

局所筋機能測定のための筋内挿入型プローブの開発

岡 久雄^{1,2)}, 枝松幹也³⁾, 渡辺彰吾⁴⁾, 北脇知己¹⁾

要 約

臨床においては、筋機能や機能不全を診断するために、表面筋電図や針筋電図、筋生検などが行われている。しかし、これらの方法では筋機能や筋収縮メカニズムを連続的に測定することは難しい。本研究では新たに筋内挿入型プローブと測定システムを開発した。測定プローブは光ファイバと6本の白金細線から構成されている。光ファイバを用いて筋の局所血流量と筋内圧力を測定し、6個の電極を用いて運動単位活動電位を測定した。プローブと測定システムの基礎特性を確認した後、麻酔下のラットの腓腹筋において、安静時および局所虚血時の活動電位、血流量、筋内圧力を測定した。また脛骨神経を電気刺激し、活動電位波形から伝播速度を算出したところ、プローブは正常に動作していることが確認できた。さらに筋小胞体からのカルシウム放出チャンネルを抑制する dantrolene を筋注すると、筋内圧力波形は大きく減少したが、活動電位波形はほとんど変化しないことがわかった。

キーワード：筋機能、筋内圧力、筋内血流、活動電位、筋収縮

はじめに

臨床的な筋疾患には、運動負荷に関連して発症する筋痛や、筋ジストロフィーに代表される筋原性疾患、重症筋無力症、筋萎縮生側索硬化症、ギランバレー症候群などの神経原性疾患がある。これらの筋疾患に共通する点は易疲労性、筋力の低下などが挙げられる¹⁾。

現在、筋疾患に対して行われる筋機能検査には、随意収縮時の活動電位を評価する針筋電図検査や、電気刺激を用いる誘発筋電図検査、末梢神経伝導検査などがある。針筋電図検査は、筋肉に導出針電極を刺入し、筋内の電気活動を記録する。一方、末梢神経伝導検査は末梢・運動神経を電氣的に興奮させ、その反応を筋肉や神経上から記録する。また、臨床研究も含めると、筋生検（バイオプシー）、筋損傷の生化学マーカー（ミオグロビン、CK（creatine kinase）、メチルヒスチジン、血沈等）、表面筋電図、筋張力測定などがある。さらに筋疲労に関しては、筋細胞内の pH、Na⁺、Ca²⁺、筋細胞膜外の K⁺、

乳酸等の測定が行われている²⁾。しかし、これらの測定では、筋生検や採血によって得た検体より測定する、痛みを伴う、筋収縮下での経時的に計測は行えない、等の様々な問題を持つ。また近年では、筋の機械的振動から起こる圧力波を測定する筋音図によって、運動単位レベルでの活動様式を分析する方法が報告されている³⁾。しかし、これはコンデンサマイクロフォンや加速度計によって体表面上で計測するものが多く、局所における筋線維レベルでの筋収縮特性を評価することは難しい。

本研究では、*in vivo*での詳細な筋収縮メカニズムを検討するために、運動単位活動電位（motor unit action potential: MUAP）、筋内の局所血流量、筋の収縮力を表す筋内圧力に着目し、これらを筋収縮下で同時計測できる新しい筋内挿入型プローブの開発を行った。まず、本プローブの基礎特性を確認した後、麻酔下のラットの腓腹筋において、本プローブを用いて安静時および局所虚血時の MUAP、筋血流量および筋内圧力を測定した。さらに、筋小胞

1) 岡山大学医学部保健学科検査技術科学専攻

2) 岡山大学医歯工学先端技術研究開発センター

3) 朝日インテック株式会社

4) 岡山大学大学院保健学研究科

体からの Ca^{2+} 放出を抑制する dantrolene を筋注したときの MUAP および筋内圧力を測定した。

方 法

1. 筋の収縮と活動電位

筋は骨格筋、心筋、平滑筋に分類される。身体のおよそ半分を占める骨格筋は意志によって収縮できるため、随意筋とも呼ばれる。図 1 に骨格筋の筋収縮メカニズムを示す。運動神経からのシグナルは運動終板まで達し、神経線維細胞内に Ca^{2+} が流入して、神経終末からアセチルコリンが放出される。アセチルコリンが筋線維膜上にある受容体に結合して微小終板電位が生じ、これが多数合わさることによって筋線維膜上に終板電位が発生する。この神経-筋接合部には 0.5~1 ms 程度のシナプス遅延がある。この終板電位が閾値に達する（脱分極）と筋線維の活動電位となって、膜上を伝播する。筋線維上を伝播する活動電位の伝播速度は、

$$\text{MUAP 伝播速度} = \sqrt{Ka/2Ri} \quad \dots\dots (1)$$

で表され、K は膜特性に依存する定数、 a は筋線維の直径、 Ri は固有抵抗であり、伝播速度が膜の電氣的性質に依存することがわかる⁴⁾。筋線維膜上を伝播した活動電位は、筋節ごとに線維内に深く陥入している横行小管（T管）内に入り込んで、T管に隣接する筋小胞体へと伝達される。この筋小胞体

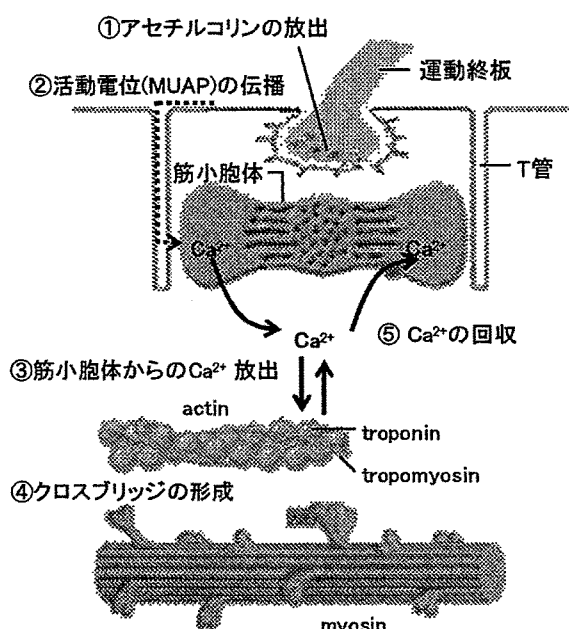


図 1 骨格筋の収縮メカニズム (Human Physiology (A. Vabder *et al.*, McGraw Hill, 2001), Fig. 11-16 を改変)

には T 管側に DHPR (dihydropyridine-receptor) と呼ばれる電位依存性の Ca^{2+} チャネルが存在し、電位変化を筋小胞体に伝える。そして筋小胞体内の Ca^{2+} は、RyR (ryanodine-receptor) と呼ばれる Ca^{2+} 濃度依存性のチャネルから Ca^{2+} を筋細胞質中に放出する⁵⁾。

遊離した Ca^{2+} がトロポニンと結合すると、アクチンとミオシンの結合部位の抑制がとれ、アクチンとミオシンはクロスブリッジする。さらに ATP の加水分解により、ミオシン頭部から無機リン酸が解離すると、フィラメント間の滑走が生じ、筋収縮が起こる。ミオシン頭部に新しい ATP が結合すると、アクチンとの架橋がとれ、次のアクチンとの結合の準備がなされる。筋の Ca^{2+} 濃度が低下すると筋は弛緩する。

筋小胞体からの Ca^{2+} 放出は、代謝産物や無機リン酸 (Pi)、 Ca^{2+} 、ATP、ADP、 H^+ 、 Mg^{2+} など種々の電解質濃度により影響を受けることが知られている⁶⁾。また筋の収縮と弛緩のいずれにおいても ATP がエネルギーを供給している点に注目する必要がある。すなわち、 Ca^{2+} が筋小胞体に取り込まれるのが抑制されると、活動電位が発生しなくても筋は弛緩しなくなる。一般に、このエネルギー供給は血液からの代謝によるところが大きく、筋収縮時には局所で筋細動脈の拡張が起こり、血液からグルコースや脂質、各種電解質等が大量に供給される。また酸素も供給されて筋組織の低酸素状態を回避し、さらに乳酸なども運び去られる。従って、局所虚血下（血液の枯渇）では、筋のエネルギー代謝に大きな影響、すなわち energy crisis が引き起こされ、筋細胞膜の機能状態は悪化し、クロスブリッジサイクルは十分に作用せず、活動電位の伝播速度が低下すると推測される。

2. 筋内挿入型プローブおよび計測システム

1) 筋内挿入型プローブ

筋内局所の筋機能状態を *in vivo* で評価するために、MUAP、血流量、筋内圧力を同時に測定できる、筋内挿入型プローブを開発した。図 2 (a) に開発したプローブの端面から見た構造を、同図 (b) に側面から見た構造を示す。また図 3 は完成したプローブの概観である。

MUAP を測定するために、図 2 (a) および図 3 (a) に示すように、直径 $50\mu\text{m}$ の白金細線を 3 本ずつ、2 列（電極 E1 ~ E6）に配置した。不関電極は別途設け、6 組の単極導出とした。電極間距離は最小

で $136.5\mu\text{m}$ 、最大で $756\mu\text{m}$ であり、測定の際は筋線維の走行方向にできるだけ沿った2組の電極を選択する。図3(c)に示すように、プローブのグリップ内には、白金電極のためのバッファ回路を設置して、インピーダンス変換を行っている。

筋血流量を測定するために、図2および図3(a)に示すように、直径 $370\mu\text{m}$ （コア径 $200\mu\text{m}$ ）のガラスファイバを配置した。局所の筋内圧力を測定するために、光ファイバ型圧力センサを配置した。図2

および図3(a)に示すように、光ファイバは外径 $520\mu\text{m}$ 、内径 $470\mu\text{m}$ のポリイミドチューブ内に挿入された。圧力センサはファブリ・ペロー干渉（Fabry-Perot-interference）を利用したもので、平行に配置した2つの完全鏡面内部（cavity）に単一モードレーザーを入れると、レーザー光の半波長の整数倍で定在波が生じる。この完全鏡面の一方を半透明鏡にして共振した波長のみを通過させ、cavityの距離変化、すなわち反射ダイヤフラム面

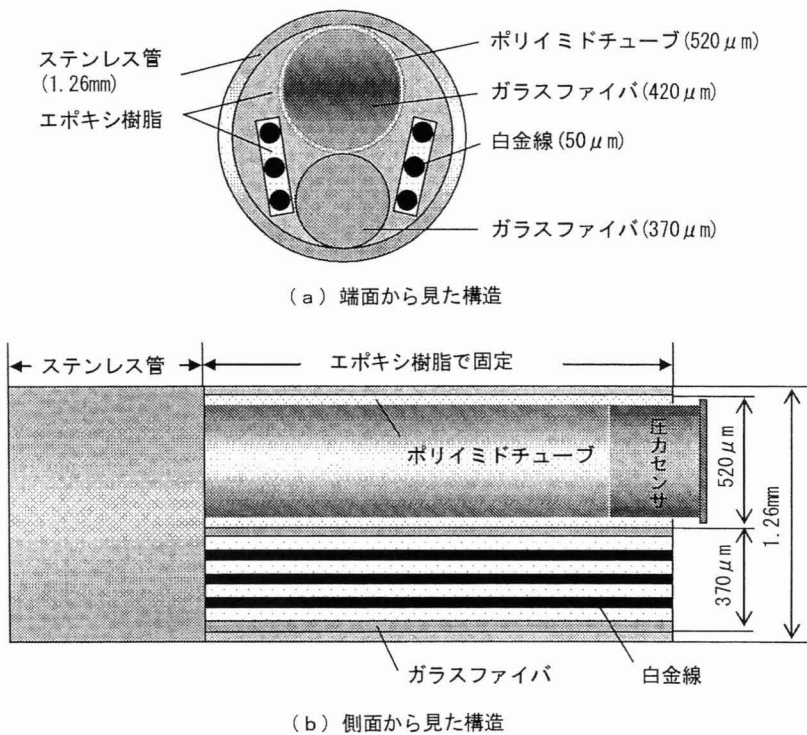


図2 筋内挿入型プローブの構造

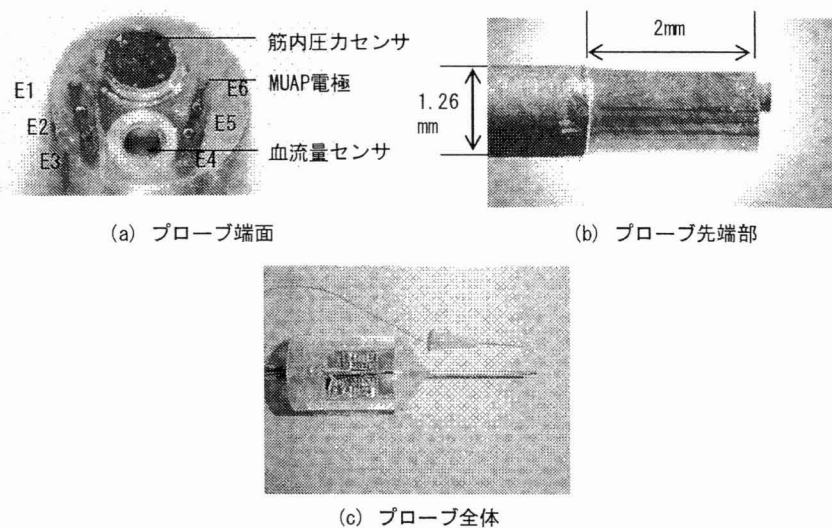


図3 筋内挿入型プローブの概観

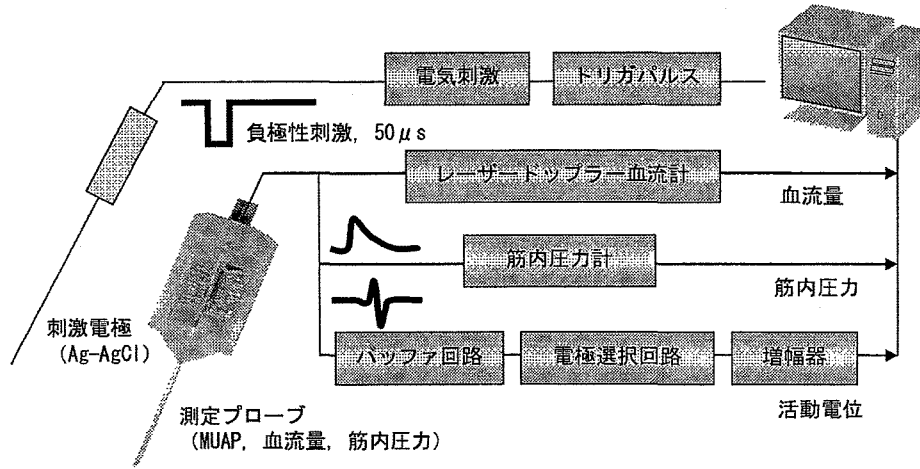


図4 筋内挿入型プローブを含む測定システム

の圧力変化を検出する。センサ先端のダイヤフラム面は、直径 $420\mu\text{m}$ 、連結された光ファイバは直径 $250\mu\text{m}$ である。

図2(b)および図3(b)に示すように、これらを直径 1.26mm のステンレス管の中に固定した。プローブ先端のステンレス管は長さ 4cm 、エポキシ樹脂で保護されたセンサ先端は約 2mm である。プローブ先端部は直接筋に触れる部分であるため、プローブの強度、生体適合性のほか、制作方法の容易性等を考慮して、エポキシ樹脂を選択した。

本プローブは筋内挿入型であるため、後に述べる実験に際しては、プローブのガイドとなる針と円筒管を予め筋内に挿入し、後から本プローブを挿入した。

2) 測定システム

筋内挿入型プローブを含む測定システムのブロック図を図4に示す⁷⁾。プローブに配置されたMUAPを測定するための白金電極のバッファ出力は電極選択回路を経て増幅される。血流量を測定するための光ファイバは、ドップラー血流計(DRT4, Moor Instruments)に接続されている。流量を測定するためにレーザードップラー法を用いたが、これはレーザーユニットから発生した、波長 780nm のレーザー光を、送光ファイバを通して組織内に入射させ、赤血球の運動速度に比例した周波数変調(ドップラーシフト)を受けた光が受光ファイバで検出器に導かれ、電気信号に変換される。得られた値は、微小サンプルボリューム内の組織血流量に対応する「Flux」値で表され、時定数 0.1s (可変)でsmoothing表示および出力される。

筋内圧力を測定するための光ファイバは、微小圧

力計(Samba 3000, Samba Sensors)に接続された。これら3つの信号は、16bitでA/D変換され、パーソナルコンピュータに入力され、MUAPの伝播速度や血流量、筋内圧力が算出される。

3. 実験方法

1) 筋内挿入型プローブの基礎特性

動物実験に先立ち、製作した筋内挿入型プローブと測定システムの基礎特性を確認する実験を行った。

(1) 微小電圧の測定

容器に入れた生理食塩水に振幅が $0.5\sim 4\text{mV}$ 、周波数が $10\sim 2000\text{Hz}$ の正弦波信号を印加し、本プローブの白金電極を用いて、その振幅や位相を10回測定して標準偏差を求めた。

(2) 流量の測定

本プローブの流量測定用のガラスファイバを用いて、流量が適切に測定できているかを検討した。タンクに内径 3mm のシリコンチューブを取り付け、懸濁液(バリトゲンHD, 伏見製薬)の定常流を発生させた。このときタンクの高さを調節して、定常流の速度を $3.14\sim 13.25\text{ml/s}$ まで変化させ、本ファイバと参照用ファイバ(直径 $500\mu\text{m}$ の市販プローブ)を用いて3回ずつ測定し、その平均値を比較した。

(3) 微小圧力の測定

プローブに挿入した圧力センサの特性を確認するため、パイプを用いて水柱圧実験を行った。水面を標準大気圧とし、 10cm 毎に静水圧を10回ずつ測定し、平均値と標準偏差を求めた。

2) 安静および局所虚血時の筋収縮

実験には6~15週齢、体重約150~300gのラットを用い、自律神経系麻酔薬であるinactin (T-133, Sigma)を腹腔投与後、腓腹筋を露出させ、また腓腹筋を支配する神経以外を切断し、さらに脊髄での反射を避けるために、脛骨神経上位側を結紮した。そして筋内挿入型プローブを腓腹筋内に約2mm挿入して、MUAP、筋血流量および筋内圧力を測定した。測定は麻酔下の安静時および膝窩動静脈と足首を結紮した局所虚血時で行った。またAg-AgCl電極を用いて、パルス幅50 μ s、単極負極性の矩形波で、約2秒間隔で繰り返し脛骨神経を電気刺激した。そしてMUAP波形をモニターしながら、できるだけ1個の運動単位あるいは単一筋線維のMUAP波形を記録できるよう、刺激電流の大きさを調節した。

プローブの6つの電極のうち、選択した2つからMUAP伝播速度を算出した。例えば、筋線維の走行方向に沿って選んだ電極がE1およびE3である場合、(2)式に示すように、その電極間距離を、それぞれの電極位置で得られたMUAPの位相差で除して、伝播速度を算出した。

$$\text{MUAP 伝播速度} = \frac{\text{E1-E3 の電極間距離}}{\text{E1-E3 波形の位相差}} \dots\dots (2)$$

なお、各電極で得られるMUAP波形にはそれぞれ類似性があり、かつ位相差が算出できることをリアルタイムで確認するため、2つのMUAP波形の相互相関関数を算出した。本法は2つの信号間の相互相関関数を計算し、そのピーク値を取る時間シフトから信号間の遅延時間を算出するものである⁷⁾。

3) Ca²⁺ 放出抑制時の筋収縮

前節と同様に、麻酔下のラットに対し、筋小胞体のRyRに作用してCa²⁺放出を抑制し、トロポニンとCa²⁺の結合を阻害して筋収縮を抑制するdantrolene (1.5mg/kg)を、腓腹筋に筋注投与した後、電気刺激したときのMUAPおよび筋内圧力を測定した。測定はdantrolene投与直後から15分後まで5分毎に行った。

実験結果および考察

1. 筋内挿入型プローブの基礎特性

プローブの白金電極による微小電圧の測定では、それぞれの印加電圧で10回測定を行ったところ、標準偏差を平均値で割った変動係数は平均して2.67%、0.5~4 mVにおいて印加電圧と検出電圧はほぼ比例し、1次関数近似による相関係数は0.999、直線性誤差は $\pm 0.182\%$ FS、また6本すべての電極において高い相関を得ることができた。また、いずれの電極においても位相遅れはなく、周波数特性も2000Hzまで十分であることを確認した。

プローブのコア径200 μ mのガラスファイバと参照用ファイバで測定されたFlux値に対し、1次関数近似による相関係数は0.986、直線性誤差は $\pm 0.565\%$ FSであった。これまでに開発したプローブでは直径500 μ mのプラスチックファイバを用いていたが⁷⁾、直径が半分以下のコア径200 μ mのガラスファイバでも十分に流量を測定できることが確認された。

さらに、プローブの圧力センサに対する水柱圧実験において、測定値の1次関数近似による相関係数は0.994、直線性誤差は $\pm 0.0544\%$ FSであり、十分に高い精度を得た。従って、製作した筋内挿入型プローブは、MUAP、血流量、筋内圧力を十分に測定できることが確認できた。表1に筋内挿入型プローブと測定システム全体の仕様をまとめる。

2. 安静および局所虚血時の筋収縮

図5(a)に、刺激電流値が78 μ Aのときの、安静時のMUAP波形(実線は電極E1、破線はE3)を示す(ラットは9週齢、240g)。この値以上の電流値では他の運動単位が興奮し、MUAP波形が二つ以上重畳した複合波になったので、78 μ Aが単一のMUAPを得られる最小電流値であることがわかる。MUAPのピークピーク値は約20mV、電気刺激からの遅延時間は約1.7msであった。すでに述べたように、神経-筋接合部で約1msのシナプス遅延があり、またMUAPの筋線維上の伝播を考慮する

表1 MUAP電極、流量センサ、微小圧力センサの仕様

	センサ直径	測定範囲	分解能	周波数特性	直線性誤差
MUAP電極	50 μ m	-0.5~0.5V	0.122mV	DC~2000Hz	$\pm 0.182\%$ FS
流量センサ(DRT4)	200 μ m	0~1000Flux	12bit	~1.59Hz(smooth)	$\pm 0.565\%$ FS
微小圧力センサ(Samba 3000)	420 μ m	-37.5~187.5mmHg	0.075mmHg	DC~3000Hz	$\pm 0.0544\%$ FS

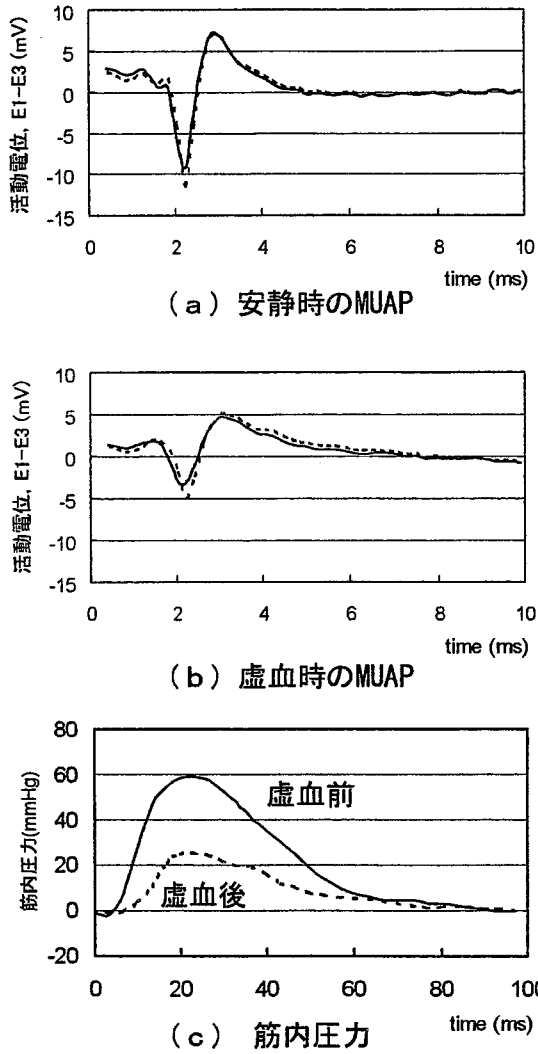


図5 安静時および虚血時の MUAP (実線は電極 E1, 破線は E3) および筋内圧力波形

と、1.7msの遅延時間は妥当な値であろう。同図(b)は虚血開始10分後の MUAP 波形である。電極は E1 と E3 で、電極間距離は273 μ mである。安静時の MUAP に比べ、ピークピーク値が約半分になっていることがわかる。同図(c)は安静時および虚血開始10分後の筋内圧力波形である。MUAP 遅延時間は約1.7msであったが、筋内圧力波形の遅延時間は約5 msで、かなり遅くなっている。また MUAP 波形の持続時間は約7 msであるのに対し、筋内圧力波形は約100ms 持続していることがわかる。これは個々の筋線維では MUAP が素早く脱分極-再分極するが、多数の筋線維が同期して筋収縮力を発揮・弛緩するためには時間を要するからと考えられる。また安静時に比べ、虚血時にはその最大値は半分以下に低下し、さらに筋収縮の速度(波形の傾き)も緩やかになることがわかる⁸⁾。

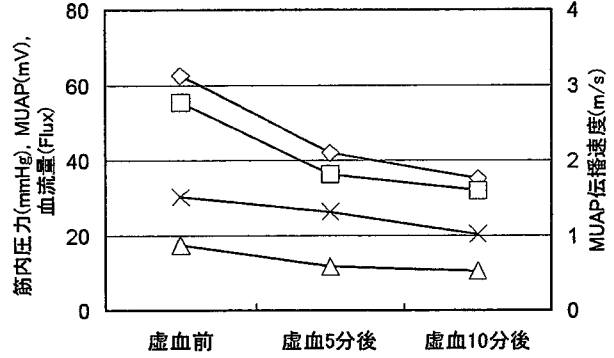


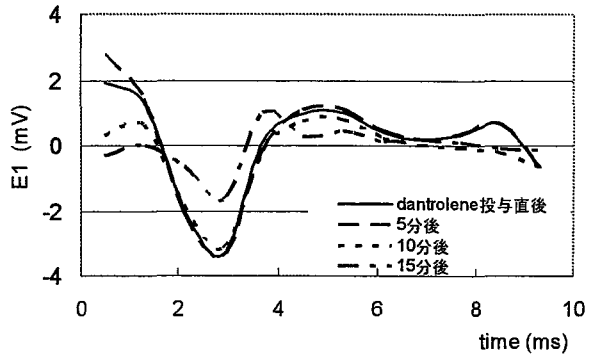
図6 虚血時の MUAP ピークピーク値 (Δ) および MUAP 伝播速度 (\square), 血流量 (\times), 筋内圧力 (\diamond) の変化

図6は、虚血前(安静時)、虚血開始5分後、10分後の MUAP のピークピーク値 (Δ), MUAP 伝播速度 (\square), 血流量 (\times), 筋内圧力 (\diamond) を示す(ラットは9週齢, 240g)。なお、筋内圧力の値は筋内圧力波形の最大値である。膝窩動静脈と足首を結紮しただけでは、例えば大腿動脈からの血液供給も残されているので完全な虚血状態を実現できないものの、徐々に虚血状態が進むに連れ、すべての値が小さくなっていくことがわかる。これは、2章でも述べたように、血液の代謝によるエネルギー供給割合は大きく、グルコースや脂質、各種電解質、酸素等を大量に供給し、乳酸などを運び去る。従って、局所虚血下では、energy crisisが生じ、活動電位のピークピーク値の低下や、筋細胞膜の機能状態が悪化することから(1)式で示したように、伝播速度が低下すると考えられる。さらにクロスブリッジも十分に形成されないため、筋の収縮力(筋内圧力)も低下すると考えられる^{9,10)}。

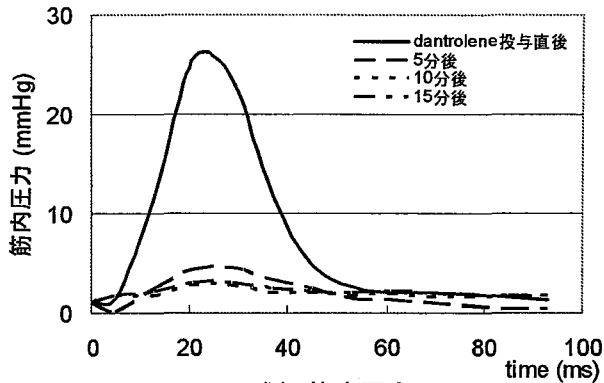
3. Ca^{2+} 放出抑制時の筋収縮

図7に dantrolene を投与したときの MUAP 波形と筋内圧力波形を示す(ラットは15週齢, 300g)。同図(a)は dantrolene 投与直後から15分後まで5分毎に測定した MUAP 波形であるが(—:直後, ---:5分後, \cdots :10分後, -·-:15分後), さほど大きくは変化していないことがわかる。すなわち、dantrolene は RyR 以外のレセプタには影響を及ぼさないことがわかっているため、MUAP は T 管に到達するまで正常に伝播していると考えられる。MUAP の振幅の差は dantrolene 投与によるイオン濃度の交換率、膜の透過性等が変化したためであろう^{11,12)}。

一方、同図(b)の筋内圧力波形では、投与直後は振



(a) MUAP



(b) 筋内圧力

図7 Ca²⁺ 放出抑制時の MUAP および筋内圧力波形

幅が大きいですが、その後は極端に小さくなり、ほとんど筋収縮が起こっていないことを推測させる。これは dantrolene 投与によって筋小胞体からの Ca²⁺ 放出が抑制されたことを示す。15分後以降でも筋内圧力波形が完全に消失していないのは、 dantrolene を投与して局所の Ca²⁺ 放出を抑制しても、周囲の筋線維は収縮しているため、筋内圧力波形が記録されたと推察される。

おわりに

本研究では、*in vivo*での局所筋収縮メカニズムを検討するために、MUAP、局所血流量、筋内圧力を同時計測できる、新しい筋内挿入型プローブの開発を行った。そして開発したプローブと測定システムの基礎特性を確認するとともに、麻酔下のラッ

トの腓腹筋において、安静時および虚血時の MUAP、局所血流量、筋内圧力を計測し、本プローブが、動物実験において正常に動作していることを確認した。さらに、筋小胞体からの Ca²⁺ 放出を抑制する dantrolene を筋注したときの MUAP および筋内圧力の変化を測定し、 dantrolene の Ca²⁺ 放出抑制効果を確認することができた。

開発した筋内挿入型プローブのステンレス管の外径は1.26mm であるが、今後はヒトにも適用できるよう、サイズを小さくしたい（例えば筋肉注射に使用する注射針21G（外径0.8mm））と考える。

文 献

- 1) 宮村実晴：最新運動生理学，39-55，真興交易：東京，1997.
- 2) 森谷敏夫，根元 勇：スポーツ生理学，88-100，朝倉書店：東京，1994.
- 3) Orizio, C.: Muscle sound: bases for the introduction of a mechanomyographic signal in muscle studies. Crit. Rev. Biomed. Eng., 21:201-243, 1993.
- 4) Bronzino, J.D. (ed.): Basic electrophysiology, The biomedical engineering handbook. 101-118, CRC PRESS: Connecticut, 1995.
- 5) 宮村実晴：新運動生理学(上巻)，227-239，真興交易：東京，2001.
- 6) 二宮石雄：スタンダード生理学，289-304，分光堂：東京，2002.
- 7) 岡 久雄，一色弘三，Öberg, P. Å.: 局所虚血下における筋機能計測のための筋内挿入型プローブの開発. 第18回バイオメカニズム・シンポジウム前刷，173-182, 2003.
- 8) 伊藤文雄：クローズアップ生理学，55-75，名古屋大学出版会：名古屋，1996.
- 9) 岡久雄，Öberg, P. Å., 枝松幹也：筋内プローブを用いた筋収縮メカニズムの解析. 信学技報 MBE2003, 29-32, 2004.
- 10) 岡 久雄，枝松幹也，渡辺彰吾，北脇知己：MUAP, 血流および圧力同時測定のための筋内挿入型センサの開発. 第25回バイオメカニズム学術講演会予稿集，99-100, 2004.
- 11) 枝松幹也，渡辺彰吾，北脇知己，岡 久雄：筋機能測定のための筋内挿入型プローブの開発. 第19回生体・生理工学シンポジウム，55-56, 2004.
- 12) Oka, H., Edamatsu, M., Isshiki, H. and Öberg, P. Å.: Development of an intramuscular probe for motor unit action potential, blood flow and intramuscular pressure measurements. APCMBE 2005, Tsukuba: Japan, PA-1-63, 2004.

Development of intramuscular probe for local muscle function

Hisao OKA^{1,2)}, Motonari EDAMATSU³⁾, Shogo WATANABE⁴⁾ and Tomoki KITAWAKI¹⁾

Abstract

In order to diagnose muscle function or dysfunction, surface/needle electromyograms, muscle biopsy, biochemical markers inspection, muscle tone, etc. are carried out. It is difficult to measure muscle function continuously by using these methods. In this study, an intramuscular probe and measurement system were developed. The probe is composed of optical fibers and six small platinum electrodes. The probe, the tip of which is protected by epoxy resin, is inserted in a cannula of 1.26mm in diameter. By using the fibers, the local blood flow in a muscle and the intramuscular pressure were measured. By using six electrodes (50 μ m in diameter), a motor unit action potential was measured. The time-course changes of the action potential, blood flow and intramuscular pressure were measured in the gastrocnemius muscle of rats under the resting and the local ischemia. The tibial nerve was stimulated electrically using the current of the unipolar and negative polarity with 50 μ s pulse duration every 2 seconds and the propagation velocity of the action potential was calculated from the potential waves. The animal tests using rats were carried out in order to verify the developed probe and system. Under the local ischemia, the action potential, the blood flow and the intramuscular pressure decreased and the propagation velocity became slower. When dantrolene sodium was injected, which inhibits the calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum, the intramuscular pressure decreased but the action potential wave was still detectable.

Key Words : muscle function, intramuscular pressure, intramuscular blood flow, action potential, muscle contraction

1) Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences, Okayama University Medical School

2) Research Center for Biomedical Engineering, Okayama University

3) Asahi Intecc Co., Ltd.

4) Graduate School of Health Sciences, Okayama University