(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2017 年 1 月 26 日 (26.01.2017)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2017/012555 A1

(51) 国际专利分类号:
A61B 5/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/090755

(22) 国际申请日: 2016 年 7 月 20 日 (20.07.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
62/194,462 2015 年 7 月 20 日 (20.07.2015) US

(72) 发明人; 及
(71) 申请人: **徐敏 (XU, Min)** [CN/CN]; 中国浙江省温州市鹿城区鹿城路 157 弄 2 号 304 室, Zhejiang 325000 (CN)。

(74) 代理人: **温州金瓯专利事务所（普通合伙） (WENZHOU JINOU PATENT LAW OFFICE (GENERAL PARTNERSHIP))**; 中国浙江省温州市鹿城区车站大道华盟商务广场 1110-1111 室, Zhejiang 325000 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: PHOTON STRUCTURE AND CHEMOMETRICS PATHOLOGIC SYSTEM

(54) 发明名称 : 光子结构和化学计量学病理系统

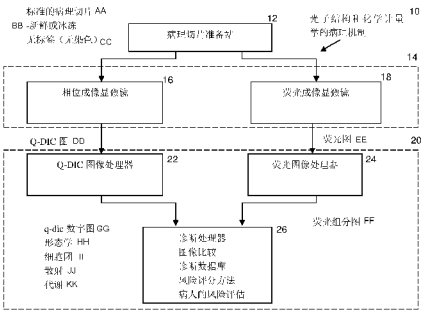


图 1

10 PHOTON STRUCTURE AND CHEMOMETRICS PATHOLOGIC MECHANISM
12 PATHOLOGICAL SECTION PREPARATION STATION
16 PHASE IMAGING MICROSCOPY
18 FLUORESCENCE IMAGING MICROSCOPE
22 Q-DIC IMAGE PROCESSOR
24 FLUORESCENCE IMAGE PROCESSOR
26 DIAGNOSIS PROCESSOR
IMAGE COMPARISION
DIAGNOSIS DATABASE
RISK SCORING METHOD
RISK ASSESSMENT FOR PATIENTS
AA STANDARD PATHOLOGICAL SECTION
BB FRESH OR FROZEN
CC UNLABELED (UNDYED)
DD Q-DIC MAP
EE FLUORESCENCE IMAGE
FF MAP OF FLUORESCENCE COMPONENT
GG Q-DIC DATA MAP
HH MORPHOLOGY
II CELL MASS
JJ SCATTERING
KK METABOLISM

(57) **Abstract**: Disclosed is a photon structure and a chemometrics pathologic system (10), wherein a fresh or frozen or standard pathological tissue section which is undyed or treated with other labeling techniques is used to realize the detection, diagnosis, monitoring and prognosis of cancers and precancerous lesions or general lesions. A phase imaging microscopy (16) and a fluorescence imaging microscope (18) can be used to obtain a differential phase contrast (Q-DIC) image and a fluorescence image for an unlabeled tissue section. An analysis is conducted on the Q-DIC image, a two-dimensional Q-DIC data map is generated, and a digital atlas comprising the morphology, cell mass distribution, scattering properties, etc., is obtained. The fluorescence image is analyzed, so that a map of the fluorescence intensity and the absolute concentration of the autofluorescence component of the tissue is generated. The diagnosis and prognosis of cancers and precancerous lesions or general lesions are conducted in combination with the contrastive analysis of the Q-DIC data map and the content map of the fluorescence component. The system (10), which is aimed at a plurality of cancers and tissues, can realize noninvasive and unlabeled detection, diagnosis, monitoring and prognosis of cancerous lesions or general lesions.

(57) 摘要:

[见续页]

WO 2017/012555 A1

一种光子结构和化学计量学病理系统（10），其采用未染色或做其他标记技术处理过的新鲜或冷冻或标准组织病理切片，来实现癌症和癌前病变或一般病变的检测、诊断、监测和预后。未标记的组织切片可以使用相位成像显微镜（16）及荧光成像显微镜（18）来获得差分相位对比(Q-DIC)图像和荧光图像。对 Q-DIC 图像进行分析，可以生成二维 Q-DIC 数据图，得到包括形态学、细胞质量分布，散射特性等的数字图谱。对荧光图像进行分析，以产生荧光强度及组织自发荧光组分绝对浓度的地图。结合 Q-DIC 数据图和荧光组分含量图的对比分析进行癌症和癌前病变或一般病变的诊断和预后。该系统（10）可针对多种癌症和组织实现癌症病变或一般病变的无创无标记检测、诊断、监测和预后。

光子结构和化学计量学病理系统

技术领域

本发明涉及人类癌症诊断系统，更具体而言，涉及光子结构和化学计量学病理系统利用未标记的组织切片用于癌症和癌前检测、诊断、监控和预后。

背景

对于癌症和癌前病变的检测、诊断、监测和预后而言有广泛的传统的方法。涉及组织分析的技术一般利用染色或以其他方式标记的组织切片，以增加影像区域的对比度。准备分析的部分，通常需要耗时的处理，包括应用染色或其他标记技术，掩盖了样品的某些方面。目前，没有有效的癌症检测和诊断技术是使用新鲜或冷冻的组织切片，而无需事先处理的，如染色或其他标记技术。这种延迟和复杂的检测和诊断过程，使过程更加昂贵的同时也限制病理实验室处理更多的样品和产生更多的收入。

目前的病理学实践中使用传统的光学显微镜有几个关键的限制，包括 a)准备样品需要耗时和昂贵的多步组织处理；b)横向分辨率约为 0.5 微米或更糟，无法揭示试样的轴向信息；c)基于人工专家检查的组织结构和形态变化的诊断主要是主观的，并受到观察者自身和不同观察者的变化的影响。该 PSCP 系统解决上述局限性的同时实现成本效益和客观的手段，可以更准确进行快速的癌症诊断和预后。

前列腺癌的过度治疗的问题一直受到社会广泛关注并显示诊断时需要更好的预测。这个挑战从癌症的有限采样开始，因此，基于常规显微镜观察的诊断针活检遇到困难。正在作出不断的努力来寻找基因标志并评估来满足这种需要。该 PSCP 系统利用重配结构和分子特征状态进行风险评分，为确定治疗的需要提供了较好的预后。诊断和治疗只有那些将成为临床上显着的癌症，将大大减少治疗癌症的成本和经济负担。

因此，对于改进的癌症和癌前病变的检测、诊断、监测和预后技术有一个持续的需要。更具体地说，对于利用新鲜或冷冻的组织切片，且在分析组织切片之前不需要耗时的先验染色或其他标记技术的生物组织检测诊断技术有一个持续的需要。

发明内容

本发明提供一种从生物组织利用光相互作用定量其微观结构的方法，通过利用相位成像显微镜对组织切片成像，获得 Q-DIC 图像；再对 Q-DIC 图像进行分析，获得二维 Q-DIC 定量图谱，从而利用得到的准确的定量图谱，可以用于人体各种身体机能的检测包括但不限于病理、癌症的检测、诊断和预后，具有快速、准确的优点。

本发明同时提供一种利用生物组织自发荧光定量其分子含量的方法，通过利用荧光成像显微镜对组织切片成像，获得荧光显微图像；再对荧光显微图像依据如下方程式分解计算得到荧光分子含量数据图；

方程式为：$$\begin{pmatrix} I_1 \\ I_2 \\ \vdots \\ I_m \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} w_{11} & w_{12} & \cdots & w_{1n} \\ w_{21} & w_{22} & \cdots & w_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ w_{m1} & w_{m2} & \cdots & w_{mn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_1 \\ C_2 \\ \vdots \\ C_m \end{pmatrix} \quad (6)$$

（式中，式中，I 为 荧光强度 ，w 为权重因子，C 为荧光物质含量）

通过本方法可以获得荧光分子绝对含量及其分布图，可以快速、准确地用于人体各种身体机能检测包括但不限于病理、癌症的检测、诊断和预后。

本发明还提供一个用于癌症检测、诊断、监测和/或预后的光子结构和化学计量学病理系统，利用没有事先染色或其它标记技术的标准病理学切片。在某些情况下，用相位和荧光成像显微镜可以对相同的未标记的组织部分成像，来获得差分相位对比（Q-DIC）图像和荧光图像。对 Q-DIC 图像进行分析，生成二维 Q-DIC 定量图谱，如形态、细胞质量和散射的数据图。对荧光图像进行分析，产生了荧光强度、荧光分子含量和代谢数据图。将 Q-DIC 和荧光的数字数据图组合，然后单独进行分析和比较，来完成癌症的诊断和预后。该系统对于很多癌症是有用的，包括固体和纤维肿瘤，特别是非常适合用于前列腺癌、肺癌、乳腺癌等的检测、诊断、监测或预后。

Q-DIC 数字图和荧光的数字图像可以是配准的，例如（但不一定）在逐个象素配准，以便于图像比较。配准的数字图像在显示时可能会呈比较并排和覆盖的格式。计算分析也可以描绘出单独和相对数据图。对现有的 Q-DIC 定量图谱图和荧光定量图谱相关的已知病理学的诊断数据库进行分析，来产生一个风险评估评分方法并应用于病人 Q-DIC 及荧光定量图谱来获得癌症的检测、诊断、监测或预后。

这种方法具有的优势是使用新鲜或冷冻的组织切片，不必被染色或其他标记进行分析并在几分钟内产生诊断和预后的结果。使用传统的相位及荧光成像显微镜对标准病理切片进行成像可以获得适当的 Q-DIC 图像和荧光图。一个包含的图像分析和风险评分方法的软件应用程序可以安装和运行在任何合适的计算机，如台式机、笔记本电脑、服务器或其他计算设备。在许多情况下，诊断系统可以成本有效地安装在一个医疗办公室，实验室或医院，在一个病人的预约时间内提供癌症的诊断和预后结果。这种方法还通过去除一个病理学家的主观分析元素产生了更为客观的癌症诊断的方法。

简要说明图纸

图 1 是一个光子结构和化学计量学病理系统的框图。

图 2 是一种进行癌症诊断和预后的方法的逻辑图，使用光子结构和化学计量学病理体系和标准，处理未标记的病理组织切片。

图 3 显示方程（1）。

图 4 显示方程（2）。

图 5 显示方程（3）。

图 6 显示方程（4）。

图 7 显示方程（5）。

图 8 显示第一组图像。

图 9 显示第一个表，比较测量的图像参数与理论图像参数。

图 10 显示方程（6）。

图 11 显示了第二组正常与癌症比较的图像。

图 12 显示第二个表，比较正常的图像参数和癌图像参数。

图 13 显示第三个表比较正常和癌组织的图像参数。

图 14 显示比较“纯”成分荧光及提取的组织荧光组件光谱。

图 15 显示不同肺组织的绝对荧光强度存在显著差异图。

图 16 显示第四个表，比较正常的图像参数的和癌图像参数。

图 17 为正常和肺癌的分辨浓度图。

图 18 显示正常与肺癌症比较的荧光强度百分比图。

图 19 为正常与癌症的 ROC 曲线图。

实施方式的详细描述

一个实现本发明的实施例可以是一个光子结构和化学计量学病理系统（PSCP），采用新鲜或冷冻的人体标准病理组织切片无需经过染色或其他标记技术，对癌症检测、系统诊断、监测和/或预后。附加的图片加上附带的切片演示，是本披露的一部分，总结和参考下面。

该 PSCP 系统是一种新型的具有成本效益的，无标记，定量，实时组织结构和分子病理学的工具，用于癌症诊断和预后。目前的组织病理学，主要是利用正常的腺组织结构的损失程度的癌症诊断，是主观的，并受到观察者自身和观察者间的变化的影响，并存在区分恶性肿瘤侵袭性的困难。PSCP 利用非常规线索包括组织结构和细胞代谢的改变来实现肿瘤分级和侵略性的客观危险分层，可能证明是一个可靠的辅助或一个独立的系统用于快速诊断和预后评估。

该 PSCP 系统是一种新型的具有成本效益的，无标记，定量，实时组织结构和分子病理学的工具，用于癌症诊断和预后。该系统集成了定量相位成像和组织自发荧光成像，同时量化未标记的病理组织切片在细胞和亚细胞水平的形态，质量分布，散射特性，和代谢特征。配准的组织形态，质量分布，散射特性及癌症组织内在荧光分子分布及代谢的二维（2D）的显微图，与组织病理学和患者的预后密切相关。根据这些相关性，基于支持向量机（SVM）等的风险分层算法确定患者的风险评分被用来分级癌症和预测患者的预后。该 PSCP 系统集成了空间分辨的组织结构和分子的成像用于对癌症诊断和预后，便于第一时间克服所面临的常规病理学的主要挑战包括：观察者自身和观察者间的变化、基于主要组织形态的主观诊断的局限性、及鉴别恶性肿瘤侵袭性的困难。此外，PSCP 是无标记的，可以直接分析新鲜或冷冻的未染色的组织来实现实时诊断。

图 1 是光子结构和化学计量学病理（PSCP）系统的框图 10。该系统是由一个标准的病理切片制备站 12，一个具有荧光成像能力的标准相位成像显微镜 14，和一个专门配置的常规计算机 20 来实现功能的。切片准备站 12 是用来准备一个标准的病理切片，这可能是由一个新鲜或冷冻的组织标本制备的。该切片通常厚约 4 至 5 微米，不需要染色或其他标记，从而避免了通常耗时的切片准备步骤，如切片染色。

同一组织切片可以被用于创建 Q-DIC 和荧光图像。此功能可应用于传统的相位成像显微镜，传统相位成像显微镜在许多医疗办公室，实验室和医院中使用。Q-DIC 和荧光图像可输入到计算机系统 20，这可能是适用于任何通用计算机配置的软件在图像处理和诊断方法方面的创新。更具体地说，计算机系统 20 包括 Q-DIC 图像处理器 22，根据 Q-DIC 成像的基础计算各种二维 Q-DIC 定量图谱，如形态学、细胞质量和散射特性的定量图谱。计算机系统 20 还包括一个荧光图像处理器 24，它根据荧光图像来计算荧光分子含量和代谢数字数据图。Q-DIC，荧光及其衍生的数字数据图接下来会传递给诊断处理器 26 用于诊断和预后分析。

Q-DIC 和荧光数字图可以在像素的基础上配准或调整大小，提供类似大小的图进行比较。定量图谱也可以按像素放置或按叠加模式放置用于视觉分析，并进行单独图像和比较计算分析。诊断处理器 26 还包括一个风险评估评分的方法，还包括已知病人的 Q-DIC 和荧光组分数据图先验诊断数据库来创建风险评估方法。无论数据库本身是否包含在一个具体的实施例中，风险评估评分方法应用到病人 Q-DIC 和荧光组分数据图来获得从一个特定的组织制备样本的相关的病人的诊断和预后结果。

在一个说明性实施例中，病理学切片准备站 12 可能是适合的任何类型的切片准备站，在许多情况下切片从冷藏或另一个位置到达分析的位置。Q-DIC 显微镜一般可倒置、相差、微分干涉相衬，荧光显微镜，可聚焦驱动。

图 2 是一个进行癌症诊断和预后的方法的逻辑图 30。使用光子结构和化学计量学病理体系和标准的未标记的病理组织切片。32 是一个使用从病人获得的组织样本来制备的标准的病理切片。例如，一个新鲜的或冷冻的，未标记的组织切片是可用的。一个相位差显微镜被用来获取一个组织切片的 Q-DIC 图像 34。荧光显微镜被用来获得一个组织切片的自发荧光图像 36。Q-DIC 图像和荧光图像通常采用同一相位及荧光成像显微镜在不同设置及荧光滤光片下获得。

38，对 Q-DIC 的图像进行处理来获得各种 Q-DIC 定量图谱，如形态，细胞质量和散射特性的定量图谱。也在 38，荧光图像被处理来获得荧光强度、自发荧光分子含量和代谢数字数据图。40，对于已知病理受试者的一个 Q-DIC 数据图和荧光数据图像的历史数据库分析确定了数据图与病理诊断和预后的相关性。这些相关性通常可形成一个风险评分方法，允许在个体和比较数据图特征的基础上鉴别具高风险性的癌症。风险评分是基于包括一系列的预测特性，组合的特点，和对历史数据库进行分析的基础上的总体概况，并通过使用进行系统的经验改进。风险评分方法的有效性随着数据库的大小和分析细节的增加有望得到改善。因此，它将有利于获得一个大的初始数据集，并作为系统开发的经验积累不断扩大数据库。风险评分的方法也适用于评估不同类型的癌症，不同类型的组织，和通过使用和审核系统和相关的数据库发现是有效的其他变化。

在 42，风险评分方法被用于从一个特定的组织切片中获得的数据，以获得特定的诊断和预后结果。由于该系统使用标准的相位及荧光成像显微镜对标准的病理切片进行成像并在通用计算机上进行软件配置与分析，利用广泛可用的设备使一个病人特定的诊断和预后的结果在几分钟内可以得到，在许多情况下，组织

样本可实时或近实时得到。

该PSCP系统在切片没有进行任何事先的组织染色或其他标签的处理的情况下同时量化在细胞和亚细胞水平上组织形态、分布、散射特性、自发荧光分子含量及代谢的定量相位成像和组织荧光成像。配准的二维显微组织结构和肿瘤组织切片的分子图与组织病理学和患者的预后有关。基于这些相关性，一个风险分层算法来确定一个病人的风险评分是用来分级癌症和预测患者预后的。从而 PSCP 系统首次整合空间分辨的组织结构和分子成像技术用于肿瘤诊断和预后。

该PSCP系统采用光散射检测生物组织的微环境和基于组织自发荧光检测天然荧光分子和细胞代谢的变化。光散射已被证明是可敏感发现核和细胞的改变，小到几纳米，并已成功地应用于检测常规方法检测不到的早期癌。组织的固有荧光也被证明是一个有效的组织生理状态的探针，可反映它的氧化应激，代谢，细胞生长和细胞的存活或死亡。

该PSCP的方法客观地提取直接从完整组织的光的相互作用下的固有的组织三维结构和分子特性的二维图像，避免主观的人类解释和染色样品的显微图像的后图像模式分析（在数字病理学）的影响。与自体荧光光谱相比，该 PSCP 系统提供天然荧光分子的绝对浓度的二维显微化学计量图，得到空间分辨分析的分子活动，显着提高对比度。空间共分辨的组织结构和分子活性，结合光散射对前者的高灵敏度和组织天然荧光对后者的高灵敏度，可能会得到更准确的癌症诊断和预后。这允许使用 PSCP 方法来克服所面临的传统的病理学主要挑战包括观察者自身和观察者间变化引入的主观诊断非确定性和传统方法鉴别恶性肿瘤侵袭性的内在困难。此外，该 PSCP 方法不仅可以应用于标准染色福尔马林固定石蜡包埋的组织切片还可以应用于之前没有任何组织处理的新鲜或冰冻组织切片。它可以实现实时诊断和可能适于体内应用。PSCP 提供了一个可靠的辅助或快速诊断和预后评估的一个独立的系统。

据估计 2012 年，在所有网站上公布的超过 160 万名男性和女性被诊断为癌症，超过 50 万的男性和女性死于癌症。前列腺癌（前列腺癌）是男性最常见的癌症。诊断前列腺肿瘤的预后目前依赖于活检组织病理学评价与临床结合，如临床分期和前列腺特异性抗原（PSA）测定治疗。前列腺癌是一个具有发达的癌症分级系统的癌症。格里森评分（GS），今天前列腺癌组织分级最广泛使用的方法，是前列腺癌最重要的预后因素。这是一个病人的具体因前列腺癌死亡的风险的一个决定因素，极大地影响了有关治疗方案的决定。

格里森评分系统是根据正常的腺组织结构的损失程度（即形状，大小和分化的腺体）。这种由癌症引起的正常的腺体结构损失的主观微观测定由格里森级代表（GG），范围内的数从 1 到 5，5 为可能最差等级。格里森评分（GS）是前列腺癌组织中的最主要及次主要的两个 GG 之和。前列腺癌患者大部分是诊断 GS 为 6 和 7 的肿瘤。这些肿瘤可以采取两种不同的病程–惰性或高度侵袭性，后者如不治疗会导致死亡。临床医生和患者需要根据风险选择治疗方法，如外科手术，放射治疗或冷冻治疗，其伴随着病态和妥协的生活质量，或警惕等待而冒着生命危险延迟治疗。然而，格里森评分和它的得分在很大程度上是主观。这里存在观察者自身及观察者间的变化和非确定性，特别是当活检基于细微的针芯组

织样本。客观区分前列腺癌，尤其是 GS6 和 7 癌症，一个预后异质性肿瘤，为惰性或侵袭性的群体是非常需要的。现已被证明，其他因素，包括格里森 4 级和 5 级的量，核结构的改变，和周期性增殖基因与患者的整体预后有关。前列腺肿瘤的异质性也导致基于有限的样本使用格里森分级来评估病人预后进一步复杂化，。

基于格里森评分特别是针对大体积或多灶性肿瘤预测生物学行为，由于依赖于肿瘤体积，有自己固有的困难。一种可以利用非常规线索的系统，如组织微环境和生理状态，可以弥补格里森分数在个别肿瘤的巨大的异质性，并成为一个更可靠的辅助甚至是一个独立的诊断和预后评估的系统。

PSCP 系统可解决传病理诊断的挑战。PSCP 首次整合组织结构和分子的定量成像，同时量化在癌变的细胞和亚细胞水平的重要标志，包括组织微环境和细胞代谢的改变。组织微环境变化影响组织的折射率的空间分布，从而导致其光散射特性的变化。PSCP 采用光散射测定微环境的在亚波长量级的改变。光散射法已被证明对微结构和组织成分的高度敏感并已被用于检测和评估的其他方法检测不到的早期癌的形态学亚波长变化和生化变化。

定量相位成像已成为一个强大的光散射技术允许结构和运动的纳米尺度的测量以非接触式、非侵入性的方式产生一个空间分辨样品散射特性图。癌变的另一个重要标志是细胞代谢的改变。癌细胞的代谢通常是由氧化作用转移的磷酸化的有氧糖酵解作为细胞内 ATP 的主要生产者。PSCP 基于生物组织自体荧光揭示天然荧光分子和细胞代谢的变化。自体荧光已被证明是一种有效的组织生理状态的探针。自动荧光监测细胞代谢已成功地应用于区分正常、发育不良和肿瘤，在体内和体外具有高的敏感性和特异性。

PSCP 中空间分辨的组织结构和分子成像的紧密结合与共配准提供显着的优势，超过现有的方法，如数字病理或自体荧光光谱。PSCP 直接从完整组织的光的相互作用下客观地提取固有的组织亚波长结构和分子特性，产生配准的二维组织形态、质量分布、散射特性和生物组织的代谢的显微图。PSCP 还提供了天然荧光团的绝对浓度的二维显微化学计量学图，使空间分辨分析细胞代谢，显著提高对比度。试验结果表明，组织结构和分子成像是互补的，核的光学路径长度（OPL）和散射特性与肿瘤侵袭性密切相关。荧光的浓度和它们比的浓度，作为细胞代谢的标志物，与肿瘤分级密切相关。在 PSCP 中光散射的组织结构高灵敏度优势和配准的本地荧光组织生理状态（特别是细胞代谢）的高灵敏度优势组合得到更精确的癌症诊断和预后。

此外，PSCP 是无标记和实现成本有效的、客观的实时诊断与预后。在传统的方法中，标准的组织病理学检查肿瘤活检需要多个组织处理步骤。它是费力和费时的，因为每个组织样品的冰冻切片的制备需要 20–45 分钟和常规永久性/固定的组织切片通常需要 12-18 小时处理还有额外的切片和染色步骤。传统的光学显微镜专家手动评估的时间范围可能为 5 分钟到 1 小时，这取决于每个试样部分的切片的数量。如果有诊断困难，可能需要免疫组化，它需要额外的 24 小时进行，并需要 5 分钟到 1 小时的专家手动评估进一步评估。专家人工评估的成本可以根据专业合格的病理学家工资或专业解释保险费。相比之下，PSCP 不仅可以

应用于标准的染色甲醛固定的石蜡包埋组织切片，也可以应用于新鲜或冷冻的组织标本，因此消除了任何现有组织处理的需要。PSCP 的成像速度主要受需要记录组织天然荧光图像曝光时间的限制，由于使用当前最通用计算机系统，数据处理的时间是可忽略的。

一旦 PSCP 系统进行了优化和全自动化,一个完整的 PSCP 可以在 2 到 3 分钟内完成超过 15mm x 15 mm 面积标准的切片的扫描（物镜 20x）。使用一个更敏感的数码相机可以使时间进一步减少。一旦系统购买和安装，比较标准的病理系统来说 PSCP 系统的运行成本最小。一个基于机器的系统的一个显着的优点是，它不会受到每天的变化，不会受到人为错误的影响而遗漏切片上的疑点。PSCP 的一个有利的用途是能够自动筛查切片并突出显示可疑区域和案例供专家进一步评估来减轻病理学家的负担。PSCP 的另一个重要的优势在于预测。

PSCP 第一次集成定量完整的组织标本的空间分辨的组织结构和分子成像用于客观癌症的诊断和预后，同时量化与癌变紧密相关的细胞和亚细胞水平的重要标志。不同组织成分的折射率不同，当光穿过时，会呈现不同程度的相位延迟。在 PSCP 中的定量相位图可以获得纳米轴光程差，揭示由传统的病理学检测不到的在组织结构上的微小改变。组织结构进行量化的细节超出形态学范围。相位图可同时给出细胞的质量分布。组织的散射特性，如约化散射系数和光散射各向异性因子可通过散射相位定理计算，量化组织局部微环境特征。例如，一个小的“g”表明，散射组织的尺寸是小的，局部区域是更不均匀的（如细胞核破碎），而一个大的“g”意味着散射组织的尺度是大的，并且局部区域往往是更均匀的。核的 OPL 是细胞分裂率的标志。核的 OPL 和 g 被发现与癌的侵袭性密切相关。此外，配准的化学计量学成像获得细胞代谢的空间分辨分析，从而显著提高对比度。由于组织结构和分子成像是相辅相成的，相比以前的技术同时测量两者能使癌症的诊断和预后达到更高的精度。

化学计量学组织荧光成像提供了天然荧光绝对浓度的配准二维显微分子图。主要的氧化还原反应（氧化还原反应）通过 NAD +还原转换为 NADH 和黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）氧化为 FADH2 生成能量 ATP，这一过程称为氧化磷酸化。癌细胞的代谢通常是由氧化磷酸化转化为有氧糖酵解作为细胞内 ATP 的主要生产者。这种转变一直被称为“Warburg 效应”和 NADH 的净增加的结果。色氨酸和 NADH 浓度的增加伴随着细胞从非转移性/低转移到转移状态。这些分子包括色氨酸，NADH 和 FAD 是自动荧光，因此组织的自发荧光已被广泛研究用于诊断目的。所面临的挑战包括：1）组织自体荧光弱，2）组织形态和血红蛋白吸收内的散装组织对自动荧光的显着修改。在 PSCP，RGB 数码相机是用来记录切片在紫外和蓝色波段激发的薄片组织（例如，约 4-5 微米厚）的自体荧光图像。荧光团的绝对浓度图是由 RGB 通道和测量系统标定的非负矩阵分解（NMF）计算。通过避免在局域体积平均和提供空间分辨的分子浓度，在不同区域之间的组织对比度显著增强。PSCP 可以解决传统的组织自然荧光光谱的缺点，同时提供一个简单的，无标记，对组织切片的化学计量学映射和代谢实时评估的方法。

基于支持向量机等的风险评估算法利用定量组织结构和分子成像实现了癌症的诊断和预后的高精度。组织结构和分子的成像相互补充。试验结果表明，核

OPL 和 g 的图与前列腺癌的生化复发密切相关，而光代谢参数与癌症等级的关系更密切。配准的结构和分子图也在数据分析方面开辟了新的途径，来为患者实现更准确的风险评分。例如，对自然荧光团的荧光强度的计算可以通过排除非核区的相位图来确定。更重要的是，配准图能显示切片上的每一个个体细胞的形态、质量分布、散射特性和代谢的表征。对组织的平均特征的丰富信息，单细胞水平的统计和空间分布特征作为一个先进的支持向量机（SVM）输入状态来发展客观和准确的癌症风险评分。这些创新使 PSCP 的性能能使已经非常很有希望的初步结果有望进一步提高。

示例PSCP显微成像系统可以实现一个倒置的落射荧光微分干涉对比显微镜（DIC）（Axiovert 40cfl，蔡司）。对于定量相位成像，光源是一个 35W 卤素灯，由具有波长可选择的窄带滤波器在 50nm 的步长下滤波为 400nm 到 700nm 的光波和在一个单波长测量通常使用。凝汽器和物镜数值孔径（计划）分别是 0.2 和 0.5。免疫荧光检测，光源为 50W 汞弧灯。该微镜配备聚焦驱动（tofra，加利福尼亚）。DIC 图像是由一个低噪声 CCD 相机记录（infinity2-1r，lumenera），荧光图像由数码相机记录（Canon 5D Mark II）。电动台可用于扫描试样。在 MATLAB 中的自定义代码（MathWorks）可以用于自动化的全扫描和聚焦的标本系统，记录 DIC 和荧光图像，进行数据分析和最后的癌症的风险分层。

更具体地说，在一个实施例中的卤素灯是 35W 的，由具有波长可选择的窄带滤波器在 50nm 的步长下滤波为 400nm 到 700nm 的光波和在单一波长测量中（500nm）使用。凝汽器和物镜数值孔径（x40）分别为 0.2 和 0.5。免疫荧光检测，光源为 50W 汞弧灯。显微镜配备聚焦驱动（tofra，加利福尼亚）。DIC 图像是由一个低噪声 CCD 相机记录（infinity2-1r，lumenera）和荧光图像由数码相机记录（Canon 5D Mark II）。一个电动台是用来扫描的标本。在 MATLAB（MathWorks）中的自定义代码自动化系统整体扫描/聚焦标本，记录 DIC 和荧光图像，进行数据分析和最后的癌症的风险分层。

下面介绍一个具体的例子与理论发展。图 3 显示了方程（1）与 DIC 成像有关，其中$I(\rho)$是 DIC 图像，$k=2\pi n_0/\lambda$是探测光束的波数，n_0是背景的折射率，λ是真空中的光的波长，$\phi(\rho)=k\int_0^L dzm(\rho,z)$是通过薄切片的厚度 L 与 m 的相对折射率的介质的波传输在位置(ρ,z)的空间分辨的相位图，其中ρ和z分别是横向和轴向坐标。强度传输方程 TIE 已成功地应用于一个明视野显微镜定量相位成像。

方程（1）是与 DIC 显微镜定量相位成像有关。从式（1），对相位图做拉普拉斯变换可近似为图 4 显示的公式 2，这里I_0和I_1分别代表对象的聚焦和失焦的 DIC 图像，失焦的位置与最佳位置相差δz。ϕ是由拉普拉斯变换得到，$-\nabla_\perp^2\phi$是由正则化傅立叶变换得到的。光学路径长度（OPL）图的计算是由$OPL=\phi(\rho)\lambda/2\pi$得到的。从质量分布推导的空间分布的细胞团的相位和 OPL 图成正比。

组织散射的特征由散射相位关系得到。薄散装混浊介质的相位图像$\phi(\rho)$与该介质的散射系数μ_s，约化散射系数μ_s'，和各向异性因子 g（通常组织的 $0<g<1$）相关联。这些关系被称为散射相位定理方程（3），（4）和（5），如图 5，6

和 7 。

散射相定理是适用于一片均匀或非均匀介质。在后者的情况下，μ_s，μ_s'，g 的图使用空间平均的局部区域，而不是整个切片的相位图计算。用相位图的有限差分计算平方相位梯度图。在显微镜中的相位梯度的计算中，应用一个适当的校正修正显微镜中光衍射的影响。

在 PSCP 中的相位成像技术可以在一个单一的波长（例如，500nm）或多个波长进行。当相位成像测量在多个波长，波长依赖性散射特性可以被用来计算 μ_s' 的光谱斜率。从这个光谱斜率可以计算散射结构的分形维数。正常和癌组织之间的分形维数有一个显着的差异，利用光谱斜率和来自多个波长相位测量也可作为额外的支持向量机的输入参数。

参照图 8，在水中的一个单层的聚苯乙烯球悬浮液（大小为 $8.31\mu m$）和一个 20%的脂肪乳混悬液中的薄膜（厚度：$4\mu m$）（常用的组织模型）在玻璃载玻片上由 PSCP 显微成像系统的成像产生一组有限的注册图像 800。采取的每个样本一个对焦点和一个失焦（$\delta z = 1\mu m$）的 DIC 图像。图像 802 的第一列显示的光程图，溶于水的单层聚苯乙烯球悬浮液（大小：$8.31\mu m$）（顶部）和一个 20%的脂肪乳悬浮液的薄膜（厚度：$4\mu m$）（底部）。第二至第六列 804-812 显示 H&E 染色图像，一个案例（A）格里森 8 分（GS8）和 PSA 五年无复发（顶部）和案例（B）GS8 和 PSA 五年复发（底部）的聚焦 DIC 图像，*OPL* 图，约化散射系数图 μ_s' 和光散射各向异性因子 g 图。前列腺癌图像窗口大小是 $100\mu m \times 100\mu m$。染色和光学图像是同一样品的不同切片，因而未完全匹配。在各自的图中，核区与高 *OPL* 值，高 μ_s' 值，低 g 值相关。A 的 μ_s' 平均值为 $0.027\mu m^{-1}$ ，在核区的光学路径长度的平均值为 $0.85\mu m$ 和平均 g 为 *0.0914*，而 B 的相应值是分别为 $0.052\mu m^{-1}$，$1.50\mu m$ 和 0.779。这与总体趋势一致，更有侵略性的肿瘤观察到高的 μ_s' 值，高核 *OPL* 值和较小的核 g 值（见表 3）。

第一列 802 的图像显示了两样本计算的 *OPL* 图。应用散射相位定理可以分析每个单独的球体在相位图中球占据的区域的散射特性。例如，中央球产量的白色虚线所强调的区域，$\mu_s = 0.234\mu m^{-1}$，$\mu_s' = 0.0202\mu m^{-1}$，$g = 0.91$，面积 $61.0\mu m^2$，相应的散射和约化散射截面分别为 $118\mu m^2$ 和 $10.2\mu m^2$。对于截面中所包含的所有球的平均散射和约化散射截面分别为 $116\mu m^2$ 和 $9.8\mu m^2$。Mie 理论预测的这些值（$C_{sca} = 125\mu m^2$，$C_{sca}' = 9.5\mu m^2$，$g = 0.92$）与指定大小的聚苯乙烯球在探测波长 *550 nm* 的理论预测达到良好的一致。

参照表 900 如图 9 所示，20 %的脂肪乳悬浮液的整个截面的散射系数和约化散射系数要适当考虑在显微镜光衍射后计算。对于 20 %脂肪乳悬浮液也实现了测量和理论散射特性值的一致。表 900 显示了 20%脂肪乳混悬液和聚苯乙烯微球的散射特性的理论值与测量值之间的比较。

具体贡献组织天然的荧光包括：大多数蛋白质中的芳香族氨基酸残基（$\lambda_{ex} = 200-340nm$，$\lambda_{em} = 360-370,455nm$）；还原的吡啶核苷酸（NAD（P）H），是细胞代谢的辅助因子，主要在线粒体中发现的，但也存在于细胞质中

（$\lambda_{ex}=360nm$，$\lambda_{em}=460nm$）；和核黄素和黄素核苷酸（核黄素，黄素单核苷酸和二核苷酸），主要是结合到酶的辅酶黄素蛋白和集中在线粒体（$\lambda_{ex}=360,445-470nm$，$\lambda_{em}=440,520nm$）。内源性卟啉与年龄相关的脂褐素也被证明是细胞的自发荧光的来源。细胞外基质成分的胶原和弹性蛋白也有助于组织的天然荧光。

参考图 10 说明方程（6）式中，I 为 荧光强度 ，w 为权重因子，C 为荧光物质含量。组织本地的荧光强度的图像是采用数码彩色相机在紫外光激发下（例如用 DAPI /紫外线集中在 *365nm* 波长带宽 *12nm* 的荧光激发波长滤波器组）和蓝色光（用 40 纳米的带宽滤波器组与激发波长为 *480nm*）照射下记录的图像。每种颜色的图像分别由三个光谱集成荧光强度图的 R，G 和 B 通道。在一般情况下，测得的 RGB 通道图像I_i ，测得的 RGB 通道图像是由贡献的 n 种荧光物质的图C_j产生如方程（6），其中的权重为$w_{ij}\geq 0$ 。

对权重进行归一化为$\sum w_{ij}=1$，以确保总荧光强度图（总结所有渠道，从所有的激励）所产生第 j 个组分是C_j。权重w_{ij}可以被视为第 j 个组分的光谱特征。在相同的实验条件下“纯”荧光组分的测量可用来估计权重。注意纯荧光和组织中荧光团之间的权重由于其不同的化学环境可能略有不同。利用非负矩阵分解（NMF）分析 RGB 通道可以直接从实验数据中提取权重和荧光图。荧光地图C_j然后根据光谱特征匹配和空间分布特征的先验信息被识别为某种荧光种类。天然荧光分子的绝对浓度和分布由下式C_j/K_j给出,在这里K_j表示总的荧光的校准常数，即在相同的实验条件下由一个摩尔的纯第 j 种组分产生的荧光强度。

它的化学显微镜量化的天然荧光绝对浓度和分布首次同时含色氨酸，胶原蛋白，NADH，FAD 与卟啉。通过划分两个浓度图得到的氧化还原比率如 FAD/NADH 和 FAD /色氨酸。浓度比而不是荧光强度比，前者不依赖于测量条件。注意色氨酸强信号可以从纯色氨酸样品和标本在紫外光的激发下观察，虽然其激发峰为（*280nm*）。

图 11 显示了一副典型的化学计量学显微镜结果，包括一个 GS7 的前列腺癌患者的正常（顶部）1102 和癌症（底部）1104 的未染色病理切片的 PSCP 成像结果，以及同一个位置不同序列切片的染色图像。第一列显示了相同位置的一个不同串行切割部分相应的染色图像。其余列从左到右分别是分别为色氨酸、NADH、FAD，在色氨酸中和在 NADH 中 FAD 的浓度比值的浓度。窗口大小是$62.5\mu m\times 62.5\mu m$。注意核内不含 NADH 或 FAD。对癌肿部位的色氨酸和 NADH 浓度平均值显著高于正常部位（色氨酸：$140nM/mm^3$为正常的部位和$740nM/mm^3$为癌症部位；NADH：$3nM/mm^3$为正常部位和$7nM/mm^3$为癌部位）。FDA/色氨酸的平均浓度比分别为从4.3×10^{-4}到1.5×10^{-4}和从 0.023 到 0.015，将正常部位与癌部位进行比较如图 12 表 1200 所示。表 1200 总结了 19 例癌症组织和癌旁正常前列腺组织的差异。我们观察到的癌症区域中的色氨酸和 NADH 相比相应的正常的区域来说浓度较高（$P<0.01$）；FDA 在色氨酸或 NADH 的浓度比在癌部位较低（$P<0.05$）；μ_s'，OPL 往往在癌症区域略有下降,然而μ_s'、OPL、 g 和

FDA 的浓度的差异在统计学上是不显著的。在表 1200 所示的光学性能呈现的趋势，也在格里森评分较高的前列腺癌的队列中观察到。色氨酸和 NADH 浓度和氧化还原比率与格里森评分的关联，在一般情况下，比其他更明显。

光学参数（包括核 OPL 在组织平均值和至少单个细胞水平的统计，约化散射系数、各向异性因子，天然的荧光的浓度，和氧化还原比率）和临床参数（格里森评分和生化复发）是从两种方法收集和汇总得到的。该 PSCP 系统与癌症转移的临床检测和疾病死亡这些因素有关（通常通过影像学方法–骨扫描或 MRI 或 CT 扫描）。前列腺癌的长期进程中，PSA 的复发是疾病复发的最早和最敏感的措施，也是目前大多数研究的标准。转移瘤的临床表现是侵袭性疾病的一个附加的强有力的标志物。然而，在临床上，在面对不断上升的 PSA 时这往往没有寻求或记录，PSA 已是足够的证据，以保证治疗。虽然疾病的死亡被跟踪，但是在尸检文档的情况下，这些数据往往是不可靠的。然而，系统的结果与疾病复发与三个标志物相关 1），前列腺特异性抗原复发，2）转移的临床证据，和 3）疾病死亡。通过对两组光学和临床参数的比较，建立了两者之间的相互关系。

使用 TMA 和新鲜冷冻的前列腺手术标本组织切片具有一个独特优势，这些样品都是不同的格里森评分和覆盖平均切除 7 年后随访数据的前列腺癌病例大样本，患者的预后对于 PSCP 风险评分的发展至关重要。新鲜和冷冻保存的组织的光学性能没有统计上的显着差异。前列腺癌的 TMA 队列包含 191 例相荧光测量包含 9 个相邻的正常点，65 个 GS6 点，82 个 GS7 点，23 个 GS8 点和 8 个 GS9 点，其中共有 PSA 无复发 123 例（NREC）和 PSA 复发 44 例（REC）例（其他病例的格里森评分或 PSA 复发状况不明）。

表 1300 如图 13 所示显示了 PSA REC 与 PSA NREC 病例相比而言 μ_s' 和 OPL 是显著升高的，g 明显降低（P 的值分别为 $p < 10^{-3}$， $p < 10^{-5}$， $p < 10^{-7}$），而在 123 例 PSA NREC 病例和 44 例 PSA REC 两组之间的色氨酸，NADH 和 FDA 的浓度和 FDA/色氨酸和 FAD / NADH 的氧化还原比没有统计上的显著差异的。如表 1300 所示，依赖于 PSA 的复发状态的病例点的光学性能呈现的趋势，也能在每个单独的格里森评分组观察到（未显示）。这表明 PSCP 可以将前列腺癌分为侵袭性与非侵袭性的。

在表 1200 和表 1300 中提出的光学参数是组织平均特性。对这些参数的单细胞水平的统计可能进一步揭示组织结构和分子变化与肿瘤的分级和侵袭性之间的关系，并获得更高的 PSCP 与临床参数和患者的预后的相关性。这为客观准确的癌症患者风险评分奠定了坚实的基础。

支持向量机（SVM）等可以用来最终形成前列腺癌的风险评分，其中的支持向量机和流量峰值算法的组合能达到高精度。训练的支持向量机的决策函数（或判别函数）可以被用来作为风险评分。当结果变量，如肿瘤级有两个以上类别，一对一的方法可能适用于任何可能的两组比较。

基于相关前列腺癌测量的参数的相关性研究，光学测量的组织结构和分子图谱可以成为前列腺癌风险评分的基础。风险评分可以基于支持向量机的决策函数与递归特征消除所选择的变量。支持向量机针对不同的预测问题可使用组织平均特征和统计上的形态、分布、散射特性，荧光基团的浓度的单细胞水平和他们的

比等。该算法区别于正常前列腺包括良性前列腺增生前列腺癌，预测肿瘤分级、GS6 到 7 肿瘤的分化和亚 GS7 肿瘤，基于这些信息，该算法还评估癌症的侵略性和预测患者的预后。

该系统还可以计算受试者的操作特性（ROC）曲线，并确定诊断和预后的性能，使用的准确性，灵敏度和特异性进行比较评价。组织平均特征的高斯核支持向量机可以仅通过使用支持向量机函数计算，基于 10 个随机将五倍交叉验证计算的准确性，特异性和敏感性。使用格里森评分的支持向量机的准确度只有 58.4 ± 6.3，敏感性只有 71.1 ± 10.0，特异性只有 28.3 ± 6.1。最好的支持向量机利用一个单一的变量能实现准确度为 69.6 ± 1.2，所有输入变量的准确度为 72.3 ± 2.8。采用 RFE 选择相位特征的最佳子集包含 μ_s，核 *OPL* 和 g，支持向量机实现了精度为 79.5 ± 1.3，灵敏度为 79.5 ± 1.5 和特异性为 79.3 ± 5.2。通过增加代谢的特点，使用选定的 RFE 参数最佳子集的支持向量机的精度为 81.2 ± 3.2，灵敏度为 84.7 ± 3.7 和特异性为 73.3 ± 2.9。这个初步的结果表明，使用精心挑选的变量的支持向量机使精度至少增加十倍，最好的支持向量机利用一个单一的变量和包含的代谢数据是有益的。该程序提供了改进的支持向量机，更重要的是，在支持向量机中采用单细胞水平的统计除了组织的平均特性产生一个最终的风险评分算法相比于之前的方法达到更高的准确性，灵敏度和特异性。

作为本发明的另一实施例，PSCP 系统用于肺癌组织矩阵阵列（TMA）（Biomax，USA）成像。在这个设置中（紫外光的激发下）通道为 UV-R、UV-G、UV-B 和（在蓝光激发）通道为 B-R、B-G。在上述两者的激发下曝光时间均定为 1.5s。一组含有一层均匀的薄切片（~4μm 厚）的纯荧光团（包括色氨酸、胶原蛋白、弹力蛋白、NADH、FAD，和卟啉）的水悬浮液在相同的实验条件下分别制备和测量。

对于每一个标本，块主枢 NMF 算法在背景去除后的空间分解荧光图像是为 W 和 H 的乘积。单个荧光成分的分布包含在 H 一行，荧光物种是由特征矩阵 W 确定的。图 14 显示从“纯”荧光银行测得和从组织自发荧光分解获得的荧光组分光谱。误差条显示了在所有标本中提取的荧光分量的光谱特征的标准偏差。提取的和“纯粹”的荧光光谱的差异可以归结到不同的化学环境和 NMF 源分离残留之间的差异。所提取的荧光成分的光谱特征与那些“纯”荧光银行整体一致。

主要的荧光物种被确定为 Trp（色氨酸）、弹力蛋白、NADH 和 FAD。这四大成分的荧光强度在正常肺组织（n = 26），病灶周围组织（n = 34）与肺癌组织（n = 58）存在显著差异（见图 15，其统计意义由“*”（P = 0.05），“**”（P＜0.01）和“***”（P＜0.001）表示）。表 4 总结测定了在正常，病灶周围，与肺癌组织的色氨酸、弹力蛋白、NADH 和 FAD 的浓度（mM），和 FAD/色氨酸和 FAD / NADH 的氧化还原比率（浓度比）。从正常，病灶周围肺组织到癌细胞，都观察到色氨酸、弹力蛋白、NADH 和 FAD 浓度显着降低。在病灶周围正常肺组织之间，（FAD/色氨酸和 FAD / NADH）氧化还原比率的观察也遵循类似的趋势，然而它们的表现在统计学上无显著差异。

分辨浓度图中的典型结果如图 17 所示为正常肺组织（第一行），病灶周围组织（中间行），与肺癌组织（下排）。色氨酸、弹力蛋白、NADH 和 FAD 的

平均浓度至正常，病灶到癌变组织表现出整体的单调下降（正常、病灶周围和癌变的肺组织的色氨酸分别为：61.7mm，40.6mm，和 34.6 毫米；弹性蛋白分别为：15.2mm，13.7MM，和 6.2mm；NADH 分别为：0.61mm，为和 0.67mm；和 FAD 分别为：0.47mm，0.35mm，和 0.20mm）。相应的平均浓度比,FDA/色氨分别为 0.0065，0.0085，0.0053 和 FAD/ NADH 分别为 0.74，0.56，0.31，与表 4 一致。图 17 的第一列显示了相同位置的一个不同的串行切割部分的相应的 H&E 染色图像。窗口大小为 160μm×160μm。线粒体与 NADH 和 FAD 浓度升高相关。病灶周围情况特别清楚显示 NADH、FAD，和 FAD /色氨酸的图中有丰富的线粒体。

色氨酸浓度的降低表明加速分解和增强细胞诱导因子降解色氨酸，类似于在肺癌患者血清中观察到。弹性蛋白被发现是肺组织中的一个主要的荧光，癌前病变组织比正常组织观察到荧光伴随杂乱无章的纤维网急剧下降。皮茨 El Al 发现致癌物质转化的细胞显示 NADH 和黄素和点状荧光强度明显降低，永生化的人支气管上皮细胞与人支气管上皮细胞的比较自发荧光的空间定位的迷失。这里观察到同样的趋势（见表 4 和图 17）。癌症的 FAD/ NADH 氧化还原比降低是世界公认的 Warburg 效应的结果。值得注意的是，在这里，不仅癌症中 FAD 和 NADH 而且 FDA 的绝对浓度比其他荧光物质下降更明显。他带来了 FAD/ NADH 还原和进一步观察 NADH（和其他非 FAD）在总的检测信号的荧光（见图 18）的百分比的增加。在肺组织 FAD/色氨酸的比与 FAD/ NADH 的比具有相似的趋势。

NMF 的一个潜在的问题是，它可能产生非唯一的解决方案。这种模糊性被最小化，通过利用已知的纯“荧光”的光谱特征作为特征矩阵的分块主枢 NMF 算法的初始猜测。通过测量添加噪声的合成数据，验证了该方法的稳定性。由于其相似的光谱特征，在噪声小于 5% 时还原的 NADH 和 FAD 具有小于 8%的差异，而还原的色氨酸和蛋白在噪声接近 2%时的差异小于 20%。在我们的实验中，所测得的荧光图像中的噪声为 1%。

对于荧光物种的个体的量化得到绝对荧光组分浓度而不是相对含量具有一些重要的优点。这消除了系统的响应和测量细节潜在的不确定性，其可能会影响报告的数据和所观察到的与组织的生理状态相关的荧光特性。不同的方法之间的客观比较变得简单。最重要的是，绝对的荧光基团的浓度恢复作为有关的生物数据便于数据的解释和改善组织诊断。相对荧光强度比的鉴别能力比绝对荧光组分浓度弱得多。事实上，绝对的浓度可以用来分类非癌性（病灶周围的正常，n = 66）和肿瘤（n = 52）比相对荧光强度更准确。在图 19 中显示的 ROC 曲线计算使用支持向量机的 5 倍交叉验证，其中分类的准确性前者为 99.8%，后者为 93.9%。单独的氧化还原比的准确性是 77.1%。

以上例举的是对前列腺癌和肺癌的诊断的实施例，但本发明并不限于此，以上方法不仅对前列腺癌和肺癌的诊断和预后有良好的效果，对其它癌症以及其它病理都有检测和预后能力。在一些实施例中，利用从生物组织利用光相互作用定量其微观结构的方法，通过利用相位成像显微镜对组织切片成像，获得 Q-DIC 图像；再对 Q-DIC 图像进行分析，通过以上公式 1-5 获得的约化散射系数 μ_s'，光学路径长度 OPL，以及各向异性因子 g，可以用于人体及生物体的检测包括但

不限于病理、癌症的检测、诊断和预后。在一些实施例中，利用生物组织自发荧光定量其分子含量的方法，通过利用荧光成像显微镜对组织切片成像，获得荧光显微图像；进而对荧光显微图像通过上述方程式（6）计算得到荧光组分绝对浓度数据图；进而得到色氨酸，胶原蛋白，NADH，FAD 与卟啉数据，也可以对人体和神物体检测包括但不限于病理、癌症的检测、诊断和预后。

权利要求书

1、一种从生物组织利用光相互作用定量其微观结构的方法，包括以下步骤：

（1）、利用相位成像显微镜对组织切片成像，获得 Q-DIC 图像；

（2）、对 Q-DIC 图像进行分析，获得二维 Q-DIC 定量图谱。

2、一种如权利要求 1 所述的方法，其特征在于：步骤（2）中，对 Q-DIC 图像按如下计算方程式获得约化散射系数 μ_s'，光学路径长度 OPL，以及各向异性因子 g，μ_s'，OPL，g 的空间分布的二维图谱即为二维 Q-DIC 定量图谱；

方程式为：

$$k\frac{\partial I}{\partial z} = -I\nabla_{\perp}^{2}\phi \qquad (1)$$

$$-\nabla_{\perp}^{2}\varphi = k\frac{\partial \ln I}{\partial z} = k\frac{\ln I_1 - \ln I_0}{\delta z} \qquad (2)$$

$$\mu_s L = 2\langle 1-\cos\Delta\phi\rangle \qquad (3)$$

$$\mu_s' L = \frac{1}{2k^2}\left\langle |\nabla\phi|^2 \right\rangle \qquad (4)$$

$$OPL = \phi(\rho)\lambda/2\pi \qquad (5)$$

$$g = 1 - \frac{\left\langle |\nabla\phi|^2 \right\rangle}{4k^2\langle 1-\cos\Delta\phi\rangle} \qquad (6)$$

其中，$I(\rho)$是 DIC 图像，$k = 2\pi n_0/\lambda$是探测光束的波数，n_0是在背景的折射率，λ是真空中的光的波长，$\phi(\rho) = k\int_0^L dz m(\rho,z)$是通过薄切片的厚度 L 与 m 的相对折射率的介质的波传输在位置(ρ,z)的空间分辨的相位图，其中ρ和 z 分别是横向和轴向坐标，I_0和I_1分别代表对象的聚焦和失焦的 DIC 图像，失焦的位置与最佳位置相差δz，ϕ是由拉普拉斯变换得到，$-\nabla_{\perp}^{2}\phi$是由正则化傅立叶变换得到的，μ_s为散射系数，μ_s'为约化散射系数，g 为各向异性因子。

3、一种利用生物组织自发荧光定量其分子含量的方法，包括以下步骤：

（1）、利用荧光成像显微镜对组织切片自发荧光在多个激发波段成像，获得荧光显微图像；

（2）、对荧光显微图像通过如下方程式计算并分解得到自发荧光组分数据图；

方程式为：$\begin{pmatrix} I_1 \\ I_2 \\ \vdots \\ I_m \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} w_{11} & w_{12} & \cdots & w_{1n} \\ w_{21} & w_{22} & \cdots & w_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ w_{m1} & w_{m2} & \cdots & w_{mn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_1 \\ C_2 \\ \vdots \\ C_m \end{pmatrix}$ （6）

式中，I 为 荧光强度 ，w 为权重因子，C 为荧光物质含量。

4、如权利要求 3 所述的方法，其特征在于：所述的组织自发荧光组分数据图是绝对浓度。

5、如权利要求 3 所述的方法，其特征在于：所述的组织自发荧光组分数据图包括色氨酸，胶原蛋白，NADH，FAD 与卟啉数据图。

6、一种使用光子结构和化学计量学病理系统针对未标记的病理组织切片进行癌症诊断和预后的方法，包括：

从人类病人中获得组织样本；

用组织样品制备无标记的病理切片；

获得病理切片的相位差显微镜（Q-DIC）图像；

从 Q-DIC 图像中计算一个或多个二维 Q-DIC 定量图谱；

获得病理切片的多个激发波段的荧光显微图像；

从荧光显微图像中计算荧光组分数据图；

包括一个基于已知病理受试者二维 Q-DIC 定量图谱和荧光组分数据图与已知的病理学科数据库统计分析产生或获得的相关风险评分方法；以及根据已知的病理学的病人的组织样本和二维 Q-DIC 定量图谱和荧光组分数据图，风险评估方法利用二维 Q-DIC 定量图谱和荧光组分的数字图数据来获得病人的一个癌症诊断和预后的组合应用。

7、根据权利要求 6 的方法，其中对 Q-DIC 图像按如下计算方程式获得约化散射系数 μ_s'，光学路径长度 OPL，以及各向异性因子 g，μ_s'，OPL，g 的空间分布的二维图谱即为二维 Q-DIC 定量图谱；

方程式为：$k\frac{\partial I}{\partial z} = -I\nabla_\perp^2\phi$ （1）

$-\nabla_\perp^2\varphi = k\frac{\partial \ln I}{\partial z} = k\frac{\ln I_1 - \ln I_0}{\delta z}$ （2）

$\mu_s L = 2\langle 1-\cos\Delta\phi\rangle$ （3）

$\mu_s' L = \frac{1}{2k^2}\langle|\nabla\phi|^2\rangle$ （4）

$OPL = \phi(\rho)\lambda/2\pi$ （5）

$$g = 1 - \frac{\left\langle |\nabla \phi|^2 \right\rangle}{4k^2 \left\langle 1 - \cos \Delta \phi \right\rangle} \qquad (6)$$

其中，$I(\rho)$是 DIC 图像，$k = 2\pi n_0 / \lambda$是探测光束的波数，n_0是背景的折射率，λ是真空中的光的波长，$\phi(\rho) = k\int_0^L dz m(\rho, z)$是通过薄切片的厚度 L 与 m 的相对折射率的介质的波传输在位置(ρ, z)的空间分辨的相位图，其中ρ和 z 分别是横向和轴向坐标，I_0和I_1分别代表对象的聚焦和失焦的 DIC 图像，失焦的位置与最佳位置相差δz，ϕ是由拉普拉斯变换得到，$-\nabla_\perp^2 \phi$是由正则化傅立叶变换得到的，μ_s为散射系数，μ_s'为约化散射系数，g 为各向异性因子。

8、一种如权利要求 6 所述的方法，其特征在于：荧光显微图像通过如下方程式计算并分解得到荧光组分数据图；

方程式为：$$\begin{pmatrix} I_1 \\ I_2 \\ \vdots \\ I_m \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} w_{11} & w_{12} & \cdots & w_{1n} \\ w_{21} & w_{22} & \cdots & w_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ w_{m1} & w_{m2} & \cdots & w_{mn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_1 \\ C_2 \\ \vdots \\ C_m \end{pmatrix} \qquad (6)$$

式中，I为 荧光强度 ，w 为权重因子，C 为荧光物质含量。

9、一种如权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述的荧光组分数据图是绝对浓度。

10、一种如权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述的荧光组分数据图包括色氨酸，胶原蛋白，NADH，FAD 与卟啉数据图。

11、一种如权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述的癌症为前列腺癌。

12、一种如权利要求 5 所述的方法，其特征在于：所述的癌症为肺癌。

13、一种光子结构和化学计量学病理系统，包括：

病理切片准备站；

相位成像显微镜；

荧光成像显微镜

基于已知病理患者的一个Q-DIC定量图谱和荧光强度数据图的风险评估的评分方法；

通用计算机程序：

从相位成像显微镜获到一个相位差显微镜（q-dic）的病理图像；

从 Q-DIC 图像中计算一个或多个二维 Q-DIC 定量图谱；

从荧光显微镜中获得病理切片的荧光显微图像；

从荧光显微图像中计算荧光组分数据图；

根据已知的病理的病人的组织样本和二维 Q-DIC 数据图和荧光强度数据图，应用风险评分方法的组合二维 Q-DIC 数字图和荧光组分数据图来获得病人的癌症诊断和预后或者生物组织的病理检查。

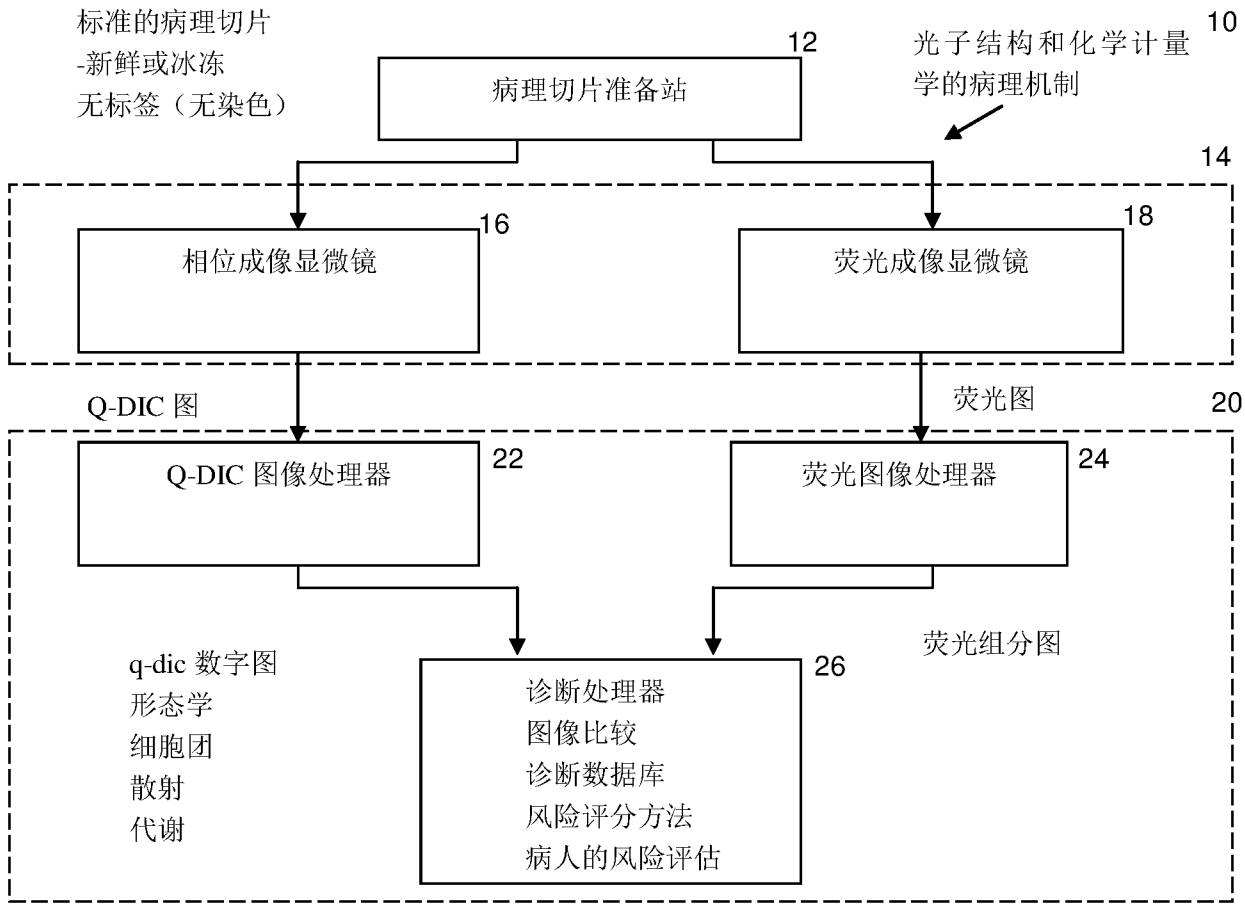

标准的病理切片
-新鲜或冰冻
无标签（无染色）
12
病理切片准备站
光子结构和化学计量学的病理机制
10
14
16
相位成像显微镜
18
荧光成像显微镜
Q-DIC 图
荧光图
20
Q-DIC 图像处理器
22
荧光图像处理器
24
q-dic 数字图
形态学
细胞团
散射
代谢
荧光组分图
26
诊断处理器
图像比较
诊断数据库
风险评分方法
病人的风险评估

图 1

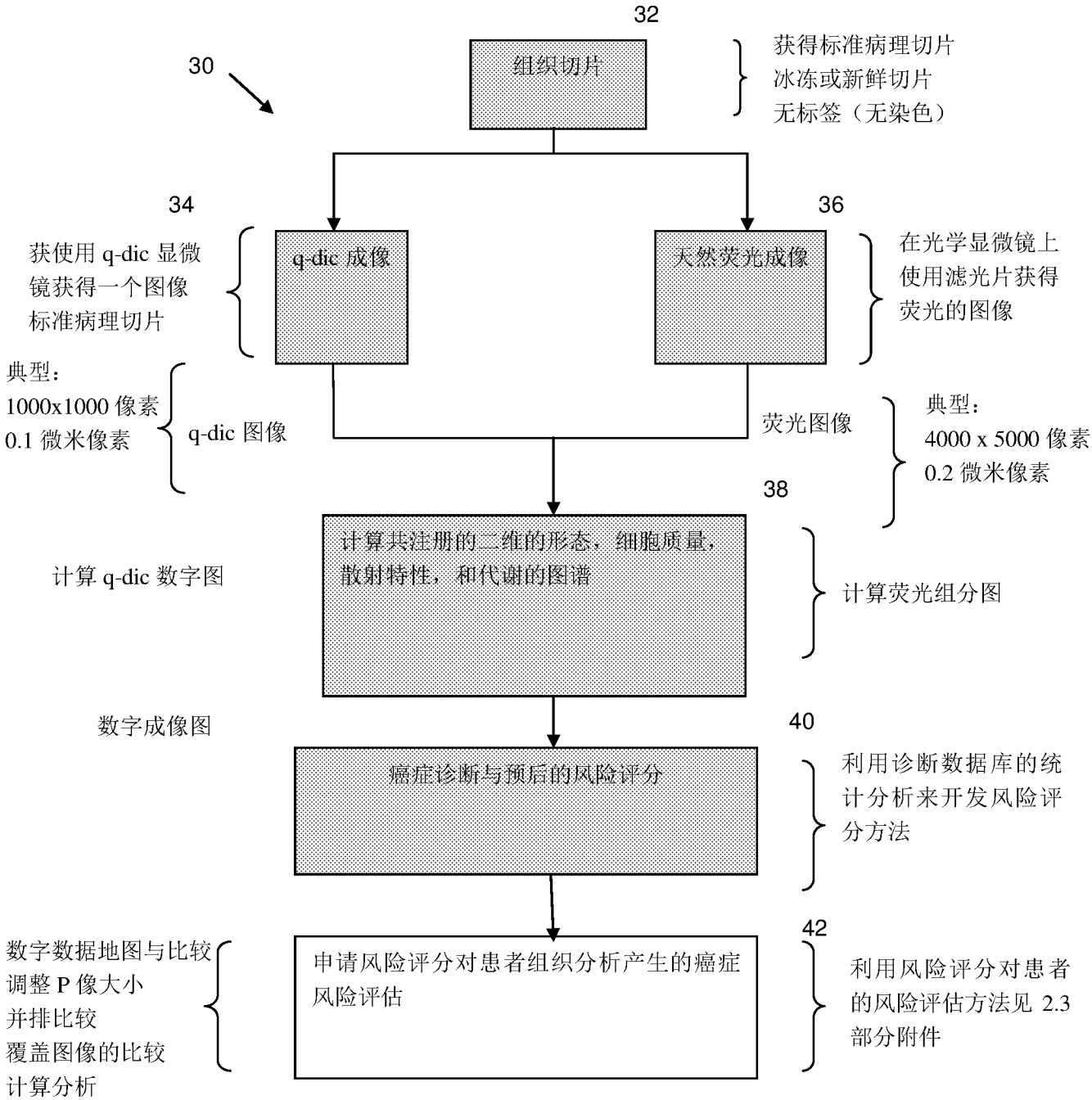


图 2

图 3 $$k\frac{\partial I}{\partial z} = -I\nabla_{\perp}^{2}\phi$$ 公式 1

图 4 $$-\nabla_{\perp}^{2}\phi = k\frac{\partial LnI}{\partial z} = k\frac{LnI_1 - LnI_0}{\partial z}$$ 公式 2

图 5 $$\mu_s L = 2\langle 1-\cos\Delta\phi\rangle$$ 公式 3

图 6 $$\mu_s' L = \frac{1}{2k^2}\left\langle |\nabla\phi|^2 \right\rangle$$ 公式 4

图 7 $$g = 1 - \frac{\left\langle |\nabla\phi|^2 \right\rangle}{4k^2\langle 1-\cos\Delta\phi\rangle}$$ 公式 5

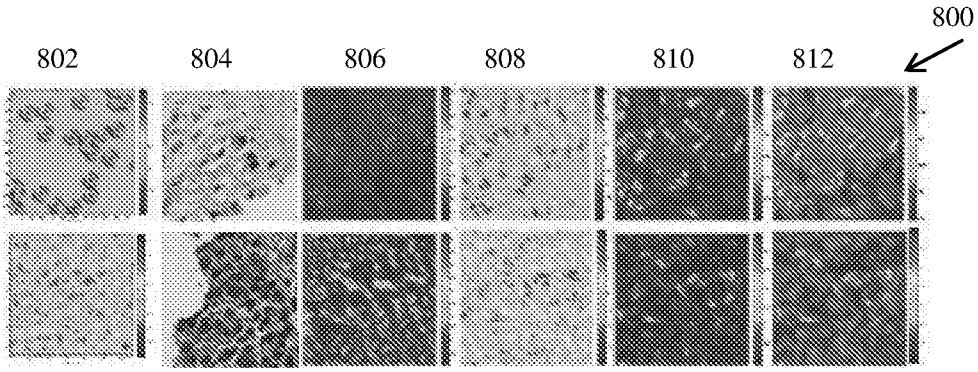


图 8

900

	聚苯乙烯微球			20%脂肪乳悬浮		
	$c_{sca}(\mu m^2)$	$c_{sca}'(\mu m^2)$	g	$\mu_s(\mu m^{-1})$	$\mu_s'(\mu m^{-1})$	g
理论值	125	9.5	0.92	0.139	0.031	0.78
测量值	118	10.2	0.91	0.136	0.022	0.84

图 9

$$\begin{pmatrix} I_1 \\ I_2 \\ \vdots \\ I_m \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} w_{11} & w_{12} & \cdots & w_{1n} \\ w_{21} & w_{22} & \cdots & w_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ w_{m1} & w_{m2} & \cdots & w_{mn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_1 \\ C_2 \\ \vdots \\ C_m \end{pmatrix}$$ 公式 6

图 10

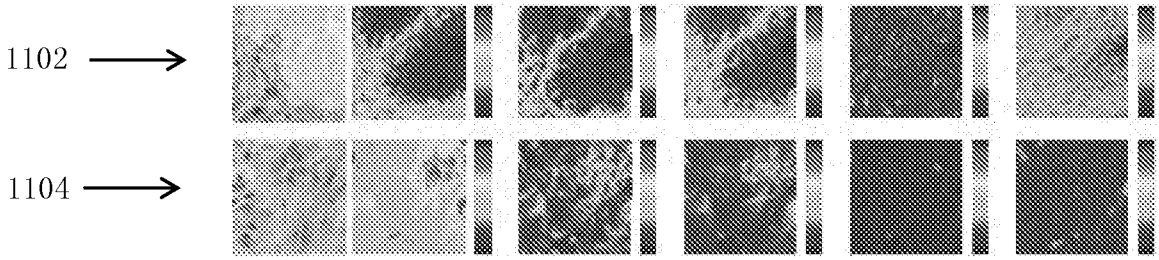


图 11

1200

	$\mu_s'(\mu m^{-1})$	$OPL(\mu m^{-1})$	g	色氨酸	NADH	FAD	FAD/TRY	FAD/NADH
正常	0.043(0.018)	1.17(0.21)	0.85(0.05)	330(160)	5.1(1.9)	0.13(0.05)	$5.5(3.5)\times10^{-4}$	$29(9)\times10^{-3}$
癌症	0.040(0.014)	1.10(0.13)	0.85(0.06)	520(160)	6.6(1.0)	0.15(0.05)	$3.2(1.2)\times10^{-4}$	$24(4)\times10^{-3}$
P-值	0.6	0.2	1	0.001	0004	0.2	0.01	0.03

图 12

1300

	$\mu_s'(\mu m^{-1})$	$OPL(\mu m^{-1})$	g	色氨酸	NADH	FAD	FAD/TRY	FAD/NADH
PSA NRec	0.038(0.014)	1.07(0.22)	0.863(0.056)	410(260)	4.7(2.2)	0.09(0.04)	$2.9(1.8)\times10^{-4}$	$22(6)\times10^{-3}$
PSA Rec	0.046(0.011)	1.24(0.21)	0.828(0.022)	390(200)	5.0(2.7)	0.11(0.05)	$3.2(1.8)\times10^{-4}$	$24(8)\times10^{-3}$
P-值	2×10^{-4}	6×10^{-6}	4×10^{-8}	0.6	0.6	0.6	0.4	0.2

图 13

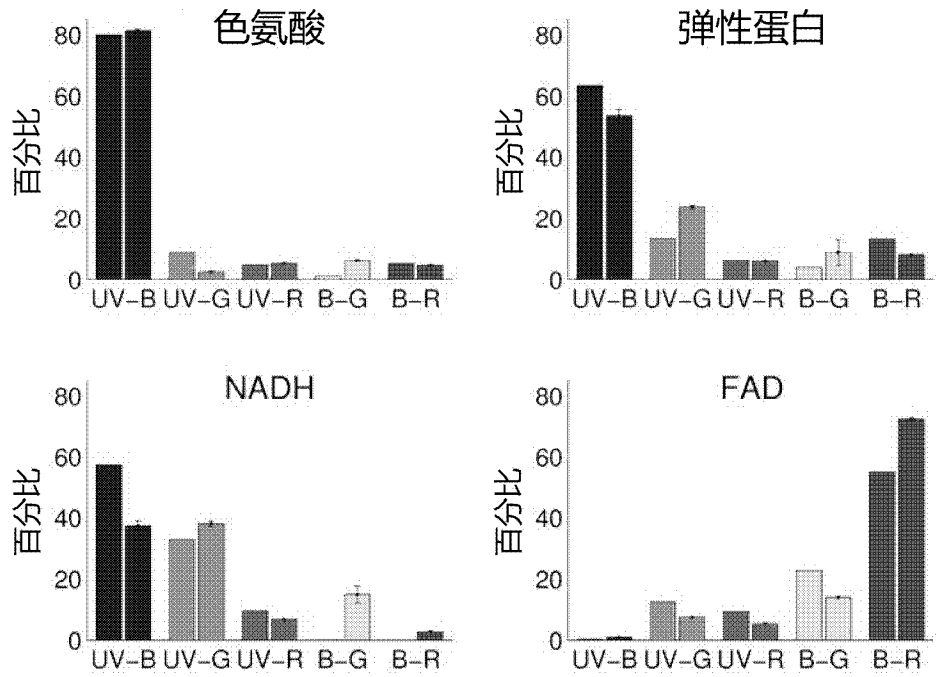


图 14

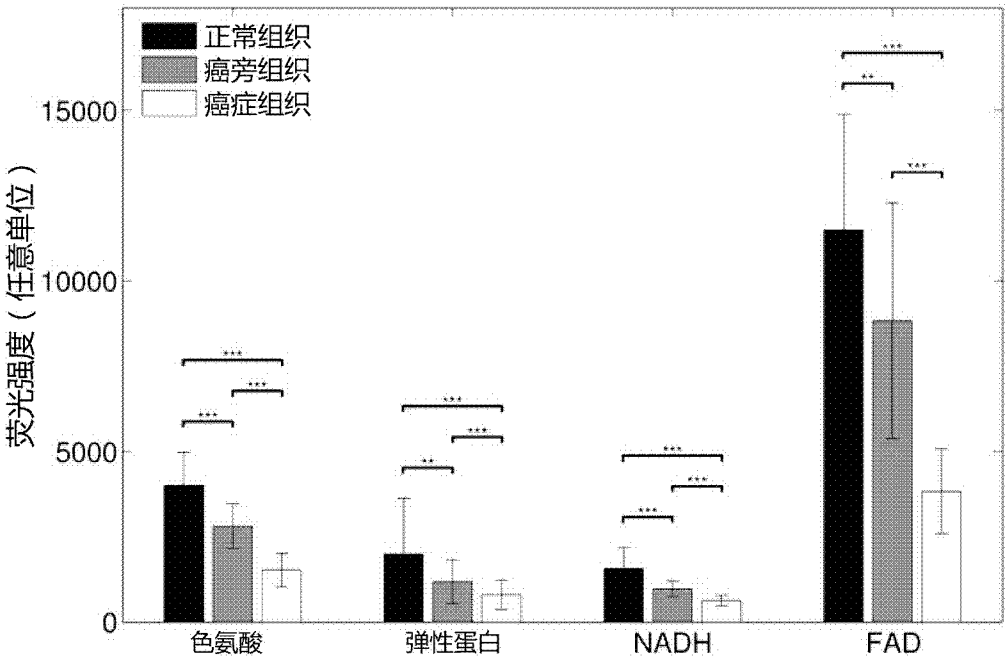


图 15

	色氨酸	弹性蛋白	NADH	FAD	FAD/色氨酸	FAD/NADH
正常组织	63(15)	23(19)	1.02(0.40)	0.43(0.13)	$7.6(1.8)\times10^{-3}$	0.63(0.28)
癌旁组织	44(10)	13(7)	0.64(0.15)	0.33(0.13)	$8.4(2.2)\times10^{-3}$	0.75(0.38)
癌症组织	24(8)	9.1(4.9)	0.41(0.11)	0.14(0.05)	$6.5(2.5)\times10^{-3}$	0.38(0.15)
P 值 N-P	4×10^{-4}	0.006	1×10^{-5}	0.01	0.6	0.3
P-C	8×10^{-12}	9×10^{-4}	1×10^{-9}	3×10^{-15}	0.005	7×10^{-7}
N-C	1×10^{-19}	3×10^{-7}	1×10^{-16}	1×10^{-19}	0.009	0.0001

图 16

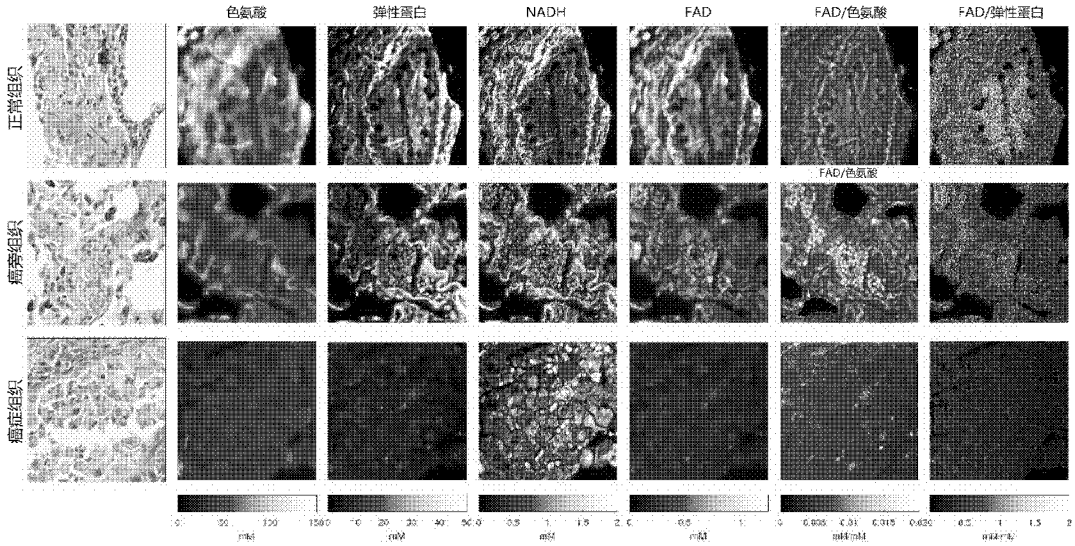

色氨酸
弹性蛋白
NADH
FAD
FAD/色氨酸
FAD/弹性蛋白
正常组织
癌旁组织
癌症组织

图 17

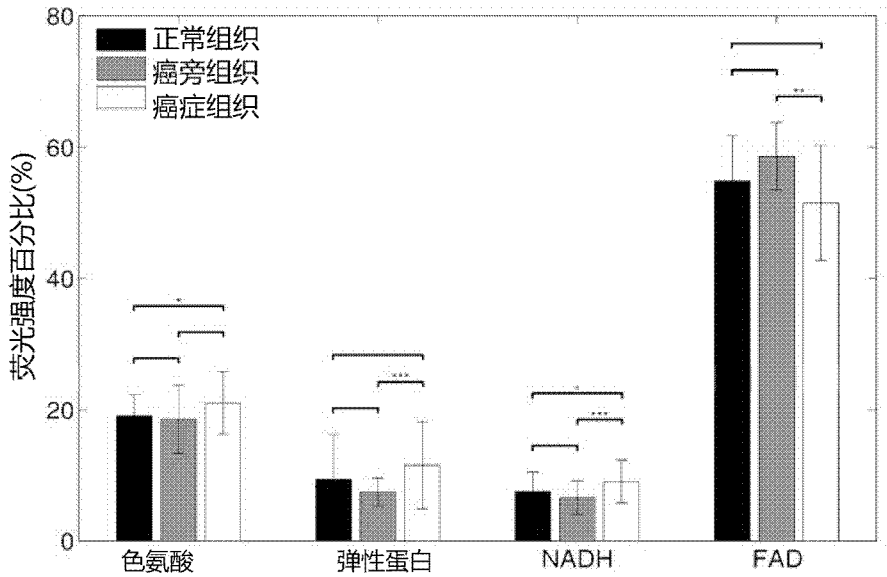

正常组织
癌旁组织
癌症组织
荧光强度百分比(%)
0
20
40
60
80
色氨酸
弹性蛋白
NADH
FAD

图 18

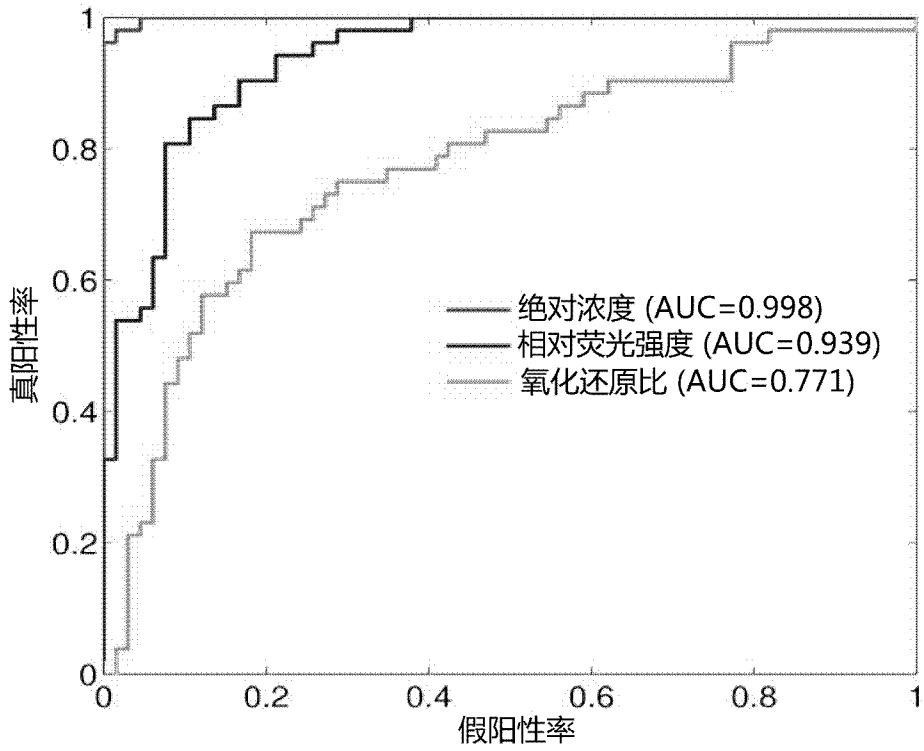

真阳性率
假阳性率
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
绝对浓度 (AUC=0.998)
相对荧光强度 (AUC=0.939)
氧化还原比 (AUC=0.771)

图 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/090755

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61B 5/00 (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)

A61B 5/-; G06T 5/-

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

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

WPI, EPODOC, CNKI, CNPAT, Web of Knowledge: tissue, q-dic, cancer, elastin, concentration, phasic+, fluorescence, Wenzhou Medical University, xu min

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2014268168 A1 (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION) 18 September 2014 (18.09.2014) description, paragraphs [0006]-[0014], [0068], [0068] and figure 1	1, 13
Y	CN 103918005 A (KONINKLIKE PHILIPS ELECTRONICS N.V.) 09 July 2014 (09.07.2014) description, paragraphs [0037]-[0053], and [0093]-[0098]	1, 13
X	US 2014268168 A1 (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION) 18 September 2014 (18.09.2014) description, paragraphs [0006]-[0014], [0068], [0068] and figure 1	3-5
A	US 2014119628 A1 (TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT FOUNDATION LIMITED) 01 May 2014 (01.05.2014) the whole document	1-5, 13
A	CN 102099671 A (UNIV HEALTH NETWORK) 15 June 2011 (15.06.2011) the whole document	1-5, 13

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 September 2016	19 October 2016

Name and mailing address of the ISA
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No. (86-10) 62019451

Authorized officer
HU, Yating
Telephone No. (86-10) 52871091

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/090755

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102266219 A (CAMBRIDGE RESEARCH AND EQUIPMENT CO., LTD.) 07 December 2011 (07.12.2011) the whole document	1-5, 13
A	CN 1317688 A (HUAZHONG SCIENCE AND TECHNOLOGY UNIVERSITY) 17 October 2001 (17.10.2001) the whole document	1-5, 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/090755

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.:6-12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 6-12 relate to a method for cancer diagnosis and prognosis of unlabeled pathological tissue sections using photonic structures and chemometric pathology systems, which requires obtaining the tissue sample from a human patient, requires an interventional surgical procedure, and further performs cancer diagnosis and prognosis analysis on human tissue samples, is a diagnostic method, and therefore does not warrant an international search according to the criteria set out in Rule 39. 1(iv)

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 additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/090755

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2014268168 A1	18 September 2014	JP 2016515032 A	26 May 2016
		EP 2972068 A2	20 January 2016
		AU 2014236457 A1	20 August 2015
		WO 2014152961 A2	25 September 2014
		CN 105074379 A	18 November 2015
		CA 2903201 A1	25 September 2014
CN 103918005 A	09 July 2014	WO 2013030698 A1	07 March 2013
		RU 2014111826 A	10 October 2015
		US 2014205057 A1	24 July 2014
		EP 2761586 A1	06 August 2014
		IN 1546CHN2014 A	08 May 2015
		JP 2014525304 A	29 September 2014
		US 9430832 B2	30 August 2016
US 2014119628 A1	01 May 2014	US 9036885 B2	19 May 2015
CN 102099671 A	15 June 2011	CA 2891990 A1	26 November 2009
		US 2011117025 A1	19 May 2011
		JP 2011521237 A	21 July 2011
		CA 2724973 C	11 August 2015
		WO 2009140757 A1	26 November 2009
		US 9042967 B2	26 May 2015
		CN 104939806 A	30 September 2015
		US 2016045114 A1	18 February 2016
		CA 2724973 A1	26 November 2009
		JP 2015057600 A	26 March 2015
		EP 2291640 A1	09 March 2011
CN 102266219 A1	07 December 201	US 2015056690 A1	26 February 2015
		DE 06014263 T1	06 June 2007
		US 2013300848 A1	14 November 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/090755

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		EP 1757223 A2	28 February 2007
		US 8391961 B2	05 March 2013
		DE 04816892 T1	28 December 2006
		CN 1886089 B	10 August 2011
		US 2007016082 A1	18 January 2007
		CN 1886089 A	27 December 2006
		EP 1681993 A2	26 July 2006
		WO 2005040769 A2	06 May 2005
		CN 102266219 B	26 March 2014
		US 7321791 B2	22 January 2008
		US 2009245605 A1	01 October 2009
		EP 1757223 B1	13 February 2013
		US 8385615 B2	26 February 2013
		US 2005065440 A1	24 March 2005
		EP 1681993 B1	10 July 2013
		US 2008294032 A1	07 November 2008
		US 8634607 B2	21 January 2014
		US 2014134713 A1	15 May 2014
		US 8879812 B2	04 November 2014
CN 1317688 A	17 October 2001	CN 1166939 C	15 September 2004

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2016/090755

A. 主题的分类

A61B 5/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61B5/-;G06T5/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

WPI,EPODOC,CNKI,CNPAT,Web of Knowledge:显微,图谱,微观,相位,二维,差分相位对比,荧光,癌症,诊断,组分,数据图,浓度,胶原蛋白,组织切片,温州医科大学,徐敏,tissue,q-dic,cancer,elastin,concentration,phasic+,fluorescence

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	US 2014268168 A1 (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION) 2014年 9月 18日 (2014-09-18) 说明书第[0006]-[0014]、[0068]-[0069]段，附图1	1、13
Y	CN 103918005 A (皇家飞利浦有限公司) 2014年 7月 9日 (2014-07-09) 说明书第[0037]-[0053]、[0093]-[0098]段	1、13
X	US 2014268168 A1 (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION) 2014年 9月 18日 (2014-09-18) 说明书第[0006]-[0014]、[0068]-[0069]段，附图1	3-5
A	US 2014119628 A1 (TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT FOUNDATION LIMITED) 2014年 5月 1日 (2014-05-01) 全文	1-5、13
A	CN 102099671 A (大学健康网络) 2011年 6月 15日 (2011-06-15) 全文	1-5、13

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2016年 9月 28日	2016年 10月 19日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 胡亚婷 电话号码 (86-10)52871091

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 102266219 A (剑桥研究和仪器设备股份有限公司) 2011年 12月 7日 (2011 - 12 - 07) 全文	1-5、13
A	CN 1317688 A (华中科技大学) 2001年 10月 17日 (2001 - 10 - 17) 全文	1-5、13

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/090755

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 6-12
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求6-12涉及使用光子结构和化学计量学病理系统针对未标记的病理组织切片进行癌症诊断和预后的方法，其需要从人类病人中获取该组织样本，其需要经过介入性的外科手术操作，并进一步针对人体组织样本进行癌症的诊断和预后分析，其为诊断方法，属于细则第39.1规定的不要求国际检索单位检索的主题。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2016/090755

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	2014268168	A1	2014年 9月 18日	JP	2016515032	A	2016年 5月 26日
				EP	2972068	A2	2016年 1月 20日
				AU	2014236457	A1	2015年 8月 20日
				WO	2014152961	A2	2014年 9月 25日
				CN	105074379	A	2015年 11月 18日
				CA	2903201	A1	2014年 9月 25日
CN	103918005	A	2014年 7月 9日	WO	2013030698	A1	2013年 3月 7日
				RU	2014111826	A	2015年 10月 10日
				US	2014205057	A1	2014年 7月 24日
				EP	2761586	A1	2014年 8月 6日
				IN	1546CHN2014	A	2015年 5月 8日
				JP	2014525304	A	2014年 9月 29日
				US	9430832	B2	2016年 8月 30日
US	2014119628	A1	2014年 5月 1日	US	9036885	B2	2015年 5月 19日
CN	102099671	A	2011年 6月 15日	CA	2891990	A1	2009年 11月 26日
				US	2011117025	A1	2011年 5月 19日
				JP	2011521237	A	2011年 7月 21日
				CA	2724973	C	2015年 8月 11日
				WO	2009140757	A1	2009年 11月 26日
				US	9042967	B2	2015年 5月 26日
				CN	104939806	A	2015年 9月 30日
				US	2016045114	A1	2016年 2月 18日
				CA	2724973	A1	2009年 11月 26日
				JP	2015057600	A	2015年 3月 26日
				EP	2291640	A1	2011年 3月 9日
CN	102266219	A	2011年 12月 7日	US	2015056690	A1	2015年 2月 26日
				DE	06014263	T1	2007年 6月 6日
				US	2013300848	A1	2013年 11月 14日
				EP	1757223	A2	2007年 2月 28日
				US	8391961	B2	2013年 3月 5日
				DE	04816892	T1	2006年 12月 28日
				CN	1886089	B	2011年 8月 10日
				US	2007016082	A1	2007年 1月 18日
				CN	1886089	A	2006年 12月 27日
				EP	1681993	A2	2006年 7月 26日
				WO	2005040769	A2	2005年 5月 6日
				CN	102266219	B	2014年 3月 26日
				US	7321791	B2	2008年 1月 22日
				US	2009245605	A1	2009年 10月 1日
				EP	1757223	B1	2013年 2月 13日
				US	8385615	B2	2013年 2月 26日
				US	2005065440	A1	2005年 3月 24日
				EP	1681993	B1	2013年 7月 10日
				US	2008294032	A1	2008年 11月 7日
				US	8634607	B2	2014年 1月 21日
				US	2014134713	A1	2014年 5月 15日
				US	8879812	B2	2014年 11月 4日
CN	1317688	A	2001年 10月 17日	CN	1166939	C	2004年 9月 15日