産後1週目から8週目の母乳中葉酸濃度の経時的変化

三嶋 智之^{*1}, 中野 純子², 唐 沢 泉², 澤 田 未 緒²
伊 佐 保 香³, 柴 田 克 己⁴

(2013年8月26日受付; 2013年10月25日受理)

要旨: 本研究では母乳中の葉酸濃度の経時的変化について縦断的に調べた。25名の授乳婦より提供された産後1週目から8週目までの母乳中の葉酸濃度をバイオアッセイにより定量した。授乳婦の食事調査は行っていないため葉酸の摂取量は不明であった。本研究で分析した200検体の母乳中葉酸濃度は $54.2 \pm 31.9 \mu\text{g/L}$ (平均 $\pm$ 標準偏差), 中央値が46.6 (4.9-161.9) $\mu\text{g/L}$ であり, 被験者全体の葉酸濃度は5週目まで上昇し, 1週目と比較して3週目から8週目の各週では有意に高値を示した ($p < 0.05$)。また, 1週目の葉酸濃度の中央値にて2群に分けて解析を行ったところ, 高値群の母乳中葉酸濃度は低値群に対してすべての週において有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

キーワード: 母乳, 葉酸, 経時の変化, 縦断的研究, バイオアッセイ

葉酸は水溶性ビタミンの一つであり, 核酸の合成やDNAのメチル化に関与することから細胞分裂の際に重要な役割を果たしている。したがって葉酸が欠乏すると巨赤芽球性貧血や胎児の神経管閉鎖障害が惹き起こされる¹⁾。日本人の食事摂取基準 (2010年版) では, 成人・小児の推定平均必要量は血清中葉酸, 赤血球葉酸ならびに血漿ホモシステイン値の維持に必要な量を参考にして策定されている²⁾。一方, 乳児については生後しばらくの間, 母乳のみで正常に発育することから, 必要量は母乳の葉酸濃度と哺乳量から求められている。現在の食事摂取基準では0-5か月の乳児については40 $\mu\text{g/日}$ を目安量として設定しており²⁾, この策定においてすでに多くの報告から母乳中の葉酸濃度に関するデータが収集されている³⁾。

母乳中のいくつかの成分は徐々にその濃度が変化し, 特に授乳初期には大きく変化することが知られている。例えばタンパク質含量は初乳 (産後1週程度) から移行乳 (産後1-2週程度) を経て徐々に減少し, 成熟乳 (2週以降) では2分の1程度にまでなる⁴⁾。また, 亜鉛や銅などのミネラルも産後すぐと比較して数週間から数か月後には2分の1から10分の1程度に減少する⁴⁾。水溶性ビタミンについては, 井戸田ら⁵⁾が横断的な研究において, その濃度変化によっていくつかのパターンに分けられると報告している。その中で葉酸については初乳

から移行乳までに濃度は増加し, その後減少すると報告されている。しかし, その濃度の経時的変化について, 日本人の授乳婦個人を追跡した縦断的なデータを示した報告は無い。母乳中への葉酸の移行のメカニズムについては明らかではないが, 今村は母体血から母乳へ active な移行があると示唆している⁶⁾。また血中葉酸濃度については葉酸代謝関連遺伝子多型の影響を受ける⁷⁾ことから, 母乳中への分泌にも個人差があると考えられる。そこで初乳の母乳中葉酸濃度が低い (高い) 授乳婦の場合, その後の授乳期間を通じて低濃度 (高濃度) で推移すると推測した。本研究では濃度変化が大きいと考えられる出産後1-8週目までの母乳を対象として, 葉酸濃度の経時的変化について授乳婦個人の推移を縦断的に調べることを目的とした。

実験方法

1. 試 薬

Lactobacilli MRS Broth (継代用培地), Folic Acid Casei Medium (葉酸定量用培地) は三光純薬 (株), プロナーゼ MS (プロテアーゼ) は科研製薬 (株) より購入した。また葉酸 (プテロイルモノグルタミン酸) は和光純薬工業 (株) より, kidney acetone powder porcine (Type II) はSigma-Aldrich より, その他の試薬はナカライテスク (株) より購入した。

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: mishima@u-gifu-ms.ac.jp)

¹ 岐阜医療科学大学保健科学部臨床検査学科 (501-3892 岐阜県関市市平賀字長峰 795-1)

² 岐阜医療科学大学助産学専攻科 (501-3892 岐阜県関市市平賀字長峰 795-1)

³ 岐阜女子大学家政学部健康栄養学科 (501-2592 岐阜県岐阜市太郎丸 80)

⁴ 滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科 (522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500)

2. 母乳サンプルの収集と研究倫理

岐阜県内のクリニック（いずみレディースクリニック、ゆりレディースクリニック）および助産院（ゆりかご助産院、こうのとりの助産院）にて出産した女性に本研究の主旨を説明し、同意を得た上で母乳を提供いただいた。同意が得られた女性は 35 名であったが、産後 1 週間目から 8 週間目までの母乳が完全に提供できた授乳婦は 27 名であったため、その試料を測定対象とした。さらに測定した試料のうち、妊娠期間中から授乳 8 週間までサプリメントを継続して服用していた 2 名のデータは除外し、25 名分のデータについて解析した。このうち妊娠中にサプリメントを服用していた被験者は 12 名であったが、出産前に服用を中止しており、授乳期間の 8 週間までは葉酸を含むサプリメントを摂取していなかった。なお、本研究では葉酸を含むサプリメントの摂取期間についてアンケートにて回答を得たが、サプリメントの種類や摂取方法については調査していない。また食事調査を行っておらず、すべての被験者において葉酸摂取量が把握されていない。

母乳は授乳婦に採取日を指定し、自宅で授乳婦本人が午前中の授乳後に採取して、スピッツ管に保存した。母乳はすぐに冷凍庫で保存され、冷凍状態で郵送された試料を分析に供するまで -60°C に保存した。本実験はすべてヘルシンキ宣言、ヒトを対象とする医学的研究の倫理的原則の精神に則し、岐阜医療科学大学の研究倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 24）。

3. 母乳の処理方法⁸⁻¹⁰⁾

母乳はよく混合し、遠心分離 ($12,000 \times g$, 10 分間, 4°C) した中間層を分析に使用した。母乳 50 μL に 0.114 M アスコルビン酸を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.85) 390 μL を加え、よく混合したものをオートクレーブ処理 (121°C , 5 分間) した。その後、100 U/mL プロテアーゼ溶液 50 μL , kidney acetone powder より調製したコンジュガーゼ溶液 5 μL , 25 mg/mL システイン 5 μL を加え、 37°C で 20 時間インキュベートした。反応後、沸騰浴で 10 分間加熱したものを遠心分離 ($12,000 \times g$, 10 分間, 4°C) し、中間層を酵素処理サンプルとしてバイオアッセイによる葉酸定量に供した。

4. バイオアッセイによる葉酸定量方法⁸⁻¹⁰⁾

Lactobacillus casei (L. casei) ATCC27773 株を *Lactobacilli* MRS Broth に接種し、前培養 (22 時間, 37°C) した。それを遠心分離し ($3,000 \times g$, 5 分間, 室温)、得られた沈殿部分の菌体に滅菌生理食塩水加えて攪拌し、さらに遠心分離後 ($3,000 \times g$, 5 分間) 上清を取り除く操作を 5 回繰り返した。最終的に得られた菌体を 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ クロラムフェニコールを含む Folic Acid Casei Medium に懸濁した。培地 100 μL を 96 穴マイクロプレートに入れ、上記で得られた母乳の酵素処理サンプル 20 μL , 0.5% アスコルビン酸溶液 80 μL を加えた。 37°C で 22 時間培養した後、600 nm で濁度を測定した。

5. 統計処理

結果は中央値（範囲）で表した。1 週目から 8 週目までの母乳中葉酸濃度のデータについて Friedman 検定後、Sheffe 法による多重比較を行った。また 1 週目のデータの中央値 (21.4 $\mu\text{g}/\text{L}$) を基準として、被験者を低値群 ($<21.4 \mu\text{g}/\text{L}$) および高値群 ($\geq 21.4 \mu\text{g}/\text{L}$) の 2 群に分け、両群間の各週のデータについて Mann-Whitney の U 検定を行った。各検定結果について $p < 0.05$ にて有意と判定した。

結果と考察

被験者 25 名の年齢は 30.6 ± 3.8 歳、身長は 158.8 ± 4.8 cm、妊娠前の体重は 52.5 ± 8.3 kg であった（平均 $\pm$ 標準偏差）。妊娠中にサプリメントを服用していた被験者は 12 名（低値群に 5 名、高値群に 7 名）であった。

本研究で得られた産後 8 週間までのすべての検体 (200 検体) の母乳中葉酸濃度は、平均値が $54.2 \pm 31.9 \mu\text{g}/\text{L}$ （平均 $\pm$ 標準偏差）、中央値が 46.6 (4.9–161.9) $\mu\text{g}/\text{L}$ であった。現在の食事摂取基準 (2010 年版) では、乳児の葉酸摂取量は目安量として、男女とも 40 $\mu\text{g}/\text{日}$ (0–5 か月児) および 65 $\mu\text{g}/\text{日}$ (6–11 か月児) が設定されている²⁾。この値の根拠として使用された母乳中の葉酸濃度（平均 $\pm$ 標準偏差）に関する報告では 54 $\mu\text{g}/\text{L}$ ⁵⁾, $62 \pm 29 \mu\text{g}/\text{L}$ ¹¹⁾, $46 \pm 22 \mu\text{g}/\text{L}$ ⁸⁾ という値が示されており、本研究結果も同程度の値を示していた。

本研究では産後 8 週間 (56 日目) までの授乳婦を追跡し、母乳中葉酸濃度の経時的変化について縦断的に調べた。表 1 には産後 1 週目から 8 週間までの各週の母乳中葉酸濃度について中央値と範囲を示した。その結果、5 週目までに葉酸濃度は徐々に上昇し、それ以降は安定した。また 1 週目と比較して 3 週目以降では有意に高値を示していた ($p < 0.05$)。井戸田ら⁵⁾は 2,279 検体の母乳を分娩後日数によって分け、それらを等比混合した試料を分析した結果、葉酸の母乳中の濃度は初乳 (分娩後 3–5 日) から移行乳 (16–30 日) までは上昇し、さらにその後の成熟乳 (31–60 日) までは安定したと報告している。本研究の結果は井戸田らが行った横断的分析と同様の結果であった。次に表 1 に示すように、得られた結果を 1 週目の葉酸濃度の中央値 (21.4 $\mu\text{g}/\text{L}$) において低値群 ($<21.4 \mu\text{g}/\text{L}$)、高値群 ($\geq 21.4 \mu\text{g}/\text{L}$) の 2 群に分けた場合、低値群と高値群間には 1–8 週間まですべての週において有意な差が認められた。また図 1 (a), (b) には個人の葉酸濃度の経時的変化について示したが、初乳の葉酸濃度が低い (あるいは高い) 被験者の場合、その後も低濃度 (高濃度) で推移することが示された。これらのことから母乳中の葉酸濃度には授乳期間を通じて個人差があり、初乳の葉酸濃度を分析することによりその後の変化が推測できることが示唆された。

本研究で対象となった 25 名の授乳婦のうち 12 名は妊娠期間中に葉酸を含むサプリメントを摂取していたが、

表 1 母乳中葉酸濃度の変動

出産後の週	全被検者；n=25 ($\mu\text{g/L}$)	1 週目低値群 (<21.4)；n=12 ($\mu\text{g/L}$)	1 週目高値群 (≥ 21.4)；n=13 ($\mu\text{g/L}$)
1	21.4 (4.9-96.5) ^a	10.3 (4.9-19.2) ^{a,*}	28.3 (21.4-96.5) ^a
2	34.8 (13.7-15.1) ^{ab}	25.8 (13.7-35.6) ^{ab,*}	61.9 (22.9-115.1) ^a
3	40.6 (20.5-129.9) ^b	29.8 (20.5-45.2) ^{ab,*}	65.2 (31.3-129.9) ^{ab}
4	49.3 (20.6-141.8) ^b	34.1 (20.6-52.3) ^{ab,*}	76.1 (34.7-141.8) ^{ab}
5	57.1 (22.3-131.7) ^c	37.9 (22.3-57.4) ^{b,*}	84.4 (35.3-131.7) ^{bc}
6	60.2 (28.4-145.2) ^c	36.1 (28.4-60.3) ^{b,*}	85.3 (37.0-145.2) ^{bc}
7	55.6 (23.3-127.5) ^c	45.6 (23.3-65.7) ^{b,*}	76.2 (26.8-127.5) ^c
8	57.9 (25.8-161.9) ^{bc}	31.5 (25.8-61.4) ^{b,*}	81.6 (26.8-161.9) ^{bc}

データは中央値（範囲）で示した。低値群と高値群は1週目の母乳中葉酸濃度の中央値（21.4 $\mu\text{g/L}$ ）にて分けた。同グループ内（同一列）の各週のデータについて異なるアルファベットの表記は $p < 0.05$ にて有意差があることを示す（Scheffe の多重比較検定）。1 週目低値群（n=12）の各週の“*”は1 週目高値群（n=13）に対して $p < 0.05$ にて有意差があることを示す（Mann-Whitney の U 検定）。

図 1 母乳中葉酸濃度の経時的変化

1 週目の母乳中葉酸濃度が中央値未満 (<21.4 $\mu\text{g/L}$) を低値群 (a) とし、中央値以上 ($\geq 21.4 \mu\text{g/L}$) を高値群 (b) とした。低値群 (a) および高値群 (b) のすべての被験者の母乳中葉酸濃度について産後 1 週目から 8 週目までの経時的変化を示した。

1 週目の母乳葉酸濃度は摂取者で 21.6 (4.9-96.5) $\mu\text{g/L}$ 、非摂取者で 19.2 (9.0-76.1) $\mu\text{g/L}$ であり、同程度の値であった ($p=0.70$)。West *et al.*¹²⁾ は実験への参加前から葉酸サプリメントより 750 $\mu\text{g/日}$ および食事から 400 $\mu\text{g/日}$ の葉酸を継続して摂取している授乳婦では葉酸濃度が初乳時から高値を示したと報告している。サプリメントや食事からの葉酸の付加的摂取により、血清や赤血球中葉酸レベルは確かに上昇する¹²⁻¹⁴⁾ ことから、母乳中の葉酸濃度が葉酸摂取量の影響を受けると推測される。しかし近藤らの報告では、葉酸サプリメント摂取後の血清葉酸濃度は 2 時間後に最大となり、消失半減期は 6 時間と示されている¹⁵⁾。本研究で対象となった妊娠期間中に葉酸を含むサプリメントを摂取していた 12 名の授乳婦は少なくとも出産前（サンプルの採取 1 週間以上前）にはその摂取を中止しており、授乳期間中には服用していない。したがって本研究の授乳婦らの血清葉酸濃度は採取 1 週目にはベースラインまで戻っていたと推測される。また今回我々が示した結果は 8 週目までであり、これ以降の濃度の変化については調べていない。井戸田

ら⁵⁾ は成熟乳の葉酸濃度は 31-60 日までに安定した後、241-482 日までに徐々に減少したと報告しており、さらに Mackey & Picciano¹⁶⁾ も母乳中葉酸濃度が授乳 3 か月目よりも 6 か月目で減少したと報告している。それに対して Mackey & Picciano¹⁶⁾ は授乳婦がサプリメント (1 mg/日) を摂取することで、授乳 6 か月目の母乳中葉酸濃度の減少がみられないと報告している。このようにいくつかの研究の結果から、サプリメントなどから葉酸を付加的に摂取した場合、初乳や成熟乳において葉酸濃度が低値となることは抑えられると考えられる。その一方で West *et al.*¹²⁾ は授乳婦が多量の葉酸を摂取したとしても（食事：およそ 400 $\mu\text{g/日}$ ，サプリメント：750 $\mu\text{g/日}$ ），濃度が安定する 10-12 週目の母乳中の葉酸濃度がさらに高くなることはなかったと報告しており、母乳中への葉酸の分泌量には閾値が存在し、多量に摂取したとしても上限の上昇にはつながらないと推測される。また Houghton *et al.*¹⁷⁾ によれば、416 $\mu\text{g/日}$ の 5-methyltetrahydrofolate (5MTHF) もしくは 400 $\mu\text{g/日}$ の葉酸の摂取では母乳中の葉酸濃度や folate binding protein (FBP

量)に影響を与えないと報告されており, 摂取される葉酸の量によっても影響が異なると考えられる。

本研究では葉酸の摂取量は調べておらず, 母乳中濃度との関係は不明であるため, 母乳中葉酸濃度の変化や個人差の原因は明らかにできない。また母乳中の葉酸は5MTHF およびプテロイルグルタミン酸として遊離の状態が存在するもの¹²⁾と FBP に結合した状態で存在するもの¹⁷⁾¹⁸⁾があるが, それらの母乳中への移行(分泌)のメカニズムについてはよく分かっていない。これらのことから今後個人差の原因を明らかとするため, 葉酸摂取量や血中葉酸濃度との関連性や分泌のメカニズムについても明らかとする必要がある。

厚生労働省の妊婦への葉酸摂取の啓蒙に関する発表¹⁹⁾がされた2000年以降, 妊婦の葉酸摂取に関する認知度やサプリメントの摂取率も上昇している²⁰⁾。実際に, 葉酸の摂取により血中の葉酸濃度は確かに上昇し, 海外では神経管閉鎖障害児の出生率は低下している¹²⁾¹³⁾。このように妊娠期間中の葉酸摂取の重要性が知られるようになってきた一方で, 現在のところ授乳中に葉酸を付加的に摂取する女性は少ないと考えられる。実際, 本研究における授乳婦において葉酸の付加的な摂取者は少なかった(35名中3名)。しかし現在の食事摂取基準では授乳婦の葉酸摂取量に100 µg/日の付加量を推奨量として設定していること²⁾から, 今後は妊娠期から授乳期にかけて葉酸を含むサプリメント(または食品)が積極的に摂取されるようになる可能性が考えられる。したがって, 食生活の変化によって母乳中の葉酸濃度が変動し, 食事摂取基準の基礎となる数値が変化することも考えられるため, 今後も定期的にデータを得ていくことが重要である。

研究にご協力くださいました母乳提供者の皆様, いずみレディースクリニック, ゆりレディースクリニック, ゆりかご助産院, こうのとりの助産院, 岐阜大学早川享志教授ならびに山本紘平博士に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 山田和弘 (2010) 6. 葉酸: ビタミン総合辞典 (日本ビタミン学会編), p 292-7. 朝倉書店, 東京.
- 2) 第一出版編集部 (2009) 厚生労働省策定 日本人の食事摂取基準 (2010年版). 第一出版, 東京.
- 3) 柴田克己, 遠藤美佳, 山内麻衣子, 廣瀬潤子, 福渡努, 渡辺文雄, 渡邊敏明 (2010) 日本人の食事摂取基準 (2010年版) 決定の基礎とした母乳中の水溶性ビタミン含量. ビタミン **84**, 53-8.
- 4) 加藤英夫, 平山宗宏, 小林 昇 (編) (1983) VII 母乳の栄養学: 母乳哺育, p 231-313. メディサイエンス社, 東京.
- 5) 井戸田正, 菅原牧裕, 矢賀部隆史, 佐藤則文, 前田忠男 (1996) 最近の日本人乳組成に関する全国調査 (第十報) —水溶性ビタミン含量について—. 日本小児栄養消化器病学会雑誌 **10**, 11-20.
- 6) 今村昭一 (1981) 母体血および母乳における鉄・葉酸・ビタミン B₁₂ について. 日本産科婦人科学会雑誌 **33**, 1053-61.
- 7) 平岡真実, 影山光代, 百合本真弓, 金胎芳子, 矢富裕, 大川龍之介, 國枝 寛, 堀江修一, 香川靖雄 (2009) 葉酸代謝関連遺伝子多型に基づくテラーメイド栄養学—さかど葉酸プロジェクト—. ビタミン **83**, 264-74.
- 8) 柴田克己, 遠藤美佳, 山内麻衣子, 廣瀬潤子, 福渡努 (2009) 日本人の母乳中 (1-5 か月) の水溶性ビタミン含量の分布 (資料). 日本栄養・食糧学会誌 **62**, 179-84.
- 9) 渡邊敏明, 甘庶志帆乃, 榎原周平, 福井 徹 (2005) 微生物学的定量法および化学発光酵素免疫測定法による血清葉酸量の比較検討. 生物試料分析 **28**, 253-8.
- 10) 沖中 靖 (1984) 葉酸の定量法 1. 葉酸の微生物学的定量法. ビタミン **58**, 25-32.
- 11) Sakurai T, Furukawa M, Asoh M, Kanno T, Kojima T, Yonekubo A (2005) Fat-soluble and water-soluble vitamin contents of breast milk from Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol* **51**: 239-47.
- 12) West AA, Yan J, Perry CA, Jiang X, Malysheva OV, Caudill MA (2012) Folate-status response to a controlled folate intake in nonpregnant, pregnant, and lactating women. *Am J Clin Nutr* **96**: 789-800.
- 13) Yetley EA (2011) Monitoring folate status in population-based surveys. *Biofactors* **37**: 285-9.
- 14) Takimoto H, Hayashi F, Kusama K, Kato N, Yoshiike N, Toba M, Ishibashi T, Miyasaka N, Kubota T (2011) Elevated maternal serum folate in the third trimester and reduced fetal growth: a longitudinal study. *J Nutr Sci Vitaminol* **57**: 130-7.
- 15) 近藤厚生, 木村恭祐, 磯部安朗, 上平 修, 松浦治, 後藤百万, 岡井いくよ (2003) 二分脊椎症と葉酸: 葉酸経口摂取量と葉酸血清濃度. 日本泌尿器科学会雑誌 **94**, 551-9.
- 16) Mackey AD, Picciano MF (1999) Maternal folate status during extended lactation and the effect of supplemental folic acid. *Am J Clin Nutr* **69**: 285-92.
- 17) Houghton LA, Yang J, O'Connor DL (2009) Unmetabolized folic acid and total folate concentrations in breast milk are unaffected by low-dose folate supplements. *Am J Clin Nutr* **89**: 216-20.
- 18) O'Connor DL, Tamura T, Picciano MF (1991) Pteroylpolylglutamates in human milk. *Am J Clin Nutr* **53**: 930-4.
- 19) 神経管閉鎖障害の発症リスク低減のための妊娠可能な年齢の女性等に対する葉酸の摂取に係る適切な情報提供の推進について (2000年12月28日) 各都道府県・政令市・特別区母子保健主管部(局)長, 栄養主管部(局)長宛 (厚生省児童家庭局母子保健課長, 保健医療局地域保健・健康増進栄養課生活習慣病対策室長).
- 20) 近藤厚生, 岡井いくよ, 早川ちさ, 下須賀洋一 (2009) 神経管閉鎖障害の発生頻度を低減するために: 妊婦の葉酸認知率, 葉酸サプリメント摂取率, 食事からの葉酸摂取量 (2002-2007年). ビタミン **83**, 250-5.

J Jpn Soc Nutr Food Sci 67: 27–31 (2014)

Research Data

Temporal Changes in the Folate Content of Breast Milk Collected 1 to 8 Weeks Postpartum

Tomoyuki Mishima,^{*,1} Junko Nakano,² Izumi Karasawa,² Mio Sawada,²
Yasuka Isa,³ Katsumi Shibata⁴

(Received August 26, 2013; Accepted October 25, 2013)

Summary: In this longitudinal study, we examined temporal changes in total folate concentration in human breast milk. Breast milk samples were obtained from 25 healthy Japanese women every week up to the eighth week from the first week postpartum. We measured the total folate content of the milk samples by bioassay. Because a diet survey had not been conducted on these subjects, their total folate intake was unknown. The concentration of total folate in the 200 milk samples was 54.2 ± 31.9 $\mu\text{g/L}$ (mean $\pm$ SD) or 46.6 (median) (range 4.9–161.9) $\mu\text{g/L}$. The concentration increased between the first and fifth weeks. The total folate concentration in each sample from the third to eighth weeks was significantly higher than in the first week ($p < 0.05$). We also divided the subjects into two groups according to the median folate concentration in the first week. This revealed that the group with the higher folate concentration in the first week continued to have a significantly higher concentration than the other group throughout the entire study period ($p < 0.05$).

Key words: human breast milk, folate, temporal change, longitudinal study, bioassay

* Corresponding author (E-mail: mishima@u-gifu-ms.ac.jp)

¹ School of Health Science, Gifu University of Medical Science, 795-1 Nagamine Ichihiraga, Seki, Gifu 501-3892, Japan

² Postgraduate Midwifery Course, Gifu University of Medical Science, 795-1 Nagamine, Ichihiraga, Seki, Gifu 501-3892, Japan

³ Faculty of Home Economics, Gifu Women's University, 80 Taromaru, Gifu, Gifu 501-2592, Japan

⁴ School of Human Culture, The University of Shiga Prefecture, 2500 Hassaka-cho, Hikone, Shiga 522-8533, Japan