(19) **Bundesrepublik Deutschland**
**Deutsches Patent- und Markenamt**

(10) **DE 695 32 108 T2** 2004.05.27

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 732 889 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 32 108.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/12456**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 935 191.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/010363**
(86) PCT-Anmeldetag: **29.09.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **11.04.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.09.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **12.11.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.05.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61B 5/00**
**G01N 21/64**

(30) Unionspriorität:
**316132** **30.09.1994** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IT, LI, NL**

(73) Patentinhaber:
**UT-Battelle, LLC., Oak Ridge, Tenn., US**

(72) Erfinder:
**VO-DINH, Tuan, Knoxville, US; PANJEHPOUR, Masoud, Knoxville, US; OVERHOLT, F., Bergein, Knoxville, US**

(74) Vertreter:
**Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183 Wiesbaden**

(54) Bezeichnung: **KREBSDIAGNOSE DURCH LASERINDUZIERTE DIFFERENTIAL-NORMIERTE FLUORESZENZ**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

### Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich allgemein auf eine Vorrichtung und ein Verfahren für das Erzeugen eines Signals, das den Zustand einer Gewebeprobe repräsentiert.

### Hintergrund der Erfindung

[0002] In vivo und schnelle Verfahren zur Gewebediagnose sind für eine effiziente Krebsvorsorge und -therapie wichtig. Als ein Beispiel für einen Typs der Erkennung wird die Endoskopie verwendet, um abnormale Gewebe in der menschlichen Speiseröhre zu erkennen. Sobald eine Abnormalität gefunden wurde, werden Biopsien für die Bestimmung der Histopathologie entnommen.
[0003] Für die Diagnose repräsentiert eine Biopsieprobe gewöhnlich einen sehr kleinen Bereich. Die Laborergebnisse sind üblicherweise über mehrere Tage nicht erhältlich. Daher liefern die bekannten endoskopischen Techniken keine in vivo Klassifikation des Gewebetyps in Echtzeit.
[0004] Seit kurzem gibt es ein Interesse an dem Verwenden von laserinduzierter Fluoreszenz (LIF) bei der Entwicklung von diagnostischen und therapeutischen Werkzeugen. Eine Anzahl von Forschern hat LIF als ein Verfahren benutzt, um zwischen Tumoren und normalem Gewebe zu unterscheiden. Zum Beispiel wurde die LIF-Technik verwendet, um adenomartige Polypen von normalem Kolongewebe und hyperplastischen Polypen in vitro zu unterscheiden. Siehe C. R. Kapadia et al., „Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy of Human Colonic Mucosa – Detection of Adenomatous Transformation", Gastroenterology, 99: 150–157 (1990).
[0005] Wieder andere haben die LIF-Technik untersucht, um adenomartiges Gewebe von normalem Dickdarm- bzw. Kolongewebe in vivo zu unterscheiden. Siehe R. M. Cothren et al., „Gastrointestinal Tissue Diagnosis by Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy at Endoscopy", Gastrointestinal Endoscopy, 36: 1005–111 (1990). Fluoreszenztechniken wurden auch verwendet, um normale und maligne Brustgewebe und Lungengewebe zu charakterisieren und um die Arzneimittel für die photodynamische Therapie in Rattengeweben zu quantifizieren. Ein faseroptischer auf Antikörpern basierender LIF-Biosensor wurde verwendet, um DNA-Modifikationen durch karzinogene Chemikalien in Proben der menschlichen Plazenta zu erkennen.
[0006] Andere Forscher haben LIF und eine multivariante lineare Regressionsanalyse verwendet, um neoplastisches Gewebe von nicht-neoplastischem Gewebe zu unterscheiden. Siehe K. T. Schomacker et al., „Ultraviolet Laser-Induced Fluorescence of Colonic Tissue: Basic Biology and Diagnostic Potential", Lasers in Surgery and Medicine, 12: 63–68 (1992).
[0007] Die Daten von Schomacker et al. legen nahe, daß die LIF-Messungen Veränderungen in der Morphologie von Polypen eher erkennen als Veränderungen in den für Polypen spezifischen Fluorosphoren und es war diese Veränderung in der Morphologie, die indirekt zur Unterscheidung von Polypen führt. Schomacker et al. schließen, daß die Machbarkeit der Unterscheidung von Gruppen von normalen und dysplastischen Zellen durch LIF bis jetzt nicht gezeigt wurde.
[0008] US-Patent Nr. 4,930,516, Anmelder Alfano et al., beschreibt ein Verfahren zur Detektion von krebsartigem Gewebe, wobei laserinduzierte Fluoreszenz verwendet wird. Die Wellenlängen, bei denen maximale Intensitäten für Gewebeproben erreicht werden, werden bestimmt und mit den Scheitelwertwellenlängen, die von bekanntem nicht-krebsartigem Gewebe abgeleitet wurden, verglichen.
[0009] US-Patent Nr. 5,131,398, Anmelder Alfano et al., beschreibt ein Verfahren zum Unterscheiden zwischen krebsartigem Gewebe und benignem Tumorgewebe, wobei eine Lichtquelle verwendet wird, die einen monochromatischen Lichtstrahl mit 300 nm erzeugt, der durch ein Endoskop in die Probe gerichtet wird. Emissionsstrahlung, die durch Fluoreszenz erzeugt wird, wird bei 340 und 440 nm gemessen, und ein Verhältnis der beiden Intensitäten wird dann berechnet und als Grundlage zum Bestimmen, ob das Gewebe krebsartig ist, verwendet.
[0010] Die PCT-Anmeldung Nr. WO 90/12536 beschreibt eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Diagnose des Zustands von gastrointestinalem Gewebe durch Anwendung von laserinduzierter Fluoreszenz von Gewebe, um die Existenz von abnormalem Gewebe innerhalb des Körpers zu erkennen. WO 90/12536 wendet einen statischen Ansatz an, wobei Mittelwerte der Verhältnisse der Fluoreszenzintensität bei bestimmten Wellenlängen verwendet werden, um die Merkmale der Fluoreszenzspektren zu korrelieren.
[0011] Eine weitere endoskopische Technik, die im US-Patent Nr. 5,261,410, von Alfano et al. beschrieben wird, verwendet eine infrarote monochromatische Lichtquelle und mißt dann die Raman-Verschiebung in der Emissionsstrahlung, um den Zustand einer Gewebeprobe zu bestimmen.
[0012] Die zuvor genannten Referenzen und die darin enthaltenen detaillierten Studien deuten an, daß ein starkes Bedürfnis verbleibt, verbesserte Vorrichtungen und Verfahren zur Analyse von Gewebeproben für die Verwendung zur effektiven Krebsdiagnose zu entwickeln.

## Zusammenfassung der Erfindung

[0013] Entsprechend liefert ein erster Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung eine Vorrichtung zur Erzeugung eines Signals, das den Zustand einer Gewebeprobe repräsentiert, die aufweist:
eine Einrichtung für das Bestrahlen der Gewebeprobe mit einem monochromatischen Anregungslicht mit einer vorbestimmten Wellenlänge,
eine Einrichtung für das Erzeugen eines laserinduzierten Fluoreszenzspektrums mit einer Mehrzahl von Wellenlängen mit einer Intensität bei jeder der Mehrzahl von Wellenlängen aus einer Emissionsstrahlung, die durch Wechselwirkung des Anregungslichts mit der Gewebeprobe erzeugt wird,
dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung weiterhin aufweist:
eine Einrichtung für das Berechnen einer Fläche unter dem laserinduzierten Fluoreszenzspektrum, um einen integrierten Bereich zu erzeugen,
eine Einrichtung für das Dividieren der Intensität bei jeder Wellenlänge des laserinduzierten Fluoreszenzspektrums durch die integrierte Fläche unter dem laserinduzierten Fluoreszenzspektrum, um ein normalisiertes Spektrum zu erzeugen, und
eine Einrichtung für das Korrelieren des normalisierten Spektrums mit einem spezifischen Zustand der Gewebeprobe, um das Signal zu erzeugen, das den Zustand darstellt.
[0014] Vorzugsweise weist die Vorrichtung eine Laserquelle auf, die einen Strahl bei 410 nm für Krebs in dem Ösophagus bzw. der Speiseröhre erzeugt.
[0015] Ein zweiter Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung liefert ein Verfahren zur Erzeugung eines Signals, das den Zustand einer Gewebeprobe repräsentiert, das die Schritte aufweist:
Bestrahlen der Gewebeprobe mit einem monochromatischen Anregungslicht mit einer vorbestimmten Wellenlänge,
Produzieren eines laserinduzierten Fluoreszenzspektrums mit einer Mehrzahl von Wellenlängen mit einer Intensität bei jeder der Mehrzahl von Wellenlängen aus der Emissionsstrahlung, die durch die Wechselwirkung des Anregungslichts mit der Gewebeprobe erzeugt wird,
dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren weiterhin aufweist:
Berechnen einer Fläche unter dem laserinduzierten Fluoreszenzspektrum, um eine integrierte Fläche zu erzeugen,
Dividieren der Intensität jeder Wellenlänge des laserinduzierten Fluoreszenzspektrums durch die integrierte Fläche unter dem laserinduzierten Fluoreszenzspektrum, um ein normalisiertes Spektrum zu erzeugen; und
Korrelieren des normalisierten Spektrums mit einem spezifischen Zustand der Gewebeprobe, um das Signal, das den Zustand darstellt, zu erzeugen.
[0016] Geeigneterweise verwenden die Vorrichtung und das Verfahren laserinduzierte Fluoreszenz, wobei die spektralen Veränderungen weniger von der spektralen Intensität abhängen und daher den Zustand eines Gewebes zuverlässiger anzeigen.
[0017] Entsprechend werden kleine Veränderungen in schwachen Signalen von malignen Geweben durch die differentielle Normalisierungsprozedur für eine verbesserte Analyse verstärkt.
[0018] Andere Gegenstände, Vorteile und hervorragende Eigenschaften der Erfindung werden aus der folgenden detaillierten Beschreibung offensichtlich, die mit Bezug auf die beiliegenden Figuren betrachtet bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung offenbaret.

## Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0019] **Fig.** 1 ist eine schematische Ansicht einer Vorrichtung eines differentiellen normalisierten Fluoreszenzdiagnoseverfahrens der vorliegenden Erfindung,
[0020] **Fig.** 2(a) und 2(b) sind Graphen, die eine Fluoreszenzemission eines normalen Gewebes zeigen, wobei entsprechende nicht-normalisierte Daten verwendet werden,
[0021] **Fig.** 3 ist ein Graph, der (a) die DNF einer normalen Ösophagus Mucosa und (b) die DNF eines Ösophagus Adenokarzinoms zeigen, wobei die Kurve (b) eine negative Spitze bei 475–480 nm zeigt, die charakteristisch für malignes Gewebe in dem Ösophagus ist,
[0022] **Fig.** 4 ist ein Graph, der einen differentiellen normalisierten Index bei 480 nm zeigt, wobei Ergebnisse einer histopathologischen Untersuchung in dem Graph für normale Gewebe und maligne Gewebe markiert sind, und
[0023] **Fig.** 5 ist ein Graph, der gemittelte differentielle normalisierte Fluoreszenzwerte bei 480 nm für verschiedene Gewebe darstellt.

## Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0024] Gemäß **Fig.** 1 kann ein Instrument **10** zum Ausführen von Krebsdiagnose in vivo in einem Betriebs-

raum eines Krankenhauses oder einem anderen geeigneten Untersuchungsraum aufgebaut werden. Eine Quelle **12** von monochromatischem Anregungslicht erzeugt einen gepulsten Strahl, der auf eine bestimmte Wellenlänge mit einem Farbstoffkopf (DYE) **14** abgestimmt wird. Zur Erkennung und Differenzierung von normalen und malignen Tumoren in dem Ösophagus, ist die Quelle **12** vorzugsweise ein gepulster, Stickstoff gepumpter Farbstoftlaser (Modell LN300C Laser Photonics, Inc., Orlando, Florida, USA), der auf 410 nm abgestimmt ist.

[0025] Der gepulste Ausgangsstrahl läuft durch eine fokussierende Linse **16** und in ein gegabeltes optisches Faserbündel **18**. Das Bündel **18** umfaßt zum Beispiel sieben Fasern mit 200 μm Durchmesser zur Anregung und zwölf Fasern mit 200 μm für die Emission. Das Bündel ist so konstruiert, daß es in den Biopsiekanal eines Endoskops **20** eingeführt werden kann. Das distale Ende des Bündels grenzt an das zu analysierende in vivo Gewebe und berührt vorzugsweise das Gewebe (obwohl dies nicht notwendig ist).

[0026] Emissionsstrahlung in der Form von laserinduzierter Fluoreszenz wird durch das Bündel **18** zu einer fokussierenden Linse **22**, die optional ist und dann an eine Sensoreinrichtung geleitet. Die Sensoreinrichtung kann einen Spektrograph (SPEC.) **24** und einen Mehrkanaldetektor (DET.) **26** aufweisen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Detektor **26** eine verstärkte Photodiodenanordnung (Model OMA III, EG & G Princeton Applied Research, Princeton, New Jersey, USA), die mit einem Spektrographen (Modell 1235 EG & G) zur spektralen Aufspaltung ausgestattet ist.

[0027] Alternativ können ein Polychromator oder andere Lichtdetektoren verwendet werden.

[0028] Das Ausgangssignal von dem Lichtdetektor wird an einen Computer 28 geleitet, der mit einer kommerziell erhältlichen Datenerfassungssoftware ausgestattet ist.

[0029] In einer altemativen Ausführungsform kann der Detektor ein über ein Gate geschalteter Mehrkanaldetektor sein, der in einer zeitaufgelösten Betriebsart mit einer Verzögerungszeit, die auf die Lebensdauer der interessierenden Fluoreszenzkomponenten in den Geweben optimiert ist, betrieben wird. Das Auswählen von geeigneten Gate- und Verzögerungszeiten kann die spektralen Eigenschaften weiter verstärken.

[0030] In noch einer anderen alternativen Ausführungsform kann die Anregungslaserintensität moduliert und der Detektor in einer phasenaufgelösten Betriebsart synchronisiert werden, um die Detektion, Sensitivität und Selektivität zu verbessern.

## Vorgehensweise für klinische Messungen

[0031] Alle Messungen wurden während gastrointestinalen Endoskopieroutineuntersuchungen von Patienten durchgeführt. Die faseroptische Sonde wurde in den Biopsiekanal des Endoskops eingeführt. Das distale Ende der Fluoreszenzsonde ist so angeordnet, daß es die Oberfläche des zu beobachtenden Gewebes leicht berührt. Jede LIF-Messung entspricht Fluoreszenzmessungen für zehn Anregungspulse. Das System ist programmiert, um die Fluoreszenz für jeden Laserpuls aufzunehmen. Eine Hintergrundmessung wird von den akkumulierten Daten abgezogen und die resultierenden Spektren werden in einer speziellen Datendatei abgespeichert. Ein Minimum von drei Messungen wird für jede Gewebestelle aufgezeichnet. Eine kleine Lichtquelle, die nahe an dem Bildschirm des Endoskops angeordnet ist, sendet Blitze für jeden Laserpuls, der an das Gewebe geliefert wird. Diese Blitze erlauben es dem Benutzer des Endoskops, den exakten Ort der Analyse visuell zu bestimmen und einen richtigen Kontakt der Sonde mit dem Gewebe während der Fluoreszenzmessungen sicherzustellen. Das Auslesen für jeden Gewebeort ist in ungefähr 0,6 Sekunden beendet.

[0032] Allgemein zeigen die LIF-Spektren von normalen und malignen Geweben bestimmte Unterschiede bei verschiedenen Wellenlängen. Jedoch ist es schwierig, feine aber konsistente Unterschiede in den Rohdaten zu beobachten, da diese Unterschiede oft von großen Variationen in der Intensität verdeckt werden.

[0033] Ein Beispiel einer Fluoreszenzemission von einem normalen Gewebe und einem malignen Gewebe ist in **Fig.** 2(a) dargestellt. Die Laseranregungswellenlänge wurde zu 410 nm gewählt. Um eine effektive Technik zu entwickeln, die in der Lage ist, normale und maligne Gewebe zu differenzieren, ist es wesentlich, die optimalen experimentellen Bedingungen und Parameter, die die Ergebnisse der LIF-Messungen beeinflussen, zu untersuchen und auszuwählen. Der erste solcher Parameter ist die Laseranregungswellenlänge. Mit einem Stickstofflaser ist die niedrigste verfügbare Anreyungswellenlänge (höchste Energie) 337 nm. Längere Wellenlängen können ausgewählt werden zur Anregung durch Verwenden des abstimmbaren Farbstoffsystems **14** aus **Fig.** 1.

[0034] Allgemein würde die Verwendung von kürzeren Wellenlängen mehr Komponenten anregen, wohingegen die Verwendung von längeren Wellenlängen weniger Komponenten in Geweben anregen würde. Die Auswahl der Laseranregungswellenlänge ist wichtig, da es mit einem festen Anregungslaser nicht möglich ist, alle Gewebekomponenten in einer einzelnen Messung anzuregen. Ein Ansatz ist, so viele Gewebekomponenten bei den Wellenlängen anzuregen, bei denen sie die stärkste Absorption zeigen. Dieser Ansatz jedoch produziert nicht notwendigerweise die besten Ergebnisse, da bestimmte wichtige, aber feine spektrale Änderungen von starken, aber nicht spezifischen Absorptionsbändern verdeckt werden können. Nach dem Ausführen einer Anzahl von Experimenten wurde die 410 nm Laserwellenlänge für bestimmte Krebsarten ausgewählt. Diese

Wellenlänge erzeugt Fluoreszenzspektren, die bestimmte spezifische spektrale Eigenschaften haben, die für die Entwicklung des vorliegenden diagnostischen Verfahrens nützlich sind.

[0035] Die Daten in **Fig.** 2(a) zeigen, daß die Fluoreszenzintensität des malignen Gewebes (rechte Kurve) viel schwächer ist als die des normalen Gewebes (linke Kurve). Jedoch ist diese allgemeine auf der Intensität basierende Beobachtung oft schwierig in der Praxis zu verwenden, da die Intensität der aufgenommenen Fluoreszenzsignale nicht immer ein konsistenter Parameter ist, da sie von vielen Faktoren, einschließlich des Blutflusses, der Hämoglobinabsorption, der Gewebeoberflächenmorphologie, des Abstandes zwischen der Gewebeoberfläche und der Sonde, etc. ist. Für Vergleichszwecke sind die beiden Spektren in **Fig.** 2(a) auf der gleichen Intensitätsskala gezeichnet. Es ist bemerkenswert, daß die Detektion von kleinen spektralen Strukturen in dem schwachen Fluoreszenzsignal des malignen Tumors (**Fig.** 2(a), rechte Kurve) generell schwierig ist.

[0036] Während die Intensität der Fluoreszenz nicht immer ein gleichbleibender Parameter ist, berücksichtigt die vorliegende Erfindung, daß das spektrale Profil jedes Spektrums spezifische Charakteristika enthält, die beständiger sind. Basierend auf dieser Beobachtung verwendet die vorliegende Erfindung die differentielle normalisierte Fluoreszenz (DNF), um kleine, aber gleichbleibende spektrale Unterschiede zwischen den normalen und malignen Geweben zu verstärken.

[0037] Um die spektralen Eigenschaften in den Fluoreszenzspektren von normalen und malignen Geweben zu verstärken und zu vergleichen, verwendet die vorliegende Erfindung ein Normalisierungsverfahren, das die Intensität bei jeder Wellenlänge durch die integrierte Fläche unter dem gesamten Spektrum dividiert. Die normalisierte Fluoreszenzintensität $I_n$ bei Wellenlänge i für die Probe K. d. h. $I_n (K)_i$ ist gegeben durch:

$$I_n (K)_i = I (K)_i/\Sigma I (K)_i, \quad (1)$$

wobei $I (K)_i$ die Fluoreszenz bei Wellenlänge i für die Probe K ist und
$\Sigma_i$ der Summe der Fluoreszenzintensitäten bei allen Wellenlängen i über die untersuchte spektrale Breite entspricht.

[0038] **Fig.** 2(b) stellt den Effekt dieses Verfahrens für das gleiche normale Ösophagusgewebe (linke Kurve) und das gleiche maligne Ösophagusgewebe (rechte Kurve) dar. Dieses Verfahren ist so ausgelegt, daß zwei wichtige Effekte in den Fluoreszenzdaten erzeugt werden. Zuerst erzeugt es einen „Normalisierungs"-Effekt. Da jedes Spektrum in Bezug auf die integrierte Intensität des gesamten Spektrums normalisiert ist, wird das resultierende Spektrum weniger von dem Intensitätsfaktor abhängig.

[0039] Es ist zu bemerken, daß die normalisierte Intensität $I_n (K)_i$ einen dimensionslosen Wert hat, da sie das Verhältnis einer Intensität (Dimension in Photonen) geteilt durch eine Summe von Intensitäten $\Sigma_i I (K)_i$ (die auch eine Dimension in Photonen hat) ist.

[0040] Ein weiterer wichtiger Effekt dieses Normalisierungsverfahrens ist die Verstärkung kleiner spektraler Merkmale in schwachen Fluoreszenzsignalen. Dieser einzigartige Effekt des DNF-Verfahrens ist wesentlich für die Diagnose von malignen Geweben, die im allgemeinen schwache Fluoreszenz zeigen, deren kleinen Merkmale schwierig zu erkennen sind. Als Ergebnis dieses Normalisierungsverfahrens werden die Unterschiede in spektralen Eigenschaften zwischen den normalisierten Fluoreszenzspektren von normalen und malignen Geweben einfacher erkannt (siehe **Fig.** 2(b) Abschnitt: vergleiche linke und rechte Kurve).

[0041] Wie in **Fig.** 2(b) gezeigt, lagen die beiden bemerkenswerten Merkmale der spektralen Eigenschaften bei 460–490 nm und 640–670 nm. Ein verarmtes Gebiet kann bei ungefähr 475–480 nm in den Spektren von malignen Geweben beobachtet werden. Diese spektrale Verarmung spiegelt den Mangel an bestimmten Komponenten (oder Absorption durch manchen Komponenten) in malignen Geweben wieder, die normalerweise bei 460–490 nm fluoreszieren. Diese spektralen Fehlstellen (d. h. „negative Spitzen") liefern ein wichtiges Kriterium für die Diagnose malignen Gewebes. Nach unserer Kenntnis wurde die wichtige spektrale Eigenschaft in keiner vorhergehenden Studie berichtet.

[0042] Ein weiteres wichtiges Merkmal in den normalisierten Fluoreszenzspektren ist, daß bestimmte Bänder zwischen 640 und 670 nm in den Fluoreszenzspektren von malignen Tumoren relativ gesehen intensiver sind als solche von normalen Geweben. Darüber hinaus gibt es auch kleinere spektrale Merkmale, die in der normalisierten Kurve von malignen Geweben (**Fig.** 2(b)) bei 590 und 625 nm bemerkt werden können.

[0043] Unter Verwendung der normalisierten Spektren, haben wir eine DNF-Technik entwickelt, die dafür ausgelegt ist, diese spektralen Unterschiede zwischen normalen und malignen Geweben auszunutzen. Aufgrund der Kenntnis, daß die normalisierten Fluoreszenzspektren von allen normalen Geweben ähnliche spektrale Profile haben, haben wir eine „Basislinienkurve" für normale Gewebe eingeführt. Diese Basislinienkurve wurde als der gewogene Mittelwert normalisierter Fluoreszenzspektren von einem Referenzsatz von normalen Gewebeproben bestimmt. Die Intensität dieser Basislinienkurve, $I_B$, bei Wellenlänge i ist gegeben durch:

$$I_{Bi} = (\frac{1}{n_B}) x \Sigma_B I(B)_i \,, \quad (2)$$

wobei $\Sigma_B$ einem normalen Gewebe B entspricht, das in dem Basisliniensatz verwendet wird.

[0044] Es ist bemerkenswert, daß dieses Verfahren a priori die Identifikation eines Satzes an normalen Geweben (und Patienten) erfordert, um die Basislinienkurven zu bestimmen. Die für die Basislinienkurve notwendigen Daten können anfänglich auf histopathologischen Untersuchungsdaten beruhen. Sobald die Basislinienkurve erzeugt ist, kann sie für alle zukünftigen Messungen verwendet werden und die Fluoreszenzcharakteristiken eines jeden Geweben können mit dieser Basislinierikurve verglichen werden.

[0045] Nach der Erstellung der Basislinienfluoreszenzkurve wurde die DNF-Kurve für eine spezifische interessierende Gewebeprobe als die Differenz zwischen ihrem normalisierten Fluoreszenzspektrum $I_n$ und der Basislinienkurve $I_B$ berechnet. Dieses Verfahren umfaßt das Abziehen der Intensität der Basislinienkurve von der normalisierten Intensitätskurve der interessierenden Probe. Die DNF-Intensität der bestimmten Gewebeprobe K bei Wellenlänge i ist gegeben durch:

$$I_{DNF}(K)_i = I_n(K)_i - I_B \quad (3)$$

[0046] Das DNF-Spektrum, d. h. der Ausdruck der Intensität $I_{DNF}(K)_i$ über der Wellenlänge i ist in **Fig.** 3 dargestellt. Diese Figur zeigt die DNF-Kurven entsprechend einem normalen Gewebe und einem malignen Tumor in Abschnitten A bzw. B nach Abziehen der Basislinienkurve $I_{Bi}$ wie in Gleichung 3 beschrieben. Wie erwartet ist die DNF-Kurve, die einem normalen Gewebe entspricht, eine Linie nahe der horizontalen Basislinie, da es wenig Unterschied zwischen dem normalisierten Fluoreszenzspektrum eines gegebenen normalen Gewebes und dem gewichteten Mittel eines Referenzsatzes an normalem Gewebe $I_{Bi}$ gibt. Auf der anderen Seite erwartet man einige Unterschiede zwischen der normalisierten Fluoreszenz eines malignen Tumors und $I_{BI}$ zu beobachten. Die Ergebnisse des DNF-Verfahrens bestätigten dieses wichtige Merkmal und zeigten deutlich eine negative Spitze bei 475–480 nm für maligne Gewebe, wie in **Fig.** 3 dargestellt.

[0047] Die $I_{DNF}$-Werte bei 480 nm sind in **Fig.** 4 für einen Satz von Proben für eine Datenbasis von 300 Messungen über 80 Patienten gezeigt. Biopsien von normalen und malignen Gewebeproben von Patienten, die mit laserinduzierter Fluoreszenz untersucht wurden, wurden auch histopathologisch mit den in **Fig.** 4 gezeigten Ergebnissen untersucht. Die normalen Gewebe sind durch einen Punkt (.) gekennzeichnet, und die malignen Gewebe sind durch ein Kreuz (+) gekennzeichnet. Die Ergebnisse zeigen, daß alle 35 malignen Tumore einen negativen DNF-1-Index mit einem Wert kleiner als $-7{,}5 \times 10^{-4}$ haben, was der negativen Spitze in der Fluoreszenz malignen Gewebes, die zuvor in **Fig.** 2 diskutiert wurde, entspricht. Auf der anderen Seite sind die Werte des DNF-1-Index von allen 79 normalen Geweben, mit Ausnahme von drei Proben, wie erwartet um null herum verteilt (zwischen $-5 \times 10^{-4}$ und $5 \times 10^{-4}$), da sie von den Unterschieden zwischen der normalisierten Fluoreszenzkurve eines normalen Gewebes und der Basislinienkurve eines Satzes von normalen Geweben stammen.

## Klassifikation von Karzinomen und normalem Gewebe

[0048] In einer Studie, die das Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet, wurden die Daten, die sich auf die ersten 30 Patienten beziehen, den Forschern zugänglich gemacht, um sie mit Fluoreszenzdaten zu vergleichen, die Basislinienkurve zu berechnen und das DNF-Modell zu entwickeln. Nach dieser anfänglichen Phase waren alle Messungen „Blindversuche", und das DNF-Modell wurde verwendet, um die Diagnose der Gewebe für alle anderen Patienten „vorherzusagen". Für diese Blindversuche waren histopathologischen Testergebnisse den Forschern a priori unbekannt.

[0049] Wie in **Fig.** 4 gezeigt, ist die Klassifikation der malignen Gewebe, wobei die DNF-1-Indizes verwendet wurden, in exzellenter Übereinstimmung mit histopathologischen Ergebnissen für den Satz von Patienten, der in dieser Studie betrachtet wurde. In dem in **Fig.** 4 gezeigten Datensatz sind alle 35 malignen Geweben, die mit dem DNF-Verfahren erkannt wurden, in exzellenter Übereinstimmung mit den Biopsieergebnissen. Von 77 normalen Geweben, die mit dem DNF-Verfahren als normal klassifiziert wurden, wurde nur eines durch histopathologische Untersuchungen als maligne festgestellt. Obwohl die exakten Ursachen dieser Fehlklassifikation nicht komplett verstanden ist, könnte eine Möglichkeit sein, daß die von der optischen Technik untersuchte Fläche nicht exakt der gleiche Ort war, an dem die Biopsie gemacht wurde. Andere DNF-Messungen an diesem Patienten wurden richtig klassifiziert.

[0050] Zwei interessante Fälle sind in **Fig.** 4 mit Sternchen (*) gezeigt. Diese zwei Proben, die vom selben Patienten kommen, wurden erst als normales Gewebe durch das konventionelle Biopsieverfahren diagnostiziert. Jedoch klassifizierte das laser-basierte DNF-Verfahren diese Proben als maligne. Es wurde entschieden, den Patienten einer erneuten Diagnose zu unterziehen, wobei ein unabhängiges Verfahren (d. h. ein CAT-Scanverfahren) verwendet wurde. Die computerunterstützten Tomographie (CAT) Scanverfahren deckten auf, daß dieser Patient Lungenkrebs hatte, der in Bereiche gestreut hatte, die eine Zwischenlage der Ösophagus-Mucosa bilden. Dieses Beispiel unterstreicht die Effektivität der optischen DNF-Technik, malignes Gewebe zu diagnostizieren, das von dem konventionellen Biopsieverfahren fehldiagnostiziert worden wären.

[0051] Es ist anzumerken, daß diese Studie die normal normalisierten (d. h. 0-ter Ordnung) Spektren

(**Fig.** 2(b)) und DNF-Kurven 0-ter Ordnung (**Fig.** 3) verwenden. In bestimmten Fällen können kleine spektrale Merkmale in den Kurven durch Verwenden von Kurven mit 1. Ableitung, 2. Ableitung oder n-ter Ableitung weiter verstärkt werden.

Analyse des Barrettschen Ösophagus

[0052] Zusätzlich zu normalen und malignen Geweben gibt es einen Typ von Dysplasie, die Barrettscher Ösophagus bzw. Ösophagus mit Barett-Syndrom genannt wird, die mit konventioneller Endoskopie schwierig zu erkennen ist. **Fig.** 5 zeigt die gemittelten Werte des DNF-Index bei 480 nm entsprechend verschiedener Typen von Geweben: normaler Ösophagus, normaler Barrettscher Mucosa (BAR.-N), niedrige bis moderate Dysplasie (BAR.LM), moderate bis schwere Dysplasie (BAR.MS), schwere Dysplasie (BAR.S) und Karzinom.
[0053] Um die Ergebnisse in **Fig.** 5 zu diskutieren, ist es nützlich, die Natur der Barrettschen Gewebe zu verstehen. Der Barrettsche Ösophagus, eine progressive kolumnare Metaplasie der unteren Speiseröhre, ist ein prämaligner Zustand mit einem erhöhten Risiko eines Adenokarzinoms. In dieser Arbeit ist das diagnostische Verfahren für den Barrettschen Ösophagus verschieden von normalem Karzinomgewebe. Karzinome Gewebe sind oft eindeutige Fälle, die visuell von dem Arzt durch sein oder ihr Endoskop gesehen werden können. Daher war es möglich, eine optische LIF-Messung in einem spezifischen Bereich durchzuführen und später eine Biopsie an der gleichen Stelle durchzuführen. Mit diesem Verfahren ist es möglich, einen präzisen (1 : 1) Vergleich zwischen den zwei Verfahren für einen Typ von Gewebe zu haben. Barrettsche Gewebe entsprechen oft visuell nicht eindeutigen Fällen. In dem Barrettschen Ösophagus ist die ursprüngliche schuppenartige Epitelzellenauskleidung des Ösophagus durch eine metaplastische kolumnarartige Epitel ersetzt, wobei dies oftmals eine Mischung von Gewebeinseln von kolumnarem Epitel mit diffusen Begrenzungen zur Folge hat.
[0054] Zum Testen der vorliegenden Techniken erfolgte zunächst eine schnelle Durchführung von LIF-Messungen und dann wurden die Biopsien in den gleichen Bereichen genommen. Ungefähr 5– 7 LIF-Messungen an verschiedenen Orten können in der gleichen Zeit genommen werden, die für eine reguläre Biopsie benötigt wird. Obwohl große Sorgfalt darauf verwendet wurde, die Biopsien in den Bereichen durchzuführen, die zuvor mit LIF gemessen wurden, ist es oft schwer, die exakten Orte der Barrettschen Gewebe zu finden, die zuvor durch LIF analysiert wurden. Daher ist es für Barrettsches Ösaphagusgewebe nicht möglich, einen präzisen exakten Vergleich zwischen den optischen DNF-Ergebnissen und den Biopsiedaten zu haben.
[0055] Die sich auf den Barrettsche Ösophagus beziehenden Daten werden mit den gemittelten DNF-Werten der Barrettschen Gewebe präsentiert, die in den verschiedenen Klassifikationen angeordnet sind, die von dem Pathologen verwendet werden, d. h. BAR.N, BA.M-L, BARM-S, BARS.
[0056] Die Ergebnisse in **Fig.** 5 deuten an, daß der DNF-Index bei 480 nm einen interessanten generellen Trend zeigt: je schwerer die Barrettsche Dysplasie ist, desto negativer werden die gemittelten DNF-Indexwerte. Zum Beispiel haben Gewebe, die hinsichtlich des Barrett-Syndroms als normal und als niedrig bis mittel eingestuft werden, DNF-Werte nahe bei null (d. h. ähnlich wie normale Gewebe). Gewebe, die von dem Pathologen hinsichtlich des Barrett-Syndroms als mittel bis schwer eingestuft werden, haben einen gemittelten DNF-Wert von ungefähr $7{,}5 \times 10^{-4}$, wohingegen hinsichtlich des Barrett-Syndroms als schwer eingestufte Gewebe DNF-Werte bei ungefähr $15 \times 10^{-4}$ haben. Karzinome Gewebe haben einen gemittelten DNF-Wert bei ungefähr $17 \times 10^{-4}$. Es ist bemerkenswert, daß diese Ergebnisse einen generellen Trend liefern, der verwendet werden könnte, um die Diagnose von Dysplasien im Barrettschen Ösophagus zu verbessern. Verbesserte Verfahren zur Diagnose von Barrettschen Dysplasien im Ösophagus werden im Moment in unseren Laboratorien untersucht.
[0057] Die vorliegende Erfindung liefert eine einzigartige Technik, die effektive Indizes zum Diagnostizieren maligner Tumore in der Speiseröhre liefern kann. Die DNF-Indizes, die von in vivo laserinduzierten Fluoreszenzmessungen abgeleitet werden, haben exzellente Ergebnisse in der Diagnose von malignen Tumoren in der Speiseröhre geliefert. Bei den insgesamt 114 untersuchten Proben gibt es nur einen Fall, bei dem das DNF-Ergebnis von den Biopsiedaten abweicht. Es gibt zwei Proben, in denen das DNF-Verfahren die Bösartigkeit in Geweben offenbart, die von dem Biopsieverfahren übersehen wurden.
[0058] Das DNF-Verfahren liefert auch einen generellen Trend, der der Schwere einer Dysplasie für einen Barrettschen Ösophagus entspricht. Daher kann die Verwendung des vorliegenden DNF-Verfahrens eine schnelle in vivo Technik zur Krebsdiagnose liefern, die keine Biopsie erfordert und daher die Zeit und Kosten von Krebsvorsorge und Behandlung reduziert.
[0059] Während vorteilhafte Ausführungsformen gewählt wurden, um die Erfindung darzustellen, ist es für Fachleute offensichtlich, daß verschiedene Änderungen und Modifikationen daran gemacht werden können, ohne von dem Geist der Erfindung, wie in den angehängten Ansprüchen definiert, abzuweichen.

**Patentansprüche**

1. Vorrichtung für das Erzeugen eines Signals, das den Zustand einer Gewebeprobe repräsentiert, die auf-

weist:
eine Einrichtung für das Bestrahlen (**12**) der Gewebeprobe mit einem monochromatischen Anregungslicht mit einer vorbestimmten Wellenlänge,
eine Einrichtung für das Erzeugen (**18**) eines laserinduzierten Fluoreszenzspektrums mit einer Mehrzahl von Wellenlängen mit einer Intensität bei jeder der Mehrzahl von Wellenlängen aus einer Emissionsstrahlung, die durch die Wechselwirkung des Anregungslichts mit der Gewebeprobe erzeugt wird,
**dadurch gekennzeichnet**, daß die Vorrichtung weiterhin aufweist:
eine Einrichtung für das Berechnen (**28**) einer Fläche unter dem laserinduzierten Fluoreszenzspektrum, um einen integrierten Bereich zu erzeugen,
eine Einrichtung für das Dividieren der Intensität bei jeder Wellenlänge des laserinduzierten Fluoreszenzspektrums durch die integrierte Fläche unter dem laserinduzierten Fluoreszenzspektrum, um ein normalisiertes Spektrum zu erzeugen, und
eine Einrichtung für das Korrelieren (**28**) des normalisierten Spektrums mit einem spezifischen Zustand der Gewebeprobe, um das Signal zu erzeugen, das den Zustand darstellt.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, die weiterhin aufweist eine Einrichtung für das Subtrahieren (**28**) des normalisierten Spektrums von einem Mittelwert eines Referenzsatzes von harmonisierten Spektren von normalen Geweben, um eine differentielle normalisierte Fluoreszenzkurve (DNF) zu erzeugen.

3. Vorrichtung nach Anspruch 2, die weiterhin aufweist eine Einrichtung für das Korrelieren des differentiellen normalisierten Spektrums mit einem spezifischen Zustand der Gewebeprobe.

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Bestrahlungseinrichtung (**12**) einen Laser mit einer Wellenlänge von etwa 410 nm aufweist.

5. Vorrichtung nach Anspruch 4, wobei die Bestrahlungseinrichtung (**12**) weiterhin ein Endoskop (**20**) und ein faseroptisches Bündel (**18**) für das Leiten von Anregungslicht in das Endoskop (**20**) und das Erfassen von Emissionsstrahlung von dem Gewebe durch ein anderes faseroptisches Bündel aufweist.

6. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Bestrahlungseinrichtung (**12**) einen gepulsten Laser aufweist und die Korrelationseinrichtung ein gategesteuerter Fotodetektor (**26**) ist, der derart angeordnet ist, daß er in einem zeitaufgelösten Modus arbeitet.

7. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Bestrahlungseinrichtung (**12**) einen gepulsten Laser mit einer Wellenlänge von etwa 410 nm aufweist und die Korrelationseinrichtung ein gategesteuerter Fotodetektor (**26**) ist, der derart angeordnet ist, daß er in einem zeitaufgelösten Modus arbeitet.

8. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Bestrahlungseinrichtung (**12**) einen modulierten Laser aufweist und die Korrelationseinrichtung einen synchronisierten Fotodetektor (**26**) aufweist, der derart angeordnet ist, daß er in einem phasenaufgelösten Modus arbeitet.

9. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Bestrahlungseinrichtung (**12**) einen Laser aufweist, der ein amplitudenmoduliertes Licht mit etwa 410 nm erzeugt, und die Korrelationseinrichtung einen synchronisierten Detektor (**26**) aufweist, der derart angeordnet ist, daß er in einem phasenaufgelösten Modus arbeitet.

10. Vorrichtung nach Anspruch 4, wobei die Korrelationseinrichtung (**28**) eine Einrichtung für das Analysieren des analysierten Spektrums bei etwa 480 nm aufweist.

11. Vorrichtung nach Anspruch 4, wobei die Korrelationseinrichtung (**28**) eine Einrichtung für das Analysieren des normalisierten Spektrums bei etwa 660 nm aufweist.

12. Verfahren zum Erzeugen eines Signals, das den Zustand einer Gewebeprobe darstellt, das die Schritte aufweist:
Bestrahlen der Gewebeprobe mit einem monochromatischen Anregungslicht mit einer vorbestimmten Wellenlänge,
Produzieren eines laserinduzierten Fluoreszenzspektrums mit einer Mehrzahl von Wellenlängen mit einer Intensität bei jeder der Mehrzahl von Wellenlängen aus der Emissionsstrahlung, die durch die Wechselwirkung des Anregungslichts mit der Gewebeprobe erzeugt wird,
dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren weiterhin aufweist:
Berechnen einer Fläche unter dem laserinduzierten Fluoreszenzspektrum, um eine integrierte Fläche zu er-

zeugen,
Dividieren der Intensität jeder Wellenlänge des laserinduzierten Fluoreszenzspektrums durch die integrierte Fläche unter dem laserinduzierten Fluoreszenzspektrum, um ein normalisiertes Spektrum zu erzeugen, und
Korrelieren des normalisierten Spektrums mit einem spezifischen Zustand der Gewebeprobe, um das Signal, das den Zustand darstellt, zu erzeugen.

13. Verfahren nach Anspruch 12, das weiterhin die Schritte aufweist des Subtrahierens des normalisierten Spektrums von dem Durchschnittswert eines Referenzsatzes eines harmonisierten Spektrums von normalen Geweben, um eine differentielle normalisierte Fluoreszenzkurve (DNF) zu erzeugen.

14. Verfahren nach Anspruch 13, das weiterhin den Schritt aufweist des Korrelierens des differentiellen normalisierten Spektrums mit einem spezifischen Zustand der Gewebeprobe.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der Korrelationsschritt das Belichten bzw. Bestrahlen der Gewebeprobe mit einem monochromatischen Anregungslicht mit einer Wellenlänge von etwa 410 nm aufweist.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei der Korrelationsschritt das vorherige Identifizieren eines Satzes von normalen Geweben, um eine Basislinie zu etablieren, das Teilen der Intensität bei jeder Wellenlänge des Spektrums durch die integrierte Fläche unter dem Spektrum, um ein normalisiertes Spektrum zu erzeugen, und das Vergleichen des normalisierten Spektrums mit der Basislinie aufweist.

17. Verfahren nach Anspruch 15, wobei der Korrelationsschritt das Bestimmen einer Wellenlänge aufweist, bei der normales Gewebe fluoresziert, und das Identifizieren von Verringerungen in der Fluoreszenz von normalem Gewebe aufweist.

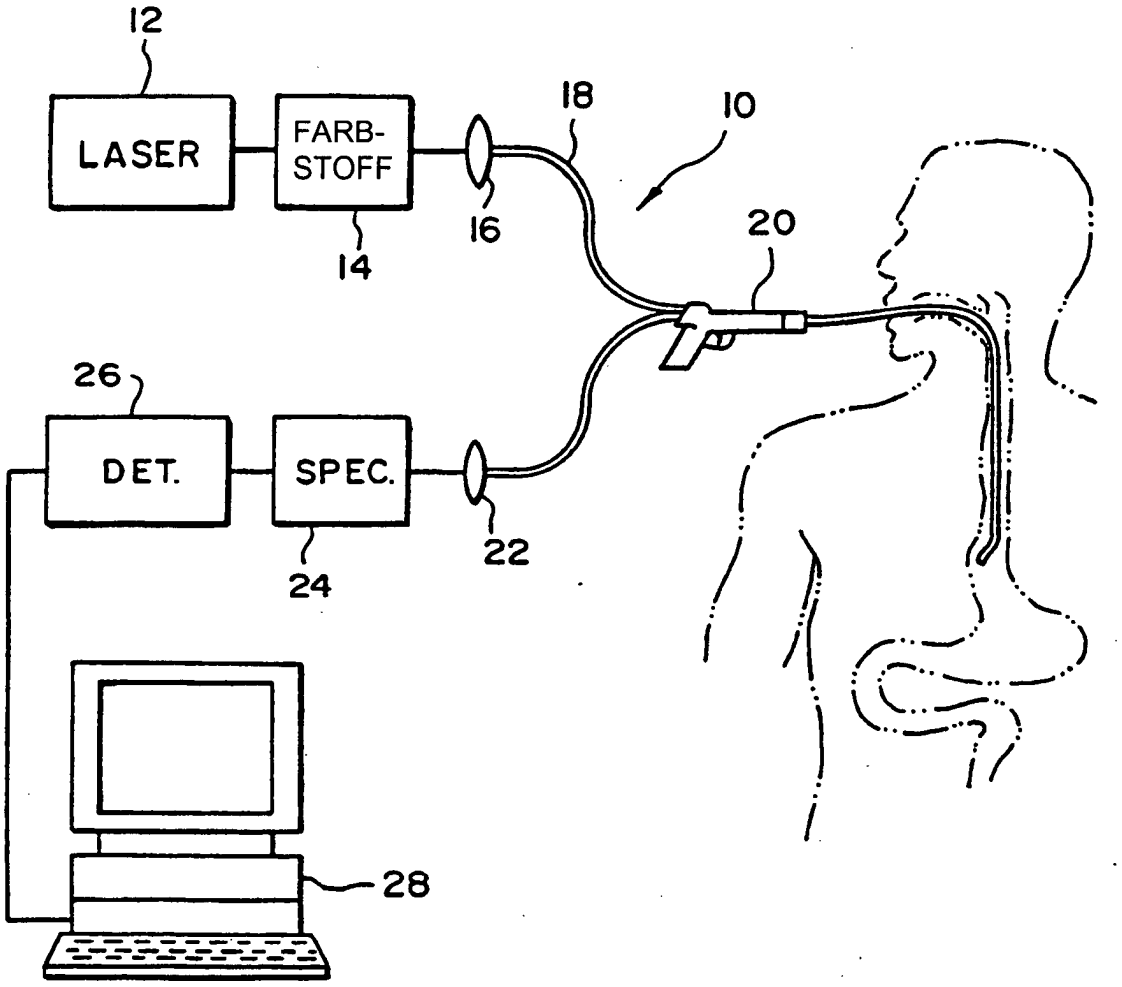
18. Verfahren nach Anspruch 15, wobei der Korrelationsschritt das Vergleichen der Kurven der ersten und/oder zweiten oder n-ten Ableitung des normalisierten Spektrums aufweist.

19. Verfahren nach Anspruch 16, wobei der Korrelationsschritt das Vergleichen der Kurven der ersten, zweiten oder n-ten Ableitungskurven der differentiellen normalisierten Fluoreszenzspektren aufweist.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

**Anhängende Zeichnungen**

FIG. 1



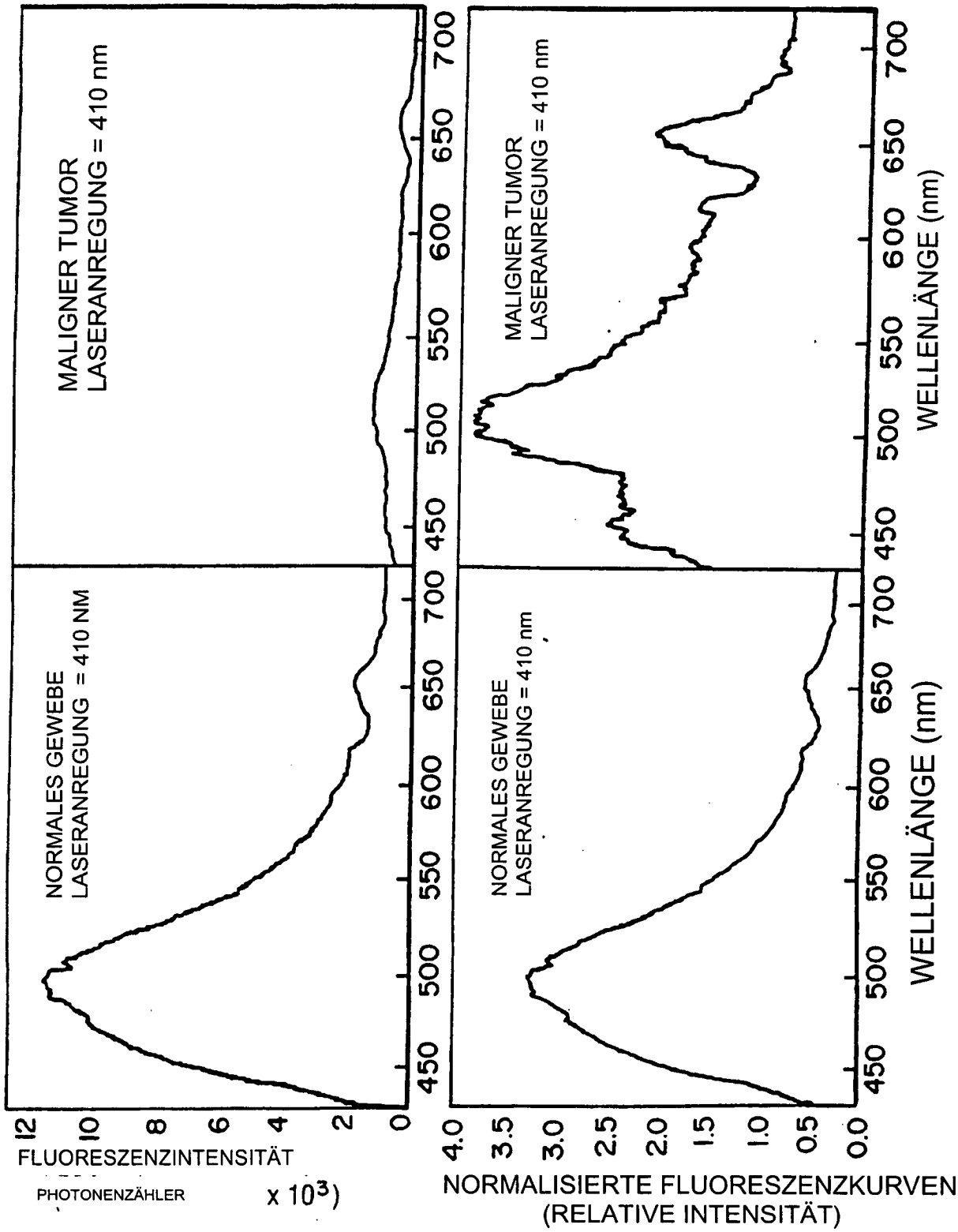

MALIGNER TUMOR
LASERANREGUNG = 410 nm
NORMALES GEWEBE
LASERANREGUNG = 410 NM
FLUORESZENZINTENSITÄT
PHOTONENZÄHLER
x 10³)
0
2
4
6
8
10
12
450
500
550
600
650
700
MALIGNER TUMOR
LASERANREGUNG = 410 nm
NORMALES GEWEBE
LASERANREGUNG = 410 nm
NORMALISIERTE FLUORESZENZKURVEN
(RELATIVE INTENSITÄT)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
WELLENLÄNGE (nm)
WELLENLÄNGE (nm)

FIG. 2

FIG. 3

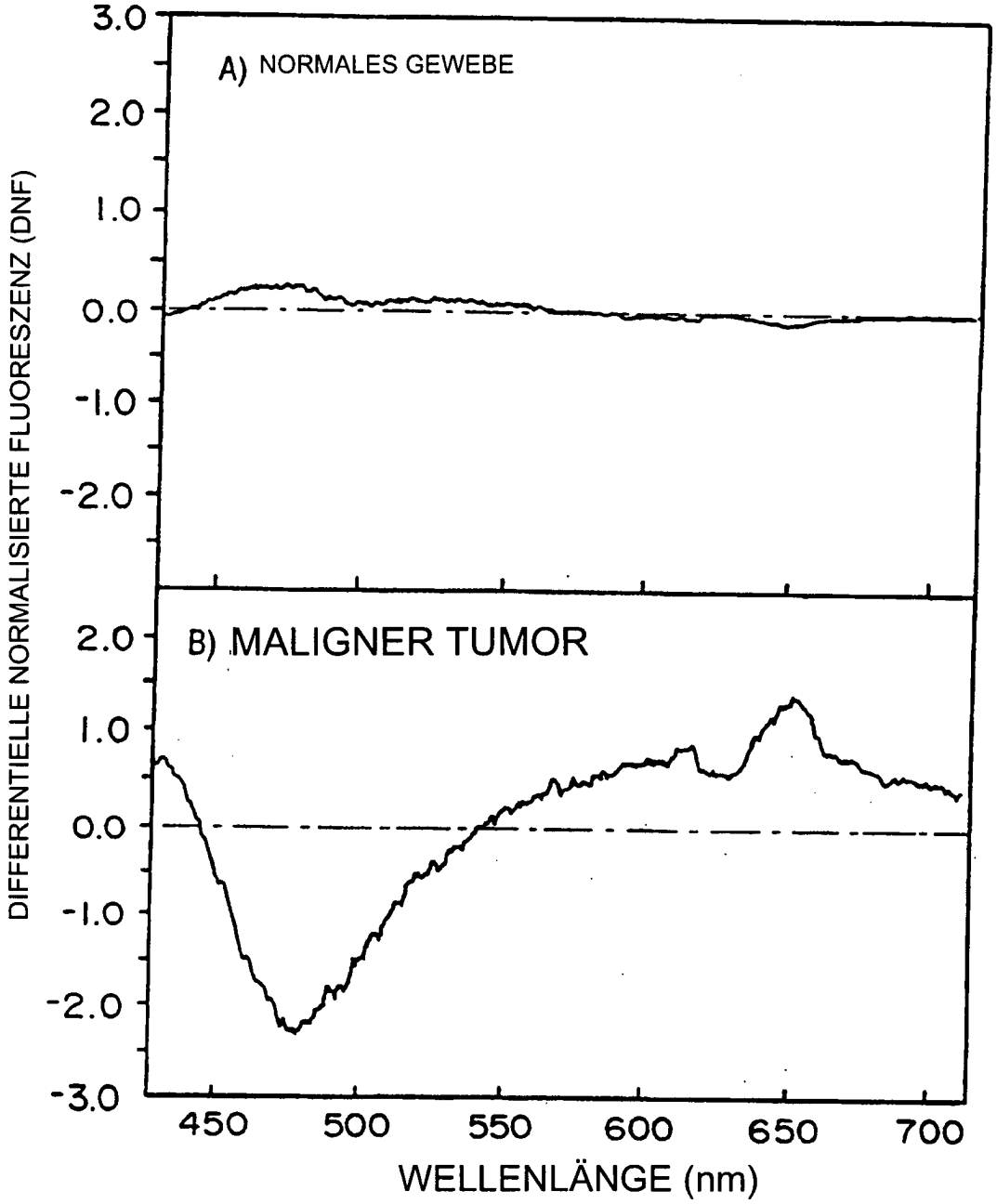

A) NORMALES GEWEBE
B) MALIGNER TUMOR
DIFFERENTIELLE NORMALISIERTE FLUORESZENZ (DNF)
3.0
2.0
1.0
0.0
-1.0
-2.0
-3.0
450
500
550
600
650
700
WELLENLÄNGE (nm)

FIG. 4

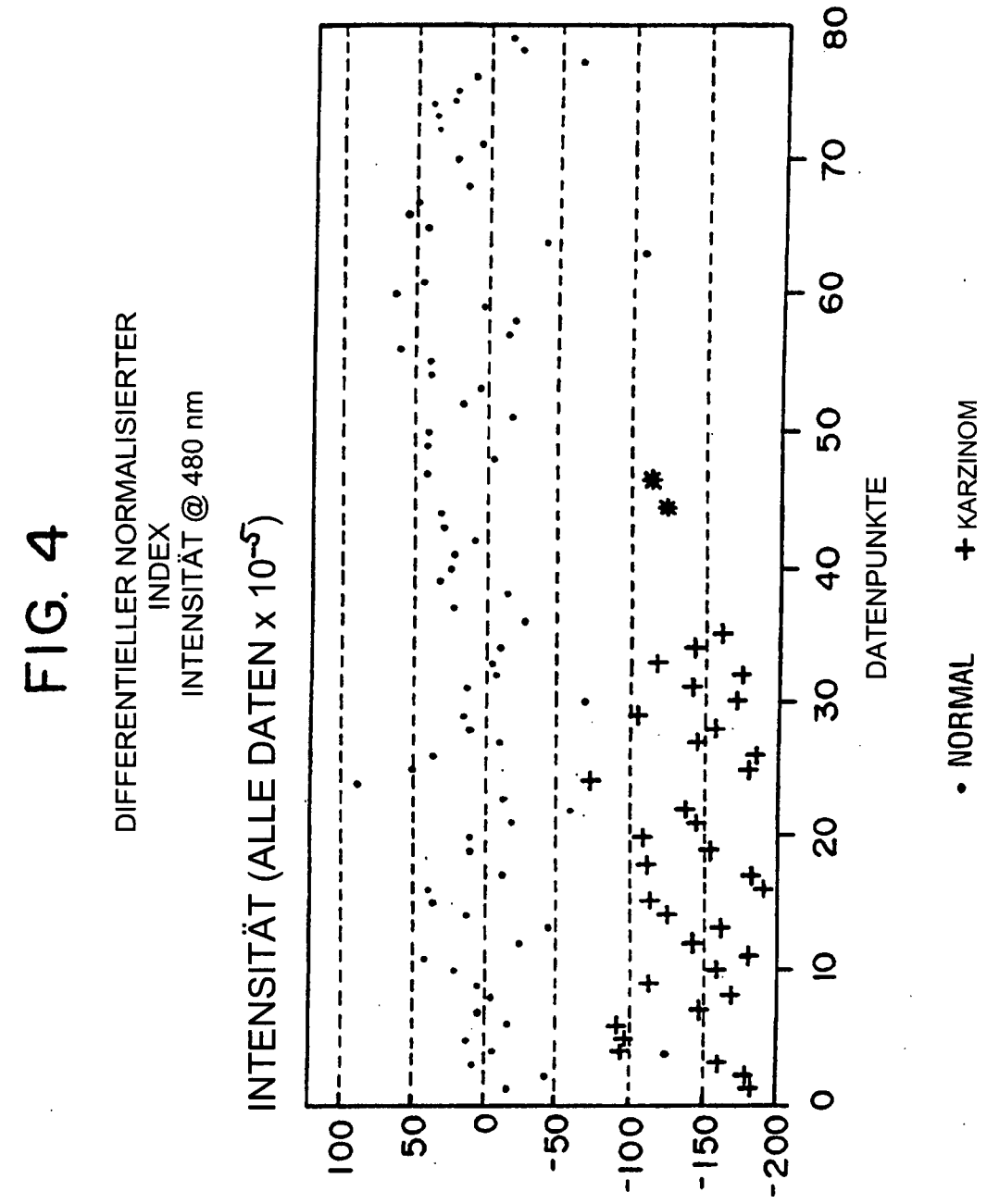
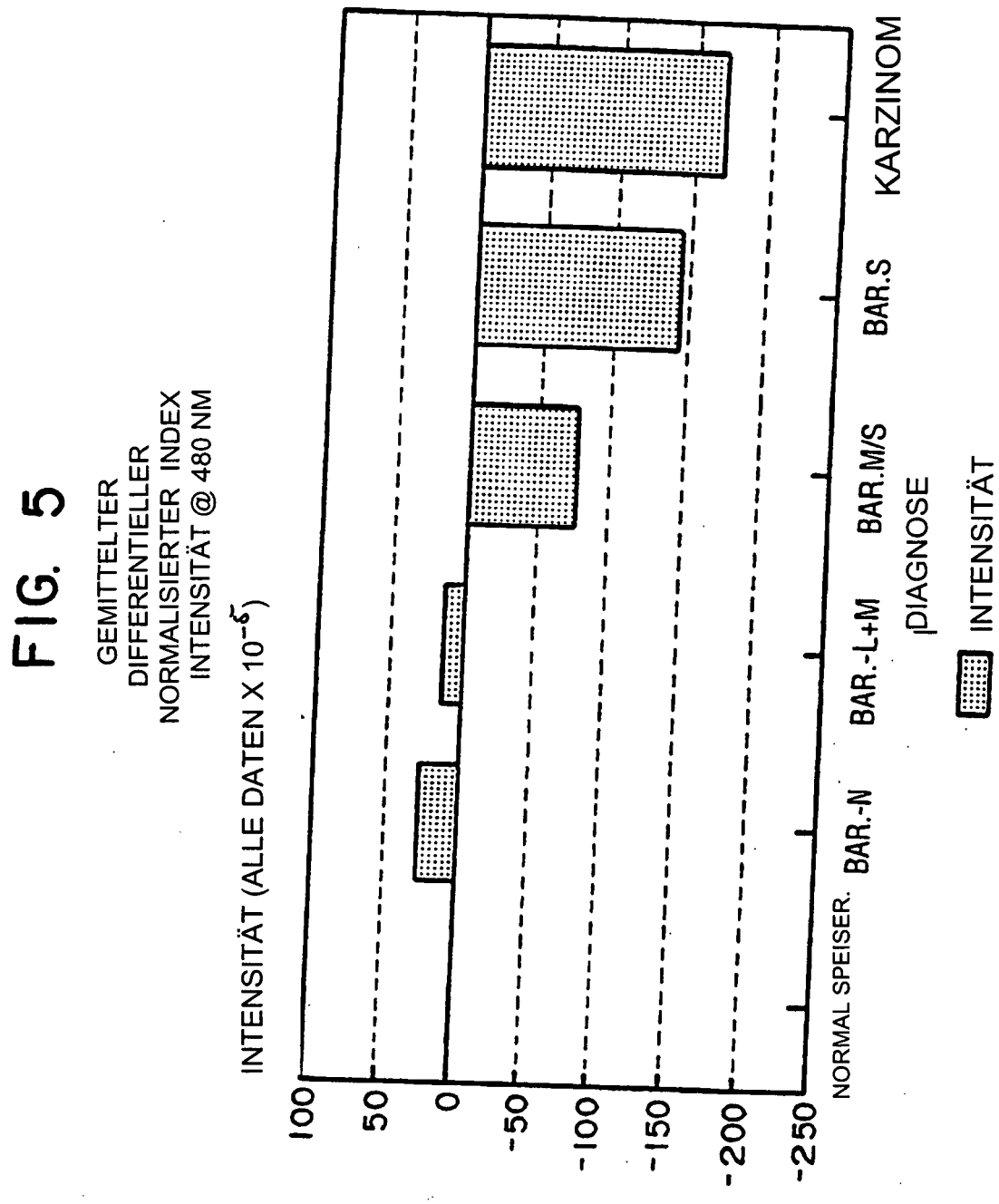

DIFFERENTIELLER NORMALISIERTER
INDEX
INTENSITÄT @ 480 nm
INTENSITÄT (ALLE DATEN x $10^{-5}$)
100
50
0
-50
-100
-150
-200
0
10
20
30
40
50
60
70
80
DATENPUNKTE
• NORMAL
+ KARZINOM

FIG. 5


GEMITTELTER
DIFFERENTIELLER
NORMALISIERTER INDEX
INTENSITÄT @ 480 NM
INTENSITÄT (ALLE DATEN X $10^{-6}$)
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
NORMAL SPEISER.
BAR.-N
BAR.-L+M
BAR.M/S
BAR.S
KARZINOM
DIAGNOSE
INTENSITÄT