

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年9月16日(16.09.2010)

PCT

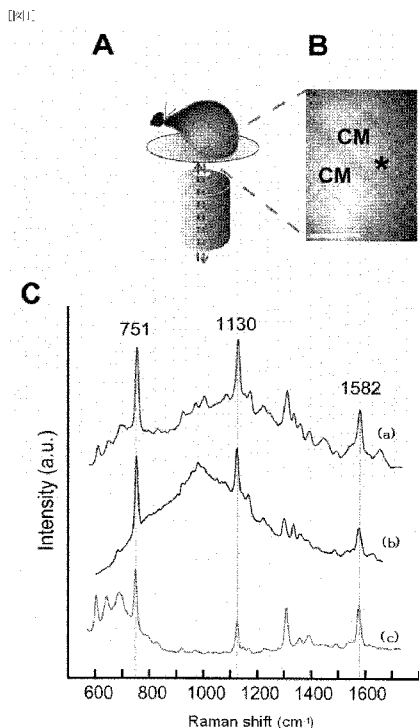
(10) 国際公開番号
WO 2010/103661 A1

- (51) 国際特許分類: *A61B 10/00* (2006.01) *G01N 21/65* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/054930
- (22) 国際出願日: 2009年3月13日(13.03.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 京都府公立大学法人(KYOTO PREFECTURAL PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒6028566 京都府京都市上京区河原町通広小路 上る梶井町465番地 (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高松 哲郎 (TAKAMATSU, Tetsuro) [JP/JP]; 〒6020841 京都府京都市上京区河原町通広小路 上る梶井町465番地 京都府立医科大学内 Kyoto (JP). 小川 貢 (OGAWA, Mitsugu) [JP/JP]; 〒6020841 京都府京都市上京区河原町通広小路 上る梶井町465番地 京都府立医科大学内 Kyoto (JP). 原田 義規 (HARADA, Yoshinori) [JP/JP]; 〒6020841 京都府京都市上京区河原町通広小路 上る梶井町465番地 京都府立医科大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所 (Sae-gusa & Partners); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, KM, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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,

[続葉有]

(54) Title: BODY TISSUE IMAGING USING RAMAN SCATTERING LIGHT

(54) 発明の名称: ラマン散乱を用いた生体組織イメージング



(57) Abstract: Disclosed are a method of noninvasively imaging a tissue (in particular, a cardiac tissue) in real time and an apparatus therefor. A method of imaging a sample, which contains a myocardial tissue and a blood vessel and/or a collagen-rich region, comprising the following steps (1) to (3): (1) a step of irradiating the sample, which contains a myocardial tissue and a blood vessel and/or a collagen-rich region, with an exciting light; (2) a step of detecting Raman scattering light from the sample; and (3) a step of analyzing the Raman scattering light thus detected with the use of Raman scattering spectra specific to myocardial cells and erythrocytes and/or collagen as indications and thus imaging the same.

(57) 要約: 本発明は、組織（特に、心臓組織）を非侵襲的に、且つ、リアルタイムにイメージングする方法及び装置を提供することを目的とする。本発明は、以下の工程（1）～（3）：（1）心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料に励起光を照射する工程；（2）該試料からのラマン散乱光を検出する工程；（3）該検出されたラマン散乱光を、心筋細胞と赤血球及び／又はコラーゲンに特徴的なラマン散乱スペクトルとを指標として解析し、画像化する工程；を含む、心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料をイメージングする方法を提供する。

WO 2010/103661 A1

NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, 添付公開書類:
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, — 國際調查報告 (條約第 21 條(3))
TG).

明 細 書

ラマン散乱を用いた生体組織イメージング

技術分野

[0001] 本発明は、生体組織からのラマン散乱スペクトルを利用して生体組織をイメージングする方法に関する。また本発明は、ラマン散乱スペクトルを利用した生体組織のイメージングするための装置に関する。

背景技術

[0002] 組織イメージングは、その組織を構成する様々な細胞やその他のコンポーネントの分布を知る上で不可欠である。従来、心筋の組織像を評価する手段として心筋生検がある。しかし、心筋生検では、標本の固定、染色が必要であり、そのためにリアルタイムに解析して像を作ることは不可能である。また、心臓組織を傷つけてしまうという問題もある。磁気共鳴画像 (MRI) 法は心臓の機能や構造に関する情報を得るために使用されるが、組織像の変化に基づいた情報ではない。例えば、正常な心筋細胞からなる領域と虚血により心筋細胞が壊死して線維組織によって置換された領域とを明確に識別することはできない。

[0003] 一方、ラマン分光法は振動型分光法の一形態であり、分子中の化学結合の直接の情報を提供する。ラマン分光法では、入射光により誘起される振動の特異的なエネルギー変化をスペクトルとしてプロットすることができ、これによって無染色で物質を特定することができる。このようなラマン分光法の特性を利用したイメージング方法や装置が開発されている (特許文献1及び2)。医療分野におけるラマン分光法を使った最近の研究では、がん (非特許文献1)、アテローム性動脈硬化症 (非特許文献2)、ヘモグロビンの酸素飽和 (非特許文献3) の診断などの組織診断に焦点が当てられてきた。しかし、これらの研究は、単に標的組織のラマンスペクトルを解析するに留まり、病変部位を視覚的に識別するためにイメージングを試みたものではない。このようにラマン分光法を利用したイメージングに関する研究は進められているものの、内臓組織を構成する様々な細胞のコンポーネントを分析可能なイメージングに応用した例は報告されていない。

特許文献1:特開2000-55809号公報

特許文献2:特開2007-147350号公報

非特許文献1:Haka, A.S. et al. (2006)., Cancer Res. Vol. 66, 3317-22.

非特許文献2:Motz, J.T. et al. (2006)., J. Biomed. Opt. vol. 11, 021003.

非特許文献3:Torres Filho, I.P., et al., (2008)., J. Appl. Physiol. 104, 1809-17.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0004] かかる現状の下、本発明は、組織(特に、心臓組織)を非侵襲的に、且つ、リアルタイムにイメージングする方法及び装置を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0005] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ね、(1)ラマン分光法により心臓における心筋細胞と血球とを、各々に固有のスペクトルパターンに基づいて識別することが可能であり、心筋細胞からなる領域と血管とを含む試料について、両組織を明瞭に区別したイメージングが可能であること、(2)酸素化型の赤血球と脱酸素化型の赤血球とを各々に固有のラマンスペクトルに基づいて識別することができ、これらを明瞭に区別してイメージングすることが可能であること、(3)心筋梗塞を起こした心臓の組織から得られるラマン散乱光を解析することにより、心筋細胞が壊死して線維組織化した領域と正常な心筋細胞からなる領域とを明瞭に区別してイメージングすることが可能であることを見出した。これらの知見に基づき、本発明者らは更なる検討を重ね、非侵襲的、且つ、リアルタイムに、正常な心筋細胞からなる領域とコラーゲンリッチな領域と血管とを視覚的に識別可能な状態で明瞭にイメージングすることを可能にし、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、以下の態様の発明を提供する。

- [0006] 項1. 以下の工程(1)~(3):

- (1)心筋組織と血管及び/又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料に励起光を照射する工程;
- (2)該試料からのラマン散乱光を検出する工程;
- (3)該検出されたラマン散乱光を、心筋細胞と赤血球及び/又はコラーゲンに特徴

的なラマン散乱スペクトルとを指標として解析し、画像化する工程；

を含む、心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料をイメージングする方法。

- [0007] 項2. ラマン散乱光検出手段により検出された、心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料からのラマン散乱光を、心筋細胞と赤血球及び／又はコラーゲンに特徴的なラマン散乱スペクトルとを指標として解析し、画像処理する工程を含む、心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料をイメージングする方法。
- [0008] 項3. 該試料が、虚血を起こした心臓又はその一部である、項1又は2に記載の方法。
- [0009] 項4. 心筋細胞に特徴的なラマン散乱スペクトルが、シトクロムに起因するラマン散乱スペクトルである、請求項1～3のいずれかに記載の方法。
- [0010] 項5. 赤血球に特徴的なラマン散乱スペクトルが、ヘモグロビンに起因するラマン散乱スペクトルである、項1～3のいずれかに記載の方法。
- [0011] 項6. ヘモグロビンに起因するラマン散乱スペクトルが、酸素化型ヘモグロビン及び／又は脱酸素化型ヘモグロビンに起因するラマン散乱スペクトルである、項4に記載の方法。
- [0012] 項7. 励起光が、532nmの波長を有する、請求項1に記載の方法。
- [0013] 項8. (A)心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む領域を含む試料に励起光を照射する手段、(B)前記試料からのラマン散乱光を検出する手段、(C)該検出したラマン散乱光を心筋細胞と赤血球及び／又はコラーゲンに特徴的なラマン散乱スペクトルを指標として画像処理する手段、を備える心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料をイメージングするためのイメージング装置。
- [0014] 項9. 血管を含む試料から得られたラマン散乱光について、酸素化型赤血球に固有のラマンスペクトルと脱酸素化型赤血球に固有なラマンスペクトルとを指標として解析する工程を含む、当該試料を動脈と静脈とを視覚的に区別してイメージングする方法。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、非侵襲的に、且つ、リアルタイムに、正常な心筋細胞からなる領域とコラーゲンリッチな領域と血管とを明確に区別して心臓の組織をイメージングすることが可能である。よって、本発明のイメージング方法を用いることにより、虚血に陥った心臓において、正常に機能する領域と心筋細胞が壊死して線維化した領域とを的確に見分けることが可能となる。また、本発明により、心臓における血管の存在を明瞭に判別することができる。よって、本発明の方法を用いて、心筋梗塞を起こした心臓における血管の有無を調べる事が可能であり、それを治療の手段や計画の決定に役立てることができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]図1は、代表的な生きたままの心筋細胞の細胞質とヘムタンパク質のラマンスペクトルの測定に関する。図1Aは、摘出した心臓全体と光学系のセッティングの模式図を示す。図1Bは、心外膜下領域の自家蛍光イメージを示す。図1Cは、図1B中のアスタリスクで示された(a)心筋細胞(レーザーパワー;20mW、照射時間;5秒)、(b)還元型シトクロムb5(50 μ M)及び(c)還元型シトクロムc(125 μ M)のラマンスペクトル(レーザーパワー;5mW、照射時間;10秒)を示す。ここで、CMは心筋細胞であり、a.u.は任意の単位を示す。

[図2]図2は、生きたex-vivo心臓の心筋細胞と血管のラマンイメージに関する。図2Aは、(a)心筋細胞、(b)酸素化型赤血球及び(c)脱酸素化型赤血球のラマンスペクトルを示す。赤血球のラマンスペクトルはレーザーパワー2mWで照射時間3秒で得られた。図2Bは、代表的試料中で心臓表面から得られた自己蛍光イメージを示す。四角で囲まれた領域はラマンイメージが得られた領域を示している。図2Cは、ラマンバンドイメージを示す。図2Dは、(a)第1、(b)第2、(c)第3主成分スコアイメージ(左:56x96ピクセル)と各々の主成分スペクトル(右)を示す。イメージのための試料はレーザーパワー20mWで56ラインで照明された。それぞれのラインの照射時間は5秒で全体の照射時間は280秒である。スケールバーは20 μ m。CMは心筋細胞を示し、BVは血管を示し、a.u. は任意の単位を示す。

[図3]図3は、心筋梗塞領域の代表的な凍結融解セクション中の心筋細胞とコラーゲンのラマンイメージに関する。図3Aは、凍結融解セクションのヘマトキシリンエオシン

染色を示す。図3Bは、マッソントリクロム染色による心筋梗塞の境界領域のイメージを示す。図3Cは、図3Aのボックスで囲まれた領域の高解像イメージを示す。図3Dは、図3Cと同じ領域の白色光イメージを示す。図3Eは、図3Dのアスタリスクに示す線維性の組織(上)とI型コラーゲンのラマンスペクトル(下)を示す。図3Fは、第2主成分スコアイメージ(左)(108x179ピクセル)とその主成分スペクトル(右)を示す。このイメージは図3Dで示された領域をレーザーパワー100mWで108ラインに照明されることで得られた。それぞれのラインの照射時間は5秒で全体の照射時間は540秒であった。スケールバーは50 μ m (A, B); 20 μ m (C, D, F)である。CMは心筋細胞を示し、FTは線維化した組織を示し、CNは、コラーゲンを示し、a.u.は任意の単位を示す。

[図4]図4は、生きたまま調製された心筋梗塞領域における心筋細胞とコラーゲンのラマンイメージを示す。図4Aは、第2主成分スコアイメージ(60x150ピクセル)と同じ代表的な試料の白色光イメージとの融合写真を示す。ドットで示されたラインは心筋細胞の輪郭を示している。図4Bは、第2主成分スペクトルを示す。試料はレーザーパワー100mWで60ラインに照明された。それぞれのラインの照射時間は5秒で全体の照射時間は300秒である。CM、心筋細胞。FTは線維化した組織を示し、スケールバーは20 μ mである。

発明を実施するための最良の形態

[0017] 以下、本発明を詳細に説明するが、本発明は、以下に説明される特定の実施形態に限定されるものではない。また当業者であれば、以下に説明する実施形態の各要素を本発明の範囲内において容易に変更することが可能である。

[0018] 一実施形態において、本発明は、以下の工程(1)～(3)を含む、心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料をイメージングする方法である。

- (1)心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料に励起光を照射する工程;
- (2)該試料からのラマン散乱光を検出する工程;
- (3)該検出されたラマン散乱光を、心筋細胞と赤血球及び／又はコラーゲンに特徴的なラマン散乱スペクトルとを指標として解析し、画像化する工程。

- [0019] 本実施形態における、イメージング対象は、心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料である。好ましくは、当該試料は心臓の全体又は一部である。本発明の方法は、主として正常な心筋細胞からなる領域と心筋細胞が壊死した領域とを明瞭に区別することができるため、虚血に陥った心臓の診断に役立てることができる。このような観点から、イメージングに供する試料は、虚血を起こした心臓の全体又は一部である。具体的には、虚血により狭心症、心筋梗塞、心不全、及び不整脈を起こした心臓である。心臓の一部をイメージングの対象とする場合、その部分は当業者が適宜決定することができる。例えば、心電図やMRIの結果から決定された部位をイメージングすることができる。
- [0020] コラーゲンリッチ領域とは、心筋細胞が壊死して線維化した結果、正常に機能する心筋細胞から成る領域と比較してコラーゲンの存在比率が高い領域である。線維化の程度に関する定義については、議論のあるところではあるが、本発明においてはMRIにおいて心室壁内50%以上が線維に置換されているところをコラーゲンリッチ領域と定義することができる。よって、コラーゲンリッチ領域とは、心臓において心筋細胞が脱落し、心筋組織がその機能を失った領域である。これに対し、正常領域とは心臓において正常な心筋細胞が機能している領域を意味する。また、血管とは心筋内を走行する任意の血管を意味し、動脈及び静脈のいずれも含まれる。特に、心筋細胞近傍に存在する小血管のイメージングは組織細胞レベルの代謝を見る上で重要である。
- [0021] 該試料は、心筋組織と血管とを含むものであっても、心筋組織とコラーゲンリッチ領域を含むものであってもよい。好ましい一実施形態において、該試料は、心筋組織、血管及びコラーゲンリッチ領域を含む。また、他の実施形態において、該試料は、血管とコラーゲンリッチ領域を含むものであってもよい。該試料には、心筋組織、コラーゲンリッチ領域及び血管の他に、他の細胞や組織が含まれていてもよい。例えば、炎症細胞、脂肪組織が含まれてもよい。
- [0022] 本実施形態のイメージング方法は、上記のような試料に励起光を照射する工程を含む。励起光は、試料に照射することによって試料を構成する物質に固有のラマン散乱光を生じるレーザ光である。励起光は、当該技術分野において使用される任意

の励起光を使用することができ、心筋細胞と血管とコラーゲンを識別するために適したラマンスペクトルを得る観点から適宜選択することができる。よって、励起光の波長は特に制限されないが、好ましくはヘム蛋白の共鳴波長400～600nmであり、より好ましくは500～600nmである。特に好ましくは、532nmのNd:YAGレーザを使用することができる。

- [0023] 試料に励起光を照射するための手段は、ラマン分光法において通常用いられる、レーザ光を発する手段であれば特に制限なく使用することができる。
- [0024] 本実施形態のイメージング方法は、次いで、試料から発せられるラマン散乱光を検出する工程を含む。ラマン散乱光を検出する手段は、ラマン散乱光を検出し、それを画像化処理するための信号に変換することが可能なものであれば特に制限されず、当該分野において公知の検出手段を適宜選択して使用することができる。例えば、受光素子がマトリクス上に配列されたエリアセンサを検出手段として使用することができる。より具体的には、画素がアレイ状に配置された二次元CCDをラマン散乱光の検出手段として好適に使用することができる。
- [0025] 好ましい実施形態においては、試料からのラマン散乱光は、その検出に先立って、ダイクロイックフィルタ等により励起光と同じ波長を有する反射光と分離される。さらに、分離されたラマン散乱光は、回折格子やプリズムから成る分光素子によって光の波長に応じて空間的に分光される。分光されたラマン散乱光は上述のような検出手段においてラマンスペクトルを表す信号に変換され、パーソナルコンピュータ等の解析手段に出力される。
- [0026] 本実施形態のイメージング方法は、さらに検出されたラマン散乱光から得られたスペクトル情報を、パーソナルコンピュータ等の解析手段に記憶された心筋細胞、赤血球及び／又はコラーゲンに特徴的なラマンスペクトルを指標として解析され、画像化される。解析及び画像化は、当該技術分野に公知のソフトウェアを用いてパーソナルコンピュータ等によって処理される。例えば、MATLAB(Mathworks社)を用いて解析し画像化することができる。
- [0027] 心筋細胞に特徴的なラマンスペクトルとは、心筋細胞に対して励起光を照射して得られる、心筋細胞に固有のラマン散乱光のスペクトルである。同様に、赤血球に特徴

的なラマンスペクトルとは、赤血球に対して励起光を照射して得られる、赤血球に固有のラマン散乱光のスペクトルであり、コラーゲンに特徴的なラマンスペクトルとは、コラーゲンに励起光を照射して得られる、コラーゲンに固有なラマン散乱光のスペクトルである。赤血球は、酸素化型赤血球と脱酸素化型赤血球とのいずれであってもよい。試料に含まれる血管について、動脈か静脈かを識別する場合は、酸素化型赤血球及び脱酸素化型赤血球に特徴的なラマンスペクトルを各々の指標として使用することができる。

[0028] 心筋細胞に特徴的なラマンスペクトルを指標として解析するとは、心筋細胞に特徴的なスペクトルと合致するラマンスペクトルを示すラマン散乱光が得られるか否かによって、そのラマン散乱光を発する試料中の部位が心筋細胞であるか判定するということである。同様に、試料中の特定の部位が血管に相当するかどうかは、試料からのラマン散乱光が赤血球に固有のラマンスペクトルを示すか否かによって判定される。コラーゲンリッチ領域についても同様に、コラーゲンに特徴的なスペクトルを示すラマン散乱光を放つか否かによって判定される。

[0029] 心筋細胞に特徴的なラマンスペクトルの一例は、実施例1(図1)に示される。図1に示されるように、心筋細胞を532nmのレーザー光で励起した場合のラマンシフト751/cm、1130/cm、及び1582/cmにおけるピークを指標とすることができる。実施例1に記載されるように、前記のラマンシフトのピークパターンは、心筋細胞中のシトクロムに起因するものである。酸素化型赤血球及び脱酸素化型赤血球に特徴的なラマンスペクトルの一例は、実施例2(図2)に示される。図2に示されるように、酸化型赤血球を532nmのレーザー光で励起した場合のラマンシフト1371/cm、1582/cm及び1637/cmにおけるピークを指標とすることができる。また、還元型赤血球を532nmのレーザー光で励起した場合のラマンシフト1355/cm、1545/cm及び1601/cmにおけるピークを指標とすることもできる。これらのラマンシフトのピークパターンは、赤血球中のヘモグロビンの存在に起因している。コラーゲンに特徴的なラマンスペクトルの一例は、実施例3(図3)に示される。本発明では、これらのスペクトルを使用することにより、正常な心筋組織と血管とコラーゲンリッチな領域とを明瞭に区分けしてイメージングすることができる。

- [0030] イメージングの対象となる試料全体から得られるラマンスペクトルの分布は、解析手段として主成分分析を用いて実施される。
- [0031] 主成分分析は多変量解析の一つであり、複数の観測変数から、それを要約する合成変数(主成分と呼ぶ)を作り出す分析法である。従って、ラマンスペクトルの解析においては、イメージング対象から得られる複数のラマンスペクトルから、その試料のいくつかの成分を特徴づけるスペクトル形体を抽出する目的で使用することができる。主成分の計算原理としては、(1) 全ての変数を標準化する、(2) 情報のロスを最小限にするために、主成分の分散値が最大になるように、主成分の軸を設定し、さらに主成分同士の相関を0にする、(3) 決定された主成分の分散が大きい順に第1主成分、第2主成分、第3主成分とする、(4) 主成分の軸に対応する重み係数を最小二乗法を用いて計算する。このようにして得られた主成分スペクトルに対する、個々のラマンスペクトルの得点(主成分スコア)を計算し、この値をプロットし画像化する。
- [0032] 以上に説明した、試料への励起光の照射、試料からのラマン散乱光の検出、検出されたラマン散乱光のラマンスペクトル信号への変換、及びラマンスペクトルの解析及び画像化と一連の工程は、例えば、特開2007-147357に記載される方法や市販されているラマン分光イメージング装置(例えば、ナノフoton社製のラマン顕微鏡)を用いて行うことができる。
- [0033] 一実施形態において本発明は、ラマン散乱光検出手段により検出された、心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料からのラマン散乱光を、心筋細胞と赤血球及び／又はコラーゲンに特徴的なラマン散乱スペクトルとを指標として解析し、画像処理する工程を含む、心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料をイメージングする方法である。本実施形態の方法は、ラマン散乱光として得られる情報を解析処理して、当該光の発信源である試料を画像として表示する方法である。本実施形態における方法は、上述する実施形態の説明に従って実施することができる。
- [0034] 一実施形態において、本発明は、(A) 心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む領域を含む試料に励起光を照射する手段、(B) 前記試料からのラマン散乱光を検出する手段、(C) 該検出したラマン散乱光を心筋細胞と赤血球及び／又

はコラーゲンに特徴的なラマン散乱スペクトルを指標として画像処理する手段、を備える心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料をイメージングするためのイメージング装置である。本発明のイメージング装置における(A)励起光照射手段、(B)ラマン散乱光検出手段、及び(C)画像処理手段は、基本的には当該技術分野において公知のラマン分光法を領したイメージング装置において用いられる手段をそのまま又は適宜改良を加えて使用することができる。好ましくは、(A)励起光照射手段及び(B)ラマン散乱光検出手段は、外科手術時に心臓に対してレーザー光の照射し、心臓からのラマン散乱光を検出するという観点から、いずれも細長いアームの先端でレーザー光の放出及びラマン散乱光の検出ができる形状を有する。

実施例

[0035] 以下、実施例を参照して本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の特定の実施例に限定されるものではない。

[0036] 試験例:心筋梗塞を起こした心臓モデルの調製

後述する実施例で使用した検体は、次のようにして作成された。心臓全体の検体(n=12)は、100%酸素供給下で全身麻酔の下、若い成体ウィスターラット(体重250-300g、雌)から取り出された。下大静脈から塩化カリウム(0.2mEq)を投与して心筋細胞の収縮を止めた後、心臓からのすべての血管を結紮し、血液で冠状血管を満たして心臓を摘出した。心臓はタイロッド溶液(4°C、pH7.4)に静置し摘出後の代謝分解を最小限にした。酸素化型の血液及び脱酸素化型の血液は、各々3匹のラットの左心房及び右心房から得た。

[0037] 心筋梗塞は33匹のラットの左下行冠状動脈を完全に結紮することで作製された。28日後に20匹の生存ラットから心臓を慎重に摘出した。12個の心臓を即座に液体窒素で凍結し、検証まで-80°Cで保存した。残る8つの心臓は生きたまま調製された。凍結サンプルは5µmの厚さのセクションにクリオスタット(LEICA, Wetzler, Germany)でスライスした。ラマン分析のサンプルは0.17mmの厚さの石英ガラス(Matsunami、大阪、日本)に載せられ、10mMのPBS(pH7.4)で湿った状態に保たれた。ヘマトキシリンエオシン染色とマッソントリクロム染色を用いて切片の組織を確認した。生きた心臓は横方向に切られ梗塞領域は肉眼で確認された。それらは1~2mmの厚さ

のスライスに切断された。生きた試料を用いた後述の試験は、摘出後1時間以内に完了した。

[0038] 実施例1:心筋細胞の細胞質のラマンスペクトル

生きたまま調製された損傷のないex-vivo心臓の心外膜下から得られた心筋細胞の細胞質のラマンスペクトルをレーザーラマンコンフォーカル顕微鏡 (RAMAN-11; Nanophoton、大阪、日本)を用いて測定した。取り出された心臓を顕微鏡のステージ上の石英基盤の上に置いた後、心筋細胞を確認するために、自家蛍光画像を利用した。自家蛍光は、330~380nm波長で励起し、420nm波長以上で検出した(図1A)。これにより心筋細胞を同定し、焦点を合わせた後、フィルターを変更しラマンスペクトルを採取した(図1C)。レーザー強度は20mW、照射時間は5秒であった。使用した顕微鏡の構造は、Harada, Y. et al., 2008, Proc. SPIE、vol. 6853,685308に図示されている。心筋細胞のラマンスペクトルは、いくつかのラマンバンドを含み、主として600, 643, 690, 751, 1003, 1130, 1171, 1307, 1336, 1356, 1396, 1450, 1582, 1657, 2854 及び 2932 cm^{-1} である(図1A)。その中で、751 (ν 15 mode)、1130 (ν 22 mode) 及び 1582 cm^{-1} (ν 19 mode) がヘムタンパク質の中心にあるポルフィリン環から生じた特定の振動モードと考えられる。ヘムタンパク質の中でも、還元型のシトクロムb5及びcのピークが心筋細胞のピークとよく対応する。シトクロムb5及びcは、代表的なヘムタンパク質で電子吸収帯の一つである β バンドを520~530nm波長にもつ。ミオグロ빈は本実施例の条件下では心筋細胞のスペクトルにほとんど寄与していないと考えられる。なぜなら、光乖離現象によってオキシミオグロ빈のラマンスペクトルを得ることが難しいことと、デオキシミオグロ빈はスペクトルのパターンに違いがあるからである。

[0039] 実施例2:生きたex-vivo心臓の心筋細胞と血管のラマン組織イメージ

シトクロムのラマンスペクトルは、ヘモグロ빈のラマンスペクトルと多くの共通点を有する。ヘモグロ빈による心筋細胞のシトクロムの検出に干渉する可能性を除外するためには、心臓組織中の二つのヘムタンパク質を分別する必要がある。酸素化型及び脱酸素化型赤血球は、それぞれ左心房及び右心房から、ヘパリン入りシリンジに採取した。それぞれ少量を石英基盤上に滴下し、自家蛍光画像で赤血球の形態を

確認し、ラマンスペクトルを採取した。図2Aは心筋細胞、酸素化型赤血球及び脱酸素化型赤血球についてのラマンスペクトルを示す。これらの特徴的なラマンバンドは、報告されている532nmの励起光を使った生理学的条件下で得られたスペクトルとよく対応する。特に ν_4 モード(酸素化マーカーバンド、1350-1380 cm^{-1} レンジ)及び ν_{19} と ν_{10} モード(1500-1650 cm^{-1} レンジ)に対応したバンドである。これらのラマンバンドは赤血球中のヘモグロビンから生じている。図2Bは心外膜下の心筋細胞とその近傍の小血管の自家蛍光画像である。自家蛍光は、330~380nm波長で励起し、420nm波長以上で検出した。図2Cは図2Bで示された心外膜下領域から得られたそれぞれの特徴的なラマンバンドでのラマンバンドイメージを示している。心筋細胞を表す1130 (ν_{22}) cm^{-1} とオキシヘモグロビンを表す 1582 (ν_{19})及び 1637 (ν_{10}) cm^{-1} とは、別々にイメージされ得るが、デオキシヘモグロビン単独でイメージすることは、オキシヘモグロビンの1582 cm^{-1} でのバンドの裾の部分で邪魔されるため不可能である。オキシ及びデオキシヘモグロビンの両者が1545 cm^{-1} のバンドを指標とすることで画像化される。

[0040] スペクトルの差異を同定し、同定された多数のバンドを化学マッピングのために使用するため、同じ領域から得られた5264(56x94ピクセル)個のラマンスペクトルについて主成分分析(PCA)が行われた。PCAは、MATLAB (Mathworks, Natick, Mass)とNanophotonソフトウェアを用いて行われ、大きなイメージデータの中から意味のある内在する変数を同定した。それぞれの主成分(PC)スペクトルに対応するPCスコアを、イメージ中の個々のラマンスペクトルにおいて計算した。そのスコアを正と負で分離し、空間情報を与えプロットし、画像化を図った。このスコアイメージはイメージ処理ソフトウェア(Image J; National Institutes of Health)を用いて行った。第1主成分が心筋細胞のスペクトルを抽出し、そのスコアイメージは心筋細胞それ自体の存在を示した。第2主成分スコアイメージと主成分スペクトルに示されるように、還元型のb及びc型シトクロム(751及び 1130 cm^{-1})を含んでいる心筋細胞とヘモグロビン(1545, 1582, 1601, 及び 1637 cm^{-1}) (図2Db)で満たされた周りにある小さな血管を同定することができた。興味深いことに第3主成分スコアイメージと主成分スペクトルは異なる状態のヘモグロビンを表していた。オキシ(1371, 1582, 及び 1637 cm^{-1})及びデオキシ(1355,

1545, 及び 1603 cm^{-1})ヘモグロビンを同定することができた。即ち、心筋細胞に近接する小動脈と小静脈のラマンイメージを得ることに成功した(図2Dc)。

[0041] 実施例3:心筋梗塞領域のラマン組織イメージ

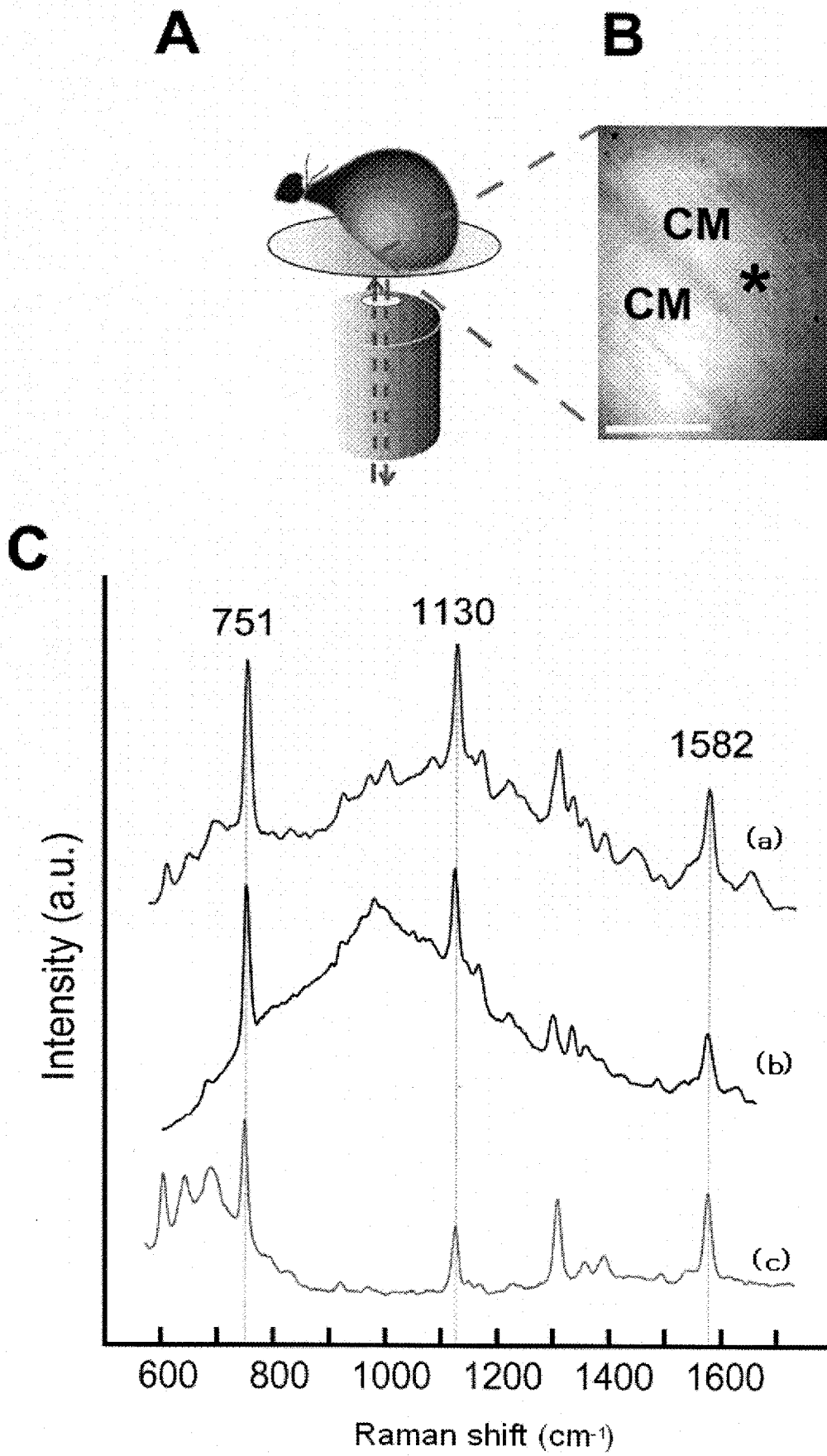
通常の組織学的検証方法(図3A-C)と合わせて心筋梗塞領域の凍結融解セクションについてラマン解析を行った。組織学的検証は、ラマン解析用との連続凍結切片におけるヘマトキシリンエオジン染色およびマッソントリクロム染色を用いて行った。これらの染色法により、線維組織で置換された心筋梗塞領域を同定することができた。図3Eは線維性組織(図3Dにアスタリスクで表示されている)から得られた代表的なラマンスペクトルを示している。そのラマンスペクトルはI型コラーゲンのものと非常に一致している。PCAが図3Dで示された領域から得られた19,332(108x179ピクセル)個のラマンスペクトルについて行われ、心筋細胞と線維性組織のそれぞれの特徴的なラマンバンドが得られた。第2主成分スコアイメージ(図3F)は、心筋細胞とそれを取り巻くコラーゲンをはっきりと映し出し、それは連続するヘマトキシリンエオジン染色のイメージ(図3C)とよく合致していた。第2主成分スペクトルにおける正のバンドは、還元型b及びc型シトクロム(751, 1130, 及び 1582 cm^{-1})及び脂質(2854 cm^{-1} , CH_2 伸縮モード)に関連するものである。一方負のバンドはI型コラーゲン(857, 1250, 1687, 及び2945 cm^{-1})の存在に関連性のあるものである。

[0042] 凍結融解試料の結果に基づき、その方法を生きた心臓サンプルに適応した。心筋梗塞を作成したラットから取り出した心臓を輪切りにし、肉眼的に心筋梗塞部位を同定、その部位を含めて、1-2mmの厚さに切り試料を作成した。顕微鏡ステージ上の石英基盤に試料を載せ、白色光イメージを見ながら焦点を合わせた後、ラマンイメージデータを取得した。取得した9,000(60x150ピクセル)個のラマンスペクトルにおいてPCAを行った。得られた第2主成分スペクトル(図4A及び図4B)に対する個々のラマンスペクトルの主成分スコアを画像化することで、心筋細胞とコラーゲン分子のラマンイメージングを行うことに成功した。凍結融解試料(図3F)と生きたままの試料(図4B)から得られた第2主成分は良く合致していた。

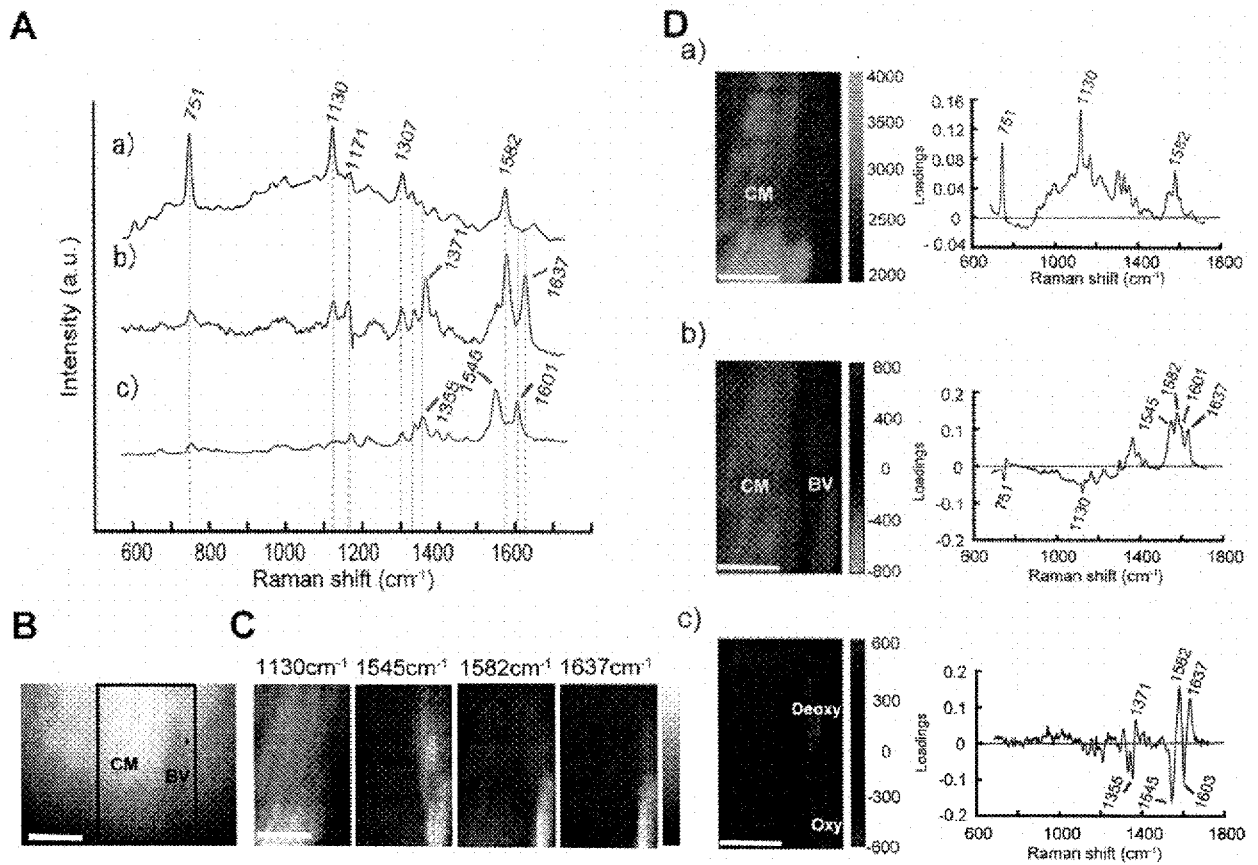
請求の範囲

- [1] 以下の工程(1)～(3)：
- (1)心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料に励起光を照射する工程；
- (2)該試料からのラマン散乱光を検出する工程；
- (3)該検出されたラマン散乱光を、心筋細胞と赤血球及び／又はコラーゲンに特徴的なラマン散乱スペクトルとを指標として解析し、画像化する工程；
- を含む、心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料をイメージングする方法。
- [2] ラマン散乱光検出手段により検出された、心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料からのラマン散乱光を、心筋細胞と赤血球及び／又はコラーゲンに特徴的なラマン散乱スペクトルとを指標として解析し、画像処理する工程を含む、心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料をイメージングする方法。
- [3] 該試料が、虚血を起こした心臓又はその一部である、請求項1又は2に記載の方法。
- [4] 心筋細胞に特徴的なラマン散乱スペクトルが、シトクロムに起因するラマン散乱スペクトルである、請求項1～3のいずれかに記載の方法。
- [5] 赤血球に特徴的なラマン散乱スペクトルが、ヘモグロビンに起因するラマン散乱スペクトルである、請求項1～3のいずれかに記載の方法。
- [6] ヘモグロビンに起因するラマン散乱スペクトルが、酸素化型ヘモグロビン及び／又は脱酸素化型ヘモグロビンに起因するラマン散乱スペクトルである、請求項4に記載の方法。
- [7] 励起光が、532nmの波長を有する、請求項1に記載の方法。
- [8] (A)心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む領域を含む試料に励起光を照射する手段、(B)前記試料からのラマン散乱光を検出する手段、(C)該検出したラマン散乱光を心筋細胞と赤血球及び／又はコラーゲンに特徴的なラマン散乱スペクトルを指標として画像処理する手段、を備える心筋組織と血管及び／又はコラーゲンリッチ領域とを含む試料をイメージングするためのイメージング装置。

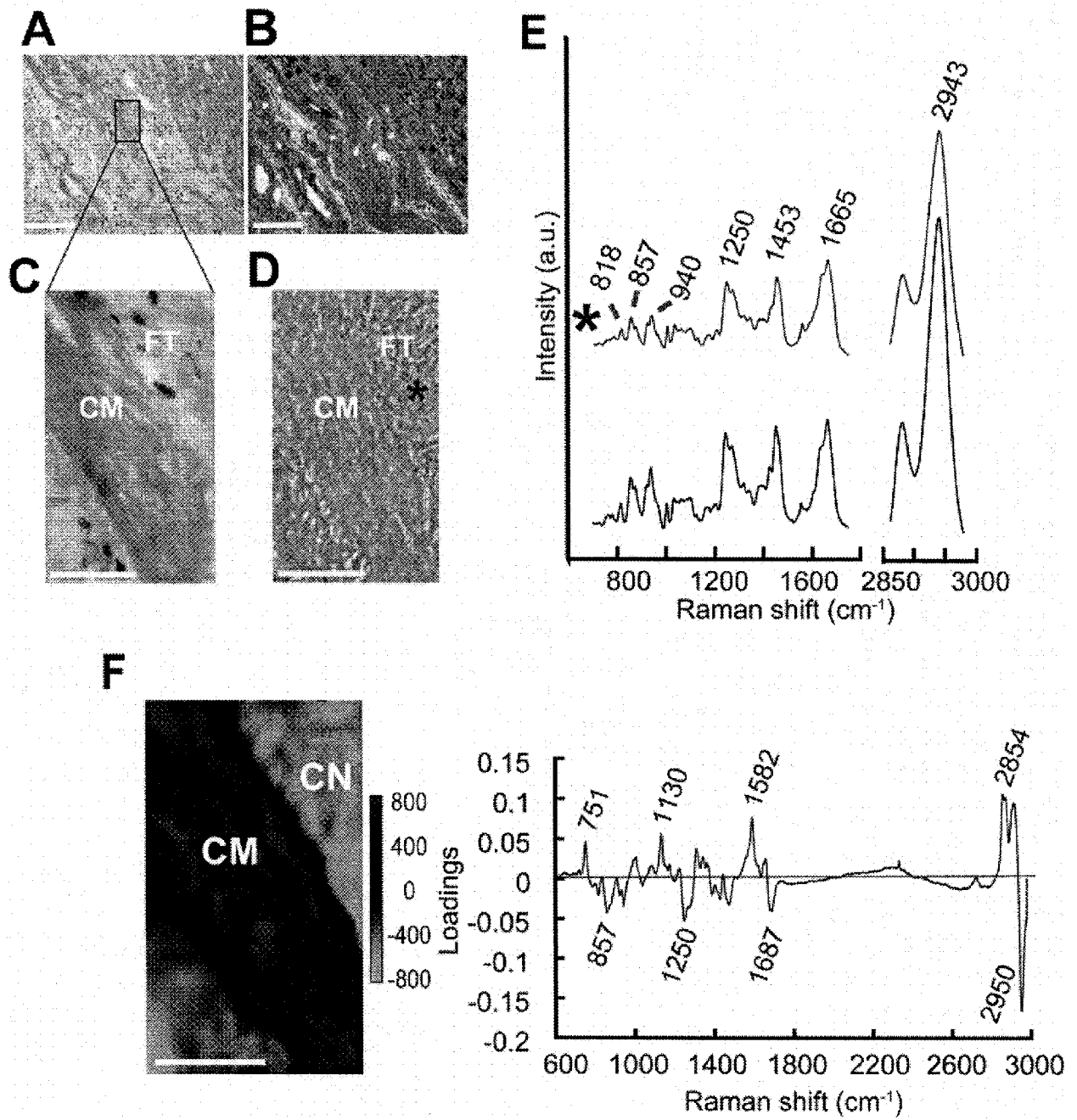
[図1]



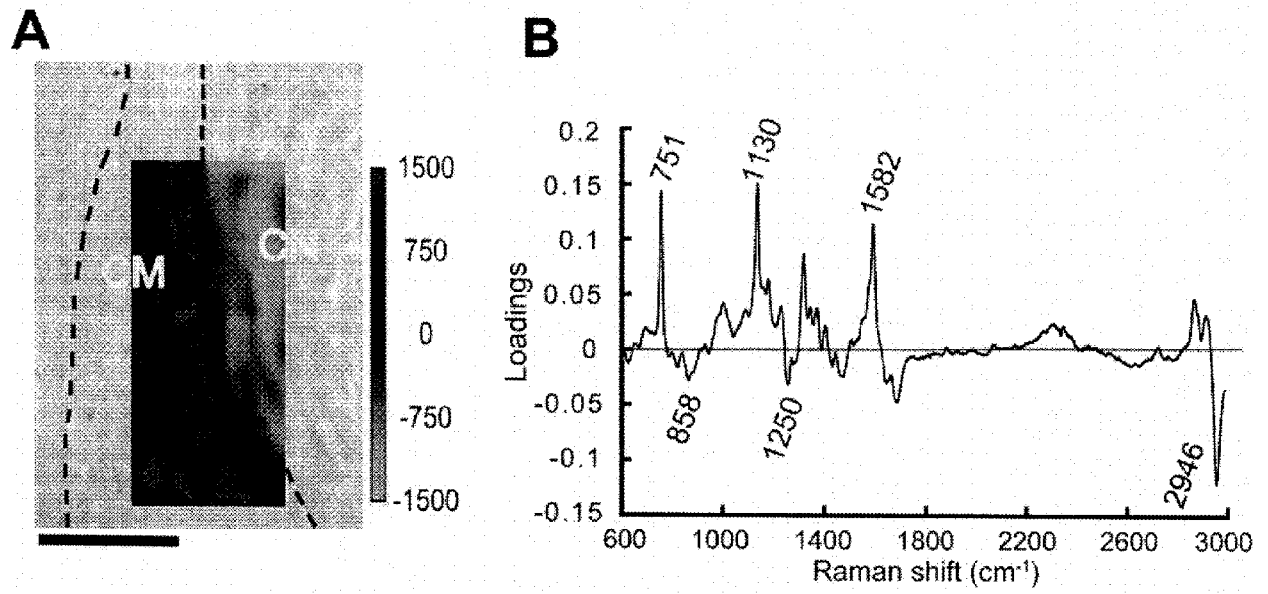
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/054930

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61B10/00(2006.01) i, G01N21/65(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61B10/00, G01N21/65

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2005-522293 A (Massachusetts Institute of Technology), 28 July, 2005 (28.07.05), Full text; all drawings & US 2003/0191398 A1 & US 2004/0073120 A1 & EP 1495309 A & WO 2003/087793 A1	8
X	Kathleen M.Gough, Fourier transform infrared evaluation of microscopic scarring in the cardiomyopathic heart:Effect of chronic AT1 suppression, Analytical Biochemistry, 2003, Vol.316 No.2, P.232-242	8

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 01 April, 2009 (01.04.09)	Date of mailing of the international search report 14 April, 2009 (14.04.09)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/054930

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-525158 A (Hyper-med, Inc.), 17 July, 2008 (17.07.08), Full text; all drawings & US 2007/0024946 A1 & EP 1835845 A & WO 2006/086085 A2 & CA 2592691 A & CN 101237817 A	8
A	JP 6-505183 A (Massachusetts Institute of Technology), 16 June, 1994 (16.06.94), Full text; all drawings & US 5110327 A & WO 1992/015008 A1 & EP 573535 A	8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/054930

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.: 1-7

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

It pertain to methods for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy and for diagnosis of the same and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under
(Continued to extra sheet)

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:

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

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/054930

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

the provisions of Article 17(2) (a) (i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61B10/00(2006.01)i, G01N21/65(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61B10/00, G01N21/65

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JMEDPlus(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2005-522293 A (マサチユセツツ・インスチチュート・オブ・テクノロジー) 2005.07.28, 全文, 全図 & US 2003/0191398 A1 & US 2004/0073120 A1 & EP 1495309 A & WO 2003/087793 A1	8
X	Kathleen M.Gough, Fourier transform infrared evaluation of microscopic scarring in the cardiomyopathic heart:Effect of chronic AT1 suppression, Analytical Biochemistry, 2003, Vol.316 No.2, P.232-242	8

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.04.2009

国際調査報告の発送日

14.04.2009

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮川 哲伸

電話番号 03-3581-1101 内線 3292

2Q

9208

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2008-525158 A (ハイパームド・インコーポレーテッド) 2008.07.17, 全文, 全図 & US 2007/0024946 A1 & EP 1835845 A & WO 2006/086085 A2 & CA 2592691 A & CN 101237817 A	8
A	JP 6-505183 A (マサチューセツツ・インスチテュート・オブ・テクノ ロジー) 1994.06.16, 全文, 全図 & US 5110327 A & WO 1992/015008 A1 & EP 573535 A	8

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 1-7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法及び人体又は動物の体の処置方法及び人体の又は動物の体の診断方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規則により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。