

光と区別されて 200ns 以降に検出されている様子がわかる。このことから時間分解蛍光寿命計測の有効性が確認され、10～20mm 程度であれば生体組織深部にあっても、本手法によりその蛍光物質由来の蛍光情報を抽出することが可能であることが示唆された。

#### ④音響光学効果を利用した蛍光イメージング法

図 10 は, Intralipid-10% 溶液を体積濃度 100ml/L で希釈して散乱媒質としたときの測定結果であるが、走査範囲のほぼ中心付近に蛍光物質が局在している様子がわかる。図 11 は、走査範囲中心付近の信号強度分布の X 軸上のプロファイルを表示したものである。信号ピークの半値全幅は約 3mm であり、その位置は蛍光体の配置位置と一致し、また半値幅もほぼ蛍光体の直径と一致している。レーザー光は光散乱媒質中で散乱されているため、蛍光体が水槽内のどの位置にあっても、蛍光を発するが、1MHz で変調された蛍光成分は蛍光体が音場焦点にあるときに最も強くなり、焦点から外れると散乱により急激に弱くなるため、蛍光体の位置を同定することができたと考えられる。ここで用いた散乱体濃度においては、目視での内部観察はまったく不可能であった。しかし、本手法により、蛍光源の位置情報を 1mm 程度の分解能で抽出することができた。これらの結果から超音波-光相互作用を利用した蛍光イメージング法は、光散乱媒質中内部の蛍光物質分布の測定に有効であることがわかった。

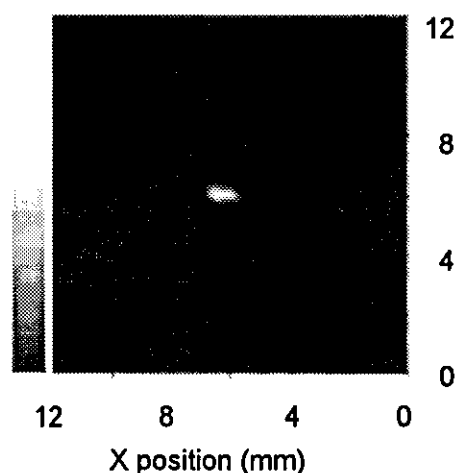


図10 散乱媒質内の蛍光強度分布の画像計測結果

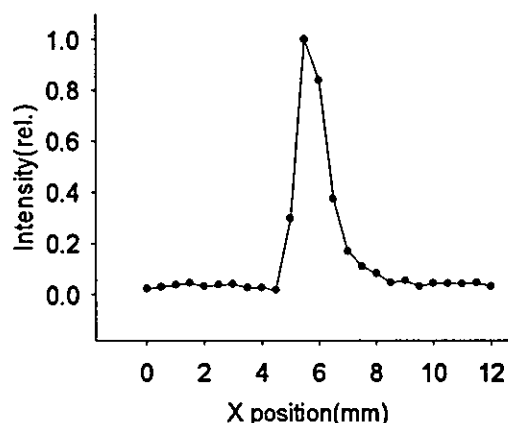


図11 試料中心付近のX方向の蛍光強度分布

#### D. 考察

生体内に分布したナノセンシング・カプセルからの蛍光を生体外において高感度に画像検出する上で、検出限界を制限する背景光ショット雑音の中から選択的にターゲット蛍光物質由来の蛍光を検出する方法として蛍光分光イメージング法と時間分解蛍光寿命イメージング法について検討した。生体試料を用いて行った実験では、従来法では検出不可能であった深部蛍光を選択的に抽出することができた。本年度は比較的均質な生体試料を用いているが、実際の生

きた生体では、皮膚の光学特性など考慮すべき点もまだ多い。今後、大型の動物を使った実験・検討が望まれる。これらの手法は自家蛍光との分離が目的であり、散乱による解像度の劣化については改善することはできない。その点を考慮し、本研究では、生体深部蛍光を高分解画像化する技術について、集束超音波を利用した新しい蛍光画像計測法について検討を行った。生体模擬試料を用いた基礎実験の段階ではあるが、50mm 程度厚さの生体組織内部の蛍光を1mm 程度の分解能で計測することが可能との示唆を得ることができた。今後はこれらの技術を統合した計測系のシステム化を図ることにより、ヒトを対象としたセンチネルリンパ節臨床検査装置へと成果を結実させることが可能であると考えられる。

## E. 結論

本研究において目的とした、生体内ナノセンシング・カプセル高感度・高解像・非侵襲画像計測システムの構築することができ、またその実用化に向けた各種基礎データを取得することができた。これにより分担研究における当初の目標を達成することができたと判断される。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H: Synchronization of Cellular Clocks in the Suprachiasmatic Nucleus, *Science*, Vol. 302, No. 5649, 1408-1412, 2003

Kobayashi M: Modern technology on physical analysis of biophoton emission and its potential extracting the physiological

information. In: *Energy and Information Transfer in Biological System* (F. Musumeci, L.S. Brizhik and M.W. Ho eds.) pp157-187, World Sci. Pub., Singapore (2003)

H. Terazono, T. Mutoh, S. Yamaguchi, M. Kobayashi, M. Akiyama, R. Udo, S. Ohdo, H. Okamura, S. Shibata: Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver, *PNAS*, Vol. 100, No. 11, pp. 6795-6800 (2003)

Kobayashi M: Spontaneous ultraweak photon emission of living organisms -biophotons - phenomena and detection techniques for extracting biological information, *Trends in Photochem. Photobiol.*, Vol. 10, pp. 111-135 (2003)

### 2. 学会発表

Masaki Kobayashi: Optical measurement technology for analyzing gene expression International Symposium on Molecular Clock Tokyo 2004 (Tokyo, Japan) (February 26-28, 2004)

Masaki Kobayashi: Biophoton imaging and analysis for biomedical applications International conference on Biophotons and Biophotonics (Beijing, China) (October 12-16, 2003)

Masaki Kobayashi: In vivo visualization of oxidative stress based on highly sensitive biophoton imaging. International congress on toxicology (Nova Gorica, Slovenia) (September, 2004)

Masaki Kobayashi: Highly sensitive imaging of biophoton from human bodies using a cooled-CCD camera system. Biophotonics Summer School 2004 (Neuss, Germany) (August, 2004)

鈴木聡, 小林正樹, 武田元博, 中島護雄, 多田寛, 大内憲明, 榎本幹: ラットリンパ節造影のためのレーザ励起蛍光画像計測システムの開発, 第1回東北地区若手研究者研究発表会 講演番号 YS-1-27, 講演資料 p53 (2003)

近藤清貴, 佐々木研輔, 小林正樹, 江原淑夫, 榎本幹: 生物フォトン時空間特性分析による植物葉の熱ストレス応答の計測, 平成16年度東北地区若手研究者研究発表会 講演番号

YS-2-19, 講演資料 p37 (2004)

佐々木研輔, 近藤清貴, 小林正樹, 江原淑夫,  
榎本幹: 生物フォトン時空間特性分析による  
植物葉のウイルス感染抵抗反応分析法の検討  
平成 16 年度東北地区若手研究者研究発表会,  
講演番号 YS-2-20, 講演資料 p39 (2004)

笠松隆史, 小林正樹, 榎本幹: コヒーレント  
検出法による光散乱媒質中における超音波分  
布のイメージング II, 平成 16 年度東北地区若  
手研究者研究発表会, 講演番号 YS-2-21, 講演  
資料 p41 (2004)

渋谷幸弘, 小林正樹, 榎本幹: 散乱媒質中  
における蛍光物質分布の画像計測法の基礎検討,  
平成 16 年度東北地区若手研究者研究発表会,  
講演番号 YS-2-51, 講演資料 p101 (2004)

鈴木聡, 小林正樹, 武田元博, 榎本幹: 超高  
感度 CCD による悪性腫瘍由来生物フォトン  
発光の *in vivo* 画像計測, 平成 16 年度東北地  
区若手研究者研究発表会, 講演番号 YS-2-52,  
講演資料 p103 (2004)

藤原修一, 奥山智浩, 小林正樹, 榎本幹: ヒ  
ト体表における生物フォトン 2 次元発光画像  
計測システムの開発, 平成 16 年度東北地区若  
手研究者研究発表会, 講演番号 YS-2-53, 講演  
資料 p105 (2004)

深澤勝, 小林正樹, 榎本幹: 極微弱発光の光  
子放出時系列分析による光子統計特性分析法  
の検討, 平成 16 年度東北地区若手研究者研究  
発表会, 講演番号 YS-2-54, 講演資料 p107 (2003)

武藤修, 鈴木聡, 奥山智浩, 遠藤雅史, 小林  
正樹, 中島護雄, 多田寛, 武田元博, 大内憲  
明, 榎本幹: 蛍光微粒子を用いた生体機能計測  
のための分光画像計測法の検討, 平成 16 年度  
東北地区若手研究者研究発表会, 講演番号  
YS-2-55, 講演資料 p109 (2004)

佐々木研輔, 小林正樹, 深澤勝, 江原淑夫,  
榎本幹: 生物フォトン 2 次元時空間特性分析  
による植物葉における傷害の検出と分析 I -  
CO<sub>2</sub> レーザーによる熱傷害-: 平成 15 年秋季  
第 64 回応用物理学会学術講演会講演予稿  
集, 論文番号 31p-S-5, 11194 (2003)

笠松隆史, 渋谷幸弘, 小林正樹, 榎本幹  
コヒーレント検出イメージング法による光散  
乱媒質中における超音波分布の可視化  
平成 15 年度電気関係学会東北支部連合大会

講演予稿集, 講演番号 1B-06 (2003)

佐々木研輔, 深澤勝, 小林正樹, 江原淑夫,  
榎本幹: 植物のウイルス感染時における生物  
フォトン発光の 2 次元時空間特性計測と傷害  
に対する応答の分析, 平成 15 年度電気関係学  
会東北支部連合大会講演予稿集, 講演番号  
1B-07 (2003)

渋谷幸弘, 小林正樹, 榎本幹: 超音波-光相  
互作用を利用した生体内蛍光イメージング法  
の基礎検討, 平成 17 年電気学会全国大会講  
演論文集, 講演番号 3-01Q 第 3 分冊 p14 (2005)

鈴木聡, 小林正樹, 武田元博, 大内憲明, 榎  
本幹: 癌生物フォトン発光の高感度画像計測  
システムの開発と医用計測応用 I, 平成 17 年  
第 52 回応用物理学会関係連合講演会講演予  
稿集, 論文番号 3p-YN-4, p.1450 (2005)

小林正樹: バイオフォトンイメージングと生  
体計測への応用, 第 6 回分子ダイナミック分  
光ワークショップ講演要旨集 (2004)

鈴木聡, 小林正樹, 武田元博, 中島護雄, 多  
田寛, 大内憲明, 榎本幹: 蛍光微粒子を用い  
たセンチネルリンパ節蛍光画像計測法の検討,  
平成 17 年度東北地区若手研究者研究発表会  
講演番号 YS-3-22, 講演資料 p43 (2005)

武藤修, 乾拓也, 橋本克哉, 小林正樹, 榎本  
幹: 量子ドットを用いた生体機能計測のため  
の蛍光画像分光システムの開発, 平成 17 年度  
東北地区若手研究者研究発表会講演番号  
YS-3-21, 講演資料 p41 (2005)

表沢俊亮, 武田修治, 小林正樹, 榎本幹: 超  
高感度 CCD を用いたヒト生物フォトン画像  
検出とその生体情報計測への応用, 平成 17 年  
度東北地区若手研究者研究発表会講演番号  
YS-3-50, 講演資料 p99 (2005)

今野淳, 水野麻弥, 小川雄一, 松木英敏,  
小林正樹, 川瀬晃道, 榎本幹: 蛍光色素法を  
用いたミリ波照射による PC12 の膜電位変化  
の計測, 平成 17 年度東北地区若手研究者研究  
発表会講演番号 YS-3-38, 講演資料 p75 (2005)

武田敏英, 小川雄一, 水野麻弥, 小林正樹,  
川瀬晃道, 榎本幹: ミリ波帯電波を利用した  
アクティブ反射イメージング, 平成 17 年度東  
北地区若手研究者研究発表会講演番号  
YS-3-39, 講演資料 p77 (2005)

深澤勝, 小林正樹, 奥山智浩, 榎本幹:  
超高感度 CCD によるヒト生物フォトン発光  
画像計測システムの開発と生体計測への応用  
の検討 I  
平成 16 年第 65 回応用物理学学会学術講演会講  
演予稿集, 論文番号 3p-ZT-9, p.1141 (2004)

麦沢俊亮, 深澤勝, 奥山智浩, 小林正樹, 榎  
本幹: 超高感度 CCD によるヒト体表生物フォ  
トン発光画像計測システムの開発と生理情報  
計測への応用 I, 平成 16 年度電気関係学会東  
北支部連合大会講演論文集, p.349, 講演番号  
2J6 (2004)

深澤勝, 麦沢俊亮, 奥山智浩, 小林正樹, 榎  
本幹: 超高感度 CCD によるヒト体表生物フォ  
トン発光画像計測システムの開発と生理情報  
計測への応用 II, 平成 16 年度電気関係学会東  
北支部連合大会講演論文集, p.350, 講演番号  
2J7 (2004)

鈴木聡, 小林正樹, 武田元博, 中島護雄, 多  
田寛, 大内憲明, 榎本幹: 量子ドットナノ粒  
子を用いたセンチネルリンパ節診断のための  
蛍光寿命時間分解画像計測システムの開発,  
平成 16 年度電気関係学会東北支部連合大会  
講演論文集, p.351, 講演番号 2J8 (2004)

笠松隆史, 小林正樹, 榎本幹: コヒーレント検  
出イメージング法による光散乱媒質中におけ  
る超音波音場の可視化 II, 平成 16 年度電気関  
係学会東北支部連合大会講演論文集, p.352,  
講演番号 2J9 (2004)

渋谷幸弘, 小林正樹, 榎本幹: 超音波を利用し  
た散乱媒質中における蛍光イメージング法の  
基礎検討, 平成 16 年度電気関係学会東北支部  
連合大会講演論文集, p.353, 講演番号 2J10  
(2004)

S. Suzuki, M. Kobayashi, M. Takeda, N. Ohuchi,  
M. Enomoto: In vivo imaging of biophoton  
originating from malignant tumor with using a  
highly sensitive CCD camera system, 平成 16 年  
度電気関係学会東北支部連合大会講演論文集,  
p.3, 講演番号 1A3 (2004)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含  
む)

1. 特許  
「蛍光断層画像計測装置」特願2004-240739
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

ナノサイズ・センシングカプセルの新規開発と医療応用（H14-ナノ-010）

CdSe ナノ粒子を用いた癌細胞イメージング

（分担）研究者 樋口 秀男 東北大学大学院工学研究科

研究要旨

癌をイメージングし、ナノマシンを利用して選択的に消滅させることが我々の最終目的である。①乳癌細胞の細胞表面に過剰発現している HER2 レセプターの抗体である Herceptin に明るい蛍光 CdSe ナノ粒子を標識することができた。この抗体 CdSe ナノ粒子は、乳癌細胞に選択的に結合した。③抗体 CdSe ナノ粒子を培養乳癌細胞内に輸送することができ、その過程を高速三次元追跡できた。④マウスに乳癌を移植し、抗体 CdSe ナノ粒子を静脈注射したところ、CdSe ナノ粒子が個々の癌細胞に特異的に結合したことをイメージングできた。⑤細胞に取り込まれた CdSe ナノ粒子に光を照射することで、癌細胞を選択的に殺すことができた(Photo Dynamic Therapy)。

1 癌細胞に特異的に結合するように CdSe 粒子を改良

2004 年 Q-dots 社から売り出されたポリマーコートされた蛍光性 CdSe 粒子の細胞毒性を確認した(図1)。我々が実験で用いる CdSe 粒子濃度は 10 nM 以下であるが、この 100 倍濃度の CdSe 粒子存在

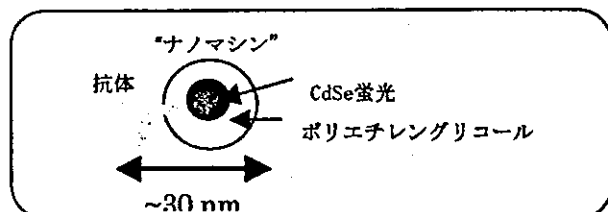


図1 蛍光性 CdSe 粒子に乳癌抗体を結合

意な差が見られなかった。CdSe 粒子は細胞毒性がほとんどないことが確認された。

蛍光性 CdSe 粒子の表面のアミノ基(-NH<sub>2</sub>)をマレイミド化する。一方、乳癌で大量に発現している HER2 レセプターに対する抗体の Herceptin を還元することで、-SH 基を露出する。CdSe 粒子の表面のマレイミド基は抗体の表面の-SH 基と反応し、抗体を結合した蛍光性 CdSe 粒子を作成することができた(図2)。この抗体結合 CdSe 粒子を乳癌細胞と反応させた。ナノ粒子の蛍光は微弱なので、イメージングには超高感度カメラを用いた。その結果、1nM の蛍光性 CdSe 粒子は乳癌細胞に多数結合したが、骨髄細胞には結合しなかった(図2)。後に述べるように、マウスでも乳癌細胞に特異的に結合することが確認された。

下で、細胞を培養しても、細胞増殖に有

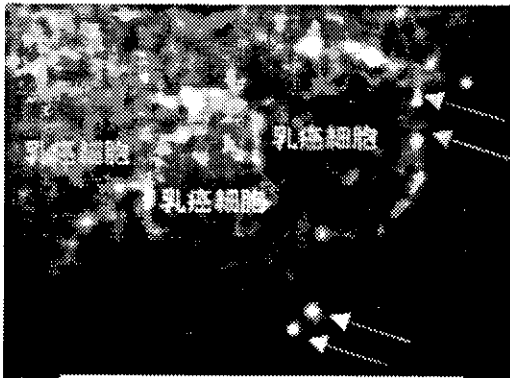


図2 抗体を結合したCdSeの単一粒子の蛍光観察

### 3. 患部まで薬を移動させる方法の確立と、培養細胞に薬を注入しその経過をイメージング

HER2はHER1, 3, 4と二量体を形成した後、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、モータータンパク質を利用して下流へと信号や物質を伝達すると考えられている。このエンドサイトーシスはまさに生体そのものを利用した、ドラッグデリバリーナノマシンである。我々は、乳癌細胞においてHER2が細胞膜上から細胞内部へと輸送される条件を見つけ、輸送の過程をナノメートル分解能で追跡した。ドラッグデリバリーナノマシンを利用するために、エンドサイトーシスに適した条件を探したところ、抗体結合CdSeナノ粒子を用いることであった。これは

おそらく、抗体はHER2の多量体化を促進し、比較的大きなCdSeナノ粒子(直径40nm)がエンドサイトーシスを誘起するためであろう。次に、この粒子を癌細胞に与え、ドラッグデリバリーナノマシンによる輸送過程を可視化できる装置の開発と輸送過程を解析した。抗Her2-CdSe粒子が細胞内に取り込まれる過程は3次元なので、従来のような2次元情報のみでは不可能である。そこで我々は、蛍光粒子CdSeで標識したHER2の運動を実時間で3次元的に観察できる顕微鏡システムを構築した(図3)。本システムは、330ms毎に9枚の共焦点像を取得し、ひとつの3次元画像を構築する。すなわち、1秒間に3コマの立体像を得ることができる。CdSe粒子の光は微弱であるため、フィルターやレーザーそしてカメラを改良することにより、CdSe粒子単一粒子の3次元像を得ることができた(図4)。得られた像から、CdSe粒子の3次元位置を正確に追跡するために、蛍光強度を重みとした輝点の重心を計算することで求めた。位置精度は、水平方向~20nm、垂直方向~85nmであった。我々は本手法を用いて、HER2が乳癌細胞KPL4内で輸送されている様子を3次元的に実時間で観察することに成功した(図5)。これは、高速(秒3コマ)かつ10ナノメートル精度で単

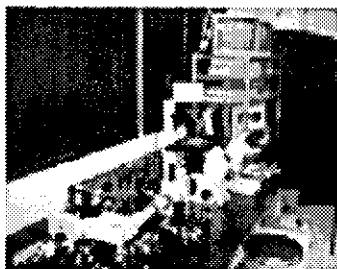


図3 高速3次元共焦点装置

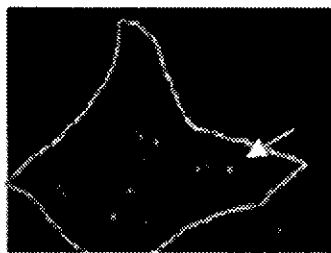


図4 癌細胞内に取り込まれたCdSeの単一粒子の共焦点蛍光

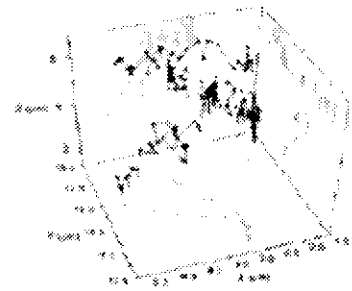


図5 癌細胞内に取り込まれるCdSeの輸送過程の三次元追

一粒子の3次元運動を捉えた(たぶん世界で)初めての像である。さらに、この装置を改良して、2005年1月には、画像取得速度を、10倍以上に上げる装置の開発に成功した。現在、30msで1枚の立体共焦点像の取得ができるようになった。以上のように、我々は、薬を(後に示すように、CdSe自身を薬として利用する)細胞内に輸送する方法と、輸送過程の3次元超高速イメージングに成功した。



図6 乳癌細胞を移植したマウス

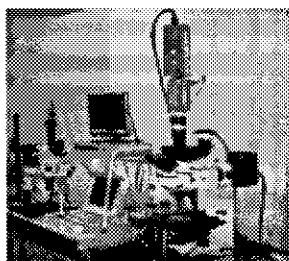


図7 マウス観察装置

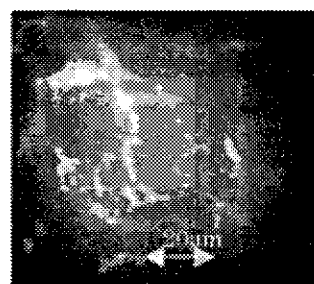


図8 マウス内の腫瘍細胞

4. CdSe 粒子を注入し、マウスの癌腫瘍を蛍光イメージングする(渡辺, 多田(大内研)). ヒト乳癌培養細胞である KPL-4 を 5-10 週齢の female Balb/c マウスに移植し作製した担癌マウスの尾静脈より抗体 CdSe complex を投与した(図6). 生きたマウス内の CdSe の蛍光観察をおこなうために、青色励起光、蛍光バンドパスフィルター、CCD カメラなどからなる実体顕微鏡を CdSe 粒子観察装置に改良した(図7). CdSe 粒子-Herceptin 複合体は投与後数分で担癌マウスの腫瘍組織に集積、生きたままでの蛍光イメージングに成功した。集積した粒子は2日後も移動することなく同じ場所に観察された。移植癌腫瘍以外には肝臓、脾臓などの網内系への非特異的集積も見られた。

さらに、移植癌腫瘍内の CdSe 粒子の分

布の詳細を観察するために、研究(3)で開発した共焦点顕微鏡を利用した。できるだけ深部が観察できるように、研究(3)で用いた油浸レンズを水浸レンズに変えた。生きたマウスの皮膚を剥離し、腫瘍を露出して、腫瘍部を対物レンズ上に固定した。高倍率のレンズを用いることで、マウス内の細胞の周りに結合した、CdSe 粒子の3次元蛍光像を観察することができた(図8)。 また、腫瘍周り毛細血

管壁にも CdSe 粒子が認められた。これらの観察は、次に示す光力学療法をマウスに利用する際の重要な知見を与える。すなわち、光力学療法により癌細胞だけでなく、腫瘍周辺の毛細血管も破壊することも可能であることを示唆する。

5. 光力学療法(Photodynamic Therapy)を利用して、癌細胞のみを破壊する。CdSe 粒子は特異的に癌細胞に結合した CdSe 粒子そのものは、細胞に対して毒性を示さないもので、癌細胞を死滅させることができなかった。そこで、我々は、CdSe 粒子を光励起したときの電子のエネルギーの一部は酸素に受け渡され、活性酸素を発するという原理を利用して、癌細胞を死滅させることを試みた。まず、癌細胞に抗体 CdSe 粒子を加え、12時間静置した。その後、470-490nm の青い光を照射して、細胞の形態変化を観察した。お

よそ、2分後に細胞の形態は変化を開始し、細胞周辺の至る所に水疱が観察された。その後1分以内に、この細胞は破裂した。一方、抗体 CdSe 粒子を加えていない細胞では、10 分後でも変化が見られなかった。

#### 1. 論文発表

- 1) Higuchi H, Bronner CE, Park HW, and Endow SA. Rapid double 8-nm steps by a kinesin mutant. *EMBO J.* 23:2993-9, 2004/7
- 2) Uemura S, Higuchi H, Olivares AO, De La Cruz EM, and Ishiwata S. Mechanochemical coupling of two substeps in a single myosin V motor. *Nature Struct Mol Biol.* 11:877-83, 2004/9
- 3) Yanai, M. J.P. Butler, T. Suzuki. H. Sasaki and H. Higuchi. Regional rheological differences in locomoting neutrophils. *Am.J.Physiol.* 287,C603-11, 2004/9
- 4) Takashi Kamei, Seiji Kakuta, and Hideo Higuchi. Biased Binding of Single Molecules and Continuous Movement Of Multiple Molecules of Truncated Single-Headed Kinesin. *Biophysical Journal*, 2004 /12
- 5) Nguyen Hoa Anh and Hideo Higuchi. Motility of myosin V regulated by the dissociation of single calmodulin. *Nature Struct Mol Biol*, 2005, in press
- 6) Monma N, Nguyen VT, Kaneko J, Higuchi H, Kamio Y. Essential Residues, W177 and R198, of LukF for Phosphatidylcholine-Binding and Pore-Formation by Staphylococcal {gamma}-Hemolysin on Human Erythrocyte Membranes. *J Biochem (Tokyo)*. 136:427-431(2004).
- 7) Kaseda, K, H. Higuchi and K. Hirose. Alternate fast and slow stepping of a heterodimeric kinesin molecule. *Nature cell Biol.* 5,1079-1082(2003)
- 8) Nguyen, V.T., Y. Kamio and H. Higuchi. Single-molecule imaging of cooperative assembly of gamma-hemolysin on erythrocyte membranes. *EMBO. J.* 22, 4968-4979 (2003).
- 9) Okada, Y, H. Higuchi and N. Hirokawa. processivity of the single-headed kinesin KIF1A through biased binding to tubulin. *Nature* 424, 574-477 (2003).
- 10) Kaseda, K, H. Higuchi and K. Hirose. Coordination of kinesin's two heads studied with mutant heterodimer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 18058-16063 (2002).
- 11) Nguyen, V.T., Higuchi, H and Kamio Y. Controlling pore assembly of staphylococcal g-hemolysin by low temperature and by disulfide bond formation in double-cystein LukF mutants. *Mol. Microbiol.* 45, 1485-1498 (2002)
- 12) Nishiyama, M., H. Higuchi and T. Yanagida. Chemomechanical coupling of



the forward and backward steps of single kinesin molecules. *Nature Cell Biol.* 4,790-797 (2002)

## 2. 雑誌の総説・解説

- 1) 西山雅祥, 樋口秀男「キネシンの運動解析から見えてきた熱ラチェットメカニズム」*生物物理* 44, 75-80, 2004/4
- 2) 加世田国与士, 樋口秀男, 広瀬恵子「キネシンは本当に歩くか」*実験医学* 22, 865-868, 2004/4
- 3) 白川昌宏, 樋口秀男「イメージング特集にあたって」*生物物理* 44 巻6 編集, 2004/12
- 4) Nishiyama, M., H. Higuchi, Y. Ishii, Y. Taniguchi and T. Yanagida. Single molecule processes on the stepwise movement of ATP-driven molecular motors. *Bio-Systems*. 71, 145-156 (2003).
- 5) Higuchi, H. and S.A. Endow. Directionality and processivity of molecular motors. *Current Opinion in Cell Biology*. 14, 50-57 (2002).

## 3. 招待講演

(国際)

- 1) Hideo Higuchi  
「Biased Binding, Processive Steps and Oscillatory Movement of Single-headed Kinesin」*Structural Insights into Kinesin Function*, 2004/12, Washington U.S.A

- 2) Hideo Higuchi 「Nano-biology and nano-medicine on cancer cells」*NanoScience and Technology for Medical Applications*, 2005/2/15, Sendai
- 3) H. Higuchi (2004.3) *Nanotechnology on Protein Science. Single biomolecules symposium. Takamatsu.*
- 4) H. Higuchi (2002.11) "Substeps and Backward Steps of Single Kinesin Molecules" *Dynamics & Function of Nano-Biomachines. Osaka*
- 5) H. Higuchi (2002.2) *Biophysical Society Annual Meeting. San Francisco, CA*

(国内)

- 1) 樋口秀男, 「微小管の重合・脱重合: 原子から細胞そして固体へ」, 第42回年会講演, 日本生物物理学会, 2004/12, 京都
- 2) 樋口秀男, 「ナノイメージング」分子イメージング勉強会, 厚生労働省, 2004/5/11, 東京
- 3) 樋口秀男, 「生物の運動メカニズム」早稲田大学, 2004/8, 東京
- 4) 樋口秀男, 「生体ナノシステム」室蘭工業大学, 2004/10, 北海道
- 5) 佐崎 元, 岡田雅史, 松井拓郎, 樋口秀男, 渡辺朋信, 塚本勝 男, 中嶋一雄, 「タンパク質結晶表面での単位成長ステップおよび表面拡散分子のその場観察: 巨大分子を利用することで成長素過程を明らかにする」, 第34回結晶成長国内会議バルク分科会シンポジウム, 2004/8, 東京農工大学,
- 6) 樋口秀男, 「分子モーターの動作機構

を採る」東京工業大学,  
2005/1/28, 東京

7) 樋口秀男 (2003.3) 「熱ゆらぎを利用した生体分子モーター1分子の運動」  
大阪大学産業科学研究所講演会 大阪

8) 樋口秀男 (2003.3) 「分子モーターの1分子計測とナノバイオロジー」 多元研シンポジウム 仙台

9) 樋口秀男 (2003.3) 「レーザートラップと AFM を用いた生体分子モーターの1分子運動観察」 応用物理学会、横浜

#### 6. 特許

特許 出願番号: 2004\_303004 「単粒子三次元位置追跡方法」 平成 16 年  
10 月 18 日, 渡邊朋信, 樋口秀男

#### 7. 新聞雑誌報道

1) Kinesin: walking or limping?  
Nature Cell Biology. News and views

2) 分子モーター頭部2つ, 共同駆動か,  
微小機械に手がかり, 日経産業新聞  
(2003.2.18)

3) Revealingly odd couples.  
Proc Nat. Acad. Sci. USA Commentary (2002.  
12.24)

4) 分子ネットワークが光で連絡  
科学新聞 (2002.10.18)

5) 発光高分子ネットワークで緩やかに  
接続 日本工業新聞 (2002.10.2)

ナノサイズ・センシングカプセルの新規開発と医療応用  
新規シリカコーティング蛍光ビーズおよびX線造影剤開発に関する研究  
（分担）研究者 小林 芳男 東北大学大学院工学研究科

研究要旨

蛍光ビーズおよびAgIナノ粒子のシリカカプセル化に成功した。  
動物実験等で本シリカカプセル化粒子が医療分野でのセンシング  
に利用可能であることがわかった

A 研究目的

本研究はアレルギー等の副作用が問題となっている検査薬品の副作用を完全に取  
り除く技術の確立を目的とする。すなわ  
ち、本研究は、センシングマテリアルの  
シリカカプセル化法の開発とその医療分  
野への応用を目的とする。

B 研究方法

1. シリカカプセル化法の開発：市販の蛍  
光ビーズおよびAgIナノ粒子分散液にシ  
リコンアルコキシドとアミン系触媒を作  
用させてシリカカプセル化した。このと  
き種々の操作条件の最適化を行った。
2. キャラクターゼーション
  - 2-1. シリカカプセル化蛍光ビーズを用い  
た蛍光画像化：小林正樹、武田らと共同  
で、動物実験を行った。計測は蛍光画像  
装置により行い、蛍光特性や粒子サイズ  
等の条件を検討した。
  - 2-2. シリカカプセル化AgIナノ粒子のX  
線造影能：武田らと共同で、CTによるX  
線撮影や動物実験を行い、X線造影能や

粒子サイズ等の条件を検討した。

倫理面への配慮

本研究は現在までのところ人体を対象と  
した実験を行っていないため倫理的問題  
は生じない。また、動物実験は全て麻酔  
下で行い、動物愛護に十分配慮してある。

C 研究結果

1. シリカカプセル化蛍光ビーズ：蛍光画  
像化による検討により、最適な粒子サイ  
ズは40nm程度であることがわかった。  
種々の試薬濃度条件を変化させてシリカ  
カプセル化を行ったところ、50-60nm程  
度のほぼ最適粒子サイズに近いサイズの  
カプセル化粒子の合成に成功した。この  
粒子の蛍光強度を測定したところ、シリ  
カカプセル化を施していない蛍光ビーズ  
に比べて、蛍光の耐久性が上がった。こ  
の成果に関しては、Colloids and Surfaces  
A: Physicochemical and Engineering A  
spects誌と化学工学会第36回秋季大会で  
報告した。この粒子はセンチネルリンパ

節計測に利用できることがわかった。しかしながら、最適粒子サイズよりやや大きいいため、造影率の低下が認められた。この内容は平成16年度第104回日本外科学会総会で報告した。

2. シリカカプセル化AgIナノ粒子：種々の試薬濃度条件を変化させてシリカカプセル化を行ったところ、30-90nm程度のカプセル化粒子の合成に成功した。これに関しては、*Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 誌と第57回コロイドおよび界面化学討論会および第13回高分子ミクロスフェア討論会で報告した。また、武田らと共同で動物モデルおよびX線撮影装置による有用性評価を行い、良好なX線造影能を有することがわかった。この内容については平成16年度第104回日本外科学会総会で報告した。また、特許出願を行った。

#### D 考察

1. シリカカプセル化蛍光ビーズ：シリカカプセル化により蛍光強度の耐久性が向上したのは、シリカカプセル化により蛍光色素と外気中の酸素との接触が防がれたためと考えられる。また、センチネルリンパ節計測に利用できたことから、各種センシングへの応用が期待できる。しかしながら、造影率の低下が認められたため、さらに粒子サイズの制御技術の開発が必要である。

2. シリカカプセル化AgIナノ粒子：カプセル化粒子は良好なX線造影能を有することから、シリカカプセル化蛍光ビーズと同様に、各種センシングへの応用が期待できる。実用的にはさらに濃縮された

粒子分散液を用いる必要があるため、今後は濃縮技術の開発が必要となる。

#### E 結論

以上の実験によりシリカカプセル化ナノサイズセンシング粒子は新たな医療診断材料として利用可能であることがわかった。今後、さらに新しい応用や新しい診断技術の開発が期待される。

#### F 健康危惧情報

現在までのところ、本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

#### G 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yoshio Kobayashi, Kiyoto Misawa, Masaki Kobayashi, Motohiro Takeda, Mikio Konno, Masanobu Satake, Yoshiyuki Kawazoe, Noriaki Ohuchi and Atsuo Kasuya, "Silica-Coating of Fluorescent Polystyrene Microspheres by a Seeded Polymerization Technique and Their Photo-Bleaching Property," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **242** (2004) 47-52.

2) Yoshio Kobayashi, Kiyoto Misawa, Motohiro Takeda, Masaki Kobayashi, Masanobu Satake, Yoshiyuki Kawazoe, Noriaki Ohuchi, Atsuo Kasuya and Mikio Konno, "Silica-coating of AgI semiconductor nanoparticles," *Colloids and Surfaces A:*

*Physicochemical and Engineering Aspects*,  
251 (2004) 197-201.

登録日 平成 16 年 03 月 08 日

登録番号 2004 - 269439

## 2. 学会発表

1) 三澤清登、小林芳男、今野幹男、小林正樹、シリカカプセル化蛍光微粒子の合成法の開発。化学工学会第 36 回秋季大会 平成 15 年 9 月

発明の名称 X線造影剤及び造影方法

出願日 平成 17 年 02 月 18 日

出願番号 特願 2005-42634 号

2) 武田元博、小林芳男、中島護雄、多田 寛、亀井 尚、川添良幸、粕谷厚生、佐竹正延、大内憲明、新規ナノサイズヨウ化銀ビーズを用いた X 線センチネルリンパ節生検の検討。第 104 回日本外科学会総会 平成 16 年 4 月

3) 中島護雄、武田元博、小林芳男、多田 寛、亀井 尚、川添良幸、粕谷厚生、佐竹正延、大内憲明、蛍光ビーズを用いたセンチネルリンパ節検索法の検討。第 104 回日本外科学会総会 平成 16 年 4 月 9 日

4) 三澤清登、小林芳男、武田元博、大内憲明、今野幹男、ヨウ化銀/シリカコア-シェル型ナノ粒子の合成。第 57 回コロイドおよび界面化学討論会 平成 16 年 9 月

5) 三澤清登、小林芳男、武田元博、大内憲明、今野幹男、Stöber 法を用いたヨウ化/シリカコア-シェル型ナノ粒子の合成。第 13 回高分子ミクロスフェア討論会 平成 16 年 10 月

## II. 知的財産権の出願登録状況

発明の名称 センチネルリンパ節検出剤及びその検出方法

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 別紙 1

## 雑誌論文

著者氏名	連名著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	開始頁	終了頁	出版年
Kobayashi Y	Misawa K, Takeda M, Kobayashi M, Satake M, Kawazoe Y, Ohuchi N, Kasuya A, Konno M	Silica-coating of AgI semiconductor nanoparticles	Physicochem Eng Aspects	251	197	201	2004
Kobayashi Y	Misawa K, Kobayashi M, Takeda M, Konno M, Satake M, Kawazoe Y, Ohuchi N, Kasuya A,	Silica-coating of fluorescent polystyrene microspheres by a seeded polymerization technique and their photo-bleaching property	Physicochem Eng Aspects	242	47	52	2004
Takeda M	Kobayashi M, Takayama M, Suzuki S, Ishida T, Ohnuki K, Moriya T, Ohuchi N	Biophoton detection as a novel technique for cancer imaging	Cancer Sci	95	656	661	2004
武田元博	粕谷厚生、川添良幸、大内憲明	ナノセンシングサブセルの医療応用と未来展望	BIO Clinica	20	37	40	2005
Higuchi H	Christian Eric Bronner, Hee-Won Park, Sharyn A Endow	Rapid double 8-nm steps by a kinesin mutant	EMBO J	23	2993	2999	2004
Nguyen H	Higuchi H	Motilit of myosin V regulated by dissociation of single calmodulin	Nature structural & molecular biology	12	127	132	2005
Kamei T	Kakuta S, Higuchi H	Biased Binding of Single Molecules of Truncated Single-Headed Kinesin	Biophysical J	88	2068	2077	2005
Uemura S	Higuchi H, A.O.Olivares, Enrique M, Ishikawa S	Mechanochemical coupling of two substeps in a single myosin V motor	Nature structural & molecular biology	11	877	883	2004
Kaseda K	Higuchi H, Hirose K	Alternate fast and slow stepping of a heterodimeric kinesin molecule	Nature cell biology	5	1079	1082	2003
Okada Y	Higuchi H, Hirokawa N	Processivity of the single-headed kinesin KIF1A through biased binding to tubulin	Nature	424	574	577	2003
Nguyen V. T.	Kamio Y, Higuchi H	Single-molecule imaging of cooperative assembly of gamma-hemolysin on erythrocyte membranes	EMBO J	22	4968	4979	2003
Kaseda K	Higuchi H, Hirose K	Coordination of kinesin's two heads studied with mutant heterodimer	Proc. Natl. Acad. Sci.	96	18058	18063	2002
Nishiyama M	Higuchi H, Yanagida T	Chemomechanical coupling of the forward and backward steps of single kinesin molecules	Nature Cell Biol.	4	790	797	2002
Suzuki T	Miki Y, Moriya T, Shimada N, Ishida T, Hirakawa H, Ohuchi N, Sasano H	Estrogen-Related Receptor $\alpha$ in Human Breast Carcinoma as a Potent Prognostic Factor	Cancer Research	64	4670	4676	2004
Amano G	Yajima M, Moroboshi Y, Kuriya Y, Ohuchi N	MRI Accurately Depicts Underlying DCIS in a Patient with Paget's Disease of the Breast Without Palpable Mass and Mammography Findings	Jpn J Clin Oncol	35	149	153	2005

Moriya T	Hirakawa H, Suzuki T, Sasano H, Ohuchi N	Ductal Carcinoma in situ and Related Lesions of the Breast: Recent Advances in Pathology Practice	Breast Cancer	11	4	325	333	2004
Takeda M	Ishida T, Ohnuki K, Suzuki A, Kiyohara H, Moriya T, Ohuchi N	Breast Conserving Surgery with Primary Volume Replacement using a Lateral Tissue Flap	Breast Cancer	12	1	16	20	2005
Ishida T	Moriya T, Furuta A, Ohuchi N	Pathological assessment of intraductal spread of carcinoma in relation to surgical margin state in breast conserving surgery	Jpn J Clin Oncol	33	4	161	166	2003
Young M	Moriya T, Oguma M, de la Cruz, Endoh M, Ishida T, Hirakawa H, Orita Y, Sasano H, Ohuchi N	Microinvasive ductal carcinoma (tmic) of the breast: the clinicopathologic profile and immunohistochemical features of 28 cases	Pathol. Int	53	7	422	428	2003
Suzuki T	Moriya T, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H	Intracrine mechanism of estrogen synthesis in breast cancer	Biomed Pharmacother	57	10	460	462	2003
Sakayori M	Kawahara M, Shiraishi K, Nomizu T, Shimada A, Kudo T, Abe R, Ohuchi N, Takenoshita S, Kanamaru R, Ishioka C	Evaluation of the diagnostic accuracy of the stop codon (SC) assay for identifying protein-truncating mutation in the BRCA1 and BRCA2 genes in familial breast cancer	J Hum Genet	48		130	137	2003
Amari M	Moriya T, Harada Y, Ishida T, Ohnuki K, Takeda M, Sasano H, Horii A, Ohuchi N	LOH analyses of asynchronous lesions of ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma	Jpn J Clin Oncol	33	11	556	562	2003
De La Cruz C	Moriya T, Endoh M, Watanabe W, Takeyama J, Ming Y, Oguma M, Sakamoto K, Suzuki T, Hirakawa H, Orita O, Ohuchi N, Sasano H	Invasive micropapillary carcinoma of the breast. Clinicopathological and immunohistochemical study	Pathol. Int	54		90	96	2004
Shiraishi K	Kato S, Han S-Y, Liu W, Otsuka K, Sakayori M, Ishida T, Takeda M, Kanamaru R, Ohuchi N, Ishioka C	Isolation of temperature-sensitive p53 mutations from a comprehensive missense mutation library	J Biol Chem	279	1	348	355	2004
Takeda M	Ishida T, Ohnuki K, Suzuki A, Sakayori M, Ishioka C, Nomizu T, Noguchi S, Matubara Y, Ohuchi N	Collaboration of breast cancer clinic and genetic counseling division for BRCA1 and BRCA2 mutation family in Japan	Breast Cancer	11	1	30	32	2004
Kawahara M	Sakayori M, Shiraishi K, Nomizu T, Takeda M, Abe R, Ohuchi N, Takenoshita S, Ishioka C	Identification and evaluation of 55 genetic variations in the BRCA1 and the BRCA2 genes of patients from 50 Japanese breast cancer families	J Hum Genet	49		391	395	2004
Suzuki T	Hayashi S, Miki Y, Ono K, Nakamura Y, Moriya T, Sugawara A, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ (PPAR $\gamma$ ) in human breast carcinoma: a possible modulator of estrogenic actions	Cancer Research					in press



Nakajima M	Takeda M, Kobayashi M, Suzuki S, Ohuchi N	Nano-sized fluorescent particle as a new tracer for sentinel node detection: An experimental model for decision of appropriate size and wavelength	Cancer Sci					in press
Zhou X	Kobayashi Y, Ohuchi N, Takeda M, Kasuya A	Strong luminescence of CdSe nanoparticles by surface modification with Cadmium (II) hydroxide oxide	International Journal of Modern Physics B					in press
Zhou X	Kobayashi Y, Romanyuk V, Ohuchi N, Takeda M, Tsunekawa S, Kasuya A	Preparation of silica encapsulated CdSe quantum dots in aqueous solution with the improved optical properties	Applied Surface Science	241	281	286	2005	
武田元博	大内憲明	MR I による乳癌診断および臨床応用	医学の歩み 別冊 乳腺疾患		99	101	2004	
大内憲明	武田元博、川添良幸、佐竹正延、粕谷厚生	クラスター利用ナノ医療	ナノ学会会報	1	101	105	2003	
Ohuchi N	Ishida T, Ohnuki K, Takeda M	Advances in diagnosis of breast cancer: mammography for screening and MRI for breast conserving surgery.	Innovate achievements in cancer imaging. The 33rd International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund.		30	34	2003	
Yoshida N	Ogata T, Tanabe K, Li Songhua, Nakazato M, Kohu K, Takafuta T, Shapiro S, Ohta Y, Satake M, Watanabe T	Filamin A-bound PEBP2 $\beta$ / CBF $\beta$ is retained in the cytoplasm and prevented from functioning as a partner of the Runx1 transcription factor	Mol. Cell. Biol.	25	1003	1012	2005	
Terajima D	Shida K, Takada N, Kasuya A, Rokhsar D, Satou N, Satake M, Wang H-G	Identification of candidate genes encoding the core components of the cell death machinery in the Ciona intestinalis genome	Cell Death Different	10	749	753	2003	
Zhou X	Kobayashi Y, Romanyuk V, Ohuchi N, Takeda M, Tsunekawa S, Kasuya A	Preparation of silica encapsulated CdSe quantum dots in aqueous solution with the improved optical properties	Applied Surface Science	241	281	286	2003	
Kato Y	Yokobayashi H, Kasuya A, Kagawa M, Kawasaki M	Oxygen-Deficient Anatase Precipitated from High-Temperature Plasma	J. Am. Ceram. Soc.	87	166	169	2003	
Sato Y	Jeyadevan B, Hatakeyama R, Kasuya A, Tohji K	Electronic properties of radial single-walled carbon nanotubes	Chem. Phys. Lett.	385	323	328	2003	
Ye CJ	Gombojav B, Takeshita Y, Nagasaka S, Takahashi Y, Yamamoto A, Goto T, Kasuya A	Electronic states of SnBr4 single crystal and its clusters inserted in the molecular vessel of cyclodextrin	J. Phys. Soc. Japan	72	2224	2228	2003	
Shan-Ying Wang	Jing-Zhi Y, Mizuseki H, Jia-An Yan, Kawazoe Y, Chong-Yu Wang	First-principles study of the electronic structures of icosahedral TiN(N=13, 19, 43, 55) clusters	J. Chem. Phys.	120	8463	8468	2004	

Shan-Ying Wang	Jing-Zhi Y, Mizuseki H, Qiang Sun, Chong-Yu Wang, Kawazoe Y	Energetics and local spin magnetic moment of single 3, 4d impurities encapsulated in an icosahedral Au <sub>12</sub> cage	Physical Review	70		16543-1	16543-6	2004
Amit Jain	Kumar V, Kawazoe Y	All-electron calculations on MgO cluster (n=1-10) with Tohoku University Mixed-Basis Program TOMBO	Transactions of the Materials Research Society of Japan	29		15	18	2004
Noguchi Y	Ohno K, Kumar V, Kawazoe Y, Barnakov Y, Kasuya A	Dielectric Function of (CdSe) <sub>13</sub> Clusters	Transactions of the Materials Research Society of Japan	29	8	3723	3725	in press
Sawada T	Jian Wu, Kawazoe Y, Ohno K	Dynamics on electronic excitation in chemical reaction	Transactions of the Materials Research Society of Japan	29	8	3727	3729	in press
Kawamura H	Kumar V, Kawazoe Y	Water adsorption on Ti-doped silicon clusters	Physical Review	70	19	193402-1	193402-4	in press
Young-Cho Bae	Osanai H, Kumar V, Kawazoe Y	Nonicosahedral growth and magnetic behavior of rhodium clusters	Physical Review	70	19	195413-1	195413-7	2005
Vijay K	Abhishek K. S, Kawazoe Y	Smallest magic caged clusters of Si, Ge, Sn, and Pb by encapsulation of transition metal atom	NANO Letters	4	4	677	681	in press
Suto S	Czajka R, Lostak P, Suzuba S, Kasuya A	Variable temperature STM/STS investigations of Ag nanoparticles growth on semiconductor surfaces	Acta Physica Polonica A	104		289	301	2003
Wawro A	Suto S, Czajka R, Kasuya A	STM/STS studies of Self-organized growth of iron silicide nanocrystals on vicinal Si(111) surface	Acta Physica Polonica A	104		303	319	2003
Kikuchi Y	Belosludov RV, Baba H, Farajian AA, Mizuseki H, Kawazoe Y	Structure and Electronic Properties of Metal Di-(4-Thiophenyl)-Porphyrin	Mol. Sim.	30		929	933	2004
Mizuseki H	Belosludov RV, Farajian AA, Igarashi N, Wang JT, Chen H, Majumder C, Miura S, Kawazoe Y	Molecular Orbital Analysis of Frontier Orbitals for Molecular Electronics: A Case Study of Unimolecular Rectifier and Photovoltaic Cell	Sci. Technol. Adv. Mater.	4		377	382	2003
Kobayashi M		Spontaneous ultraweak photon emission of living organisms -biophotons- - phenomena and detection techniques for extracting biological information	Trends in Photochem. Photobiol	10		111	135	2004

## 別紙 2

書籍 (2002-2004年)

著者氏名	連名著者氏名	編纂者名	論文タイトル名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	開始頁	終了頁
Ohuchi N, Ishida T, Ohnuki, Takeda M	Tadao Kakizoe	Tadao Kakizoe	Advances in diagnosis of breast cancer: mammography for screening and mri for breast-conserving surgery	Innovative achievements in cancer imaging	The Princess Takamatsu Cancer Research Fund	東京	2003	30	34
大内憲明		大内憲明		我が国におけるこれまでの老人保健事業等の評価、検討及び関連する医療福祉分野の施策・研究に関する調査研究-がん検診	日本公衆衛生協会	東京	2002	1	86
大内憲明		大内憲明		がん検診の精度評価のためのコンピュータ・プログラム: データベース入力マニユアル	日本公衆衛生協会	東京	2002	1	102
大内憲明	石田孝宣、大平広道、増田真幸	小山博樹、霞富士雄、飯野祐一、大内憲明	乳房温存療法: 整容性を目指した乳房温存手術の手法	先端医療シリーズ21 「乳癌の最新医療」	先端医療技術研究所	東京	2003	262	265
大貫幸二	大内憲明	小山博樹、霞富士雄、飯野祐一、大内憲明	画像診断&装置の進歩: マンモグラフィ	先端医療シリーズ21 「乳癌の最新医療」	先端医療技術研究所	東京	2003	87	92
大内憲明		大内憲明	診断と治療	CMDT 2004、カレント・メデイクカル 第43版	日経 B P	東京	2004		
大内憲明		大内憲明	PDQ 日本語版	Current Medical Information	CCI Japan	東京	2004		
大内憲明	石田孝宣	伊藤良則	ホルモン補充療法	乳腺疾患: state of the art	医歯薬出版	東京	2004		
大内憲明	武田元博	伊藤良則	MRIによる乳癌診断および臨床応用	乳腺疾患: state of the art	医歯薬出版	東京	2004		

大内憲明	鈴木昭彦	和田 攻	CA15-3とその他の乳癌マーカー 現在の乳がん検診の問題点 とこれからの検診計画	臨床検査ガイド	文光堂	東京	2004		
大内憲明		三木一正	Lateral tissue-flap	がん検診計画ハンドブック	南江堂	東京	2004		
大内憲明	石田孝宣	眞 富士雄	充填法	乳房温存手術のKnack & Pitfalls	文光堂	東京	2005		
大内憲明		植野 映		乳癌の手術、第3版	南江堂	東京	2005		
大内憲明		大内憲明		マンモグラフィーによる乳がん検診の手引き、第3版	日本医事新報社	東京	2004		