

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3786873号

(P3786873)

(45) 発行日 平成18年6月14日(2006.6.14)

(24) 登録日 平成18年3月31日(2006.3.31)

(51) Int. Cl.

A 6 1 B 10/00 (2006.01)

F I

A 6 1 B 10/00

E

請求項の数 8 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2001-504288 (P2001-504288)
 (86) (22) 出願日 平成12年3月22日(2000.3.22)
 (65) 公表番号 特表2003-507088 (P2003-507088A)
 (43) 公表日 平成15年2月25日(2003.2.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/007745
 (87) 国際公開番号 W02000/078217
 (87) 国際公開日 平成12年12月28日(2000.12.28)
 審査請求日 平成15年6月16日(2003.6.16)
 (31) 優先権主張番号 09/335,932
 (32) 優先日 平成11年6月18日(1999.6.18)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 500272842
 ザ ユニヴァーシティ オブ ユタ リサ
 ーチ ファウンデーション
 アメリカ合衆国 ユタ州 84108 ソ
 ルトレイクシティ アラビーン ドライヴ
 615 スイート 110
 (74) 代理人 100072051
 弁理士 杉村 興作
 (72) 発明者 ワーナー ゲッラーマン
 アメリカ合衆国 ユタ州 84105 ソ
 ルトレイクシティ イー ケンジントン
 1360

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物組織中のカロテノイドと関連する化学物質との非侵襲的測定方法および装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生物組織(生きた人間の一部分をなす組織を除く)中の悪性疾患の存在または危険性を非侵襲的に判定する方法であって、該方法が

検出するカロテノイドに対する波長シフトを有するラマン反応を起こす波長の光を発生する光源を得る工程、

光源からカロテノイドレベルを測定する生物組織に、組織破壊を引き起こさずかつ組織のカロテノイドレベルを実質的に変えない強度の光を当てる工程、

組織から散乱した光であって、弾性散乱光と非弾性散乱光とを含み、非弾性散乱光が組織内のカロテノイドに対応するラマン信号を発する光を収集する工程、

弾性散乱光をフィルター除去する工程、および

ラマン信号強度を定量する工程、を含み、

ラマン信号強度と隣接する正常組織からのラマン散乱との間の実質的な相違が悪性疾患の存在または危険性を示すことを特徴とする方法。

【請求項2】

前記光源が検出するカロテノイドの吸収帯と重なる波長の光を発生することを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記光源が約450nm~約520nmの波長域のレーザー光を発生することを特徴とする、請求項1記載の方法。

10

20

【請求項 4】

前記生物組織が人間から採取された体液であることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記生物組織が人間から採取された皮膚であることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記光が最大で約 $200 \text{ mW} / \text{cm}^2$ の強度を有することを特徴とする、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

皮膚中のカロテノイドの周波数特性で前記散乱光を測定することを特徴とする、請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

実際のカロテノイドレベルで校正した信号強度を介して前記ラマン信号を定量することを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の属する技術分野)

本発明は、一般的には生物組織に見られる化合物のレベルを測定する方法に関する。より具体的には、本発明は生物組織内のカロテノイドおよび関連化学物質のレベルの非侵襲的検出および測定を行うための方法および装置であって、生体組織の抗酸化状態の評価および悪性疾患または危険性の検出における診断の補助として用いることのできる方法および装置に関する。

【0002】

(従来技術)

カロテノイドは食事から摂取可能な植物色素であって、人体において重要な機能を果すものである。人間の健康におけるカロテノイドの役割は、急速に拡大している研究分野である。多くのカロテノイドに関する研究はレチノイドまたはビタミン A の前駆体としての役割に焦点を当ててきたが、現在の研究ではカロテノイドの他の機能にも焦点を当てている。この機能には、抗酸化活性、免疫反応調節、細胞間伝達およびギャップ結合調節が含まれる。

【0003】

カロテノイドは種々の組織における悪性腫瘍の形成に対してある程度の生理学的防衛を提供することが証明されている。例えば、カロテノイドは皮膚、唾液腺、乳腺、肝臓および大腸等の組織におけるガンの形成を防止することが動物モデルで示されている。さらに、カロテノイドとレチノイド等の関連物質とのレベルが低いことが、悪性病変に対する危険度の高い因子として判断されている。例えば、カロテノイドのリコピンのレベルが低いことと前立腺ガンおよび子宮頸管ガンとは関連がある。カロテノイドのルテイン、ゼアキサンチン、カロテンおよびカロテンのレベルが低いことと肺ガンとは関連がある。また、カロテンのレベルが低いことと口腔ガンとは関連がある。したがって、これらのカロテノイド、レチノイドおよび他の関連物質の化学的濃度を定量的に測定することにより、ガンの危険性または存在の指標が得られる。

【0004】

米国における最も一般的なガンは皮膚ガンである。患者を教育することを試みているにも関わらず、皮膚ガンの発生率は依然として上昇している。皮膚関連悪性腫瘍に係る化学物質のレベルを検出することのできる方法は、皮膚ガンの早期診断および治療において医師および医療関係者の大きな助けとなる。

【0005】

皮膚中のカロテノイドが皮膚悪性腫瘍に対する生理学的防衛を与えることは理論化されている。しかし、ほとんどの発見は、皮膚および皮膚悪性腫瘍中のカロテノイド濃度を直接

10

20

30

40

50

測定してはならず、血漿から間接的に得られたにすぎない患者のカロテノイドレベルのデータで多少なりとも妥協している。

【0006】

皮膚ガンに関係する化学物質の存在を検出するのに用いる従来の方法は、主として生物組織検査または他の侵襲性処置により得られた組織の分析によるものであった。カロテノイドを測定するのに用いる現在の標準法は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法によるものである。この方法は多量のサンプルを患者から取り出し、次いで分析および処理する必要があり、典型的には完了するのに少なくとも24時間を要する。この種の分析の間、完全に破壊されないにしても組織が傷つけられる。したがって、非侵襲的でより迅速な測定方法が好ましい。

10

【0007】

眼の黄斑組織のカロテノイドレベルを測定する非侵襲的方法は、米国特許第5,873,831号に開示されている。この開示をここに参照して組み入れる。この特許では、ラマン分光法として公知の方法によりカロテノイドおよび関連物質のレベルを測定する。これはある種の化合物の存在および（適正な校正を行うという条件で）濃度を同定することのできる方法である。この方法では、近単色光を測定するサンプルに入射し、入射した光とは異なる周波数の非弾性散乱光を検出および測定する。入射光と散乱光との間の周波数シフトはラマンシフトとして知られており、このシフトは、ある分子の振動または回転エネルギー状態を示す「指紋」であるエネルギーに相当する。典型的には、分子はいくつかの特徴的なラマン活性振動または回転エネルギー状態を示し、したがってその分子のラマンスペクトルを測定することにより分子の指紋が得られる、すなわち分子に固有な一連のスペクトル的に鋭い振動または回転ピークが得られる。ラマン散乱光の強度は、関心のある分子の濃度に直接的に対応する。

20

【0008】

ラマン分光法に関連する難点のひとつは、ラマン散乱光に固有の信号強度が非常に低いということである。散乱光強度は周波数の4乗に比例することは周知である。微弱なラマン信号をレイリー散乱光と区別しなければならない。レイリー散乱光は入射した光と同じ周波数の弾性散乱光であり、総散乱光の相当の割合を構成する。フィルター、回折格子、または他の波長分離装置を用いてレイリー散乱光からラマン信号を分離することができる。しかし、これには、光が波長分離装置を通過した際に発生し得る更なる減衰により、測定したラマン信号をさらに弱める効果がある。実際には、ラマン散乱光を検出することはきわめて難しい。組織サンプルに入射するレーザー出力を増やしてラマン信号を増大することを試みるかもしれないが、これによりサンプルの燃焼または分解を招き得る。

30

【0009】

これらの難点のいくつかを克服するため、前記して参照した米国特許第5,873,831号に開示するとおり、共鳴ラマン分光法として公知の方法を用いている。このような方法は米国特許第4,832,483号にも開示されている。この開示を参照にしてここに組み入れる。共鳴ラマン分光法において、用いた入射光は、関心のある分子の電氣的エネルギー遷移に対応する共鳴周波数に対応した周波数を有する。これは、高強度入力信号を用いることなくラマン出力信号を強く促進する効果を有し、したがってレーザー燃焼により引き起こされるサンプルの損傷を抑制する。また、これらの共鳴ラマン信号は実質的に不可視の非共鳴ラマン信号よりもはるかに高い強度を有する。したがって、共鳴ラマン分光法において、関心のある種に属するラマン信号のみが得られる。

40

【0010】

前記して参照した米国特許第5,873,831号では、共鳴ラマン法を用いてカロテノイドのルテインおよびゼアキサンチンのレベルを測定する。この2つの化学物質は人間の眼の健康な黄斑細胞に関係する。前記して参照した米国特許第4,832,483号は共鳴ラマン分光法を用いて血漿中のある種のカロテノイドを測定しており、ラマンスペクトルピークの強度比を種々の悪性疾患の存在を示す方法として用いることを提案している。

【0011】

50

ラマン計測に関するさらに別の問題は、皮膚中の関心物質が入射光を散乱するだけでなく吸収もし、続いて相当な強度で蛍光を発するという点である。この蛍光は、ラマン信号のピークを「かき消す」または制圧する傾向のある、非常に強力な広範囲の信号を含む場合が多い。したがって、関心物質の同定および定量を行うことが特に不可能となる。

【0012】

蛍光分光法はそれ自体、生物組織中の化合物の量を測定するのに用いることができる別の方法である。例えば、米国特許第5,697,373号は、蛍光および/またはラマン分光法を用いて子宮頸管の組織異常を検出することを開示している。蛍光測定は、多くの異なる分子が広い範囲の周波数で蛍光を発するので、特定の物質の存在または濃度を確定的に同定するのに用いることができないという点である。

10

【0013】

したがって、生物組織中に種々の程度で存在するカロテノイドおよび他の類似化合物のレベルを安全、非侵襲、迅速、正確かつ特異的に測定する方法および装置を提供し、この情報を用いてあらゆる種類の生物組織におけるガンの危険性または疾病の危険性の評価を補助することは顕著な進歩となるであろう。

【0014】

(発明の概要)

本発明は、共鳴ラマン分光法を用いて、皮膚等の組織内のカロテノイドおよび類似物質のレベルを定量的に測定するものである。この方法では、単色レーザー光を関心のある組織領域に当てる。組織からの散乱光はレイリー散乱光の主要部を含む。この散乱光は入射レーザー光と同じ周波数である。散乱光の一部は入射レーザー光とは異なる周波数で非弾性的に散乱する。これがラマン信号である。レイリー散乱光およびラマン散乱光を典型的には波長選択フィルタリングにより分離し、得られたラマン信号を高感度光検出システムを用いて測定する。得られたラマン信号をデータ定量化システムにより分析することができる。このデータ定量化システムは、背景蛍光信号を除去し、その結果を表示し、かつ既知の校正標準と比較する。

20

【0015】

本発明のこれらおよび他の目的および特徴は、次の説明からより明確になるか、または以下に述べる発明の実施により確認されるであろう。

【0016】

本発明の前記のおよび他の利点および目的を得る方法を例証するため、前記して簡単に説明した本発明のより詳細な説明を付図に示した具体的実施態様を参照して説明する。これらの図は本発明の典型的実施態様のみを表すものであり、したがって発明の範囲を限定するものではないことを理解した上で、付図を用いることにより本発明をより具体的かつ詳細に説明する。

30

【0017】

(発明の実施の形態)

本発明は、生物組織および体液中のカロテノイドおよび関連化学物質を非侵襲的に検出および測定するための方法および装置を指向する。特に、本方法および装置は、人間の皮膚等の生物組織中のカロテノイドならびにその異性体および代謝物の濃度を迅速、非侵襲かつ定量的に測定することを可能にするものである。これは従来技術では必要であったHPLC分析のための組織の取り出しまたはサンプル調製の必要無しに達成される。

40

【0018】

本発明は直接的かつ定量的な光診断技術に使用可能であり、無処置の組織を低強度で照明し、かつ高度な空間分解能を提供することにより、組織内のカロテノイドレベルの正確な定量を可能にする。このような診断技術は悪性腫瘍等の組織異常を検出する補助となり得る。

【0019】

本発明の方法により非侵襲的に測定可能な生物組織の例としては、人間の皮膚、子宮頸部、大腸および肺がある。測定可能な体液の例としては、唾液、全血および粘液がある。

50

【0020】

本発明は共鳴ラマン分光法を用い、皮膚等の生物組織中のカロテノイドおよび類似物質の存在を同定および定量するものである。この方法では、近単色レーザー光を組織に当て、散乱光をスペクトル的にフィルター除去して検出する。散乱光はレイリー散乱光とラマン散乱光の両者を含む。レイリー光は弾性的に散乱した光であり、入射したレーザー光と同じ波長で散乱することを意味している。散乱光のほとんどは弾性的に散乱する。残りの僅かな光が非弾性的に散乱し、したがって入射したレーザー光と異なる周波数となる。この非弾性的散乱光がラマン信号を形成する。レーザー光とラマン散乱光との間の周波数の違いはラマンシフトとして知られており、波数の違い（または周波数もしくは波長の違い）として典型的には測定される。ラマンシフトの大きさは存在する化学物質の種類 10の指標であり、ラマン信号のピークの大きさは化学物質濃度に直接的に対応する。ラマン分光法が有用である理由の一つは、特定の波数が特定の化学構造に関係する振動または回転固有状態のあるモードに対応してシフトし、したがってこれらの化学構造の「指紋」が得られるという点である。ラマンシフトは用いた入射光の波長と独立であり、したがって理論上はいかなる強力かつ完全単色光源もこの方法に用いることができる。

【0021】

本発明に用いる共鳴ラマン分光法は、本質的に弱いラマン信号の測定に関する問題を克服する助けとなる。共鳴ラマン分光法では、関心分子の電子遷移に対応する吸収ピーク付近の波長のレーザー光源を用いる。入射光を関心分子の電子吸収周波数と共鳴関係に近づけることによりラマン信号を実質的に高め、より低い入射レーザー出力を使用可能にする 20（したがって組織損傷を最小限にする）という利点が得られ、また検出機器の感度に対する厳密な要求がより少なくなる。

【0022】

自然蛍光、特に皮膚組織内での自然蛍光が高く、微弱なラマン信号をマスクするため、可視レーザー短波長を用いた組織ラマン分光法は通常不可能である。分子自体は非常に弱い蛍光のみを示すことが知られているが、レーザーがこの分子族と選択的に共鳴結合することにより、本発明はカロテノイドラマン信号を選択的かつ大幅に増大する方法で可視短波長を用いる。この信号増強により、強力な自然蛍光が存在する場合でさえも、カロテノイドレベルの測定が可能となる。組織は光を（弾性的におよび非弾性的に）散乱するだけでなく、光を吸収するので、ラマン分析法測定中に背景蛍光が発生する。以下により詳細に 30述べる通り、背景蛍光をラマンスペクトルから除去し、得られたスペクトルを拡大してラマンカロテノイド信号の明確な指標を得ることができる。通常、ラマン信号は人間の組織の典型的には高い蛍光背景中に埋もれているので、本発明で用いる可視波長領域の低レーザー出力レベルで有益なラマン信号を測定できるとは予期されていない。

【0023】

本発明による生物組織中のカロテノイドおよび関連化学物質の非侵襲的測定法では、レーザー等の光源を利用する。この光源は検出するカロテノイドに対する波長シフトを有するラマン反応を生じる波長の光を発生する。組織破壊を引き起こさず、かつ実質的にカロテノイドレベルを変えない強度でレーザー光を組織に当てる。組織からの弾性的および非弾性的散乱光を集める。非弾性散乱光は、組織内のカロテノイドに対応するラマン信号を発生 40する固有エネルギーシフトおよび定量可能な強度を有する。弾性散乱光をフィルター除去し、ラマン信号を形成する非弾性散乱光の強度を定量する。

【0024】

カロテノイド分子から非弾性的に散乱し、ラマン信号を形成する光の強度を、正常な生物組織から散乱したラマン強度と比較し、生体被験者のガン等の悪性疾患の危険度または存在を評価することができる。例えば、悪性腫瘍の疑いのある生物組織のラマン信号強度と隣接する正常な生物組織からのラマン散乱の強度との間の実質的な差は、疾病の存在または危険を示している。またラマン信号強度を定量して組織の抗酸化状態を評価することができる。

【0025】

図1は全体として番号10で表される、本発明の装置の全体概略図であって、ラマン分光法を用いて生物組織内のカロテノイドおよび類似物質を測定する。装置10は、好適な実施態様一つにおいては低出力アルゴンイオンレーザーである干渉性光源12を含む。または、光源12は近単色光を発生する他の装置を含んでも良い。光源12は検出するカロテノイドの吸収帯と重なる波長の光を発生する。好ましくは、カロテノイドの場合、光源12は、関心のあるカロテノイドの吸収帯に対応する約450nm～約520nmの領域のレーザー光を発生する。このようなレーザー光は、市販のアルゴンレーザーから容易に入手することができる。例えば、アルゴンレーザーの4880 または5145 線等の青/緑アルゴンレーザー光線を用いてカロテノイドの電子吸収を共鳴的に励起することができる。しかし、所望により他の光の波長、例えば紫外線スペクトル領域で発生するカロテノイドの吸収遷移と重なるUVレーザー光線を使うことができるので、本発明はこれらの波長で発生した光に限定されるものではないことを理解すべきである。

10

【0026】

光源12は、測定する組織にレーザー光を当て、散乱光を収集するための種々の光学部品を含む光線送出収集システム14と光学的に連通している。図1に示す通り、送出収集システム14の光学部品は、ニュートラルフィルター16、回折格子17、スリット18、ビームスプリッター20、第1レンズ22および第2レンズ24を含む。これらの光学部品と光源12からのレーザー光線との相互作用について以下でさらに詳細に説明する。

【0027】

送出収集システム14は、レイリー散乱光からラマン散乱光をスペクトル分離する役割を果たすラマン分光計等のスペクトル選択システム26と光学的に連通している。スペクトル選択システム26は格子モノクロメーター、ホログラフィックフィルター、誘電フィルター、音響光学フィルター、プリズムおよびこれらの組合せ等の種々の光学部品を含むことができる。

20

【0028】

スペクトル選択システム26は、皮膚中のカロテノイドの周波数特性等の関心周波数領域の周波数の関数としてラマン散乱光強度を測定することのできる光検出システム28等の検出手段と光学的に連通している。光検出システム28は、CCD(電荷結合素子)検出器アレー、増感CCD検出器アレー、光電子増倍装置またはフォトダイオード等の装置を含むことができるが、これに限定されない。

30

【0029】

冷却電荷結合シリコン検出器アレーを有する迅速検出を用いた中解像度格子分光計等の市販の分光計システムから、スペクトル選択システム26および光検出システム28を選択することができる。例えば、1200ライン/mmの拡散格子および液体窒素で冷却したピクセル幅25μmのシリコンCCD検出器アレーを用いたモノクロメーターを用いることができる。他の好適な分光計は、CCDカメラに接続され、ボリュームホログラフィック透過格子を用いたホログラフィック画像分光計である。また、増感CCDカメラ等の低光レベルCCD画像アレーと共に用いたスペクトル選択光学要素を含むラマン画像システムにスペクトル選択システム26および光検出システム28を一体化することもできる。

【0030】

好ましくは光検出システム28により、検出された光をコンピュータモニタ等の出力ディスプレイに視覚的に表示することのできる信号に変換する。所望により、光検出システム28は光信号を他のデジタルまたは数値形式に変換することもできることを理解すべきである。共鳴ラマン信号強度を好ましくは定量システム30等の定量手段により分析する。定量システム30は他の実験から化学的に測定したカロテノイドレベルをと比較することにより校正できる。定量システム30をコンピュータ、好ましくは背景蛍光スペクトルの除去等のスペクトル操作が可能なデータ収集ソフトウェアがインストールされたコンピュータとすることにより、安全なレーザー出力密度を使用しながら無背景ラマン信号が可能となる。また、定量システム30はCCDイメージディスプレイまたはモニターを含んでもよい。定量システム30を出力ディスプレイと共に1台のコンピュータに組み込み、他の

40

50

実験から得られたカロテノイドレベルを用いて結果を校正して、信号強度を実際のカロテノイドレベルで校正することができる。

【0031】

装置10の運転中、レーザービーム32は光源12より発生し、入力光ファイバーを通過して送出収集システム14に向けられる。レーザービーム32はレーザー出力を減少するニュートラルフィルター16を通り、回折格子17で反射し、スリット18を通過してレーザープラズマ線を取り除く。次いで、ビームをビームスプリッター20に通し、第1レンズ22により測定する組織34上に弱く焦点を合わせる。ビームの出力密度または光強度は好ましくは最大約200 mW/cm²の範囲で約1ミリ秒乃至10,000秒の露光時間である。次いで、組織34からの背景散乱光を第1レンズ22により集め、ビームスプリッター20で反射して第2レンズ24に向ける。第2レンズ24は光を出力光ファイバーに集め、ラマン分光計等のスペクトル選択システム26に光を導く。スペクトル選択システム26においてラマン信号をレイリー光から分離した後、ラマン信号を光検出システム28に向ける。ここで光強度を関心のあるラマンピークを包含する領域、カロテノイドに対しては約800~2000 cm⁻¹の領域の周波数の関数として測定する。次いで、光検出システム28はラマン信号をコンピュータモニタ等の視覚表示に好適な形態に変換する。得られたラマン信号を定量システム30を介して分析する。

10

【0032】

本発明は特に人間の皮膚中の総カロテノイド含量の検出に有用である。健康な皮膚に見られるカロテノイドには、オールトランス型 - カロテン、リコピン、 - カロテン、 - カロテン、フィトエン、フィトフルエン、セプタプレノ(septapreno)型 - カロテン、7,7 ジヒドロ - - カロテン、アスタキサンチン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、ルテイン、 - アポ - 8 - カロテナール、ピオラキサンチンおよびロドキサンチンが含まれる。これらは長さや付着物の異なる鎖状分子であって、それぞれ炭素二重結合と炭素単結合とを交互に有する炭素骨格を有する。全てのカロテノイドで一般的なこれらの結合の振動をラマン分光計により検出することができる。これらのカロテノイドの波数シフトが通常800~2000 cm⁻¹(波数)の範囲であることが、別々の測定から分かっている。例えば、カロテノイドのルテインおよびゼアキサンチンはそれぞれ約1160 cm⁻¹および1520 cm⁻¹の波数シフトを有することが分かっている。

20

【0033】

カロテノイドは皮膚の抗酸化防衛システムの重要な成分である。カロテノイドは皮膚でフリーラジカルおよび一重項酸素スカベンジャーとして作用してものと考えられている。さらに、カロテノイドは多数の有害な活性酸素種(ROS)から皮膚を守る。ROSは、例えば皮膚を日光等の紫外線光に過剰に露光することにより形成される。ROSは、潜在的に酸化的細胞損傷ならびに基底細胞ガン、扁平細胞ガンおよび悪性黒色腫等の皮膚ガンの形成を引き起こし得る。さらに、UV光への露光により免疫抑制および早発性皮膚老化を招く。一旦形成されると、ROSはDNA、タンパク質および不飽和脂肪酸と効率的に反応し、DNAストランドの破壊および酸化的損傷ならびにタンパク質 - タンパク質およびタンパク質 - DNAの交差結合を引き起こす。脂質の酸化は、細胞中に比較的長時間残存し、したがってラジカル連鎖反応を誘導しかつ酸化損傷を増やし得る脂質過酸化物の形成を招き得る。

30

40

【0034】

皮膚中のカロテノイド、レチノイドおよび類似化学物質と皮膚ガンおよび皮膚疾患の危険性との間には相関があることがこれまでに示されている。皮膚のカロテノイドレベルの低い人々は皮膚ガンにかかる危険性が顕著に高い。したがって、皮膚に存在するカロテノイドレベルを測定することができれば、ガンの危険性を評価することができる。また、カロテノイドレベルが低いと測定された場合、栄養補助食品等の予防措置を取ることができる。

【0035】

皮膚ガンの存在を評価するための現在の方法は、疑いのある組織の領域を励起し、組織学

50

的分析を行うことを一般に含む。これは侵襲的処置であり、通常末期ガンに対して行われ、したがって適正な治療を提供するために、効果的かつ時宜を得た方法でのガンまたは前ガン状態の早期発見には有用ではない。本発明は、カロテノイドの早期非侵襲的測定を提供することによりこれらの問題を克服し、ガンの危険性の判定を補助するものである。

【0036】

本発明は、人間の種々の組織および体液中のカロテノイドレベルの迅速・非侵襲的評価を提供するだけでなく、多くの付加的で有益な用途も有するものである。これらの用途には人間の組織中の全般的抗酸化状態の評価、空間的に分解したラマンデータまたはラマン画像を用いた早期ガン検出の提供、カロテノイドまたは他の抗酸化物質が関与するガンおよび他の疾病の予防に関する多数の人口での研究への利用に好適なスクリーニング手段の提供、組織カロテノイドまたは他の抗酸化含有物の食事操作の監視の提供、および化粧品化合物からのカロテノイドの分配と摂取を評価する手段の提供が含まれる。

10

【0037】

本発明の方法および装置は、皮膚、皮膚病変および皮膚悪性腫瘍におけるカロテノイドレベルを測定するのに特に効果的である。本発明により、腫瘍縁を画定する非侵襲的方法を備えた2次元ラマンマッピングの開発が可能となり、したがって時間を浪費しかつ冗漫な部分を排除し、即時術中腫瘍縁描写 (instant intraoperative tumor margin delineation) が可能となる。カロテノイドレベルの測定を個々の皮膚病変が悪性腫瘍である可能性を予測する指標として用いることもできる。

【0038】

低い露光量を用いて、生きた人間の皮膚の種々の領域で強いラマン信号が容易に得られることを示す種々の実験を実施した。以下の実施例は、これらの実験において用いた装置および手順ならびにこれらの実験から導かれた結果に関するものである。

20

【0039】

(実施例1)

人間の皮膚中のカロテノイドのラマン測定に好適な実験装置40を図2に概略的に示したように組み立てた。装置40は、光ビーム送出収集部品を含有する光モジュール42、および分光計コンポーネントを含有するラマンモジュール44を含む。光モジュール42は、手持型ビーム送出収集装置として作られており、散乱サンプル(例えば人の皮膚)が光収集部品から約5cm以内となるようにサンプルに接近させて設置することができる。これにより装置のfナンバーが大きくなり、したがって光の透過量が大きくなる。

30

【0040】

励起源として、アルゴンレーザー46の青/緑線を用いた。アルゴンレーザー46は光モジュールと光学的に連通しており、励起レーザー光は運転中に入力光ファイバーを通過して光モジュール42に導かれる。レーザー光の一部をビームスプリッターにより分離し、光モジュール42に入る前に参照目的光検出器(図示せず)でサンプルを取る。レーザー光は入力光ファイバーを出て光モジュール42に入り、そこで第1レンズ48で平行にされ、第1狭周波数帯フィルター50(例えば、誘電干渉フィルターまたはホログラフィックノッチフィルター)を通過する。次いで、光は一組のダイクロイックビームスプリッター52および54で反射され、第2レンズ56を介して生体皮膚組織36に当てられる。狭周波数帯フィルター50はレーザープラズマ線、潜在的な光ファイバーの放射およびラマン散乱を取り除く役割を果たす。ビームスプリッター52および54は誘電性であり、かつ488nmの波長を通すと同時に約500nmより大きな波長を反射するようにコーティングされている。皮膚組織上でのレーザースポットの大きさは、レンズ56の焦点距離を適正に選択することにより操作可能である。本実験では、約2mmの大きさの皮膚を出力密度約200mW/cm²のレーザー光で照射した(これはANSI基準により安全と考えられる)。

40

【0041】

皮膚組織からのラマンシフトした信号を180度の後方散乱ジオメトリーで収集する。散乱光を収集し、レンズ56で平行にし、出力光ファイバーに向け、ビームスプリッター5

50

4、第2狭周波数帯フィルター58および第3レンズ60を通してラマンモジュール44に導く。フィルター58はラマン散乱光のレイリー成分を排除すると同時に高い透過量でカロテノイドのストークス信号を透過するように作られている。

【0042】

ラマンモジュール44は市販の格子分光計であり、シリコン検出器アレーを有するCCDカメラ62に接続されている。光モジュール42からのラマン散乱光は出力光ファイバーから出て、第1ミラー66を介して反射格子64に送られる。この光は反射格子64から波長分散信号として反射され、第2ミラー68を介してCCDカメラ62の検出器アレー上に像を結ぶ。光分散のために単一の格子段階を使い、よって高い光透過量を可能としたことに加えて、ラマンモジュール44は靴箱大であり、したがって小型、可動かつ人間を

10

【0043】

(実施例2)

実施例1の装置を用いて健康な人間の志願者の皮膚から得た典型的ラマンカロテノイドスペクトルを図3のグラフに示す。約2mmの大きさの皮膚を出力10mWのレーザー光を488nmで照射した。光子計数(強度)対波数シフトの標準形式でデータをプロットした。共鳴ラマン法を用い内在的微弱ラマン信号をさらに増幅して、スペクトルを測定した。カロテノイド分子のラマンピーク特性は図3のグラフに表れている。このピークは広範

20

【0044】

(実施例3)

蛍光背景および人間の皮膚のラマン測定に対するその影響をさらに特徴付けるため、人間の皮膚の蛍光放射スペクトルを励起波長458nm、488nm、514.5nmおよび532nmの青/緑レーザーに対してインビボ測定した。レーザーの出力密度は0.2W/cm²であり、波長1nm毎のサンプリング時間は1秒であった。結果を図5のグラフに示す。このグラフより、放射は少なくとも2つの広範かつ重なった帯域からなり、一方は600nm付近を中心とし、他方は750nm付近を中心とすることが分かる。励起波長が増えるにつれて、放射中心極大はより長い波長に若干シフトし、全体の強度は減少し、かつ532nm励起では放射の短波長成分のみが残る。この、いわゆる皮膚「自己蛍光」の起源は、内在的蛍光色素、すなわちコラーゲン細胞、ポルフィリン分子等によるものであって、カロテノイドの発光によるものではない。この結論は、蛍光の減衰速度により

30

40

【0045】

(実施例4)

ラマン散乱強度は励起波長の4乗に反比例する。これは実際には励起波長が短くなるにつれてラマン散乱強度が大幅に増加することを意味する。一方、ラマン信号をマスクする重

50

複蛍光も波長が短くなるにつれて増加する。共鳴ラマン散乱の場合、光散乱光効率はさらに散乱種の電子吸収作用の影響を受け、一般に電子吸収遷移のスペクトル依存性に従う。したがって、ラマンピークと蛍光背景との間の対比を最大にするための最適励起条件を見出すために、5つの異なるアルゴンレーザー光線およびNd:YAGレーザー波長の2倍の周波数を用いて励起条件を変えた。励起出力密度は 0.2 W/cm^2 であり、サンプリング時間は10秒であった。結果を図7のグラフに示す。このグラフは、 1520 cm^{-1} での最強ラマンカロテノイドピーク強度（白抜き三角）と皮膚の背景蛍光（白抜き丸）の両方に対するスペクトル依存性を示している。図7中点線で示した蛍光強度に対するラマンの比から、最適励起波長は500nm波長領域に存在することが分かる。4880および5145 nmの利用可能な最強のアルゴンイオンレーザー波長がこの最適波長に近く、小型で比較的安価な空冷レーザーを用いて必要な出力レベルを容易に達成することができる。

【0046】

（実施例5）

ラマン測定の実施中に、人間の皮膚の蛍光背景が数分間に渡って部分的にブリーチングされることが分かった。この効果を図8のグラフに示す。図中、曲線（a）は「新鮮な」皮膚を露光した直後の蛍光背景に対応し、曲線（b）は 200 mW/cm^2 の（安全）出力密度を用いて488nmアルゴンレーザー光を7分間照射した後の蛍光背景に対応する。蛍光スペクトルの形状は変化していないが、強度は初期値の約70%にまで下がった。この値はさらに光を照射しても安定である。

【0047】

人間の皮膚蛍光のブリーチング作用の速度をさらに調べた。結果を図9のグラフに示す。図中、488nmアルゴンレーザーを用いた照射下での525nmにおける蛍光強度対時間を、2つの励起強度、 200 mW/cm^2 （曲線a）および 25 mW/cm^2 （曲線b）に対してプロットした。蛍光が複雑な非指数関数的減衰速度に従うことが示された。また、 1524 cm^{-1} カロテノイドラマンピークの強度対時間（曲線c）を図9に示す。蛍光ブリーチングを招いた同じ出力強度レベル下で強度は実質的に不変であることが分かる。

【0048】

（実施例6）

実施例1の装置を用いて、健康な人間の志願者の体の種々の皮膚領域に含まれるカロテノイド含量を測定した。図10のグラフは、志願者の指（曲線a）および額（曲線b）の測定から得られた、蛍光を除去したラマンスペクトル結果を示す。指からのラマン反応および、それに対応してカロテノイド濃度は、額からの反応の約2倍であることが分かった。これは体の種々の皮膚領域にカロテノイドが異なるレベルで存在することを示している。

【0049】

志願者の無処置の皮膚から得られた更なる初期的発見は、体の同じ場所であってもカロテノイドレベルは人によって顕著に異なるということを表している。例えば、2人の白人男性の額のカロテノイドレベルは係数で3.8異なることが分かった。さらに初期データはカロテノイドレベルが特に喫煙者で減少することを示唆している。

【0050】

（実施例7）

実施例1の装置を用いて、扁平上皮ガンを患っている人間の志願者の体の皮膚領域中のカロテノイド含量を測定した。図11のグラフはガン近傍の健康な皮膚領域の測定から得られた、蛍光を排除したラマンスペクトル結果（曲線a）およびガンの中心領域の測定から得られた結果（曲線b）を示す。カロテノイドに関係するピークは 1015 cm^{-1} 、 1159 cm^{-1} および 1524 cm^{-1} で測定された。曲線（a）のピークは、光子計数（強度）が高いことに表されるように、健康な皮膚におけるカロテノイドのレベルが比較的高いことに対応する。曲線（b）のピークは光子計数が非常に少なく、ガンの皮膚中のカロテノイドのレベルが低いことを示している。したがって、ガン領域ではカロテノイド

10

20

30

40

50

含量が減少し、両方の領域のカロテノイド濃度の中に顕著な差が現れる。

【0051】

本発明の精神および本質的特徴を離れることなく、他の特定の形態で本発明を具現化することもできる。説明した実施態様はあらゆる点で例示的なものに過ぎず、制限的なものではないと考えるべきである。したがって、本発明の範囲は、前記の説明よりも、むしろ特許請求の範囲に示されている。特許請求の範囲と均等な意味および範囲内において、いかなる変更も本発明の範囲に包含される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の装置の全体概略図である。

【図2】 本発明の実験的装置の概略図である。

【図3】 生体の皮膚から得たラマンスペクトルを背景蛍光スペクトルと共に示すグラフである。

【図4】 背景蛍光を取り除いた後の図3のラマンスペクトルを示すグラフである。

【図5】 種々のレーザー励起波長で測定した人間の皮膚の蛍光背景を示すグラフである。

【図6】 人間の皮膚蛍光の減衰速度を示すグラフである。

【図7】 カロテノイドのラマン散乱および皮膚の蛍光に対する励起効率のスペクトル依存性を示すグラフである。

【図8】 蛍光の部分ブリーチングを行った皮膚の蛍光スペクトルを示すグラフである。

【図9】 人間の皮膚の蛍光のブリーチング挙動の速度を示すグラフである。

【図10】 種々の部位で測定した生体の皮膚のラマンスペクトルを示すグラフである。

【図11】 健康な皮膚および隣接する皮膚ガン領域のラマンスペクトルを示すグラフである。

10

20

【図1】

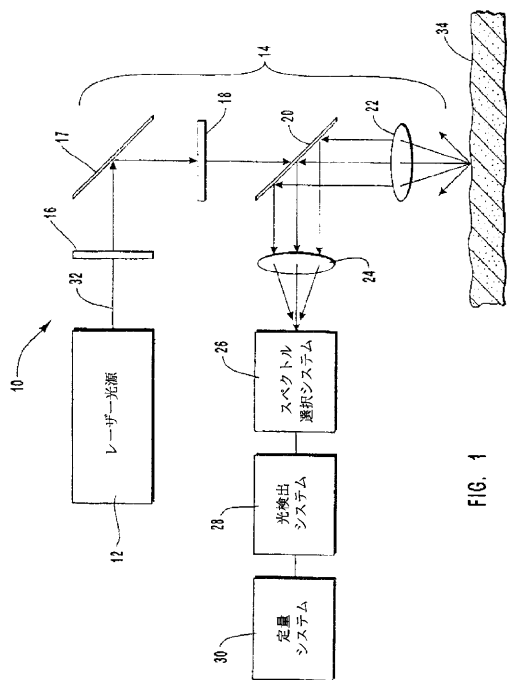


FIG. 1

【図2】

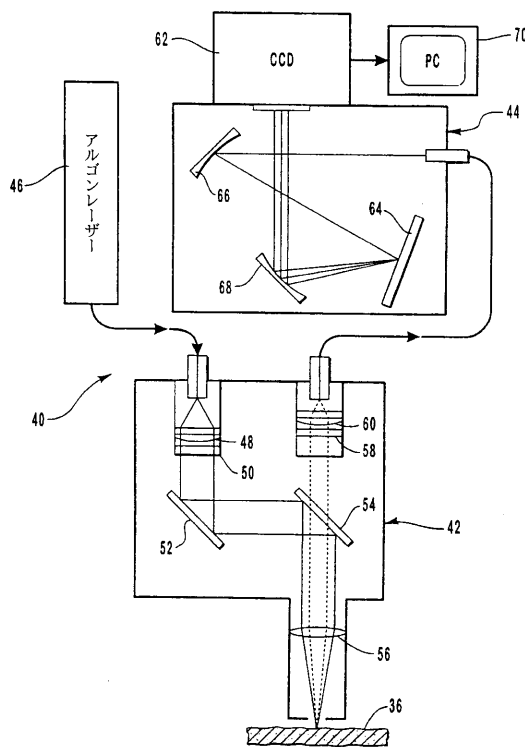


FIG. 2

【 図 3 】

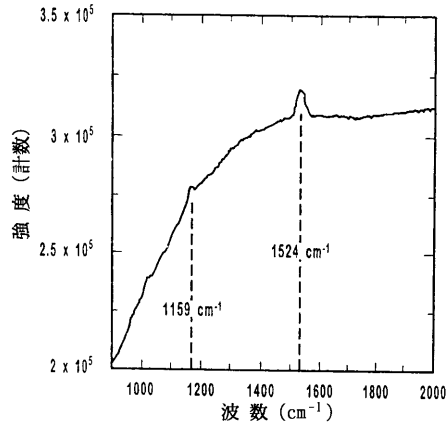


FIG. 3

【 図 4 】

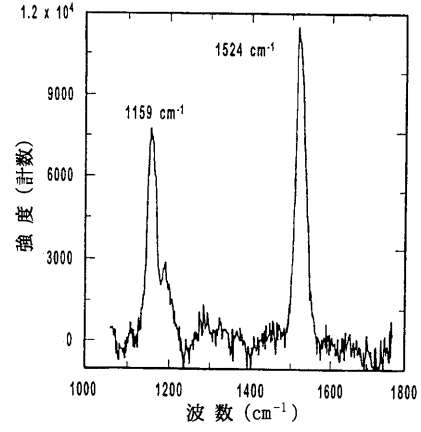


FIG. 4

【 図 5 】

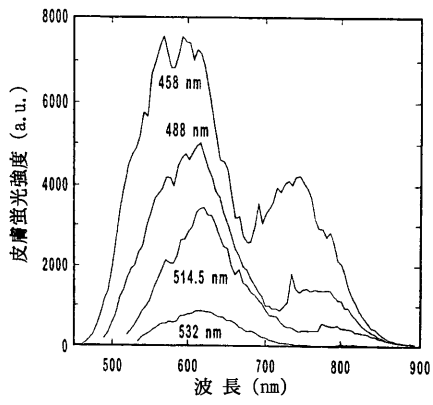


FIG. 5

【 図 6 】

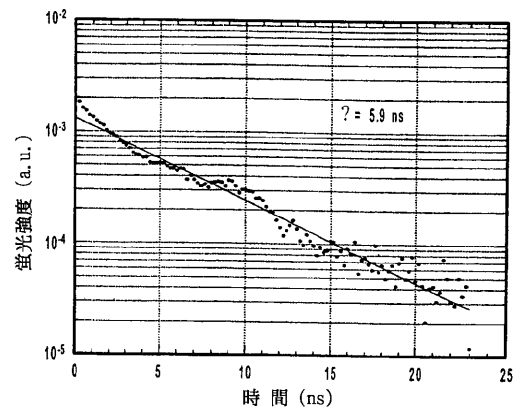


FIG. 6

【 図 7 】

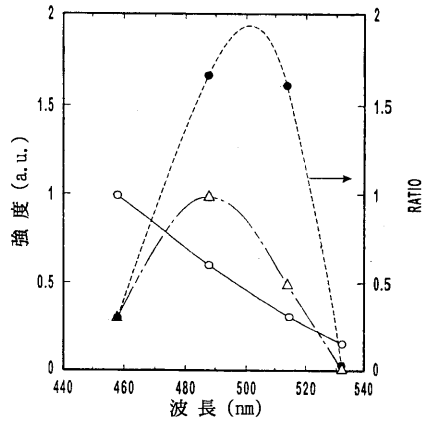


FIG. 7

【 図 8 】

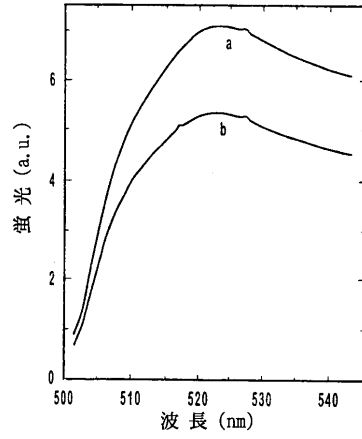


FIG. 8

【 図 9 】

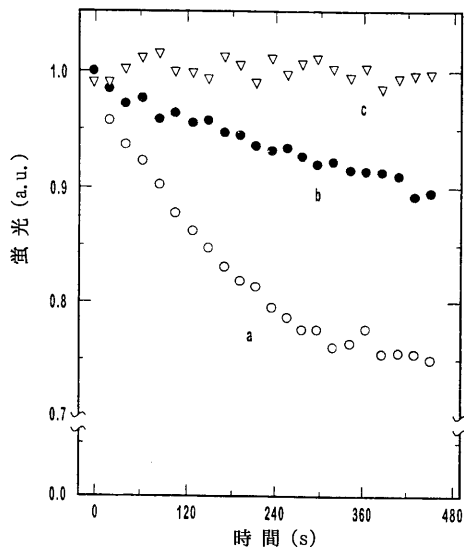


FIG. 9

【 図 10 】

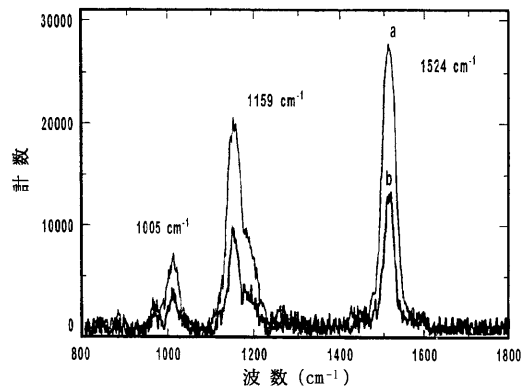


FIG. 10

【 図 1 1 】

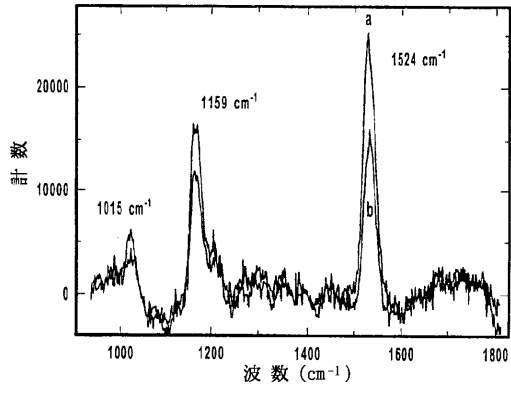


FIG. 11

フロントページの続き

(72)発明者 ロバート ダブリュー マックレイン

アメリカ合衆国 ユタ州 84103 ソルトレイクシティ エイチ ストリート 484

(72)発明者 ニキータ ビー カッツ

アメリカ合衆国 ユタ州 84111 ソルトレイクシティ サウス 400 イースト 732
ナンバー 206

(72)発明者 ポール エス バーンスタイン

アメリカ合衆国 ユタ州 84121 ソルトレイクシティ オールド ミル サークル 663
3

審査官 小田倉 直人

(56)参考文献 特開平10-282001(JP,A)

特表平10-505167(JP,A)

国際公開第98/040006(WO,A1)

国際公開第96/029925(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61B 10/00