

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5156634号  
(P5156634)

(45) 発行日 平成25年3月6日(2013.3.6)

(24) 登録日 平成24年12月14日(2012.12.14)

(51) Int. Cl. F I  
 GO 1 N 21/65 (2006.01) GO 1 N 21/65  
 GO 1 N 33/50 (2006.01) GO 1 N 33/50 Q

請求項の数 41 (全 33 頁)

(21) 出願番号	特願2008-534579 (P2008-534579)	(73) 特許権者	504403286
(86) (22) 出願日	平成18年9月29日 (2006. 9. 29)		ニュースキン インターナショナル イン
(65) 公表番号	特表2009-510473 (P2009-510473A)		コーポレイテッド
(43) 公表日	平成21年3月12日 (2009. 3. 12)		NuSkin International,
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/038282		Inc.
(87) 国際公開番号	W02007/044268		アメリカ合衆国 84601 ユタ州 プ
(87) 国際公開日	平成19年4月19日 (2007. 4. 19)		ロボ ウェスト センター ストリート
審査請求日	平成21年9月28日 (2009. 9. 28)		75 ワン ニュースキン プラザ
(31) 優先権主張番号	11/244, 434	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成17年10月4日 (2005. 10. 4)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 強いバックグラウンドの蛍光の存在において弱い信号を測定するためのラマン機器

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的サンプル中の選択された分子のレベルを測定する方法であって、

第1の波長 F 1 の光 ( 2 0 ) を生成し、前記第1の光を用いて前記標的サンプルの一部分を照射するステップと、

前記標的サンプルからの第1の散乱光を捕捉することと、前記第1の散乱光を複数の光センサ ( 4 2、4 4、4 6、4 8 ) に向けることと、これにより、前記複数の光センサの各々からの測定を得ることとにより、第1の組の測定された光強度値を生み出すステップであって、各光センサは、異なる波長における光を測定し、前記波長は、前記標的サンプル内の分子に対する予測ラマン・シフト波長の波長に近接しており、各測定は、前記光センサに対する前記第1の散乱光に固有である、ステップと、

前記第1の光からの周波数とは異なる第2の波長 F 2 の光 ( 2 2 ) を生成し、前記第2の光を用いて前記標的サンプルの一部分を照射するステップと、

前記標的サンプルからの第2の散乱光を捕捉することと、前記第2の散乱光を複数の光センサ ( 4 2、4 4、4 6、4 8 ) に向けることと、これにより、前記複数の光センサの各々からの測定を得ることとにより、第2の組の測定された光強度値を生み出すステップであって、各光センサは、異なる波長における光を測定し、前記波長は、前記標的サンプル内の分子に対する予測ラマン・シフト波長の波長に近接しており、各測定は、前記光センサに対する前記第2の散乱光に固有である、ステップと

を含み、

前記第 1 の組の測定された光強度値および前記第 2 の組の測定された光強度値から、標的サンプルにおける選択された分子のレベルを表す補間強度値を導出するステップであって、前記導出するステップは、

対応する異なる波長における測定された光強度値の比率を計算するステップと、

カーブ・フィッティングによって外挿することにより、波長 - 比率グラフ上の端点を通過し、かつ、前記グラフの中間点から等距離にある曲線を見出すステップであって、前記異なる波長の各々は、前記複数のセンサのそれぞれに対する中心波長である、ステップと

を含む、ステップ

を特徴とする、方法。

10

【請求項 2】

前記複数の光センサは、少なくとも 4 つの光センサを含み、

波長 F 1 に対する前記照射の結果として得られる散乱光に対する第 1 の組の測定された強度値を生み出すステップは、前記複数の光センサのうちの少なくとも 4 つに対して、波長 F 1 に対する照射の結果として得られる異なる波長 { f 0、f 1、f 2、f 3 } に対する測定値 { S F 1 0、S F 1 1、S F 1 2、S F 1 3 } を生み出すことを含み、

波長 F 2 に対する前記照射の結果として得られる散乱光に対する第 2 の組の測定された強度値を生み出すステップは、前記複数の光センサのうちの少なくとも 4 つに対して、波長 F 2 における照射の結果として得られる異なる波長 { f 0、f 1、f 2、f 3 } に対する測定値 { S F 2 0、S F 2 1、S F 2 2、S F 2 3 } を生み出すことを含み、

20

{ S F 1 0、S F 1 1、S F 1 2、S F 1 3 } および { S F 2 0、S F 2 1、S F 2 2、S F 2 3 } の各々は、順序付けられた組の測定された強度値であり、S F 1 1 は、前記選択された分子および照射波長 F 1 に関連付けられた特徴的ラマン発光波長 F c における測定であり、S F 2 2 は、前記選択された分子および照射波長 F 2 に関連付けられた特徴的ラマン発光波長 F c における測定である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記少なくとも 4 つの光センサの較正 ( 5 0 0 ) 以降、そのようなセンサの出力における変動について、{ S F 1 0、S F 1 1、S F 1 2、S F 1 3 } および { S F 2 0、S F 2 1、S F 2 2、S F 2 3 } の各々を調整することをさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 4】

前記標的サンプルからの散乱光においてラマン散乱を有しない光学的ダーク・サンプル標的から導出されるダーク値について、{ S F 1 0、S F 1 1、S F 1 2、S F 1 3 } および { S F 2 0、S F 2 1、S F 2 2、S F 2 3 } の各々を調整すること ( 5 1 0 ) をさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 1 の組の測定された強度値および前記第 2 の組の測定された強度値における対応する値の比率から、補間強度値を導出するステップは、

測定値の比率 { S F 1 0 / S F 2 0、S F 1 1 / S F 2 1、S F 1 2 / S F 2 2、S F 1 3 / S F 2 3 } を計算することと、

40

結果として得られる計算された測定値の比率から、カーブ・フィッティングによって外挿することにより、波長 - 比率グラフ上の点 { f 0、S F 1 0 / S F 2 0 } および { f 3、S F 1 3 / S F 2 3 } を通過する曲線を見出すことであって、前記曲線は、点 { f 1、S F 1 1 / S F 2 1 } および { f 2、S F 2 1 / S F 2 2 } から等距離にあり、f 0、f 1、f 2、f 3 の各々は、測定された強度値に対する第 1 のセンサ、第 2 のセンサ、第 3 のセンサ、第 4 のセンサのそれぞれに対する中心波長である、ことと

を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記カーブ・フィッティングは、前記曲線として放物線を用いる、請求項 5 に記載の方法。

50

## 【請求項 7】

前記結果として得られる計算された測定値の比率から、端点{ $f_0$ 、 $SF_{10}/SF_{20}$ }および{ $f_3$ 、 $SF_{13}/SF_{23}$ }において固定された曲線を用いる放物線補間において、前記4つのセンサに対する波長範囲の中間点にあり、かつ、点{ $f_1$ 、 $SF_{11}/SF_{21}$ }と{ $f_2$ 、 $SF_{12}/SF_{22}$ }との間の中間に存在する値をグラフで決定すること

を含む、請求項5に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記結果として得られる計算された比率から、端点{ $f_0$ 、 $SF_{10}/SF_{20}$ }および{ $f_3$ 、 $SF_{13}/SF_{23}$ }において固定された非線形曲線を用いるカーブ・フィッティングによって測定されるときに、点{ $f_1$ 、 $SF_{11}/SF_{21}$ }と{ $f_2$ 、 $SF_{12}/SF_{22}$ }との間の中間に存在する値をグラフで決定すること

を含む、請求項5に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記第1の光は、第1の波長 $F_1$ の光であり、

前記第2の光は、前記第1の波長 $F_1$ に隣接する第2の波長 $F_2$ の光であり、

前記方法は、

前記複数の光センサの各々から測定を得ることであって、各測定は、前記光センサに対する前記第1の散乱光に固有である、ことと、

波長 $F_1$ に対する前記照射の結果として得られる散乱光に対する第1の組の測定された強度値を生み出すことであって、前記組の測定された強度値は、

前記選択された分子および波長 $F_1$ に関連付けられた特徴的ラマン発光波長 $F_c$ における値または前記 $F_c$ の付近の値と、

波長 $F_1$ に対する前記照射の結果として得られるラマン発光を除外するために、前記特徴的ラマン発光波長 $F_c$ に隣接しているが、前記波長よりも十分に低い波長に対する少なくとも1つの測定と、

波長 $F_1$ に対する前記照射の結果として得られるラマン発光を除外するために、前記特徴的ラマン発光波長 $F_c$ に隣接しているが、前記波長よりも十分に高い波長に対する少なくとも1つの測定と

を含む、ことと、

前記複数の光センサの各々から測定を得ることであって、各測定は、前記光センサに対する前記第2の散乱光に固有である、ことと、

波長 $F_2$ に対する前記照射の結果として得られる散乱光に対する第2の組の測定された強度値を生み出すことであって、前記組の測定された強度値は、

前記選択された分子および波長 $F_2$ に関連付けられた特徴的ラマン発光波長 $F_c$ における値または前記 $F_c$ の付近の値と、

波長 $F_2$ に対する前記照射の結果として得られるラマン発光を除外するために、前記特徴的ラマン発光波長 $F_c$ に隣接しているが、前記波長よりも十分に低い波長に対する少なくとも1つの測定と、

波長 $F_2$ に対する前記照射の結果として得られるラマン発光を除外するために、前記特徴的ラマン発光波長 $F_c$ に隣接しているが、前記波長よりも十分に高い波長に対する少なくとも1つの測定と

を含む、ことと、

前記第2の散乱光の対応する測定に対する前記第1の散乱光の測定の比率を計算することにより、前記第1の組の測定された強度値および前記第2の組の測定された強度値における対応する値の比率から、非ラマン発光に起因する強度値成分を除去する $F_1$ および $F_2$ の各々に関連付けられた前記特徴的ラマン発光波長 $F_c$ の間の散乱光に対する補間強度値を導出することであって、前記補間強度値は、前記標的サンプルにおける前記選択された分子のレベルの測定を表す、ことと

を含む、請求項1に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 10】

前記散乱光を所定の分量で少なくとも4つの強度センサに向けることは、前記散乱光を等分量で向けることを含む、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記選択された分子は、カロテノイドである、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記標的サンプルは、ヒト組織である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記標的サンプルは、ヒトの手の組織である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記第2の波長F2の光は、前記第1の波長F1の光の強度と実質的に等しい強度を有する、請求項9に記載の方法。

10

## 【請求項 15】

F1およびF2は、3ナノメートル未満だけ分離されている、請求項9に記載の方法。

## 【請求項 16】

F1およびF2は、2ナノメートル未満だけ分離されている、請求項9に記載の方法。

## 【請求項 17】

散乱強度値が測定される最低波長値と、散乱強度値が測定される最高波長値との間の差は、10ナノメートル未満の波長範囲である、請求項9に記載の方法。

## 【請求項 18】

散乱強度値が測定される最低波長値と、散乱強度値が測定される最高波長値との間の差は、7ナノメートル未満の波長範囲である、請求項9に記載の方法。

20

## 【請求項 19】

それぞれの光が照射を提供している場合に、前記第1の波長F1の光のおよび前記第2の波長F2の光の強度を調整することにより、前記標的における各光から等しい強度を提供することをさらに含む、請求項9に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記第1の波長F1および前記第2の波長F2は、実質的にラマン共鳴波長である、請求項9に記載の方法。

## 【請求項 21】

標的サンプルにおける選択された分子のレベルを測定する装置であって、第1の波長F1の光を用いて標的を照射するように構成された第1の光源(20)と、前記第1の波長F1に隣接する第2の波長F2の光を用いて前記標的を照射するように構成された第2の光源(22)と、

30

波長F1およびF2における照射の各々の結果として得られる散乱光を前記標的から受信し、前記選択された分子および照射波長(34、14)の各々に関連付けられた特徴的ラマン発光波長Fcを含む波長範囲における前記散乱光の強度をサンプリングする手段と

波長F1に対する前記照射の結果として得られる散乱光に対する第1の組のサンプリングされた強度値を感知し、かつ、測定する第1のサンプリング装置(14)であって、前記サンプリングされた強度値は、

40

前記選択された分子およびF1に関連付けられた前記特徴的ラマン発光波長Fcにおける値または前記Fcの付近の値と、

波長F1に対する前記照射の結果として得られるラマン発光を除外するために、前記特徴的ラマン発光波長Fcに隣接しているが、前記波長よりも十分に低い波長に対する少なくとも1つのサンプリングされた強度値と、

波長F1に対する前記照射の結果として得られるラマン発光を除外するために、前記特徴的ラマン発光波長Fcに隣接しているが、前記波長よりも十分に高い波長に対する少なくとも1つのサンプリングされた強度値と

を含む、第1のサンプリング装置(14)と、

50

波長 F 2 に対する前記照射の結果として得られる散乱光に対する第 2 の組のサンプリングされた強度値を感知し、かつ、測定する第 2 のサンプリング装置 ( 1 4 ) であって、前記サンプリングされた強度値は、

前記選択された分子および F 2 に関連付けられた前記特徴的ラマン発光波長 F c における値または前記 F c の付近の値と、

波長 F 2 に対する前記照射の結果として得られるラマン発光を除外するために、前記特徴的ラマン発光波長 F c に隣接しているが、前記波長よりも十分に低い波長に対する少なくとも 1 つのサンプリングされた強度値と、

波長 F 2 に対する前記照射の結果として得られるラマン発光を除外するために、前記特徴的ラマン発光波長 F c に隣接しているが、前記波長よりも十分に高い波長に対する少なくとも 1 つのサンプリングされた強度値と

を含む、第 2 のサンプリング装置 ( 1 4 ) とを含み、

補間強度値を導出するように構成されたデータ処理論理であって、前記導出は、

前記第 1 の組のサンプリングされた強度値および前記第 2 の組のサンプリングされた強度値における対応する値の比率を計算し、かつ、グラフ化することと、

カーブ・フィッティングによって外挿することにより、波長 - 比率グラフ上の端点を通過し、かつ、前記グラフの中間点から等距離にある曲線を見出すことであって、前記異なる波長の各々は、F 1 および F 2 の各々に関連付けられた特徴的ラマン発光波長 F c に隣接する前記組のサンプリングされた強度値のそれぞれに対する中心波長であり、前記導出は、非ラマン発光に起因する強度値成分を除去し、前記第 1 の組および前記第 2 の組における対応する値の比率から導出された前記補間強度値は、前記標的サンプルにおける前記選択された分子のレベルの測定を表す、ことと

によって行われることを特徴とする、装置。

**【請求項 2 2】**

前記第 1 の光および前記第 2 の光は、発光ダイオードによって生成される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 2 3】**

前記第 1 の光および前記第 2 の光は、それぞれ、第 1 のフィルタおよび第 2 のフィルタを通過させられる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 2 4】**

前記第 1 のフィルタは、471.3 ナノメートルにおける光のみを通過させ、前記第 2 のフィルタは、473 ナノメートルにおける光のみを通過させる、請求項 1 に記載の方法

。

**【請求項 2 5】**

前記第 1 の光および前記第 2 の光は、各々が 4 等分量に分割され、前記 4 等分量は、4 つの光センサに向けられる、請求項 2 4 に記載の方法。

**【請求項 2 6】**

第 1 の光センサは、505.8 ナノメートルにおける光を測定し、

第 2 の光センサは、507.8 ナノメートルにおける光を測定し、

第 3 の光センサは、509.8 ナノメートルにおける光を測定し、

第 4 の光センサは、511.8 ナノメートルにおける光を測定する、請求項 2 5 における方法。

**【請求項 2 7】**

前記第 1 の散乱光および前記第 2 の散乱光は、各々が 4 つの光センサに向けられる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 2 8】**

前記第 1 の散乱光および前記第 2 の散乱光は、各光センサ向けられる等分量の各光に等分される、請求項 2 7 に記載の方法。

**【請求項 2 9】**

10

20

30

40

50

前記第 2 の散乱光の対応する測定に対する前記第 1 の散乱光の測定の比率を用いて、標的サンプルにおける選択された分子のレベルを計算することは、

前記光センサに対する前記第 1 の散乱光に固有の前記光センサの各々からの測定を、前記光センサに対する前記第 2 の散乱光に固有の対応するそれぞれの光センサからの測定で割ることにより、ラマン比率を得ることと、

前記ラマン比率に前記標的サンプルからの蛍光の平均レベルを乗じることと

を含み、

前記蛍光の平均レベルは、前記標的サンプルの前記部分が、前記第 2 の光を用いて照射されるときに、前記複数の光センサによって出力される平均 P M T 電圧に基づいて得られる、請求項 1 に記載の方法。

10

**【請求項 3 0】**

前記標的サンプルからの蛍光の平均強度レベルは、前記標的サンプルからのラマン・シフト発光の強度よりも少なくとも 5 0 倍大きい、請求項 2 9 に記載の方法。

**【請求項 3 1】**

正規化データを収集することと、

前記正規化データとともに、前記第 1 の散乱光の測定および前記第 2 の散乱光の測定を用いることにより、前記標的サンプルにおける選択された分子のレベルを計算することとをさらに含み、

前記正規化データは、前記第 1 の光と前記第 2 の光と前記複数の光センサとから得られた較正データを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

**【請求項 3 2】**

前記光センサは、光電子倍增管である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3 3】**

波長 F 1 および波長 F 2 のそれぞれに対する照射の結果として得られる散乱光に対する第 1 の組のサンプリングされた強度値および第 2 の組のサンプリングされた強度値を生み出すサンプリング装置は、

波長 F 1 に対する照射の結果として得られる 4 つのサンプル値 { S F 1 0、S F 1 1、S F 1 2、S F 1 3 } を感知するためのデータ処理論理と、波長 F 2 における照射の結果として得られる 4 つのサンプル値 { S F 2 0、S F 2 1、S F 2 2、S F 2 3 } を感知するためのデータ処理論理とを有する少なくとも 4 つの強度センサ ( 4 2、4 4、4 6、4 8 )

30

を含み、

{ S F 1 0、S F 1 1、S F 1 2、S F 1 3 } および { S F 2 0、S F 2 1、S F 2 2、S F 2 3 } の各々は、順序付けられた組の値であり、S F 1 1 は、前記選択された分子および F 1 に関連付けられた特徴的ラマン発光波長 F c における測定であり、S F 2 2 は、前記選択された分子および F 2 に関連付けられた特徴的ラマン発光波長 F c における測定である、請求項 2 1 に記載の装置。

**【請求項 3 4】**

前記少なくとも 4 つのセンサの較正以降、そのようなセンサの出力における変動について、{ S F 1 0、S F 1 1、S F 1 2、S F 1 3 } および { S F 2 0、S F 2 1、S F 2 2、S F 2 3 } の各々を調整する手段 ( 1 6 ) をさらに含む、請求項 3 3 に記載の装置。

40

**【請求項 3 5】**

前記標的サンプルからの散乱光においてラマン散乱を有しない光学的ダーク・サンプル標的から導出されるダーク値について、{ S F 1 0、S F 1 1、S F 1 2、S F 1 3 } および { S F 2 0、S F 2 1、S F 2 2、S F 2 3 } の各々を調整する手段をさらに含む、請求項 3 3 に記載の装置。

**【請求項 3 6】**

各サンプリング装置は、4 つのセンサを用いて、一組のサンプリングされた強度値を感知し、かつ、測定し、

前記第 1 の組のサンプリングされた強度値および前記第 2 の組のサンプリングされた強

50

度値における対応する値の比率から、補間強度値を導出するためのデータ処理論理は、  
サンプル値の比率 {  $SF_{10} / SF_{20}$ 、 $SF_{11} / SF_{21}$ 、 $SF_{12} / SF_{22}$ 、 $SF_{13} / SF_{23}$  } を計算することと、  
結果として得られる計算されたサンプル値の比率から、カーブ・フィッティングによっ  
て外挿することにより、波長 - 比率グラフ上の点 {  $f_0$ 、 $SF_{10} / SF_{20}$  } および {  
 $f_3$ 、 $SF_{13} / SF_{23}$  } を通過する曲線を見出すことであって、前記曲線は、前記グ  
ラフ上の点 {  $f_1$ 、 $SF_{11} / SF_{21}$  } および {  $f_2$ 、 $SF_{21} / SF_{22}$  } から等距  
離にあり、 $f_0$ 、 $f_1$ 、 $f_2$ 、 $f_3$  の各々は、サンプリングされた強度値を感知する第 1  
のセンサ、第 2 のセンサ、第 3 のセンサ、第 4 のセンサのそれぞれに対する中心波長であ  
る、ことと

10

を行うためのデータ処理論理を含む、請求項 21 に記載の装置。

【請求項 37】

カーブ・フィッティングのためのデータ処理論理は、前記曲線として放物線を用いる、  
請求項 36 に記載の装置。

【請求項 38】

前記結果として得られる計算されたサンプル値の比率を用いて、{  $f_0$ 、 $SF_{10} / S$   
 $F_{20}$  } および {  $f_3$ 、 $SF_{13} / SF_{23}$  } において固定された曲線に基づく放物線補  
間において、前記 4 つのセンサに対する波長範囲の中間点にあり、かつ、点 {  $f_1$ 、 $SF$   
 $_{11} / SF_{21}$  } と {  $f_2$ 、 $SF_{12} / SF_{22}$  } との間の中に存在する値をグラフで  
決定するためのデータ処理論理を含む、請求項 36 に記載の装置。

20

【請求項 39】

サンプル値の比率 {  $SF_{10} / SF_{20}$ 、 $SF_{11} / SF_{21}$ 、 $SF_{12} / SF_{22}$ 、  
 $SF_{13} / SF_{23}$  } を計算することと、  
結果として得られる計算されたサンプル値の比率を用いて、波長 - 比率グラフ上の点 {  
 $f_0$ 、 $SF_{10} / SF_{20}$  } および {  $f_3$ 、 $SF_{13} / SF_{23}$  } において固定された非  
線形曲線を用いるカーブ・フィッティングによって測定されるときに、前記グラフ上の点  
{  $f_1$ 、 $SF_{11} / SF_{21}$  } と {  $f_2$ 、 $SF_{12} / SF_{22}$  } との間の中に存在する  
値をグラフで決定することと

を行うためのデータ処理論理を含む、請求項 21 に記載の装置。

【請求項 40】

波長  $F_1$  および  $F_2$  における照射の各々の結果として得られる散乱光を前記標的から受  
信し、前記選択された分子および前記照射波長の各々に関連付けられた特徴的ラマン発光  
波長  $F_c$  を含む波長範囲における前記散乱光の強度をサンプリングする手段は、少なくと  
も 4 つの強度センサに対する所定の部分に散乱光を向ける手段を含む、請求項 21 に記載  
の装置。

30

【請求項 41】

少なくとも 4 つの強度センサに対する所定の部分に散乱光を向ける手段は、等分量で前  
記散乱光を向ける手段 ( 50 a、50 b、50 c、50 d ) を含む、請求項 40 に記載の  
装置。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

( 関連出願の引用 )

本願は、米国特許法第 119 条 ( e ) の下で、2005 年 10 月 4 日出願の名称「Raman Instrument for Measuring Weak Signals in the Presence of Strong Background Fluorescence」( 代理人整理番号 187128 / US ) の米国出願第 11 / 244, 434 号に対する利益を主張し、該出願の内容はその全体が本明細書において参考として援用される。

【0002】

50

本発明は、生物組織に認められる化合物のレベルを測定する方法及び装置に関する。更に詳細には、本発明は、生物組織中のカロテノイド又は他の選択された分子のレベルの非侵襲的な検出及び測定のための方法及び装置に関する。

【背景技術】

【0003】

カロテノイド(carotenoid)は、人体において重大な効果を有する、食事から摂取可能な植物色素である。例えば、多くのカロテノイドは免疫機能にプラスの効果を有するらしいと考えられており、このことは、癌を阻止するのに重要である可能性がある。カロテノイドはまた、心臓疾患から身を守る可能性がある抗酸化作用を有する。更に、カロテノイドは、加齢に関連した黄斑変性などの変性疾患の危険性を低減することに役立つ可能性があることが、いくつかの研究により示されている。

10

【0004】

最近、研究者らは、カロテノイドのカロテン(ニンジン)、リコピン(トマト及び赤ピーマンなどの赤い果物及び野菜)、クリプトキサンチン(オレンジ)、並びにルテイン及びゼアキサンチン(ブロッコリ及び緑色葉野菜)などに焦点を当てている。これらの物質を欠損する人はある種の癌、特に肺癌を発症させる可能性が高いことが、ある研究により示されており、これらのカロテノイドを多く消費することが癌を防ぐ可能性があるという理論、及びこれらの物質の欠損を確認することで、ある個人に健康上の懸念の可能性に対する注意を喚起し得るという理論を支持している。1つの研究は、特にルテイン、即ちホウレンソウ、ブロッコリ、レタス、トマト、オレンジ、ニンジン、セロリ、及び葉野菜を含む多くの野菜並びに果物に認められるカロテノイドに注目した。この研究は結腸癌を患う約2000人の患者を評価し、この研究群のルテイン摂取量が癌でない人のそれより大幅に低いことを確認した。

20

【0005】

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物学的防御を提供することが例証されている。例えば、カロテノイドは、皮膚、唾液腺、乳腺、肝臓、及び結腸などの組織における癌腫形成を防ぐことが、動物モデルで示されてきた。更に、カロテノイド、及びレチノイドなどの関連物質のレベルが低いことは、悪性病変の高危険因子として判定されてきている。例えば、摂取するカロテノイドのリコピンのレベルが低いと、前立腺癌及び子宮頸癌に関連し、カロテノイドのルテイン、ゼアキサンチン、カロテン、及びカロテンは肺癌に関連し、並びにカロテンは口腔癌に関連する。従って、これらのカロテノイド、レチノイド、及び他の関連物質の化学濃度を定量的に測定することは、癌の危険性又は存在の指標を提供する。

30

【0006】

皮膚癌は、米国では最も一般的な癌である。皮膚関連の悪性腫瘍に関連する化学物質レベルの検出を実現する方法は、皮膚癌の早期診断及び早期治療において医師及び医療関係者の大きな力添えとなる。

【0007】

皮膚中のカロテノイドは、皮膚の悪性腫瘍からの生物学的防御を提供するという理論が立てられている。皮膚癌に関連する化学物質の存在を検出するのに使用される先行方法は、主に、生検又は他の侵襲的手順により得られた組織の分析によるものであった。現在カロテノイドを測定するのに使用されている標準的な方法は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)技術によるものである。そのような技術は、後の分析及び処理のために患者から大量の組織サンプルを採取することを必要とするため、通常、完了するのに少なくとも24時間かかる。このように、この技術は侵襲的で時間がかかり、また費用もかかる。

40

【0008】

目の黄斑組織中のカロテノイド・レベル測定のための非侵襲的方法は、特許文献1に記載されており、そこでは、カロテノイド及び関連物質のレベルは、ラマン分光法を用いて測定されている。ラマン分光法は、特定の化学物質の(正確な較正が実施された場合の)存在及び濃度を確認することができる。略単色の光が測定されるサンプルに入射し、入射

50

光とは異なる波長の非弾性散乱光が検出され測定される。入射光と散乱光との間の波長シフトは、ラマン・シフトとして既知であり、該シフトは、選択された分子の振動エネルギー状態又は回転エネルギー状態の「指紋」であるエネルギーに対応する。通常、分子は、いくつかの特徴的ラマン活性の振動エネルギー状態又は回転エネルギー状態を示すので、その分子のラマン・スペクトルの測定は、その分子の指紋を提供する、即ち、分子特有の一連のスペクトル的に鋭い振動ピーク又は回転ピークを提供する。ラマン散乱光の強度は、関心分子（単数又は複数）の濃度に直接対応する。

#### 【0009】

ラマン分光法に関する1つの問題は、ラマン散乱光に固有の非常に低い信号強度である。散乱光強度が波長の4乗を用いて計測できることは周知である。微弱なラマン信号は、レーリー（Rayleigh）散乱光とは区別しなければならない。レーリー散乱光は、入射光と同じ波長の弾性散乱光であり、総散乱光の大部分を構成している。ラマン信号は、フィルタ、回折格子、又は他の波長分離デバイスの使用により、レーリー散乱光から分離することができる。しかし、これには、光が波長分離デバイスを通過する時に起こり得る更なる減衰により、測定されたラマン信号を更に弱める作用を有する可能性がある。実際には、ラマン散乱光を検出することは極めて困難である。組織サンプルへの入射光の強度を高めてラマン信号を増強しようとする者もいるであろう。レーザーは光強度を高める光源として使用されてきたが、これにより、サンプルの燃焼又は分解が生じる可能性がある。

#### 【0010】

これらの問題のいくつかを克服するために、本明細書上記で参照した特許文献1に記載されている通り、共鳴ラマン分光法として既知の技術が使用されてきた。そのような技術はまた、特許文献2にも記載されている。共鳴ラマン分光法では、利用されている入射照射は、関心分子の電子エネルギー遷移に対応する共鳴波長に相当する波長を有する。このことは、より強力な入力信号を使用することなく、ラマン出力信号を大いに強化する効果を有し、それにより、レーザー燃焼により生じるサンプルへの損傷を回避することができる。また、これらの共鳴ラマン信号は、ヒト組織を損傷しない出力レベルでは実質的に不可視である非共鳴ラマン信号よりもずっと高い強度を有する。従って、共鳴ラマン分光法では、関心種に属するこれらのラマン信号のみが得られる。

#### 【0011】

上記で参照した特許文献1では、共鳴ラマン技術を用いて、ヒトの眼の健康な黄斑組織に関連する2つの化学物質である、カロテノイドのルテイン及びゼアキサンチンの濃度を測定している。上記で参照した特許文献2は、共鳴ラマン分光法を使用して、血漿中の特定のカロテノイドを測定しており、種々の悪性疾患の存在を示す方法として、ラマン・スペクトル・ピークの強度比の使用を提唱している。

#### 【0012】

ラマン測定に関連する更に別の問題は、皮膚中の関心物質が入射光を散乱させるだけでなく、吸収することもあり、続いて実質的な強度で蛍光を発することである。この蛍光は、ラマン・スペクトル・ピークを「かき消す」か又は圧倒する傾向のある、非常に強いスペクトル的に広範な信号を含むことが多く、物質の同定及び定量化の困難を増大させる。

#### 【0013】

蛍光分光法はそれ自体が別の技術であり、生物組織中の化合物量を計測するのに使用することができる。例えば、特許文献3は、子宮頸部の組織異常を検出するための蛍光分光法及び/又はラマン分光法の使用を開示している。蛍光測定の欠点は、多数の異なる分子が広帯域の波長で蛍光を発するので、そのような測定は特定の物質の存在又は濃度を最終的に確認するには使用できないことである。

#### 【0014】

特許文献4は、レーザーを使用して手の皮膚面などの組織を励起し、得られた散乱光のスペクトルを観察することによりカロテノイド・レベルを測定するシステムを示している。弱い狭帯域のラマン・ピークは、スペクトルにおいて広帯域の蛍光背景（通常、100

10

20

30

40

50

倍を超えて明るい)とは区別しなければならない。特許文献4におけるシステムは、予測ラマン・ピークの部分ではなくその両側に隣接するスペクトルの部分にカーブ・フィットを行なうことにより、ラマン・ピークの下にある蛍光(又は背景光)レベルを推定する技術を使用している。この分析に必要なスペクトル分解能は、該システムが依存する標準的な分光計を用いて組織から収集し得る光量を厳密に制限する。励起された組織領域は小さい、ミリメートル単位の小部分であることが求められる。レーザは、ラマン励起のための小点に焦点を集めることができる単色光の良好な光源であるが、必要な青-緑スペクトル領域の波長を有するレーザは高価であり、物理的条件が変動する環境下で安定に保つのは若干困難である。更に、ラマン・ピークの両側への光の測定に基づいて該ピークの下にある背景光のレベルを評価することは、特定のハードウェア変動によって変動する可能性のある誤りを生じやすい。

10

**【0015】**

ラマン分光法は、比較的大きな組織励起領域に対応する十分なスペクトル測定感度を有しており、レーザ又はラマン・ピークの下にある蛍光のレベルのベースライン推定を使用する必要がなく、該分光法を使用して組織中の化学物質濃度を測定する装置及び方法を提供することは、飛躍的な進歩であると考えられる。そのような装置は、生物組織中に種々の程度で存在するカロテノイド又は他の類似の化学物質のレベルの、安全で、非侵襲的、迅速、正確、かつ詳細な測定を、より広く利用可能にすると考えられる。

**【特許文献1】**米国特許第5873831号明細書**【特許文献2】**米国特許第4832483号明細書**【特許文献3】**米国特許第5697373号明細書**【特許文献4】**米国特許第6205354号明細書**【発明の開示】****【課題を解決するための手段】****【0016】**

組織中の化学濃度を測定する方法には、2つの測定段階がある。第1に、第1の光を生成し、該第1の光で組織の一部を照射するステップと、組織からの第1の反射光を捕捉するステップと、該第1の反射光を複数の光センサに向けるステップであって、各光センサが異なる波長の光を測定し、該波長が、組織中の化学物質に関する予測ラマン・シフト波長の波長に近接しているステップと、各光センサから測定値を得るステップであって、各測定値が該光センサを通る第1の反射光に固有であるステップの段階である。第2に、第2の光を生成し、該第2の光で組織の一部を照射するステップと、組織からの第2の反射光を捕捉するステップと、該第2の反射光を複数の光センサに向けるステップであって、各光センサが異なる波長の光を測定し、該波長が、組織中の化学物質に関する予測ラマン・シフト波長の波長に近接しているステップと、各光センサから測定値を得るステップであって、各測定値が該光センサを通る第2の反射光に固有であるステップの段階である。第1の反射光の測定値及び第2の反射光の測定値を使用して、組織中の化学物質を計算する。

30

**【0017】**

多数の実施形態が開示されているが、以下の詳細な説明から、本発明の更に他の実施形態が当業者に明らかになるであろう。該説明は、本発明の例示的な実施形態を示し、記載している。理解されるであろうように、本発明は、いずれも本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、種々の明白な態様における変更が可能である。従って、図面及び詳細な説明は、本質的に例示的であり、非限定的であるとみなされるべきである。

40

**【発明を実施するための最良の形態】****【0018】**

生きている皮膚などの生物組織又は標的サンプル中のカロテノイド及び他の関連物質又は他の選択された分子のレベルの測定のための方法及び装置が提供されている。該装置は、励起部分、分析器部分、及び較正部分を含む。該装置により、組織中のカロテノイド(それらの異性体及び代謝産物を含む)及び類似物質のレベルの非侵襲的で、迅速、安全

50

、且つ正確な判定が可能になる。この情報は、カロテノイド又は他の抗酸化化合物が有用な情報を提供する可能性がある場合、状態のマーカとなり得る。

#### 【0019】

本発明の技術を用いて非侵襲的に測定することができる生物組織の例には、ヒトの手の皮膚が含まれる。測定は子宮頸部、直腸、及び肺に関してもなされてよいことが予想される。適切なサンプル提示付属品を付加することで、測定可能な体液に唾液、全血、及び粘液が含まれることが予想される。

#### 方法の概観

本方法及び装置は、共鳴ラマン分光法を使用する。該分光法は、皮膚などの生物組織中のカロテノイド及び類似物質又は他の選択された分子を同定し定量化するのに使用される。 (例えば、発光ダイオードからの) 単色又は略単色の励起光は、組織又は他の標的に向けられ、次に、散乱光は、スペクトル的にフィルタにかけられ検出される。このプロセスは、標的中の選択された分子構造が、標的に衝突する特徴的な波長の光により励起された場合、異なる特定の波長の光を発する、という前提に基づいている。その分子構造により発せられる非弾性散乱光子即ちラマン発光の強度は、単色光励起光源の波長からの波長分離機能即ちラマン・シフトである。例えば、473.0ナノメートルの光に暴露された場合、カロテノイドの炭素-炭素共役二重結合は、509.8ナノメートルの光を発する。

#### 【0020】

以下でより十分に記載する通り、約473.0ナノメートルの略単色の励起光は、標的に向けられてもよい。散乱光は標的から発せられ、レーリー散乱光及びラマン散乱光の両方、並びに標的からの蛍光も含む。レーリー光は、非弾性的に散乱された(又は入射励起光と同じ波長で散乱された)光である。

#### 【0021】

非弾性様式で散乱され、従って、入射励起光とは異なる波長である、光の小残余の一部は、ラマン信号を形成する。光源が473.0ナノメートルの光でカロテノイドを励起すると、カロテノイドは509.8ナノメートルに中心があるラマン信号を発し、その強度は組織中のカロテノイド量と相関する。レーリー散乱光とラマン散乱光とは波長で分類される。励起光の大半もまた標的で吸収され、標的からの蛍光発光につながる。ラマン測定における問題は、この不明瞭にする約509.8ナノメートルの非ラマン蛍光成分の除去である。該成分は、通常、ラマン信号より100倍強度がある。ラマン信号の分析には、測定から背景光(蛍光発光及びレーリー発光)を除去することが含まれる。

#### 【0022】

励起光とラマン散乱光との間の波長差は、ラマン・シフトとして既知であり、通常、波数又は波長の差として測定され、相当する波長シフトに変換することができる。ラマン・シフトは、使用されている入射光の波長とは無関係である。従って、例えば、励起波長が473.0ナノメートルである場合、カロテノイド分子のラマン・ピークは509.8ナノメートルで生じる一方、励起波長が471.3ナノメートルである場合、ラマン・ピークは507.8ナノメートルで生じる。励起光の波長からのシフト量が、存在する分子の種類を示しており、ラマン・ピークの強度は、該シフトを引き起こした存在する分子の濃度に直接対応する。以前に示唆されている通り、特定の波数シフトは、これらの化学構造の特定の振動方式又は回転方式に対応する。このように、方法及び装置は、約471.3ナノメートル及び473.0ナノメートルの励起光を提供する光源に関して検討されているが、広範な励起波長が、対応する波長シフトと共に殆んど同様に良好に機能する。

#### 【0023】

上記で検討した通り、短い可視波長を使用する、組織におけるラマン分光法は、特に、より微弱なラマン信号をマスクする皮膚組織では、非常に高い固有の蛍光性が原因で複雑である。ラマン信号を(ラマン信号より少なくとも50倍、通常100倍明るい)背景蛍光と区別するために、背景蛍光の除去を可能にする2つの測定が行なわれる。第1の測定では、組織を473.0ナノメートルの励起波長に短時間暴露する。第2の測定では、組織を471.3ナノメートルの青色光に暴露する。正確な波長値が重要ではないのと同様

10

20

30

40

50

に、これら2つの波長の正確な分離は重要ではない。従って、他の波長及び/又は他の波長間の分離が使用されてもよい。一般に、2つの励起波長を共に近づけるか又は隣接させることが好ましいが、フィルタ(例えば、両方とも以下で検討する、励起帯域通過フィルタ及びPMT帯域通過フィルタを含む)の帯域幅が原因で融合しないように、十分に離間させることが好ましい。本明細書で検討しているある特定の実施形態では、諸励起フィルタは、フィルタ幅0.8ナノメートルで、1.7ナノメートル離れている。これにより、励起フィルタの帯域幅によるある程度の広がりをもたせ、2ナノメートル離れた2つの励起波長に対応するラマン・ピークが置かれる。ラマン光を観察するようになされたPMTの手前の帯域通過フィルタは、1ナノメートルの帯域幅を有し、これにより、ピークの更なる広がりを効果的に導入する。波長分離は、フィルタの帯域幅の制約内で、可能な限り狭いことが望ましい。更に、必要に応じて、フィルタ分離はより大きく、例えば3ナノメートルでもよい。

#### 【0024】

組織から発せられる光は、第1及び第2の測定の方において類似の蛍光レベルを示す。なぜなら、組織に向けられた光の変動は比較的小さいからである。例えば505.8ナノメートル、507.8ナノメートル、509.8ナノメートル、及び511.8ナノメートルなど、ラマン信号ピークに近いか又はそれを含むいくつかの波長の発光は、473.0ナノメートル及び471.3ナノメートルの各励起波長に関して測定される。即ち、発光の4つのサンプルは、約505ナノメートルから約512ナノメートルの波長範囲で採取される。波長範囲及び特定のサンプリング波長は、選択された分子及び各励起波長に関連する特徴的発光波長 $F_c$ の値か又はそれに近い値を含むように選択され、少なくとも1つのサンプルは、そのような励起波長の照射に起因するラマン発光を除外するために、特徴的発光波長 $F_c$ に隣接しているが、該波長の下方に十分に変位されており、少なくとも1つのサンプルは、そのような励起波長の照射に起因するラマン発光を除外するために、特徴的発光波長 $F_c$ に隣接しているが、該波長の上方に十分に変位されている。これらの測定値は、次に、組織中のカロテノイド(このラマン・シフトに関連する化学物質)濃度を計算するのに使用されてもよい。更に詳細には、2つの励起波長に関して組織から発せられる個々の波長の測定値は、次に、それら自体で除される。測定値は2つの励起波長に関して略同一なので、ラマン信号ピーク波長付近で観察される各波長に関して比率は1に近い。この態様では、強い蛍光背景及び検出器応答における変動は、該除算により除外される。しかし、カロテノイドによるラマン・ピークは、2つの励起波長に関して異なる波長で生じるので、それを除すことはしない。このように、本方法及び装置を使用することで、カロテノイド・レベルは、たとえ強い固有蛍光の存在下であっても判定され得る。

#### 装置の概観

装置は、カロテノイドの特徴を示す波長シフトを伴うラマン応答を生じる波長の光を生成する。装置は、通常約470ナノメートルと475ナノメートルとの間で選択される2つの励起波長に起因する発光の測定を実施可能にする構成要素を有し、該光を組織又は他の標的に向けるが、他の波長が使用されてもよい。非弾性散乱光が、組織中のカロテノイドに対応するラマン信号を生成する特徴的なエネルギー・シフト及び定量化可能な強度を有する状態で、弾性散乱光及び非弾性散乱光、並びに組織からの蛍光が収集される。ラマン信号を形成する非弾性散乱光の強度は、2つの測定の分析により定量化される。

#### 光処理構成要素

図1は、装置10の構成要素を概略的に示す。装置10は、励起部分12、分析器部分14、及び較正部分16を含む。励起部分12は、組織又は他の標的が暴露される光を生成する。分析器部分14は、標的から反射する光を受容し、特定の波長の光量を測定する。較正部分16は、生データを分析しカロテノイド量の最終量を計算するのに使用されてもよいデータを収集する。コンピュータ(図1に図示せず)を使用して装置10を制御し、分析を実施する。最終カロテノイド・レベル値の計算は、コンピュータがすべての生データを受信した後にコンピュータで実行されてもよいし、生データの収集を補助する、装置内に常駐のプロセッサで実行されてもよい。後者の場合、少量の分析されたデータ及び

10

20

30

40

50

結果は、表示又は保存のためにコンピュータに伝達されてもよい。データ分析の位置は、この方法論にとって重要ではない。

【 0 0 2 5 】

励起部分 1 2 は、2 つの光源 2 0、2 2 を含む。光源 2 0、2 2 には、例えば、発光ダイオード (LED) が含まれてもよい。一例では、LED 2 0、2 2 は類似しており、470 ~ 475 ナノメートルの波長範囲を包含する波長範囲の光を発する。2 つの異なる特定の波長を得るために、各光源 2 0、2 2 からの光は、関連の非球面コリメート・レンズ 2 8、3 0 及び狭帯域光学フィルタ 2 4、2 6 を通過させられる。コリメート・レンズ及び光学フィルタは、単なる例示的な光学構成要素及び集束構造体であり、標的に到達している光が所望の質を有している限り、他のものが使用されてもよいし、何も使用されなくてもよい。このように、例えば、第 1 の光源 2 0 からの光は、473.0 ナノメートルの狭帯域光学フィルタ 2 4 を通過させられる。第 2 の光源 2 2 からの光は、471.3 ナノメートルの狭帯域光学フィルタ 2 6 を通過させられる。しかし、本発明は、これらの波長内で生成される光に限定されないことを理解すべきである。光源が LED である必要もなく、それらは、例えば、2 つの異なる波長で発射するようになされたレーザとすることができるであろう。

10

【 0 0 2 6 】

第 1 の光源 2 0 からのコリメート光がビームスプリッタ 3 2 に衝突し、それを通って進む一方で、第 2 の光源 2 2 からのコリメート光は、同ビームスプリッタ 3 2 の反対側に衝突し、そこから反射する。図示の実施形態では、ビームスプリッタは 50 : 50 ビームスプリッタである。これは、2 つの光源からの光を、該光の半分を犠牲にして共通の経路に置く。ビームスプリッタ 3 2 は、光路を確立し、光源 2 0、2 2 からの光を標的に向けるためだけに動作し、光が、光ファイバ、又はコリメート光路に出入りする 2 つの狭帯域フィルタを備えた単一の光源などの他の手段により組織に向けられる実施形態では、設けられる必要はない。光は、次に、励起遮断物 3 6 を通って進む。該遮断物は、生成されるラマン信号付近の波長を有する光源からの光をより完全に除去するのに使用される。励起遮断物は、関心波長以外の波長を遮断する。より詳細には、励起遮断物は、組織から収集される波長を遮断してもよい。従って、例えば、組織からの反射光がシアン光を含む場合、シアン光は励起遮断物により遮断される。フォトダイオード 3 8 は、光源の強度を監視するのに使用され、50 : 50 ビームスプリッタ 3 2 により無駄にされた光を観察し、校正プロセスに組み込まれて、起こる可能性のある光源の強度変動を補正することができる。両光源 2 0、2 2 から生じる光は、次に、二色性ビームスプリッタ 3 4 によって反射される。該ビームスプリッタは、励起波長の光に対して高反射性になされているが、生成される予測ラマン・ピーク付近の波長に対しては、高透過性になされている。

20

30

【 0 0 2 7 】

二色性ビームスプリッタ 3 4 によって反射される励起光は、軸 6 0 に沿って進み、非球面集光レンズ 6 1 により、光誘導ロッド 4 0 の端部に集められる。該ロッドは、光が組織に到達する前に、ビーム・ホモジナイザとしての機能を果たす。これにより、光源の変動、及び別途測定を混乱させる可能性のある光学フィルタからの影響を除去する。ロッド 4 0 は、光を組織へ及びその内部へ向けさせ、組織の点を照射する。一実施形態では、ロッド 4 0 は、ガラス・ロッドであり、これは、直径約 2 ミリメートルの点を照射する。図 2 及び 1 2 を参照すると分かる通り、ロッド 4 0 は、装置 1 0 の開口部 7 1 を若干通過して延出し、ロッド 4 0 が組織又は標的 1 3 に確実に接触するようにしてもよい。組織又は標的 1 3 は、例えば、図 1 に示すように手でもよい。

40

【 0 0 2 8 】

光路にある構成要素 (例えば、非球面集光装置 2 8、3 0 及びロッド 4 0) は、その表面での反射を低減するために抗反射コーティングを有しても良い。

【 0 0 2 9 】

組織から反射する発光は、ロッド 4 0 を介して且つ非球面集光装置及び二色性ビームスプリッタ 3 4 を介して分析器部分 1 4 まで、中央光軸 6 3 上を戻る。(反射光のための軸

50

63は、図1の中央軸60とは分離して示されているが、これは単に説明のためであり、軸60、63は実際には一致する。) 発光遮断物41は、装置10の分析器部分14で使用される波長に亘る様に光のスペクトル成分を制限する。図示の実施形態では、光は発光遮断物41を通過し、それにより、励起波長のレーリー散乱光が減少する。光は、次に、色ガラス・フィルタ43を介して方向づけられる。色ガラス・フィルタはスペクトル遮断物であり、レーリー散乱光を吸収するために設けられてもよい。色ガラス・フィルタの通過帯域は、分析器部分のセンサにより測定されることになる波長を透過させるのに十分広い。分析器部分14は、光を光検出システムに向ける。該システムは、例えば、皮膚中のカロテノイドに特徴的な波長などの、関心範囲のいくつかの波長の発光の強度を測定することを可能にする。図示の実施形態では、光検出システムは、光電子増倍管などの複数の分離した高感度光検出器を含む。十分な増幅率を有し低ノイズ・レベルであれば、アパランシェ・フォトダイオード、CCD(電荷結合素子)検出器アレイ、又は増倍型CCD検出器アレイなどの他の高感度デバイスを使用してもよい。

10

#### 【0030】

図示の実施形態では、光検知システムは、4本の光電子増倍管(PMT)42、44、46、48を含む。光は分割され、各PMTに略同量が向けられる。PMTは光検出器であり、蛍光分光法などの低強度用途に有用である。高い内部増幅率により、PMTは、高感度を用いて低レベルの光を測定する能力を有する。光電子増倍管は、一般に、真空のガラス筐体内にフォトダイオード及び一連のダイノードを含む。光電子放出陰極に衝突する光子は、光電効果により電子を放出する。電子はダイノード鎖により加速され、カスケード効果により、第1のカスケードに衝突する各光子につき $10^5 \sim 10^7$ の電子が生成される。

20

#### 【0031】

ビームスプリッタは、中央軸63に沿って方向づけられた光がPMT42、44、46、48で等分されるように、各PMT(図1のPMT0~PMT3)に関連して設けられている。このように、図示の実施形態では、4つのビームスプリッタ50a~50dが設けられている。分析器フィルタ54及び集束レンズ52が、各PMT42、44、46、48に対する各ビームスプリッタ50a~50dからの光路に設けられている。集束レンズ52は、光をそのPMTの活性領域上に集めるフレネル・レンズであってもよい。各フィルタ54は、特定の波長の光のみを通過させる帯域通過フィルタである。第1のビームスプリッタ50aは、光の4分の1をPMT0 42へ方向転換させる。第2のビームスプリッタ50bは、残りの光の3分の1を方向転換させ、発光全体の4分の1をPMT1 44に供給する。第3のビームスプリッタ50cは、残りの光の2分の1を方向転換させ、発光全体の4分の1をPMT2 46に供給する。第4のビームスプリッタ50d即ちミラーは、残りの光すべてを方向転換させ、発光全体の4分の1をPMT3 48に供給する。このようにして、PMT42、44、46、48はそれぞれ、発光の等しい分量の強度を測定することができ、それぞれ、関連する帯域通過フィルタの使用により、関心波長範囲の特定の部分を測定することができる。この手法では、利用可能な光の大部分が、比較的少数の検出器に対して利用可能になり、測定される特定の波長における感度の増強を実現する。更に、4つの検出器の相対感度は、本方法及び装置にとって重要ではないので、光に対して極度に感度の良いPMTを使用することが可能になる。

30

40

#### 【0032】

各PMT42、44、46、48は、光源20、22により発せられた光に基く、カロテノイドのラマン信号の波長に近い、光の異なる特定の波長に暴露され、それを測定する。従って、LED20、22が471.3~473.0ナノメートルの波長の光を発する場合、分析器フィルタ54は、505.8、507.8、509.8及び511.8ナノメートルを中心とする可能性がある。特定の実施形態では、各フィルタ54は、1ナノメートルの通過帯域幅を有する。但し、種々の通過帯域幅及び種々の中心波長を使用することができると考えられる。従って、第1のPMT42は、505.8ナノメートルの光を測定してもよく、第2のPMT44は、507.8ナノメートルの光を測定してもよく、

50

第3のPMT46は、509.8ナノメートルの光を測定してもよく、且つ第4のPMT48は、511.8ナノメートルの光を測定してもよい。

【0033】

各PMTからの出力は、組織中に存在するカロテノイド・レベルを判定するために、装置の分析構成要素に伝達される。ある特定の実施形態では、各PMTの出力は、1秒間につき3000回サンプリングされ、アナログ・デジタル・コンバータを通過する。PMT出力は、0~10ボルトの範囲の値を有する電圧として分析構成要素に伝達される。この電圧は、PMTが暴露される光量と相関する。

【0034】

測定は次のように行なわれる。471.3ナノメートルに濾過された光源がオンにされ、該光源が組織サンプルを照射し、多量の不要な蛍光背景光と同様に、507.8ナノメートルでラマン信号が生成される。4本のPMTは、サンプルから生成され発光される予測ラマン・シフト波長に近接する波長を測定する。例えば、4本のPMTsは、それぞれ505.8ナノメートルの光、507.8ナノメートルの光、509.8ナノメートルの光、及び511.8ナノメートルの光を測定する。この光の大部分は蛍光である。しかし、507.8ナノメートルの光を観察するPMTは、ラマン信号による少量の付加光を認める。各PMTの平均示度は、測定の休止期間中に得られ、記録される。471.3ナノメートルに濾過された光源は、次にオフにされ、473.0ナノメートルに濾過された光源がオンにされる。測定は繰り返される。各PMTで観察される蛍光レベルは類似しているが、今度は少量のラマン信号が、509.8ナノメートルを測定するPMTで付加光として出現する。この測定順序は反復され平均されて、PMTの平均示度におけるノイズを低減させる(8つの示度の総計、各PMTは、各光源でのサンプルの照射中に読み取られている)。次に、サンプルの471.3ナノメートルでの照射で得られた4つのPMT示度はそれぞれ、サンプルの473.0ナノメートルでの照射で得られた4つのPMT示度で除される。これにより、値が1に近い4つの数字が生成される。なぜなら、4つのPMT示度の2つのグループは蛍光が優勢であり、非常に類似しているからである。しかし、507.8ナノメートルを観察するPMTに関して生成された数字は、第1の測定における余分なラマン信号が原因で1より若干大きく、例えば、1.005であり、509.8ナノメートルを観察するPMTに関して生成された数字は、第2の測定における余分なラマン信号が原因で1より若干小さく、例えば0.995であろう。この1との差は、サンプルの蛍光に対するラマン・ピークの比を示す。次の、蛍光の平均レベルによる乗算で、サンプル中のカロテノイド分子量に比例する数字が生じる。

【0035】

上記の測定の説明は、471.3ナノメートルに濾過された第1の光源及び473.0ナノメートルに濾過された第2の光源に特定のものであるが、光源は任意の適切な波長に濾過されてもよいことを理解されたい。

【0036】

較正部分16は光源23を含む。該光源はPMT応答の較正のためだけに使用される光を発して、温度変化又は印加される電圧の変動によって起こるドリフトの影響を除去する。光源23により発せられる光の波長は、一般に、分析器部分14によって処理するために組織から受容されることになる光の波長に対応する。従って、光源23により発せられる光は、約505ナノメートル~約512ナノメートルの範囲のLED光でもよい。光はフィルタ56を通過する。フィルタ56には、例えば、減光フィルタが含まれてもよい。減光フィルタ56は、光の出力を、ラマン測定において組織から反射する光に匹敵するレベルまで低減させる。フォトダイオード58は、較正部分16内に設けられている。フォトダイオードは、較正光が通過する空洞共振器内の光を測定する。

【0037】

光源23からの光は、光線送達システムを介して中央光軸へ且つ分析器部分14の方向へ向けられる。光線送達システムは、光を測定されるPMTへ向ける光学構成要素の任意の組合せを含んでもよい。図示の通り、光線送達システムは二色性ミラー34を含み、該

10

20

30

40

50

ミラーは、505～512ナノメートルの範囲の光を透過するようになされているとしても、少量の光を反射する。従って、光源23からの光は、フィルタ56を通過し、二色性ミラー34により、中央光路60上に且つ分析器部分14へと向けられる。

#### 【0038】

図2～8は、図1に概略的に示す構成要素を具現化する商品の例示的な物理的配置を示す。この配置は、検討されている種々の構成要素のための内部ハウジング（全般的に70）を含み、該ハウジングは、次に、該商品の可搬式種類に適した外部ハウジング900内に封入されてもよい。そのような種類は、手又は他の組織をガラス・ロッド40の端部に直接置くことを比較的容易にする。温度センサ（図示せず）が、PMT温度を感知するために、PMT42, 44, 46, 48に、又はそれらの付近に設けられていてもよい。図9～14は、外部ハウジング並びに種々の内部ハウジング及び構造を示す。図9～14は構成要素の全体的な位置を示すが、簡略化のために、図1にはある光路を示そうとはしていない。

10

#### 支援用電気構成要素

前述した光処理構成要素は、装置で使用される励起光を生成させ、方向付け、発光を收容させ、方向付け、測定して、生の発光値を提示する。これらの構成要素は、ソフトウェアを含む、関連する支援構成要素及び制御構成要素を有し、該構成要素は、以下で検討する動作方法を実行するのに必要である。支援構成要素及び制御構成要素は、一部分は、光処理構成要素のためのハウジング900（図9参照）の内部に、一部分は別個のコンピュータ200（図2参照）又はデータ・プロセッサ上に配置されてもよい。該データ・プロセッサは、装置10の光処理構成要素のためのハウジング内部に含まれている支援構成要素及び制御構成要素と通信する。ファン203（図5及び6参照）が、構成要素を冷却するために含まれていてもよい。

20

#### 【0039】

コンピュータ200は、装置10への動力供給をオンオフし、PMTへの電圧を調節し、光源への電流を調節し、個々の光源をオン又はオフに切り換え、PMT、フォトダイオード、及び温度センサにより出力された値を読み取る機能を制御する。コンピュータ200はまた、データ分析の種々のステップのためにデジタル化され作成された生データを受信してもよい。或いは、データ処理構成要素（マイクロプロセッサ、DSP、又は他の論理構成要素）は、ハウジング900内部の回路基板1210、1212、及び1214（図12参照）上に配置することができる。これらのデータ処理構成要素は、処理のすべて又は大部分を実行することができ、コンピュータ200に結果データの小さいセットを渡す。該セットは、更なる計算を殆んど又はまったく必要としないが、ユーザの再検討、保存、更なる通信のために表示されてもよい。

30

#### 【0040】

支援構成要素及び制御構成要素の機能には、以下のものが含まれる。励起光源20、22及び較正光源16に電力を供給し、供給されている電力を感知し、制御し、且つ調節する。光電子増倍管に電力を供給し、供給されている電圧を感知し、制御し、且つ調節する。出力電圧、又はPMT42、44、46、48、フォトダイオード38及び58、並びに温度センサ（図示せず）の出力である他の値を読み取り、感知した電圧及び他の値をデジタル化し、デジタル処理構成要素への伝達、任意の可能な機械構成要素の起動のためにそれらをフォーマットし、データを保存し伝達し、装置及び任意の利用可能な構成要素の動作順序並びにシステム試験を制御する、ユーザ・インターフェースからの且つソフトウェアからの制御信号を受信し実行する。これらのことは、以下で検討する方法を実行する制御ソフトウェアを用いて且つ上記で検討した光処理構成要素を用いて、動作するように構成されている、従来の構成要素により実行され得る。

40

#### 【0041】

ハウジング900内部のすべての支援構成要素及び制御構成要素のための電力は、例えば、電源201（図2参照）から、コネクタ1412において供給され、一方、コンピュータ200との往復の通信は、コネクタ1410においてハウジング900に接続されて

50

いる通信チャネルにより行なわれる。電力はまた、電池などの内部電源により供給することができ、通信チャネルは、物理接続又は無線接続であってもよい。

#### 方法の検討

図15のハイレベル・フロー・チャートに示す通り、本装置の動作において使用されている3つの全体的な方法は、ブロック500に示す、装置の較正、ブロック502に示す、2つの励起波長からの、組織又は別の標的から散乱される光の測定、及びブロック504に示す、カロテノイド・レベルの最終値を得るための、これら2つの測定からのデータの分析である。これらの方法の各々を、以下で検討する。

#### 【0042】

##### 1. 較正

較正プロセスは、構成要素をそれらの適切な動作パラメータに調整し、生データを分析し正規化するために使用されるデータを収集し、例えばカロテノイド（又は他の選択された分子）などの化学物質量の最終量を計算する。この最終量は、「カロテノイド・スコア」と称されてもよい。カロテノイド・スコアは、任意の適切な範囲にあってもよく、組織中のカロテノイド・レベルを反映している。適切な範囲は0～100,000であってもよい。図16に示す通り、較正プロセスは次のことを含んでもよい。(1)ブロック506及び508に示す通り、PMTへ供給される電圧、及び光源に供給される電流の最適値を見出すこと、(2)ブロック510に示す通り、「ダーク差引き(Dark Subtract)」プロセスに使用するための光学的ダーク物質を測定すること、(3)ブロック512に示す通り、(従って、約473ナノメートルの光源、約509ナノメートルのラマン信号の)カロテノイドの波長に相当するシフトした発光波長のラマン信号を生成する参照標準物質を測定すること、(4)ブロック514に示す通り、データ分析で使用するための一次方程式の係数を計算し、示度をカロテノイド・スコアに変換すること、及び(5)ブロック516に示す通り、データ分析における正規化のためのデータを収集すること。これらのステップのすべてが一度に実施される訳ではなく、それらは、図示とは異なる順序で実施されてもよい。参照標準物質は、較正プロセスでの使用のために考案された、用意されたサンプルである。これらの物質は、例えば、参照により本明細書に援用されている、「Process and Compositions for Synthetic Calibration of Bio-photonic Scanners」という名称の、2004年11月3日出願の米国特許出願第10/981139号明細書で検討されている組成物の方法により且つ該組成物を使用して、又は当技術分野で既知の他の方法により用意されてもよい。

#### 【0043】

較正は所望の回数行なわれてもよいが、一般に、組織測定の前に行なわれ、組織測定より少ない回数行なわれる。較正からのデータ及び動作パラメータは、本明細書で後述される通り、データを分析するのに使用される。

#### 【0044】

「自動調整」520として既知の較正プロセスの部分を、図17に図示する。自動調整は、PMT入力電圧及び光源電流の最適な設定を決定するのに使用される。一般に、第1及び第2の光源20、22は、同一条件下で作動された場合、異なる光出力レベルを示す。特定の実施形態では、第1及び第2の光源20、22の電流、及び各PMTの入力電圧は、典型的な設定に初期設定される。

#### 【0045】

最適電圧を決定するために、ボックス522で開始し、参照標準物質は光源20、22の1つを使用して照射される。ボックス526で判定される通り、最低PMTの出力値が1.2ボルトの5%以内になるまで、ボックス524に示す通り、PMT入力電圧が変更される。この入力電圧において、PMTは、参照標準及び大部分の組織の良質な示度を得る(以下で検討するように、異常に高い蛍光性を有する組織での測定を実施するために、PMT電圧の微調整が必要な場合がある)。このように、ボックス528に示す通り、これが最適電圧である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 6 】

校正光源の最適電流レベルを決定するために、ボックス 5 2 0 で開始し、ボックス 5 3 4 で判定される通り、最高示度の P M T の出力電圧が 7 . 5 ボルトの 5 % 以内になるまで、ブロック 5 3 2 に示す通り、校正部分 1 6 の校正光源 2 3 の電流レベルを調整する。ボックス 5 3 5 に示す通り、これが最適電流である。

## 【 0 0 4 7 】

第 1 及び第 2 の励起光源 2 0、2 2 の最適電流レベルを決定するために、ボックス 5 3 6 で開始し、ボックス 5 4 0 で判定される通り、1 つの光源がオンの場合に参照標準物質を照射している間に測定される平均 P M T 出力電圧が、その他の光源がオンの場合に平均の 1 % 以内になるまで、ボックス 5 3 8 に示す通り、第 1 及び第 2 の励起光源 2 0、2 2 に使用される光源電流を調整する。ボックス 5 4 1 に示す通り、これが最適電流である。

10

## 【 0 0 4 8 】

一般に、自動調整プロセスで得られる値は、日々若干変動する。該プロセスは、工場での校正の必要を排除し、装置が老朽化するにつれて又は異なる環境で運転されるのに従って適応する。

## 【 0 0 4 9 】

光学的ダーク物質を読み取ること（「ダーク・スキャン」）は、外部蛍光源の不在下で、光信号及び電気信号のベースライン測定を提供する。これは「ダーク・データ」と称される場合がある。黒色アルマイト・レンズ・キャップ 1 2 1 1（図 1 2 参照）が、光学的ダーク物質として使用するために、装置に設けられてもよい。標的としてのダーク物質を有する P M T の出力値は、後にデータ分析（後述）で使用するために保存される。ダーク・データは、光源をオンオフすることにより、第 1 及び第 2 の光源 2 0、2 2 の各々に関して捕捉される。「ダーク・データ」値は、P M T のすべての後続の読取りからの生データから減じられる。これらの値は、他の校正物質又は組織が読み取られた場合に捕捉された値と比較した場合、通常小さい。

20

## 【 0 0 5 0 】

参照標準物質を測定することをを用いて、「C」と称されてもよい非校正スコアを計算することができる。非常に高い示度の組織と比肩する 5 0 9 ナノメートルのラマン応答を有する参照物質は、該装置を使用して測定される。この「高」参照物質の測定からのデータは、非校正スコアを算出するために分析される。高参照物質の C 値は、データ分析に使用するための一次方程式の係数計算へと更に進められる。校正プロセスはまた、データ分析に高次方程式を使用してもよい。

30

## 【 0 0 5 1 】

特定の実施形態では、組織測定 of C 値からカロテノイド・スコアを計算するのに使用される一次方程式の係数及び補正値を、校正プロセスが計算する。該式は、データ分析に関連して以下でより十分に検討する。以前に高参照物質と称された高校正標準標的サンプルは、公称 7 7 , 0 0 0 のカロテノイド・スコアを割り当てられている。この数字は任意であり、変更されてもよい。しかし、この数字は、広範な組織サンプリングを、組織中の相対的カロテノイド含有量を反映する尺度を使用して、0 と 1 0 0 , 0 0 0 との間に記録することを可能にする。特定の実施形態では、直線の傾き - 切片型の式である簡単な一次方程式により、C 値がこの尺度に位置づけられる。

40

## 【 0 0 5 2 】

カロテノイド・スコア = C 値 × 係数 + 補正値  
係数は、高参照物質の割り当てられた（公称）値を、読取り時に得られた C 値で除することにより計算される。通常、直線の係数及び補正値を計算するのに使用する 2 点を提供するために、第 2 の参照基準が読み取られてもよい。しかし、装置は、ラマン作用物質を含有しない参照サンプルを読み取る際、0 に十分に近い C 値を得るので、第 2 の点は 0 の割当て値及び 0 の C 値を有すると考えられる。従って、係数を計算する式は 1 つの示度しか必要とせず、補正値は 0 である。校正は、より複雑で時間のかかる二点校正ではなく、単一点校正である。異なる割当てスコアを有する標準参照物質を使用して、追加の測定を行

50

ない、高次較正式を生成することができる。

【 0 0 5 3 】

いくつかの他の値が、データ分析中に生データを正規化するのに使用するために、較正中に捕捉されてもよい。これらには次のものが含まれるが、それらに限定されない。( a ) 較正部分 1 6 のシアン色 / 緑色フォトダイード 5 8 の示度 ( 「 緑色ダイオード較正示度 」 )、( b ) 較正光源 2 3 が自動調整されている間の各 P M T の出力電圧の示度 ( 「 緑色較正データ 」 という )、及び ( c ) 高参照物質の読取り中に第 1 及び第 2 の光源 2 0、2 2 に関して捕捉される、励起部分 1 2 のフォトダイード 3 8 の示度 ( 第 1 及び第 2 の光源それぞれに関する「第 1 の青色ダイオード較正示度」及び「第 2 の青色ダイオード較正示度」 )。

10

【 0 0 5 4 】

装置が「ゼロ化している」かどうかを判定するために、較正プロセスの最後にチェックが実施されてもよい。これにより、機械の高品質の示度を示す能力を測定する。適切にゼロ化する機械は、蛍光を有するが、カロテノイド (例えば、509 ナノメートル) と同じ波長のラマン信号を有さない参照物質を読み取った場合、0 に近い C 値を得る。このチェックを行なうためのデータは、自動調整プロセス中に捕捉される。ダーク・データが捕捉されるまで C 値は計算されないので、「ゼロ化」チェックは較正プロセスの最後に実施される。

【 0 0 5 5 】

2 . スキャン及び測定

図 1 8 は、スキャン及び測定のプロセスを広範に示す。組織の各スキャンを実施する前に、(後述する)データ分析中に使用するために、ブロック 6 0 0 に示す通り、データが収集される。ブロック 6 0 2 に示す通り、較正部分 1 6 の緑色 / シアン色光源 2 3 を照射し、分析部分 1 4 により該光を方向づけ、P M T を用いて該光を処理することにより、「緑色示度」が収集される。各 P M T の出力は収集され、スキャンの「緑色示度」を含む。励起部分 1 2 の第 1 の光源 2 0 に関する「第 1 の青色ダイオード示度」(ブロック 6 0 4 )、励起部分 1 2 の第 2 の光源 2 2 に関する「第 2 の青色ダイオード示度」(ブロック 6 0 6 )、較正部分 1 6 の光源 2 3 に関する「緑色ダイオード示度」(ブロック 6 0 8 ) は、各光源を別個に照射することにより、且つ関連するフォトダイオード 3 8 又は 5 8 において値を測定することにより収集される。

20

30

【 0 0 5 6 】

装置 1 0 の動作中、第 1 の光源 2 0 が起動され第 1 の励起光が生成される。光は、励起フィルタ (例えば、狭帯域フィルタ 2 4 ) を介して、且つ光送達システムを介して、組織又は他の標的に向けられる。第 1 の光源 2 0 への電流は、その輝度を制御するために調節されてもよい。短時間の遅延がもたらされ、第 1 の光源 2 0 からの出力を安定させることが可能にされてもよい。組織からの後方散乱光は、光収集システムを通過させられ、分析器部分 1 4 に向かう。光は等分され、P M T に向けられる。各 P M T の出力は、例えば、1 0 0 ミリ秒の休止期間に亘って 1 秒間に 3 0 0 0 サンプルの速度でサンプリングされる。各サンプルにおける P M T 出力は、アナログからデジタルに変換され、電圧として記録される。値は各 P M T に関して収集される。このプロセスは、次に、第 2 の光源 2 2 を用いて繰り返される。

40

【 0 0 5 7 】

第 1 及び第 2 の光源 2 0、2 2 の各々に加えられる電流は異なってもよい。一般に、組織に向けられる光の強度は、各光源 2 0、2 2 から同じであることが望ましい。そうするために、2 つの光源の輝度に差があり、2 つの励起フィルタの透過効率に差があるため、光源は異なる電流で駆動されてもよい。各光源の最適電流は、較正プロセスの自動調整部分で決定されていてもよい。以前に検討した通り、そのような最適電流は、必ずしも各個別スキャンに関して決定される訳ではない。

【 0 0 5 8 】

P M T に印加される電圧もまた、自動調整プロセス中に決定されてもよい。一般に、P

50

MTの電圧は、高い蛍光性を有する組織を読み取る場合にアナログ・デジタル・コンバータが飽和状態になる程高すぎず、(前述した)参照標準物質の良好な示度を示すのに十分に高い、PMTから出力を生じる値に設定される。

【0059】

示度は、2つの測定値、即ち1つは第1の光源20からで1つは第2の光源22から、を使用して生み出される。従って、一実施形態では、ある示度を生み出すために、第1の測定値が、471.3ナノメートルの励起フィルタを介して第1の光源を用いて測定される。従って、第1の測定値は、第1の波長F1の光を用いた標的の照射に対応する。この第1の測定値からの、各PMTから1つの4つのPMT値は保存される。第2の測定値は、473.0ナノメートルの励起フィルタを介して第2の光源を用いて測定される。従って、第2の測定値は、第2の波長F2の光を用いた標的の照射に対応する。この第2の測定からの、各PMTから1つの4つのPMT値は保存される。このように、示度は8つの値、即ち471.3のフィルタを用いて測定された4つのPMT値及び473.0のフィルタを用いた4つのPMT値、を使用する。(当業者に明らかになるであろう通り、種々の数のPMTが、示度に使用されている種々の数の値と共に使用されてもよい。特徴的ラマン発光波長Fcは、組織中で測定される選択された分子に関連する。各PMTは、予測発光波長の又はそれに隣接する波長の光強度をサンプリングし、このように、ラマン散乱信号のみを測定することが所望される波長の近傍の標的蛍光に関するデータを提供する。)

複数のPMTは同時に読み取られる。PMTからの値は、第1の光源20を使用する測定に対して捕捉される。PMTからの値は、次に、第2の光源22を使用する測定に対して捕捉される。この測定対は、一緒に単一の示度を示す。各光源20、22に関して複数の読取りが実施され、1つの完全なスキャンに関して生データの8つの値を集めるために結果が平均される。値が収集され平均されて、測定毎に生じる可能性のある小さい変動をならす。

【0060】

このように、サンプリングされた強度値の第1の組は、第1の波長F1の光を用いた標的の照射に起因する光に関して生み出され、サンプリングされた強度値の第2の組は、第2の波長F2の光を用いた標的の照射に起因する光に関して生み出される。各組は、選択された分子及び各波長F1又はF2に関連する特徴的発光波長Fc又はその付近の値を含む。各組は、更に、各波長F1又はF2に起因するラマン発光を除外するために、特徴的波長Fcに隣接するが該波長から十分に変位された少なくとも2つの値を含む。これらの値の少なくとも1つは、予測特徴的波長Fcより低く、該値の少なくとも1つは、予測特徴的波長Fcより高い。強度値の各組は、各強度センサ(例えば、PMT)からの値を含む。従って、サンプリングされた強度値の第1の組は、第1の波長F1の照射に起因する、複数のセンサからの値を含む。例えば、第1の組は、4つの値SF10、SF11、SF12、SF13を含み、1つは4つのセンサの各々に起因する。値の組は、順序集合であり、値の1つ、例えば、F11は、選択された分子及び第1の波長F1に関連する特徴的波長Fcの測定値である。同様に、サンプリングされた強度値の第2の組は、第2の波長F2の照射に起因する、複数のセンサからの値を含む。例えば、第2の組は、4つの値SF20、SF21、SF22、SF23を含み、1つは4つのセンサの各々に起因する。値の組は、順序集合であり、値の1つ、例えば、F21は、選択された分子及び第2の波長F2に関連する特徴的波長Fcの測定値である。

【0061】

従って、完全なスキャン及び測定は、以下を含む。(1)ブロック610に示す通り、実施される読取りの数を決定すること(一般に、よい結果を得るためには、参照基準を読み取る場合より皮膚を読み取る場合に、より多くの読取り及びより長いスキャンを行なう。実施されるスキャンの数は、当業者による、通常の実験により容易に決定されてもよい)、(2)PMTへの電圧を自動調整プロセス中に決定された値に調整すること、(3)ブロック612、614に示す通り、決定された数の読取りを実施し、それぞれから返さ

れた8つの値を保存すること、及び(4)ブロック616に示す通り、各測定から返された8つの値の結果を平均すること。スキャンからの生の未処理データは、このように、全部で8つの、各光源での各PMTの平均値を含む。(校正プロセスが繰り返されたので、これらに変更されていない限り、PMT電圧を調整するステップは実施される必要がないことに留意されたい。)

以下で検討する通り、生の未処理データは、カロテノイド・スコアに変換するためのデータ分析を受ける。一般に、第1及び第2の波長F1及びF2の各々に関連する特徴的波長Fc間の発光に関する補間強度値は、サンプリングされた強度値の第1及び第2の組から得られる。補間強度値は、非ラマン発光による強度値成分を除去する。

【0062】

異常に高い蛍光性を示す組織が、アナログ・デジタル・コンバータが値を正確に変換できないようなPMTからの高出力を生成する可能性があることに留意すべきである。このことが起こった場合、PMT電圧が約20ボルト下げられてもよく、スキャンは繰返される。電圧は、スキャンが成功するまで、約20ボルトずつ繰返し下げられてもよい。緑色ダイオード信号を再度読み取り、前回の緑色ダイオード示度と比較して、下げられたPMT電圧での組織の示度を適切に校正することができる。

【0063】

### 3. データ分析

データ分析プロセスは、読取りにおいて得られた生データをカロテノイド・スコアに変換する。カロテノイド・スコアは任意の範囲で表されてもよく、組織中のカロテノイド・レベルを示す。一実施形態では、範囲は0~100,000である。前述したように、カロテノイド・スコアの計算は次の通りである。

【0064】

カロテノイド・スコア = C値 × 係数 + 補正值

分析プロセスは、現在のスキャンからの生データを処理するために、校正中に収集されたデータを使用する。

【0065】

上記で検討した通り、現在のスキャンは、複数の値、即ち第1の光源を使用する各PMTに関する値及び第2の光源を使用する各PMTに関する値、をもたらず。検討されている実施形態では、従って、スキャンは8つの値、即ち471.3ナノメートルのフィルタを有する光源を使用する4つのPMTの各々に関する値及び473.0ナノメートルのフィルタを有する光源を使用する4つのPMTの各々に関する値、をもたらず。該値はそれぞれ、各PMTの示度を平均すること、PMT及びそれらの帯域通過フィルタが対象としている波長範囲における異なる波長のサンプルを示すことを含む。

【0066】

温度変化は、スキャンが行なわれている環境の変化が原因で、又は通常動作中の機械及びPMTの単なる温度上昇が原因で、起こる可能性がある。PMTの光感受性の任意の変動及びPMTの応答における結果の変動を補正するために、生データ上で「緑色正規化」が実施される。緑色正規化は、生データを緑色校正データ(図16の516に示す通り、校正で測定された校正部分の光源のPMT示度)の比率で調整し(と乗算し)、緑色示度(図18の602に示す通り、照射される校正部分の光源を用いるスキャンの最初に測定されたPMT示度)で除することを含む。この手順は、生のPMT示度を、校正時にスキャンが行なわれた場合に示したであろう示度に調整する。

【0067】

緑色正規化がPMT応答の変動を補正する一方、両光源20又は22の輝度の変動を補正するために、輝度校正が行なわれる。一実施形態では、励起部分12の第1又は第2の光源20、22を用いて測定されたPMT示度は、PMT信号に、組織読取り中に測定された青色LED信号に対する校正プロセス中に測定された対応する青色LED信号の比率を乗じることにより補正される。

【0068】

10

20

30

40

50

このように、生データは、機械較正時とスキャン実行時との間に起こった可能性のある、（例えば、温度変化が原因の）PMT 応答の変動及び光源の輝度の変動に関して補正される。PMT 電圧は、較正部分 16 の光源 23 の示度における変動を使用して補正される。光源の輝度は、青色フォトダイオード 38 の示度における変動を使用して補正される。

【0069】

フォトダイオードの示度もまた、補正されてもよい。光源 20、22、23 のスイッチが切られた場合、システム中に光が存在するはずはなく、フォトダイオードは 0 を読み取るはずである。これは、必ずしもそうとは限らない。従って、スキャンの初めに、光源 20、22、23 のスイッチが切られている場合があり、フォトダイオード 38、58 において、短時間の示度が非ゼロ電圧で測定される。測定された非ゼロ電圧は、次に、同一スキャン内で行なわれるすべての後続のフォトダイオードの読取りから減ぜられてもよい。

【0070】

データ分析中、すべての PMT 示度は「ダーク差引きされる」。ダーク・スキャンからのダーク・データは、ダーク差引き中に使用される。ダーク・スキャンから保存された各生データ値は、正規化データ・アレイにおいてそれに対応する値から減じられる（即ち、第 1 の光源 20 及びフィルタ 24 を用いた PMT 42 におけるダーク値は、第 1 の光源 20 及びフィルタ 24 を有する PMT 42 における正規化データから減じられる）。一実施形態では、ダーク・データは、捕捉時又はその応用時に、正規化又は補正されない。

【0071】

各 PMT に関して、（例えば、471.3 ナノメートルの励起フィルタを有する）第 1 の光源が照射された時に捕捉された、ダーク差引き済みの、緑色正規化済みの生データの比率は、（例えば、473 ナノメートルのフィルタを有する）第 2 の光源が照射された時の同等のデータで除される。図示の実施形態では、このプロセスにより、各 PMT につき 1 つの 4 つの正規化された信号比率が生成される。従って、これらの比率は、 $SF10/SF20$ 、 $SF11/SF21$ 、 $SF12/SF22$ 、及び  $SF13/SF23$  を含んでもよい。値「D」は、これら 4 つの比率を使用して計算される。

【0072】

D は、カロテノイド信号の存在下又は不在下で PMT の比率間の差の大きさである。機械により測定される標的蛍光に対してカロテノイドが付加する信号における差である。「D」は、図 20 に示す、4 つの比率を通して描かれた放物線に関して計算される。放物線は 2 つの特徴を有する。第 1 に、放物線は第 1 及び最後の PMT の比率を通過する。第 2 に、第 2 の PMT に関する比率と放物線との間の距離の大きさは、第 3 の PMT での距離の大きさに等しい。図 20 は、PMT 比率及びそれらに由来する放物線を示す。D は、PMT 1 の曲線まで下がるか又は PMT 2 の曲線まで上がる、PMT 比率からの距離である。図示のアルゴリズムの実施形態では、これらの距離は等しい。この補間アルゴリズムで使用されている放物線の式は、以下でより詳細に検討する。

【0073】

一般に、放物曲線は、2 つの既知の端点（PMT 0 及び PMT 3）間を補完して、PMT 1 と PMT 2 との間の中に標的蛍光レベルを見出すために使用される。このレベルは、D の値を決定するのに使用されてもよい。PMT 0 及び PMT 3 において測定された比率をこのように放物線補完アルゴリズムに使用して、PMT 0 と PMT 3 との間で測定されたスペクトル（波長サンプリング範囲）の中間点における標的蛍光を決定してもよい。この手順は、PMT 1 で測定された比率と背景蛍光信号レベルとの差の大きさ、及び/又は PMT 2 で測定された比率と背景蛍光信号レベルとの差の大きさである値 D を返す。

【0074】

別の方法で述べると、曲線は計算された比率をフィッティングするために外挿され、曲線は点  $\{f_0, SF10/SF20\}$  及び  $\{f_0, SF13/SF23\}$  を通過し、ここでは、 $f_0$ 、 $f_1$ 、 $f_2$  及び  $f_3$  の各々は、4 つのセンサの各第 1、第 2、第 3、及び第 4 の中心波長であり、曲線は、点  $\{f_1, SF11/SF21\}$  及び  $\{f_2, SF12/SF22\}$  から等距離にある。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 5 】

従って、値Dは、ラマン信号が存在する場合及び存在しない場合の、PMTの示度の比率間の差の大きさを表す。この差は、装置により測定される標的蛍光に対してカロテノイドが付加する信号における差である。この値は、標的中の相対カロテノイド濃度レベルを示す。Dは非常に小さい数字であり、背景蛍光と比べてラマン信号が非常に小さいという事実を反映している。通常、ラマン活性成分を有さない参照標準を読み取る場合、Dは0に近い。相当なラマン信号を生成する物質を含む参照標準を読み取る場合、Dは0.02を超過し得る。皮膚組織のDは、通常、0.0050～0.0100の範囲にある。特定の値は、センサ又は検出器のスペクトル分解能の影響を受ける。本実施形態におけるセンサ又は検出器は、一式のPMTである。

10

## 【 0 0 7 6 】

以下でより十分に検討する通り、通常、Dを計算するために、放物線はPMT比率を通過して描かれる。放物線は2つの特徴を有する。第1に、放物線は第1及び最後のPMTの比率を通過する。第2に、第2のPMTに関する比率と放物線との間の距離は、第3のPMTにおける比率と放物線との間の距離に等しい。Dは、第2のPMTの曲線まで下がるか又は第3のPMTの曲線まで上がる、PMT比率からの距離である（これらの距離は等しい）。

## 【 0 0 7 7 】

従って、Dは、ラマン信号の存在によるPMT比率の増加を測定する。DはPMT信号の比率を使用して計算されたため、存在するラマン活性物質量の有意な測定を行なうには、Dに平均PMT電圧を乗ずることが必要である。平均PMT電圧は、第2の光源が第2のフィルタを照射した時に測定された電圧である。この値はCと称され、組織中のラマン活性物質量の、最終的な非較正量である。

20

## 【 0 0 7 8 】

最終ステップにおいて、カロテノイド・スコアは、スキャンから得られるCの値、並びに較正プロセスにより生成される係数及び補正值から計算される。これにより、較正カロテノイド・スコアが提示される。較正プロセスは、日々機械内で又は機械毎に起こる可能性のある変動を緩和する。構成要素は老朽化し機械毎に同一ではない。較正プロセスは、これらのことがスコアに影響するのを防ぐ。

## 【 0 0 7 9 】

活性物質の漸増濃度とC値との間の参照標準を読み取ると、一般に直線の関係が認められる。従って、一次方程式を使用して、スキャンの最終結果を計算する。

30

## 【 0 0 8 0 】

カロテノイド・スコア = ( C × 係数 ) + 補正值

別の実施形態では、活性物質の漸増濃度を有する較正物質の示度を表すのに、高次多項式が使用されることもある。

## 【 0 0 8 1 】

4本のPMT測定に関して、カーブ・フィットは直線又は放物線でしかあり得ないことに留意されたい。しかし、PMTの数が増えた場合、多項式はPMTの数 - 2まで作られてもよい。従って、例えば、5本のPMTが設けられた場合、三次多項式が適している可能性がある。

40

## 【 0 0 8 2 】

更に、2つの励起波長が使用される一方、任意の数の励起波長が使用されてもよい。

## 【 0 0 8 3 】

利益及び用途

本方法及び装置を使用して、ヒトの皮膚などの組織中のカロテノイド含有量を検出及び測定してもよい。類似の機器及び較正を用いる200万回のスキャンからのデータを使用すると、ヒトの皮膚のカロテノイド・スコアは26,000である。果物及び野菜が多い食事とカロテノイド・スコアの間には、高い相関がある。健康に良い食事を取り、栄養補助食品を使用する人は、70,000を超えるスコアを出すこともある。好ましくない

50

食習慣又は喫煙などの他の習慣を持つ人は、10,000未満のスコアを出すこともある。

【0084】

皮膚中のカロテノイド、レチノイド、及び類似の化学物質のレベルと特定の健康状態との間に相関があることは、ある研究において以前に例証されている。低レベルのカロテノイドが測定された場合、栄養補助食品を含む食事の是正などの予防措置を取ることができる。

【0085】

健康と関連のあることが認められているいくつかのカロテノイドには、オールトランス型 - カロテン (all-trans-β-carotene)、リコピン、  
- カロテン、  
- カロテン、フィトエン、フィトフルエン、セプタプレノ型 - カロテン (septapreno-β-carotene)、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 (β-apo-8'-carotenal)、ピオラキサンチン、及びロドキシサンチン (rhodoxanthin) が含まれる。これらは、種々の長さ及び連結を有する鎖状分子であり、すべて、炭素二重結合及び炭素単結合がそれぞれ交互になった状態の炭素骨格を有する。すべてのカロテノイドに共通の、これらの結合の振動は、ラマン分光法を用いて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一般に  $800 \sim 2000 \text{ cm}^{-1}$  (波数) の範囲内にあることは、別個の測定から既知である。例えば、カロテノイドのルテイン及びゼアキサンチンが、それぞれ約  $1160 \text{ cm}^{-1}$  及び  $1520 \text{ cm}^{-1}$  の波数シフトを有することは既知である。

【0086】

カロテノイドは、皮膚の抗酸化防御系の重要な成分であり、そこでは、カロテノイドは、フリーラジカル及び一重項酸素スカベンジャーとしての役割を果たすと考えられている。更に、カロテノイドは、多数の活性酸素種 (ROS) から皮膚を防御する。ROSは、例えば、太陽光などからの紫外 (UV) 線への皮膚の過剰な暴露により形成される。一旦形成されると、ROSはDNA、タンパク質、及び不飽和脂肪酸に効率的に反応し、DNA鎖の破壊及び酸化損傷、並びにタンパク質-タンパク質及びタンパク質-DNAの交差結合を引き起こす。脂質の酸化は過酸化脂質の形成をもたらし、これは細胞中で比較的長期間持続し、従って、ラジカル連鎖反応を開始して酸化損傷を増強する可能性がある。

【0087】

本方法及び装置は、種々のヒト組織及び体液におけるカロテノイド・レベルの迅速で非侵襲的な査定を実現し、更に有益な用途を有する。これらには、ヒト組織における全体的な抗酸化状態を査定すること、組織のカロテノイド含有量又は他の抗酸化物質含有量の食事操作の監視を提供すること、及びカロテノイドの分布及び化粧品化合物からの摂取を査定するための道具を提供することが含まれる。

【0088】

更に、本方法及び装置は、皮膚及び皮膚病巣中のカロテノイド・レベルを測定するのに使用されてもよい。カロテノイド分子から非弾性散乱され、ラマン信号を形成する光の強度は、正常な生物組織からのラマン散乱の強度と比較して、状態を査定することができる。ラマン信号の強度もまた定量化して、組織の酸化状態を査定することができる。

【0089】

「D」を導出する

以下の検討は、放物線と (x, y) 点の対に関する式の一般形式で開始する。(x, y) 点の対の値は、PMTの数、及び読取りに471.3のフィルタが使用された場合のその出力値を473.0のフィルタを使用した場合の値で除した比率である。この検討は、D及びベースライン放物線の係数を計算するのに使用されてもよい式の導出を示す。図20を参照されたい。

【0090】

P0、P1、P2、及びP3は、PMT0~3それぞれの比率の値である。放物線上の

4 点は既知である。

【 0 0 9 1 】

【 化 1 】

$$\begin{aligned}(x_0, y_0) &= (0, P_0) \\ (x_1, y_1) &= (1, P_1 - D) \\ (x_2, y_2) &= (2, P_2 + D) \\ (x_3, y_3) &= (3, P_3)\end{aligned}$$

これらの値及び放物線の式の一般形式 ( $y = ax^2 + bx + c$ ) を使用して、D の値を求めることができる。

【 0 0 9 2 】

【 化 2 - 1 】

$$\begin{aligned}x_0 = 0 \text{ および } y_0 = P_0 \text{ のとき } P_0 &= a(0^2) + b(0) + c \\ x_1 = 1 \text{ および } y_1 = P_1 - D \text{ のとき } P_1 - D &= a(1^2) + b(1) + c\end{aligned}$$

【 0 0 9 3 】

【 化 2 - 2 】

$$\begin{aligned}x_2 = 2 \text{ および } y_2 = P_2 + D \text{ のとき } P_2 + D &= a(2^2) + b(2) + c \\ x_3 = 3 \text{ および } y_3 = P_3 \text{ のとき } P_3 &= a(3^2) + b(3) + c\end{aligned}$$

第 1 の式では、 $P_0 = c$  である。c を  $P_0$  で置き換え、 $P_0$  を左辺に移項し、定数を乗ずることにより、上記の式は単純化できる。4 つの式は以下のようになる。

【 0 0 9 4 】

【 化 3 】

$$\begin{array}{ll} \text{式 1} & P_0 = c \\ \text{式 2} & P_1 - D - P_0 = a + b \\ \text{式 3} & P_2 + D - P_0 = 4a + 2b \\ \text{式 4} & P_3 - P_0 = 9a + 3b \end{array}$$

このように、c の値が求められる。a 及び b の値を求めると、D は消去される。最初に、式 2 及び 3 を解いて D の値を求める。

【 0 0 9 5 】

【 化 4 】

$$\begin{aligned}P_1 - D - P_0 = a + b \text{ は } D &= P_1 - P_0 - a - b \text{ になる} \\ P_2 + D - P_0 = 4a + 2b \text{ は } D &= P_0 - P_2 + 4a + 2b \text{ になる}\end{aligned}$$

D = D なので、2 つの式は等しく置き直し得る。

【 0 0 9 6 】

【 化 5 】

$$P_1 - P_0 - a - b = P_0 - P_2 + 4a + 2b$$

$$\text{式 5 } -2P_0 + P_1 + P_2 = 5a + 3b$$

式 5 を解いて a の値を求める。

【 0 0 9 7 】

【 化 6 】

$$\text{式 6 } a = (-2P_0 + P_1 + P_2 - 3b) / 5$$

式 2 及び 3 を解いて a の値を求める。a を式 4 に代入して b を求める。

【 0 0 9 8 】

10

20

30

40

【化 7】

$$\begin{aligned}
 P_3 - P_0 &= 9a + 3b \\
 3b &= P_3 - P_0 - 9a \\
 3b &= P_3 - P_0 - 9((-2P_0 + P_1 + P_2 - 3b) / 5) \\
 15b &= 5P_3 - 5P_0 - 9(-2P_0 + P_1 + P_2 - 3b) \\
 15b &= 5P_3 - 5P_0 + 18P_0 - 9P_1 - 9P_2 + 27b \\
 -12b &= 13P_0 - 9P_1 - 9P_2 + 5P_3
 \end{aligned}$$

$$\text{式 7 } b = (-13P_0 + 9P_1 + 9P_2 - 5P_3) / 12$$

b を求めたら、式 2 の簡略版を使用して D を求めてもよい。

【 0 0 9 9 】

10

【化 8】

$$d = P_1 - P_0 - a - b$$

式 6 から、a の値を代入する。

【 0 1 0 0 】

【化 9】

$$\begin{aligned}
 d &= P_1 - P_0 - ((-2P_0 + P_1 + P_2 - 3b) / 5) - b \\
 5d &= 5P_1 - 5P_0 - (-2P_0 + P_1 + P_2 - 3b) - 5b \\
 5d &= 5P_1 - 5P_0 + 2P_0 - P_1 - P_2 + 3b - 5b \\
 5d &= -3P_0 + 4P_1 - P_2 - 2b
 \end{aligned}$$

20

最後に、式 7 から b の値を当てはめて D を求める。

【 0 1 0 1 】

【化 10】

$$\begin{aligned}
 5D &= -3P_0 + 4P_1 - P_2 - 2((-13P_0 + 9P_1 + 9P_2 - 5P_3) / 12) \\
 30D &= -18P_0 + 24P_1 - 6P_2 - (-13P_0 + 9P_1 + 9P_2 - 5P_3) \\
 30D &= -18P_0 + 24P_1 - 6P_2 + 13P_0 - 9P_1 - 9P_2 + 5P_3 \\
 30D &= -5P_0 + 15P_1 - 15P_2 + 5P_3 \\
 6D &= -P_0 + 3P_1 - 3P_2 + P_3 \\
 D &= (-P_0 + 3P_1 - 3P_2 + P_3) / 6
 \end{aligned}$$

結果の D は、式 3 を使用するプロセスを繰返すことにより、チェックされてもよい。

30

【 0 1 0 2 】

【化 11】

$$D = P_0 - P_2 + 4a + 2b$$

最初に  $a = (-2P_0 + P_1 + P_2 - 3b) / 5$  を代入し、次に  $b = (-13P_0 + 9P_1 + 9P_2 - 5P_3) / 12$  を代入すると、D に関して同じ結果が生じる。

【 0 1 0 3 】

【化 12】

$$\begin{aligned}
 D &= P_0 - P_2 + 4a + 2b \\
 D &= P_0 - P_2 + 4 * ((-2P_0 + P_1 + P_2 - 3b) / 5) + 2b \\
 5D &= 5P_0 - 5P_2 + 4 * (-2P_0 + P_1 + P_2 - 3b) + 10b \\
 5D &= 5P_0 - 5P_2 - 8P_0 + 4P_1 + 4P_2 - 12b + 10b \\
 5D &= -3P_0 + 4P_1 - P_2 - 2b \\
 5D &= -3P_0 + 4P_1 - P_2 - 2 * ((-13P_0 + 9P_1 + 9P_2 - 5P_3) / 12) \\
 5D &= -3P_0 + 4P_1 - P_2 + (26P_0 - 18P_1 - 18P_2 + 10P_3) / 12 \\
 60D &= -36P_0 + 48P_1 - 12P_2 + 26P_0 - 18P_1 - 18P_2 + 10P_3 \\
 60D &= -10P_0 + 30P_1 - 30P_2 + 10P_3 \\
 D &= (-P_0 + 3P_1 - 3P_2 + P_3) / 6
 \end{aligned}$$

40

式 3 から導かれる D を求める最後の式は、式 2 から導かれる式と同一であることに留意されたい。

D を計算するために「a」は必要なく、その解を求めないことに留意されたい。基線放物

50

線を計算する場合は、「a」の解を求めてもよい。最初の式のいずれが使用されてもよい。例えば、式4である。

【0104】

【化13】

$$\begin{aligned}
 \text{式 4} \quad & P_3 - P_0 = 9a + 3b \\
 & P_3 - P_0 = 9a + 3 * ((-13P_0 + 9P_1 + 9P_2 - 5P_3) / 12) \\
 & 12P_3 - 12P_0 = 108a + 3 * (-13P_0 + 9P_1 + 9P_2 - 5P_3) \\
 & 12P_3 - 12P_0 = 108a - 39P_0 + 27P_1 + 27P_2 - 15P_3 \\
 & -108a = -12P_3 + 12P_0 - 39P_0 + 27P_1 + 27P_2 - 15P_3 \\
 & 108a = 12P_3 - 12P_0 + 39P_0 - 27P_1 - 27P_2 + 15P_3 \\
 & 108a = 27P_0 - 27P_1 - 27P_2 + 27P_3 \\
 & a = (P_0 - P_1 - P_2 + P_3) / 4
 \end{aligned}$$

10

このように、a、b、cの値が計算され、次の式を用いて、PMT比率の値であるDが得られる。

【0105】

【化14】

$$\begin{aligned}
 a &= (P_0 - P_1 - P_2 + P_3) / 4 \\
 b &= (-13P_0 + 9P_1 + 9P_2 - 5P_3) / 12 \\
 c &= P_0 \\
 D &= (-P_0 + 3P_1 - 3P_2 + P_3) / 6
 \end{aligned}$$

20

最終チェックが、4つの最初の式の各々を実証することにより実施されてもよい。

【0106】

【化15】

$$\begin{aligned}
 \text{式 1} \quad & P_0 = c \\
 \text{式 2} \quad & P_1 - D - P_0 = a + b \\
 \text{式 3} \quad & P_2 + D - P_0 = 4a + 2b \\
 \text{式 4} \quad & P_3 - P_0 = 9a + 3b
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{式 1} \quad & P_0 = c \\
 & \text{これは真である。}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{式 2} \quad & P_1 - D - P_0 = a + b \\
 & P_1 - ((-P_0 + 3P_1 - 3P_2 + P_3) / 6) - P_0 = (P_0 - P_1 - P_2 + P_3) / 4 \\
 & \quad + (-13P_0 + 9P_1 + 9P_2 - 5P_3) / 12 \\
 & 12P_1 + 2P_0 - 6P_1 + 6P_2 - 2P_3 - 12P_0 = 3P_0 - 3P_1 - 3P_2 + 3P_3 - 13P_0 + \\
 & 9P_1 + 9P_2 - 5P_3 \\
 & -10P_0 + 6P_1 + 6P_2 - 2P_3 = -10P_0 + 6P_1 + 6P_2 - 2P_3 \\
 & \text{これは真である。}
 \end{aligned}$$

30

$$\begin{aligned}
 \text{式 3} \quad & P_2 + D - P_0 = 4a + 2b \\
 & P_2 + ((-P_0 + 3P_1 - 3P_2 + P_3) / 6) - P_0 \\
 & \quad = 4 * ((P_0 - P_1 - P_2 + P_3) / 4) + 2 * ((-13P_0 + 9P_1 + 9P_2 - 5P_3) / \\
 & \quad 12) \\
 & 12P_2 - 2P_0 + 6P_1 - 6P_2 + 2P_3 - 12P_0 \\
 & \quad = 12P_0 - 12P_1 - 12P_2 + 12P_3 - 26P_0 + 18P_1 + 18P_2 - 10P_3 \\
 & -14P_0 + 6P_1 + 6P_2 + 2P_3 = -14P_0 + 6P_1 + 6P_2 + 2P_3
 \end{aligned}$$

40

【0107】

## 【化 1 6】

これは真である。

$$\begin{aligned} \text{式 4} \quad & P_3 - P_0 = 9a + 3b \\ & P_3 - P_0 = 9((P_0 - P_1 - P_2 + P_3) / 4) + 3((-13P_0 + 9P_1 + 9P_2 - 5P_3) / \\ 12) & \\ & 12P_3 - 12P_0 = 3 \cdot 9(P_0 - P_1 - P_2 + P_3) + 3 \cdot (-13P_0 + 9P_1 + 9P_2 - 5P_3) \\ & 4P_3 - 4P_0 = 9P_0 - 9P_1 - 9P_2 + 9P_3 - 13P_0 + 9P_1 + 9P_2 - 5P_3 \\ & 4P_3 - 4P_0 = 4P_3 - 4P_0 \\ & \text{これも真である。} \end{aligned}$$

好適な実施形態を参照して本発明を記載してきたが、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、形式及び詳細において変更がなされてもよいことを当業者は理解するであろう。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0108】

【図1】図1は、装置の基本的な光処理構成要素の概略図である。

【図2】図2は、正面からの絵画図、並びに装置、その制御コンピュータ及びその電源の概略図である。

【図3】図3は、分光計の主要構成要素のための内部ハウジングの背面からの絵画図である。

【図4】図4は、装置の主要構成要素のための内部ハウジングの上面図である。

20

【図5】図5は、装置の主要構成要素のための内部ハウジングの正面からの絵画図であり、また、支援構成要素及び冷却ファンのための上部回路基板の位置も示している。

【図6】図6は、装置の主要構成要素のための内部ハウジングの背面からの絵画図であり、また、支援構成要素及び冷却ファンのための下部回路基板の位置も示している。

【図7】図7は、装置の主要構成要素のための内部ハウジングの左側面図である。

【図8】図8は、装置の主要構成要素のための内部ハウジングの右側面図である。

【図9】図9は、装置の外面の正面からの絵画図である。

【図10】図10は、装置の外面の背面からの絵画図である。

【図11】図11は、装置の外面の背面図である。

【図12】図12は、装置の内部の左側面からの絵画図及び横断面図である。

30

【図13】図13は、装置の内部の上面からの絵画図及び内部図である。

【図14】図14は、装置の内部の後方斜めからの絵画図及び内部図である。

【図15】図15は、装置と共に使用されている方法のハイレベル・フロー・チャートである。

【図16】図16は、装置と共に使用されているフィールド較正プロセスのフロー・チャートである。

【図17】図17は、装置と共に使用されているフィールド較正プロセスの自動調整部分のフロー・チャートである。

【図18】図18は、組織測定における示度を収集するために使用されているデータ収集及び初期計算のフロー・チャートである。

40

【図19】図19は、最終ラマン散乱値を提示するために分析される測定値を提供するのに必要な2つのスキャンを実行するステップのフロー・チャートである。

【図20】図20は、2つの異なる励起波長での測定に関するPMT比率と該比率値を使用して構成されている放物曲線とをグラフで表して示す図表である。

【 図 1 】

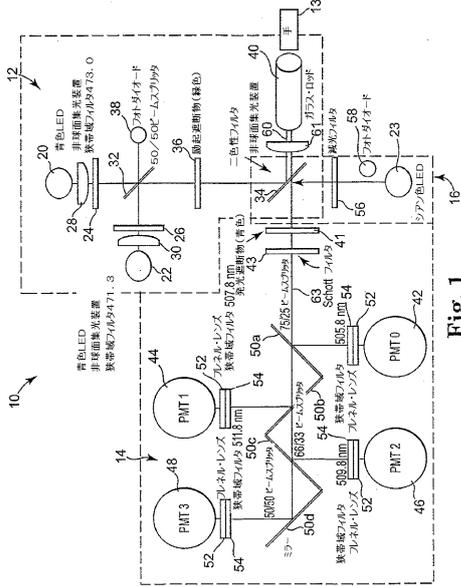


Fig. 1

【 図 2 】

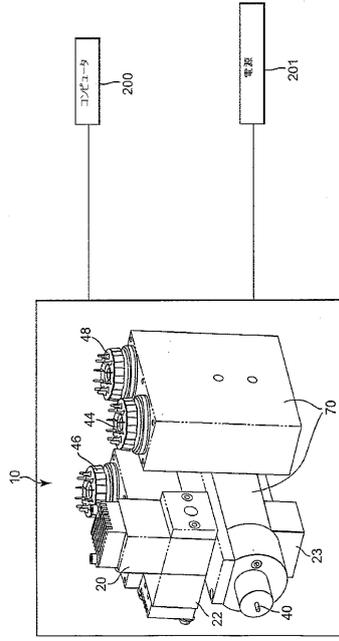


Fig. 2

【 図 3 】

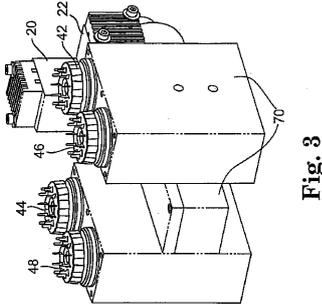


Fig. 3

【 図 4 】

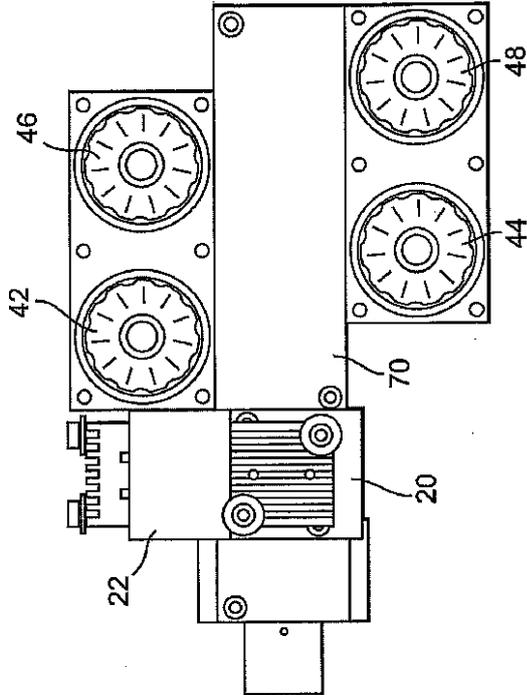


Fig. 4

【 5 】

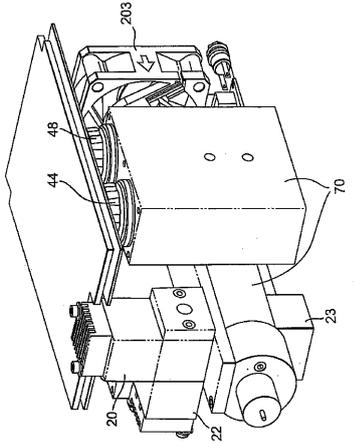


Fig. 5

【 6 】

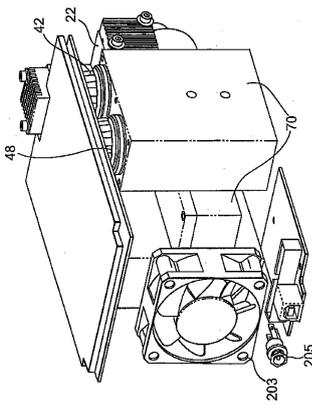


Fig. 6

【 9 】

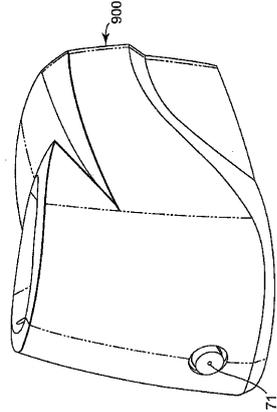


Fig. 9

【 10 】

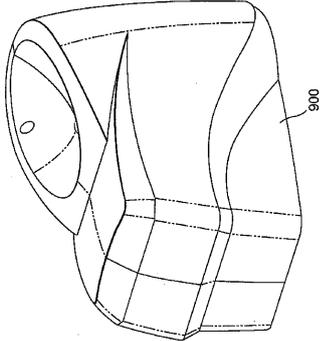


Fig. 10

【 7 】

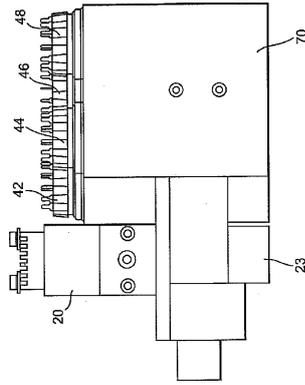


Fig. 7

【 8 】

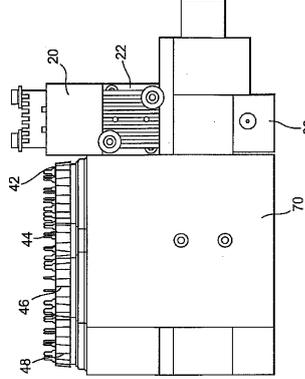


Fig. 8

【 11 】

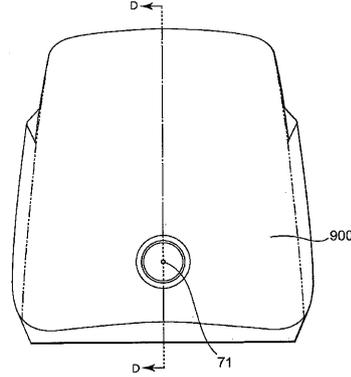


Fig. 11

【 図 1 2 】

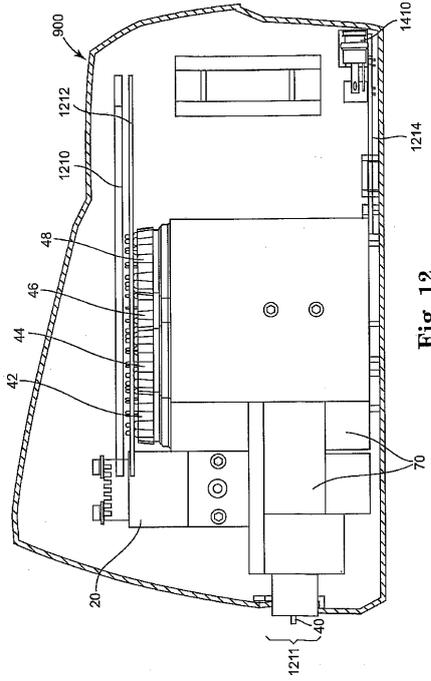


Fig. 12

【 図 1 3 】

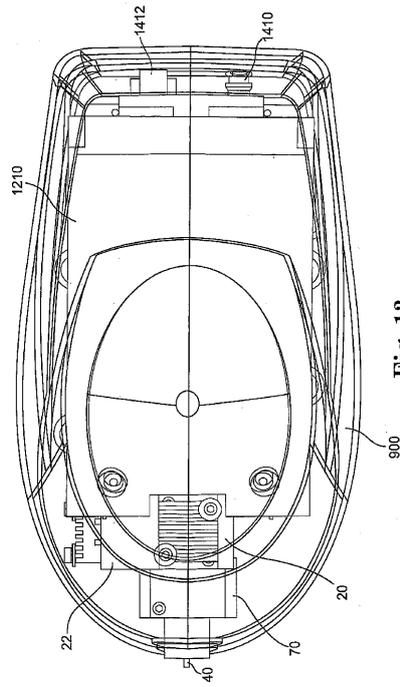


Fig. 13

【 図 1 4 】

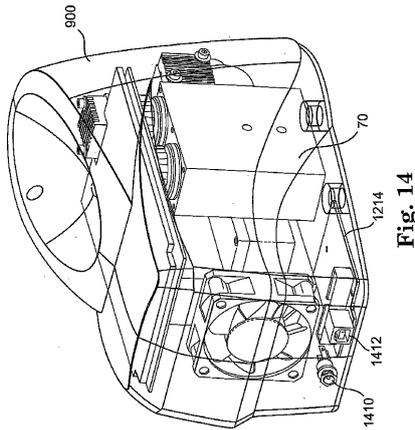


Fig. 14

【 図 1 5 】

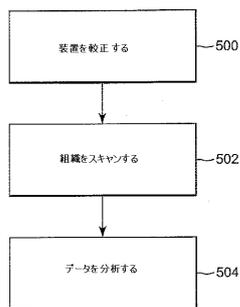


Fig. 15

【 図 1 6 】

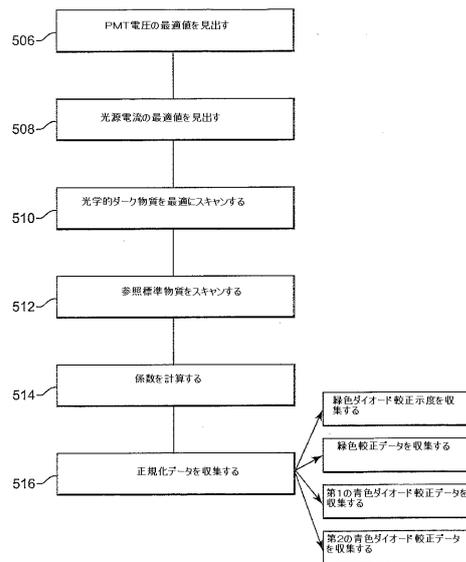


Fig. 16

【 図 17 】

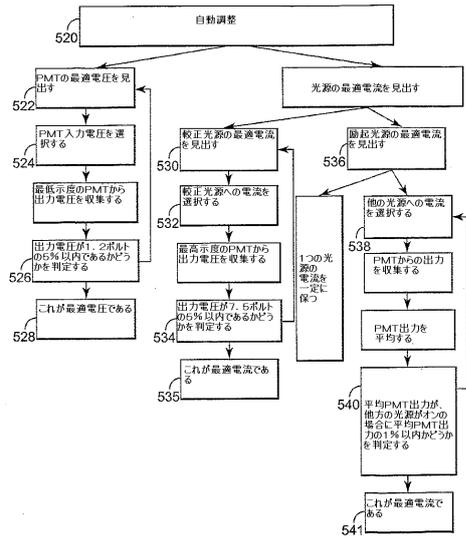


Fig. 17

【 図 18 】

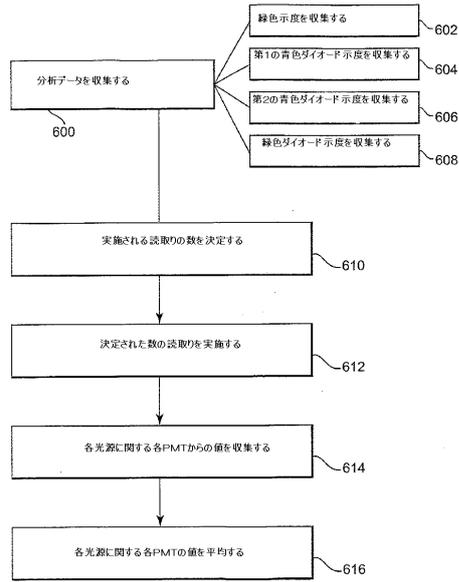


Fig. 18

【 図 19 】

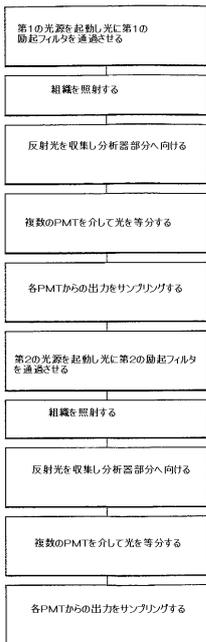


Fig. 19

【 図 20 】

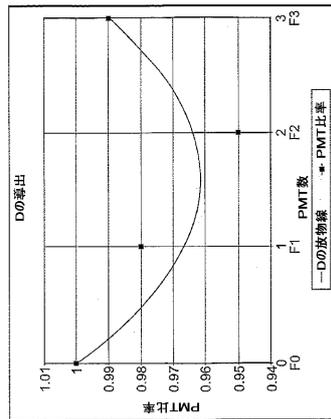


Fig. 20

## フロントページの続き

- (72)発明者 ファーガソン, スコット  
アメリカ合衆国 ユタ 84660, スパニッシュ フォーク, サウス 2250 イースト  
1419
- (72)発明者 フラリック, ジョン エフ.  
アメリカ合衆国 ユタ 84103-2537, ソルト レーク シティ, エー ストリー  
ト 441
- (72)発明者 バーゲソン, スコット ダグラス  
アメリカ合衆国 ユタ 84097, オレム, イー. 850 エヌ. 1043
- (72)発明者 ピートロス, ジャスティン  
アメリカ合衆国 ユタ 84604, プロボ, エヌ. ピュート ドライブ 3152

審査官 田中 洋介

- (56)参考文献 特公昭53-039156(JP, B2)  
特開昭48-074891(JP, A)  
国際公開第2005/079247(WO, A2)  
特表平09-507579(JP, A)  
特表2008-544238(JP, A)  
ANDREW P.SHREVE et al., Effective Rejection of Fluorescence Interference in Raman Spec  
troscopy Using a Shifted Excitation Difference Technique, APPLIED SPECTROSCOPY, 米国,  
THE SOCIETY FOR APPLIED SPECTROSCOPY, 1992年 4月 1日, Vol.46 No.4, pp.707-711

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/62-21/74

G01J 3/44

JSTPlus/JST7580(JDreamII)