

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-515032

(P2016-515032A)

(43) 公表日 平成28年5月26日 (2016.5.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 B 1/00 (2006.01)	A 6 1 B 1/00 3 0 0 D	2 G 0 5 9
A 6 1 B 1/04 (2006.01)	A 6 1 B 1/04 3 7 0	4 C 1 6 1
G 0 1 N 21/17 (2006.01)	G 0 1 N 21/17 6 3 0	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁)

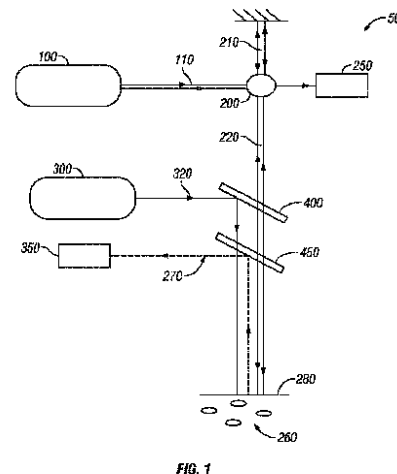
(21) 出願番号	特願2016-502776 (P2016-502776)	(71) 出願人	505098937
(86) (22) 出願日	平成26年3月14日 (2014.3.14)		リサーチ ディベロップメント ファウン
(85) 翻訳文提出日	平成27年10月2日 (2015.10.2)		デーション
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/028403		アメリカ合衆国 ネバダ州 カーソン シ
(87) 国際公開番号	W02014/152961		ティー ノース ディビジョン ストリー
(87) 国際公開日	平成26年9月25日 (2014.9.25)		ト 4 0 2
(31) 優先権主張番号	61/785,030	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013.3.14)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光コヒーレンス断層撮影および二光子発光撮像のための装置および方法

(57) 【要約】

本開示の例示的实施形態は、複合カテーテルベースの光コヒーレンス断層撮影二光子発光 (OCT - TPL) 撮像システムを含む。例示的实施形態はさらに、生体内の高い空間分解能で薄い被膜の線維性アテローム中の細胞成分 (例えば、マクロファージ、コラーゲン/エラスチン線維、脂質液滴) の分布を検出し、さらに特性評価する方法を含む。一実施形態において、装置は、第1の波長を放出するように構成されている光コヒーレンス断層撮影光源と、コヒーレンス断層撮影光源から放出される第1の波長を基準経路およびサンプル経路に向かわせるように構成されているスプリッタと、第2の波長を放出するように構成されている短パルス光源と、第1のダイクロイック要素と、第2のダイクロイック要素とを備えている。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

第 1 の波長を放出するように構成されている光コヒーレンス断層撮影光源と、
前記コヒーレンス断層撮影光源から放出される前記第 1 の波長を基準経路およびサンプル経路に向かわせるように構成されているスプリッタと、
第 2 の波長を放出するように構成されている短パルス光源と、
第 1 のダイクロイック要素と、
第 2 のダイクロイック要素と
を備えている、装置。

【請求項 2】

前記光コヒーレンス断層撮影光源は、掃引源光コヒーレンス断層撮影光源として構成されている、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 3】

前記光コヒーレンス断層撮影光源は、広帯域光コヒーレンス断層撮影光源として構成されている、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 4】

前記サンプル経路は、フォトニック結晶ファイバを通して向かわせられる、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 5】

平衡検出器をさらに備えている、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 6】

前記平衡検出器は、非干渉 OCT 構成要素を最小化するように構成されている、請求項 5 に記載の装置。

【請求項 7】

光子計数検出器をさらに備えている、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 8】

前記光子計数検出器は、光電子増倍管である、請求項 7 に記載の装置。

【請求項 9】

前記光子計数検出器は、アバランシェフォトダイオードである、請求項 7 に記載の装置。

【請求項 10】

前記光子計数検出器は、二光子発光を検出するように構成されている、請求項 7 に記載の装置。

【請求項 11】

前記第 2 のダイクロイック要素は、光子計数検出器の方へ二光子発光を向かわせるように構成されている、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 12】

前記第 1 のダイクロイック要素は、前記第 1 および第 2 の波長を前記サンプル経路に向かわせるように構成されている、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 13】

前記サンプル経路は、ナノ粒子を備えているサンプル部位に向かわせられる、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 14】

前記サンプル部位の画像を表示するように構成されている視覚ディスプレイをさらに備えている、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 15】

前記視覚ディスプレイは、前記装置と前記サンプル部位との間の距離に基づいて、前記サンプル部位の表示の一部分を増進するように構成されている、請求項 14 に記載の装置。

【請求項 16】

前記視覚ディスプレイは、検出値が正規化値を超える、前記サンプル部位の場所の輝度を増加させるように構成されている、請求項 15 に記載の装置。

【請求項 17】

前記ナノ粒子は、ナノロッドとして構成されている、請求項 13 に記載の装置。

【請求項 18】

前記ナノロッドは、金を含み、約 756 nm の表面プラズモン共鳴を有する、請求項 17 に記載の装置。

【請求項 19】

分散補償要素をさらに備えている、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 20】

前記分散補償要素は、前記基準経路と前記サンプル経路との間の分散差を補償するように構成されている、請求項 19 に記載の装置。

【請求項 21】

前記分散補償要素は、二光子発光励起光を事前補償するように構成されている、請求項 19 に記載の装置。

【請求項 22】

サンプル部位を撮像する方法であって、前記方法は、
光コヒーレンス断層撮影光源からサンプル部位に向かって第 1 の波長を放出することと

短パルス光源から前記サンプル部位に向かって第 2 の波長を放出することと、

前記サンプル部位から光コヒーレンス断層撮影信号を検出することであって、前記光コヒーレンス断層撮影信号は、前記第 1 の波長から生成される、ことと、

前記サンプル部位から二光子発光放出信号を検出することであって、前記二光子発光放出信号は、前記第 2 の波長によって誘導される、ことと
を含む、方法。

【請求項 23】

前記光コヒーレンス断層撮影信号および前記二光子発光信号は、複数のサンプル部位から検出される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記サンプルは、組織を含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記組織は、上皮組織である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記組織は、動脈組織である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

前記動脈組織は、冠状動脈の中に位置する、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記組織は、血管管腔表面である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 29】

前記組織は、口腔粘膜である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 30】

前記光コヒーレンス断層撮影信号は、光コヒーレンス断層撮影像を生成するために使用される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 31】

前記二光子発光信号は、光コヒーレンス断層撮影像と位置合わせされる、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 32】

3次元光コヒーレンス断層撮影像上で2次元二光子発光データを表示することをさらに含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 33】

10

20

30

40

50

第 1 の処理要素が、光コヒーレンス断層撮影信号を使用し、光コヒーレンス断層撮影像を構築する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 34】

前記第 1 の処理要素は、中央処理ユニットまたはグラフィックス処理ユニットである、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

第 2 の処理要素が、光コヒーレンス断層撮影像上で位置合わせされた二光子発光画像を見るためにレンダリングする、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

前記サンプル部位は、ナノ粒子を備えている、請求項 22 に記載の方法。

10

【請求項 37】

前記二光子発光信号は、前記ナノ粒子から放出される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記二光子発光放出信号は、前記サンプル部位の組織から放出される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 39】

撮像データを表示する方法であって、前記方法は、
撮像システムを用いて光コヒーレンス断層撮影データを取得することと、
前記撮像システムを用いて複数の発光粒子から二光子発光データを取得することと、
前記光コヒーレンス断層撮影データおよび前記二光子発光データを複合画像で同時に表示することと
を含む、方法。

20

【請求項 40】

前記発光粒子は、ナノ粒子である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記撮像システムは、カテーテルベースの撮像システムである、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 42】

前記カテーテルベースの撮像システムが管腔に沿って軸方向に移動させられるにつれて前記カテーテルベースの撮像システムから取得されるデータに基づいて、3次元画像を生成することをさらに含む、請求項 41 に記載の方法。

30

【請求項 43】

前記光コヒーレンス断層撮影データは、半径方向の次元および方位角の次元のデータを含み、前記二光子発光データは、方位角信号を含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 44】

半径方向寸法を前記二光子発光データに追加することをさらに含む、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記半径方向寸法を前記二光子発光データに追加することは、前記二光子発光方位角信号によって正規化された半径方向確率分布関数を使用することを含む、請求項 44 に記載の方法。

40

【請求項 46】

前記半径方向確率分布関数は、
前記撮像システムの光学性質と、
前記カテーテルベースの撮像システムと前記カテーテルベースの撮像システムが挿入される管腔壁との間の距離と、
前記管腔壁の組織の光学性質と
を使用して決定される、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

前記半径方向確率分布関数は、ナノ粒子の一般的な分布を仮定することを使用して決定さ

50

れる、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記カテーテルベースの撮像システムが管腔に沿って軸方向に移動させられるにつれて前記カテーテルベースの撮像システムから取得されるデータに基づいて、3次元画像を生成することをさらに含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

(関連出願の引用)

本願は、米国仮特許出願第 6 1 / 7 8 5 , 0 3 0 号 (2 0 1 3 年 3 月 1 4 日出願) に対する優先権を主張し、上記出願の内容は、参照により本明細書に引用される。

10

【0002】

(背景情報)

心筋梗塞につながるアテローム性動脈硬化症およびプラーク破裂は、世界中で主要な死因のままである [1]。炎症ならびに基礎的な細胞および分子機構 [2 - 4] は、発生から進行を通じたアテローム発生、プラーク破裂、および最終的には血栓症の一因となる。近年、Virmani [5] によって「薄い被膜の線維性アテローム」として定義されている、脆弱なプラークは、炎症に起因し、典型的には、厚さが 6 5 μ m 未満の薄い線維性被膜、減少した平滑筋細胞を伴うマクロファージの浸潤の増加、および安定したプラークと比較して増加した脂質コアのサイズを有するものとして特徴付けられる [6 - 8]。

20

【0003】

薄い被膜の線維性アテロームの破裂につながる、いくつかの細胞および分子事象が、現在理解され、新規の撮像アプローチを開発するために利用されている。薄い被膜の線維性アテローム中のマクロファージの蓄積は、薄い被膜の線維性アテロームの脆弱性および血栓形成の増加 [1 3 - 1 5] の一因となると考えられる、マトリクスメタロプロテイナーゼ (MMP) [9 - 1 2] を過剰発現させる。マクロファージは、冠状、脳、および末梢循環におけるプラーク破裂の危険性を示す、重要な初期細胞マーカーである。プラーク脆弱性は、細胞組成ならびに解剖学的構造に関連するので、組成および構造の両方を同時に明らかにすることができる診断方法を開発することが、脆弱なプラークを識別するために望ましく、それは、心臓血管介入に応答した縦断研究におけるマクロファージ密度の生体内監視を可能にするであろう。

30

【0004】

血管内 OCT (IVOCT) は、高解像度血管内撮像のための最近開発されたカテーテルベースの方法である。心臓血管画像診断法のうち IVOCT は、薄い被膜の線維性アテロームを撮像するための十分な空間分解能を提供する、唯一のアプローチである。

【0005】

しかしながら、IVOCT 画像のみによって、プラーク破裂の危険性を容易に査定することはできない。二光子発光 (TPL) 顕微鏡法は、組織の非線形光学性質を使用し、それらの内因性自己蛍光に基づいて、内皮細胞、平滑筋細胞 [1 6]、エラスチン線維 [1 7、1 8]、酸化 LDL [1 9]、および脂質液滴 [2 0] 等のプラーク構成要素を撮像するために利用されてきた。ごく最近では、TPL 顕微鏡法によって、ナノ粒子を装填されたマクロファージを検出できることが報告されている [2 1、2 2]。ファイバベースの OCT [2 3、2 4] および TPL 顕微鏡法 [2 5 - 2 8] は、それぞれ、フォトニック結晶ファイバを使用して、より高い空間分解能を達成するために広帯域光を透過させること、またはシステムサイズ小型化のために超短パルスを送送することが報告されている。しかしながら、複合ファイバベースの OCT - TPL システムは、これまで実現されていない。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

50

本開示の例示的实施形態は、生体内で高い空間分解能を用いて、薄い被膜の線維性アテローム中の細胞成分（例えば、マクロファージ、コラーゲン/エラスチン線維、脂質液滴）の分布を検出し、さらに特性評価する、複合カテーテルベースの光コヒーレンス断層撮影二光子発光（OCT-TPL）撮像システムを含む。カテーテルベースのOCT-TPLシステムの構成要素は、OCT（例えば、1310nm）およびTPL（例えば、800nm）用の光源、OCT（例えば、平衡検出器）およびTPL（例えば、光子増倍管）用の検出器、TPL励起パルスの群遅延分散を補償する透過回折格子圧縮機、OCTおよびTPL光源の両方から光を送達し、TPL放出信号を伝送するファイバ（例えば、フォトリック結晶ファイバ）、および撮像カテーテルを含むことができる。本開示の実施形態は、撮像のための方法および装置、ならびに短パルスレーザ光および広帯域OCT光の同時送達を必要とする、関連診断および治療カテーテルベースのモダリティを説明する。

10

【0007】

装置のある実施形態は、第1の波長を放出するように構成されている光コヒーレンス断層撮影光源と、コヒーレンス断層撮影光源から放出される第1の波長を基準経路およびサンプル経路に向かわせるように構成されているスプリッタと、第2の波長を放出するように構成されている短パルス光源と、第1のダイクロイック要素と、第2のダイクロイック要素とを備えている。特定の実施形態では、光コヒーレンス断層撮影光源は、掃引源光コヒーレンス断層撮影光源として構成され得る。ある実施形態では、光コヒーレンス断層撮影光源は、広帯域光コヒーレンス断層撮影光源として構成され得る。いくつかの実施形態では、短パルス光源は、10pJ~1mJのパルスエネルギー、および5fs~100psパルス持続時間を有する、短パルスレーザであり得る。具体的実施形態では、サンプル経路は、フォトリック結晶ファイバを通して向かわせられ得る。ある実施形態は、平衡検出器を含み得、特定の実施形態では、平衡検出器は、非干渉OCT構成要素を最小化するように構成され得る。

20

【0008】

特定の実施形態は、光子計数検出器を含み得、ある実施形態では、光子計数検出器は、光電子増倍管であり得る。具体的実施形態では、光子計数検出器は、アバランシェフォトダイオードであり得る。いくつかの実施形態では、光子計数検出器は、二光子発光を検出するように構成され得る。ある実施形態では、第2のダイクロイック要素は、光子計数検出器の方へ二光子発光を向かわせるように構成され得る。特定の実施形態では、第1のダイクロイック要素は、第1および第2の波長をサンプル経路に向かわせるように構成され得る。ある実施形態では、サンプル経路は、ナノ粒子を備えているサンプル部位に向かわせられ得る。

30

【0009】

特定の実施形態はさらに、サンプル部位の画像を表示するように構成されている視覚ディスプレイを備え得る。ある実施形態では、視覚ディスプレイは、装置とサンプル部位との間の距離に基づいて、サンプル部位の表示の一部分を増進するように構成され得る。いくつかの実施形態では、視覚ディスプレイは、検出値が正規化値を超えるサンプル部位の場所の輝度を増加させるように構成され得る。具体的実施形態では、ナノ粒子は、ナノロッドとして構成され得る。ある実施形態では、ナノロッドは、金を含み、約756nmの表面プラズモン共鳴を有する。特定の実施形態はさらに、分散補償要素を備え得、いくつかの実施形態では、分散補償要素は、基準経路とサンプル経路との間の分散差を補償するように構成される。ある実施形態では、分散補償要素は、二光子発光励起光を事前補償するように構成される。

40

【0010】

特定の実施形態はまた、サンプル部位を撮像する方法を含み得、本方法は、光コヒーレンス断層撮影光源からサンプル部位に向かって第1の波長を放出することと、短パルス光源からサンプル部位に向かって第2の波長を放出することと、サンプル部位から光コヒーレンス断層撮影信号を検出することとであって、光コヒーレンス断層撮影信号は、第1の波長から生成される、ことと、サンプル部位から二光子発光放出信号を検出することとであっ

50

て、二光子発光放出信号は、第2の波長によって誘導される、こととを含む。ある実施形態では、短パルス光源は、 $10\text{ pJ} \sim 1\text{ mJ}$ のパルスエネルギー、および $5\text{ fs} \sim 100\text{ ps}$ パルス持続時間を有する、短パルスレーザであり得る。

【0011】

いくつかの実施形態では、光コヒーレンス断層撮影信号および二光子発光信号は、複数のサンプル部位から検出され得る。特定の実施形態では、サンプルは、組織を含み、具体的実施形態では、組織は、上皮組織または動脈組織であり得る。ある実施形態では、動脈組織は、冠動脈の中に位置し得る。具体的実施形態では、組織は、血管管腔表面であり得る。特定の実施形態では、組織は、口腔粘膜であり得る。いくつかの実施形態では、光コヒーレンス断層撮影信号は、光コヒーレンス断層撮影像を生成するために使用され得る。特定の実施形態では、二光子発光信号は、光コヒーレンス断層撮影像と位置合わせされ得る。ある実施形態はさらに、3次元光コヒーレンス断層撮影像上で2次元二光子発光データを表示することを含み得る。いくつかの実施形態では、第1の処理要素は、光コヒーレンス断層撮影信号を使用し、光コヒーレンス断層撮影像を構築し得る。

【0012】

いくつかの実施形態では、第1の処理要素は、中央処理ユニットまたはグラフィックス処理ユニットであり得る。特定の実施形態では、第2の処理要素は、光コヒーレンス断層撮影像上で位置合わせされた二光子発光画像を見るためにレンダリングする。ある実施形態では、サンプル部位は、ナノ粒子を備え得る。特定の実施形態では、二光子発光信号は、ナノ粒子から放出され得る。具体的実施形態では、二光子発光放出信号は、サンプル部位の組織から放出され得る。

【0013】

ある実施形態は、撮像データを表示する方法を含み、本方法は、撮像システムを用いて光コヒーレンス断層撮影データを取得することと、撮像システムを用いて複数の発光粒子から二光子発光データを取得することと、光コヒーレンス断層撮影データおよび二光子発光データを複合画像で同時に表示することとを含む。いくつかの実施形態では、発光粒子は、ナノ粒子であり得る。特定の実施形態では、撮像システムは、カテーテルベースの撮像システムであり得る。

【0014】

ある実施形態では、光コヒーレンス断層撮影データは、半径方向の次元および方位角の次元のデータを含み得、二光子発光データは、方位角信号を含み得る。特定の実施形態はさらに、半径方向寸法を二光子発光データに追加することを含み得る。ある実施形態では、半径方向寸法を二光子発光データに追加することは、二光子発光方位角信号によって正規化された半径方向確率分布関数を使用することを含み得る。具体的実施形態では、半径方向確率分布関数は、撮像システムの光学性質と、カテーテルベースの撮像システムとカテーテルベースの撮像システムが挿入される管腔壁との間の距離と、管腔壁の組織の光学性質とを使用して決定され得る。

【0015】

特定の実施形態では、半径方向確率分布関数は、ナノ粒子の一般的な分布を仮定することを使用して決定され得る。ある実施形態はさらに、カテーテルベースの撮像システムが管腔に沿って軸方向に移動させられるにつれてカテーテルベースの撮像システムから取得されるデータに基づいて、3次元画像を生成することを含み得る。

【0016】

以下では、「連結される」という用語は、必ずしも直接的ではなく、かつ必ずしも機械的ではないが、「接続される」と定義される。

【0017】

「1つの」（「a」または「an」）という言葉の使用は、請求項および/または明細書で「備えている」という用語と併せて使用されるとき、「1つ」を意味し得るが、「1つ以上の」または「少なくとも1つ」の意味とも一致する。「約」という用語は、一般に、記述された値+または-5%を意味する。請求項での「または」という用語の使用は、

代替案のみを指すように明示的に指示されない限り、または代替案が相互排他的でない限り、「および/または」を意味するために使用されるが、本開示は、代替案のみ、ならびに「および/または」を指す定義を支持する。

【0018】

「備えている」（ならびに「comprises」および「comprising」等の備えている（comprise）の任意の形態）、「有する」（ならびに「has」および「having」等の有する（have）の任意の形態）、「含む」（ならびに「includes」および「including」等の含む（include）の任意の形態）、「含む」（ならびに「contains」および「containing」等の含む（contain）の任意の形態）という用語は、非制約的な連結動詞である。結果として、1つ以上のステップまたは要素を「備えている」、「有する」、「含む」、または「含む」方法またはデバイスは、これらの1つ以上のステップまたは要素を保有するが、これらの1つ以上の要素のみを保有することに限定されない。同様に、1つ以上の特徴を「備えている」、「有する」、「含む」、または「含む」方法のステップまたはデバイスの要素は、これらの1つ以上の特徴を保有するが、これらの1つ以上の特徴のみを保有することに限定されない。さらに、ある方法で構成されるデバイスまたは構造は、少なくともそのように構成されるが、また、記載されていない方法で構成され得る。

10

【0019】

本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の発明を実施するための形態から明白となるであろう。しかしながら、本発明の精神および範囲内の種々の変更および修正が、詳細な説明から当業者に明白となるであろうため、詳細な説明および具体的実施例は、本発明の具体的実施形態を示す一方で、例証のみとして挙げられることを理解されたい。

20

【0020】

本特許または出願ファイルは、カラーで実行された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を伴う本特許または特許出願公開のコピーが、要請および必要な料金の支払に応じて、特許庁によって提供されるであろう。

【0021】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本開示のある側面をさらに実証するように含まれる。本発明は、本明細書で提示される具体的実施形態の詳細な説明と組み合わせて、これらの図面のうちの1つを参照することによって、より理解され得る。

30

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1は、例示的实施形態による装置の概略図である。

【図2】図2は、IV-OCTシステムから取得された画像を示す。

【図3】図3は、IV-OCTシステムから取得された画像を示す。

【図4】図4は、例示的实施形態による装置から取得された画像を示す。

【図5A】図5Aおよび5Bは、例示的实施形態による装置の概略図を示す。

【図5B】図5Aおよび5Bは、例示的实施形態による装置の概略図を示す。

【図6】図6は、例示的实施形態による装置の概略図を示す。

40

【図7】図7は、例示的实施形態による装置の概略図を示す。

【図8A】図8は、例示的实施形態による装置の概略図を示す。

【図8B】図8は、例示的实施形態による装置の概略図を示す。

【図9】図9は、例示的实施形態による装置から取得された画像を示す。

【図10A】図10は、例示的实施形態による装置の概略図を示す。

【図10B】図10は、例示的实施形態による装置の概略図を示す。

【図10C】図10は、例示的实施形態による装置の概略図を示す。

【図10D】図10は、例示的实施形態による装置の概略図を示す。

【図10E】図10は、例示的实施形態による装置の概略図を示す。

【図11】図11は、例示的实施形態による装置から取得されたデータを示す。

50

【図 1 2】図 1 2 は、例示的实施形態による装置から取得されたデータを示す。

【図 1 3】図 1 3 は、例示的实施形態による装置から取得されたデータを示す。

【図 1 4 A】図 1 4 は、例示的实施形態による装置から取得されたデータを示す。

【図 1 4 B】図 1 4 は、例示的实施形態による装置から取得されたデータを示す。

【図 1 4 C】図 1 4 は、例示的实施形態による装置から取得されたデータを示す。

【図 1 4 D】図 1 4 は、例示的实施形態による装置から取得されたデータを示す。

【図 1 5】図 1 5 は、例示的实施形態による、データ結果の表示を修正するようにコンピュータ読み取り可能な媒体によって行われるステップのフローチャートを示す。

【図 1 6 A】図 1 6 は、例示的实施形態による装置から取得された画像およびデータを示す。

10

【図 1 6 B】図 1 6 は、例示的实施形態による装置から取得された画像およびデータを示す。

【図 1 6 C】図 1 6 は、例示的实施形態による装置から取得された画像およびデータを示す。

【図 1 6 D】図 1 6 は、例示的实施形態による装置から取得された画像およびデータを示す。

【図 1 6 E】図 1 6 は、例示的实施形態による装置から取得された画像およびデータを示す。

【図 1 6 F】図 1 6 は、例示的实施形態による装置から取得された画像およびデータを示す。

20

【図 1 7】図 1 7 - 2 0 は、例示的实施形態による装置から取得された画像を示す。

【図 1 8】図 1 7 - 2 0 は、例示的实施形態による装置から取得された画像を示す。

【図 1 9】図 1 7 - 2 0 は、例示的实施形態による装置から取得された画像を示す。

【図 2 0】図 1 7 - 2 0 は、例示的实施形態による装置から取得された画像を示す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

ここで図 1 を参照すると、装置 5 0 の 1 つの例示的实施形態は、光コヒーレンス断層撮影光源 1 0 0 と、スプリッタ 2 0 0 と、二光子発光励起光源 3 0 0 と、第 1 のダイクロイック要素 (dichroic element) 4 0 0 と、第 2 のダイクロイック要素 4 5 0 とを備えている。本実施形態では、光コヒーレンス断層撮影光源 1 0 0 は、第 1 の波長 1 1 0 を放出するように構成され、スプリッタ 2 0 0 は、第 1 の波長 1 1 0 を基準経路 2 1 0 およびサンプル経路 2 2 0 に向かわせるように構成される。ある実施形態では、光コヒーレンス断層撮影光源 1 0 0 は、掃引源光コヒーレンス断層撮影光源または広帯域光コヒーレンス断層撮影光源として構成することができる。特定の実施形態では、サンプル経路 2 2 0 は、フォトニック結晶ファイバを通して向かわせることができる。示される実施形態では、二光子発光励起光源 3 0 0 は、第 2 の波長 3 2 0 を放出するように構成される。

30

【0024】

動作中、サンプル経路 2 2 0 および第 2 の波長 3 2 0 が (例えば、第 1 のダイクロイック要素 4 0 0 ならびに図 1 の他の構成要素を介して) サンプル部位 2 8 0 に向かわせられるように、装置 5 0 を位置付けることができる。

40

【0025】

ある例示的实施形態では、サンプル部位 2 8 0 は、ナノ粒子 2 6 0 を備え得、具体的実施形態では、ナノ粒子 2 6 0 は、ナノロッドとして構成され得る。特定の実施形態では、ナノ粒子 2 6 0 は、約 7 5 6 nm の表面プラズモン共鳴を伴う、金を含むナノロッドとして構成され得る。ある実施形態では、ナノロッドの構成は、以下で提供される実施例の第 4 節で確立される手順に従って、選択することができる。

【0026】

装置 5 0 はさらに、二光子発光 (T P L) を検出するように構成される光子計数検出器 3 5 0 と、非干渉 O C T 構成要素を最小化するように構成される平衡検出器 2 5 0 とを備

50

えている。具体的実施形態では、光子計数検出器 350 は、1 つ以上の光電子増倍管 (PMT) として構成することができる。他の実施形態では、光子計数検出器 350 は、アバランシェフォトダイオードとして構成することができる。

【0027】

特定の実施形態では、図 1 で図示されるシステムの構成要素は、サンプル経路 220 中の光と TPL 励起光源 300 からの第 2 の波長 320 とのサンプル部位 280 への伝搬を可能にするためにフォトニック結晶ファイバ (PCF) を利用する、カテーテルベースのシステムに組み込むことができる。PCF は、OCT および TPL 励起光の両方の単一モード透過を可能にする。単一モード透過は、モード干渉が起こらないことを保証するために OCT 撮像で必要とされる。単一モード透過は、TPL 励起光のパルス持続時間がモード分散により広がらないことを保証するために、TPL 撮像のために必要とされる。具体的実施形態では、カテーテルは、システム 50 を利用して血管内画像を取得するように、血管に挿入することができる。

10

【0028】

動作中、システム 50 は、単一のシステムで OCT および TPL 撮像技術の両方の利益を提供する。例示的实施形態では、システム 50 の構成要素は、OCT および TPL 分野での確立された原理に従って機能する。したがって、個々の OCT および TPL の概説が提供されるであろうが、例示的实施形態は、環境条件または他の要因に従って、パラメータの種々の組み合わせを利用し得ることが理解される。例えば、OCT 光源 100 は、近赤外光を生成することができ、比較的長い波長の光の使用は、動脈壁等の散乱媒体の中へのより深い浸透を可能にする。特定の実施形態では、OCT 光源 100 は、約 1310 nm の波長で光を提供するように構成することができる。

20

【0029】

サンプル経路 220 中の光がサンプル部位 280 に向かわせられると、サンプル部位 280 の表面下特徴から反射するこの光のわずかな部分が収集される。動作中、サンプル経路 220 中の光の有意な部分は、反射されないが、むしろ、サンプルから後方散乱する。後方散乱光は、従来の撮像で画像を曖昧にする背景の一因となるが、この光は、干渉分光法を介して OCT システムで有益に使用することができる。例えば、受け取った光子の光路長を記録するために、平衡検出器 250 を使用することができ、検出前に組織における散乱を増加させる、ほとんどの光子の拒否を可能にする。これは、サンプル部位 280 において目的とする領域から直接反射される光を収集しながら、背景信号を拒否することによって、構築されるべき厚いサンプルの記録 3 次元画像を記録することを可能にすることができる。例示的实施形態では、OCT 撮像は、概して、サンプル部位 280 における生物組織中の表面の 1 ~ 2 ミリメートル下方に限定される。より大きい深度で、散乱することなく脱出する光の割合は、典型的には、小さすぎて検出できない。

30

【0030】

システム 50 の動作中、TPL 光源 300 および光子計数検出器 350 はまた、二光子発光顕微鏡法における確立された原理と一致して利用される。ある実施形態では、TPL 光源 300 は、6 nJ ~ 5 μ J の最大パルスエネルギー、100 fs ~ 1 ps のパルス幅、および 500 kHz ~ 80 MHz の繰り返し率を伴って、760 nm ~ 1040 nm で第 2 の波長 320 の励起エネルギーを生成する、同調可能なフェムト秒レーザとして構成することができる。特定の実施形態では、TPL 光源 300 はまた、約 78 μ m² ~ 706.8 μ m² のスポット面積および 20 ミクロン秒のピクセル滞留時間を伴って、10 μ m ~ 30 μ m のスポットサイズを生成するように構成され得る。加えて、TPL 光源 300 はまた、500 mW ~ 2500 mW のサンプル上の平均電力、0.0625 MW ~ 5 MW の瞬間電力、および 2 E - 4 MW / μ m² ~ 16 E - 3 MW / μ m² の瞬間電力密度を伴って、ピクセルあたり 10 ~ 1600 パルスを生成するように構成され得る。

40

【0031】

図 1 に示される実施形態では、第 1 のダイクロイック要素 400 は、フォトニック結晶ファイバ (PCF) を介して第 2 の波長 320 をサンプル部位 280 に向かわせるように

50

位置付けることができる。特定の実施形態では、PCFは、NKT Photonicsから入手可能な大型サイズのモードフィールド直径 ($20\mu\text{m}$) (LMA-20) を有することができる。ある実施形態では、PCFは、ダブルクラッドファイバとして構成されてもよく、具体的実施形態では、Crystal Fibreから入手可能なモデル番号DC-165-16の受動ファイバ等のダブルクラッド高NAファイバであり得る。例示的なダブルクラッドフォトニック結晶ファイバは、高NAマルチモードファイバ構造に組み込まれた大型モード面積の単一モードコアを備え得る。そのようなファイバは、単一モードビームが、ファイバにおいて前方に伝搬されることを可能にすることができ、同時に、散乱光または二光子発光が、検出のために収集され、後方に伝搬され得る。単一クラッドフォトニック結晶ファイバの代わりにダブルクラッドファイバの使用は、高NA内側クラディングを用いて、二光子発光検出効率を増加させること (低NAコアと比較して) ができる。構成要素の特定の仕様は、実施例の目的のみで提示され、他の実施形態は、本明細書で説明されるものとは異なる仕様を伴う構成要素を備え得ることが理解される。

【0032】

システム50の動作中、第2の波長320は、ナノ粒子260に励起エネルギーを提供することができる、ナノ粒子260は、第2のダイクロイック要素450を介して光子計数検出器350に向かわせられる発光270を放出することができる。例示的な実施形態では、光子計数検出器350および平衡検出器250からの出力は、ユーザが、重ね合わせられるOCTおよびTPL撮像の両方の結果を視覚化することを可能にする、単一のディスプレイで組み合わせられるように構成することができる。

【0033】

血管内OCTおよびTPL画像の表示は、有用なデータを提供する方法で迅速に解釈することができる様式で、情報をユーザに提示することに、ある課題を提起する。例えば、血管内OCTが、2次元 (半径方向および方位角) である一方で、TPL情報は、いくつかの実施形態では、1次元 (方位角) である。2次元IV-OCT画像の内側または外側のいずれかのリングまたはバンドとしてのTPL方位角情報の1次元表示もまた、複合IV-OCTおよびTPL画像情報を提示する方法として評価された。

【0034】

複合IV-OCTおよびTPLを表示するための例示的な実施形態は、その位置でのTPL方位角信号によって正規化されるであろう、半径方向確率分布関数 $[p(r)]$ を使用するTPLデータに半径方向寸法を組み込むことを含む。半径方向確率分布関数 $[p(r)]$ は、(部分的に) (1) カテーテルの光学部、(2) カテーテルと管腔壁との間の距離、(3) 組織光学性質から決定することができる。この情報は、ナノ粒子260の一般的な分布仮定するTPL信号の半径方向依存性 $[p(r)]$ を予測するように組み合わせることができる。

【0035】

方位角および半径方向依存性の両方を含むTPL情報を用いると、1つの画像データセットで情報の両方のセットを示すように、TPLおよびIV-OCT画像を融合することができる。加えて、3次元IV-OCTおよびTPLデータセットを単一の画像データセットに融合することができるように、引き戻し全体に対して同一の手順に従うことができる。

【0036】

ここで図2を参照すると、組み合わせられたTPLデータなしで、典型的なIV-OCT画像を生成するように構成されるカテーテル510を使用して、IV-OCT画像500が生成されている。図2に示されるように、画像500は、実質的に一様な壁を伴う健康な冠動脈520を示す。動脈520の側面断面図530が、図2の下部分に示されている。側面断面図530は、カテーテル510の引き戻し中に線560に沿って得られた動脈520の再構築された図である。

【0037】

ここで図3を参照すると、同様に組み合わせられたTPLデータなしで、典型的なIV-

10

20

30

40

50

ＯＣＴ画像を生成するように構成されるカテーテル６１０を使用して、ＩＶ－ＯＣＴ画像６００が生成されている。図３に示されるように、画像６００は、ほぼ１時～３時の位置で大きな脂質コアの上を覆って位置する、薄い被膜の線維性アテローム６４０を伴う冠状動脈６２０を示す。動脈６２０の側面断面図６３０は、図３の下部分に示されている。側面断面図６３０は、カテーテル６１０の引き戻し中に線６６０に沿って得られた動脈６２０の再構築された図である。

【００３８】

画像６００は、薄い被膜の線維性アテローム６４０を示すが、提供される画像からプラーク破裂の危険性を容易に査定することはできない。画像６００は、解剖学的構造の表示を提供するが、ユーザが細胞組成を評価することを可能にしない。例えば、画像６００は、マクロファージ、脂質沈着、およびコラーゲン／エラスチン線維の存在の指示、すなわち、プラーク破裂の危険性を示すことができる初期細胞マーカーを直接提供しない。

10

【００３９】

本発明の実施形態（例えば、図１に示されるシステム５０、または図５Ａ、５Ｂ、６、あるいは７に示される特定の例示的システムを含む）は、図４で図示されるような画像７００に類似する、複合ＯＣＴ－ＴＰＬ画像を提供するように構成される。画像７００は、冠状動脈の一部を検査する複合ＯＣＴ－ＴＰＬシステムによって生成することができる。例えば、冠状動脈７２０は、ほぼ１時～３時の位置で大きな脂質コアの上を覆って位置する、薄い被膜の線維性アテローム６４０を備えている。

【００４０】

20

図３の画像と異なり、図４に示される画像（拡張ＯＣＴ－ＴＰＬ画像）は、解剖学的構造の表示および構造の細胞組成を分析する能力の両方をユーザに提供する。例えば、例示的なＯＣＴ－ＴＰＬシステム内の光子計数検出器は、例えば、マクロファージ、エラスチン線維、および／または脂質液滴を含む、薄い被膜の線維性アテローム７４０の細胞成分中で濃縮され得るナノ粒子からの二光子発光（ＴＰＬ）７５０を検出することができる。解剖学的構造の複合画像、ならびに構造の細胞組成の指示は、ユーザが、特定の構造に関連付けられるプラーク破裂の危険性のより徹底的な分析を行うことを可能にすることができる。

【００４１】

本開示の例示の実施形態はまた、本装置によって取得される画像を定量的に分析し、ある側面の視覚表示を増進する、コンピュータ読み取り可能な媒体（例えば、ソフトウェア）を備え得る。例えば、カテーテルが血管管腔内で中心に置かれない場合、カテーテルからより遠くにある、目的とする部位から放出される光は、（カテーテルにより近い部位から放出される光と比較して）肉眼には明るく見えない場合がある。

30

【００４２】

ここで図１５－１６を参照すると、一実施形態では、コンピュータ読み取り可能な媒体は、プロセス８００の以下のステップを行うように構成することができる。（１）ステップ８１０でカテーテルを識別する。（２）ステップ８２０で管腔（例えば、分析されている組織の血管壁）を識別する。（３）ステップ８３０で、各Ａスキャンに対するカテーテルと管腔との間の距離、およびカテーテルまでの全体的平均距離（Mean overall）を計算する。（４）ステップ８４０で、Mean overall（Acloser）よりカテーテルに近いＡスキャンの平均、およびMean overall（A further）よりカテーテルまで遠いＡスキャンの平均を計算する。（５）ステップ８５０で、Ｂスキャンにおける値の範囲、（最大値－最小値）によって、AcloserおよびA furtherを正規化（それぞれ、Acloser N、およびA further N）する。（６）ステップ８６０で、各Ａスキャンにおいて、Ａスキャン管腔がMean overallと比較してカテーテルにより近いのかまたは遠いのかどうかに応じて、Acloser NまたはA further Nにおける対応するピクセルより大きいそれらのピクセルとして、輝点を識別する。加えて、輝点を識別するためにＡスキャンの平均化を行うことは、強度対深度を補正するように、カテーテルビームのガウス形状によって各Ａスキャンを拡

40

50

大縮小することによって置き換えることができる。

【0043】

ここで図16Aを具体的に参照すると、図16Bの処理された画像と比較して、未処理画像が示されている。図16Cでは、Bスキャン画像が長方形で示されている。青色の指示線で強調表示されたBスキャンの一部分は、平均距離より小さい、カテーテルと管腔壁との間の距離を伴う場所から取得されていることに留意されたい。同様に、緑色の指示線で強調表示されたBスキャンの一部分は、平均距離より大きい、カテーテルと管腔壁との間の距離を伴う場所から取得されている。図16Dは、管腔で整列させられたAスキャンを示す。図16Fは、(赤紫色の)例示的Aスキャン、ならびにカテーテルと管腔壁との間の距離が平均距離より小さい(青色)、および平均距離より大きい(緑色)、それらの場所の正規化基準値を示す。

10

【0044】

図16Fの例示的スキャンが正規化値を超える場所は、「輝点」として識別することができる、画像を図16Bに示されるように増進することができる。これは、さらに調査されることができる目的とする部位を、ユーザがより客観的に識別することを可能にすることができる。

【0045】

例示的实施形態はまた、OCT情報にTPLデータを重ね合わせることによって、テクスチャ分析を行うことも可能である。データセットは、ブランクの場所、組織型、および他の生理学的情報等の追加の情報を医師に提供するように、3次元レンダリングおよび処理中に分析することができる。この情報は、テクスチャ分析、レイトレーシング、または他の高度処理技法を使用して、3次元データセットから計算され得る。

20

【0046】

角度分解されたOCTシステムの例示的实施形態は、複数の3次元データセットを生成し得、その場合、分析が全てのデータセットに対して行われ、追加の情報を医師に提供するように組み合わせられることも、そうでないこともある。

【0047】

要約すると、本明細書で説明される複合OCT-TPL撮像システムは、2つの光学コントラスト機構、すなわち、後方散乱および二光子発光を提供することができる。本明細書で説明されるカテーテルベースの装置の実施形態は、高ピーク電力短パルスレーザ光、およびOCTに利用されるもの等の広帯域光の両方の同時単一モード送達を必要とする、光ベースのモダリティに利用され得る。本開示の例示的实施形態は、生体内で薄い被膜の線維性アテロームおよびその細胞成分(例えば、マクロファージ、コラーゲン/エラスチン線維、脂質液滴)を同時に撮像するように、カテーテルベースのOCT-TPL撮像システムにおいてIVOCをTPL撮像と組み合わせ、これは、IVOC単独に優る決定的利点を有し、心臓血管介入中に経時的に薄い被膜の線維性アテロームの脆弱性についての重要な情報を心臓専門医に提供するのである。特定の実施形態の特定の構成、特徴、および方法は、以下で提供される実施例に記載される。

30

【0048】

(実施例1 - カテーテルベースの強度OCT-TPLシステム)

40

カテーテルベースの強度OCT-TPLシステム(図5Aおよび5Bに示される)の実施例は、同調可能なフェムト秒レーザ励起(例えば、760nm~1040nm、6nJ~5μJ、100fs~1ps、500kHz~80MHz)を使用するTPLと組み合わせられた、1310nmで動作するスペクトル領域OCTシステムを組み込むことができる。フェムト秒レーザ光の群分散遅延を事前に補償して、管腔表面に変換制限パルスを提供するために、パルス圧縮機を利用することができる。撮像カテーテルは、OCT光およびTPL励起光の両方の単一モード伝搬、ならびにTPL放射光の透過(例えば、OCT光およびTPL励起光が同時に透過させられる)を可能にすることができる、OCT-TPL撮像システムのフォトニック結晶ファイバ(PCF)(例えば、LMA-20、NKT Photonics)に接続される。ある実施形態では、PCFは、15μmコア

50

(例えば、LMA - 15)を備え得る。

【0049】

図5Aは、ビームスプリッタ(BS)と、帯域通過フィルタ(BP)と、ショートパスフィルタ(SP)と、光子増倍管(PMT)と、フォトニック結晶ファイバ(PCF)を備えている、カテーテルベースの強度OCT - TPL撮像システムを描写する。図5Aは、TPL励起光がダイクロイックミラーを通してPCFファイバに透過させられない、実施例を図示する。

【0050】

図5Bもまた、ビームスプリッタ(BS)と、帯域通過フィルタ(BP)と、ショートパスフィルタ(SP)と、光子増倍管(PMT)と、フォトニック結晶ファイバ(PCF)を備えている、カテーテルベースの強度OCT - TPL撮像システムを描写する。しかしながら、対照的に、図5Bは、TPL励起光の一部がダイクロイックミラーを通してPCFファイバに(後に、走査光学モジュールおよびサンプルに)透過させられる、実施例を図示する。結果として、TPLおよびOCT光源、ならびに関連器具類の配列もまた、図5Aおよび5Bに示されるように異なる。いずれか一方の構成では、分散補償器もまた、当技術分野で公知であるようにOCT基準アーム分岐に配置することができる。

10

【0051】

ある実施形態では、TPLおよびOCT画像のマージした画像を生成するために、図5Aおよび5Bに示されるシステムを使用することができる。ヒト冠状動脈のTPL、OCT、およびマージした組織画像の実施例が、図17および18に示される。図に示されるように、マージした画像は、OCT(本実施例では緑色)およびTPL(本実施例では赤色)を用いて取得された画像の一部を示すために、異なる色を使用し得る。

20

【0052】

図17および18の画像を生成するために使用されるシステムの動作中、OCTパラメータは、以下の通りであった。掃引レーザ: 1310nm / 110nm、ビームサイズ: 20μm、レーザ出力: 1.2mW、視野: 2mm × 2mm、およびAスキャン速度: 20kHz。加えて、図17および18の画像を生成するために使用されるシステムのTPLパラメータは、以下の通りである。2 - P励起レーザ: 760nm ~ 1040nm、120fs、80MHz、ピクセル滞留時間: 4マイクロ秒、レーザ出力: 500mW、ビームサイズ: 20μm、放射フィルタ: < 700nm、視野: 2mm × 2mm。

30

【0053】

ここで図19を参照すると、例示的实施形態によるTPL撮像技法を用いて取得された画像が表示されている。画像は、アテローム動脈硬化性プラークを伴うウサギ大動脈組織切片を表示する。明るいTPL信号は、脂質液滴、コラーゲン、およびエラスチン線維からの自然自己蛍光である。

【0054】

図20は、例示的实施形態によるファイバベースのシステムを用いて取得されたヒト冠状動脈組織のTPL、OCT、およびマージしたTCL - OCT画像を表示する。加えて、図20の右下部分は、脂質の分布を示す、染色組織切片を備えている。

40

【0055】

(実施例2 - カテーテルベースの高偏光感度OCT - TPLシステム)

カテーテルベースの高偏光感度OCT - TPLシステム(図6に示される)の一実施例は、同調可能なフェムト秒レーザ励起(例えば、760nm ~ 1040nm、6nJ ~ 5μJ、100fs ~ 1ps、500kHz ~ 80MHz)を使用するTPLと組み合わせられた、1310nmで動作するスペクトル領域高偏光感度OCT(PSOCT)システムを組み込むことができる。図6のシステムは、インラインファイバ偏光計の役割を果たす偏光維持ファイバ区画(PM1およびPM2)と、偏光ビームスプリッタ(PBS)と、帯域通過フィルタ(BP)と、ショートパスフィルタ(SP)と、光子増倍管(PMT)と、フォトニック結晶ファイバ(PCF)とを備えている。

【0056】

50

P S O C Tシステムは、基準光および干渉縞の両方の偏光状態を測定するために、平衡検出およびインラインファイバ偏光計 [2 9] を利用する。干渉計のサンプル経路中の開放光学スイッチは、(基準光とサンプル光との間に干渉縞を伴わない) 基準光の偏光状態のみを含む信号の測定を可能にする。フェムト秒レーザ光の群分散遅延を事前に補償して、管腔表面に変換制限パルスを提供するために、パルス圧縮機を利用することができる。撮像カテーテルは、O C T 光および T P L 励起 / 放射光の両方の伝搬を可能にすることができる、O C T - T P L 撮像システムのフォトニック結晶ファイバ (P C F) (例えば、L M A - 2 0、N K T P h o t o n i c s) に接続することができる。

【 0 0 5 7 】

(実施例 3 - カテーテルベースのスペクトル領域高位相感度 O C T - T P L システム)

カテーテルベースの高位相感度 O C T - T P L システム (図 7 に示される) の一実施例は、同調可能なフェムト秒レーザ励起 (例えば、7 6 0 n m ~ 1 0 4 0 n m、6 n J ~ 5 μ J、1 0 0 f s ~ 1 p s、5 0 0 k H z ~ 8 0 M H z) を使用する T P L と組み合わせられた、1 3 1 0 n m で動作するスペクトル領域高位相感度 O C T (P h S O C T) システムを組み込むことができる。図 7 のシステムは、偏光ビームスプリッタ (B S) と、帯域通過フィルタ (B P) と、ショートパスフィルタ (S P) と、光子増倍管 (P M T) と、フォトニック結晶ファイバ (P C F) とを備えている。

【 0 0 5 8 】

フェムト秒レーザ光の群分散遅延を事前に補償して、撮像されている血管の管腔表面に入射する変換制限パルスを提供するために、パルス圧縮機を利用することができる。撮像カテーテルは、O C T 光および T P L 励起光の両方の単一モード伝搬、ならびに T P L 放射光の透過を可能にすることができる、O C T - T P L 撮像システムのフォトニック結晶ファイバ (P C F) (例えば、L M A - 2 0、N K T P h o t o n i c s) に接続することができる。

【 0 0 5 9 】

(実施例 4 - O C T - T P L カテーテル設計および Z E M A X を使用する光学シミュレーション)

本実施例では、O C T - T P L カテーテルが、T P L 励起および放射を組み込むように、現在の O C T カテーテルを修正するであろう。以前、ナノ粒子を装填されたマクロファージの検出は、特注の多重光子顕微鏡を使用して行われた [3 0]。したがって、提案されたカテーテルベースの O C T - T P L 撮像システムの T P L 励起効率を、多重光子顕微鏡と比較することが望ましい。表 1 は、両方の撮像システムからのレーザ励起の特性評価を示す。

【 0 0 6 0 】

10

20

30

【表 1】

レーザパラメータ	多重光子顕微鏡	カテーテルベース のOCT-TPLシス テム
波長(nm)	800	800
繰り返し率(MHz)	76	0.5-80
パルス幅(fs)	150	10-1000
スポットサイズ(μm)	0.96	10-30
スポット面積(μm ²)	0.72	78.5-706.9
ピクセル滞留時間(マイクロ秒)	2.5	4-20
ピクセル当たりのパルス数	190	10-1600
サンプルにおける平均電力(mW)	20	500-2500
パルスエネルギー(nJ)	0.26	6-5000
瞬間電力(MW)	1.75E-3	0.0625-5
瞬間電力密度(MW/μm ²)	1.16E-3	2E-4-16E-3(20μm スポットに基づく)

10

20

表1. 提案されたカテーテルベースのOCT-TPLシステムとの多重光子顕微鏡のTPL励起
効率の比較

TPL励起光を送達するためにPCFが使用されるであろうため、送達することができる瞬間電力は、非線形シュレディンガー方程式を使用して表すことができる、PCFにおける非線形効果の発生によって制限される。

30

【0061】

【数1】

$$\frac{\partial A}{\partial z} + \frac{i\beta_2}{2} \frac{\partial^2 A}{\partial t^2} = i\gamma |A|^2 A$$

式中、 $|A|^2$ 、 β_2 、 γ 、 z 、および t は、それぞれ、パルス瞬間電力[W]、群速度分散パラメータ[fs²cm⁻¹]、非線形パラメータ[W⁻¹km⁻¹]、位置[cm]、および時間[秒]である。本実施例で使用されるPCFに対して、 $\beta_2 = 21 \text{ W}^{-1} \text{ km}^{-1}$ [17]、 $\beta_2 = -172 \text{ fs}^2 \text{ cm}^{-1}$ 、 $\lambda = 800 \text{ nm}$ 、 $c = 3 \times 10^8 \text{ m/s}$ を考慮すると、PCFにおける非線形効果の閾値を下回る最大瞬間電力は、非線形シュレディンガー方程式から解かれ、すなわち、 $|A|^2 = -2 \beta_2^2 c^2 / (\beta_2^2) = 4.49 \text{ MW}$ である。OCT-TPLシステムにおけるフェムト秒レーザは、5MWの瞬間電力を提供することができる(表1参照)が、PCFにおいて伝搬する実際の瞬間電力は、非線形効果の閾値より小さくなるように、約4.49MWに制限され得る。PCFにおけるいくつかの非線形性の許容は、スペクトルの広がりおよび追加のパルス圧縮を提供し得る。

40

【0062】

ZEMAXは、光学システムの設計をモデル化、分析、および支援することができる、ソフトウェアプログラムである。ZEMAXを使用して、OCT-TPLカテーテルの例

50

示の実施形態をシミュレートして検証することができる。OCT - TPLカテーテルのZEMAXのモデルが、金ナノ粒子を含む動脈組織とのOCTおよびTPL光相互作用をシミュレートするために構築されている（例えば、（a）OCT - TPLカテーテルの2D側面図、および（b）OCT - TPLカテーテルの3D正面図を提供する、図8を参照）。

【0063】

カテーテルは、グリーンレンズ（材料：GTAG）、プリズム（BK7）、シース（THV__GENERIC）、およびフラッシュ流体（海水）を使用してモデル化される。動脈組織は、2層幾何学形状を使用してモデル化される。最上層が、金ナノ粒子（ $\mu_a = 181 \text{ cm}^{-1}$ ）と、内膜（ $\mu_s = 239 \text{ cm}^{-1}$ ）とを含む一方で、底層は、内膜のみから成る。内膜組織の吸収係数およびナノ粒子の散乱係数は、それぞれ、金ナノ粒子および内膜組織のものと比較するとごくわずかであるため無視される。

【0064】

動脈組織とのOCTおよびTPL光相互作用のZEMAXシミュレーションは、3つのステップで行われる。（1）グリーンレンズの前面の中心に位置する点光源から動脈組織上への入射OCT（1310nm）およびTPL（800nm、1.35MW、NA=0.04）励起光線。（2）ビーム組織界面における単一のマクロファージ細胞（金ナノ粒子を含む）が励起させられ、TPLを放射する。（3）マクロファージ細胞からのTPL放射光線がカテーテルまで辿られ、グリーンレンズの前面に位置する検出器（図6に示されていない）によって検出される。

【0065】

TPL光路長（OPL）、グリーンレンズの前面におけるOCTおよびTPL放射スポットサイズ、およびPCFの中へ連結されることができるグリーンレンズの前面におけるTPL放射出力を含む、3つの重要なパラメータが、ZEMAXシミュレーションから計算される。具体的には、表2は、主光線および縁光線方向の両方において798nm～802nmに及ぶ、TPL励起の5つの異なる波長のOPLを示す。結果は、グリーンレンズの前面から動脈組織表面までの5nmの範囲内のTPL励起パルスの分散が1fs未満であることを示す。

【0066】

【表2】

波長(nm)	OPL(mm) 主光線($\theta=0^\circ$)	OPL(mm) 縁光線($\theta=2.29^\circ$)
798	4.91664060	4.91662242
799	4.91656997	4.91655178
800	4.91649954	4.91648133
801	4.91642930	4.91641106
802	4.91635924	4.91634099
開口数(NA)	0.04	0.04
$\Delta\text{OPL}(\mu\text{m})$	0.281353472	0.281426256
分散(fs)	0.93784	0.93809

表2. 主光線および縁光線方向の両方において798nm～802nmに及ぶTPL励起光の分散

グリーンレンズの前面における OCT および TPL スポットサイズは、ZEMAX 内の同一の位置に位置する検出器によって測定される（図 9 は、同一の位置に位置する検出器によって測定される、グリーンレンズの前面における OCT および TPL スポットサイズを示す。検出器のサイズはグリーンレンズの直径と同一である）。OCT 光の NA (0.05) が TPL 励起 (0.04) より高いため、OCT スポットサイズ (17.1 μm) は、TPL 放射スポットサイズ (21.8 μm) よりわずかに小さい。使用される PCF は、例えば、25 μm のコア直径を有し、それは、OCT および TPL スポットサイズの両方がコアの中に収まることができることを示す。

【0067】

次いで、PCF コアの中へ連結されることができる TPL 放射出力が、図 5 に示される検出器から計算され、スポットサイズの中心から 25 μm 直径内の光線のみが含まれる。TPL 励起瞬間電力 (1.35 MW) に基づいて、25 μm 直径内の検出器における検出される TPL 放射瞬間電力は、 $1.51 \times 10^{-4} \text{ W}$ であるように計算され、それは、単一の TPL 励起パルス (800 fs) が 425 個の光子 / パルスを生成できることを示唆する。TPL 励起および OCT の繰り返し率が、それぞれ、500 kHz および 50 kHz であるので、10 個の TPL 励起パルスが単一の OCT A スキャン内で記録されることができ、これは、4250 個の光子 / OCT A スキャンをもたらす。比較すると、データを収集するために使用される多重光子顕微鏡は、0.7 個の光子 / パルス (Hamamatsu PMT 仕様 [31] から計算される、データ図示せず) を記録し、多重光子顕微鏡からのナノローズの典型的な TPL 画像中の蓄積光子 / ピクセルは、133 個の光子 / ピクセルに制限される。従って、カテーテルベースの OCT - TPL システム検出効率は、現在使用されている多重光子顕微鏡より 1 桁を上回って高い。

【0068】

(実施例 5 - ナノロッド選択)

金ナノロッドは、マクロファージ (アテローム性動脈硬化症および癌に關与する重要な初期細胞マーカー) によって取り込まれ、マクロファージ標的化のための種々の撮像技法用の造影剤として使用されることができる。この研究の目的は、それぞれ、700、756、844、および 1060 nm での表面プラズモン共鳴をとまなう 4 つのサイズの金ナノロッドの二光子発光 (TPL) 性質を比較することである。レーザ走査 TPL 顕微鏡を使用して、単一ナノロッドおよびローダミン 6 G 粒子からの TPL が測定された。ナノロッドからの TPL 放射スペクトルが、光子増倍 CCD を伴う分光計によって記録された。4 つ全てのサイズのナノロッドは、励起波長への依存性を伴う強い TPL 強度を生成し、二光子作用断面 (TPACS) がプラズモン増進されることを示した。(TPL プロセスを確認する) 励起出力への発光強度の二次の依存性が、低出力レベルで観察され、その後、光退色効果による高出力レベルでの強度飽和または減少が続いた。単一のナノロッドの最大 TPACS は、760 nm 励起での単一のローダミン 6 G 粒子の 25 GM と比較して、12271 GM と測定された。ナノロッド TPL 放射スペクトルの特性は、プリユアン領域中の X および Y 対称点付近の穴とのフェルミレベル付近の電子の再結合によって説明することができる。選択された撮像用途のためのもっとも明るい造影剤の選択を誘導するために、ナノロッドの TPL 輝度、TPACS、および放射スペクトルの比較結果を使用

【0069】

最も一般的な心臓血管疾患のうちの 1 つである、アテローム性動脈硬化症は、米国内の全ての死亡の 3 分 1 を占める [32]。血流中のマクロファージは、アテローム動脈硬化性プラークを含む血管の内膜層に浸透し、プラークベースのマクロファージ (PBM) になる。PBM は、薄い線維性被膜 (厚さ 65 μm 未満) を浸食し、プラークをより破裂しやすくする、マトリクスメタロプロテイナーゼ (MMP) を放出することによって、炎症を加速する [33、34]。腫瘍関連マクロファージ (TAM) は、多くの癌 (例えば、乳、前立腺、卵巣、子宮頸、肺癌、および皮膚黒色腫) の進行において基本的な役割を果たすことが知られている [35]。腫瘍において、浸透 TAM は、(毒性 T 細胞活性の直

10

20

30

40

50

接および間接的抑制を通して)腫瘍成長のための免疫抑制性微小環境を提供し、血管形成を助長し、悪性細胞の増殖および存続を支援する可溶性メディエータを生成する[36]。これらの理由により、固形腫瘍におけるTAM密度は、概して、患者予後と逆の相関があると表される[35]。加えて、TAMの存在と異所性組織への局所侵入および/または転移との間の関連性が、多くの癌で確立されている[35、36]。したがって、マクロファージは、将来のブランク破裂の危険性、ならびに癌の病期および転移に関連する情報を提供する、重要な初期細胞マーカーである。生体内マクロファージ検出は、多大に臨床的に有意であり、金ナノ粒子等のマクロファージ標的造影剤の開発の動機になっている。

【0070】

ナノスフェア[37、38]、ナノシェル[39、40]、ナノケージ[41、42]、ナノローズ[43、44]、ナノロッド[45、46]等を含む、異なるコーティングを伴う種々の金ナノ粒子が、それらの独特の光学性質(すなわち、吸収、散乱、および蛍光)、ごくわずかな細胞毒性、および良好な生体適合性により、マクロファージを標的にするように開発されてきた。バルク金蛍光の量子収量が極めて弱い(約 10^{-10})ことが観察されたが[47]、金ナノ粒子は、局所光照射野振幅を強力に増進し[48、49]、表面プラズモン共鳴(SPR)効果[51-53]によって量子収量を 10^{-4} レベルまで有意に増加させることができ[49]、これは、光の入射電磁光照射野と共鳴する金ナノ粒子の伝導帯における電子のコヒーレント振動として知られている。バンド間減衰の著しい抑制により、ナノロッドは、小さいナノスフェアより高い局所照射野増進係数を呈する[54]。Mohamedらは、バルク金にわたる単一光子プラズモン励起によって、金ナノロッドの量子収量の 10^6 倍またはそれを上回る増進を観察した[55]。ナノロッドは、対称形状を伴うそれらの対応物(例えば、ナノスフェア、ナノシェル、およびナノケージ)と異なり、アスペクト比を変動させることによってSPRを近赤外線波長(組織吸収が最小である)に容易に合わせることができる[56-59]。また、ナノロッドの合成手順が確立されており、他の複雑ナノ構造(例えば、ナノローズおよびナノケージ)の合成と比較して、より良好な単分散および安定性を提供する。単一光子励起より良好な二光子または多重光子励起プロセスは、追加の局所照射野増進、したがって、より強力な放射信号を伴う量子収量のさらなる増進を提供する。ナノロッドの単一光子量子収量は、約 10^{-4} であるが、ナノロッドの二光子作用断面(TPACS)は、量子ドットの範囲($2000\text{ GM} \sim 47000\text{ GM}$)[60]内であり、有機フルオロフォア(例えば、ローダミン6G)よりはるかに高い、 2320 GM に達することができ、二光子励起を使用して、生物組織中でこれらのナノロッドを検出する有望なアプローチを提供することが報告されている。

【0071】

二光子発光顕微鏡法(TPLM)は、組織がより弱く散乱し、より少ない吸収を有する、その近赤外線励起により、特に興味を引く。TPLMは、他の画像診断法(例えば、MRI、CT、PET、OCT、および超音波)と比較して、ナノロッドの最良コントラストおよび最高3D空間分解能を提供することができる(例えば、[61-63])。単一ナノロッドのいくつかのTPLM研究が、二次電力依存性[64、65]、ナノロッドの特定の位置における局所照射野増進[65]、発光偏光およびスペクトル[60、67]の詳細な説明とともに報告されている。しかしながら、複数の励起波長における異なるサイズのナノロッドからの二光子発光(TPL)のさらなる特性評価および比較が必要とされ、これらは、(1)ナノロッドのTPL輝度の比較、(2)TPLプロセスの範囲励起出力、およびナノロッドの光退色効果、(3)ナノロッドのTPACS、および(4)ナノロッドのTPLスペクトルを含む。これらの研究は、ナノロッドからのTPLのより深い理解を提供し、造影剤選択および最適化を誘導することができる。

【0072】

この研究では、複数の励起波長での異なるサイズのナノロッドのTPL特性評価を調査するために、レーザ走査TPL顕微鏡が使用された。 756 nm でプラズモン共鳴を伴う

10

20

30

40

50

ナノロッドが、760 nm 励起での4つ全てのサイズのナノロッドの間で（同一の励起出力において）最も明るいことが分かった。全てのナノロッドは、低電力レベルで励起出力への T P L 強度の二次の依存性を呈し、その後に、光退色効果による、高電力レベルでの強度飽和または減少が続く。3つの励起波長における4つのナノロッドの T P A C S が計算されて比較された。ナノロッドの T P L 放射スペクトルは、電子正孔再結合によって解釈され、T P L 輝度測定と一致する。これらの実験および分析の結果は、ナノロッドサイズが S P R 位置だけでなく、T P L 輝度、T P A C S、および T P L 放射スペクトルも決定することを示唆する。

【0073】

（材料および方法）

（サンプル調製）

以前に説明されたような種結晶成長方法を使用して、金ナノロッドが溶液中で合成された [68]。それぞれ、700、756、844、および1060 nm で表面プラズモン共鳴を伴う4つのサイズのナノロッドが、Nanopartz から購入され、簡潔に超音波分解され、使用前に原液濃度から10回希釈された。ナノロッドサンプルが、スライドガラス上に5 μ l 希釈を分散することによって調製され、カバースリップによって覆われ、厚さ5 μ m のナノロッド溶液を形成した。スライドガラス上の4つのサイズのナノロッドの最終濃度は、それぞれ、 5.7×10^{10} 、 4×10^{10} 、 7.2×10^{10} 、および 2.8×10^{10} ナノ粒子 / ml である。透過電子顕微鏡法 (TEM) は、ナノロッドの形態を明らかにし、T P L 画像は、回折限界での単一のナノロッドの形状を示した (図 10 a - d)。図 10 は、研究で使用された金ナノロッドの TEM 画像、(a) Au 700、(b) Au 756、(c) Au 844、(d) Au 1060 を提供する。(a、b、c、d) 中の差し込み図は、400 nm ~ 700 nm のスペクトル範囲内の 840 nm 励起での単一のナノロッドの T P L 画像である。TEM および T P L 画像中のスケールバーは、それぞれ、20 nm および 1 μ m を表す。(e) レーザ走査 T P L 顕微鏡の概略図。EOM：電気光学変調器、PMT：光電子増倍管。

【0074】

金ナノロッドの長軸は、それぞれ、2.9、3.5、4.4、および6.7の対応するアスペクト比を伴って、35 nm ~ 67 nm の範囲内である。ローダミン 6 G (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) が、脱イオン水中で2つの濃度、すなわち、110 μ M および 1 pM に希釈された。110 μ M を伴うサンプルがキュベットの中に密閉された一方で、1 pM を伴うサンプルは分散させられ、次いで、スライドガラス上で乾燥させられた（単一ローダミン 6 G 粒子の分布を形成した）。T P A C S スペクトルが、キュベットおよび乾燥ローダミン 6 G 粒子の両方に対して測定された。

【0075】

（T P L 顕微鏡法）

レーザ走査 T P L 顕微鏡 (図 10 b、Prairie Technologies, Middleton, WI) を使用して、ナノロッドからの T P L が測定された。760 nm ~ 1040 nm (80 MHz、100 fs) で放射するフェムト秒 Ti : サファイアレーザ (Mai Tai HP, Newport, Irvine, CA) が、励起光源として使用された。顕微鏡に進入するレーザビームの強度が、電気光学変調器 (350 - 80, ConOptics, Danbury, CT) によって変調され、サンプルに送達される電力を測定するための電力計を伴うピックアップミラー (反射率 1%) によって監視された。2D 画像を生成するために、一対のガルバノメトリック走査鏡を使用して、x - y 面内のサンプルにわたって対物レンズ (40 倍、NA = 0.8、水出現、Olympus, Center Valley, PA) の焦点量が走査された。サンプルからの T P L 放射が、同一の対物レンズを通して収集され、720 nm ロングパスダイクロイックミラーによって励起レーザ線から分離され、4つのチャンネルの中へ向かわせられ、それぞれ、640 nm ~ 680 nm、570 nm ~ 620 nm、490 nm ~ 560 nm、および 435 nm ~ 485 nm のスペクトル範囲内で4つの光電子増倍管 (PMT 1、2 : H7422P -

10

20

30

40

50

40、PMT3、4：R3896、Hamamatsu, Bridgewater, NJ)によって検出された。励起レーザ線からの光子カウントを最小化するために、ショートパスフィルタ (et720sp, Chroma Technology, Bellows Falls, VT) がダイクロイックミラーの後に配置された。この研究では、検出光路中のダイクロイックミラーおよび帯域通過フィルタなしでTPL放射信号 (720nm未満) を収集するために、PMT1のみが使用された。TPLはまた、PMT1を光子増倍CCD (Shamrock 303i, Andor Technology, Belfast, Ireland) を伴うファイバ連結分光計と交換することによっても測定された。

【0076】

10

(TPACS計算)

ナノロッドのTPACSが、基準ローダミン6GサンプルからのTPL放射の比較方法によって決定された。サンプルからのTPL放射は、関連パラメータを用いた方程式(1)で表すことができる[69]。

【0077】

【数2】

$$F \propto \frac{1}{2} \phi C \eta_2 \sigma_2 \frac{g_p}{f \tau} \frac{8nP^2}{\pi \lambda}$$

(1)

20

式中、F (光子/秒単位) は、単位時間につき収集されるTPL光子であり、 ϕ (無次元) は、測定システムのTPL収集効率であり、C (モル/ml単位) は、フロオロフォア濃度 (すなわち、ナノロッドおよびローダミン6G) であり、 g_p (無次元) は、励起源の二次時間コヒーレンスの程度であり、f は、レーザ変調周波数であり、 τ は、FWHMパルス幅であり、n は、サンプルの屈折率であり、P (光子/秒単位) は、励起レーザ出力であり、 λ は、励起波長であり、 η_2 (GM単位、 $1 \text{ GM} = 10^{-5} \text{ cm}^4 \text{ s} / \text{光子}$) は、TPACSであり、 σ_2 および σ_1 は、それぞれ、量子収量および二光子吸収断面である。TPL画像中の単一粒子からTPL放射強度を測定することによって、 F_n (ナノロッド) および F_r (rローダミン6G) が取得された。ここで、全てのTPL信号は、同一のシステムにおいて同一の実験条件を用いて同一励起波長下で測定され、したがって、 ϕ 、 g_p 、f、 τ および λ は、ナノロッドおよびローダミン6Gサンプルについて同一である。2つのサンプルに方程式(1)を使用し、Pを平均電力

30

【0078】

【数2-1】

$$\bar{P}$$

(ワット単位) に変更すると、方程式(2)に示されるように、ローダミン6Gの既知のTPACS ($(\eta_2 \sigma_2)_r$) と比較することによって、ナノロッドのTPACS ($(\eta_2 \sigma_2)_n$) を決定することができる。

40

【0079】

【数3】

$$(\eta_2 \sigma_2)_n = \frac{n_r}{n_n} \cdot \frac{\bar{P}_r}{\bar{P}_n^2} \cdot \frac{F_n}{F_r} \cdot (\eta_2 \sigma_2)_r$$

(2)

(結果)

(ナノロッド輝度の電力依存性)

図11aは、 4×10^{11} ナノ粒子/mlの濃度で測定された4つのサイズのナノロッド

50

ドの単一光子吸収スペクトルを示す。図 1 1 b は、760、840、および 1040 nm の波長でのナノロッドの励起レーザ出力 (132 μ W ~ 4.8 mW) への MPL 強度依存性を示す。図 1 1 c は、(b) の低電力レベルでの励起レーザへのナノロッドの発光強度の二次の依存性を示す。(異なる励起波長でのナノロッドの各サイズに対する) 1.7 ~ 2.2 の傾きが、TPL プロセスを確認する。

【0080】

各ナノロッドに対して、2つの表面プラズモン共鳴 (SPR) 吸収ピークを見ることができ、約 520 nm での 1つのピークは、電子の横振動によるものであり、ナノロッドのサイズに対して鈍感である。他方の吸収ピークは、より長い波長に赤方偏移させられ、ナノロッドアスペクト比とともに増加するピーク波長を伴う電子の縦振動によるものである [55、69]。縦 SPR 比の振幅もまた、理論的計算と一致してアスペクト比とともに増加する (Au844を除く) [56]。3つの励起波長 (すなわち、760、840、1060 nm) における4つのサイズのナノロッドの多重光子発光 (MPL) が、TPL 顕微鏡によって測定された。図 1 1 b は、対数尺度で励起レーザ出力 (132 μ W ~ 4.8 mW) へのナノロッド輝度依存性を示す。MPL 信号強度は、各ナノロッドに対して、より低い励起出力で最初に直線的に増加すること (すなわち、傾き 2) が観察され、次いで、曲線が屈曲し、指数関数様増加を形成し始め、その後に信号飽和 (例えば、Au700 - Ex 760、840、1040、Au756 - Ex 760、Au844 - Ex 840、1060、Au1060 - Ex 840) または信号減少 (Au760 - Ex 1040、Au1060 - Ex 1040) が続く。同一の励起出力で、MPL 信号強度は、励起波長がナノロッドの縦 SPR により近いときにより高い。励起が縦 SPR 波長にある (またはそれに近い) とき、MPL 信号強度 (すなわち、ナノロッド輝度) は、Au756 > Au700 > Au844 > Au1060 に従うことが観察され、Au756 は、372 μ W の励起出力で、Au1060 より 11 倍明るく見える。図 1 1 c は、図 1 1 b のより低い励起出力レベルでナノロッド MPL を示す。1.7 ~ 2.2 に及ぶ全ての曲線の傾きは、TPL プロセスを示す、レーザ励起出力への発光信号強度の二次の依存性を示す。着目すべきことは、TPL プロセス出力範囲がナノロッドサイズとともに変動し、より大きいナノロッド (例えば、Au844、Au1060) がより小さいナノロッド (例えば、Au700、Au756) より広い出力範囲を有すると考えられることである。

【0081】

時間の関数としての MPL 応答が、ナノロッドの MPL 光退色性質を検査するように測定された。より小さい視野 (20 \times 20 μ m²) 内のナノロッドが、2 mW で 30 秒間照射され、図 1 2 a に示されるようなより大きい視野 (80 \times 80 μ m²) に即時にズームアウトすることによって、TPL 画像が記録された。同図において、赤色ボックスは、より小さい視野を示す。各励起波長について、赤色ボックス内のナノロッドの平均強度が、より大きい視野内の赤色ボックス外のナノロッドの平均強度に対して正規化され、結果が図 1 1 b に示された。赤色ボックス内の全てのサイズのナノロッドは、ナノロッドがはるかに短い照射時間を体験したより大きい視野内のものと比較して、30 秒間レーザ照射後に MPL 信号減少を示した一方で、より大きいサイズのナノロッド (すなわち、Au844、Au1060) は、より小さいナノロッド (例えば、760 nm 励起で Au756 に対して 2% 減少) と比較して、縦 SPR 励起波長でより著しい信号減少 (例えば、1040 nm 励起で Au1060 に対して 35% 減少) を示したことが観察された。ナノロッドの MPL 時間的応答は、特に、より大きいサイズのナノロッドにおいて、光退色効果が明白であることを示唆する。

【0082】

図 1 2 a は、ナノロッドの MPL 信号減少が観察された、(a) における赤色ボックス (20 \times 20 μ m²) 内で 2 mW で 30 秒間レーザ照射後に取得された、844 nm 励起での Au1060 の典型的な TPL 画像 (80 \times 80 μ m²) を示す。図 1 2 b は、3つの励起波長での4つのサイズのナノロッドに対して、より大きい視野内の赤色ボックス外のナノロッドの平均 MPL 信号 (同一色の第 1 のバー) に対して正規化された赤色ボッ

クス内のナノロッドの平均MPL信号（同一色の第二のバー）を示す。エラーバーは、標準偏差を表す。

【0083】

（ナノロッドのTPACS測定）

ナノロッドのTPACSが決定されることができる前に、ローダミン6GのTPACSが測定される必要がある。690nm～960nmの励起波長範囲を伴うローダミン6G溶液のTPACSが、Albottaら[71]によって報告されているが、このデータは、960nm～1040nmの波長範囲を含まない。この研究では、我々は、Albottaらのデータを80nmだけ拡張する760nm～1040nmの励起波長範囲で方程式（1）を使用して、ローダミン6G溶液および単一粒子の両方の正規化TPACSを測定して計算した。ローダミン6GのTPLプロセスが、全ての励起波長および適用された電力範囲（データ図示せず）において観察され、ローダミン6G溶液の測定は、820nmで重複した主要吸収ピークを伴う760nm～960nm範囲内の報告値に合理的に合致する。単一のローダミン粒子の吸収ピークは、800nmへの青色偏移を有し、1000nmでの第2のピークは、ローダミン6G溶液と比較して著しく減衰させられる。次いで、単一のローダミン6G粒子のTPACSが、方程式（2）に従ってナノロッドと比較するために輝度基準として使用された。

10

【0084】

ナノロッドのTPL信号は、TPLプロセスを保証することができる、1mW励起出力未満で測定された。次いで、方程式（2）を使用して、単一のナノロッドのTPL輝度が、単一のローダミン6G粒子のものと比較され、結果が表3に示されている。我々は、（1）全てのナノロッドが、820nmにおいて縦SPRを伴う金ナノロッドに対する以前の測定[60]と一致する縦SPR波長で、またはその近くで最大TPACSを有することを観察した。TPACSは、縦SPRから離れる励起波長とともに単調に減少する。（2）より小さいナノロッドは、縦SPRで、またはその近くで励起波長を伴う、より大きいナノロッドより大きいTPACSを有する（例えば、Au844に対するEx840およびAu1060に対するEx1040と比較して、Au756およびAu700に対するEx760）。760nm励起でのAu756のTPACSは、調査される全てのナノロッドおよび励起波長の間で最大であり（単一のローダミン6G粒子の25GMと比較して12271GM）、1040nm励起でAu1060のTPACSより約15倍大きい。840nm励起でのAu844のTPACSは、2039GMであり、それは、830nmで励起させられた、わずかにより大きいサイズのナノロッドについて以前に報告された2320GM[60]に非常に近い。

20

30

【0085】

図13は、760nm～1040nmの波長範囲でのローダミン6G単粒子、ローダミン6G溶液、およびAlbottaら[41]からの報告値の正規化TPACSを示す。単一ローダミン6G粒子は、乾燥水溶液から形成され、ローダミン6G溶液は、脱イオン水中に溶解させられた110μMの濃度を有し、報告データは、MeOH中に溶解させられた110μMのローダミン6G濃度を使用していた。

【0086】

40

【表 3】

表3. それぞれ、760、840、および1040nmの励起波長での単一のナノロッドのTPACS(GM
単位)

	Au700	Au756	Au844	Au1060
Ex760	9802	12271		
Ex840	2194	8412	2039	474
Ex1040	632	2391	671	682

10

(3 . 3 ナノロッドの T P L 放射スペクトル)

ナノロッドの T P L 放射をより良く特性評価するために、T P L 放射スペクトルが、複数の励起波長（すなわち、760、800、840、および1040nm）において350nm～700nmの範囲内でナノロッド溶液（80×80μm²視野）から収集された。全てのナノロッドに対する平均励起出力は、T P L プロセスを満たすことができるように、1mW未満に保たれた。次いで、T P L 放射が、入射光子の数およびナノロッドの濃度によって正規化され、図14に示された。

20

【 0 0 8 7 】

図14は、760、800、840、および1040nmの励起波長での（a）Au700、（b）Au756、（c）Au844、および（d）Au1060のT P L 放射スペクトルを示す。（a）における差し込み図は、電子増倍C C Dおよび分光計の格子を含む、検出システムの全量子効率を表す。スペクトルは、量子効率に対して補正され、入射光子の数およびナノロッド濃度に基づき正規化された。

【 0 0 8 8 】

全てのT P L スペクトルが、電子増倍C C Dおよび分光計の格子の全量子効率に対して補正された（図14aの差し込み図）。各ナノロッドに対して、T P L 放射強度は、ナノロッドの縦S P R波長で最高と考えられ、縦S P Rピークから離れる励起波長とともに単調に減少し、S P R吸収による電場増進を示唆する。励起波長がS P Rからより離れるほど、より著しくT P L 放射信号が減少し、これは、図11bに示されるようなナノロッド輝度のP M T測定の結果と一致する。全ての放射スペクトル強度は、（1040nm励起でのAu1060を除いて）励起波長が位置する、より低い光子エネルギーに対して増加し、これは、局所的S P Rの分散に起因し得る[72]。放射スペクトル範囲は、3つの波長帯、すなわち、400nm～575nm、575nm～640nm、および640nm～700nmに分離することができる。約575および640nmでの2つの下落が、全てのサイズのナノロッドのスペクトルで見られ、Au756、Au844、およびAu1060に対して、より明白である。より小さいナノロッド（すなわち、Au700、Au756）に対して、640nm～700nm帯域内のT P L 放射強度は、より大きいナノロッド（すなわち、Au844）と比較して、他の2つの帯域より急速に増加する。興味深いことに、Au1060のT P L 放射は、400nm～575nm帯域で停滞状態を呈し、その後、575nm～640nmおよび640nm～700nm帯域で信号減少が続く。金ナノロッドに対するT P L 機構がバルク金の金属に対するものと同一であるため[72]、放射ピーク領域は、フェルミレベルでの励起電子とd帯内の正孔との間のエネルギー間隙に起因するはずである。我々は、第2の高調波信号も1040nm励起でナノロッドに対して観察されるが、他の励起波長では全く見られないことに着目している。スペクトル特徴の詳細が以下で議論される。

30

40

【 0 0 8 9 】

（ 考 察 ）

ナノロッド輝度が、マクロファージ標的および検出における非常に重要なパラメータで

50

あり、それは、撮像システムの感度も決定するので、最も強い T P L 信号を生じるナノロッドのサイズを選択することは、大いに臨床的関心であり、重要である。この研究では、4つのサイズのナノロッドが比較され、A u 7 5 6 が、同一の励起出力で、および対応する縦 S P R の励起波長で最も強く放射することが分かった。実際、金ナノロッドからの単一光子励起による蛍光放射は、E u s t i s および E l - S a y e d によって実験およびシミュレーション研究 [7 3] で実証されるように、3つの要因、すなわち、(1) 増加するナノロッドアスペクト比とともに増加するはずである、縦 S P R 波長での単一光子吸収度の強度 (図 1 1 a)、(2) d 帯と伝導帯との間の電子遷移に起因し、約 1 . 8 e V (6 8 9 n m) の閾値エネルギーで開始された、S P R 吸収帯とバンド間遷移との間の重複 [7 4、7 5]、(3) 約 5 2 5 n m でピークになり、その後減少し、約 7 5 0 n m を超えると減退する、バルク金の S P R 吸収と蛍光帯との間の重複 [4 7] によって決定される。第 1 の要因は、他の 2 つの要因に対する競合構成要素であり、その正味の効果は、T P L 放射の増進を決定する。この研究では、ナノロッドのアスペクト比が 2 . 9 から 6 . 7 まで増加すると、縦 S P R の増進が増加する一方で、S P R 吸収帯とバンド間遷移との間の重複、または金のバルク蛍光が両方とも減少する。したがって、観察された最も強い増進は、3 . 5 のアスペクト比を伴う A u 7 5 6 をもたらし、それは、A u 1 0 6 0 より約 1 2 倍高い。この観察は、単一光子励起を伴うナノロッドについて報告されたものに非常に類似し、ナノロッドの量子収量は、3 . 4 を下回るアスペクト比に対して二次的に増加し、その後減少し [7 6]、蛍光放射は、アスペクト比が 3 . 2 5 を超えて増加すると、6 のアスペクト比で約 1 桁弱くなるまで減退し始める [7 3]。

10

20

【 0 0 9 0 】

ナノロッドが光退色に対して本質的に不活性であり、ナノロッド上の光散乱が、量子ドットまたは染料からの蛍光とは対照的に、数時間の測定時間にわたって一定のままとすることが出来る単一光子励起 [7 7] と異なり、ナノロッドからの T P L 放射信号は、ナノロッドのサイズに応じて、種々のレベルの光退色を呈する (図 1 2)。実際、T P L 放射は、瞬間入射電力によって決定される。T P L 放射信号は、励起出力を増加させると、最初、入射野による放射の増進により増加し、次いで、減少し、最終的に、ナノロッド形状変換または損傷による増進の消失により減退する。L i n k および E l - S a y e d ら [7 8] は、ナノロッドの完全融解のための閾値が、8 0 0 n m 励起、1 0 0 f s のパルス持続時間で約 0 . 0 1 J / c m ² (1 0 0 G W / c m ²) であることを実証した一方で、ナノロッドの明白な形状変換および縦 S P R 帯の減少は、1 0 G W / c m ² で観察される。B o u h e l l i e r ら [7 9] は、ナノロッドを高励起出力で球形に変換されることができ、対応する発光ピークが青色偏移させられ、放射増進が大幅に低減させられ得ることを示した。この研究では、ビーム焦点での瞬間電力密度は、1 0 4 0 n m 励起で 1 3 G W / c m ² であり (2 m W の平均電力)、それは、1 0 G W / c m ² より大きく、視野内のナノロッドの一部を再成形する可能性が非常に高い。したがって、発光放射が低減させられ、さらに、この光退色効果が、特に、入射レーザ光の偏光と整列させられたより大きいサイズを伴うもの (すなわち、A u 8 4 4、A u 1 0 6 0) に対して、成形または部分ナノロッド損傷に起因することが予測される。

30

40

【 0 0 9 1 】

金結晶構造は、電子遷移が X および L 対称点付近で優先的に発生する第 1 のブリュアン領域において、いくつかの対称点を有することが知られている [6 7、8 0]。金ナノロッドでは、X および L 対称点は、それぞれ、ナノロッドの長軸および対角線の方向に沿うことができる [6 7]。ナノロッドにおける T P L 放射プロセスは、3つのステップで解釈することができる [4 6、5 4、7 4]。(1) 占有 d 帯 (またはおそらくフェルミレベルを下回る s p 伝導帯 [6 7]) 内の電子が、二光子吸収によってフェルミレベルを上回る未占有 s p 伝導帯へ励起させられ、電子正孔対が作成される。(2) 次いで、励起した電子が、(例えば、バンド内散乱を通して) エネルギーを損失し、エネルギー的にフェルミレベルにより近づく。(3) 電子正孔対の再結合が発光放射をもたらす。金のバンド構造計算 [7 2、8 1] によると、放射ピーク領域は、6 - 5 X、6 - 5 L、および 6 -

50

4 L の対称点に起因する、それぞれ、 $1.8 \text{ eV} \sim 1.9 \text{ eV}$ ($652 \text{ nm} \sim 689 \text{ nm}$)、 $2.3 \text{ eV} \sim 2.4 \text{ eV}$ ($517 \text{ nm} \sim 539 \text{ nm}$)、および $3.1 \text{ eV} \sim 3.3 \text{ eV}$ ($376 \text{ nm} \sim 400 \text{ nm}$) のスペクトル範囲内にあるはずである。この研究では、対応する縦 SPR 励起波長でのナノロッドの TPL 放射ピークは全て、約 680 nm および 530 nm に位置することが観察され、急な立ち上がりエッジが約 400 nm で発現し、これは、それぞれ、6 - 5 X、6 - 5 L、および 6 - 4 L 対称点からの放射のバンド計算と非常に一致する。着目に値することは、第 2 の高調波信号が (報告された観察 [71] と一致して) 1040 nm 励起のみで明白であるが、他の励起波長では観察されないことであり、これは、TPL 放射の分散における、弱い第 2 の高調波信号の浸漬に起因し得る。

10

【0092】

(結語)

TPLM を利用することによって、金ナノロッドの TPL 性質が調査され、特性評価された。 700 、 756 、 844 、および 1060 nm の縦 SPR 波長を伴う 4 つのサイズのナノロッドが、複数の励起波長 (すなわち、 760 、 840 、 1040 nm) で励起せられた。Au 756 は、全てのナノロッドの間で、同一の励起出力を用いて 760 nm 励起で最も強い TPL 信号を放出することが観察された。励起出力への TPL 強度の二次の依存性が、低電力レベル (例えば、 $< 1.6 \text{ mW}$) で満たされた一方で、光退色効果は、特により大きいサイズのナノロッドについて、高電力レベル (例えば、 $> 1.6 \text{ mW}$) で明白であった。3 つの励起波長でのナノロッドの TPACS が、単一のローダミン 6 G 粒子の正規化 TPACS スペクトルの測定に基づいて計算された。ナノロッドの TPL 放射スペクトルは、金の電子バンド計算に合致し、TPL 輝度測定と一致する。結果は、金ナノロッドが TPLM のための有望な造影剤であり、ナノロッドの TPL 輝度、TPACS、および放射スペクトルの比較によって、最も明るいナノロッドを決定できることを示唆する。

20

【0093】

本開示に照らして、必要またはそれを上回る実験を伴わずに、本明細書で開示および請求されるデバイス、システム、および / または方法の全てを作製し、実行することができる。本発明のデバイス、システム、および方法は、特定の実施形態に関して説明されているが、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱することなく、本明細書で説明される方法のステップにおいて、または一連のステップにおいて、変形例がデバイス、システム、および / または方法に適用され得ることが当業者に明白となるであろう。当業者に明白である全てのそのような類似置換および修正は、添付の請求項によって定義されるような本発明の精神、範囲、および概念内であると見なされる。

30

【0094】

(参考文献：)

以下の参考文献の概念は、参照することにより本明細書に組み込まれる。

【0095】

【化 1 - 1】

- [1] Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S, "Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization," *Circulation* 104, 2746-2753 (2001)
- [2] Libby P, Ridker PM, Maseri A, "Inflammation and Atherosclerosis," *Circulation* 105,1135-1143 (2002)
- [3] Libby P, Theroux P, "Pathophysiology of coronary artery disease," *Circulation* 111, 3481-8 (2005)
- [4] Lucas AR, Korol R, Pepine CJ, "Inflammation in atherosclerosis: some thoughts about acute coronary syndromes," *Circulation* 113, e728-732 (2006)
- [5] Virmani R, Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, "Pathology of the Thin-Cap Fibroatheroma: A Type of Vulnerable Plaque," *J Interv Cardiol* 16(3), 267-272 (2003)
- [6] Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J, "Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content," *Br Heart J* 69, 377-381 (1993)
- [7] Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis," *Circulation* 92, 1355-1374 (1995)
- [8] Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK, "Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque," *Arteriosclerosis* 6, 131-138 (1986)
- [9] Johnson JL, George SJ, Newby AC, Jackson CL, "Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries," *Proc Natl Acad Sci* 102, 15575-15580 (2005)
- [10] Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, Foster K, Hembry R, Murphy G, Humphries S, "Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization," *Proc Natl Acad Sci* 88, 8154-8158 (1991)
- [11] Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P, "Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques," *J Clin Invest* 94, 2493-2503 (1994)

10

20

30

【0 0 9 6】

【化 1 - 2】

- [12] Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE, Clowes AW, "Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis," *Circulation* 92,1393-1398 (1995)
- [13] Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee, RT, "Macrophages and atherosclerotic plaque stability," *Curr Opin Lipidol* 7, 330-335 (1996)
- [14] Taubman MB, Fallon JT, Schecter AD, Giesen P, Mendlowitz M, Fyfe BS, Marmur JD, Nemerson Y, "Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis," *Thromb Haemost* 78, 200-204 (1997) 10
- [15] Kolodgie FD, Virmani R, Burke AP, Farb A, Weber DK, Kutys R, Finn AV, Gold HK, "Pathologic assessment of the vulnerable human coronary plaque," *Heart* 90, 1385-1391 (2004)
- [16] van Zandvoort M, Engels W, Douma K, Beckers L, Oude Egbrink M, Daemen M, Slaaf DW, "Two-photon microscopy for imaging of the (atherosclerotic) vascular wall: a proof of concept study," *J Vasc Res* 41, 54-63 (2004)
- [17] Zoumi A, Lu XA, Kassab GS, Tromberg BJ, "Imaging coronary artery microstructure using secondharmonic and two-photon fluorescence microscopy," *Biophys J* 87, 2778-2786 (2004) 20
- [18] Boulesteix T, Pena AM, Pages N, Godeau G, Sauviat MP, Beaurepaire E, Schanne-Klein MC, "Micrometer scale ex vivo multiphoton imaging of unstained arterial wall structure," *Cytometry Part A* 69A, 20-26 (2006)
- [19] Le TT, Langohr IM, Locker MJ, Sturek M, Cheng JX, "Label-free molecular imaging of atherosclerotic lesions using multimodal nonlinear optical microscopy," *J Biomed Opt* 12(5), 0540071-05400710 (2007) 30
- [20] Lilledahl MB, Haugen OA, de Lange Davies C, Svaasand LO, "Characterization of vulnerable plaques by multiphoton microscopy," *J Biomed Opt* 12(4), 0440051-04400512 (2007)
- [21] Wang T, Mancuso JJ, Sapozhnikova V, Dwelle J, Ma LL, Willsey B, Kazmi SM, Qiu J, Li X, Asmis R, Johnston KP, Feldman MD, Milner TE, "Dual-wavelength multi-frequency photothermal wave imaging combined with OCT for macrophage and lipid detection in atherosclerotic plaques", *J Biomed Opt* 17(3), 0360091-03600910 (2012)
- [22] Wang T, Mancuso JJ, Kazmi SM, Dwelle J, Sapozhnikova V, Willsey B, Ma LL, Qiu J, Li X, Dunn AK, Johnston KP, Feldman MD, Milner TE, "Combined two-photon luminescence microscopy and OCT for macrophage detection in the 40

【0 0 9 7】

【化 1 - 3】

- hypercholesterolemic rabbit aorta using plasmonic gold nanorose", *Lasers Surg Med* 44(1), 49-59 (2012)
- [23] Xue P, Fujimoto JG, "Ultrahigh resolution optical coherence tomography with femtosecond Ti:sapphire laser and photonic crystal fiber," *Chinese Science Bulletin* 53(13), 1963-1966 (2008)
- [24] Ryu SY, Choi HY, Na JH, Choi ES, Yang GH, Lee BH, "Optical coherence tomography implemented by photonic crystal fiber," *Opt Quant Electron* 37(13-15), 1191-1198 (2005) 10
- [25] Fu L, Gu M, "Double-clad photonic crystal fiber coupler for compact nonlinear optical microscopy imaging," *Opt Lett* 31, 1471-1473 (2006)
- [26] Liu G, Kieu K, Wise FW, Chen Z, "Multiphoton microscopy system with a compact fiber-based femtosecond-pulse laser and handheld probe," *J Biophoton* 4, 34-39 (2011).
- [27] Fu L, Jain A, Xie H, Cranfield C, Gu M, "Nonlinear optical endoscopy based on a double-clad photonic crystal fiber and a MEMS mirror," *Opt Exp* 14, 1027-1032 (2006)
- [28] Wu Y, Xi J, Cobb MJ, Li X, "Scanning fiber-optic nonlinear endomicroscopy with miniature aspherical compound lens and multimode fiber collector," *Opt Lett* 34, 953-955 (2009) 20
- [29] Kim, EH, Dave, DP, Milner, TE. "Fiber-optic spectral polarimeter using a broadband swept laser source," *Optics Communications*, 249 351-356 (2005)
- [30] Park J, Estrada A, Sharp K, Sang K, Schwartz JA, Smith DK, Coleman C, Payne JD, Korgel BA, Dunn AK, Tunnell JW, "Two-photon-induced photoluminescence imaging of tumors using near-infrared excited gold nanoshells," *Opt Exp* 16(3), 1590-1599 (2008)
- [31] Available at http://sales.hamamatsu.com/assets/pdf/parts_H/m-h7422e.pdf 30
- [32] V. L. Roger, A. S. Go, D. M. Lloyd-Jone, R. J. Adams, J. D. Berry, T. M. Brown, M. R. Carnethon, S. Dai, G. de Simone, E. S. Ford, C. S Fox, H. J. Fullerton, C. Gillespie, K. J. Greenlund, S. M. Hailpern, J. A. Heit, P. M. Ho, V. J. Howard, B. M. Kissela, S. J. Kittner, D. T. Lackland, J. H. Lichtman, L. D. Lisabeth, D. M. Makuc, G. M. Marcus, A. Marelli, D. B. Matchar, M. M. McDermott, J. B. Meigs, C. S. Moy, D. Mozaffarian, M. E. Mussolino, G. Nichol, N. P. Paynter, W. D. Rosamond, P. D. Sorlie, R. S. Stafford, T. N. Turan, M. B. Turner, N. D. Wong and J. Wylie-Rosett, "Heart disease and stroke statistics - 2011 update: a report from the American Heart Association," *Circulation* 123(4), e18-e209 (2011). 40
- [33] E. Falk, P. K. Shah and V. Fuster, "Coronary plaque disruption," *Circulation* 92(3), 657-

【 0 0 9 8 】

【化 1 - 4】

671 (1995).

- [34] F. D. Kolodgie, R. Virmani, A. P. Burke, A. Farb, D. K. Weber, R. Kutys, A. V. Finn and H. K. Gold, "Pathologic assessment of the vulnerable human coronary plaque," *Heart* 90(12), 1385-1391 (2004).
- [35] N. B. Hao, M. H. Lu, Y. H. Fan, Y. L. Cao, Z. R. Zhang, and S. M. Yang, "Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors," *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 948098-948108 (2012).
- [36] B. Ruffell, N. I. Affara, and L. M. Coussens. "Differential macrophage programming in the tumor microenvironment," *Trends Immunol.* 33(3), 119-126 (2012). 10
- [37] R. Shukla, V. Bansal, M. Chaudhary, A. Basu, R. R. Bhonde, and M. Sastry, "Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview," *Langmuir* 21(23), 10644-10654 (2005).
- [38] M. M. Janát-Amsbury, A. Ray, C. M. Peterson, and H. Ghandehari, "Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages," *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77(3), 417-423 (2011).
- [39] S. Lal, S. E. Clare, and N. J. Halas, "Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: impending clinical impact," *Acc. Chem. Res.* 41(12), 1842-1851 (2008). 20
- [40] X. Ji, R. Shao, A. M. Elliott, R. J. Stafford, E. Esparza-Coss, G. Liang, X. P. Luo, K. Park, J. T. Markert, and C. Li, "Bifunctional Gold Nanoshells with a Superparamagnetic Iron Oxide-Silica Core Suitable for Both MR Imaging and Photothermal Therapy," *J. Phys. Chem. C* 111(17), 6245-6251 (2007).
- [41] S. E. Skrabalak, L. Au, X. Lu, X. Li, and Y. Xia, "Gold nanocages for cancer detection and treatment," *Nanomedicine (Lond)* 2(5), 657-668 (2007).
- [42] M. Longmire, P. L. Choyke, and H. Kobayashi, "Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats," *Nanomedicine (Lond)* 3(5), 703-717 (2008). 30
- [43] L. L. Ma, M. D. Feldman, J. M. Tam, A. S. Paranjape, K. K. Cheruku, T. A. Larson, J. O. Tam, D. R. Ingram, V. Paramita, J. W. Villard, J. T. Jenkins, T. Wang, G. D. Clarke, R. Asmis, K. Sokolov, B. Chandrasekar, T. E. Milner, and K. P. Johnston, "Small multifunctional nanoclusters (nanoroses) for targeted cellular imaging and therapy," *ACS Nano* 3(9), 2686-2696 (2009).
- [44] T. Wang, J. J. Mancuso, S. M. Kazmi, J. Dwelle, V. Sapozhnikova, B. Willsey, L. L. Ma, J. Qiu, X. Li, A. K. Dunn, K. P. Johnston, M. D. Feldman, and T. E. Milner, "Combined two-photon luminescence microscopy and OCT for macrophage detection in the 40

【 0 0 9 9 】

【化 1 - 5】

- hypercholesterolemic rabbit aorta using plasmonic gold nanorose," *Lasers Surg. Med.* 44(1), 49-59 (2012).
- [45] T. S. Hauck, A. A. Ghazani, and W. C. W. Chan, "Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells," *Small* 4(1), 153-159 (2008).
- [46] T. Niidome, M. Yamagata, Y. Okamoto, Y. Akiyama, H. Takahashi, T. Kawano, Y. Katayama, and Y. Niidome, "PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications," *J. Control Release* 114(3), 343-347 (2006). 10
- [47] A. Mooradian, "Photoluminescence of metals," *Phys. Rev. Lett.* 22(5), 185-187 (1969).
- [48] J. Zheng, C. Zhang, and R. M. Dickson, "Highly fluorescent, water-soluble, size-tunable gold quantum dots," *Phys. Rev. Lett.* 93(7), 077402-077405 (2004).
- [49] G. Wang, T. Huang, R. W. Murray, L. Menard, and R. G. Nuzzo, "Near-IR luminescence of monolayer-protected metal clusters," *J. Am. Chem. Soc.* 127(3), 812-813 (2005).
- [50] J. P. Wilcoxon, J. E. Martin, F. Parsapour, B. Wiedenman, and D. F. Kelley, "Photoluminescence from nanosize gold clusters," *J. Chem. Phys.* 108(21), 9137-9143 (1998). 20
- [51] Y. Fang, W. Chang, B. Willingham, P. Swanglap, S. Dominguez-Medina, and S. Link, "Plasmon emission quantum yield of single gold nanorods as a function of aspect ratio," *ACS Nano* 6(8), 7177-7184 (2012).
- [52] P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, "Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems," *Plasmonics* 2(3), 107-118 (2007).
- [53] M. A. El-Sayed, "Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes," *Acc. Chem. Res.* 34(4), 257-264 (2001). 30
- [54] C. Sönnichsen, T. Franzl, T. Wilk, G. von Plessen, J. Feldmann, O. Wilson, and P. Mulvaney, "Drastic reduction of plasmon damping in gold nanorods," *Phys. Rev. Lett.* 88, 077402-077405 (2002).
- [55] M. B. Mohamed, V. Volkov, S. Link, and M. A. El-Sayed, "The 'lightning' gold nanorods: fluorescence enhancement of over a million compared to the gold metal," *Chem. Phys. Lett.* 317(6), 517-523 (2000).
- [56] S. Link, M. B. Mohamed, and M. A. El-Sayed, "Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant," *J. Phys. Chem. B* 106(16), 3073-3077 (1999). 40
- [57] S. S. Verma and J. S. Sekhon, "Influence of aspect ratio and surrounding medium on

【 0 1 0 0 】

【化 1 - 6】

- localized surface plasmon resonance (LSPR) of gold nanorod," *J. Optics* 41(2), 89-93 (2012).
- [58] P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed and M. A. El-Sayed, "Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine," *Acc. Chem. Res.* 41(12), 1578-1586 (2008).
- [59] E. T. Castellana, R. C. Gamez, M. E. Gómez, and D. H. Russell, "Longitudinal surface plasmon resonance based gold nanorod biosensors for mass spectrometry," *Langmuir* 26(8), 6066-6070 (2010). 10
- [60] H. Wang, T. B. Huff, D. A. Zweifel, W. He, P. S. Low, A. Wei, and J. X. Cheng, "In vitro and in vivo two-photon luminescence imaging of single gold nanorods," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(44), 15752-15756 (2005).
- [61] L. Tong, Q. Wei, A. Wei, and J. X. Cheng, "Gold nanorods as contrast agents for biological imaging: optical properties, surface conjugation and photothermal effects," *Photochem. Photobiol.* 85(1), 21-32 (2009).
- [62] T. Y. Ohulchanskyy, I. Roy, K. T. Yong, H. E. Pudavar, and R. N. Prasad, "High-resolution light microscopy using luminescent nanoparticles," *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* 2(2), 162-175 (2010). 20
- [63] D. Nagesha, G. S. Laevsky, P. Lampton, R. Banyal, C. Warner, C. DiMarzio, and S. Sridhar, "In vitro imaging of embryonic stem cells using multiphoton luminescence of gold nanoparticles," *Int. J. Nanomedicine* 2(4), 813-819 (2007).
- [64] Y. Zhang, J. Yu, D. J. S. Birch, and Y. Chen, "Gold nanorods for fluorescence lifetime imaging in biology," *J. Biomed. Opt.* 15(2), 0205041-0205043 (2010).
- [65] C. L. Chen, L. R. Kuo, C. L. Chang, Y. K. Hwu, C. K. Huang, S. Y. Lee, K. Chen, S. J. Lin, J. D. Huang, and Y. Y. Chen, "In situ real-time investigation of cancer cell photothermolysis mediated by excited gold nanorod surface plasmons," *Biomaterials* 31(14), 4104-4112 (2010). 30
- [66] H. Okamoto and K. Imura, "Near-field imaging of optical field and plasmon wavefunctions in metal nanoparticles," *J. Mater. Chem.* 16(40), 3920-3928 (2006).
- [67] K. Imura, T. Nagahara, and H. Okamoto, "Near-field two-photon-induced photoluminescence from single gold nanorods and imaging of plasmon modes," *J. Phys. Chem. B* 109(27), 13214-13220 (2005).
- [68] W. H. Ni, X. S. Kou, Z. Yang, and J. F. Wang, "Tailoring longitudinal surface plasmon wavelengths, scattering and absorption cross sections of gold nanorods," *ACS Nano* 2(4), 677-686 (2008). 40

【 0 1 0 1 】

【化 1 - 7】

- [69] C. Xu and W. W. Webb, "Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm," *JOSA B* 13(3), 481-491 (1996).
- [70] R. Gans, "Form of ultramicroscopic particles of silver," *Ann. Phys.* 47(10), 270-284 (1915).
- [71] M. A. Albota, C. Xu, and W. W. Webb, "Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm," *Appl. Opt.* 37(31), 7352-7356 (1998).
- [72] G.T. Boyd, Z. H. Yu, and Y. R. Shen, "Photoinduced luminescence from the noble metals and its enhancement on roughened surfaces," *Phys. Rev. B* 33(12), 7923-7936 (1986).
- [73] S. Eustis and M. A. El-Sayed, "Aspect ratio dependence of the enhanced fluorescence intensity of gold nanorods: experimental and simulation study," *J. Phys. Chem. B* 109(34), 16350-16356 (2005).
- [74] M. Guerrisi and R. Rosei, "Splitting of the interband absorption edge in Au", *Phys. Rev. B* 12(2), 557-563 (1975).
- [75] X. Huang, S. Neretina, and M. A. El-Sayed, "Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications," *Adv. Mater.* 21(48), 4880-4910 (2009).
- [76] K. S. Lee and M. A. El-Sayed, "Dependence of the enhanced optical scattering efficiency relative to that of absorption for gold metal nanorods on aspect ratio, size, end-cap shape and medium refractive index," *J. Phys. Chem. B* 109(43), 20331-20338 (2005).
- [77] C. Sönnichsen and A. P. Alivisatos, "Gold nanorods as novel nonbleaching plasmon-based orientation sensors for polarized single-particle microscopy," *Nano Lett.* 5(2), 301-304 (2005).
- [78] S. Link, C. Burda, B. Nikoobakht, and M. A. El-Sayed, "Laser-induced shape changes of colloidal gold nanorods using femtosecond and nanosecond laser pulses" *J. Phys. Chem. B* 104(26), 6152-6163 (2000).
- [79] A. Bouhelier, R. Bachelot, G. Lerondel, S. Kostcheev, P. Royer, G. P. Wiederrecht, "Surface plasmon characteristics of tunable photoluminescence in single gold nanorods," *Phys. Rev. Lett.* 95(26), 2674051-2674054 (2005).
- [80] R. E. Hummel, *Electronic Properties of Materials*, 37-61, 4th ed. (Springer, New York, 2011).
- [81] R. Rosei, and P. Winsemius, "Splitting of the interband absorption edge in Au," *Phys. Rev. B* 12(2), 557-563 (1975).

10

20

30

40

【 図 1 】

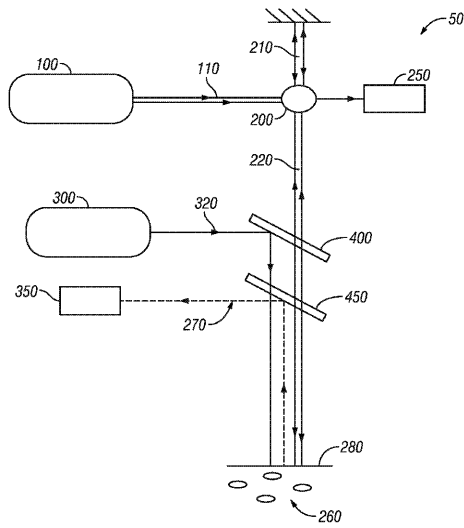


FIG. 1

【 図 2 】

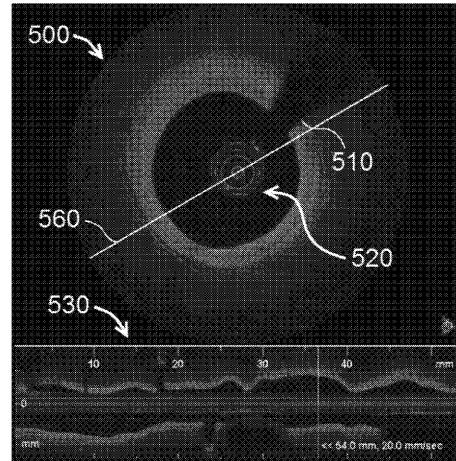


FIG. 2

【 図 8 B 】

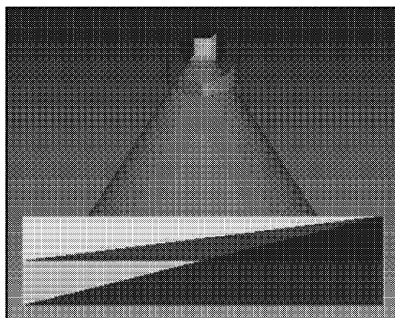


FIG. 8B

【 図 9 B 】

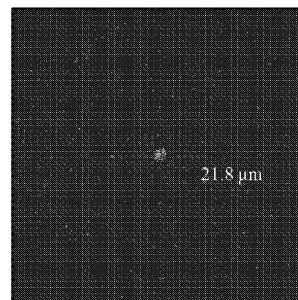


FIG. 9B

【 図 9 A 】

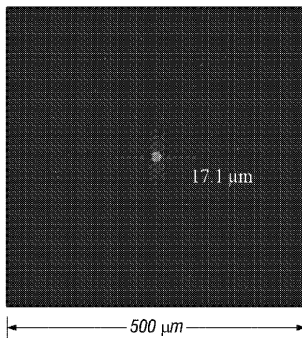
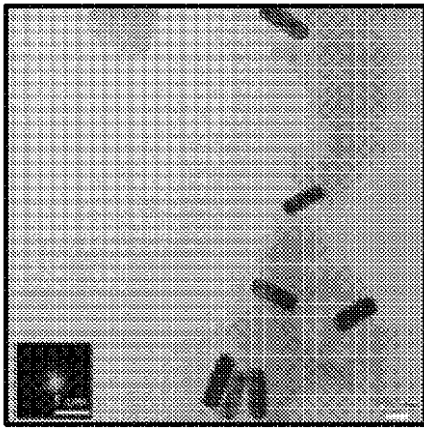
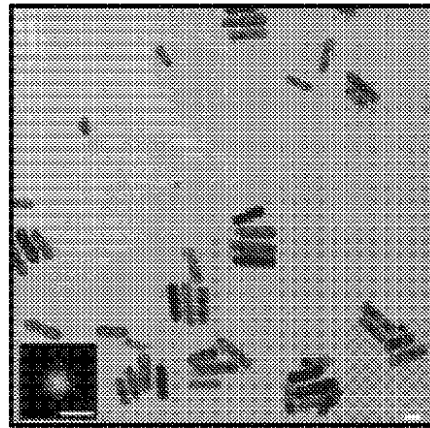


FIG. 9A

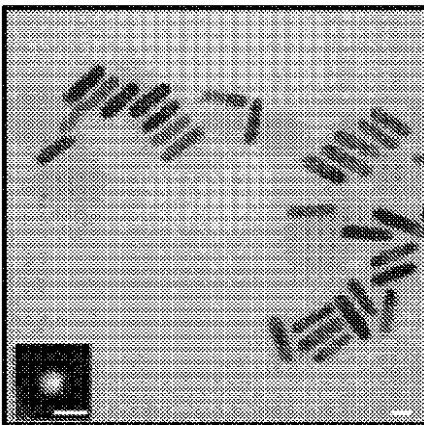
【図 10 A】

**FIG. 10A**

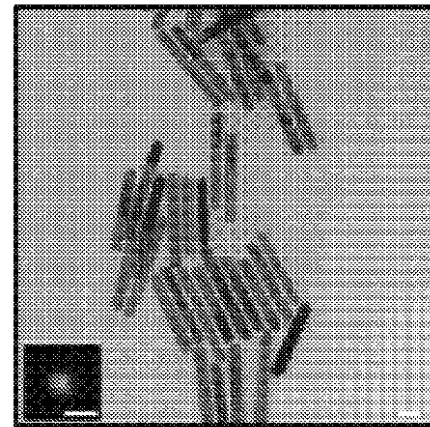
【図 10 B】

**FIG. 10B**

【図 10 C】

**FIG. 10C**

【図 10 D】

**FIG. 10D**

【 図 1 2 A 】

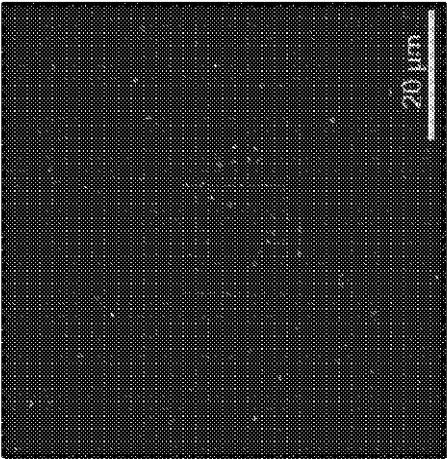


FIG. 12A

【 図 1 2 B 】

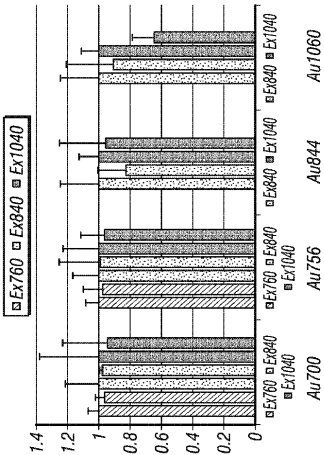


FIG. 12B

【 図 1 9 A 】

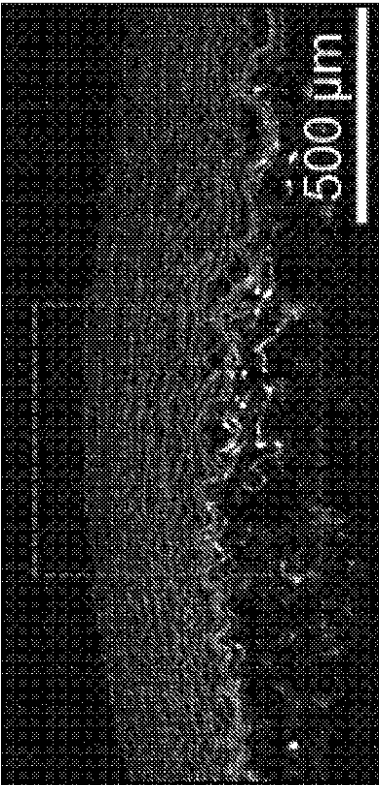


FIG. 19A

【 図 1 9 B 】

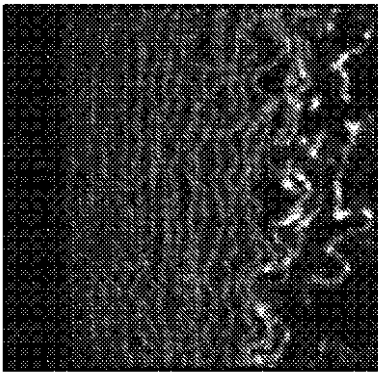


FIG. 19B

【図 19C】



FIG. 19C

【図 19D】

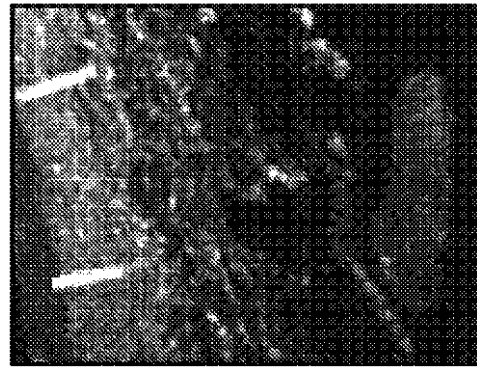


FIG. 19D

【図 3】

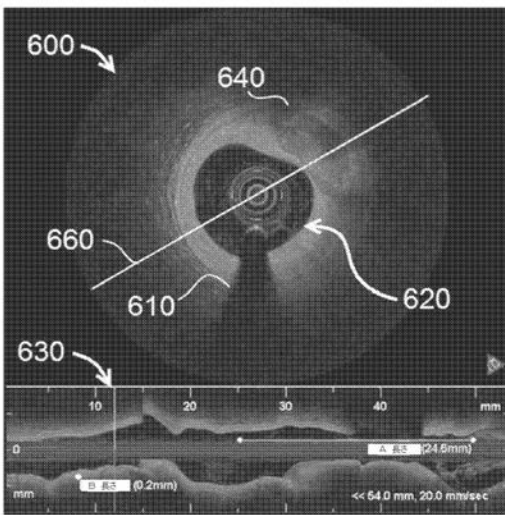


FIG. 3

【図 4】

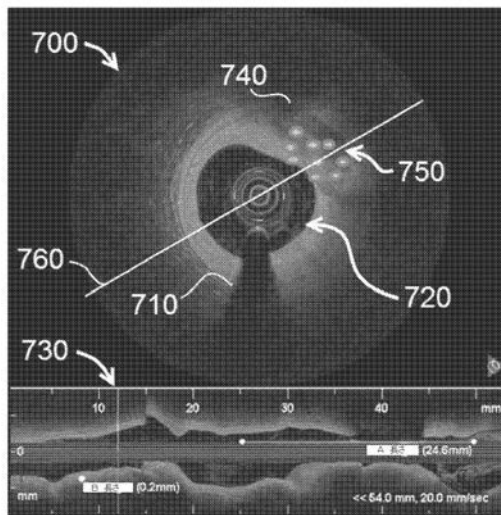
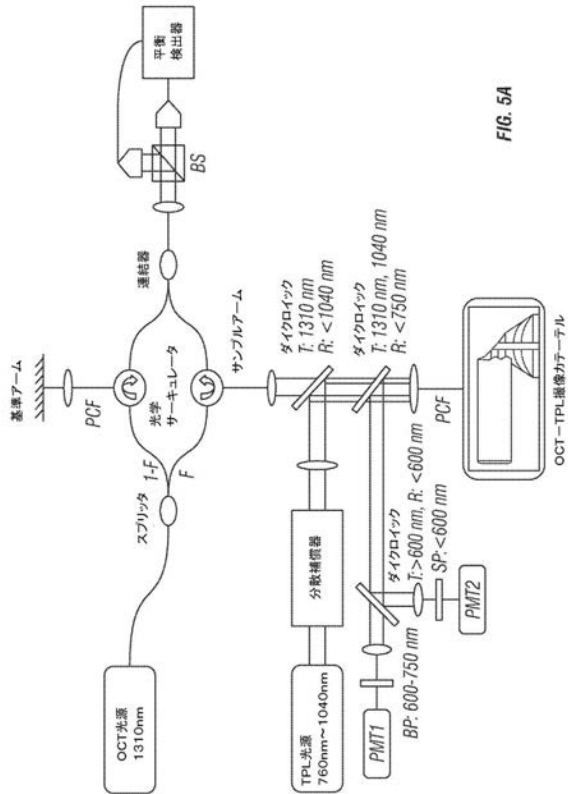
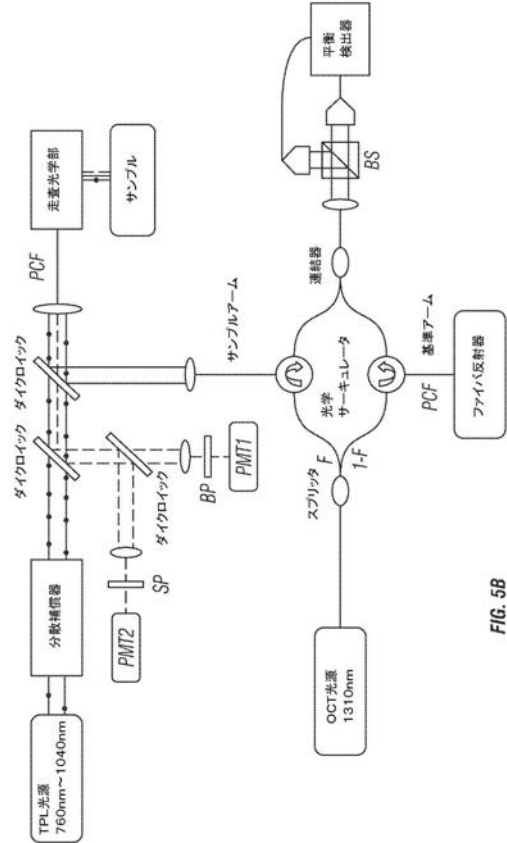


FIG. 4

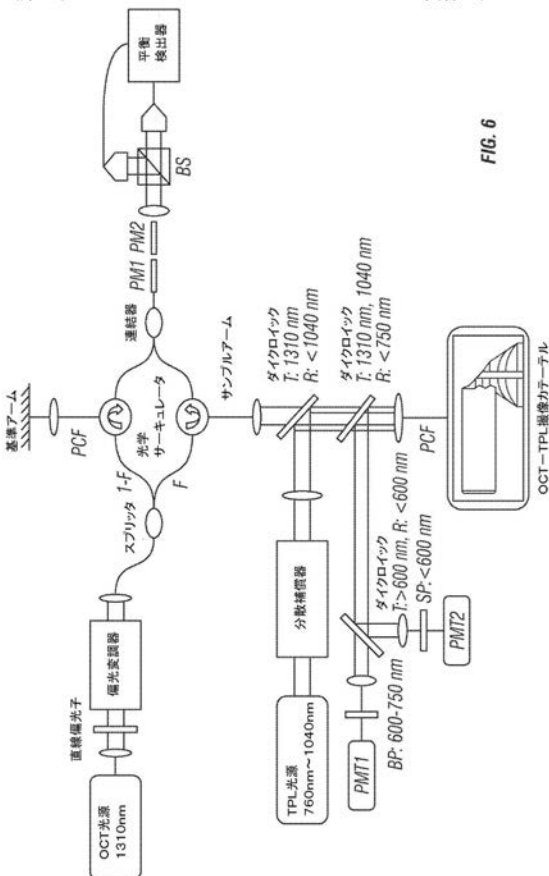
【図 5 A】



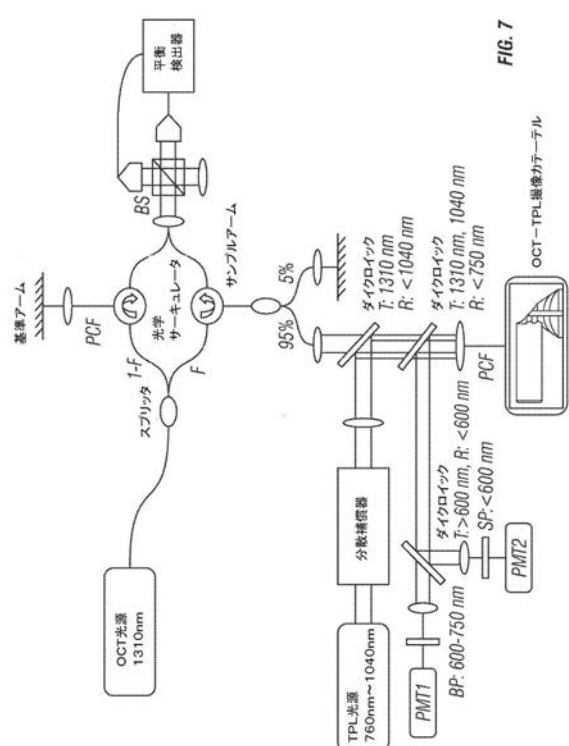
【図 5 B】



【図 6】



【図 7】



【図 8 A】

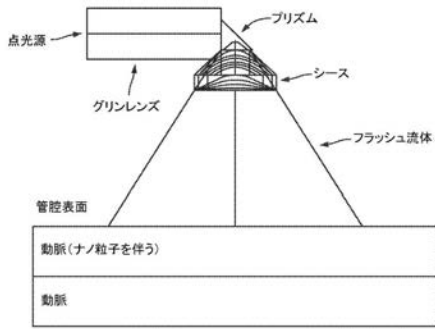


FIG. 8A

【図 10 E】

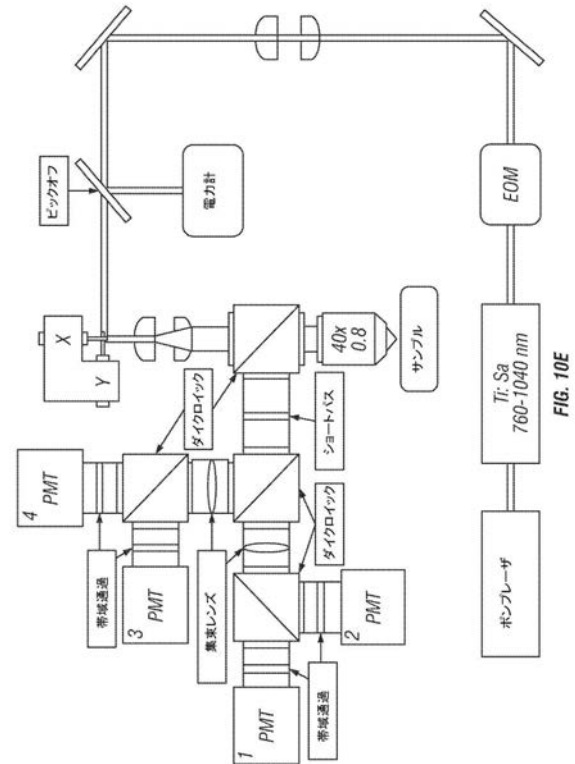


FIG. 10E

【図 1 1】

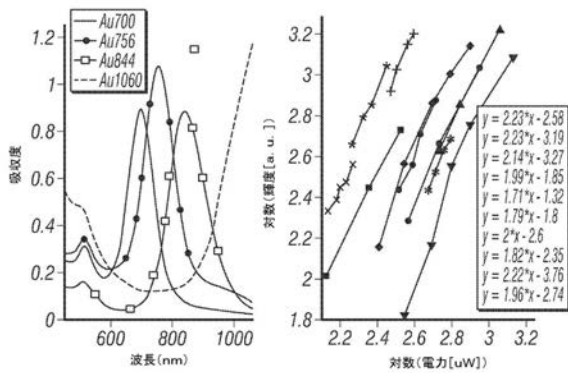


FIG. 11A

FIG. 11C

【図 1 3】

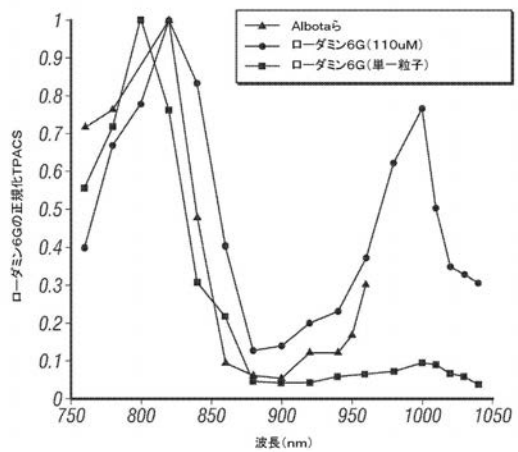


FIG. 13

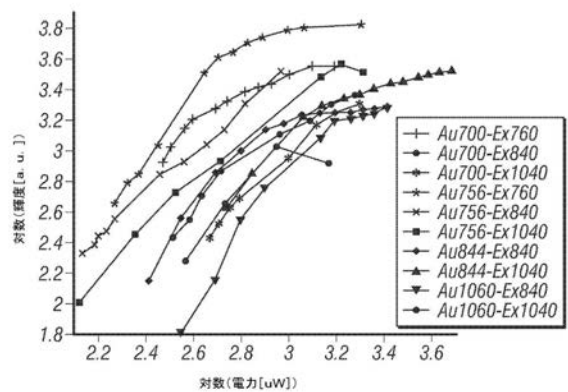


FIG. 11B

【図 14 A】

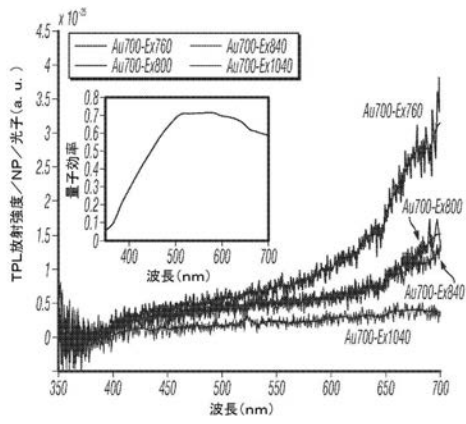


FIG. 14A

【図 14 B】

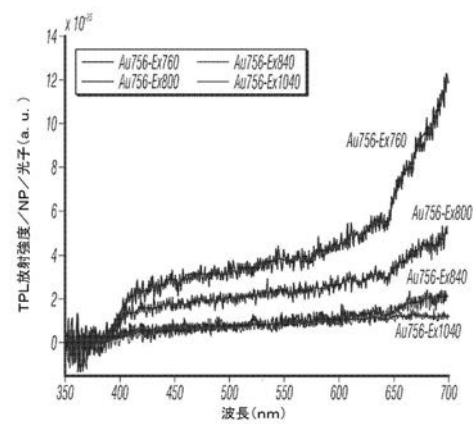


FIG. 14B

【図 14 C】

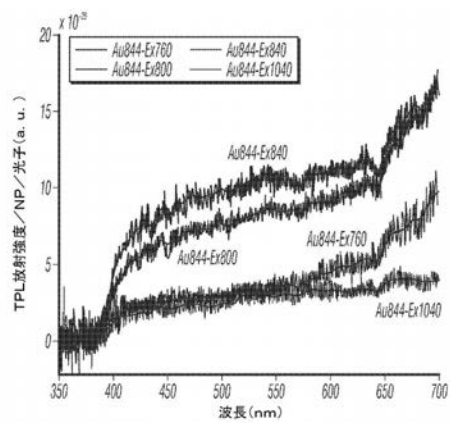


FIG. 14C

【図 14 D】

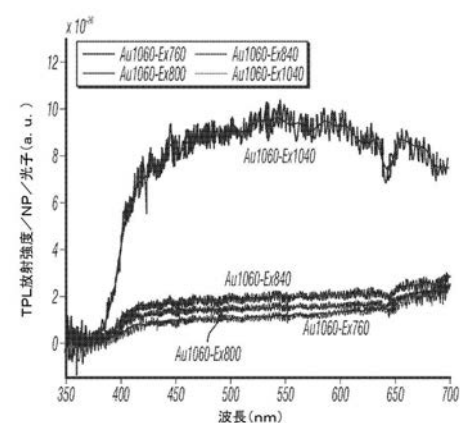


FIG. 14D

【図 15】

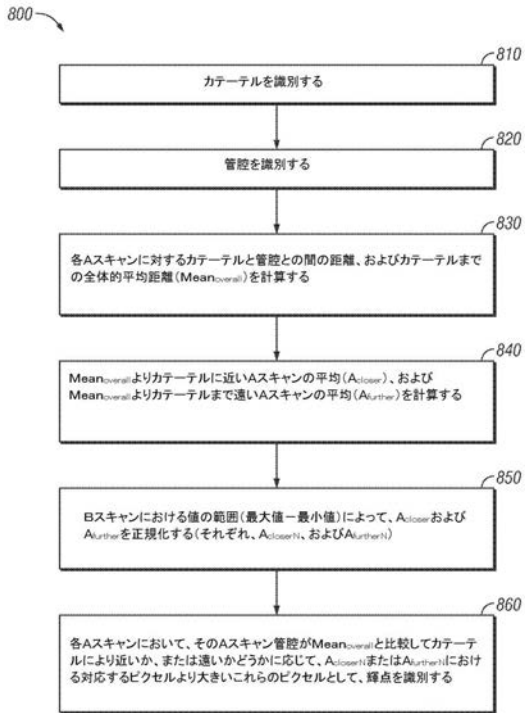


FIG. 15

【図 16 A】

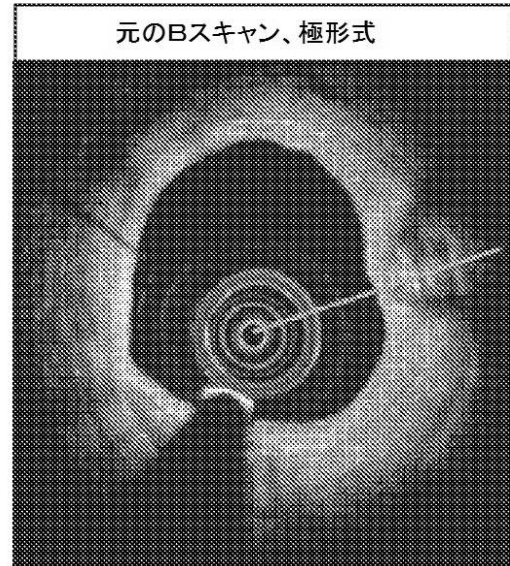


FIG. 16A

【図 16 B】

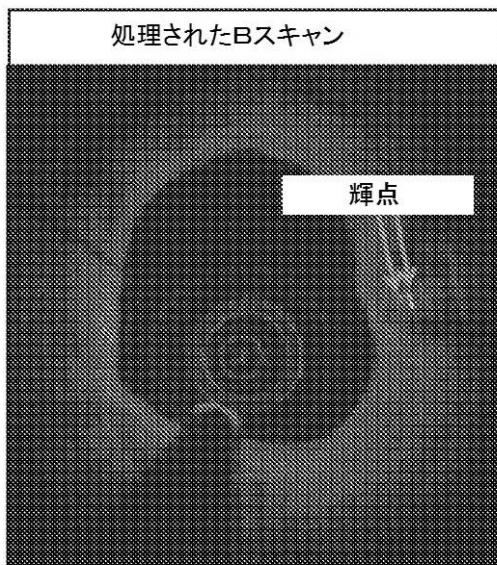
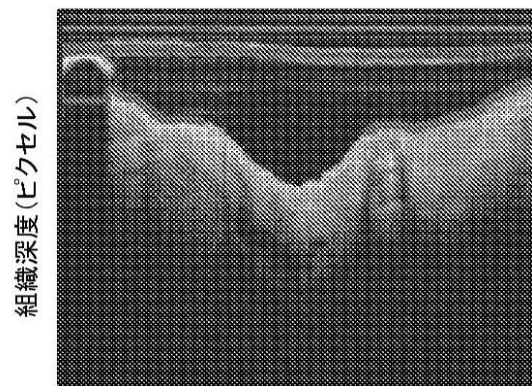


FIG. 16B

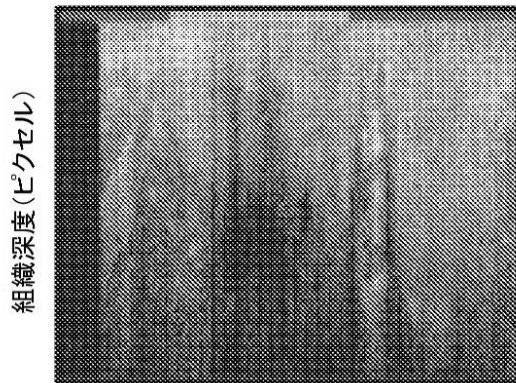
【図 16 C】



Bスキャン、長方形

FIG. 16C

【図 16D】



管腔で整列させられたAスキャン

FIG. 16D

【図 16E】

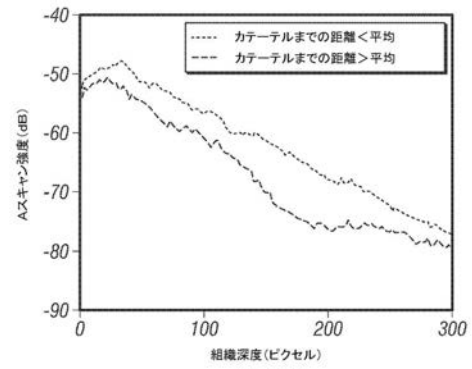


FIG. 16E

【図 16F】

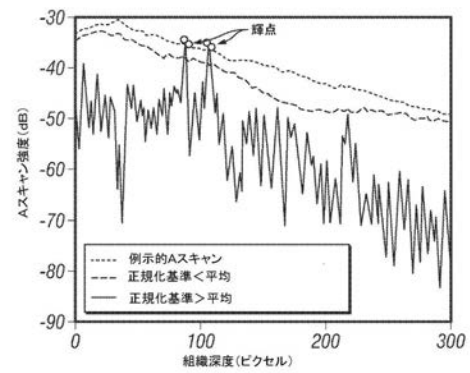


FIG. 16F

【図 17】

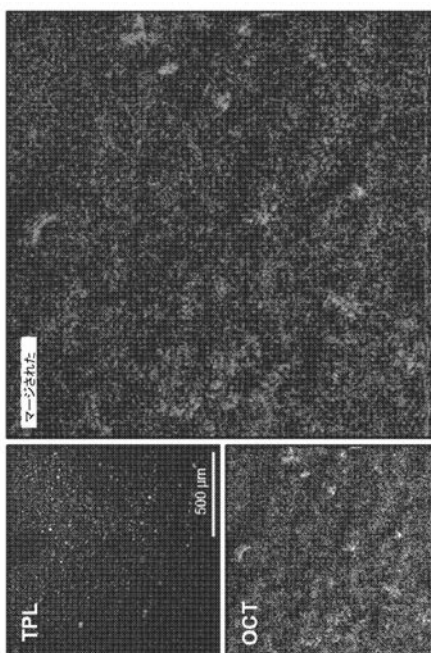


FIG. 17

【図 18】

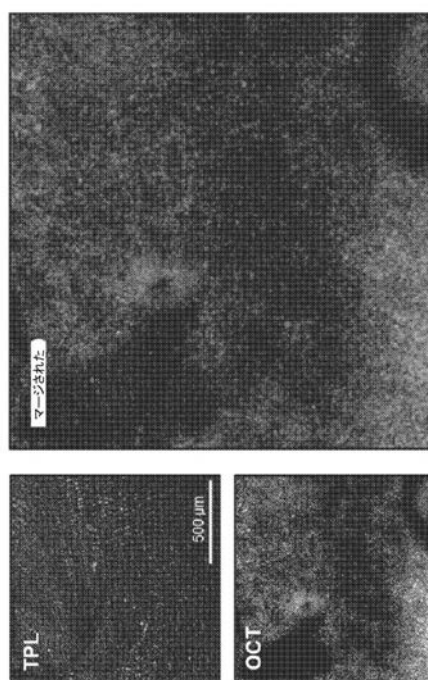
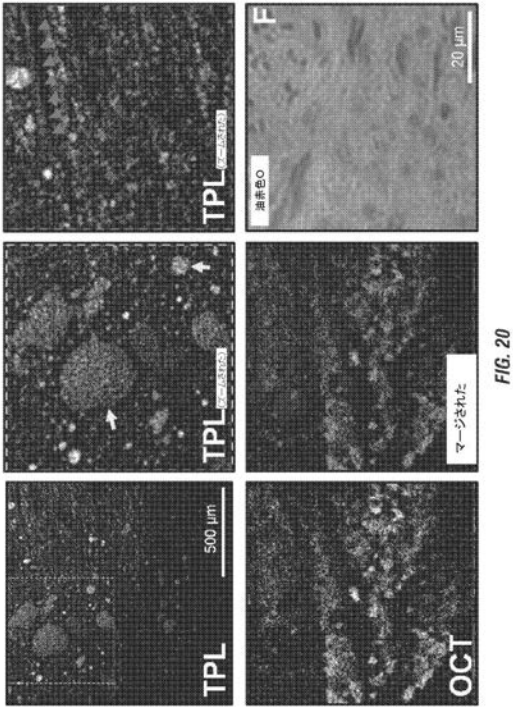


FIG. 18

【図 20】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/028403
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01B 9/02 (2014.01) USPC - 356/477 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - G01B 9/02, 11/02; G02B 6/02 (2014.01) USPC - 356/477, 479, 497, 512; 385/123 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - G01B 9/02; G01D 5/35303; G01H 9/004 (2014.02) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Orbit, Google Patents, ProQuest		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/0117424 A1 (TERAMURA et al) 22 May 2008 (22.05.2008) entire document	1-2, 5-6, 12, 14
Y		3-4, 7-11, 13, 15-21
Y	US 2005/0265405 A1 (MANNSTADT et al) 01 December 2005 (01.12.2005) entire document	3
Y	US 2009/0021746 A1 (TODA et al) 22 January 2009 (22.01.2009) entire document	4
Y	US 2012/0203114 A1 (BECHTEL et al) 09 August 2012 (09.08.2012) entire document	7-10
Y	US 2005/0002028 A1 (KASAPI et al) 06 January 2005 (06.01.2005) entire document	8-9
Y	US 2010/0286674 A1 (BEN-YAKAR et al) 11 November 2010 (11.11.2010) entire document	10-11
Y	US 2005/0171433 A1 (BOPPART et al) 04 August 2005 (04.08.2005) entire document	13, 17-18
Y	US 2009/0185191 A1 (BOPPART et al) 23 July 2009 (23.07.2009) entire document	15-16
Y	US 2005/0119552 A1 (HOCHMAN) 02 June 2005 (02.06.2005) entire document	16
Y	US 2011/0032479 A1 (UTSUNOMIYA) 10 February 2011 (10.02.2011) entire document	19-21
Y	US 6,249,630 B1 (STOCK et al) 19 June 2001 (19.06.2001) entire document	21
A	US 2011/0300490 A1 (RACHET et al) 08 December 2011 (08.12.2011) entire document	1-21
A	WO 2006/004743 A2 (SEIBEL et al) 12 January 2006 (12.01.2006) entire document	1-21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 August 2014		Date of mailing of the international search report 10 SEP 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/028403

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
see last page

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-21

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/028403

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-21, drawn to an apparatus.

Group II, claims 22-38, drawn to a method of imaging a sample site.

Group III, claims 39-48, drawn to a method of displaying imaging data.

The inventions listed as Groups I, II and III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical feature of the Group I invention: a splitter to direct wavelength emitted to a reference path and sample path, first dichroic element and second dichroic element as claimed therein is not present in the invention of Groups II and III. The special technical feature of the Group II invention: detecting an optical coherence tomography signal from the sample site, wherein the optical coherence tomography signal is generated from the first wavelength; and detecting a two-photon luminescence emission signal from the sample site, wherein the two-photon luminescence emission signal is induced by the second wavelength as claimed therein is not present in the invention of Groups I or III. The special technical feature of the Group III invention: obtaining two-photon luminescence data from a plurality of luminescing particles with the imaging system; and simultaneously displaying the optical coherence tomography data and the two photon luminescence data in a combined image as claimed therein is not present in the invention of Groups I or II.

Groups I, II and III lack unity of invention because even though the inventions of these groups require the technical feature of optical coherence tomography light source emits first wavelength, emitting a second wavelength from short pulsed light source, and obtaining two-photon luminescence data, this technical feature is not a special technical feature as it does not make a contribution over the prior art. Specifically, US 2011/0300490 A1 (RACHET et al) 08 December 2011 (08.12.2011) teaches optical coherence tomography (para 43, 98) light source emits first wavelength, emitting a second wavelength from short pulsed light source (para 117-120), and obtaining two-photon luminescence data (para 43). Further, WO 2006/004743 A2 (SEIBEL et al) 12 January 2006 (12.01.2006) teaches optical coherence tomography light source (OCT, abstract) emits first wavelength, emitting a second wavelength from short pulsed light source (short pulse laser source, para 69), and obtaining two-photon luminescence data (collect and convey the visible fluorescence light back to the same optical fiber, para 69).

Since none of the special technical features of the Group I, II or III inventions are found in more than one of the inventions, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 フェルドマン, マーク

アメリカ合衆国 テキサス 78229, サン アントニオ, フロイド カール ドライブ
7703, ユニバーシティ オブ テキサス ヘルス サイエンス センター アット サン
アントニオ スクール オブ メディシン 気付

(72)発明者 ミルナー, トーマス

アメリカ合衆国 テキサス 78712, オースティン, ユニバーシティ ステーション 1
, ザ ユニバーシティ オブ テキサス アット オースティン 気付

(72)発明者 ワン, ティアニー

アメリカ合衆国 テキサス 78712, オースティン, ユニバーシティ ステーション 1
, ザ ユニバーシティ オブ テキサス アット オースティン 気付

(72)発明者 フィップス, ジェニファー

アメリカ合衆国 テキサス 78229, サン アントニオ, フロイド カール ドライブ
7703, ユニバーシティ オブ テキサス ヘルス サイエンス センター アット サン
アントニオ スクール オブ メディシン 気付

F ターム(参考) 2G059 AA05 AA06 BB12 EE02 EE09 FF02 GG01 GG09 HH01 JJ02
JJ03 JJ17 JJ22 MM01
4C161 AA08 AA22 BB08 CC03 CC04 CC06 FF40 FF46 FF47 HH54
JJ17 MM09 NN01