

## 第2 高調波発生光 (SHG) 顕微鏡を用いた腱修復の観察

長谷 栄治\*・南川 丈夫\*\*・佐藤 克也\*\*・米倉 大介\*\*  
高橋 光彦\*\*\*・安井 武史\*\*

### Observation of Tendon Healing with Second-harmonic-generation (SHG) Microscopy

Eiji HASE,\* Takeo MINAMIKAWA,\*\* Katsuya SATO,\*\* Daisuke YONEKURA,\*\*  
Mitsuhiko TAKAHASHI,\*\*\* Takeshi YASUI\*\*

**Abstract** Tendon rupture is a traumatic injury that is difficult to recover to the condition before injury. In previous studies, histological staining and tensile testing have been widely used to evaluate histological and mechanical healing. However, since both methods are destructive and invasive, it is difficult to apply these methods to clinical diagnosis. If the degree of healing can be visualized nondestructively and noninvasively, new findings may be obtained regarding mechanisms of the tendon healing process. In this study, we used second-harmonic-generation (SHG) microscopy to evaluate the degree of healing of ruptured tendon in a rabbit model. SHG microscopy has high selectivity and high image contrast with respect to the structural maturity, density, and aggregates of collagen molecule, without the need for histological sectioning and staining. Furthermore, since SHG light intensity sensitively reflects the structural maturity of collagen molecule and its aggregates, it has the potential to be a good indicator for the degree of healing of the injured tendon. By comparing the SHG images between 4-week-healing tendons and normal tendons in the animal model, we confirmed that SHG light intensity of the healing tendon was significantly lower than that of the normal tendon, indicating that the collagen structure in the healing tendon is still immature. Furthermore, we performed image analysis based on 2D Fourier transform of the acquired SHG images, and confirmed a significant difference in collagen distribution depending on the sample. These results indicate that SHG microscopy has the unique potential as an indicator of tendon healing.

**Keywords** : second-harmonic-generation, microscopy, tendon, collagen, healing, image analysis.

### 1. はじめに

腱に過大な負荷が作用すると、部分的な損傷の発生や完全な断裂を引き起こす。腱の断裂の内、アキレス腱断裂は

最も多い症例であり、その80%はスポーツ活動中に発生している[1]。断裂腱の修復は、断裂部で腱芽細胞などが増殖して細胞外基質を形成し、細胞外基質のコラーゲン線維が構造的に成熟することで進んで行く。しかし、断裂した腱が完全に修復する前に過剰な負荷がかかると、再断裂を引き起こす。また、修復後の腱が必ずしも損傷前の強度に戻らない場合も多い。このようなことから、腱修復状態を定量的に評価出来る手法が強く望まれている。

コラーゲンは、腱の乾燥質量の内の65~75%を占め、その極めて規則的な高次配向構造が腱の力学的特性を決定する上で重要な働きをしている[2]。腱修復部においてコラーゲンの配向・密度・高次構造が正常腱と同様な状態に戻ることが腱の組織学的修復と考えると、コラーゲンの組織学的観察が修復度合いの直接的な評価方法であると言える。

このような観点から、広く用いられてきた手法が染色法である。HE染色法[3]や他のコラーゲン染色法[4]を用い

生体医工学シンポジウム2016発表(2016年9月,旭川)  
2016年7月22日受付,2016年9月23日改訂,2016年10月26日再改訂

Received July 22, 2016; revised September 23, 2016, October 26, 2016.

\*徳島大学大学院先端技術科学教育部  
Graduate School of Advanced Technology and Science,  
Tokushima University

\*\*徳島大学大学院理工学研究部  
Graduate School of Science and Technology, Tokushima  
University

\*\*\*徳島県立中央病院  
Tokushima Prefectural Central Hospital

て、コラーゲンを選択的に染色することにより、修復した腱における組織学的特性を、コラーゲン量やその分布といった観点で詳細に評価することが出来る。染色法にて損傷腱の組織学的修復を評価することは可能であるが、その結果は腱の力学的評価とは必ずしも一致しない。力学的修復を直接的評価する手法として、引張り試験[5]が用いられている。この手法では、採取した腱組織サンプルの応力-ひずみ曲線からヤング率等のパラメーターを抽出することで、力学的強度の回復を評価する。これらの手法を用いると、損傷腱の組織学的修復もしくは力学的回復を評価することが可能であるが、いずれの手法も侵襲的あるいは破壊的な手法である。もし、修復度合いを非侵襲に可視化出来れば、腱修復の診断に新たな展開を引き起こせる。非侵襲的な生体観察手段である MRI を用いると、組織が含有する水分量分布から、コラーゲン配列を反映したパラメーターを間接的に抽出することが出来る[6]。しかし、腱における一般的なコラーゲン線維径が数  $\mu\text{m}$  であるのに対して、現在臨床において応用されている MRI や超音波法等の非侵襲的観察手法では空間分解能が数百  $\mu\text{m}$  程度に制限されており、コラーゲンに対する直接的な分子選択性を持たない。

近年、生体組織におけるコラーゲンを、生きたありのままの状態でも可視化する方法として、SHG (SHG: second harmonic generation, 第 2 高調波発生) 顕微鏡が注目されている[7]。SHG 顕微鏡では、非中心対称構造物質であるコラーゲン分子に対して高ピーク光電場を有する超短パルス光を入射すると、コラーゲン分子との非線形相互作用により波長変換が起こり、入射レーザー光の半波長となる SHG 光がコラーゲン分子から特異的に発生する。この SHG 光を観測することにより、コラーゲンを選択的かつ高コントラストで可視化できる。SHG 顕微鏡は、非染色、低侵襲、深浸透性、熱的ダメージが小さい、高い空間分解能、3次元イメージングが可能といった特徴を有するため、これまでに皮膚[8]、角膜[9]、骨[10]、軟骨[11]、腱[12]等のさまざまな組織コラーゲンの観察に応用されている。また、近年では、非侵襲観測の特徴を利用し、熱傷や創傷の治癒過程のモニタリングにも応用されている[13]。さらに、最近では、SHG 顕微鏡に内視鏡技術を導入することにより、臨床診断への応用展開も試みられている[14]。

SHG 光の発生はコラーゲン濃度のみならず、コラーゲンの構造的成熟性 (高次構造的) にも依存する[7]。腱の修復過程では、構造的に未熟な (低次構造の) コラーゲンが新生された後、リモデリングによって構造的に成熟した (高次構造の) コラーゲンへと置換されていく。したがって、SHG 光は、腱修復の度合いをコラーゲンの量と構造という観点で反映した光プローブとして利用出来る可能性を有している。また、SHG イメージから、染色法を

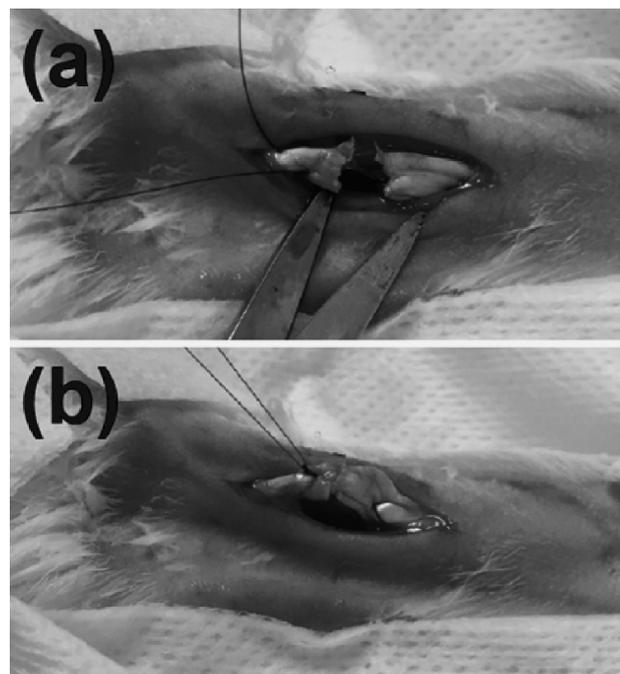


図 1 手術写真。(a) 腱の切断と (b) 縫合。

Fig. 1 Photographs of surgery. (a) Transection and (b) stitching of the tendon.

用いた組織学的診断と同様な情報を、切片化することなく非染色に取得することが可能である。さらに、内視鏡技術と融合することにより、臨床現場で利用可能な腱修復モニタリング手段に繋がる可能性もある。

本研究では、ウサギの正常腱および腱断裂モデルを用いた修復腱の SHG イメージングにより、腱断裂の修復をコラーゲン動態の観点から評価した。得られた SHG イメージに対して、2次元フーリエ変換 (2D-FT) に基づいた画像解析法[15]を適用し、断裂腱の修復度合いの定性的評価法について検討した。

## 2. 方 法

### 2.1 動物モデル

動物実験及び準備に関して、徳島大学動物実験倫理委員会 (徳動物 12133) の承認を得た。本実験では、先行研究に基づいた実験プロトコル[1]を用いてウサギ腱断裂モデルを作成した。実験動物には、3羽の日本白色家兎 (オス、8-10 週齢、体重 = 2.0-2.5 kg、北山ラベス株式会社) を用いた。飼育環境への適応のため、実験開始 1 週間より動物飼育室へ搬入し、恒温恒湿の下飼育した。飼育期間中、飲水および固形飼料は自由摂取させた。外科的腱断裂のため、イソフルランによる吸入麻酔下で (導入 5%、維持 2%)、右足を除毛クリームで脱毛し、リドカイン 0.5% の皮下注入により局所麻酔を行った後、長母指屈筋腱を露出させ、図 1(a) に示すように、筋腱移行部位と関節により屈曲する部位との中間付近を外科用メスにより鋭利に切

断した。その後、断裂部をループナイロン縫合糸により縫合した後[図1(b)], 皮膚切開部を縫合糸により縫合した。その後、創部保護のためギプスを巻きつけ、個体ごとにケージで飼育した。家兎における腱修復過程はヒトの場合と同様に、炎症期・細胞増殖期・瘢痕再構築期という経路を辿ることが知られている[16]。本研究では、修復過程において断裂した腱が見かけ上癒合するものの、コラーゲン高次構造の成熟度が低いため再断裂が起こりやすい時期である瘢痕・再構築期を評価の対象にした。そのため、瘢痕・再構築期に相当する、術後4週間の飼育を行った後、ソムノベンチルの過剰投与(75 mg/kg)による安楽死処置を行い、左右足から2本の腱を正常サンプルおよび修復サンプルとして採取し、 $-15^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。冷凍保存したサンプルは実験日に室温で解冻し、速やかにSHGイメージングを行った。

## 2.2 SHG 顕微鏡

図2に実験のセットアップを示す。本実験では、生体透過性の高いモード同期フェムト秒Cr:forsteriteレーザー(中心波長1250 nm, パルス幅100 fs, 繰返し周波数73 MHz)を光源としたSHG顕微鏡[6]を使用した。光源から出射したレーザー光は、 $\lambda/2$ 板(HWP)と偏光子(P)によってパワー調整された後、SHG光発生効率の偏光依存性をキャンセルさせるため、 $\lambda/4$ 板を用いて円偏光にされた。サンプル上のレーザースポットは、ガルバノミラー(GM)とリレーレンズ(RL)及び油浸の対物レンズ(OL, N.A. = 0.90, W.D. = 350  $\mu\text{m}$ )により、400  $\mu\text{m}$   $\times$  400  $\mu\text{m}$ の測定領域を高速2次元走査できる(測定時間2

秒/イメージ)。また、機械式ステージを用いて測定サンプルを左右上下に動かし、16枚のSHGイメージを繋ぎ合わせることで、大面積SHGイメージング(1.6 mm  $\times$  1.6 mm)を取得している。発生したSHG光は同じ対物レンズによって集光され、ハーモニクセパレーター(HS)とバンドパスフィルター(BPF)を用いてSHG光成分のみを抽出した後、電子冷却光子カウンティング型光電子増倍管(PMT)によって検出される。

## 3. 結 果

### 3.1 SHG イメージング

採取した正常サンプル及び修復サンプルのSHGイメージングを行った。事前に、異なる測定深度のSHGイメージング(深さ分解SHGイメージング, サンプル表面から深さ250  $\mu\text{m}$ まで10  $\mu\text{m}$ 刻み)を行ったところ、コラーゲン線維構造の深さ依存は確認されなかったため、SHG光強度が高くイメージコントラストも良好な測定深度100  $\mu\text{m}$ (サンプル表面から深さ100  $\mu\text{m}$ )において、全てのサンプルのSHGイメージを取得し、比較を行った。また、入射光パワーは、対物レンズ出射直後に20 mWとなるように設定した。図3(a-1), (a-2), (a-3)は、コントロールとして3つの異なる個体から得られた正常サンプル[正常サンプル①, ②, ③]の大面積SHGイメージ(イメージサイズ = 1.6 mm  $\times$  1.6 mm, ピクセルサイズ = 1,024 pixel  $\times$  1,024 pixel)を示している。全ての正常サンプルにおいて、視野全体において高強度のSHG光強度が観測され、コラーゲンが腱長軸(紙面上下方向)に沿った規則正しい配向分布となっていることが確認出来る。図3(b)は、図3(a-1)における赤四角枠内を拡大したイメージを示している(イメージサイズ = 400  $\mu\text{m}$   $\times$  400  $\mu\text{m}$ , ピクセルサイズ = 256 pixel  $\times$  256 pixel)。拡大図から、腱組織に特徴的な波打ち構造を持っていることが確認出来る。このような特徴は、腱組織において一般的に観察される組織学的特徴とよく一致していることから、SHGイメージングを行うことで腱組織を非染色・非破壊で観察出来たと言える。

次に、修復サンプルのSHGイメージングを行った。術後4週が経過した修復サンプルでは、新たに産生された瘢痕組織により断裂部周辺が覆われていたため、これらの組織を除去した後SHGイメージングを行った。

図4(a-1), (a-2), (a-3)に、3つの異なる個体から得られた修復サンプル[修復サンプル①, ②, ③]の大面積SHGイメージ(イメージサイズ = 1.6 mm  $\times$  1.6 mm, ピクセルサイズ = 1,024 pixel  $\times$  1,024 pixel)を示す。測定条件は正常サンプルと同様である。図から、全ての修復サンプルにおいて、図3の正常サンプルと比較して、平均SHG光強度が18%の著しい低下を確認出来た。これは、コラーゲン濃度が低だけでなく、構造的に未熟な(低次

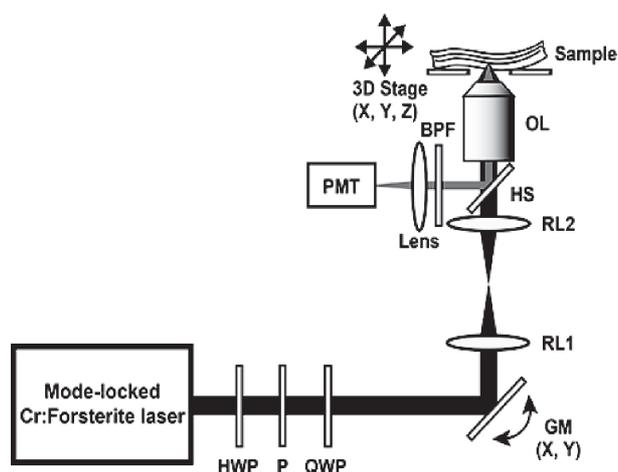


図2 実験セットアップ。HWP: $\lambda/2$ 板, P:偏光子, QWP: $\lambda/4$ 板, GM:ガルバノミラー, RL1とRL2:リレーレンズ, HS:ハーモニクセパレーター, OL:対物レンズ, BPF:バンドパスフィルター, PMT:光電子増倍管。

Fig. 2 Experimental setup. HWP: half-wave plate; P: polarizer; QWP: quarter-wave plate; GM: galvanometer mirror; RL1 and RL2: relay lenses; HS: harmonic separator; OL: objective lens; BPF: optical band-pass filter; PMT: photon-counting photomultiplier.

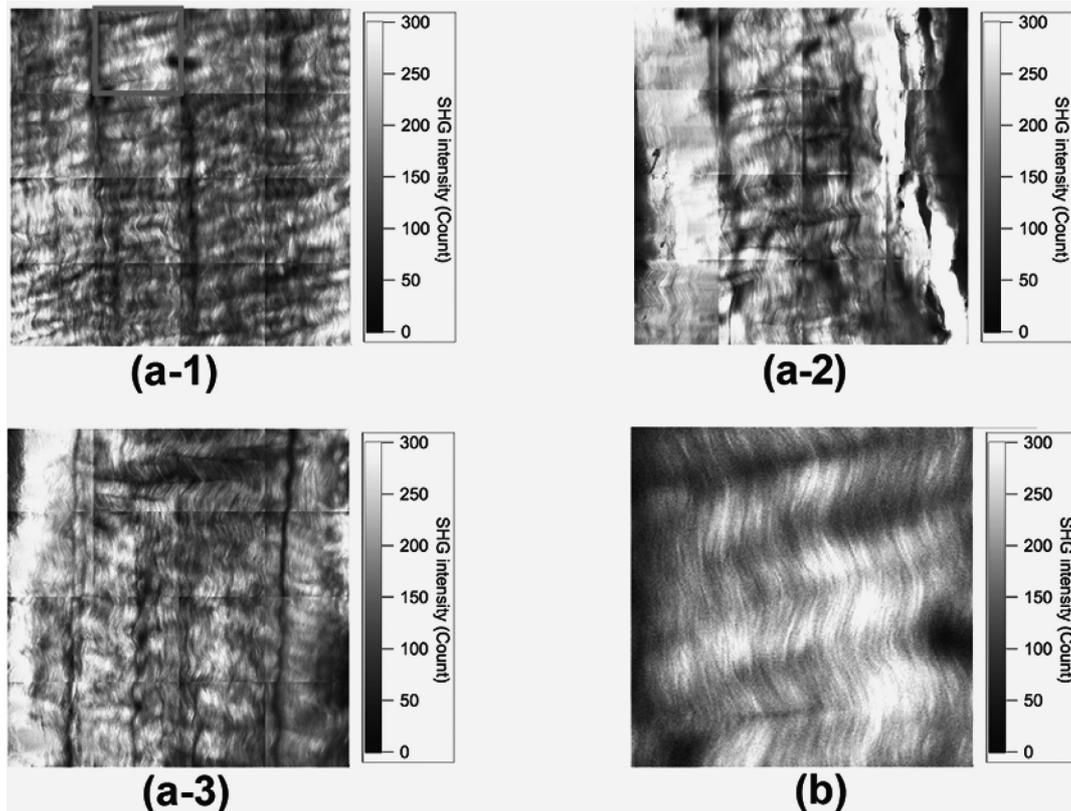


図3 (a) 3つの正常サンプル (正常①, ②, ③)における大面積 SHG イメージ (イメージサイズ = 1.6 mm × 1.6 mm, ピクセルサイズ = 1,024 pixel × 1,024 pixel). (b) (a-1)の赤枠領域の拡大図 (イメージサイズ = 400 μm × 400 μm, ピクセルサイズ = 256 pixel × 256 pixel).

Fig. 3 (a) Large-area SHG images of three normal samples (image size = 1.6 mm × 1.6 mm, pixel size = 1,024 pixel × 1,024 pixel). (b) Magnified image of the area enclosed in red box in (a-1) (image size is 400 μm × 400 μm, composed of 256 pixel × 256 pixel).

構造の) コラーゲンであるため, 個々のコラーゲン分子から発生した SHG 光がコラーゲンの規則的な階層構造によって増強されるプロセス [17] が不十分であったためであると考えられる.

修復サンプルにおけるコラーゲン線維構造を確認するため, イメージコントラストを調整したものを, 図 4 (b-1), (b-2), (b-3) に示す (イメージサイズ = 1.6 mm × 1.6 mm, ピクセルサイズ = 1,024 pixel × 1,024 pixel). また, 図 4 (b-1), (b-2), (b-3) の黄枠のイメージ領域を拡大したものを図 4 (c-1), (c-2), (c-3) に示す (イメージサイズ = 400 μm × 400 μm, ピクセルサイズ = 256 pixel × 256 pixel). 修復サンプルにおけるコラーゲン線維構造は, コラーゲンの配向が整っておらず, その濃度分布にもムラが見えており, 正常サンプルとは明らかに異なる構造を持っていることが, SHG イメージより確認出来た.

図 3 と図 4 の比較から, SHG 光強度及び SHG イメージにおいて, 正常サンプルと修復サンプルにおいて, 明確な差異を確認した. したがって, これらの SHG イメージから, 関連した定量的パラメータを抽出することにより, 腱修復度合いを定量的に評価することが可能になると考え

られる. しかし, SHG 光強度は, レーザー光源の強度揺らぎや生体組織の光学特性 (吸収, 散乱など) などの影響を受けやすく, 再現性の高い評価パラメータとは, 必ずしも言えない. そこで, SHG イメージの画像解析を用いることにより, SHG 光強度とは独立した評価パラメータの抽出を試みる.

### 3・2 2次元フーリエ変換 SHG イメージ

得られたそれぞれの SHG イメージに対して, 2D-FT を用いてパワースペクトルを取得し (2次元フーリエ変換 SHG イメージ), 腱修復の度合いに関連した定量情報を抽出することを検討する. 図 5 (a) に, 図 3 (b) の正常サンプルに関する 2次元フーリエ変換 SHG イメージ (2D-FT-SHG イメージ) を示す. 得られた 2D-FT-SHG イメージを  $r$ - $\theta$  座標系で見た際,  $r$  方向は空間周波数 (中心側ほど低空間周波数) を,  $\theta$  方向は角度を示す. その際に, 一方方向に規則正しく並んだコラーゲン線維構造では線維配向方向と垂直な方向に強い振幅を持ち, ランダムに並んだコラーゲン線維構造では円に近い形となると予想される. 図 5 (a) の正常サンプルでは, 波打つように配向したコラーゲン線維分布構造に対して, それぞれ直交した  $\theta$  方向に強

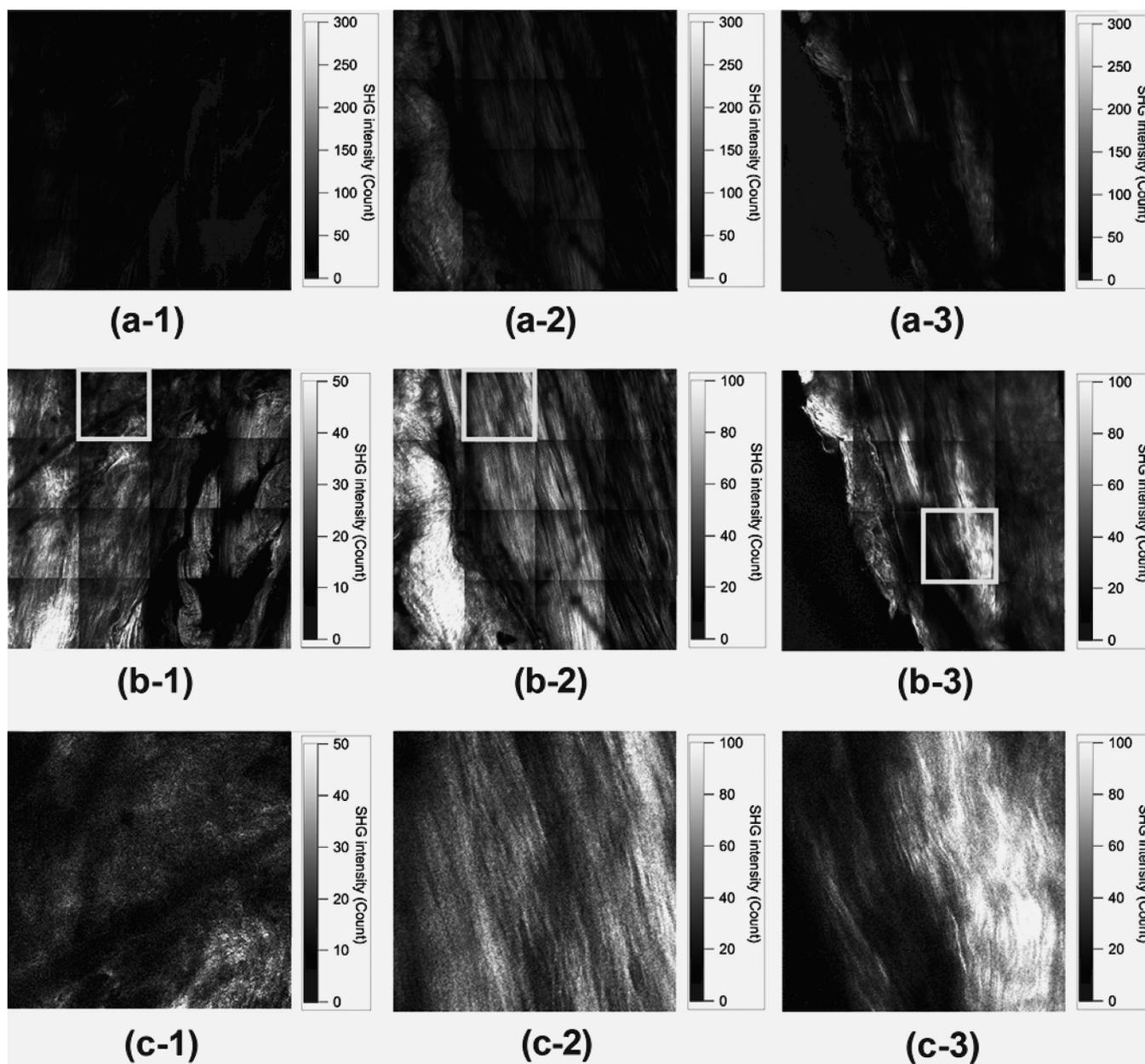


図4 3つの修復サンプル（修復サンプル①, ②, ③）の（a）コントラスト調整無し大面積 SHG イメージ（イメージサイズ = 1.6 mm × 1.6 mm, ピクセルサイズ = 1,024 pixel × 1,024 pixel）,（b）コントラスト調整有り大面積 SHG イメージ（イメージサイズ = 1.6 mm × 1.6 mm, ピクセルサイズ = 1,024 pixel × 1,024 pixel）,（c）（b）における黄枠領域の拡大図（イメージサイズ = 400 μm × 400 μm, ピクセルサイズ = 256 pixel × 256 pixel）.

**Fig. 4** (a) Large-area SHG images without contrast adjustment (image size = 1.6 mm × 1.6 mm, pixel size = 2,048 pixel × 2,048 pixel) of three healing sample. (b) Large-area SHG images with contrast adjustment (image size = 1.6 mm × 1.6 mm, pixel size = 1,024 pixel × 1,024 pixel). (c) Magnified SHG images with contrast adjustment [image size = 400 μm × 400 μm, pixel size = 256 pixel × 256 pixel, corresponding to the areas enclosed by yellow boxes in (b)] of three healing samples.

い振幅があることが確認出来る（×印を数十度回転させたような構造）。さらに、その $r$ 方向は極めて大きい空間周波数領域（ $286 \mu\text{m}^{-1}$ 程度）まで伸びていることが確認できる。これは、配向を持ったコラーゲン線維が、極めて密に存在していることを反映していると考えられる。

次に、図4(c-1), (c-2), (c-3)の修復サンプルに関する2D-FT-SHGイメージを、図5(b-1), (b-2), (b-3)に

示す。個体ごとに異なる形状の振幅分布になっていることが確認できる。図4(c-1)の修復サンプル①では、全体的にランダムなコラーゲン分布になっていることにより、図5(b-1)の2D-FT-SHGイメージでも空間周波数の分布がランダムとなり、円に近い形となっている。図4(c-2)の修復サンプル②では、順調な修復により、コラーゲン線維の配向性が向上した結果、図5(b-2)の2D-FT-SHGイメー

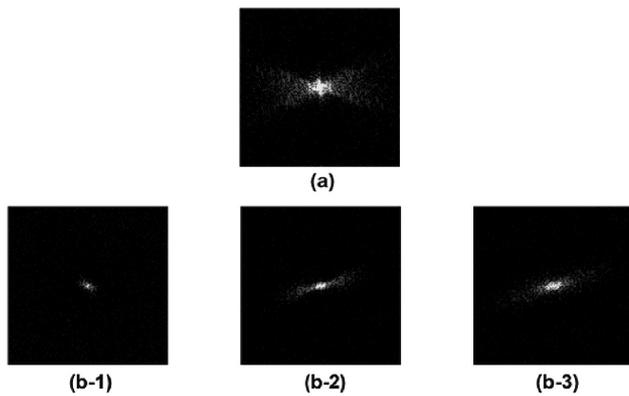


図 5 (a) 正常サンプル[図 3 (b)]の 2D-FT-SHG イメージ (イメージサイズ =  $400 \mu\text{m}^{-1} \times 400 \mu\text{m}^{-1}$ , ピクセルサイズ =  $256 \text{ pixel} \times 256 \text{ pixel}$ ). (b) 3つの修復サンプル [図 4 (c)]の 2D-FT-SHG イメージ (イメージサイズ =  $400 \mu\text{m}^{-1} \times 400 \mu\text{m}^{-1}$ , ピクセルサイズ =  $256 \text{ pixel} \times 256 \text{ pixel}$ ).

Fig. 5 (a) 2D-FT-SHG image of the normal sample shown in Fig. 3 (b) (image size =  $400 \mu\text{m}^{-1} \times 400 \mu\text{m}^{-1}$ , pixel size =  $256 \text{ pixel} \times 256 \text{ pixel}$ ). (b) 2D-FT-SHG images of three healing samples shown in Fig. 4 (c) (image size =  $400 \mu\text{m}^{-1} \times 400 \mu\text{m}^{-1}$ , pixel size =  $256 \text{ pixel} \times 256 \text{ pixel}$ ).

ジにおいて、単一方向にのみ配向している (一軸性) 線維と直交する方向に強い振幅が見られる。最後に図 4 (c-3) の修復サンプル③では、さらに順調な修復により、正常サンプルのような波打ち構造が形成された結果、図 5 (b-3) の 2D-FT-SHG イメージにおいて、線維に直交する方向のみならず、それに直交する方向にも空間周波数が分布し始めていると考えられる。しかし、修復サンプル②、③と正常サンプルの  $r$  最大値を比較すると、それぞれ 41.2%, 64.2% 程度の値となっており、正常サンプルの方が高い値を持っていることがわかる。これは、修復サンプルにおける配向したコラーゲン線維が組織全体においては分布しておらず、修復が進行した一部領域にのみ分布しているためであると考えられる。

このように、2D-FT-SHG イメージを用いると、正常サンプルと修復サンプルの違いのみならず、修復サンプル間でも修復度合いの違いを示すことができた。腱の修復過程では、損傷後に新たに産生されたコラーゲンが、ランダム配向から一軸性の配向となり、それが波打ち構造に変化することにより、正常な腱のコラーゲン分布に戻っていくと考えられる。今回の実験では、修復サンプルの修復具合の個体差及び部位差により、そのような一連の過程の形態変化を判別できていると考えられる。したがって、このような 2D-FT-SHG イメージから定量的情報を抽出すれば (例えば、 $\theta$  方向の  $r$  積算値を画像ごとに算出するなど)、腱修復における定量的パラメータの抽出が可能になると考えられる。

#### 4. 考 察

腱修復の評価は、組織学的修復と力学的修復の両視点から行う必要がある。これまでは染色法と引張試験がそれぞれ利用されてきた。しかし、これらの手法は、侵襲的あるいは破壊的手法であるため、修復過程を時系列で *in situ* モニタリングすることは、困難であった。一方、SHG 顕微鏡を用いると、非染色かつ低侵襲に組織コラーゲンを選択的に可視化できる。さらに、可視化されたコラーゲンが、腱組織における主要な細胞外マトリックスであるだけでなく、腱の力学特性を決定する上で重要な生体構造タンパク質であることを考慮すると、腱修復の新しい評価ツールとしての利用が期待できる。例えば、図 3 や図 4 に示した高コントラストな SHG イメージから、組織学的所見に基づいた組織学的修復の評価が可能である。一方、腱の力学特性は、コラーゲン線維の濃度分布・構造的成熟度 (高次構造)・配向特性に深く関連しているが、SHG 顕微鏡を用いると、SHG 光強度からコラーゲン濃度と構造的成熟度 (高次構造的性) を、また図 5 の 2D-FT-SHG イメージからコラーゲン配向特性を評価できる。したがって、これらのパラメータを総合的に評価することにより、組織学的修復のみならず、力学的修復も併せて、非染色かつ低侵襲に評価可能になることが期待される。今後は、SHG イメージングと染色法/引張試験との相関性を評価し、組織学的修復と力学的修復を非侵襲・非破壊に評価可能な光学的手法としての有用性を確認することが望まれる。

#### 5. お わ り に

本論文では、生体組織におけるコラーゲン線維を非破壊かつ低侵襲に可視化できる SHG 顕微鏡を用いて、ウサギ腱損傷モデルにおける正常腱および修復腱の SHG イメージングを行った。SHG イメージから、非染色かつ組織切片化することなく、腱断裂の組織学的修復をコラーゲン動態の観点から観察した。さらに、SHG イメージの 2 次元フーリエ変換により算出した 2D-FT-SHG イメージから、コラーゲン配向に基づいた腱の修復度合いを定量的に評価可能であることを示した。

本研究の最終目的は、これまで侵襲的・破壊的検査でしか評価できなかった腱修復評価方法を、低侵襲的 SHG 顕微鏡で代替できることを示すことである。今後は、SHG 顕微鏡に基づいた組織学的修復と力学的修復の定量的評価手法を確立すると共に、SHG 内視鏡に関する研究を進める予定である。最終的には、腱修復過程の *in vivo* 時系列モニタリングや、修復状態に応じた運動負荷の決定など、腱断裂の臨床医療に有用なツールとすることを目指す。

**利益相反** 日本生体医工学会の投稿規定の基準による開示すべき利益相反関係は無い。

謝辞 本研究の一部は、JSPS 科研費 26246031 及び 15K13384 の助成を受けたものである。

## 文 献

- Leppilahti J, Puranen J, Orava S: Incidence of Achilles tendon rupture. *Acta Orthop Scand.* **67** (3), pp. 277-279, 1996.
- Kastelica J, Galeski A, Bateria E: The multi composite structure of tendon. *Connect. Tissue Res.* **6** (1), pp. 11-23, 1978.
- Longo UG, Franceschi F, Ruzzini L, Rabitti C, Morini S, Maffulli N, Denaro V: Characteristics at haematoxylin and eosin staining of ruptures of the long head of the biceps tendon. *Br J Sports Med.* **43** (8), pp. 603-607, 2009.
- Cettia R, Jungea J, Vybergapages M: Spontaneous rupture of the Achilles tendon is preceded by widespread and bilateral tendon damage and ipsilateral inflammation: A clinical and histopathologic study of 60 patients. *Acta Orthop Scand.* **74** (1), pp. 78-84, 2003.
- Silfverskiöld KL, Andersson CH: Two new methods of tendon repair: An in vitro evaluation of tensile strength and gap formation. *J Hand Surg.* **18** (1), pp. 58-65, 1993.
- Schweitzer ME, Karasick D: MR Imaging of disorders of the Achilles tendon. *Am J Roentgenol.* **175** (3), pp. 613-625, 2000.
- Campagnola PJ, Dong CY: Second harmonic generation microscopy: principles and applications to disease diagnosis. *Laser Photon Rev.* **5** (1), pp. 13-26, 2011.
- Yasui T, Takahashi Y, Ito M, Fukushima S, Araki T: *Ex vivo* and *in vivo* second-harmonic-generation imaging of dermal collagen fiber in skin: comparison of imaging characteristics between mode-locked Cr:Forsterite and Ti:Sapphire lasers. *Appl Opt.* **48** (10), pp. D88-D95, 2009.
- Tan HY, Teng SW, Lo W, Lin WC, Lin SJ, Jee SH, Dong CY: Characterizing the thermally induced structural changes to intact porcine eye, part I: second harmonic generation imaging of cornea stroma. *J Biomed Opt.* **10** (5), pp. 054019, 2005.
- Zipfel WR, Williams RM, Christie R, Nikitin AY, Hyman BT, Webb WW: Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100** (12), pp. 7075-7080, 2003.
- Mansfield JC, Winlove CP, Moger J, Matcher SJ: Collagen fiber arrangement in normal and diseased cartilage studied by polarization sensitive nonlinear microscopy. *J Biomed Opt.* **13** (4), pp. 044020, 2008.
- Williams RM, Zipfel WR, Webb WW: Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils. *Biophys J.* **88** (2), pp. 1377-1386, 2005.
- Yasui T, Tanaka R, Hase E, Fukushima S, Araki T: In vivo time-lapse imaging of skin burn wound healing using second-harmonic generation microscopy. *Proc. SPIE* **8948**, pp. 89480B, 2014.
- Huland DM, Brown CM, Howard SS, Ouzounov DG, Pavlova I, Wang K, Rivera DR, Webb WW, Xu C: In vivo imaging of unstained tissues using long gradient index lens multiphoton endoscopic systems. *Biomed Opt Express.* **3** (5), pp. 1077-1085, 2012.
- Rao RA, Mehta MR, Toussaint KC Jr: Fourier transform-second-harmonic generation imaging of biological tissues. *Opt Express.* **17** (17), pp. 14534-14542, 2009.
- Warden SJ: Animal model for the study of tendinopathy. *Br J Sports Med.* **41** (4), pp.232-240, 2006.
- Hase E, Matsubara O, Minamikawa T, Sato K, Yasui T: *In situ* time-series monitoring of collagen fibers produced by standing-cultured osteoblasts using a second-harmonic-generation microscope. *Appl Opt.* **55** (12), pp. 3261-3267, 2016.

### 長谷 栄治 (ハセ エイジ)

2012年徳島大学工学部機械工学科卒業、現在、徳島大学大学院先端技術教育学部知的力学システム工学専攻機械創造システム工学コース博士後期課程にて非線形光学顕微鏡に関する研究に従事。

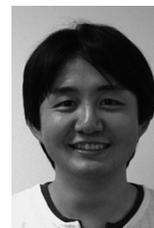
日本生体医工学学会、応用物理学会、日本光学会、Optical Society of America ほか各会員。



### 南川 丈夫 (ミナミカワ タケオ)

2006年大阪大学基礎工学部システム科学科機械科学コース卒業、2010年同大学大学院基礎工学研究科博士後期課程修了、博士(工学)。2011年日本学術振興会・特別研究員、2013年京都府立医科大学大学院医学研究科・助教、2015年徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部・特任講師、2016年同大学大学院理工学研究部・講師、現在に至る。生体光計測、顕微分光学に関する研究に従事。

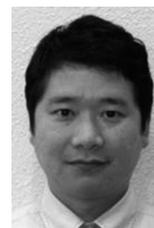
日本機械学会、応用物理学会、日本分光学会、レーザー学会、精密工学会、Optical Society of America 各会員。



### 佐藤 克也 (サトウ カツヤ)

2000年神戸大学工学部機械工学科卒業、2005年神戸大学大学院自然科学研究科博士後期課程終了、博士(工学)。2005年山口大学工学部機械工学科助手、2006年山口大学大学院医学系研究科助手、2007年山口大学大学院医学系研究科助教、2009年徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部講師、2016年徳島大学大学院理工学研究部講師、現在に至る。MEMSデバイスを用いた細胞バイオメカニクスに関する研究に従事。

日本生体医工学学会、日本機械学会、日本生物物理学会、日本福祉のまちづくり学会。



### 米倉 大介 (ヨネクラ ダイスケ)

1995年慶應義塾大学理工学部機械工学科卒業、2002年慶應義塾大学大学院理工学研究科機械工学専攻後期博士課程修了、博士(工学)。1999年徳島大学工学部助手、2003年リーズ大学研究員、2007年徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部准教授、2016年同大学院理工学研究部教授、現在に至る。表面処理及び材料強度に関する研究に従事。

日本機械学会、日本材料学会、表面技術協会各会員。



## 高橋 光彦 (タカハシ ミツヒコ)

1993 年徳島大学医学部医学科卒業。2003 年徳島大学医学部助手, 2005 年カリフォルニア大学サンディエゴ校研究員, 2011 年徳島大学大学院運動機能外科学講師, 2016 年徳島県立中央病院整形外科副部長, 現在に至る。博士 (医学), 整形外科学, リハビリテーション医学, 骨格筋に関する研究に従事。

日本整形外科学会 (専門医), 日本リハビリテーション医学会 (専門医), 日本リウマチ学会 (専門医), 日本創外固定骨延長学会 (幹事) など。



## 安井 武史 (ヤスイ タケシ)

1992 年徳島大学工学部機械工学科卒業, 1997 年同大学大学院工学研究科博士後期課程修了, 博士 (工学)。2013 年奈良県立医科大学・論文博士, 博士 (医学)。1997 年通産省工業技術院計量研究所・博士研究員, 1999 年大阪大学大学院基礎工学研究科・助手, 2010 年徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授, 2016 年同大学院理工研究部・教授, 現在に至る。非線形光学顕微鏡に関する研究に従事。

日本生体医工学会, 応用物理学会, 日本機械学会ほか各会員。

