

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6443934号  
(P6443934)

(45) 発行日 平成30年12月26日(2018.12.26)

(24) 登録日 平成30年12月7日(2018.12.7)

(51) Int.Cl.

A61B 10/00 (2006.01)  
A61B 5/055 (2006.01)

F 1

A 6 1 B 10/00 E  
A 6 1 B 10/00 T  
A 6 1 B 5/05 3 9 0  
A 6 1 B 5/05 3 8 3

請求項の数 12 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2015-519182 (P2015-519182)  
 (86) (22) 出願日 平成25年7月1日 (2013.7.1)  
 (65) 公表番号 特表2015-525587 (P2015-525587A)  
 (43) 公表日 平成27年9月7日 (2015.9.7)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2013/063878  
 (87) 國際公開番号 WO2014/006012  
 (87) 國際公開日 平成26年1月9日 (2014.1.9)  
 審査請求日 平成28年6月28日 (2016.6.28)  
 (31) 優先権主張番号 61/666,899  
 (32) 優先日 平成24年7月1日 (2012.7.1)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 61/771,131  
 (32) 優先日 平成25年3月1日 (2013.3.1)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 511268627  
 ルミト・アーベー  
 スウェーデン ルンド エス・イー-2 2  
 6 4 3 マギストラツヴェーゲン 1  
 O  
 (74) 代理人 100082072  
 弁理士 清原 義博  
 (72) 発明者 アンダーソン, エンゲルス, ステファン  
 スウェーデン エス-2 2 2 2 4 ルン  
 ド ストラ・フィスカレガタン 9 エフ  
 (72) 発明者 シュ, カン  
 スウェーデン エス-2 2 6 4 8 ルン  
 ド レゲルグレンデン 3 6

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】散乱媒体中の改善された拡散ルミネセンスイメージングまたは断層撮影法のためのシステム

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

散乱媒体中の関心領域の拡散ルミネセンス分子イメージング用のシステム(600)であつて、

前記システムは、

散乱媒体の前記ルミネセンス分子イメージングで使用するルミネセンスマーカー(502)であつて、前記ルミネセンスマーカーは散乱媒体に配置された非線形のルミネセンスマーカーである、ルミネセンスマーカー(502)と、

1又は2以上の光源(503)であつて、励起光によって前記ルミネセンスマーカーを励起するための少なくとも1つの光源位置(505と506)によって位置づけられ、該励起光は前記1又は2以上の光源によって励起容量部内へ発光されてなる1又は2以上の光源(503)と、

前記励起光によるルミネセンスマーカーからのルミネセンス光を検知する位置における検出器(504)

を備え、前記励起光がパルス励起光を含んでなるシステムであつて、

前記システムが、さらに、

寿命計算などの前記非線形のルミネセンスマーカーのエネルギーレベル遷移条件の計算に基づいて前記励起光のパルスの長さを決定するために動作可能である演算処理装置(603)と、パルスの長さ(w)などの少なくとも1つのパルスのパルス特性を、前記非線形のルミネセンスマーカーの発光・プロセスに関する励起状態の寿命と一致させる制御ユ

10

20

ニット(605)を備え、これによって、アップコンバートされた光の発光に関連する非線形のルミネセンスマーカーのエネルギー準位の所望の個体群に実質的に供給し、アップコンバーターで変換された光が効率的なやり方で出力されることを特徴とするシステム。

【請求項2】

前記励起光のパルスに続く時間間隔(210)の間にルミネセンスを検知するために動作可能な検出器ユニット(601)を含む請求項1記載のシステム。

【請求項3】

時間(t)の関数として前記パルス励起光のパワー密度を変化させるために動作可能な制御ユニット(602)と、前記パワー密度へのルミネセンスの量子収量依存性(Q/1)を決定し、かつ量子収量依存に基づいた前記散乱ミディアム中の前記マーカー位置の相対的な深さ座標(203)を決定するために動作可能な第2の処理装置(604)を含む請求項1又は2に記載のシステム。

10

【請求項4】

前記ルミネセンスマーカーはルミネセンス生物学マーカーであり、前記散乱媒体がヒト又は動物の組織であり、前記ルミネセンス生物学マーカーが前記組織内に配置される請求項1乃至3のいずれかに記載のシステム。

【請求項5】

前記ルミネセンスマーカーはナトリウムイットリウム四フッ化素(NaYF<sub>4</sub>)のナノサイズのアップコンバーティング粒子であり、Yb<sup>3+</sup>/Er<sup>3+</sup>又はYb<sup>3+</sup>/Tm<sup>3+</sup>のいずれかで共ドープされた請求項1乃至4のいずれかに記載のシステム。

20

【請求項6】

前記ルミネセンスマーカーは、水溶性である粒子を含むナノサイズのアップコンバーティング粒子および/または極性を有する構造で覆われた粒子および/または水酸基を有しアップコンバーティング粒子の表面に付けられた粒子を含む請求項1乃至5のいずれかに記載のシステム。

【請求項7】

前記ルミネセンスマーカーは保護コーティングを有する請求項1乃至6のいずれかに記載のシステム。

【請求項8】

前記システムはルミネセンス分子断層撮影法のために用いられる請求項1乃至7のいずれかに記載のシステム。

30

【請求項9】

前記ルミネセンスイメージング用のモダリティと異なるイメージングモダリティのためのイメージングコントラストに前記非線形のマーカーが付けられている請求項1乃至8のいずれかに記載のシステム。

【請求項10】

前記非線形のマーカーは、常磁性を有する、有機ガドリニウム複合体又はガドリニウム化合物に付けられ、および、前記システムは、さらにMRIとルミネセンス分子断層撮影法によって関心領域の同時イメージング用の磁気共鳴画像(MRI)装置を含む請求項1乃至9のいずれかに記載のシステム。

40

【請求項11】

前記励起光は前記第1光源位置からの第1の波長を有する第1光源と、および前記第2光源位置からの第2の波長を有する第2の光源によって提供される請求項1乃至10のいずれかに記載のシステム。

【請求項12】

前記励起光は、前記第1と第2光源によって同時に提供される請求項11に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、一般的に吸収若しくは散乱媒体中のフォトルミネッセンス・イメージング又はフォトルミネッセンス・断層撮影法、及びとりわけそのようなイメージングのための方法およびシステムに関する。

【背景技術】

【0002】

光ルミネセンスイメージング（簡単に言えば、ルミネセンスイメージング）または光ルミネセンス断層撮影（簡単に言えば、ルミネセンス断層撮影）にとって興味のある散乱媒体の一例は生体組織である。組織光学は、光とそのような組織との相互作用の研究に専念する分野である。最近の数十年にわたり、この分野は急速に発展してきた。光・組織相互作用の知見が増大するとともに、組織光学を診断ツールとして応用することへの関心も出て来ており、基礎研究からの成果が得られている。10

【0003】

本開示が部分的に扱っている組織光学の分野は、ヒトまたは動物の生体内イメージングのための非侵襲的手法である光ルミネセンス断層撮影を含む光ルミネセンスイメージングである。これらのイメージング手法はルミネセンスベースであり、ルミネセンス生物学的マーカーの励起のための外部光源を必要とする。

【0004】

光ルミネセンスは、物質が光子を吸収し、次に光子を再放射するプロセスである。ルミネセンスの特定の形態がルミネセンスであり、一般に放出される光子は照明に使用されたものよりも低いエネルギーのものである。したがって、ルミネセンスでは、ルミネセンス波長が、照明した光の波長を基準としてより長い波長にストークスシフトされる。20

【0005】

ルミネセンスイメージングは既知であり、例えば、ある期間にわたって小動物内での薬からの生物学的応答を研究するのに小動物を犠牲にする必要なしに使用することができる。

【0006】

Shimomura、Chalfie、およびTsienは、非常に重要なルミネセンスマーカーになった緑色ルミネセンスタンパク質の発見および発展に対して2008年にノーベル賞を授与された。

【0007】

しかしながら、これまで、吸収及び散乱媒体での拡散ルミネセンスイメージング又は断層撮影法のためのルミネセンス分子イメージングおよび断層撮影は、多くの欠点に苦しんでいる。それらは例えば低分解能又はコントラストを有しており、それはイメージング結果に基づく診断のタスクを困難にしている。30

【0008】

前の技術に関するさらなる問題は、低い量子収量、浅いイメージング深度、長いデータ収集回および熱の副作用である。Christian F. Gainerらの「Toward the use of two-color emission control in upconverting NaYF<sub>4</sub>: Er<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup> nanoparticles for biomedical imaging」(PROCEEDINGS OF SPIE, vol. 8231, 1~8頁)は、ナノ粒子から発光された光の色を制御する方法を開示している。この論文は色を変化させるための励起光の繰り返し率を制御することに焦点を当てている。赤色発光に対する緑色発光の割合(GPR)は、回析制限スポットの周辺で繰り返し率が140Hzから80MHzまで増加するにつれて、減少する。40

L. Martinnez Mestroらの「Nanoparticles for highly efficient multiphoton fluorescence in bioimaging」(Optics Express, 2010-11-08, 23544~23553頁)は、蛍光発光バイオイメージングにおけるアップコンバーティング・ナノ粒子の研究であって、前述のナノ粒子の赤外線から可視光線の変換効率50

は CdSe 量子ドットと金のナノロッドの変換効率を超える。

Can T. Xu らの「High - Resolution Fluorescence Diffuse Optical Tomography Developed with Nonlinear Upconverting Nanoparticles」(ACS NANO, vol. 6, no. 6, 4788~4795 頁) は、剛性され、造影剤として採用されたアップコンバーティングナノ粒子を開示しており、発光は励起のパワーに二次的に依存していることを示している。

Lui H らの「Multibeam fluorescence diffuse optical tomography using upconverting nanoparticles」(OPTICS LETTERS, THE OPTICAL SOCIETY, vol. 35, no. 5, 718~720 頁) アップコンバーティングナノ粒子を用いる蛍光拡散光学断層写真術を開示している。

Christian F. Gainer らの「Control of green and red upconversion in NYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>, Er<sup>3+</sup> nanoparticles by excitation modulation」(Journal of Materials Chemistry, vol. 21, no. 46, 1 January 2011 (2011-01-01), 18530 頁) は、ナノ粒子から発光された光の色を制御する方法を開示している。GRR 率は、中間及び低いレンジの周波数値に対するパルス長が増加するにつれて減少する。この依存性は、パルス幅の増加に伴って減じ、~400 ns より長いパルスに対しては略存在しなくなる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】X. Gao 等、“In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots”, Nature Biotechnology, 22, 8: 969~976, 2004

【非特許文献2】G. Yi 等、“Synthesis, characterization, and biological application of size-controlled nanocrystalline NaYF<sub>4</sub>:Yb, Er in few rare-earth-to-visible up-conversion phosphors”, Nano Letters, 4, 11: 2191~2196, 2004

【非特許文献3】C. T. Xu, J. Axelsson, および S. Andersson-Engels, Appl. Phys. Lett., 94, 251107 (2009)

【非特許文献4】J. P. Culver, V. Ntziachristos, M. J. Holboke, および A. G. Yodh, Opt. Lett., 26, 701 (2001)

【非特許文献5】E. Alerstam, S. Andersson-Engels, および T. Svensson, J. Biomed. Opt., 13, 041304 (2008)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

したがって、前述の欠点の改善による増大した有効性を特に可能にする改善された拡散ルミネセンスイメージングあるいはルミネセンス断層撮影装置および方法に対するニーズがある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

したがって、本発明の実施形態は、好ましくは、単独または任意の組合せで、添付の特許請求の範囲によるシステム、方法、および使用法を提供することによって、上述で確認されたような当技術分野における 1 つまたは複数の欠陥、欠点、または問題を緩和、軽減

10

20

30

40

50

、または除去しようと努力するものである。

【0012】

本発明の第1の態様によれば、拡散ルミネセンス分子イメージングによって散乱媒体中の領域を画像化する方法が提供される。この領域は、散乱媒体中でマーカー位置に配置された少なくとも1つのルミネセンスマーカーを含み、ルミネセンスマーカーは非線形ルミネセンスマーカーである。前記方法は、ルミネセンス光検知位置で検出器によって励起光によりルミネセンスマーカーからのルミネセンスを検知して、少なくとも1つの光源位置から1つ以上の光源によって励起容積部に発せられた励起光によってルミネセンスマーカーを励起することを含み、該励起光はパルス励起光を含む。

【0013】

本発明の第2の態様によれば、散乱媒体中の注目する領域の拡散ルミネセンス分子イメージングのためのシステムが提供される。このシステムは散乱媒体のルミネセンス分子イメージングで使用するためのルミネセンスマーカーを含み、ルミネセンスマーカーは散乱媒体中に配置された非線形ルミネセンスマーカーである。このシステムは、1つまたは複数の光源によって励起体積中に放出された励起光によってルミネセンスマーカーを励起するために、少なくとも1つの光源位置によって位置づけられた1つまたは複数の光源を備える。システムは、励起光によりルミネセンスマーカーからのルミネセンスを検知するルミネセンス光検知位置で検出器を含み、該励起光はパルス励起光を含む。

【0014】

実施形態では、ルミネセンスマーカーは、照明波長の入射光をアップコンバートするように構成された非線形ルミネセンスマーカーの群に含まれ、その結果、前記ルミネセンスマーカーが前記入射光で照明されると、ルミネセンスが前記照明波長よりも短いルミネセンス波長で生じる。

【0015】

ルミネセンスマーカーは、いくつかの実施形態では、生物学的ルミネセンスマーカーである。

【0016】

発明の別の態様によれば、発明の第2の態様のシステムの使用は、タブレットのルミネセンスイメージング又は断層撮影のため、及び／又は拡散光学イメージング及び／又は光線力学療法及び／又は深い組織内の生体分子の遠隔活性のため及び／又は小動物の *in-vivo* 又は *in-vitro* のルミネセンスイメージングあるいはルミネセンス断層撮影法及び／又は前述のルミネセンスイメージングあるいはルミネセンス断層撮影法及び／又はによる癌診断、および（または）プローブとして前記非線形のルミネセンスマーカーを使用する誘発発光滅損（STED）あるいは単一の分子検出を含む高分解顕微鏡法などの機能的診断法のために提供される。

【0017】

一実施形態では、非線形マーカーが別のイメージングモダリティのために画像化造影剤に付加される。例えば、非線形マーカーは、磁気共鳴映像法（MRI）、X線などのような従来のイメージングモダリティで画像化するために造影剤に付加される。特定の実施形態では、非線形マーカーは、常磁性を有する有機ガドリニウム複合体またはガドリニウム化合物に付加される。

【0018】

本発明のさらなる実施形態が従属クレームで規定され、本発明の第2およびそれに続く態様の特徴は準用して第1の態様と同様である。

【0019】

いくつかの実施形態は増加したエミッション強度を提供する。

【0020】

いくつかの実施形態は、拡散ルミネセンス分子イメージングおよびルミネセンス分子断層撮影の解像度の向上を可能にする。

【0021】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態はタブレットの成分の分布の決定を可能にする。例えば非線形ルミネセンスマーカーまたはルミネセンス体はタブレットの活性成分に付加することができる。それに

より、活性成分の空間分布を有利には決定することができる。

**【0022】**

いくつかの実施形態は、非線形マーカーがMRI造影剤として使用される場合、医用磁気共鳴映像のコントラストの増強を可能にする。同時に、ルミネセンスイメージングまたは断層撮影を行い、注目する生体内の全く同一の領域の高解像度MRIと組み合わせた機能的診断情報を可能にすることができる。

**【0023】**

いくつかの実施形態は、ナノ粒子をアップコンバートすることを用いるときに、増加した量子収量を提供する。

**【0024】**

いくつかの実施形態は、シングルショットの深い組織イメージングを提供する。

**【0025】**

いくつかの実施形態は大きなイメージング深さと短いデータ収集回数を提供する。

**【0026】**

いくつかの実施形態は、励起光の熱の副作用の抑えることを提供する。

**【0027】**

いくつかの実施形態は、拡散光学イメージング、光線力学療法および深い組織における生体分子の遠隔活性を提供する。

**【0028】**

いくつかの実施形態は、バックグラウンドなしの信号を提供する。

**【0029】**

「備える、含む (comprises) / 備えている、含んでいる (comprising)」という用語は、本明細書で使用されるとき、述べられるフィーチャ、整数、段階、または構成要素の存在を明示するために使用されるが、1つまたは複数の他のフィーチャ、整数、段階、構成要素、またはそれらのグループの存在または追加を排除しないことが強調されるべきである。

**【0030】**

本発明の実施形態が可能にするこれらおよび他の様相、特徴、および利点は、添付図面を参照する本発明の実施形態の以下の説明から明らかであり、解明されるであろう。

**【図面の簡単な説明】**

**【0031】**

【図1】図1はシャプロンスキー図である；

【図2】(a)は放射エネルギー及び非放射エネルギー伝達の概要の例証図であり、(b)は共振エネルギー伝達及び非共振エネルギー伝達の概要の例証図であり、(c)はETU(左)およびESA(右)のアップコンバージョンの比較の例証図である。

**【図3A】**図3Aは、アップコンバージョンナノクリスタルのYb<sup>3+</sup>-Tm<sup>3+</sup>イオン対中のプロセスの概要の例証図；

【図3B】図3Bは図3Aのアップコンバージョンナノクリスタルおよびアップコンバージョンエミッショニの励起パワー密度依存性の発光スペクトルを示すグラフである；

【図4】面映像法インプリメンテーションの概要の例証図であり、(a)～(b)は発ルミネセンス団イメージング(epi-ルミネセンス)に使用されたセットアップ、(c)はルミネセンス拡散光断層撮影用の他のセットアップの例証図、(d)は透視法で発ルミネセンス団再構築に使用されるセットアップ。

【図5】(a)は線形及び非線形の発ルミネセンス団によるルミネセンスイメージングの違いの概要の例証図であり、(b)は線形及び非線形の発ルミネセンス団によるルミネセンスイメージングの違いの概要の例証図であり、(c)は線形及び非線形の発ルミネセンス団によるルミネセンスイメージングの違いの概要の例証図である。

10

20

30

40

50

【図6】図6は、単光束方式励起および結合した単光束方式励起および2重のビームの励起のための、ウエイトマトリクスWの正規化された单一値分布を示すグラフである。

【図7】7aは単光束方式イメージだけを用いる(10A)ナノ粒子をアップコンバートする三次元の再構築であり、7bは単光束方式および2重のビーム像の両方を使用する(10B)三次元の再構築である。

【図8】図8は、75nmの励起の下のNaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>、Tm<sup>3+</sup>ナノ粒子のアップコンバージョンスペクトルを示す。

【図9】図9は、本発明の実施形態によって決定された975nmの励起下のNaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>、Tm<sup>3+</sup>ナノ粒子の近赤外線、赤色及び青色赤いアップコンバージョン発光帯のパワー依存性を示す。 10

【図10】図10は、本発明の実施形態によって決定された様々なパワー密度での近赤外線、赤色及び青色のアップコンバージョン発光帯の量子収量を示す。

【図11】図11は、本発明の実施形態による、CW及びパルス励起(同一の平均パワーを備えた)の励起下のNaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>、Tm<sup>3+</sup>ナノ粒子のアップコンバージョンスペクトルを示す。

【図12】図12は、本発明の実施形態による異なるパルス幅(1ミリ秒、5ミリ秒、10ミリ秒)を備えたCW励起およびパルス励起下のアップコンバージョン発光スペクトル(800nmで正規化された)を示す。

【図13】図13は、本発明の実施形態によるCWおよびパルス(31.04mWの同じ平均パワーを備えた)の励起下のアップコンバージョンスペクトルを示す。 20

【図14】図14は、本発明の実施形態による異なる平均励起パワー下の5および10ミリ秒のパルス幅を備えたパルス励起下での800nmでの信号の利得を示す。

【図15】15aは800nmでの利得に対する励起パワーの影響を示し、15bは800nmでの利得に対する励起パワーの影響を示し、15cは800nmでの利得に対する励起パワーの影響を示し、15dは800nmでの利得に対する励起パワーの影響を示し、15eは800nmでの利得に対する励起パワーの影響を示し、15fは800nmでの利得に対する励起パワーの影響を示す。

【図16】図16は800nmでの利得に対する励起パワーの影響を示す。

【図17】17aは800nmでの利得に対する励起パワーの影響を示し、17bは800nmでの利得に対する励起パワーの影響を示し、17cは800nmでの利得に対する励起パワーの影響を示す。 30

【図18】18aは800nmでの利得に対する励起パワーの影響を示し、18bは800nmでの利得に対する励起パワーの影響を示す。

【図19a】図19aは100mWの平均パワーを持つCWレーザダイオードザの励起下で800nmにおいて得られたルミネセンス・イメージを示す；

【図19b】図19bは100mWの平均パワーを持つパルスレーザ(方形波、パルス幅5ミリ秒、期間250ミリ秒)の励起下で800nmにおいて得られたルミネセンス・イメージを示す；

【図19c】図19cは100mWの平均パワーを持つパルスレーザ(方形波、パルス幅10ミリ秒、期間500ミリ秒)の励起下で800nmにおいて得られたルミネセンス・イメージを示す； 40

【図20】図20は、本発明の実施形態によるパルス化された励起光を含む励起光を例証する；

【図21】図21は、本発明の実施形態によるパルス励起光に続くルミネセンスおよびルミネセンスの遅れた検出を例証する；

【図22】図22は本発明の実施形態による、マーカーの深さ座標とその測定を例証する。

【図23】図23は本発明の実施形態による、マーカーの深さ座標とその測定を例証する。

【図24】図24は本発明の実施形態による、マーカーの深さ座標とその測定を例証する 50

。

【図25】図25は本発明の実施形態による、マーカーの深さ座標とその測定を例証する

。

【図26】(a)-(b)は信号利得対パルス幅および平均パワー密度をそれぞれ例証する；

【図27】(a)-(d)は、発明(b,d)の実施形態に従ってパルス化された励起から続くマーカーからのルミネセンスと持続波(CW)の励起(a,c)からのルミネセンスとを例証する；

【図28】図28は、発明の実施形態による方法の概要のフローチャートを例証する；

【図29】(a)-(c)は時間および平均パワー密度に対してシミュレートされた量子  
10 収量(QY)を例証する；

【図30】図30はアップコンバージョン信号利得対パワー密度を例証する。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本開示のいくつかの実施形態は、拡散ルミネセンスイメージングおよび断層撮影を扱う前述の組織光学の分野に関する。最も良く見える波長では、光は組織内に数ミリメートルを超えて透過しない。しかし、診断ウィンドウ(波長600～1600nm)では、光透過は数センチメートルまでによるイメージングを可能にするのに十分である。これにより、組織中深くのルミネセンス造影剤を画像化する可能性が開かれる。

【0033】

従来技術は、低い量子収量によりイメージングを制限し、長い獲得時間、ノイズおよび熱の副作用へと導く。

【0034】

現実的な光学的特性をもつ組織ファントムでの実験が行なわれ、本発明の実施形態の以下の開示に従って、前述の要因を改善することが可能であることが示された。国際出願第2010/128090号パンフレットにおいて、以前、そのようなイメージングのコントラストと分解能が改善され得ることが示されおり、該パンフレットは拡ルミネセンスイメージング又は断層撮影のためのシステム、方法及び非線形のルミネセンスマーカーを開示している。

【0035】

ルミネセンスイメージング又は断層撮影法の生物医学的イメージングでのいくつかの適用を以下に述べる。

【0036】

他の用途は非生物学分野で提供される。そのような分野の例は、タブレット、非線形マーカーをもつ媒体を流す液体または気体用のフィルタなどの品質管理を含む材料試験のためのルミネセンスイメージングまたは断層撮影である。

【0037】

本発明の本用途および実施形態の関連において、ルミネセンスイメージングはルミネセンスのすべてのタイプのイメージングを意味する。さらに、説明される任意のイメージングまたは断層撮影は高度に散乱する媒体中にあり、伝統的には、検出される光の拡散特性のために解像度が不十分である。本発明の実施形態は、ルミネセンス断層撮影法におけるコントラスト及び分解能を含むそのようなルミネセンスイメージングの量子収量、コントラストおよび分解能を有利に改善する。

【0038】

以下に、ルミネセンスイメージング、組織光学、およびナノクリスタルをアップコンバートするなど非線形のマーカーの原理の概要が与えられ、ついで実験及びシミュレーションからの結果を記載した。より多くの詳細が国際公開第2010/128090号パンフレットに与えられる。次に、本発明の特定の実施形態が添付図面を参照しながら説明される。

【0039】

10

20

30

40

50

## ルミネセンスコントラスト

ルミネセンスを発する分子（ルミネセンス体）からの光放出のプロセスはヤブロンスキーノートで説明することができる（図1Aを参照）。図1Aは、分子の励起状態からの様々な減衰経路を示すヤブロンスキーノートを示す。図の下部に、エタノール中のヘマトポルフィリンからのルミネセンススペクトルが示される。省略形は、S<sub>n</sub>：一重項状態、T<sub>n</sub>：三重項状態、A b s：吸収、S c：散乱、I C：内部変換、F：ルミネセンス、I X：項間交差、P：熒光、A：他の分子への移動である。さらにいくつかのプロセスの近似の時間スケールが寿命（L T）として図1に右下に示され、さらにと表記される。

### 【0040】

入射光子が分子の2つのエネルギー帯間のギャップに対応するエネルギーを有する場合、入射光子は吸収され得る。それによって、光子エネルギーはより高いエネルギー帯への分子の励起に使用されることになる。励起状態は不安定であり、分子は基底状態に戻ることになる。下方遷移は、図1に示されるようにいくつかの異なる経路に従うことができる。ラベル付けされた準位は、原子のエネルギー準位に対応する電子レベルである。S<sub>0</sub>、S<sub>1</sub>などは、電子スピニン量子数の和が0である一重項状態であり、一方、T<sub>0</sub>、T<sub>1</sub>などは、1個の電子のスピニンが符号を変えている三重項状態である。大きい分子では準位間の間隔は非常に小さく、状態は分子相互作用のために重なる。光子が分子に吸収される場合、励起電子準位の最も低い振動準位に分子を必ずしも励起するのではなく、より高い振動状態に励起する可能性が高い。これは、迅速な（10 - 15 s）吸収プロセスの間に、原子は振動運動中に場所を変えないことを述べるフランク-コンドン原理の結果である。分子が高エネルギー準位に励起されると、S<sub>1</sub>の最も低い回転-振動状態への迅速な緩和が後続することになる。この緩和の短い時間スケール（10 - 12 s）は高密度の回転振動準位に起因する。分子は、S<sub>1</sub>から、無放射力学的相互作用により状態S<sub>0</sub>に進むことができる。これは内部転換（I C）と呼ばれる。

10

### 【0041】

代わりに、下方遷移は光子の放出をもたらすことができ、このプロセスはルミネセンスと呼ばれる。遷移はS<sub>0</sub>の回転振動状態のいずれかで終了することができるので、様々な光子のエネルギーは明確な値ではなくむしろ広い分布を有することになる。したがって、分子からのルミネセンススペクトルはほとんど場合いかなる有意な構造もなしに幅広いものとなることになる。スペクトルの形態はより低い準位（S<sub>0</sub>）への遷移の確率を反映することになる。図1Aの下部に、腫瘍マーカーまたは光感作物質であり、後に説明されるヘマトポルフィリンのルミネセンススペクトルが示される。吸収-I C-ルミネセンスの経路が完了した後、分子は当初の状態および構成に戻る。したがって、ルミネセンスプロセスは非破壊であり、可逆的であり、それは例えば医学的診断では利点である。

20

### 【0042】

励起された分子には、いくつかの他の経路、例えば、他の分子へのエネルギー移動、電子移動、エキシマー形成、および分子の解離をもたらす反発状態への励起などがあり得る。これらのプロセスは図1のAで示される。

30

### 【0043】

多くのルミネセンス分子は1つの重要な特徴を共通に有しており、それは、共役二重結合の完全な鎖である、すなわち、1つおきの結合が二重結合であることである。ヘマトポルフィリンの構造はこれの一例である（図示せず）。これは、腫瘍のルミネセンス診断および光線力学療法に使用されるルミネセンス分子である。

40

### 【0044】

#### ルミネセンスイメージング

ポイントモニタ装置とは対照的に、ルミネセンスイメージングシステムは多数のポイントのルミネセンス信号を検出することができる。したがって、注目する区域の2次元画像が生成される。典型的なシステムはチューナブルフィルタと共にカメラを含む（図4の（a）を参照）。透照での同様のセットアップが図5の（b）に概略的に示される。チューナブルフィルタにより所望の検出波長を容易に選択することができ、約20 nm幅のスペ

50

クトル解像度を達成することができる。

#### 【0045】

##### 非線形ルミネセンス体によるルミネセンスイメージング

ルミネセンスイメージングのうちの特に興味あるサブセクションは非線形ルミネセンス体を使用するものである。本用途の関連において、「非線形マーカー」はルミネセンスマーカーであり、マーカーのルミネセンス( $L$ )は励起光( $E$ )の光束に線形には依存しない。したがって、非線形マーカーは、 $L = k^* E^x$ に従うルミネセンスを有し、ここで、 $x > 1$ であり、 $k$ は正の定数である。非線形マーカーは、さらに $L = k^* E^x + b$ 、 $L = k(E)^* E^x + b$ 、 $L = k(E)^* E^x + b(E)$ 、または $L = k^* E^x + b(E)$ の関係に従うルミネセンスを有することがあり、ここで、 $k$ および $b$ は一定であるか、または励起光( $E$ )の局所場に依存する(すなわち $k(E)$ および $b(E)$ )材料定数であるしたがって、従来のルミネセンスイメージングと比較して、非線形マーカー(またはルミネセンス体)は励起に1つよりも多くの光子を必要とすることがある。これは励起体積を強烈に減少させ、より局在化した励起ポイントを与える。このようにして、以下で実証されるように、ルミネセンスイメージングのコントラストおよび解像度が改善される。さらに詳細には、吸収および散乱媒体のルミネセンスイメージングにおける散乱光のコントラストおよび解像度が改善される。本発明の実施形態はこの効果を利用する。

#### 【0046】

線形ルミネセンス体によるルミネセンスイメージングと非線形ルミネセンス体によるルミネセンスイメージングとの間の差を示すために、図5の(a)~(c)が参照される。  
図5の(a)はグレイスケールの線形ルミネセンス画像を示す。各画素(705)は格子パターン(701)中の1つの励起ポイント(704)に対応する。図7bは、2光子非線形ルミネセンス体、すなわち非線形ルミネセンスマーカー(702)で得られた画像を示す。図7cにおいて、ルミネセンス体(702)は赤(より大きい円)(703)で示され、黒い点(704)は格子パターン(701)中の励起のポイントを示す。円(703)は、格子パターン(701)上のマーカー(702)の投影画像に対応する。励起ポイント(704)は、ルミネセンスマーカー(702)を走査するときの光源、すなわち、レーザ(503)の位置に対応する。非線形ルミネセンス体を使用すると、ルミネセンス画像のコントラストおよび解像度が向上することが明確に分かる。特に、光源が、図5の(c)において、マーカー(702)、または格子パターン(701)上のマーカー(702)の対応する投影画像(703)の近くの706として印を付けられた位置にある場合、励起体積は十分に小さく、非線形マーカー用の光源位置(706)に局在化されており、その結果、ルミネセンスは図5の(b)の対応する画素(708)で検出されない。図5の(a)の線形ルミネセンス画像では、対応する画素(707)は、散乱媒体中の増大した励起体積に起因するルミネセンスを受け取る。2光子非線形依存は励起体積の狭い光子密度を与える。したがって、励起光強度への検出ルミネセンスの非線形依存に基づいてマーカー(702)を画像化することによって、解像度を向上させることができる。

#### 【0047】

非線形ルミネセンス体は、一般に、線形ルミネセンス体と比較してより高い励起強度を必要とし、いくつかの非線形ルミネセンス体はコヒーレント励起さえも必要とする。散乱媒体では、光は集束されるのではなくむしろ全方向に広がるので、高い強度を達成するのは困難である。このために、ある非線形ルミネセンス体は他のものと比較して散乱媒体のルミネセンスイメージングにより好適になる。ルミネセンス体は特別高い収率を有する必要があるが、コヒーレント励起を必要としないことがある。アップコンバートナノ粒子は、高い収率と非コヒーレント励起の1つのそのような非線形ルミネセンス体である。

#### 【0048】

##### アップコンバージョン

アップコンバージョンは、2つ以上の光子が吸収され、入射光子よりも高いエネルギーの光子が解放されるときに生じる非線形プロセスである。

10

20

30

40

50

**【 0 0 4 9 】**

このプロセスは、例えば、長い時間の間 1 つの電子をトラップすることができる準安定状態を含み、別の到着光子との相互作用確率を増加させる材料で観測される。

**【 0 0 5 0 】**

実施形態によっては、異なる希土類元素イオンでドープされた固体の形態のルミネセンスマーカーがアップコンバージョンを得るために使用される。

**【 0 0 5 1 】**

アップコンバージョンは、イオン対および励起強度に応じてアップコンバージョンプロセスに違うように影響を与える多数のプロセスにより生じることができる。

**【 0 0 5 2 】**

いくつかのアップコンバージョンプロセスが図 2 a ) ~ c ) に示される。

**【 0 0 5 3 】**

プロセスのうちのいくつかはイオン間のエネルギー移動を含む。このエネルギー拡散は、放射性または非放射性、共振的または非共振的であることがある。

**【 0 0 5 4 】**

さらに、エネルギー移動アップコンバージョン ( E T U ) および励起状態吸収 ( E S A ) プロセスが、図 2 c で、図の左側と図の右側にそれぞれ示される。励起状態吸収は、励起状態にあるイオンがもう 1 つの光子を吸収するときに生じる。

**【 0 0 5 5 】**

ナノサイズ化アップコンバート結晶

10

**【 0 0 5 6 】**

ナノサイズ化アップコンバート粒子は、例えば、製作するのが容易であるランタニドドープ酸化物 ( Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ) である。

**【 0 0 5 7 】**

他のナノサイズ化アップコンバート粒子は、例えば、Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> よりも高い効率を有するフッ化物である。より高い効率は、非放射減衰の確率を低下させるフッ化物のフォノンエネルギーによって説明することができる。

**【 0 0 5 8 】**

さらに、ナノサイズ化アップコンバート粒子は、例えば Yb<sup>3+</sup> / Er<sup>3+</sup> 又は Yb<sup>3+</sup> / Tm<sup>3+</sup> のいずれかと同時ドープされたナトリウムイットリウム四フッ化物 ( NaYF<sub>4</sub> ) で製作される。

30

**【 0 0 5 9 】**

NaYF<sub>4</sub> は、それぞれ - NaYF<sub>4</sub> および - NaYF<sub>4</sub> と呼ばれる 2 つの相、すなわち立方相および六方相で結晶化する。相材料からのアップコンバトルミネセンスは、相からのアップコンバトルミネセンスと比較して約 1 衍高い大きさである。

**【 0 0 6 0 】**

アップコンバートナノ粒子などの非線形ルミネセンス体は、さらに、生物的機能化することができ、それにより、例えば腫瘍探索能力を非線形ルミネセンス体に付与することができる。

**【 0 0 6 1 】**

非線形ルミネセンス体は水溶性とすることができる、静脈、経口、または腸への投与のための溶液などいくつかの用途での投与を容易にすることができる。

40

**【 0 0 6 2 】**

アップコンバートナノ粒子を水溶性として提供する方法は、極性である構造をもつ粒子を被覆することである。被覆は、例えば、高分子またはシリカで行うことができる。合成高分子、例えばポリエチレングリコール ( PEG ) および天然高分子の両方を被覆に使用することができる。これらの高分子は生物学的環境で安定であり、顕著に悪い形でナノ結晶の光学的性質に影響を与えることはない。

**【 0 0 6 3 】**

水溶性アップコンバートナノ粒子は被覆なしで供給することができる。化学結合または

50

物理吸収のいずれかによって水酸基をアップコンバートナノ粒子の表面に付着させることができる。水酸基は当然のことながら共有結合によって形成され、最終構造は極性の性質を有する。

#### 【0064】

##### 機能化

アップコンバートナノ粒子の機能化は、全体がすべての目的のために本明細書に組み込まれる X. Gao 等、 *In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots*、 *Nature Biotechnology*、 22、 8 : 969 ~ 976、 2004 に記載されているような量子ドットの機能化と同様の方法で行うことができる。 Gao 等では 10 、アップコンバート希土類元素ドープナノ粒子に適用可能である方法が記載されている。

#### 【0065】

本開示の一実施形態で使用されるアップコンバートナノ粒子は、 G. Yi 等、 *Synthesis, characterization, and biological application of size-controlled nanocrystalline NaYF<sub>4</sub>:Yb, Er infrared-to-visible up-conversion phosphors*、 *Nano Letters*、 4、 11 : 2191 ~ 2196、 2004 に記載されている方法に従って準備され、 Yb<sup>3+</sup> および Tm<sup>3+</sup> の組合せでドープされた NaYF<sub>4</sub> 結晶であった。 2 つのイオンのエネルギー準位図が図 3 A に示される。 図 3 A は、 Yb<sup>3+</sup> / Tm<sup>3+</sup> イオン対のアップコンバージョンプロセスの概略図である。 非放射アップコンバートプロセスが破線矢印で示され、 非放射減衰は明確にするために省略されている。 図 3 B はアップコンバートナノ粒子の放出スペクトルを示すグラフである。 477 nm の青色放出ラインはより高いポンプ強度でのみ見える。 800 nm ラインのポンプパワー依存は、 x 軸に強度 (I) および y 軸にカウント (C) を示し、 適合ライン (401) の勾配 (S) が 2 に等しい図 3 B の差込み図で分かるように、 低い強度を使用して二次であることが計測された。 20

#### 【0066】

一実施形態では、 非線形マーカーが別のイメージングモダリティのために画像化造影剤に付加される。 例えば非線形マーカーは、 磁気共鳴映像法 (MRI) 、 X 線などのような従来のイメージングモダリティによる画像化のために造影剤に付加される。 特定の実施形態では、 非線形マーカーは、 常磁性を有する有機ガドリニウム複合体またはガドリニウム化合物に付加される。 MRI 造影剤として使用されると、 医用磁気共鳴映像法のコントラストが強化される。 同時に、 ルミネセンスイメージングまたは断層撮影を行い、 注目する生体内の全く同一の領域の高解像度 MRI と組み合わせた機能的診断情報を可能にすることができる。 30

#### 【0067】

他の用途は非生物学分野で提供される。 そのような分野の例は、 タブレット、 非線形マーカーをもつ媒体を流す液体または気体用のフィルタなどの品質管理を含む材料試験のためのルミネセンスイメージングまたは断層撮影である。 40

#### 【0068】

##### システム・セットアップ例

拡散ルミネセンス分子イメージング用システムは、 図 4 a - d で概略的に示される。 図 4 a - b は、 発蛍光団イメージング (epi - ルミネセンス) 用セットアップの概要の例証である； 及び、 図 4 c は透視中の発蛍光団再構築用のセットアップであり、 該セットアップは非線形の発蛍光団および従来の発蛍光団を使用して、 FMT のシミュレーションに使用することができる。 後者の場合、 シミュレートされた組織ファントムは、 幾何学上の 1 つの面のまわりに一様に離間された検出器先端部 (509) を有する半無限のシリンダー (510) としてモデル化され得る。

#### 【0069】

組織ファントム (501) は、 飛行時間の分光法システムなどの適切なシステム (50 50

0、600)、周波数領域システムあるいは定常状態及び時間あるいは周波数領域中の他の画像システムによって決定された光学的性質を備えたイントラリピッド(intralipid)インクの溶液を含み得る。発蛍光団(502)は2.4mmの内径を備えた毛管内に含まれ得る。発蛍光団の濃度は、ナノ粒子用に1重量%が選択され得、比較実験のDY-781型の従来のダウンコンバート(downconverting)発蛍光団用に1μが選択され得る。ナノ粒子の濃度は、量子ドット(すなわち1体重%の濃度)を使用した研究との合理的な対応を持つように選択され得る。

#### 【0070】

ステップモータを使用して、ファイバーにつながれたレーザ(503)はラスタースキヤンされ得る。ラスター走査中のレーザの位置は図5に示されたような格子パターン(701)で記述することができる。画像は、800nmに中心がある2つの誘電体帯域通過フィルタの後ろに位置する空気冷却CCD(504)カメラにより走査位置ごとに取得された。図4の(c)はラスター走査セットアップ(507)を示し、レーザは下の位置(505)から組織ファントム(501)を走査している。CCD(504)はレーザの位置(506)ごとに1つの画像を取り込むことができる。位置(506)は図5の格子パターン(701)と同様の格子パターン(508)を記述する。レーザの位置(506)ごとに、ファントム(501)の全側面から放出されたルミネセンス、すなわち全ルミネセンス強度が、測定され得、かつ合計することができ、得られる画像中の1つの画素を構成した。したがって、画像中の画素の数は、CCD画素の数によってではなく励起位置(506)の数によって与えられた。したがって、解像度は、ルミネセンス放出光の光子密度によってではなくレーザ光源(505)からの励起光の光子密度によって決定することができる。このようにして、励起体積中の2光子の光子密度は単一光子の光子密度よりも狭いので、解像度を向上することができる。全ルミネセンス強度を合計するとき、検出されたルミネセンスに閾値値を適用することができる。このようにして、解像度を向上することができる。例えば、ルミネセンス強度が事前定義閾値よりも上にある場合にのみ全ルミネセンス強度に追加されることになる。閾値はCCD(504)の値として定義することができ、例えばルミネセンス強度がピーク値の30%未満である場合バックグラウンド信号と見なすことができるので廃棄されることになる。さらに、画素、またはレーザの位置(506)で得られる全ルミネセンスが別の閾値値未満である場合バックグラウンド信号と見なして除去することができる。代わりに、ルミネセンス信号の二次強度を合計することができる。このようにして、解像度をさらに向上することができる。例えば、CCDのピーク強度値の定義による0と1との間の相対値を有することができるCCD(504)によって検出されたルミネセンス強度は、現在の画素または位置(506)の全ルミネセンス強度に追加される前にそれ自体を乗算することができる。さらに、全ルミネセンス強度は画素または位置(506)ごとにそれ自体を乗算することができる。走査イメージング技術を使用して、画像中の各画素は、单一の励起ポイント、すなわち光源位置(506)によって誘起されたルミネセンスに対応することができる。

#### 【0071】

##### 再構築された結果

図4bは、概略的に発明の実施形態による拡散したルミネセンス分子イメージング用のシステム(600)を例証する。システム(600)は、前述の散乱性媒質のルミネセンス分子イメージングで使用するためのルミネセンスマーカー(502)を含み、前記ルミネセンスマーカーは散乱性媒質で構成された非線形のルミネセンスマーカーである。システム(600)は、さらに1又は2以上の光源(503)をさらに含み、該光源(503)は前記1又は2以上の光源によって発光された励起光によって励起容積部内でルミネセンスマーカーを励起するために少なくとも1つの光源位置(505)、(506)で位置づけられ、前記システム(600)はさらに、前記励起光によりルミネセンスマーカーからのルミネセンスを検知するルミネセンス光検知位置において検出器(504)を含む。従って、システム(600)は、パルス励起光によって散乱性媒質中の関心領域の拡散ルミネセンス分子イメージングに適し、媒質の少ない加熱により少ない副作用、より深いイ

10

20

30

40

50

メーディング媒体をより熱くならないことにより改善された量子収量、それほど熱でない副作用、より深いイメージ深度、およびより短い獲得時間を利用する。システム(600)はパルス励起によるアップコンバージョンエミッションを増強し、パルス励起光による単一パルスイメージングに関する以下の開示でさらに記載される。

#### 【0072】

この比較は、非線形ルミネセンス体の使用が提供する有利な効果、すなわち、線形ルミネセンス体よりも高いコントラストおよび解像度を示している。この強化は、以下の式(1)で見られるような二次生成項を使用するときのより狭い感受性による。これは、異なる光源位置に対して収集された信号を考慮に入れることによって視覚化することができる。二次ルミネセンス体を使用すると、光源位置がルミネセンス体自体の近くにある場合にのみ信号は強くなることになる。したがって、この信号は、線形ルミネセンス体の場合よりもルミネセンス体の場所に関する多くの情報を提供することができる。これは、さらに、図9に示されるように、例えば、線形ルミネセンス体を使用して分解できない2つの接近して位置するルミネセンス体を分解する可能性を与えることができる。

10

#### 【0073】

アップコンバートナノ粒子を使用するマルチビームルミネセンス拡散光学断層撮影

さらに、本開示は、アップコンバートナノ粒子の独特な非線形パワー依存を利用して、同時に2つのビームで励起することを含むことによってラスター走査セットアップの情報量をさらに増加させるためのルミネセンス拡散光学断層撮影の方法を実証する。情報の増加がより正確な再構成をもたらすことが見いだされた。

20

#### 【0074】

ルミネセンス拡散光学断層撮影(FDOT)は、不明瞭な材料内部のルミネセンスプローブの濃度の空間分布を再構築しようする比較的新しいモダリティである。それは、イメージングツールとして、例えば、腫瘍、タンパク質分解酵素、薬効果を画像化するための生物医学的研究に良好な見通しを有する。FDOTは数値的に極めて不良設定な問題を有する。この問題では、ルミネセンス性標的の再構成の品質は、境界測定から得られたルミネセンス情報の量および品質によって直接決定される。計器雑音および組織自己ルミネセンスが測定の主な擾乱であり、不十分な信号品質をもたらし、再構築結果に深刻な偽画像を引き起こすことがある。これを克服するために、例えば、低雑音の装置を使用すること、およびバックグラウンド除去またはスペクトル分離を使用することができる。しかし、そのような方法がすべての問題を解決できるとは限らないが、それは、そのような方法が、再構成の品質を改善するのに決定的である再構成のための新しい制約を追加する、すなわち、新しい独立した情報を追加するのではなく、より良好方法で現在の情報を利用しているだけであるからである。非接触CCDベースFDOTシステムにおいて、より多くの情報を獲得するための好ましい1つの方法は励起位置の数を増加させることによるものである。しかし、励起ビームの強度を妥当なレベル内に保持するために、励起ビームの最小サイズに限界がある。これは、別個の、すなわち重複しない励起位置が再構成には要望されるので、励起-位置の最高密度に対する現実的な上限を意味する。さらに、先駆的構造情報を提供するために磁気共鳴映像法などの解剖学的イメージングモダリティを使用することが可能である。しかし、これは、システムの複雑さの著しい増加と柔軟性の低下とを犠牲にする。

30

#### 【0075】

本開示で、発明者は、FDOTの励起のために2つのビームを同時に利用することによって追加情報を獲得するのにアップコンバートナノ粒子の二次パワー依存を利用する手法を提示する。二重ビーム励起で得られる画像(タイプD画像と命名される)のナノ粒子数密度分布nの再構成への効果が実証される。さらに、線形ローダミン6Gと二次アップコンバートナノ粒子との間で再構築結果の比較が行われる。励起場および放出場は2つの結合拡散方程式によってモデル化することができる[非特許文献3]。二次発蛍光団のために、k番目のビームの励起下で固定された検出器位置で検知された蛍光信号は、フォワードモデル(1)によって記述することができる;

40

50

【 0 0 7 6 】

【数1】

$$\Gamma_k = \sum_{i=1}^N U_f^*(r_d, r_i) n(r_i) [U_e(r_{sk}, r_i)]^2 \Delta V_i, \quad (1)$$

【 0 0 7 7 】

ここで、Nはボクセルの数を表し、 $r_{s, d, k}$ は、それぞれ光源、検出器、およびボクセルの座標を表し、 $V_i$ はボクセル*i*の体積である。

励起光のフォワード解は、

10

【 0 0 7 8 】

【数2】

$$[U_e(r_{sk}, r_i)]^2$$

【 0 0 7 9 】

によって示される。2つのビームを同時に使用して媒体を励起すると、検出される信号は(2)によって与えられ、

【 0 0 8 0 】

【数2】

20

$$\begin{aligned} \Gamma_{k\&j} &= \sum_{i=1}^N U_f^*(r_d, r_i) n(r_i) [U_e(r_{sk}, r_i) + U_e(r_{sj}, r_i)]^2 \Delta V_i \\ &= \Gamma_k + \Gamma_j + \\ &\quad 2 \sum_{i=1}^N U_f^*(r_d, r_i) n(r_i) U_e(r_{sk}, r_i) U_e(r_{sj}, r_i) \Delta V_i, \end{aligned} \quad (2)$$

【 0 0 8 1 】

これは交さ項の関与を示す。ラスター走査セットアップ(500、507)では、2つの画像が2つの位置にわたって1つの励起ビーム走査で連続して得られ(タイプ-S画像と命名される)、第3の画像が前の2つの位置の上で2つのビーム励起(タイプD)で得られる場合、交さ項の関与は、タイプD画像が既存のタイプ-S画像からいかなる数学的動作によっても得ることができないことを意味し、タイプD画像は独立であり、追加情報を含むことを示している。しかし、線形ルミネセンス体、例えばローダミン6Gでは、タイプD画像は既存のタイプ-S画像の線形結合のみであり、逆問題のためのより多くの制約を追加しないことになる。非線形ルミネセンス体では、式(2)は多くの同時励起ビームを含むように一般化することができるが演繹される。

30

【 0 0 8 2 】

再構成における二重ビーム励起による測定の重要性は、重み行列Wの特異値解析によって確認されており、その要素は(3)によって与えられ[非特許文献3]、

$$W_{(s, d), i} = U_f^*(r_d, r_i) [U_e(r_s, r_i)] \quad V_i \quad (3)$$

ここで、

二次ルミネセンス体では  $= 2$ 、線形ルミネセンス体では  $= 1$  である。

計算は有限要素法を実行するNIRFASTパッケージを使用して行われた。Wは(4)に従って因数分解され、

$$W = U V^* \quad (4)$$

ここで、UおよびVはWの左および右の特異ベクトルを含むユニタリ行列であり、

40

50

はWの特異値を含む対角行列である。Vの列空間は画像空間モードによって張られ、一方、Uの列空間は検出空間モードによって張られる。Wの特異値は、どれくらい効率よく所与の画像像空間モードが実験装置によって検出され得るかを表す [ 非特許文献 4 ] 。

#### 【 0 0 8 3 】

図6は、Wの正規化特異値分布を示す。x軸は特異値指数(1120)を示し、y軸は正規化特異値強度(1121)を示す。明確にするために、1つおきの特異値のみが示されている。クロス符号(1122)およびプラス符号(1124)は線形ルミネセンス体( $\gamma = 1$ )を示し、前者は単一ビーム励起(1122)の場合であり、一方、後者は単一ビーム励起と二重ビームの励起(1124)の組合せの場合である。見て分かるように、二重ビームの励起(1124)による追加の特異値の正規化強度は機械精度まで降下しており、それは、二重ビーム励起による測定がF D O Tの不良設定を緩和できないことを示している。言い換えれば、タイプD画像は既存のタイプ-S画像よりも多くの情報を提供できない。したがって、それは再構成の品質を改善できない。しかし、二次ルミネセンス体(図6のアスタリスク符号(1123)および点符号(1125)で表された)では、追加の特異値(1125)の強度は依然として効果がある。これは、タイプD画像が再構成の品質に寄与することになることを意味する。10

#### 【 0 0 8 4 】

まず、(3×3)格子にわたって走査するために、単一の励起ビームを使用し得、1つの画像を走査位置ごとにC C Dカメラで取り込む。次のステップで、ファントムを照明するために、同じ格子の2つの最近接部位に位置づけられた2つの励起ビームを同時に使用することができ、6個の追加のタイプD画像が与えられた。20

#### 【 0 0 8 5 】

図7a～7bは再構築されたアップコンバートナノ粒子の3次元再現を示す。副図の赤い円柱は同一であり、真のルミネセンス性傷害を示す。図7aの再構成では、タイプ-S画像のみが使用された。見て分かるように、ルミネセンス性傷害の形状が過大評価されている。この過大評価は逆問題の不良設定によって説明することができる。タイプD画像を追加すると、図7bに示されるように、ルミネセンス性傷害形状の再構成は著しく改善される。

#### 【 0 0 8 6 】

アップコンバートナノ粒子の非線形パワー依存追加の独特的の利点が開示される。この利点により、同時に2つ以上の励起ビームを用いて得られた画像を使用することによって逆問題のための追加情報を得る可能性が与えられる。同じ利点は、線形ルミネセンス体、例えばローダミン6Gを使用した場合には見いだすことができなかった。30

#### 【 0 0 8 7 】

パルス励起によるアップコンバージョンエミッションの増強

N a Y F<sub>4</sub> : Y b<sup>3+</sup>、T m<sup>3+</sup>のためのアップコンバージョンスペクトルを例証している図8に示されるように、ナノ粒子をアップコンバーティングすることは、975 nmの励起下の近赤外線(-800 nm)、赤色(-648 nm)および青色(-475 nm)の範囲中の発光帯を放射し得る。

#### 【 0 0 8 8 】

上述されるように、これらのアップコンバーティングの発光帯の強度は励起強度への非線形の依存性を持っている。

低い強度範囲の依存性は、次式によって記述することができる：

$$I_f = k l_e \times^n \quad (5)$$

#### 【 0 0 8 9 】

ここで、I<sub>f</sub>はアップコンバージョン蛍光強度であり；

kは定数であり；

l<sub>e</sub>は励起強度であり；nは1つのエミッション光子を生成するために要求される励起光子の数である。

#### 【 0 0 9 0 】

50

近赤外線、赤色および青色発光帯のパワー依存性は図9に示され、975 nmの励起下のNaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>、Tm<sup>3+</sup>ナノ粒子の近赤外線、赤色及び青色のアップコンバージョン発光帯のパワー依存性を例証している。

#### 【0091】

量子収量は、放射された光子の数と吸収された励起光子の数の間の比として定義される。図9に示されるそれらの非線形のパワー依存性のために、アップコンバージョンエミッショニンは、図10で示されるように、一定の量子収量の代わりにパワー密度に依存する量子収量を持っており、近赤外線、青色、赤色の様々なパワー密度でのアップコンバージョン発光帯の量子収量を示している。

#### 【0092】

本発明の一実施形態による拡散ルミネセンス分子イメージングによる散乱媒質中の領域のイメージング方法(100)は、(図28)前記領域のマーカー位置での散乱媒体中の少なくとも1つの非線形の発光マーカーを提供する工程(101)、少なくとも1つの光源位置から1又は2以上の光源によって発光された励起光によって励起容積部内で非線形のルミネセントマーカーを励起する工程(103)、及びルミネセント光検出位置で検出器による励起光により、ルミネセンスマーカーからのルミネセンスを検知する工程(107)を含み、前記励起光はパルス励起光を含む。

10

#### 【0093】

量子収量はパワー密度と共に増加し定数に徐々に接近する。パルス励起は高いピークパワーを有しているので、信号レベルにおける利得は、同じ平均パワーをもつ持続波励起と比較されるパルス励起から提供される。

20

#### 【0094】

パルス励起によって狭い時間窓に励起光子の同じ数を閉じ込めることは、それゆえ、より強いアップコンバージョンエミッショニン光を得るために、励起光子を使用して、より効率的に提供され得る。これは、CWを用いてNaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>、Tm<sup>3+</sup>ナノ粒子、あるいは励起と同じ平均パワーを持つパルス光を示している図11において確認される。パルスは、10ミリ秒のパルス幅および100ミリ秒の期間を有しており、およびCW及びパルス励起の両方のためのビームサイズは図11における直径で0.70mmである。図11に示されるように、約2の因数だけ信号利得は、1.94mWの同じ平均パワーを備えたCW励起と比較してパルス励起を使用することにより得られる。

30

#### 【0095】

励起光をパルス化したことによって、アップコンバーティングナノ粒子を使用する場合の量子収量の著しい増加が提供される。さらに、パルス化した励起光は、持続波励起と比較して、シングルショットの深い組織イメージング、大きなイメージング深度および短いデータ収集時間を提供する。励起光の熱の副作用もパルス光ゆえに抑えられる。

#### 【0096】

パルス励起光は、さらに深い組織中の生体分子の拡散光学イメージング、光線力学療法および遠隔の活性化を提供する。前述の効果は、以下の「単安定素子イメージング」の下で詳細に記載するが、これは本出願の一部である。

#### 【0097】

パルス励起による追加の利点および長いエミッショニン寿命のUCNPは、遅延した検出を採用することにより散乱励起光を抑えることが可能であるということである。これは従来UCNPのためには利用されていない。組織の内部の肉眼的イメージングのためのUCNPの大きな利点は発光のアンチストークス(anti-Stokes)シフトであり、組織自己蛍光を抑える手段を証明している。これは知られており、理論上トータルバックグラウンドのない信号を提供し、大きな関心がある。たとえ組織自己蛍光をトータルで抑えることができても、はるかに強い散乱励起光からの信号をスペクトル的にろ過する先行技術に問題が実際に存在する。パルス励起および時間遅延した検出で、この抑制はより効率的になるだろう。そして、トータルバックグラウンドのない信号の利点は、パルス励起で実際に利用するのがより簡単であろう。方法(100)は、媒質中で励起光の影響のない信

40

50

号の検出に提供するルミネセンスの検出を時間遅延する工程(105)を含み得る。る105の工程をこのように含むかもしれない。図21は、時間間隔(210)の間に衰える強度のルミネセンスが、長さ(w)の励起パルス(201)に続く例を示している。当該方法は、それゆえ、前述の励起光のパルス(201)に続く時間間隔(210)の間のルミネセンスを検出する工程(108)を含み得る。時間間隔は1-100ミリ秒の範囲にあり得る。システム(600)は、従って前述の励起光のパルスに続く時間間隔(210)の間にルミネセンスを検知するために動作可能な検出器ユニット(601)を含み得る。

#### 【0098】

パルス幅依存性の利得：

10

CW励起の下では、励起パワーが2倍になれば、二次パワー依存性ゆえに(ケース1)、パワー密度が非飽和パワー密度レジームにあればフルオレセント強度は4倍高いであろう。

#### 【0099】

パルス励起の下では、定常状態に達するには一定時間(中間のエネルギー準位の寿命までに決定される)を必要とする。立ち上り時間の間のフルオレセント強度は、定常状態条件のフルオレセント強度より弱い。パルス持続時間の期間に、このように、CW励起の下、および2倍高いピークパワーを持つ方形波パルス励起の下でのフルオレセント強度と比較して、後者は4倍より高くなるが、前者未満ではなく、それがケース1とは異なる。従って、パルス脱励起(dexcitation)によるアップコンバージョンエミッション強度における利得はパルス幅依存性である。パルス幅が短かすぎれば、アップコンバージョンシステムはパルス持続時間中の定常状態からずっと離れるであろうし、それゆえ利得はより小さくなるか、あるいは利得は全くない。パルス幅は十分に長くあるべきで、それは、CW励起および異なるパルス幅をもつパルス励起の下でのアップコンバージョンスペクトルの観察の支援により決定することができる。パルス幅が定常状態に達するのに十分に長い場合、パルス励起の下で正規化されたスペクトルは、CW励起の下で正規化されたスペクトルに充分接近するであろう。図12は、異なるパルス幅(1ミリ秒、5ミリ秒、10ミリ秒)をもつCW励起およびパルス励起の下でのアップコンバージョン発光スペクトル(800nmで正規化された)を示す。CW励起は24mW(ビームサイズ0.70mm)の平均パワーを有する。すべてのパルスのピークパワーは、24mW(ビームサイズ0.70mm)である。図12の挿入図は、434-674nmの範囲の部分拡大図を示す。見られるように、パルス幅が10ミリ秒である時、CW励起からのスペクトルおよびパルス励起からのスペクトルの間の相違点は10%未満であり、定常状態あるいは疑似定常状態に達したことを示している。パルス幅が5ミリ秒から10ミリ秒に増加されると、図13(31.04mWの同じ平均パワーをもつCW励起およびパルス励起の下でのアップコンバージョンスペクトルを示す)および図14(異なる平均励起パワーの下での5及び10ミリ秒のパルス幅をもつパルス励起の下で800nmにおける信号の利得を示す)に示されるように、利得が増加される。

20

#### 【0100】

パワー依存性の利得：

30

図10に示されるように、パワー密度を増加させる場合、800nmのエミッションの量子収量は徐々に定数に接近する。したがって、利得は平均パワーを高めることとともに減少する。平均パワーが、量子収量が定数である範囲にある場合、利得はまったくない。図15の(a)-(f)、図16に示されるように、上述した立ち上り時間の間の量子収量ロスにより、我々はさらにいくつかの信号を失う。

40

#### 【0101】

青色発光及び赤色発光は、パワー依存性曲線において大きな傾斜を有し(図9に示されるように)、例えば式(5)においてnがより大きく、(図10に示されるように)800nmの発光より高いオーダーのパワー密度依存性の量子収量を有し、それらは(図9および図10に示されるように)飽和することがより困難であるので、際立った対照で、その

50

利得は 800 nm より大きい。調査された最大のパワー時においてさえ、図 17 の (a) - (c)、図 18 の (a) - (b) に示されるように、赤色発光および青色発光に対する 5.3 と 5.7 の因数による利得が存在する。

#### 【0102】

パルス励起による利得がパルスのパラメーターに関連づけられることを指摘することは注目すべきである。上記の結果はすべて方形波パルス励起で得られる。三角形または正弦波のような異なるパルスは異なる結果を与えるだろう。しかし、信号利得も期待され得る。方形波のデューティサイクルは別の主要パラメーターであり、それは、どれだけ極大ゲインが得られるかを決める。10ミリ秒のパルス幅および100ミリ秒の期間を備えたパルスは、10%のデューティサイクルを持っている。したがって、極大ゲインは 800 nm のエミッションのために 10 (1 / デューティサイクル) でありえる。実施例は、約 3.8 の因数だけ利得を示す。より小さなデューティサイクルの使用によって、より大きな利得が示され得る。従って、本開示は、小さなデューティサイクル、例えば 2 の因数の利得のみを可能にする 50% を下回るデューティサイクル、を使用することにより改善された利得を提供する。小さなデューティサイクルの使用によって、本明細書に記載された利点をもつ改善されたイメージング能力のための高ピークパワーを最良に達成するための利得が提供される。以下に説明されるような単一パルス励起の使用によって、さらに高いパワー密度が、アップコンバージョンナノ粒子の高い内因性の QY を開発するために達成され得る。従って、パルス励起は ANSI 標準に適合する一方で高パワー密度を送達する。

#### 【0103】

##### パワースキャニング断層撮影

図 9 に示されるパワー依存性の変更は、単一の励起点およびいかなる数の検出点を使用して、パワースキャニング断層撮影を行なうために使用することができる。そのコンセプトはパワー依存性曲線として簡単に要約することができ、各離散的になった領域では、与えられた傾斜係数が予期されたルミネセンスを生成 (シミュレート) するための入力として使用される。これは、空間的スキヤニングなしに励起起源を単にパワースキャニングすることで極めて迅速なやり方で従来の最適化方法を使用して、断層撮影の再構築を行なうためにさらに使用することができる。利点は、スピードと、可動部がないこと、及び単純化した器具を含んでいることである。

#### 【0104】

結論として、パルス励起を使用することで、同じ平均パワーをもつ CW 励起と比較して、アップコンバージョン発光強度が増強され得る。増強は、より高い効率を備えた同じ量の励起光子の使用から始まり、それはアップコンバージョンナノ粒子、 $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}$ 、 $\text{Tm}^{3+}$  のパワー密度依存性の量子収量に起因する。利得はパルス幅とパワー依存性である。

#### 【0105】

この提案された技術は、アップコンバージョン能力をより効率的に利用するための一般的なアプローチである。それは、 $\text{Yb}^{3+} / \text{Tm}^{3+}$  共ドープされたアップコンバーティングナノ粒子に対して作用するだけでなく、任意のアップコンバーティングナノ粒子或いはアップコンバーティングバルク材料に対しても作用する。それは、3つの光子プロセスからの $\text{Tm}^{3+}$  の青色発光及び赤色発光などのより高いオーダーのアップコンバージョン発光に対して作用する。このアプローチは、生物学的組織における光線力学療法に必要とされた短波長アップコンバージョン発光を増強するのに役立ち得る。

#### 【0106】

アップコンバージョン発光のパワー依存性の特徴は、単一の励起点を使用して、パワースキャニング断層撮影を行なうために使用することができる。

#### 【0107】

##### 組織ファントム中のパルス励起によるアップコンバージョン信号増強

この技術の有効性も組織ファントム中での測定によって確認される、図 19 a、19 b、19 c 参照。実験は、水、資質内およびインクから製造された 10 cm - 1 の減じられた

10

20

30

40

50

散乱係数と、 $0.5 \text{ cm}^{-1}$  の吸収係数とを備えた 20 mm 厚さの液体組織ファントム中で実行された。NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>、Tm<sup>3+</sup> ナノ粒子 ( $c = 1$  重量%) のコロイド状のヘキサンで充填された 2 mm の内径のガラス管が、10 mm の深さを備えたファントムに挿入された。975 nm の CW レーザダイオード、及び調整可能なパルス幅と同じ波長の期間をもつパルスレーザの 2 つのレーザ源が、比較のために使用された。レーザのスポットサイズは直径 1 mm だった。異なる 2 つのセッティングがパルスレーザに使用された：

(a) セッティング 1：5 ミリ秒のパルス幅、250 ミリ秒の期間、図 19 b；(b) セッティング 2：10 ミリ秒のパルス幅、500 ミリ秒の期間、図 28 c。CW 励起又はパルス励起の励起下で、800 nm で得られたアップコンバージョン発光イメージは、図 19 a、19 b、19 c で示される。平均パワーはすべての測定に対して同一（100 mW）に維持された。パルス励起下の強度は、セッティング 1 と 2 のために CW 励起下の強度よりそれぞれ約 6 倍および 6.75 倍高い。

#### 【0108】

図 19 a は、100 mW のパワーをもつ CW レーザダイオードの励起下で 800 nm において得られたイメージを示す。

#### 【0109】

図 19 b は、100 mW の平均パワーをもつパルスレーザ（方形波、パルス幅 5 ミリ秒、期間 250 ミリ秒）の励起下で 800 nm において得られたイメージを示す。

#### 【0110】

図 19 c は、100 mW の平均パワーをもつパルスレーザ（方形波、パルス幅 10 ミリ秒、期間 500 ミリ秒）の励起下で 800 nm において得られたイメージを示す。

#### 【0111】

パルス励起から得られるより高い強度は、アップコンバージョン信号レベルの増加による改善されたイメージングを提供する。さらに、パルス励起は、増加した信号レベルと改善されたイメージングを維持しつつ、生物学的組織中の熱効果を減じる。例えば、強いピーク信号を生成するレーザ（ピークパワーは、例えば 100 W まで）による単安定素子（10 ミリ秒 - 100 ミリ秒）は、その後励起起源を切ることで、組織を過熱しないが、劇的にエミッション信号を増加させるために、生物学的組織が冷めることを可能にするだろう。さらに、イメージングのために受容できる信号レベルを達成するために、同じ結果を生じるためにより多くのパワーを要求する連続波レーザダイオードと比較して、パルス励起光を備えた非常に低出力の光源を使用することは可能だろう。

#### 【0112】

##### パルス励起光をもつ単安定素子イメージング

アップコンバーティングナノ粒子（UCNP）の制限された量子収量（QY）は、特に低い光の条件で、最も潜在的な生物学的適用のための主な関心事である。当該分野での非常に有力な 2 つの技術は、深い組織光学イメージングと光線力学療法（PDT）であり、その両方は高い QY を要求する。現在の低い QY の問題は、増加した治療およびデータ収集時間、および浅い適用可能な深度を生じることにより、これらの技術の可能性を妨害する。低い QY は励起光レベルを上げることによりある程度まで克服されるが、そのような改善は組織加熱（ANSI 基準によって規制される）の点から副作用の危険性によって CW 励起のために制限される。本発明の実施形態によれば、パルス励起の採用によって、励起光の熱効果を制限しつつ、アップコンバージョン（UC）発光の低いパワー密度限界を克服する低い QY が提供される。さらに、UCNP の適用可能性は、単安定素子励起のスキームの利用によりさらに高められ得る。多光子の顕微鏡法に似ている、パルス励起は、平均パワー（加熱の原因である蓄積されたエネルギーを意味する）を適度に維持しつつ、パルス中に高い光子密度を提供し得る。UC 発光の非線形のパワー密度依存性により、パルス励起は本開示で述べられるような有益な効果を奏する。

#### 【0113】

本開示の実施例は、低い量子収量を実証する従来技術での問題を克服するために、UC 発光の励起動態を考慮する。以下の開示は著しい QY 増加を実証する実験とシミュレーション

10

20

30

40

50

ンの実施例を挙げており、著しいQ Y 増加は本発明の実施形態による方法、システム及びシステムの使用で、パルス励起光を使用することにより達成することができる。例えば、パルス励起光は、一致したパルス特性、すなわち有利な効果を奏するために、充分に長いパルス幅と非飽和遷移によって使用される。これはパルス励起を、UCNPのため、とりわけ深く位置付けられた組織体積のため、理想的な励起アプローチにする。加えて、UCNPの単安定素子イメージングは、増加したQ Y により実行することができ、同じ温度増加を引き起こすCW光励起と比較して、イメージング深さを改善しつつ、大きさのオーダーによってデータ収集時間は短くされ得る。したがって、本開示は、拡散光励起に依存する深い組織領域のUCNPの適用可能性を基本的に広げる可能性がある。励起動態はレート式(*rate equation*)を用いてモデル化され得る。一般化を失わずに、 $Y_b^{3+}/Tm^{3+}$  共ドープシステムの800nmでのNIR UC発光は、以下の実施例でモデルとして使用され得る。図29(a)は、Q Y が異なるパワー密度のCW励起が続く、定常状態の条件でシミュレートされCW励起を示す。見られるように、純粋に線形的ではなく複雑に励起パワー密度と共にQ Y が増加し、徐々に飽和する特徴、つまり、高い励起パワー密度で定数に接近する特徴を示す。図29(b)は、CW励起の下で、および第1のパルス持続時間でのパルス励起の下で、一時的にシミュレートされた累積的なQ Y を示す。CW励起は、1W/cm<sup>2</sup>の一定パワー密度を持っている。2Hzの周波数および4%のデューティサイクルを有するパルス励起は、それぞれ、「オン」状態及び「オフ」状態で、25W/cm<sup>2</sup>および0W/cm<sup>2</sup>のパワー密度を持っている。それゆえ、CW励起と同じ平均パワー密度に帰着する。見られるように、エネルギー準位が励起の一時的な影響により占められる場合、CW励起の下では、UCエミッションはまさにその初期段階の場合以外は一定のQ Y を持っている。この一定のQ Y は、UCシステムの定常状態に関係していて、図2(a)中の1W/cm<sup>2</sup>のパワー密度でのQ Y によって与えられる。パルス励起の下では、Q Y は、レーザパルスの開始時には非常に小さく、その後、経時に増加する。パルス持続時間の長さが許せば、Q Y はCW励起下のQ Y を越えて、漸近的に、最大値に接近するだろう。この最大値は、図29(a)中の25W/cm<sup>2</sup>のパワー密度の定常状態でQ Y に制限される。明らかに、等価なCW励起に置き換えるためにパルス励起を使用する利点は、より高いエネルギー転換効率と共に潜在的に遅い励起光子を使用できることである一方で、損失は、各パルス持続時間の早期励起光子がCW励起の間よりも低い効率で使用されることである。同じエネルギー量の下の増加したパワー密度と、減少した励磁時間の平衡を保つことによって、全面的なUC信号利得が期待され得る。

#### 【0114】

パルス励起の下の多数の期間の長期的なQ Y は電位信号利得におけるパルス幅の影響を決定するために調査された。平均パワー密度は0.1W/cm<sup>2</sup>で維持された。この研究で使用されるパルス励起は、別段の定めがない限り、4%の同じデューティサイクルを持っており、その周波数は異なるパルス幅を達成するために調節された。図29(c)に示されるように、顕著なUC信号利得は、周波数が50Hzを充分に下回る場合に、パルス励起を使用することにより得られる。例えば、[0および500]ミリ秒の時間間隔中の2Hzの方形波による信号利得は、およそ8である。信号利得は周波数とともに減少する。つまりパルス幅と共に増加する。周波数がさらに高い(例えば100Hzまで)場合、パルス励起によって生成された信号は等価なCW励起によって生成された信号よりわずかに小さくなる。信号利得が応用のパワー密度とともに減少することは注目されるべきである。平均パワー密度が1W/cm<sup>2</sup>に増加される場合、利得は2まで減少する。図29(a)に示されるように、これはUC発光の徐々の飽和特性に帰着され得る。

#### 【0115】

実験的に上記のシミュレーションによって示されるようなパルス励起による信号中の利得を有効にするために、実験は、ヘキサン中で分散したコロイド状の安定した安定したコア-シェルNaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup>@NaYF<sub>4</sub>UCNPに対して実行された。図3(b)に示されるように、準備したUCNPは975nm光の励起下で約800nmで

主なUC発光帯を発光する。異なるパルス幅を備えたCW励起およびパルス励起の下でNIR UC発光の強度が記録された。励起光の平均パワー密度は $0.12\text{ W/cm}^2$ に維持された。図26(a)に示されるように、パルス幅と共にモノトーン(monotonically)で増加する信号利得は、0.8ミリ秒のパルス持続時間有するパルス励起の使用により得られた。パルス幅が20ミリ秒に達すると、利得は8.7もの高さである。これらの結果は、図29に示された、シミュレートされた結果によく合う。本実施形態(~0.8ミリ秒)における信号利得のために必要なパルス幅が、図26(a)の挿入図中に示されるように、およそ10ミリ秒のUC発光の立ち上り時間よりはるかに短いことを指摘することは注目すべきである。

## 【0116】

印加パワー密度へのUC信号利得の依存性は、等価なCW励起と共に、20ミリ秒の固定パルス幅および500ミリ秒のパルス持続時間を備えた方形波励起を使用して調査された。図26(b)は、様々な平均の励起パワー密度でのパルス励起によるUC信号利得を示しており、励起パワー密度の増加につれて減少する傾向がはっきり見られる。調査された最小のパワー密度(~0.12W/cm<sup>2</sup>)において、信号利得はおよそ8.6である一方で、最大パワー密度(~4.65W/cm<sup>2</sup>)において、パルス励起によって生成されたUC信号はCW励起によって生成されたそれよりわずかに弱い。図26(b)の挿入図に示されるように、励起パワー密度へのUCエミッション強度の依存性は、CW励起の下でよりも小さな傾斜を示す。これは上記の信号利得傾向について説明することができる。励起パワー密度を増加させる增幅結果は、本質的にUC放射の非線形のパワー密度依存から始まる。したがって、高いオーダーのパワー密度依存性はより大きなUC信号利得に帰着するだろう。これは、青色発光および赤色発光での測定によって確認され、両方とも3つの光子励起作用を介して生成された。図30に示されるように、それらは所定のいかなる平均パワー密度でもNIR UCエミッションより著しく大きな信号利得を示す。

## 【0117】

深く位置づけられたUCNPをイメージングするための励起アプローチとしてパルス源を使用するメリットは、その後、液体組織ファントム中で有効になった。

水、イントラリピッドおよびインクで作られたファントムは、 $\mu'_{\text{s}} = 10.1\text{ cm}^{-1}$ の減少した散乱係数と、975nmで $\mu_s = 0.52\text{ cm}^{-1}$ の吸収係数を持つために、光子タイム・オブ・フライト分光法(PTOFS)システムによって決定され、厚さは17mmだった。コロイド状のコア-シェルUCNP(c=1重量%)を含む2mmの内径をもつガラス管が、実際の組織の内部でラベルがUCNPに付けられた標的(例えば腫瘍)を模倣するために、発光取りこみとしてファントムに挿入された。20ミリ秒のパルス幅および500ミリ秒の期間を備えた、CWレーザダイオードおよびパルスレーザを含む、2つの975nmのレーザのうちの1つのレーザは、励起光を提供するために使用された。組織ファントムの表面上に当たる平均パワー密度は、両方の励起アプローチに対して $1.2\text{ W/cm}^2$ だった。励起源と検出器はトランス・イルミネーション幾何学で位置づけられた。

## 【0118】

励起源から10mmの深さで埋められると、図27(a)に示されるように、図27(b)で示されるように、発光介在物は、10秒の露光時間でさえCW励起の下でかろうじて検知できるが、パルス励起の使用によりS/B比は、同じ検出条件下のおよそ7倍も著しく増加された。明白な意味は、著しくデータ収集時間を減少することができる所以であり、等価なCW励起として信号品質を維持する場合、イメージング深さが増加されることである。UCエミッションのQYは、さらに高いパワー密度を提供する励起として単一パルスを使用することによりさらに最適化され得る。例えば、975nmにおけるヒトの皮膚への接触用の最大許容パワー密度は、20ミリ秒のパルス幅および2Hzの周波数を備えた反復パルス励起のための $17.4\text{ W/cm}^2$ である一方で50ミリ秒の単一パルスのための数の高さは補足の材料に帰する $36.9\text{ W/cm}^2$ もある。UC発光の立ち上り時間より長いパルス幅を備えたそのような強い単一パルスは、UCNPがエネルギー変換の点

10

20

30

40

50

から非常に効率的な方法で使用されることを可能にする。この励起アプローチは、ANSI標準を違反せずに、UCNPを使用するイメージング能力を高めるだろう。

#### 【0119】

単安定素子イメージングのフィージビリティはこのように実験的に調査された。36.9 W / cm<sup>2</sup> の励起パワー密度を提供する50ミリ秒の單一パルスが使用された。ルミネセント介在物がパルス源から13mmの深さに置かれた時、図27(d)に示されるように、epi-蛍光イメージング・セットアップをさらに使用して、1秒の露光時間をもつ單一パルス励起を使用することを検知することができた。しかしながら、CWレーザが励起源として使用された時、同じ照明面積領域(即ち、709.6 mW / cm<sup>2</sup>)でのANSI標準による最大の許容可能なパワー密度を出力して、図27(c)に示されるように、介在物は、10秒よりさらに長い露光時間でさえ検知できなかった。励起源と検出器が同期される限り、單一パルス励起のための露光時間はUC信号品質の損害なしに50ミリ秒までも短縮され得る。ここで実証された例は、UCNPにガイドされた深い組織で単安定素子UCNPにガイドされる光学的イメージングにおける大きい励起のポテンシャルを示す。

#### 【0120】

深い組織ファントム中のUCNPの単安定素子イメージングは、QYを著しく増加するためにパルス励起を使用して、本発明の実施形態にしたがってこのように達成され得る。これによってパルス励起のアプローチは、拡散光学イメージングのみならず、光線力学療法および深い組織中の生体分子の遠隔活性など他の多くの生物医学的な応用へのUCNPの適用可能性を著しく増加させる。さらに、金属のナノ構造体は、表面のプラズモン結合によってそれらの局所場増強効果に起因するUC発光を増強するのに有効であり得る。それゆえ、パルス励起とデコレーションと金属のナノ構造体との組合せは、励起パワー密度を増加させる相乗効果により、拡散光レジメでのUCNPを使用する主なスキームを可能にし得る。本発明の一実施形態による方法(100)は、それゆえ、前記パルス励起光に露出させるために前記媒体に金属ナノ構造体を提供する工程(117)を含み得る。かかるパルス励起アプローチは、励起したTm<sup>3+</sup>を介してそれらの高いオーダーの多段式の励起の性質による生物学への適用におけるEu<sup>3+</sup>およびTb<sup>3+</sup>などのイオンからの移動を媒介としたUC発光の適用可能性をさらに増加させる。加えて、本開示は、限定された照明領域を介して励起フルエンス率を増加させることにより、低い軽荷状態で非線形の発蛍光団(UCNPおよびトリプレット・トリプレット消滅に基づいたアップコンバーターを含む)のアプリケーションを促進するために一般法を提供する。

#### 【0121】

方法(100)は、それゆえ、第1のパルス(201)によって非線形のルミネセンスマーカー(104)を励起させる工程を含む。すなわち、パルス励起光は少なくとも1つの光のパルスを含む。さらに、方法(100)は、前記第1のパルスから單一パルスルミネセンスマーカーからのルミネセンスを検知する工程(106)を含む。この單一パルスイメージングは、CW励起に対する上記利点のいくつかのものを提供する。

#### 【0122】

方法(100)は、アップコンバートされた光が非常に効率的なやり方で出力されるように、アップコンバートされた光の発光に関連付けられた非線形のルミネセンスマーカーのエネルギー準位の所望の母集団に実質的に供給するために、パルスの長さ(w)などの少なくとも1つのパルスのパルス特性を、非線形のルミネセンスマーカーのエネルギーレベルの遷移条件とマッチングさせる工程(102)を含み得る。励起/発光・プロセスに関するエネルギー準位遷移のダイナミクスは、それによって、パルスの特性を適応させるために、考慮に入れられる。つまり、ルミネセンスの適切かつ最適化された強度を提供するために、パルス特性が特定の条件で提供するように調整することができ、該特定の条件、例えば、発光・プロセスに関する励起状態の寿命の期間を考慮に入れることによって、エネルギー準位の母集団が希望のスキームに従う。それゆえ、方法(100)は、前記

非線形のルミネセンスマーカーの励起を提供するために、前記パルス光のパルス幅および／またはパルス波形を決定する工程（116）を含み得る。

#### 【0123】

この文脈では、方法（100）は、アップコンバートされた光の発光に含まれるエネルギー準位まで励起を供給する範囲にあるようにパルス励起光のパルス幅（w）を決定する工程（104）を含み得る。パルスの長さはエネルギー準位の寿命の計算に基づいて決定され得る。連発パルス中の各パルスの長さは約1-100ミリ秒の範囲にあり得る。システム（600）は、それゆえ、寿命計算など前述の非線形のルミネセンスマーカーのエネルギー準位遷移条件の計算に基づいて、前述の励起光のパルス幅を決定するために動作可能な演算処理装置（603）を含み得る。

10

#### 【0124】

方法（100）は、図27の（d）に関して記述されたような単一パルスルミネンス分子イメージングのために約20-200ミリ秒の範囲にある、パルス励起光のパルス幅（w）を決定する工程（104）を含み得る。

#### 【0125】

方法（100）は、予め定義したパルス励起光の特性を設定するために前述の励起光のパワーについて検知されたルミネンスの依存性を決定する工程（115）を含み得る。

#### 【0126】

図26の（a）を参照して、信号利得は0.8ミリ秒という短いパルス幅を使用して得られ得る。加えて、最適なパルス幅は材料に依存する。例えば、 $\text{Yb}^{3+}$  /  $\text{Er}^{3+}$  共ドープ材料のための最適な持続時間は  $\text{Er}^{3+}$  /  $\text{Tm}^{3+}$  共ドープ材料のための最適な持続時間より短い。なぜなら  $\text{Er}^{3+}$  イオンの中間のエネルギー状態は  $\text{Tm}^{3+}$  イオンのエネルギー状態より通常短い寿命を有しているからである。

20

#### 【0127】

約100μsのパルス幅を有することは、典型的には十分な信号利得を提供しない。関連する寿命より長いパルス幅は、改善された量子収量を提供し、それによってイメージング能力を改善することにおいて有利であり得る。利得は0.8ミリ秒のパルス幅を有する一方で0.8ミリ秒以上の寿命を有することで提供され得る。パルス励起の使用による利得は、本質的に高いピークパワー密度から始まる。あまりにも短いパルス幅は、より高いピークパワー密度によってもたらされた有益性を「食べ尽くす」。0.4ミリ秒のパルス幅に対応する100Hz、50%のデューティサイクルパルスを使用するとき、特定のナノ粒子に対するパルス励起を使用することによる信号利得は存在しない。ナノ粒子をアップコンバートするように励起するフェムト秒あるいはマイクロ秒パルスレーザは、本開示によって提供されるような信号利得を示さない。パルス幅の上限については、関心事は、パルス幅が大きければ（一般に、デューティサイクルがこの技術には小さいので）、検出システムの待ち時間長すぎることである。例えば、100ミリ秒のパルス幅および10%のデューティサイクルを備えたパルス励起については、レーザによって生成された次の期間のルミネンス信号を集める前の待ち時間は、900ミリ秒である。それは受けられない。しかし、待ち時間があまりに長ければ、実験における時間で経済的ではない。

30

#### 【0128】

単一パルス励起については、パルス幅を増加させることは有利かもしれない。関心事は、レーザは、単一パルスの送達後にかなりの時間休止するので、ルミネンス信号はそのような区間の中でのみ生成されるということである。パルス持続時間が短すぎれば、組織の表面から逃げる、生成された発光光子は、良好な信号を与えるには少なすぎる（しかし、QYの増加は、それで等価なCW励起と比較される）。単一パルスのための持続時間の望ましい区間は20-200ミリ秒でありえる。単一パルスがあまりに長いと、それはあまりにCWソースを望むであろう。その場合、ANSI標準にしたがって、好ましくは高いピークパワー密度を使用することは許されない。

40

#### 【0129】

ここで図22-25に言及する。方法（100）は、（パワー密度曲線206、207に

50

関して図 23 に例証されているように、時間 (t) の関数としてのパルス励起光のパワー密度 (I) を変化させる工程 (109)、パワー密度へのルミネセンスの量子収量の依存性 (Q/I) を決定する工程 (110)、及び量子収量の依存性に基づいた散乱性媒質中のマーカー位置の相対的な深さ座標 (203) を決定する工程 (111) を含み得る。異なるパワー密度について図 20 に例証されているように、一連のパルス (w1, w2) は、励起光として使用され得る。量子収量がパルスのとおのについて計算することができ、図 25 に例証される依存性 (Q/I) が決定され得る。励起光のパワー密度が変えられるにつれて量子収量がどのように変わるかに依存して、図 22 の中のマーカー 209 および 208 についてそれぞれ例証されているように、媒体中にマーカーが比較的深く位置するか、浅く位置するかを決定することができる。媒体中のより浅い位置 (204) を有するマーカー (208) は、図 25 中の Q/I 曲線で示されるように、より深い位置 (205) を有するマーカー (209) と比較して、パワー密度が変えられるにつれて、ルミネセンス量子収量に、より少ない分散を示すだろう。方法 (100) は量子収量依存の導関数 ( $dQ/dI$ ) に基づいた相対的な深さ座標 (203) を決定する工程 (112) を含み得る。そして、方法 (100) は、それぞれ第 1 及び第 2 パワー密度 (11, 12) を有する第 1 及び第 2 パルス (201, 202) を備えた非線形の発光マーカーを順に励起する工程 (113) と、当該第 1 及び第 2 パルスからの量子収量における変化に基づいて総体的な深さ座標 (203) を調整する工程 (114) を含み得る。これは、それらの相対的な大きさの影響を考慮に入れずに、異なる深さマーカーを区別すること可能にする。

10

20

### 【0130】

システム (600) は、それゆえ、時間 (t) の関数としてパルス励起光のパワー密度を変化するように動作可能な制御ユニット (602) と、パワー密度へのルミネセンスの量子収量の依存性 (Q/I) を決定し、かつ前記量子収量依存性に基づいた散乱媒体中のマーカー位置の相対的な深さ座標 (203) を決定するために動作可能な第 2 の処理装置 (604) を含み得る。システム (600) は叙上のとおりの方法 (100) を実行するための制御ユニット (605) を含み得る。さらに、方法 (100) を実行するためのシステム (600) の使用は、本開示に従って提供される。より詳しくは、システム (600) の使用は、タブレットのルミネセンス画像診断か発光断層撮影法のため、および / または拡散光学画像診断のため、および / または光力学療法および / または深い組織中の生体分子の遠隔の活性化および / または小さな動物のインビボ (in-vivo) 若しくはインビトロのルミネセンス画像診断あるいは発光断層撮影法のためのおよび / または前記ルミネセンス画像診断あるいは発光断層撮影法によって癌診断などの機能的診断法のため、および / または探針として前記非線形の発光マーカーを使用する誘導放出消耗 (STED) あるいは単一の分子の検知を含む超高解像度の顕微鏡検査法のために開示される。

30

### 【0131】

光力学療法に基づくナノ粒子をアップコンバートするパルス励起の潜在的な使用 この提案された技術は、アップコンバージョン能力をより効率的に利用するため的一般的なアプローチである。それは、 $\text{Yb}^{3+}$  /  $\text{Tm}^{3+}$  共ドープされたアップコンバーティングナノ粒子に対して作用するだけでなく、任意のアップコンバーティングナノ粒子或いはアップコンバーティングバルク・材料に対しても作用する。それは、3つの光子プロセスからの  $\text{Tm}^{3+}$  の青色発光及び赤色発光などのより高いオーダーのアップコンバージョン発光に対して作用する。このアプローチはより短い波長のアップコンバージョン ( $\mu\text{p conversion}$ ) 放射を増強するのに有用であり、生物の組織中のナノ粒子に基づいた光力学療法をアップコンバートするために必要とされる。

40

### 【0132】

本発明が特定の実施形態を参照して上に述べた。しかし、上述以外の実施形態が本発明の範囲内で同様に可能である。本発明の異なる特徴および段階は説明されたもの以外の組合せで組み合わせができる。本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定される。

50

**【 0 1 3 3 】**

本方法は、生きているヒトまたは動物の体で生体内にて行うことができる。この場合、マークーは、血液循環への注入、または皮下的もしくは直接的な腫瘍への注入による、あるいは代替として、局所適用、肺性および他の非侵襲的方法によるなどの任意の方法で体に事前導入することができる。そのような事前導入は残りの方法とは別々に行うことができる。

**【 0 1 3 4 】**

代替としてまたは追加として、本方法は、本方法が行われた後犠牲となるヒトまたは動物の体で行うことができる。

10

**【 0 1 3 5 】**

代替としてまたは追加として、本方法は、生きていないヒトもしくは動物の体、または体の一部、例えば脳死のヒトもしくは動物の体で生体外にて行うことができる。

**【 0 1 3 6 】**

代替としてまたは追加として、本方法は、フィルタまたはタブレットなどの非医学的分野で行うことができる。

**【 0 1 3 7 】****探針として U C N P を使用する超高解像度顕微鏡検査法**

超高解像度顕微鏡検査法は最近開発され、および多くの生物学の研究に非常に興味深く、かつ有用なツールになった。2つのタイプの超高解像度顕微鏡検査法があり、一つは非線形の光学効果に依存するものであり、他の一つは単一の分子検知に依存するものである。それらは両方とも選択された分子が信号を提供する点で共通し、その一方で、他方がフィルタにかけられている。第1のカテゴリーは、S T E D ( s t i m u l a t e d e m i s s i o n d e p l e t i o n ) と S S I M ( s a t u r a t e d s t r u c t u r e d i l l u m i n a t i o n m i c r o s c o p y ) を含み、一方で、単一の分子検知は、p h o t o a c t i v a t e d l o c a l i z a t i o n m i c r o s c o p y ( P A L M ) , f l u o r e s c e n c e p h o t o a c t i v a t e d l o c a l i z a t i o n 5 m i c r o s c o p y ( F P A L M ) および s t o c h a s t i c o p t i c a l r e c o n s t r u c t i o n m i c r o s c o p y ( S T O R M ) を含んでいる。

20

第1のカテゴリーの超高解像度顕微鏡検査法は、近くの探針が非発光にされ得る間、当該探針が発光し得ることを利用している。励起状態は近くの探針のために減らされる。この処置は使用される探針のための要件を設定し、1つは、それが非常に光安定性でなければならず（これは比較的高い励起パワーを要求する非線形の効果であるからである）、非明滅であること（活性状態である間に、それらが終始活性でなければならないから）および探針が光スイッチ動作され得るいくつかのエネルギー準位を持つべきである。U C N P はこれらの要件を満たす特有の特性を備えた、S T E D のための理想的な探針でありえる。

30

**【 0 1 3 8 】**

別のカテゴリーは、他のエネルギー準位に探針が光スイッチ動作することができ、不活性になることができることに依存する。これは低い光レベルを持つ単一の分子のレジメである。さらに、それは自発的な写真明滅に依存することができる。U C N P は、これらの探針中の多くのエネルギー準位を備えたこれらの技術用の興味深い探針になり得る。

40

**【 0 1 3 9 】**

つぎの参考文献は、すべての目的のために参照により全体が本明細書に組み込まれる。

[参考文献1] C . T . X u , J . A x e l s s o n , a n d S . A n d e r s s o n - E n g e l s , A p p l . P h y s . L e t t . 9 4 , 2 5 1 1 0 7 ( 2 0 0 9 ) .

[参考文献2] J . P . C u l v e r , V . N t z i a c h r i s t o s , M . J . H o l b o k e , a n d A . G . Y o d h , O p t . L e t t . 2 6 , 7 0 1 ( 2 0 0 1 ) .

50

[参考文献3] E. Alers tam, S. Andersson-Engels, and T. Svensson, J. Biomed. Opt. 13, 041304 (2008).

【図1】

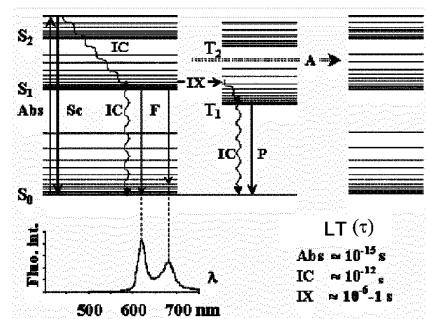
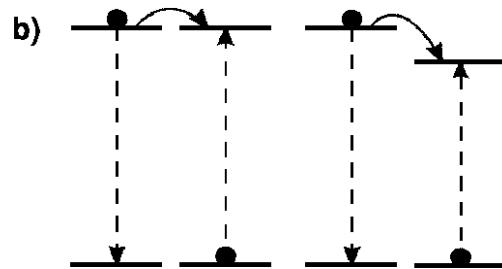
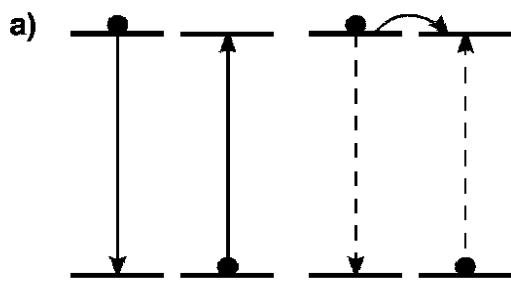


Fig. 1

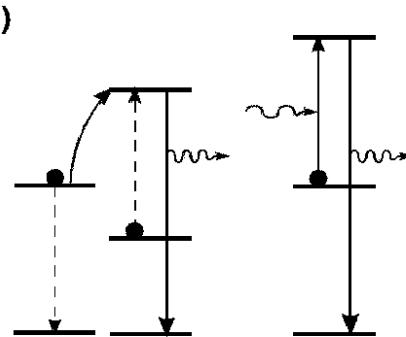
【図2 b )】



【図2 a )】



【図2 c )】



【図 3 A】

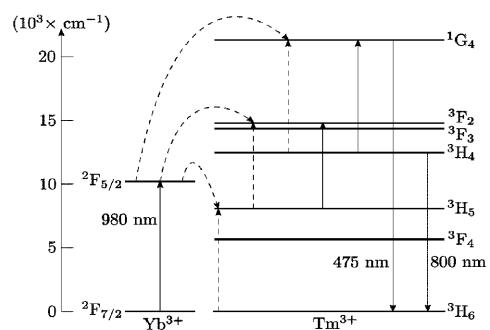


Fig. 3A

【図 3 B】

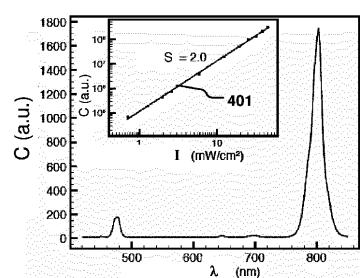
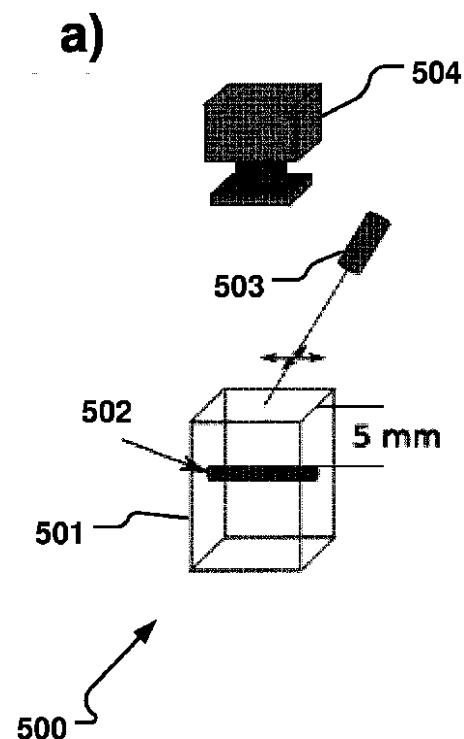
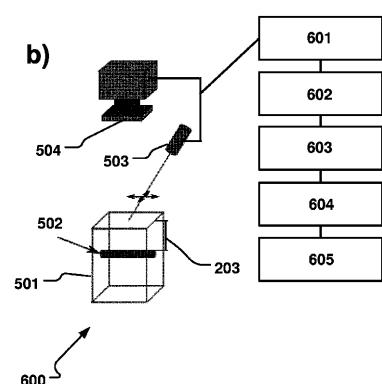


Fig. 3B

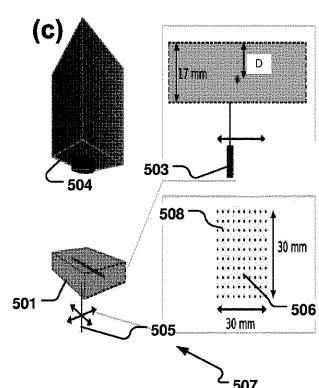
【図 4 a )】



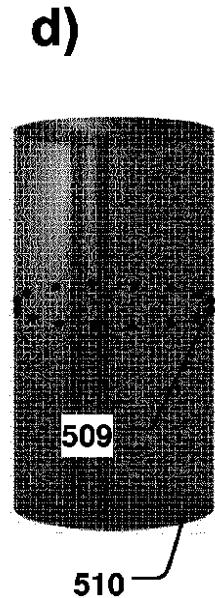
【図 4 b )】



【図 4 ( c )】



【図 4 d )】



【図 5 a - c】

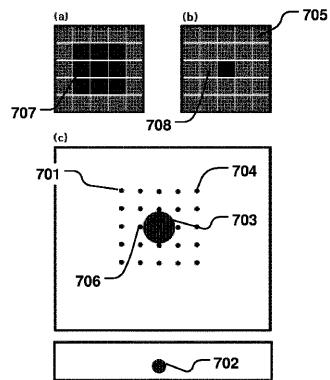


Fig. 5a-c

【図 6】

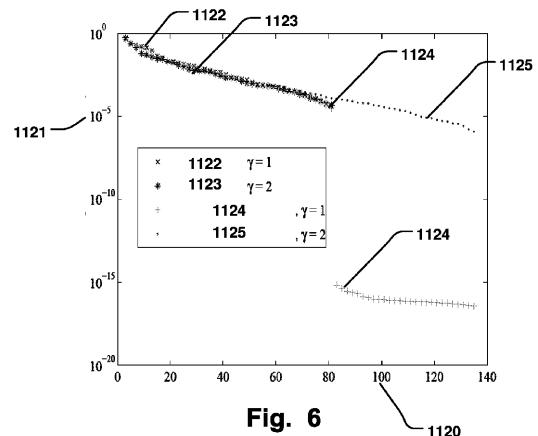


Fig. 6

【図 7 a】

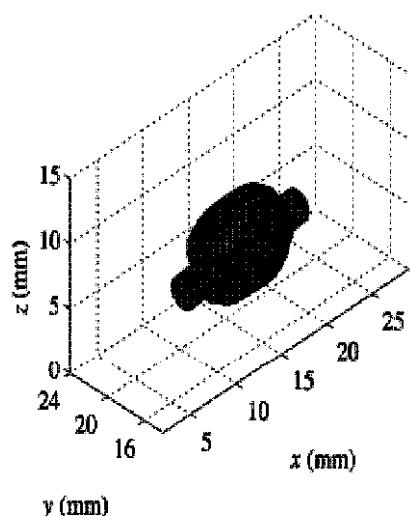


Fig. 7a

【図 7 b】

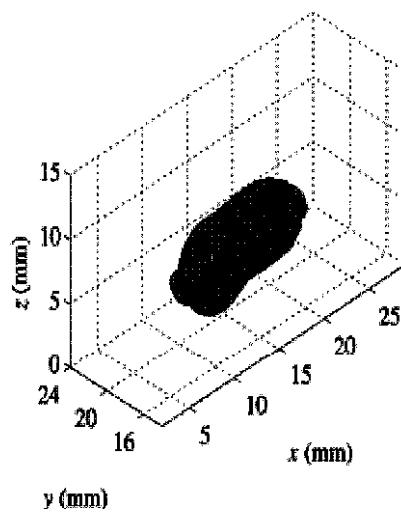
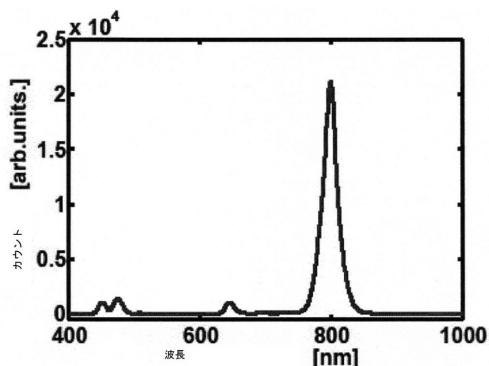
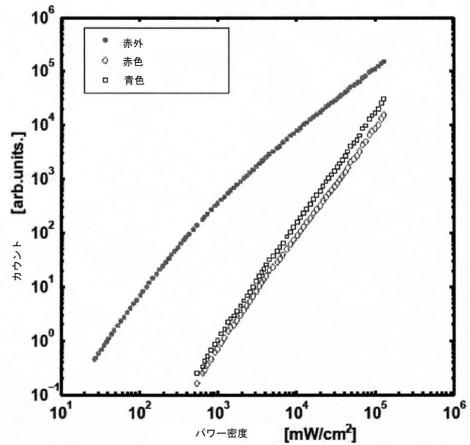


Fig. 7b

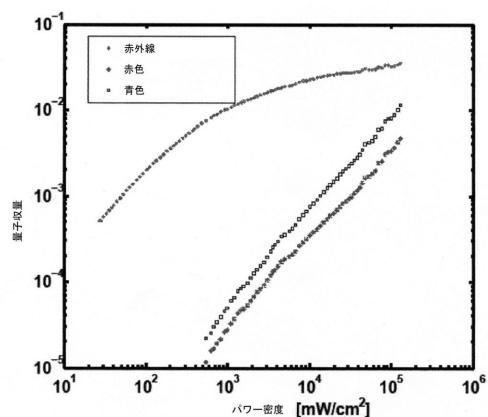
【図 8】



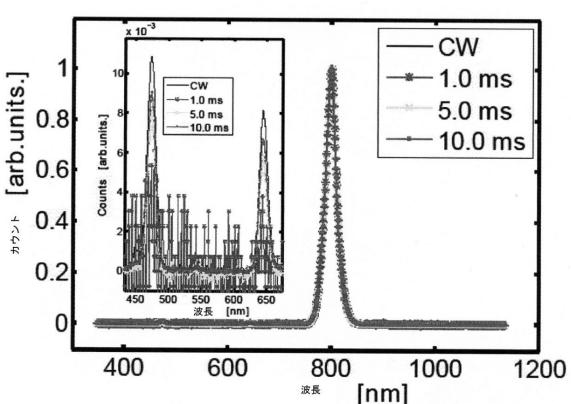
【図 9】



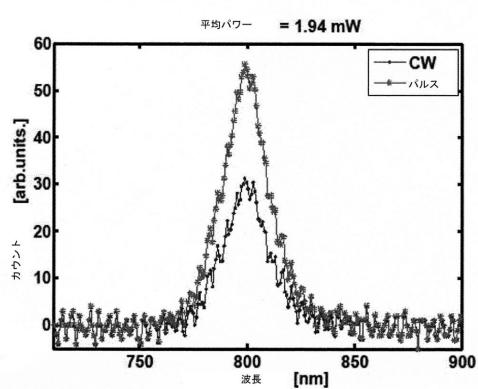
【図 10】



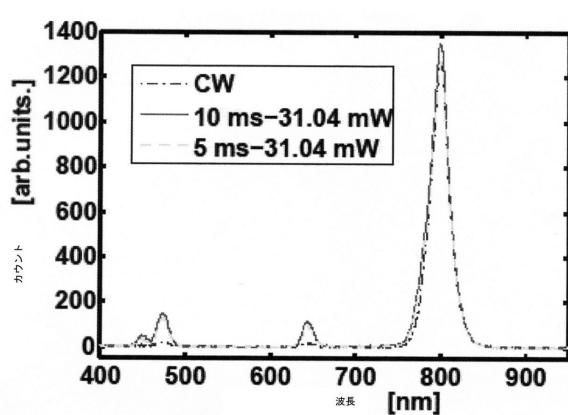
【図 12】



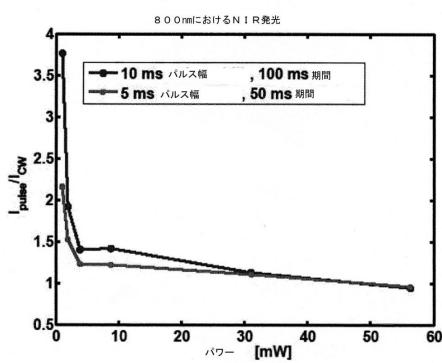
【図 11】



【図 13】



【図14】



【図15】

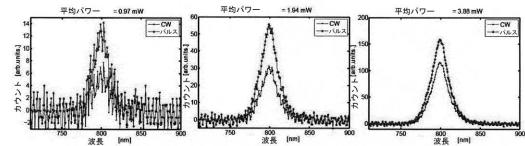


Fig. 15a

Fig. 15b

Fig. 15c

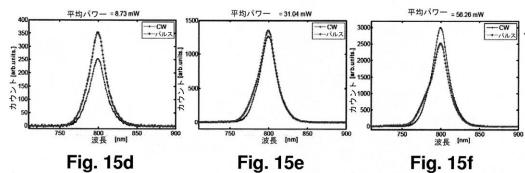
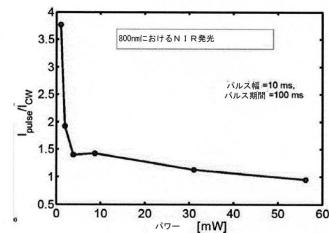


Fig. 15d

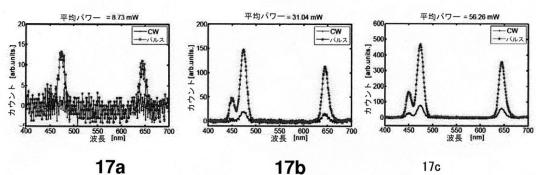
Fig. 15e

Fig. 15f

【図16】



【図17】



17a

17b

17c

【図18】

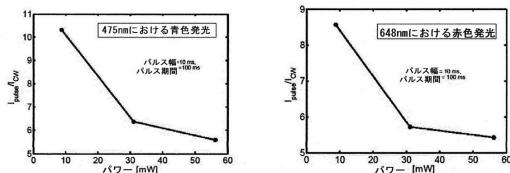


Fig. 18a

Fig. 18b

【図19 b】

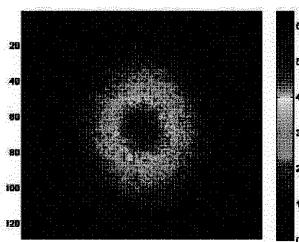


Fig. 19b

【図19 a】

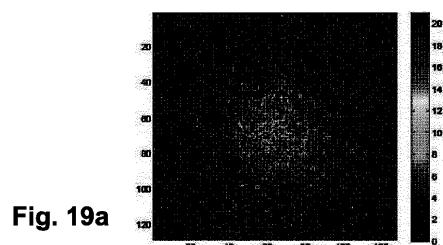


Fig. 19a

【図19 c】

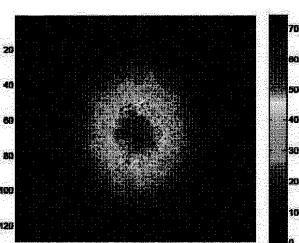
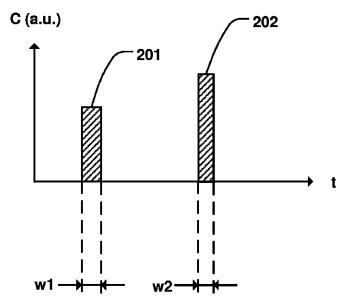
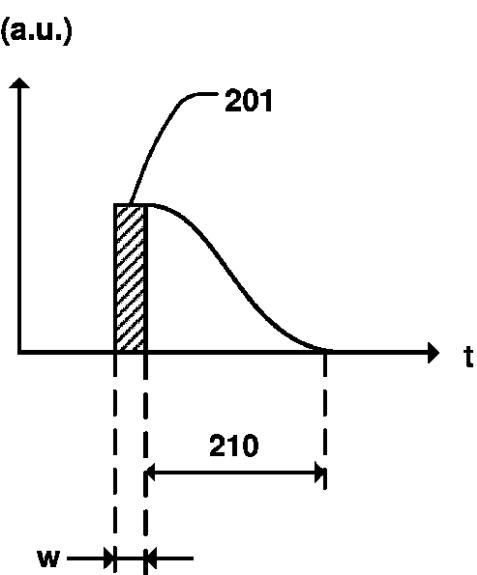


Fig. 19c

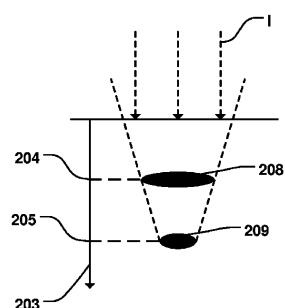
【図 2 0】

**Fig. 20**

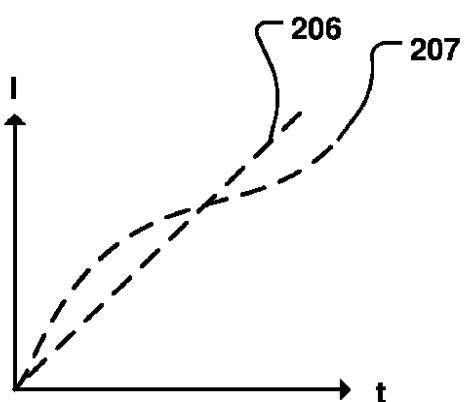
【図 2 1】

**Fig. 21**

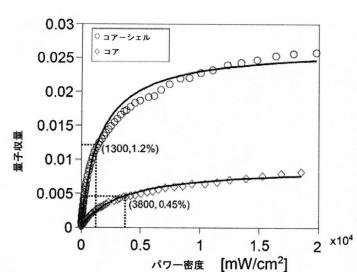
【図 2 2】

**Fig. 22**

【図 2 3】

**Fig. 23**

【図24】



【図25】

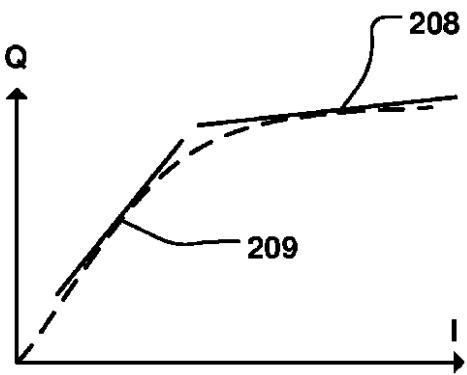
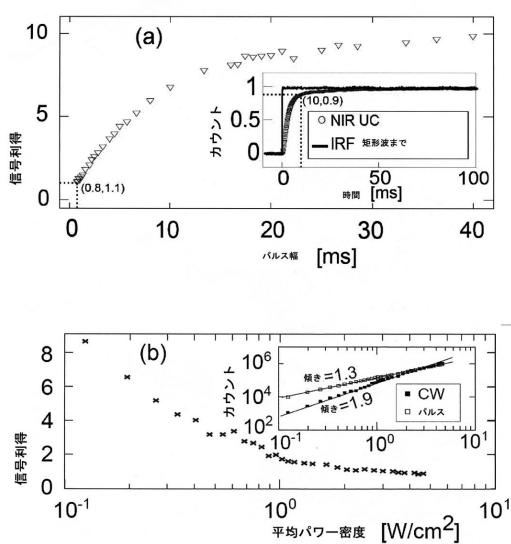
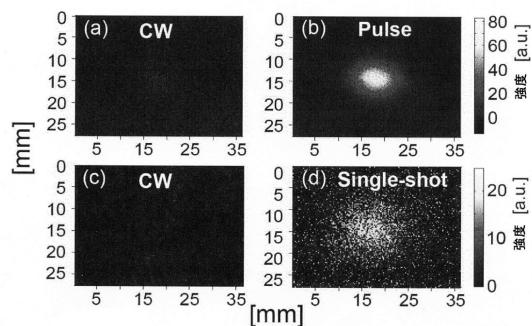


Fig. 25

【図26】



【図27】



【図28】

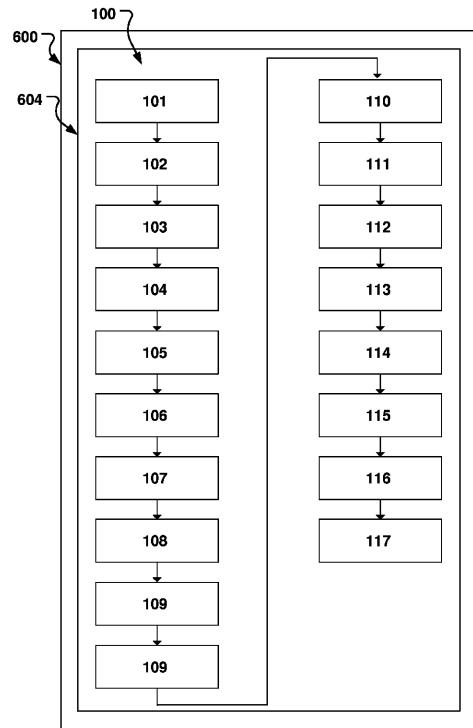
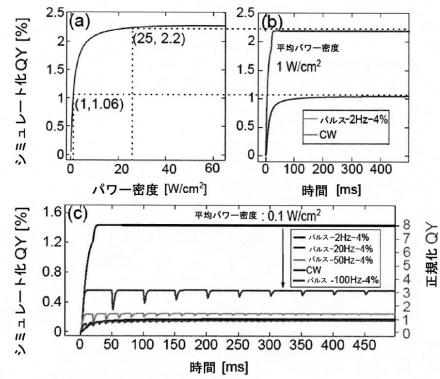


Fig. 28

【図29】



【図30】

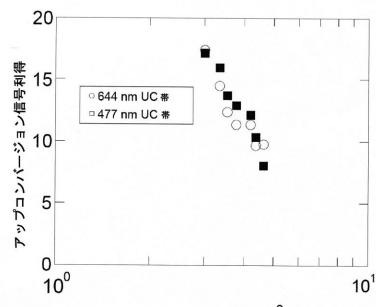


Fig. 30

---

フロントページの続き

(72)発明者 リュー , ハイチュン

スウェーデン エス - 2 2 6 4 6 ルンド エルジーエイチ 1 1 0 8 ケムネルスベーゲン  
5 1 エフ

(72)発明者 スベンマルケル , ポンタス

スウェーデン エス - 9 0 3 2 2 ウメオ ドラゴンガタン 1 1 エー

審査官 門田 宏

(56)参考文献 特開2001-272343 (JP, A)

米国特許出願公開第2012/0104281 (US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 B 1 0 / 0 0

A 6 1 B 5 / 0 0

A 6 1 B 1 / 0 0 - 1 / 3 1 7

G 0 1 N 2 1 / 6 4