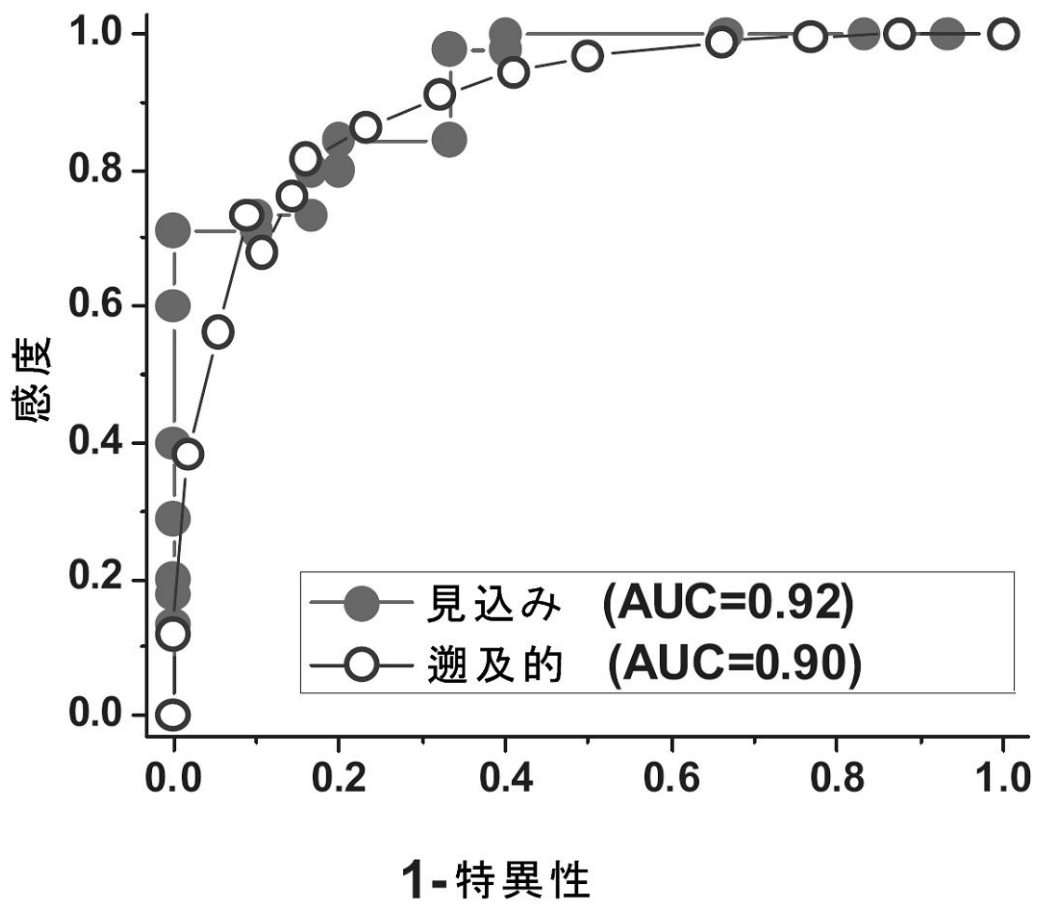
【 図 2 6 】



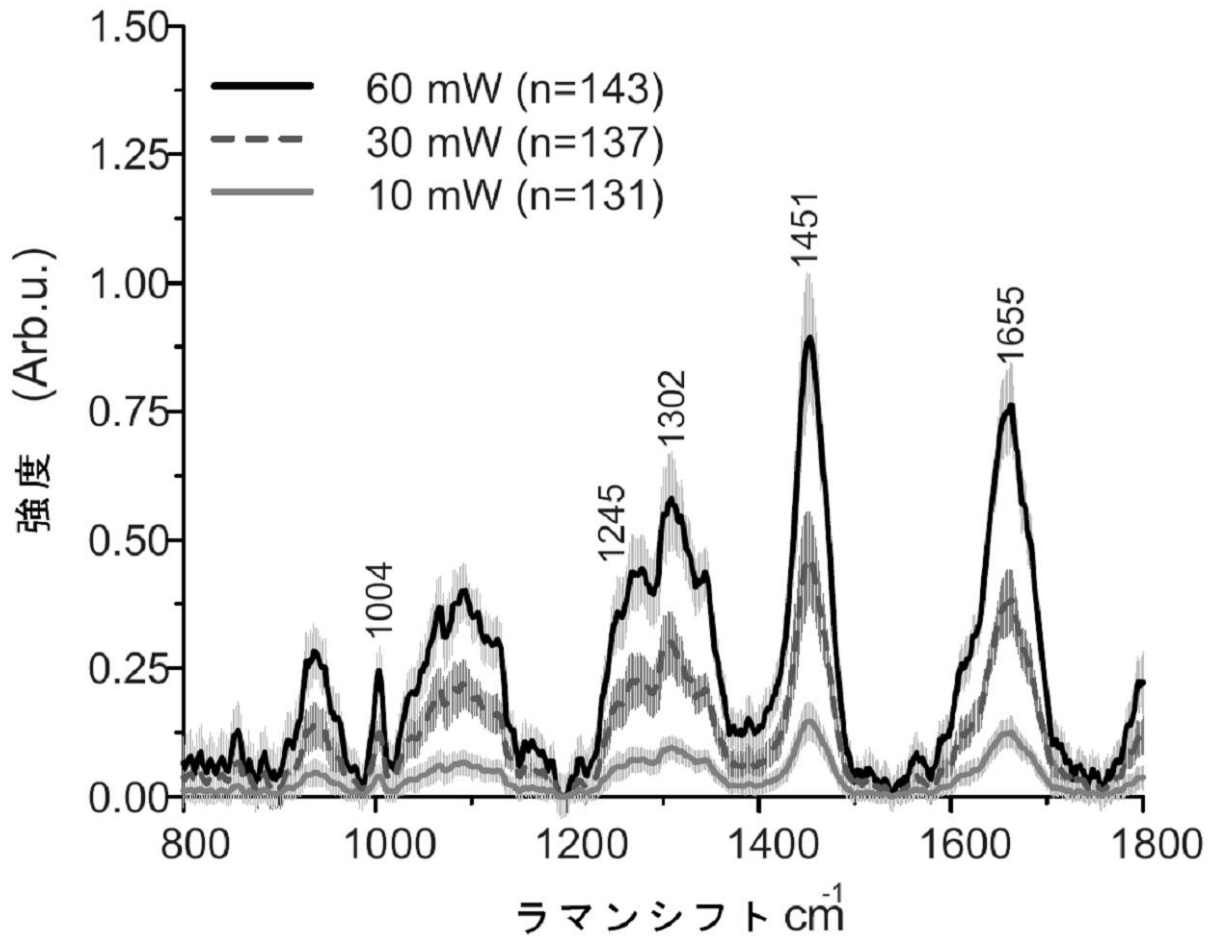
【 図 2 7 】



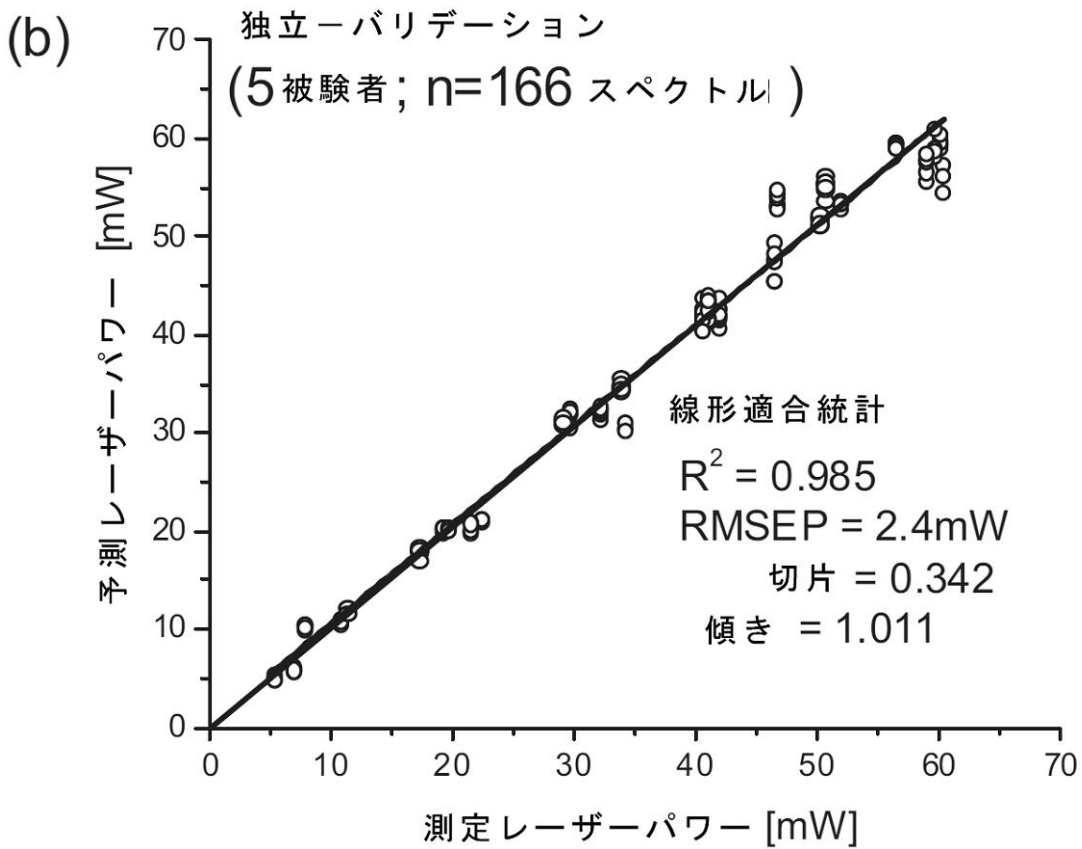
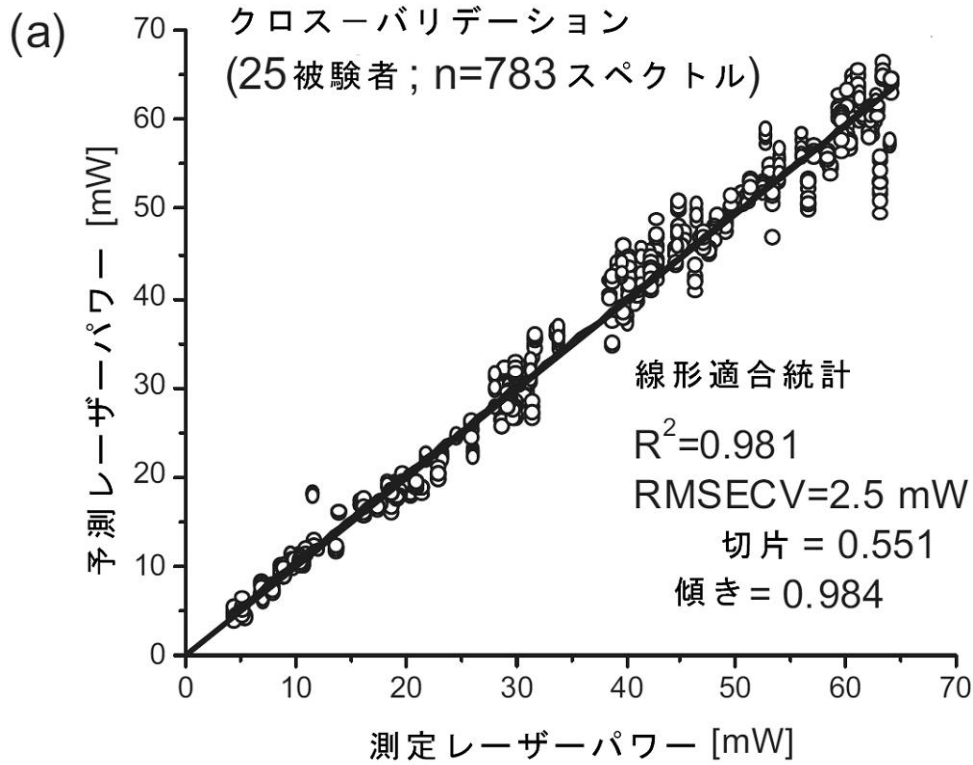
【图 2 8】



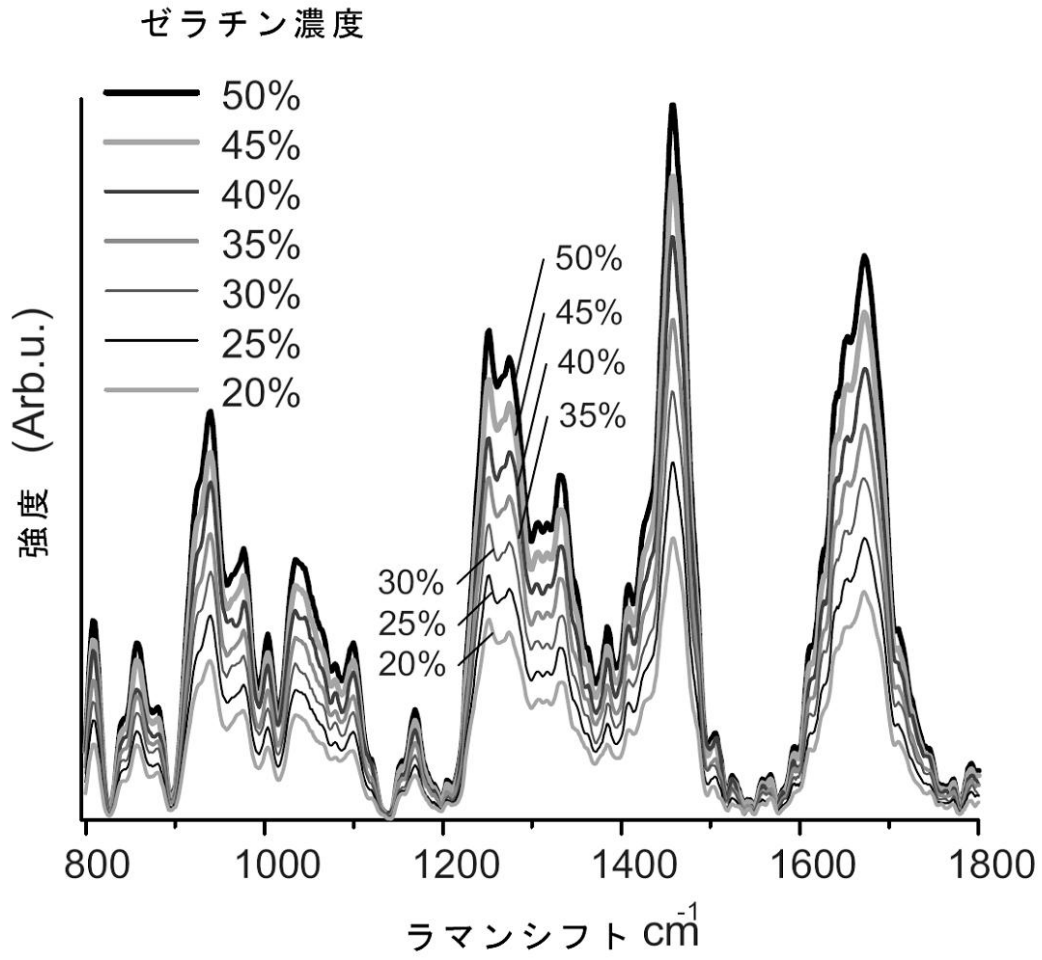
【 図 2 9 】



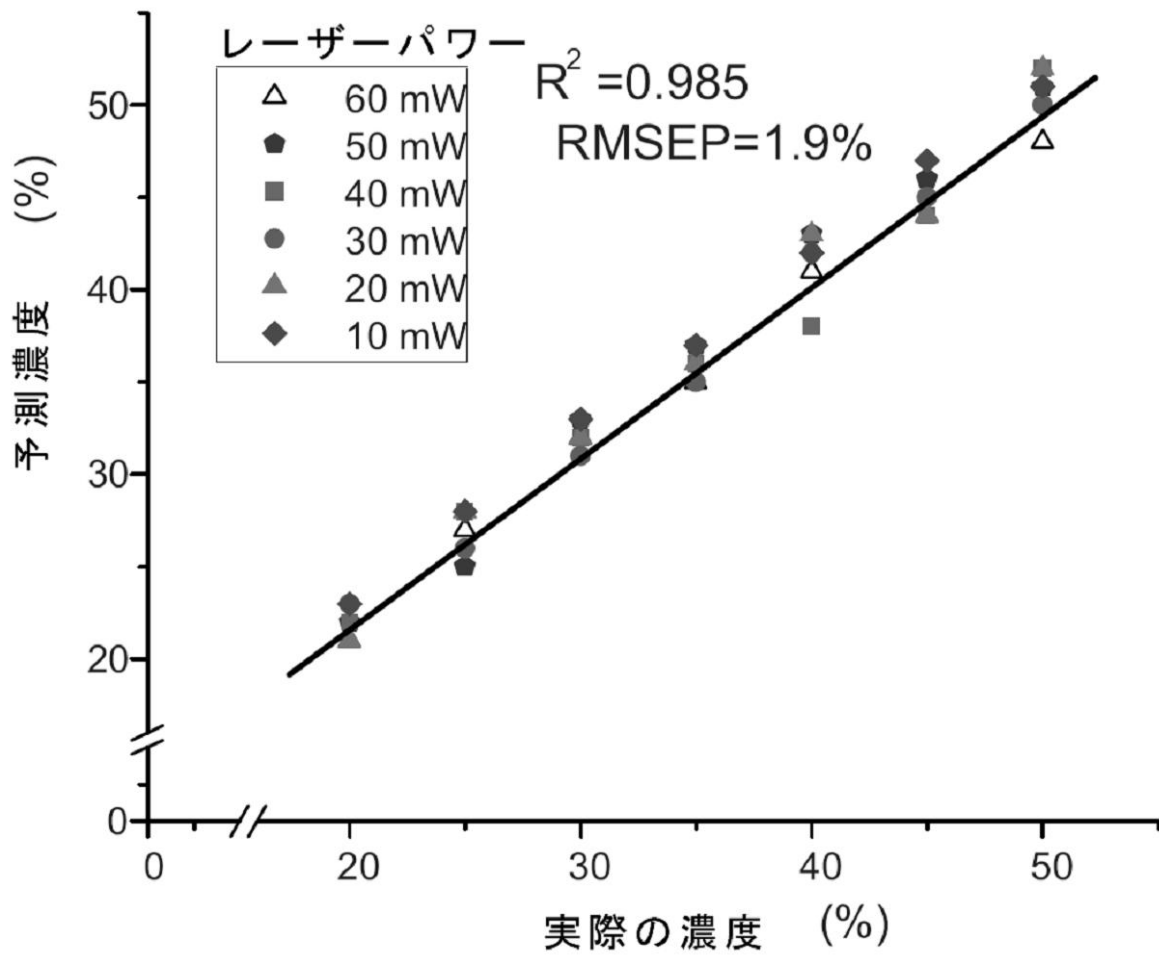
【図30】



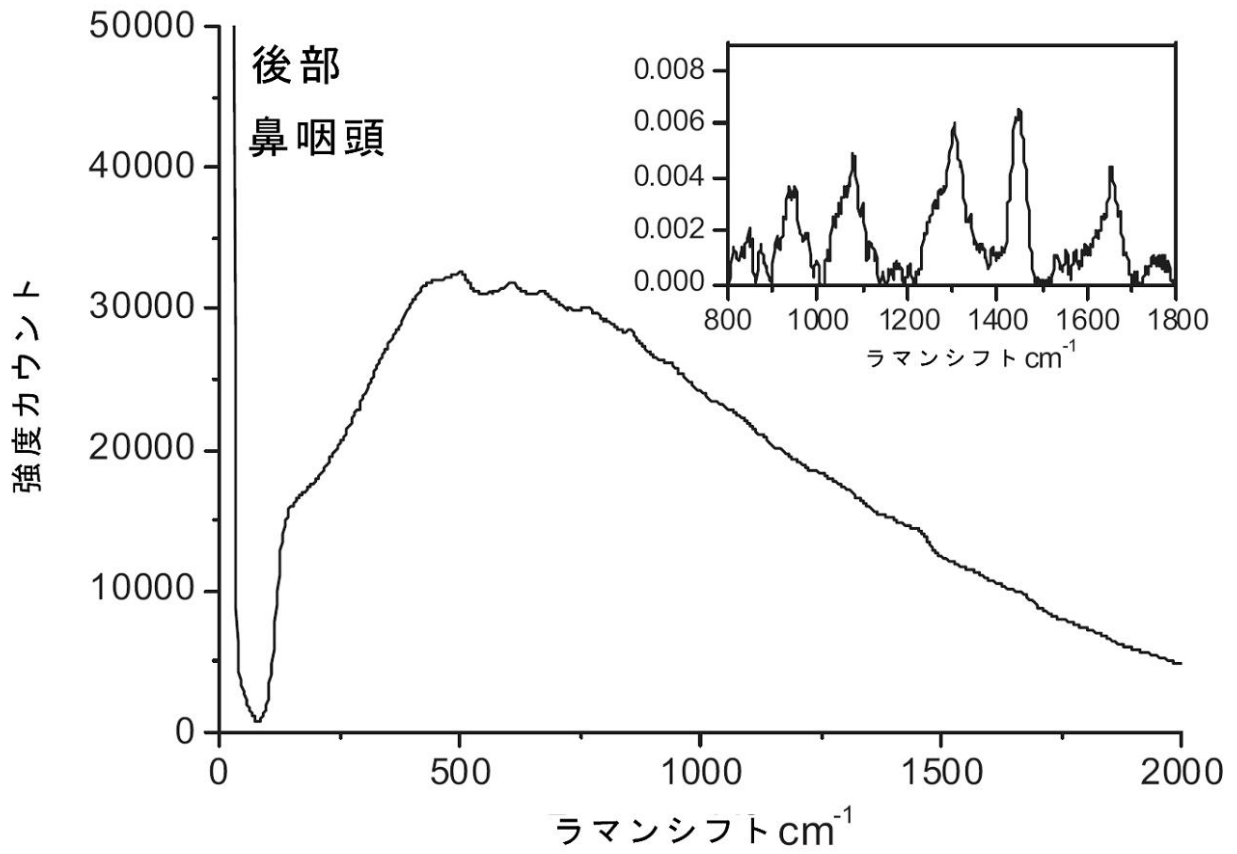
【図 3 1】



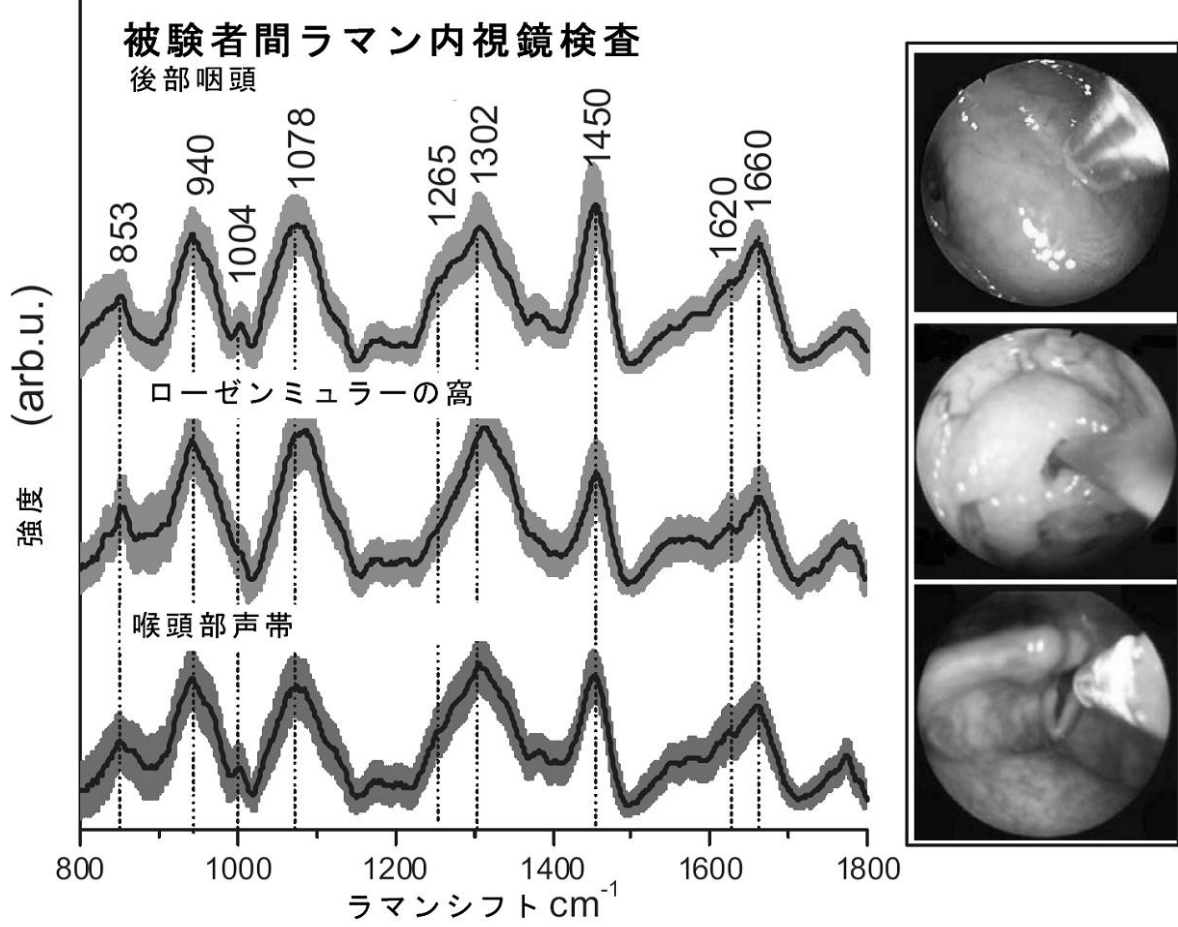
【図 3 2】



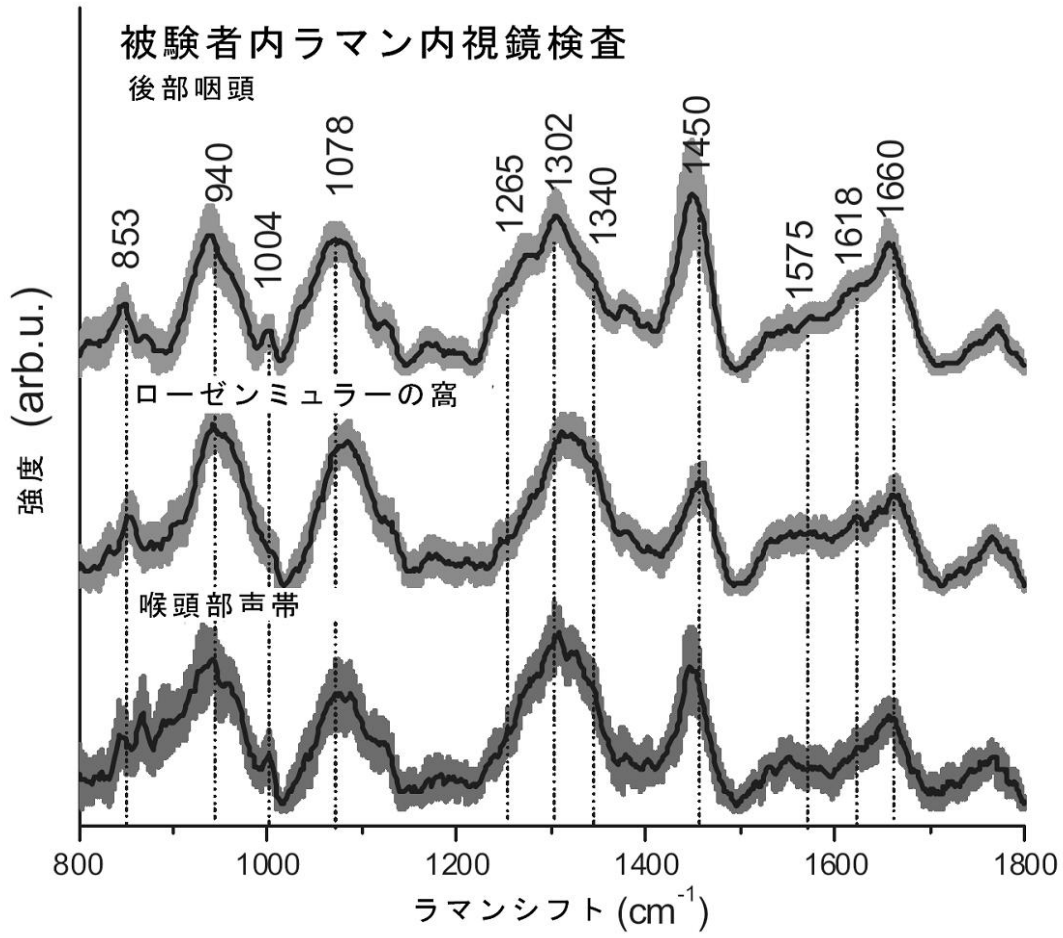
【 図 3 3 】



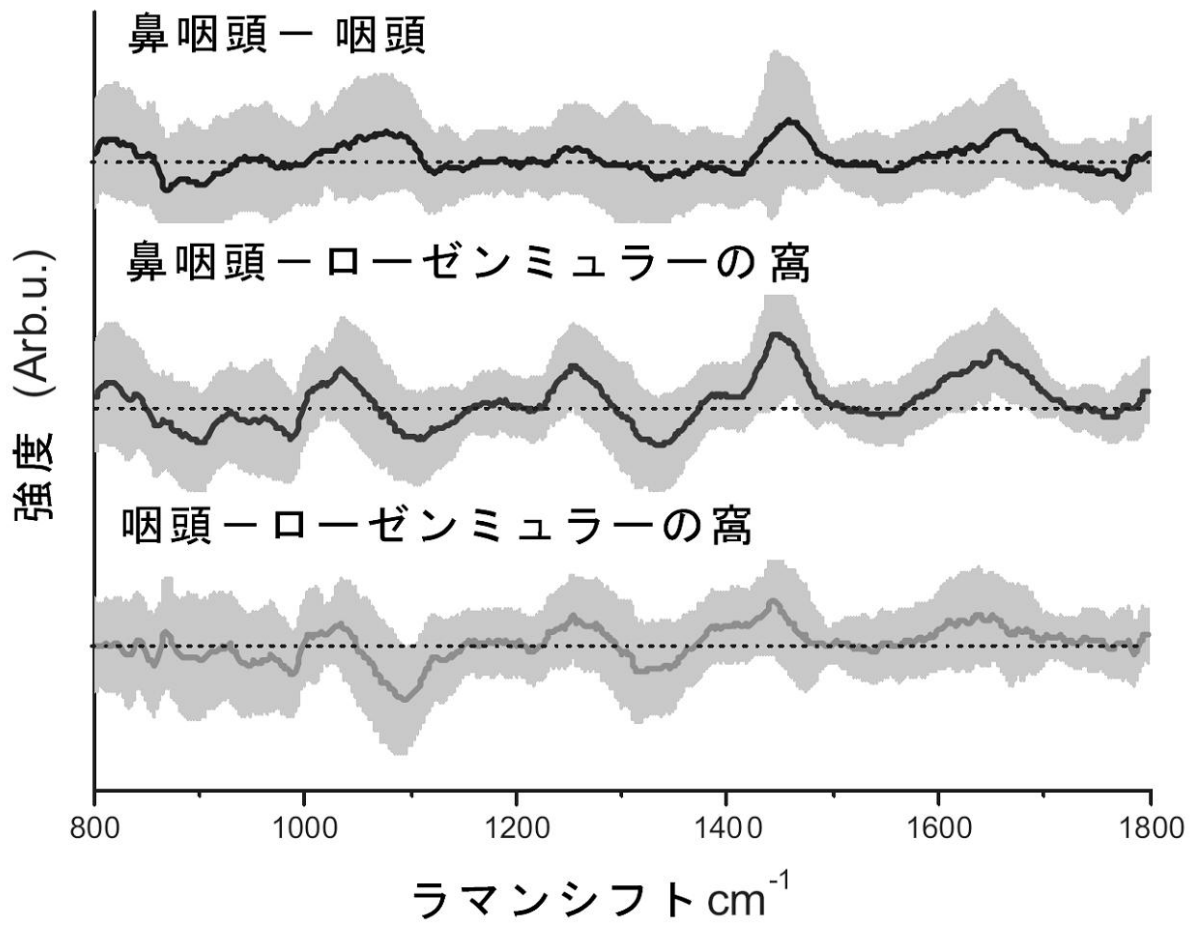
【 図 3 4 】



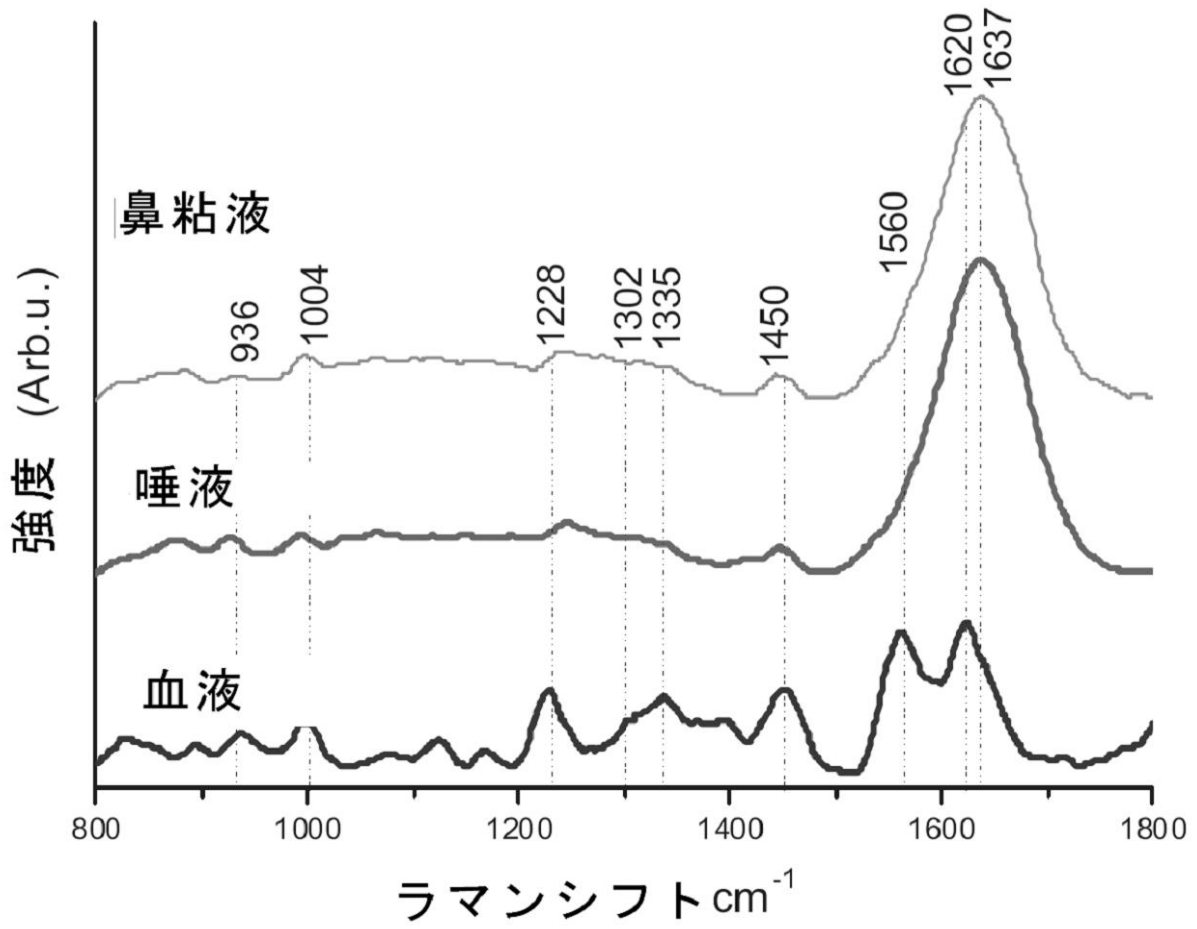
【図 3 5】



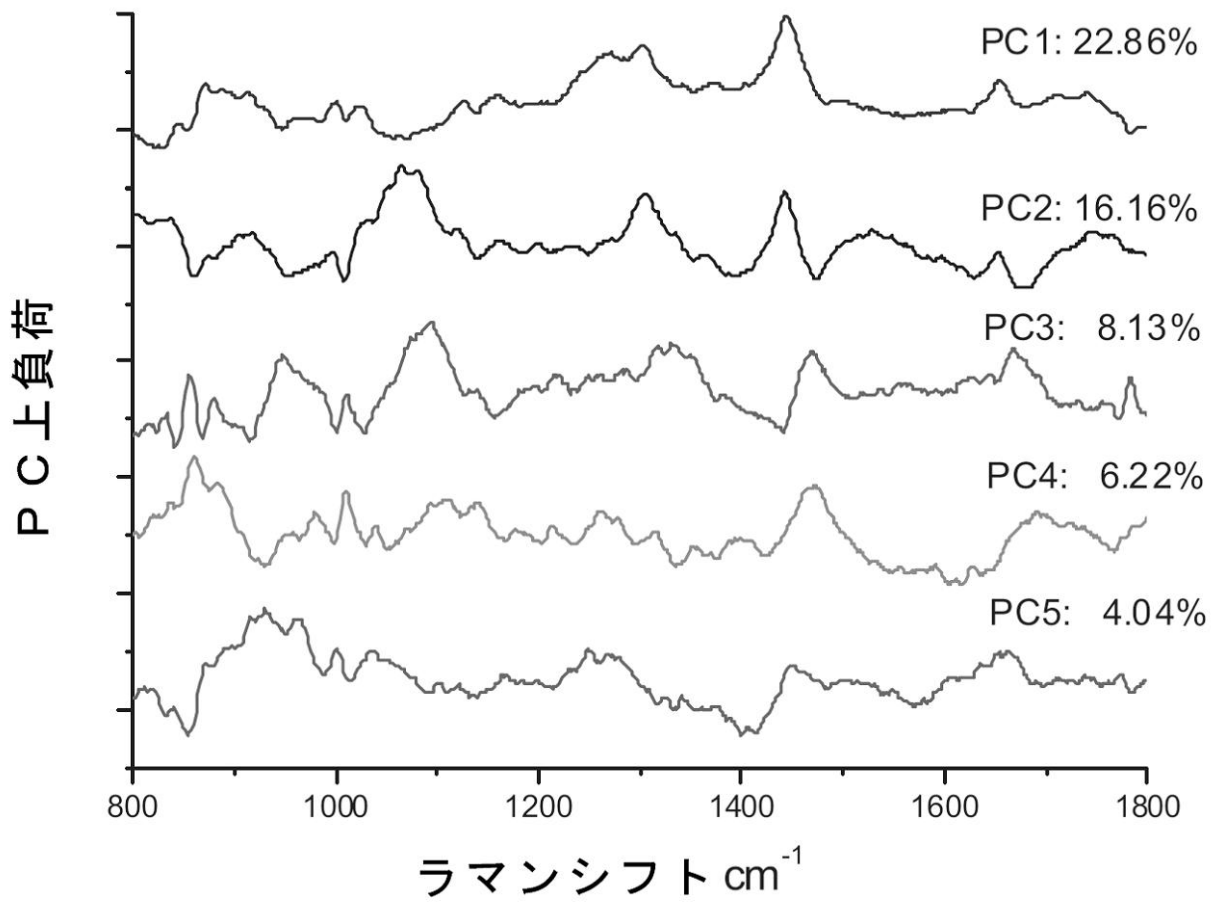
【図 3 6】



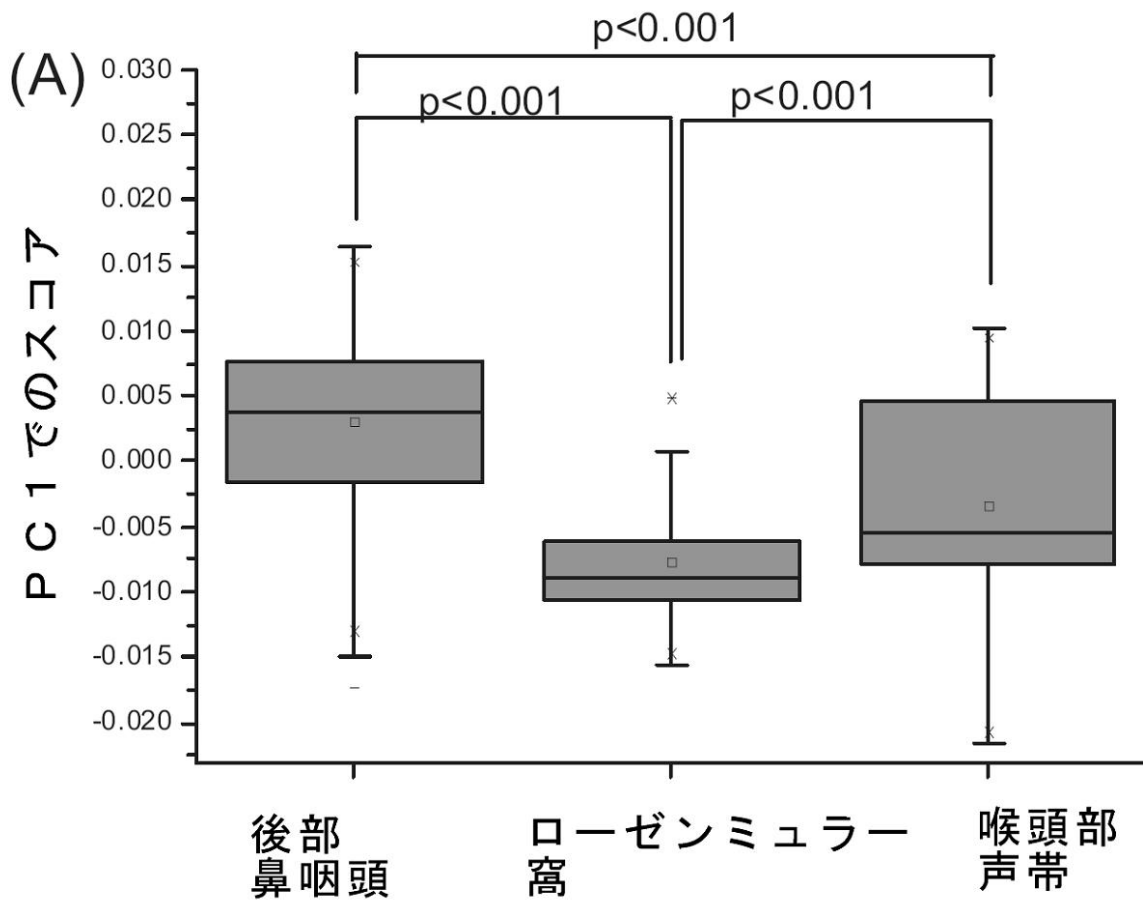
【 図 3 7 】



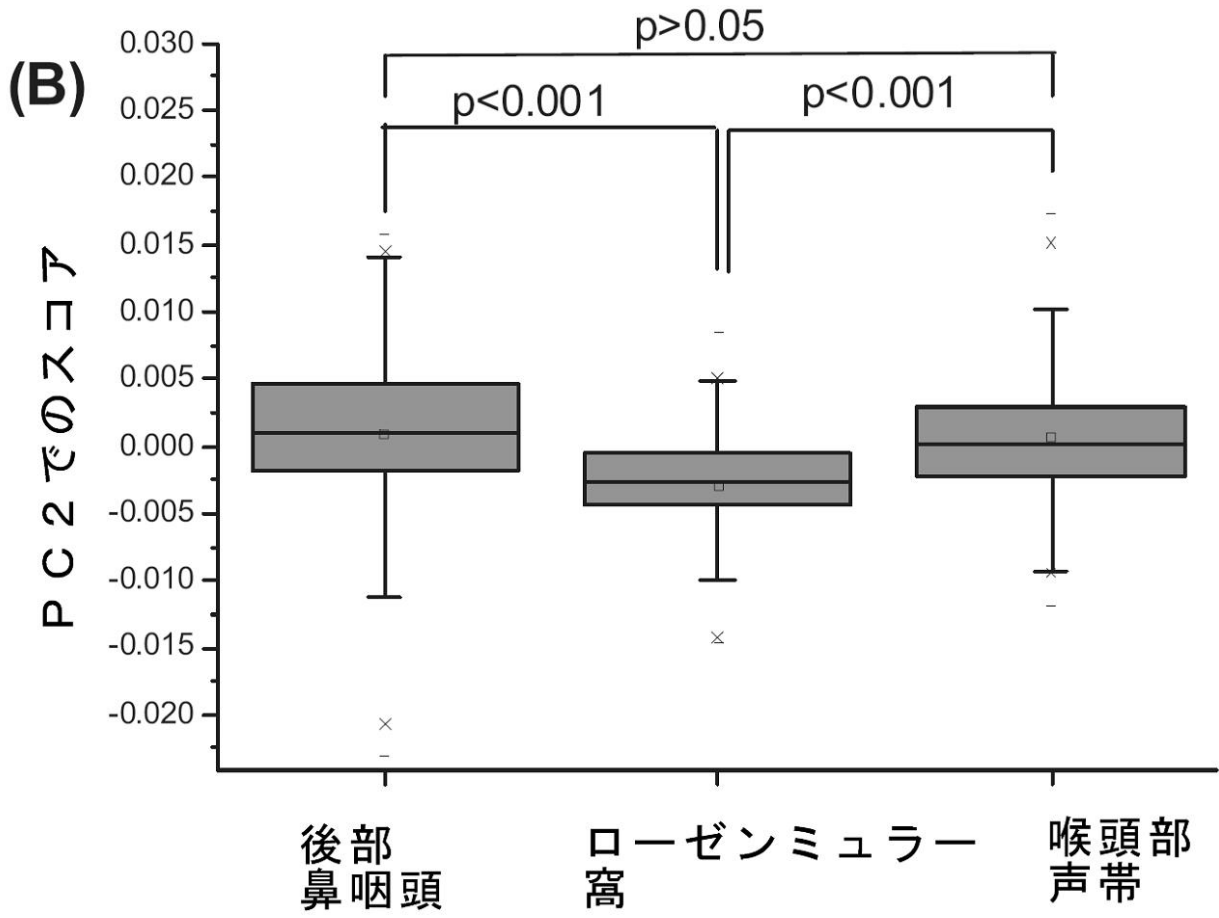
【 図 3 8 】



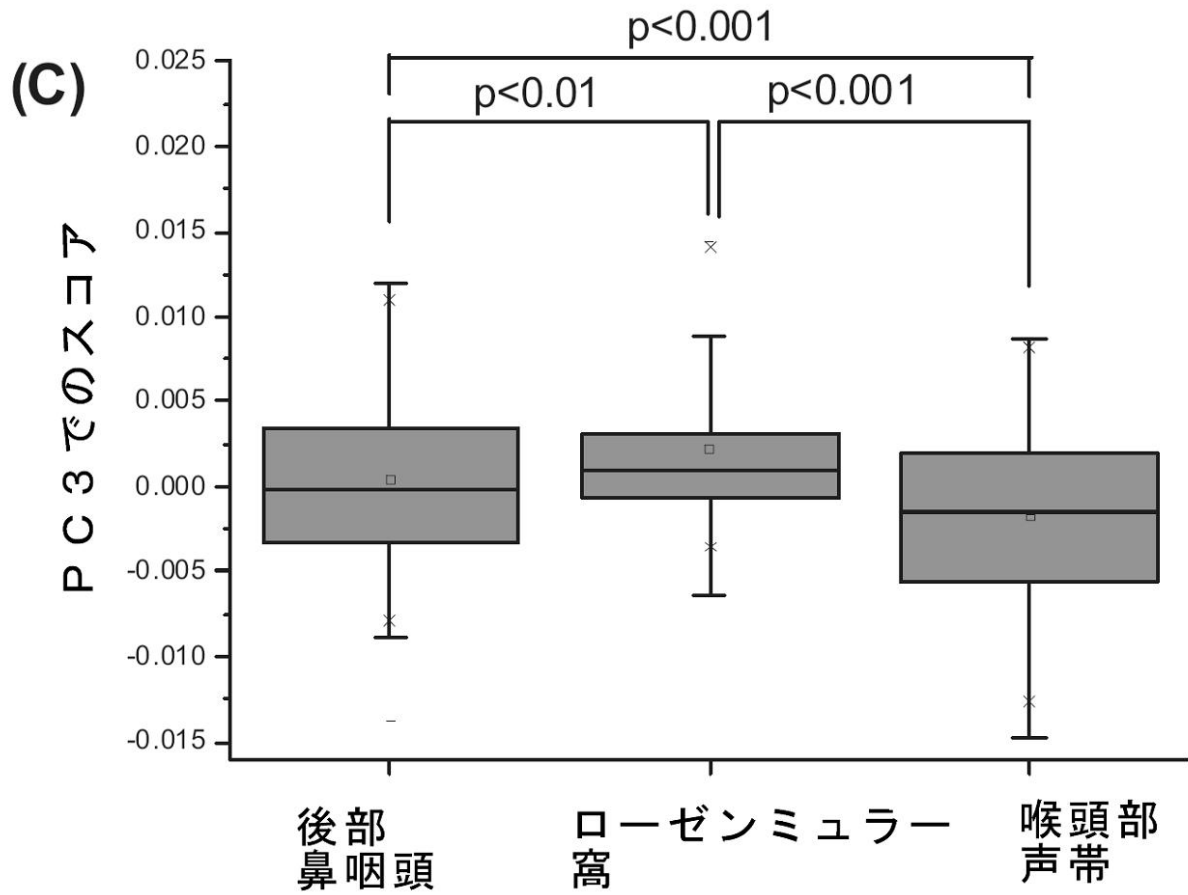
【図 39 A】



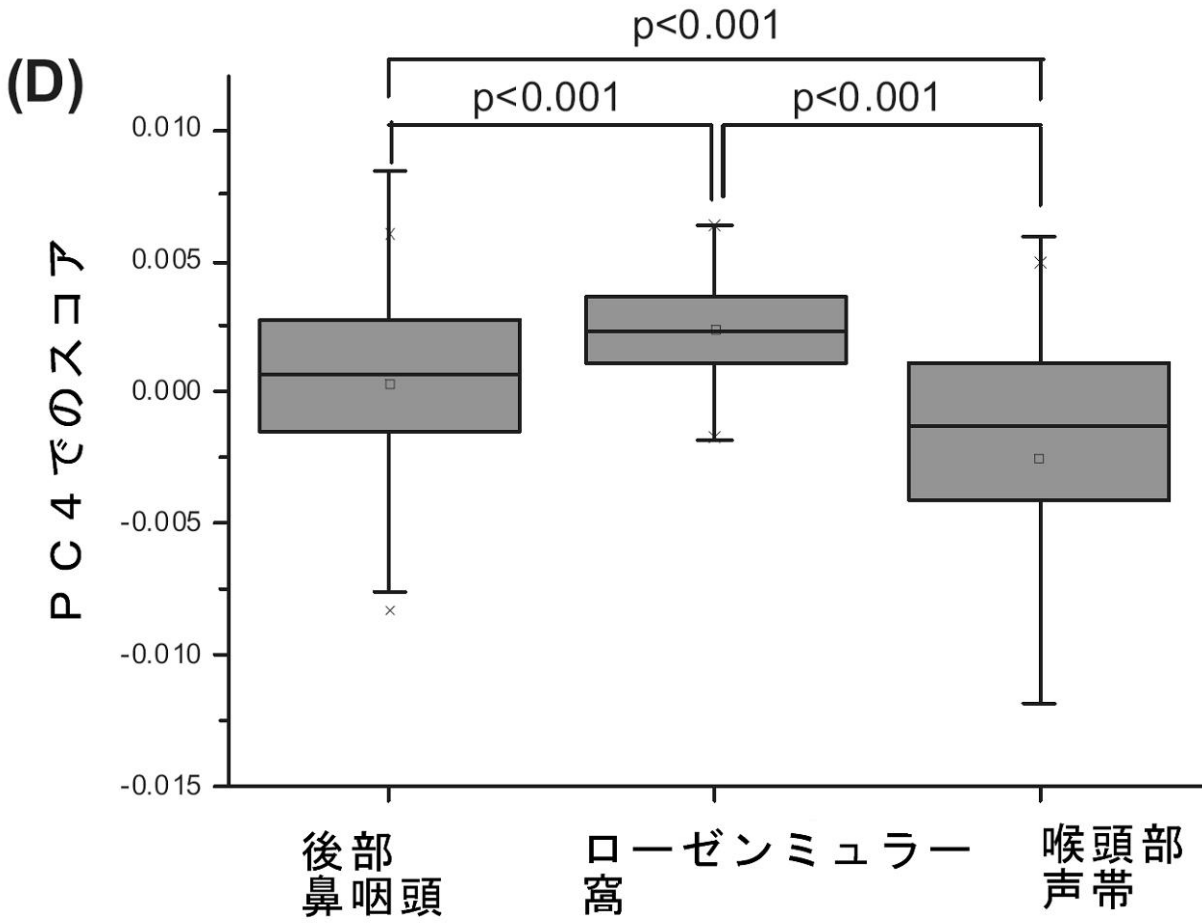
【図 3 9 B】



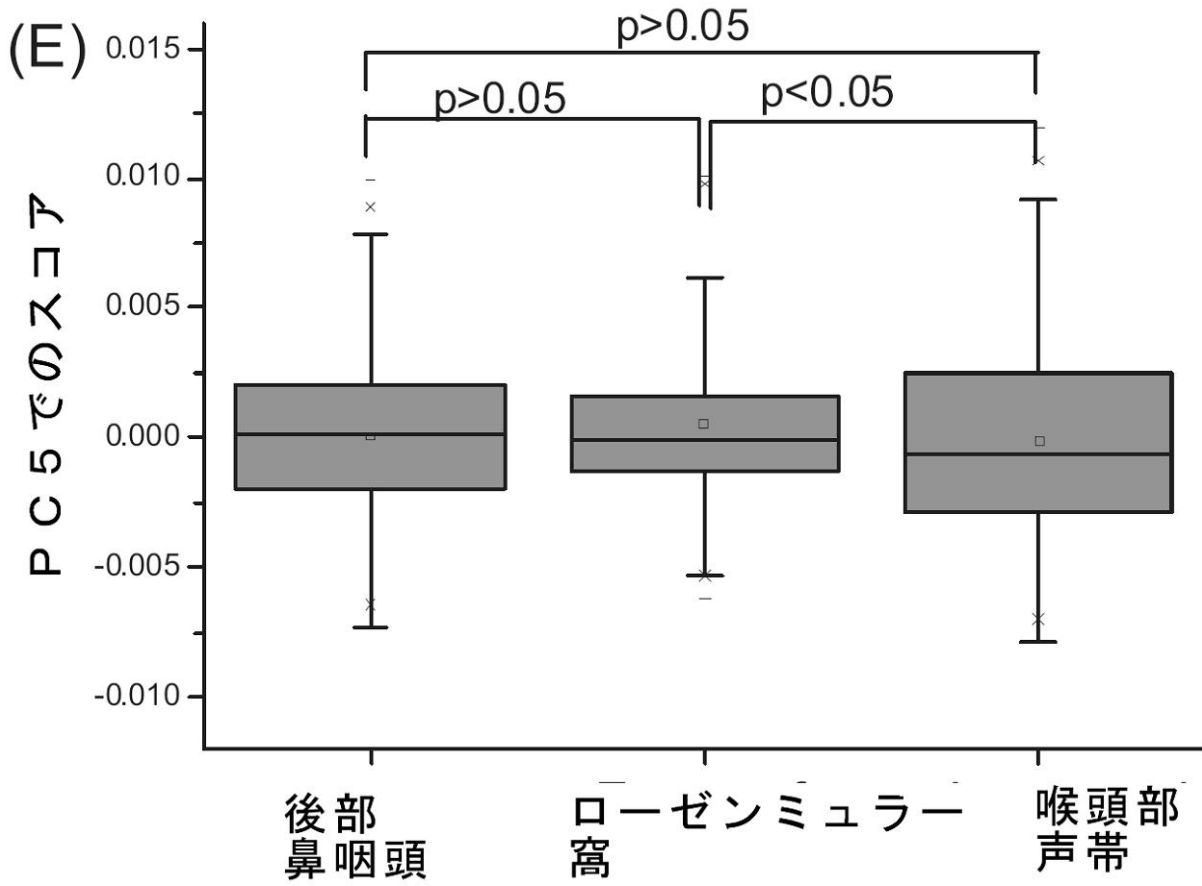
【図 3 9 C】



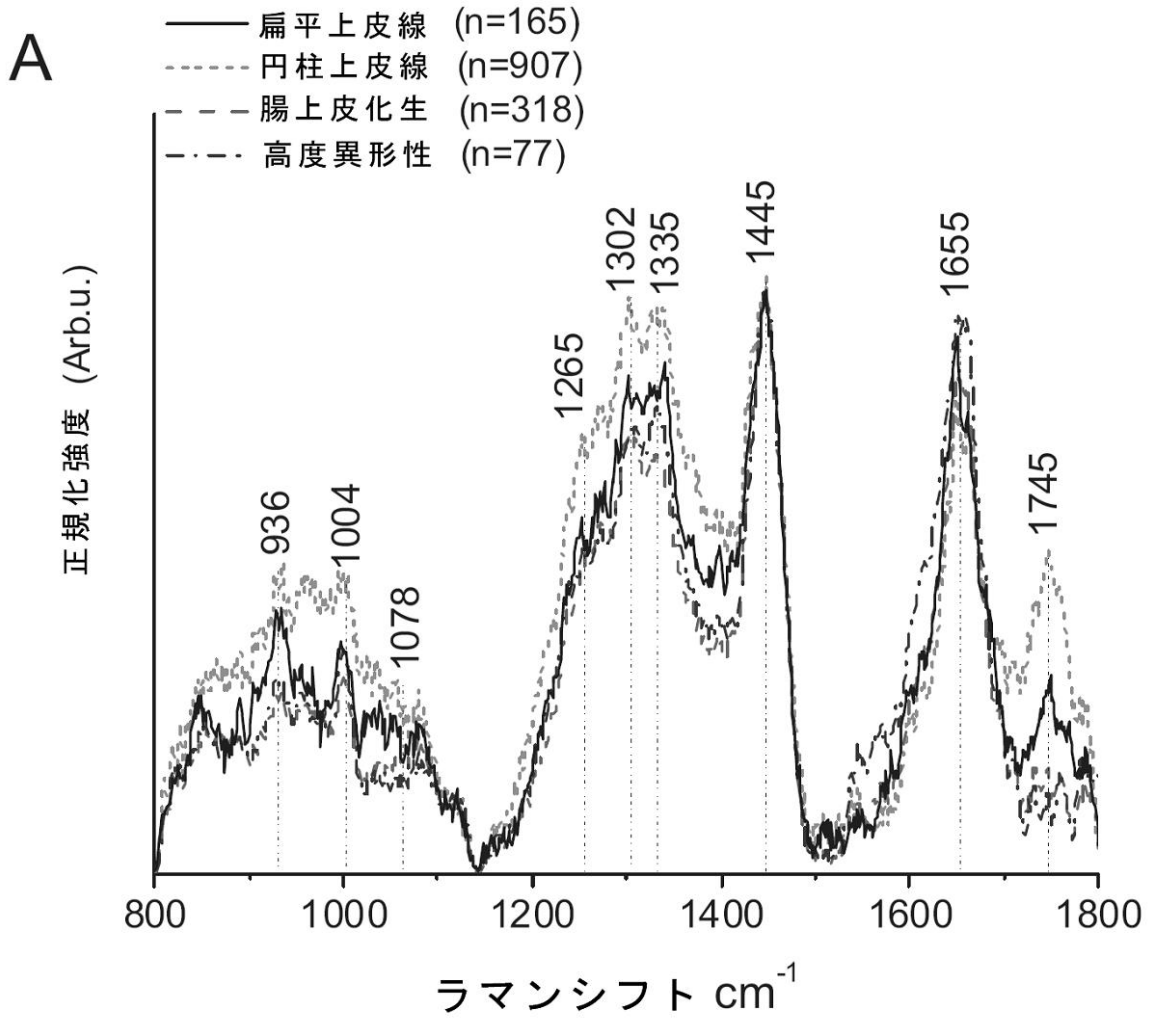
【図 3 9 D】



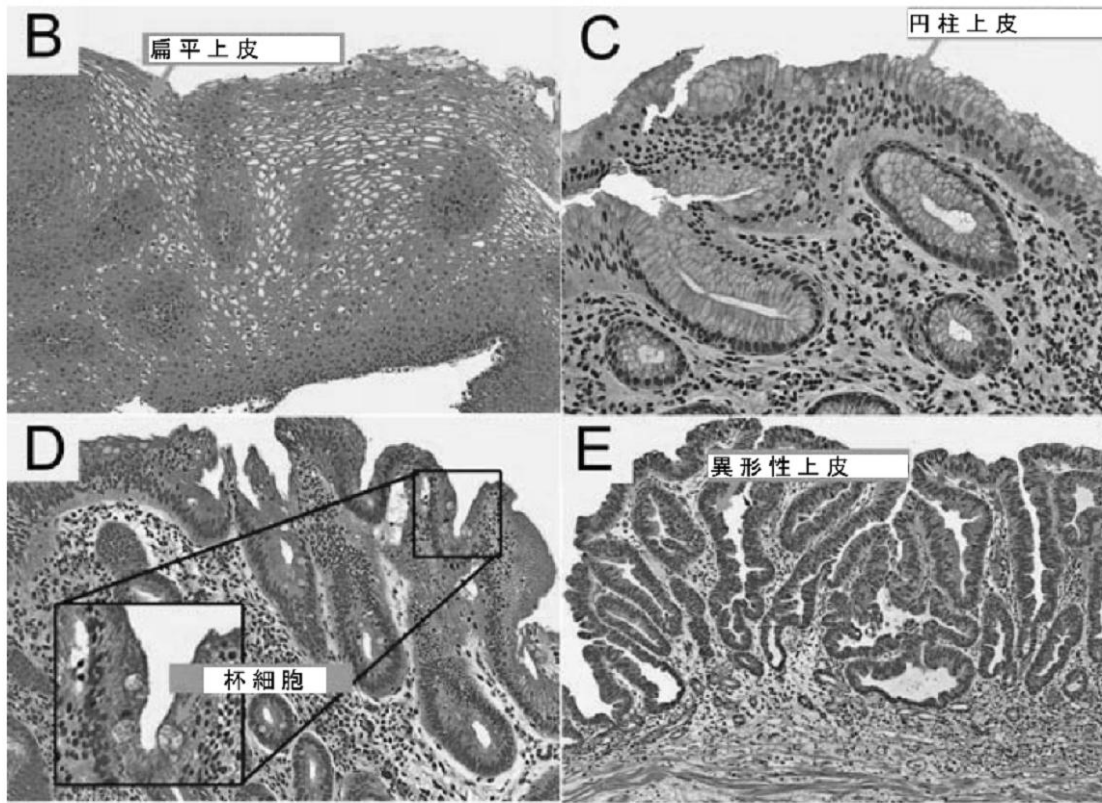
【図 39 E】



【図40A】



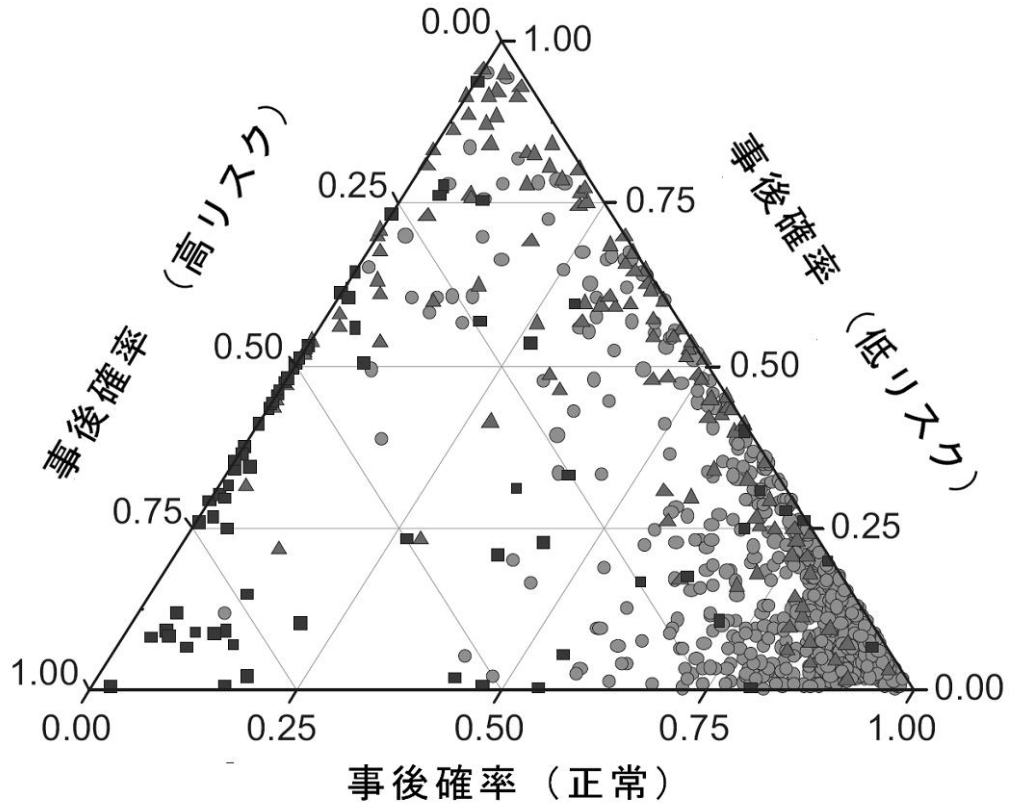
【圖 4 0 B - E】



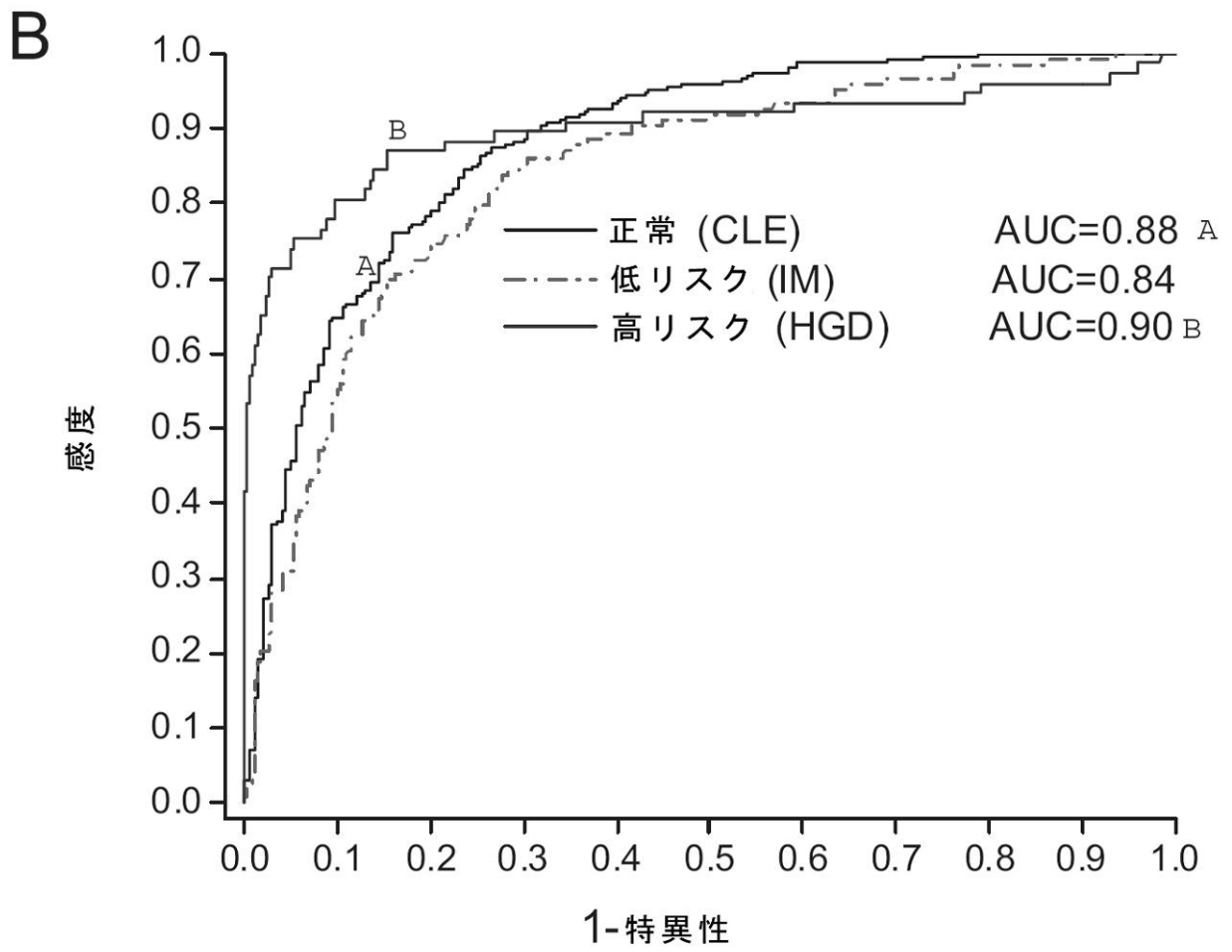
【図 4 1 A】

A

- 円柱上皮 (n=597)
- ▲ 腸上皮化生 (n=123)
- 高度異形性 (n=77)



【図 4 1 B】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SG2013/000273
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>G01N 21/65 (2006.01) A61B 5/00 (2006.01) G01J 3/44 (2006.01) A61B 6/00 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Databases: WPI, EPODOC and IPC marks: A61B5/00, A61B6/00, G01N21/65, G01J3/44 and Keywords: cancer, carci+, identif+, diagnos+, determin+, classif+, dysplasia, neoplasia, raman, fib[er, re], calibrat+, baseline, standard, target and the like		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Documents are listed in the continuation of Box C		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 3 October 2013	Date of mailing of the international search report 03 October 2013	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No.: +61 2 6283 7999	Authorised officer Graeme Evans AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262832822	

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		<b>PCT/SG2013/000273</b>
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/0191398 A1 (MOTZ et al) 09 October 2003 Abstract, Paragraphs 6, 47-49, 66-68, 95, 106, 112, 118,	1-6, 9-33
X	US 5976885 A (COHENFORD et al) 02 November 1999 Abstract, Figs 3-4, 11-13, Column 3, line 35-44, Column 4, line 8-28, column 5, line 51 - column 6, line 21, Column 6, line 38-44	1-2, 4-8, 9-13
X	WO 2011/072380 A1 (BRITISH COLUMBIA CANCER AGENCY BRANCH) 23 June 2011 Abstract, paragraphs 54-56, 75, fig 6-7	1-2, 4-6, 9-13
X	US 6621574 B1 (FORNEY et al) 16 September 2003 Abstract, fig 1-2, Claim 1	14-30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SG2013/000273
--

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**See Supplemental Box for Details**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. <b>PCT/SG2013/000273</b>
<b>Supplemental Box</b>	
<p><b>Continuation of: Box III</b></p> <p>This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.</p> <p>This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Claims 1-13 are directed to a computer-implemented method for spectroscopic identification of cancer. The feature of receiving at least one spectrum associated with a tissue; analyzing the at least one spectrum in a model that uses the spectrum to determine a score wherein said score indicates a likelihood of the tissue being cancerous is specific to this group of claims.</li> <li>• Claims 14-33 are directed to various methods of calibrating or gaining a baseline for a fiber-optic Raman spectroscopy system. The feature of correcting the recorded spectrum, of the scattered light from a target, with the calculated and stored transfer function or estimating the laser power transmitted in the fiber-optic Raman spectrometer system or correcting for background noise is specific to this group of claims.</li></ul> <p>PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.</p> <p>When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention.</p> <p>In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied <i>a priori</i>.</p>	
Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2009)	

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b> Information on patent family members		International application No. <b>PCT/SG2013/000273</b>	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
<b>Patent Document/s Cited in Search Report</b>		<b>Patent Family Member/s</b>	
<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>	<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>
US 2003/0191398 A1	09 Oct 2003	EP 1495309 A1	12 Jan 2005
		EP 2325623 A2	25 May 2011
		EP 2327978 A2	01 Jun 2011
		JP 2005522293 A	28 Jul 2005
		JP 4588324 B2	01 Dec 2010
		JP 2010249835 A	04 Nov 2010
		US 2003191398 A1	09 Oct 2003
		US 7647092 B2	12 Jan 2010
		US 2004073120 A1	15 Apr 2004
		WO 03087793 A1	23 Oct 2003
US 5976885 A	02 Nov 1999	EP 0873506 A1	28 Oct 1998
		JP H11502935 A	09 Mar 1999
		US 5976885 A	02 Nov 1999
		US 6031232 A	29 Feb 2000
		US 6146897 A	14 Nov 2000
		US 6620621 B1	16 Sep 2003
		WO 9718566 A1	22 May 1997
WO 2011/072380 A1	23 Jun 2011	CA 2784294 A1	23 Jun 2011
		CN 102725624 A	10 Oct 2012
		EP 2513633 A1	24 Oct 2012
		JP 2013514520 A	25 Apr 2013
		US 2012259229 A1	11 Oct 2012
		WO 2011072380 A1	23 Jun 2011
US 6621574 B1	16 Sep 2003	None	
<b>End of Annex</b>			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 ケック・ユー・ホー

シンガポール国 1 1 9 0 7 7 シンガポール、ロウアー・ケント・リッジ・ロード 2 1、デパートメント・オブ・メディシン、ヨン・ルー・リン・スクール・オブ・メディシン、シーノオー・ナショナル・ユニバーシティ・オブ・シンガポール

(72) 発明者 マッツ・シルヴェスト・バークホルト

シンガポール国 1 1 9 0 7 7 シンガポール、ロウアー・ケント・リッジ・ロード 2 1、デパートメント・オブ・バイオエンジニアリング、ファカルティ・オブ・エンジニアリング、シーノオー・ナショナル・ユニバーシティ・オブ・シンガポール

(72) 発明者 ウェイ・ジェン

シンガポール国 1 1 9 0 7 7 シンガポール、ロウアー・ケント・リッジ・ロード 2 1、デパートメント・オブ・バイオエンジニアリング、ファカルティ・オブ・エンジニアリング、シーノオー・ナショナル・ユニバーシティ・オブ・シンガポール

(72) 発明者 カイ・グアン・ヨー

シンガポール国 1 1 9 0 7 7 シンガポール、ロウアー・ケント・リッジ・ロード 2 1、デパートメント・オブ・メディシン、ヨン・ルー・リン・スクール・オブ・メディシン、シーノオー・ナショナル・ユニバーシティ・オブ・シンガポール

(72) 発明者 シヤマラ・デュライパンディアン

シンガポール国 1 1 9 0 7 7 シンガポール、ロウアー・ケント・リッジ・ロード 2 1、デパートメント・オブ・バイオエンジニアリング、ファカルティ・オブ・エンジニアリング、シーノオー・ナショナル・ユニバーシティ・オブ・シンガポール

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA05 EA01 EA03 FA05 GA03 GA22 GB21 HA01  
 HA05 JA01 KA01 KA09 LA03 NA05 NA06 NA13  
 2G059 AA05 AA06 BB12 BB14 CC16 EE03 FF06 GG01 HH01 JJ01  
 JJ11 JJ17 KK04 MM01 MM05 MM09 MM10 MM14  
 4C161 AA01 AA02 AA05 AA07 AA08 AA13 AA15 AA16 AA26 CC07  
 FF40 FF46 HH54 JJ11 JJ17 NN01 SS18 SS21 SS22 WW15  
 WW17

专利名称(译)	与使用光纤拉曼光谱的内窥镜检查中的实时癌症诊断相关的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015526135A</a>	公开(公告)日	2015-09-10
申请号	JP2015520131	申请日	2013-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	新加坡国立大学		
申请(专利权)人(译)	新加坡国立盐湖城大学		
[标]发明人	ジーウェイファン ケックユーホー マツシルヴェストバーグホルト ウェイジェン カイグアンヨー シヤマラデュライパンディアン		
发明人	ジーウェイファン ケックユーホー マツシルヴェストバーグホルト ウェイジェン カイグアンヨー シヤマラデュライパンディアン		
IPC分类号	A61B1/00 G01N21/65 G01N21/27		
CPC分类号	A61B5/0075 A61B1/00165 A61B5/0084 A61B2560/0233 G01J2003/4424 G01N21/274 G01N21/65 G01N2021/656 G01N2201/08 G01N2201/12753 G01N2201/129		
FI分类号	A61B1/00.300.D G01N21/65 G01N21/27.B		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/CA05 2G043/EA01 2G043/EA03 2G043/FA05 2G043/GA03 2G043 /GA22 2G043/GB21 2G043/HA01 2G043/HA05 2G043/JA01 2G043/KA01 2G043/KA09 2G043/LA03 2G043/NA05 2G043/NA06 2G043/NA13 2G059/AA05 2G059/AA06 2G059/BB12 2G059/BB14 2G059 /CC16 2G059/EE03 2G059/FF06 2G059/GG01 2G059/HH01 2G059/JJ01 2G059/JJ11 2G059/JJ17 2G059/KK04 2G059/MM01 2G059/MM05 2G059/MM09 2G059/MM10 2G059/MM14 4C161/AA01 4C161/AA02 4C161/AA05 4C161/AA07 4C161/AA08 4C161/AA13 4C161/AA15 4C161/AA16 4C161 /AA26 4C161/CC07 4C161/FF40 4C161/FF46 4C161/HH54 4C161/JJ11 4C161/JJ17 4C161/NN01 4C161/SS18 4C161/SS21 4C161/SS22 4C161/WW15 4C161/WW17		
优先权	61/667384 2012-07-02 US 2013007338 2013-04-23 GB		
其他公开文献	JP2015526135A5 JP6230077B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

一种校准光纤拉曼分光镜系统20的方法，包括激光源21，分光镜30和光纤探针11，以将来自激光源的光传输到目标并将散射光返回到分光镜，包括从激光源到具有已知光谱的标准目标，记录来自标准目标的散射光的校准光谱，比较已知光谱和校准光谱并产生传递函数，并存储传递函数。然后使用分光镜系统将传递函数用于进一步的光谱测量。还公开了一种估计系统中的激光功率的方法和从拉曼光谱中减去背景信号的方法。

(21) 出願番号	特願2015-520131 (P2015-520131)	(71) 出願人	507335687
(86) (22) 出願日	平成25年7月2日 (2013. 7. 2)		ナショナル ユニヴァーシティー オブ シンガポール
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月26日 (2015. 2. 26)		シンガポール 119077・シンガポ ール・ローワー・ケント・リッジ・ロード・ 21
(86) 国際出願番号	PCT/SG2013/000273		
(87) 国際公開番号	WO2014/007759		
(87) 国際公開日	平成26年1月9日 (2014. 1. 9)		
(31) 優先権主張番号	61/667,384	(74) 代理人	110000523
(32) 優先日	平成24年7月2日 (2012. 7. 2)		アクシス国際特許業務法人
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ジーウェイ・ファン
(31) 優先権主張番号	1307338.2		シンガポール国119077シンガポ ール、ロウアー・ケント・リッジ・ロード21 、デパートメント・オブ・バイオエンジ ニアリング、ファカルティ・オブ・エンジ ニアリング、シー/オー・ナショナル・ユニ バーシティー・オブ・シンガポール
(32) 優先日	平成25年4月23日 (2013. 4. 23)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		最終頁に続く