

原 著

マウスにおける妊娠後期の慢性ストレスは仔マウスの行動に影響を与える

藤原有子*¹ 上野浩司*²

要 約

妊娠中のストレスや感染は、統合失調症や注意欠陥多動性障害などの精神神経疾患の危険因子であることが知られている。しかしながら、妊娠中のストレスの程度やストレスを受ける時期によって出生児への影響がどのように変化するのかは明らかになっていない。本研究では、妊娠後期の雌マウスの慢性的なストレス負荷によって生まれてきた仔マウスの成熟後にどのような行動異常が生じるのかを一連の行動実験を実施して調べた。雌マウスは妊娠後期から出産するまで、毎日3度の身体的ストレスを受けた。出生した仔マウスの成熟後に様々な行動実験を行い、行動異常を明らかにした。その結果、妊娠中にストレスを受けた仔マウスはコントロールマウスと比較して身体的な特徴に明らかな違いはなかった。しかし、精神神経疾患様の行動異常（不安様行動の増加、活動量の増加、社会性の低下）を示した。これらの結果は、妊娠後期における母マウスの慢性的なストレスが仔マウスの神経心理発達に影響を与えることを示している。妊娠中の母親のストレスが精神神経疾患の発症危険因子として重要である可能性が示唆された。

1. 緒言

統合失調症や自閉症スペクトラム障害（ASD）などの精神神経疾患の原因として遺伝的要因と環境的要因が関係していると考えられているが、未だその病因は明確になっていない。近年、多くの疫学的研究が妊娠中のストレスが精神神経疾患の危険因子を大幅に増加させることを報告している。ヒトにおいて、小児期では妊娠中のストレスによって注意欠陥・多動性障害（ADHD）や ASD に関連した感情的問題、心理的問題、行動的問題が引き起こされるとされている^{1,3)}。さらに、成人期では、妊娠期のストレスは統合失調症やうつ病と関連があるとされている^{4,5)}。反対に、妊娠中のポジティブイベントや満足感は子孫が ADHD となる確率を低下させることがわかっている⁶⁾。すなわち、妊娠期間中のストレスによって生じた胎児脳への変化は数年後の精神神経疾患の出現という結果まで長く続く可能性がある。しかしながら、妊娠中のストレスによる胎児脳に生じる生物学的メカニズムは明らかにされていない。

い。妊娠中のストレスによる子供への行動や細胞への影響のメカニズムを解明するために、マウスやラットを使用した動物実験が行われてきた。妊娠中に心理的ストレス、免疫機能活性化などのストレスを動物実験モデルに負荷した場合、成熟した子孫は神経心理疾患の主な行動異常である、学習と記憶能力の低下、不安様行動などを示すことが報告されている⁷⁻⁹⁾。

脳では、正常な構造と機能の生成のための神経新生と分化が領域特異的、時間特異的に脳の神経発達期間中生じている。感受性の高い発達期の期間中、ストレスのような不利な影響は容易にエピジェネティックな変化を起こし、成人期の行動と機能に影響を与えることも報告されている¹⁰⁾。胎児期の皮質や海馬は急速に発達しており、過剰なストレスホルモンは感受性の高い脳領域において細胞喪失を引き起こす¹¹⁾。そのため、神経発達に障害が生じた場合、統合失調症や双極性障害を含む精神神経疾患が発症する成熟期まで、ストレスと環境的要因の影響が続

*1 川崎医療福祉大学 医療技術学部 健康体育学科

*2 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床検査学科

（連絡先）藤原有子 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学

E-mail : f-ari@mw.kawasaki-m.ac.jp

く可能性が示されている^{12,13)}。しかしながら、妊娠期間中にストレスを受ける時期と胎児脳の影響の関連性については明らかになっていない。妊娠中にストレスを受けた母親の子孫の全てが統合失調症などの精神神経疾患に罹患するわけではないことが知られている。

そこで我々は、雌マウスの妊娠後期に限定して慢性的な拘束ストレスを実施し、生まれてきた仔マウスが成熟後に精神疾患様の行動が増悪するか研究した。妊娠時のストレスによる影響を解析した先行研究では、特定の行動実験しか実施されていない場合が多く、そのため、示されている仔マウスの異常行動が身体的な異常によるものなのか、心理的な異常によるものなのかが明らかにされていない。そのため、我々は本研究において一連の行動実験を実施し、マウスの行動異常から混交的要因を排除した。本研究の目的は、妊娠後期における慢性的なストレスが生まれてきた仔マウスにどのような精神疾患様の行動異常を示すのかを明らかにすることである。本研究から得られる結果は、妊娠中の女性に対して適切な精神的サポート計画を立てることに役立つと考えた。

2. 方法

2.1 実験動物

すべての動物実験は、米国国立衛生研究所 (NIH) の実験動物の管理および使用のための指針 (NIH Publication No. 80-23, 1996年改訂) に従って行われ、川崎医療福祉大学、川崎医科大学 (17-088) によって承認された。妊娠した雌マウス C57BL/6N は Charles River Laboratories (神奈川, 日本) から購入した。妊娠中の雌マウスは、週に1回ケージを掃除することを除けば、妊娠14日目まで何れの処置もせず飼育した。

2.2 妊娠中のストレス

妊娠14日目にストレス負荷グループ (n=5) とコントロールグループ (n=5) に分けた。雌マウスには身体的ストレス、心理的ストレスを同時に与えるために広く使用されている拘束ストレスを負荷した^{14,15)}。ストレス負荷グループを妊娠14~20日目に毎日、午前8時、11時30分、午後3時からの1時間の間、直径3cmの透明なプラスチックシリンダーに入れて拘束ストレスを負荷した。拘束器具は先行研究を参考に作成した¹⁵⁾。コントロールグループには同時刻にマウスに触れる動作のみ行った。出生後には両グループとも何も処置を加えず、生まれてきた仔マウスは生後21日目に離乳し、性別によってケージを分けた。雄マウスのみ使用し、生後10週目に妊娠中に

ストレスを受けた母マウスから出生したマウス群 (ストレス群; n=10) と、何も処置を受けていない母マウスから生まれたマウス群 (コントロール群; n=10) を用いて実験を行った。先行研究を参考にし、各群が7匹以上となるようにした¹⁶⁻¹⁸⁾。

2.3 健康状態と前肢握力

マウスの体重、体温、ヒゲの有無など身体的な計測と観察を行った。握力の計測のために前肢の握力を測定した。マウスの尾を持ってぶら下げて前肢で金網を握らせ、ゆっくりと金網を放すまで引いた。前肢による最大の値をニュートン (cN) で表した。先行研究を参考に本試験を実施した¹⁶⁾。

2.4 高架式十字迷路試験

高架式十字迷路は2つのオープンアーム (8×25 cm) と透明な板で閉じられた2つのアームで構成されている。装置の高さは床から40cmである。各マウスを一方の閉じられたアームに向かって放し、10分間この十字の中を自由に動き回らせた。マウスの行動はビデオに記録し、オープンアームへの進入回数、滞在時間の割合、及び総移動距離を動画解析ソフトウェア (ANY-MAZE) を使用して分析した。先行研究を参考に本試験を実施した¹⁶⁾。

2.5 明暗選択箱試験

明暗選択箱は大きな箱 (60×60×40cm) を小さい開口部 (5×3cm) を持つ仕切りで2つに区切っている。片側は明るく (200lux)、もう一方は蓋をして暗くしてある。各マウスは暗い側に放ち、2つの領域の間を10分間、自由に動き回らせた。マウスの行動はビデオに記録した。明るい領域への進入回数、明るい領域の滞在時間、及び明るい領域の移動距離を動画解析ソフトウェア (ANY-MAZE) を使用して分析した。先行研究を参考に本試験を実施した¹⁶⁾。

2.6 オープンフィールド試験

オープンフィールド装置 (60×60×40cm) は何もない大きな箱である。この装置の中央に各マウスを放ち、2時間自由に動き回らせた。マウスの行動はビデオに記録した。装置の中心部 (20×20cm) の滞在時間、及び総移動距離を動画解析ソフトウェア (ANY-MAZE) を使用して分析した。先行研究を参考に本試験を実施した¹⁶⁾。

2.7 社会性試験

装置は3つの部屋から成り立っている。それぞれの部屋は20×60×40cmであり、部屋を区切る透明な板には小さい穴 (5×3cm) があり、マウスはこの穴を通して自由に3部屋を歩き来できる。各マウスをこの装置に10分間入れ、自由に探索して慣れさせた。

「社会性試験1」では、被験マウスと以前に接触したことがない成熟雄マウス(ストレンジャーマウス)をワイヤーケージ(7.5×7.5×10cm)で囲い、端の部屋の隅に置いた。もう一方の隅には空のワイヤーケージを置いた。被験マウスを中央の部屋に放ち、10分間のセッションの間自由に3部屋を探索させた。

「社会性試験2」では、最初の10分のセッションの時に空となっていたワイヤーケージ内に見知らぬマウスを入れた(ストレンジャーマウス)。このように被験マウスは、10分間のセッション中、最初に接したマウス(馴染みマウス)と新規の接触したことがないマウス(ストレンジャーマウス)との間で自由に探索させた。「社会性試験1」、「社会性試験2」とも、マウスの行動はビデオに記録した。動画解析ソフトウェア(ANY-MAZE)を使用して10分間のセッション中に各部屋で費やした時間、総移動距離を分析した。先行研究を参考に本試験を実施した¹⁶⁾。

2.8 行動試験の統計的解析

全ての結果は平均値±SEM(標準誤差)で示した。各データは統計処理ソフトSPSS(Ver.25)を用いて一元配置分散分析、2要因の分散分析(反復測定)、t検定を用いて解析を行った。分散分析後の事後比較としてt検定を使用した。0.05未満のp値($p<0.05$)を統計的に有意とした。

3. 結果

3.1 妊娠中のストレスが仔マウスの健康状態と握力に与える影響

妊娠中にストレスを受けた母マウスから出生した仔マウス群(ストレス群)とコントロール群の一般的な健康状態と神経学的特徴を比較した。毛並みと鬚の有無、及び神経学的反射は両群とも正常であった。ストレス群とコントロール群の間に体温と体重に有意な差はなかった(図1A, B)。前肢の握力に関しても群間に有意差はなかった(図1C)。

3.2 高架式十字迷路試験における妊娠中にストレスを受けた仔マウスの行動

高架式十字迷路試験では、コントロール群とストレス群の間で総移動距離に有意差はなかった(図2A)。ストレス群はコントロール群と比較してオープンアームへの進入回数が有意に少なかった(図2B)。オープンアームに費やされた時間の割合は、コントロール群とストレス群の間で有意差はなかった(図2C)。

3.3 明暗選択箱試験における妊娠中にストレスを受けた仔マウスの行動

ストレス群はコントロール群と比較して明るい領域での移動距離が有意に短かった(図2D)。明るい領域への進入回数に有意な差はなかった(図2E)。明るい領域での滞在時間は、コントロール群と比較してストレス群では有意に短かった(図2F)。

3.4 オープンフィールド試験における妊娠中にストレスを受けた仔マウスの行動

オープンフィールド試験では、コントロール群とストレス群の間で移動距離に有意差はなかった(図3A)。しかし、中心領域での滞在時間は、コントロール群と比較してストレス群の方が有意に低かった(図3B)。

3.5 社会性試験における妊娠中にストレスを受けた仔マウスの行動

「社会性試験1」においてコントロール群とストレス群の間に移動距離に有意な差はなかった(図4A)。コントロール群とストレス群はどちらもストレンジャーマウスが入っている部屋で長い時間を費やした(図4B)。

「社会性試験2」において、ストレス群はコントロール群と比較して総移動距離が有意に増加した(図4C)。コントロール群は馴染みマウスの部屋よりもストレンジャーマウスが入っている部屋で長い時間を費やしたが、ストレス群は馴染みマウスの部屋と

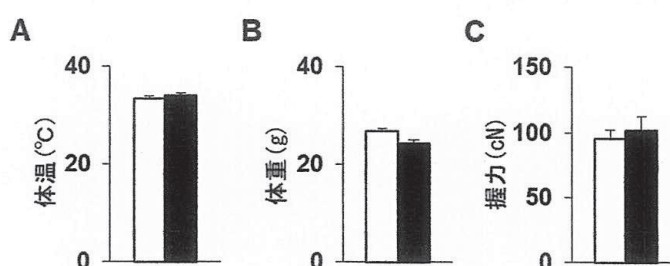


図1 マウスの健康状態と前肢握力

マウスの体温 (A), 体重 (B), 及び前肢握力 (C).

□: コントロール群, ■: ストレス群

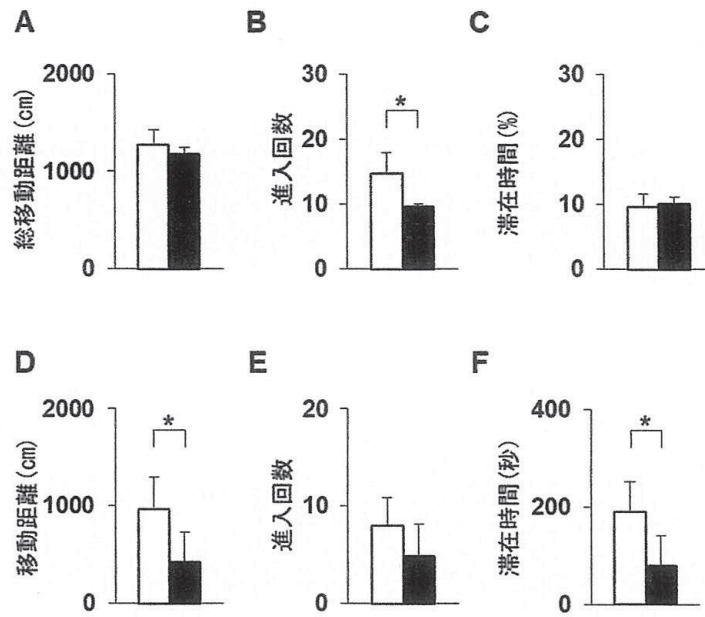


図2 高架式十字迷路試験と明暗選択箱試験

高架式十字迷路試験：総移動距離 (A), オープンアームの進入回数 (B), 及びオープンアームでの滞在時間の割合 (C).
 明暗選択箱試験：明るい領域での移動距離 (D), 明るい領域への進入回数 (E), 及び明るい領域での滞在時間 (F). * $p < 0.05$.
 □：コントロール群, ■：ストレス群

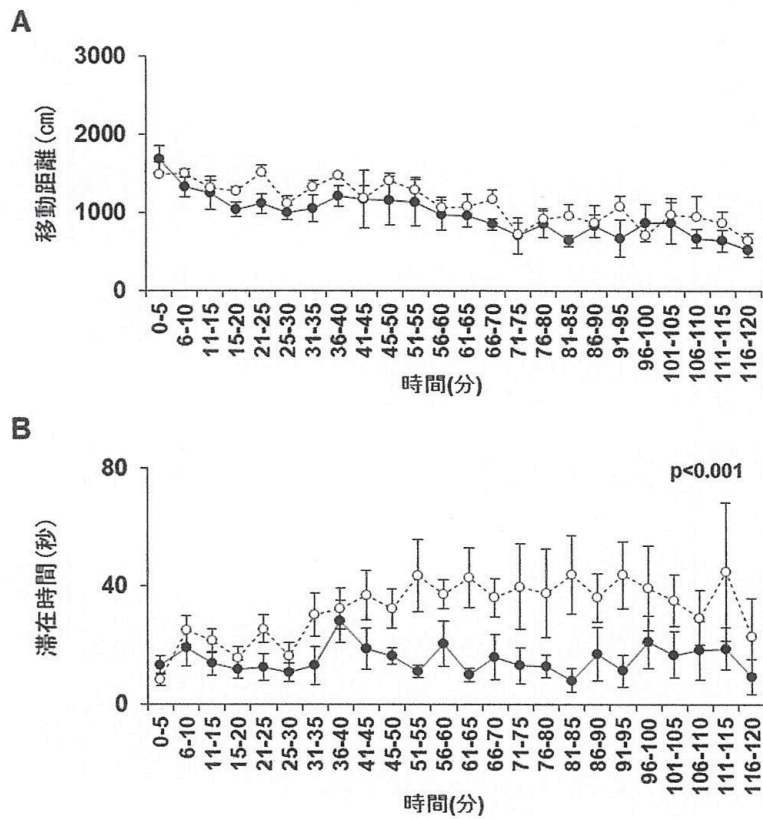


図3 オープンフィールド試験

オープンフィールドテスト：5分間ごとの移動距離 (A), および中心の滞在時間 (B).
 ○：コントロール群, ●：ストレス群

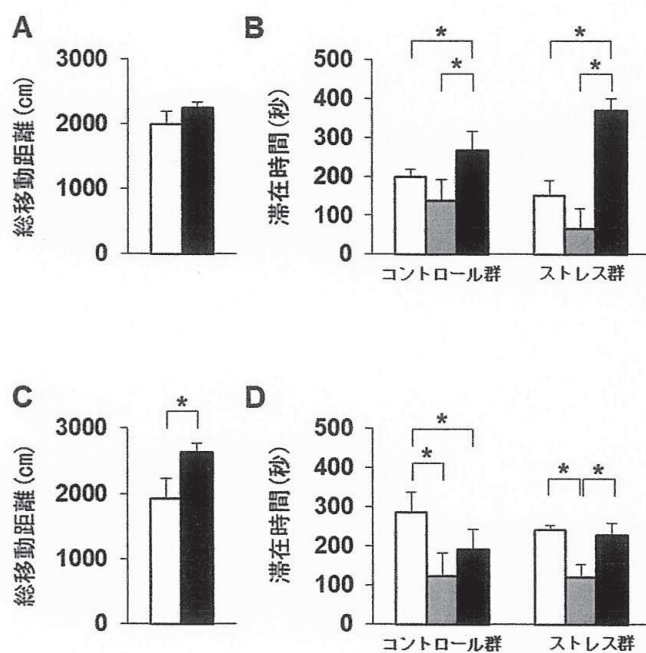


図4 社会性試験

社交性試験1：総移動距離 (A) および、各部屋での滞在時間 (B).

(A) □：コントロール群, ■：ストレス群, (B) □：空, ■：中央, ■：ストレンジャー

社交性試験2：総移動距離 (C) および、各部屋での滞在時間 (D).

(C) □：コントロール群, ■：ストレス群, (D) □：ストレンジャー, ■：中央, ■：馴染みマウス

*p<0.05.

ストレンジャーマウスがいる部屋での滞在時間に変化はなかった (図4D).

4. 考察

本研究において我々は妊娠後期におけるストレスが仔マウスの神経心理的発達に与える影響を一連の行動実験を実施して調査した。その結果、妊娠後期の慢性的なストレスは仔マウスの成熟後に不安様行動の異常、社会性行動の異常を示すことを発見した。また、コントロール群とストレス群の間に身体的違いは見られなかった。これらの結果は、妊娠後期におけるストレスは子孫の神経心理的発達に影響を与えることを示している。

妊娠中のストレスは統合失調症や ASD, ADHD, 双極性障害のリスクを増加させることを多くの研究が報告している^{19,20}。動物実験モデルでも妊娠中のストレスによってこれらの疾患に関する行動異常と解剖学的異常を示すことが報告されはじめて²¹。本研究では、妊娠後期の雌マウスに慢性的なストレスを負荷したが、体温、体重、握力にコントロール群とストレス群の間で有意な差はみられなかった。神経心理疾患の患者と健常者の間の身体的な明確な差が報告されていないことから、本結果は妥当なも

のだと考えられる。

本研究では、高架式十字迷路試験と明暗選択箱試験、オープンフィールド試験においてストレス群は不安様行動の増加を示した。妊娠12日から雌マウスにストレスを負荷した場合、本研究と同様に不安様行動が増加することが報告されている²²。これらの報告と本研究結果は妊娠雌マウスの後期にストレスを負荷された場合には仔マウスの不安様行動に影響を与えることを示している。

ストレス群は本研究の社会性試験において、社会的行動が減少した様子を示した。先行研究でも、ストレスを負荷された雌マウスの仔マウスの社会的行動が低下することが報告されている²²。また、妊娠後期にストレスを負荷すると社会的な機能の一端を担う前頭前皮質の抑制性ニューロンの発達が障害されることが示されている²³。さらに、妊娠後期にストレスを負荷された仔マウスの記憶機能が障害されることが報告されている²⁴。これらのことから、本研究で見られたストレス群の社会的行動の低下は妥当な結果であると考えられるが、それが他マウスへの関心の低下なのか、短期記憶の低下によるものなのかは不明である。これらを明らかにするにはさらなる研究が必要である。

本研究において、ストレス群は社会性試験において、活動性の増加を示した。妊娠前期にストレスを負荷した先行研究においても仔マウスは過活動を示すことが報告されており²⁵⁾、本結果は妥当な結果であると考えられる。これらの結果は妊娠期間中に雌マウスがストレスを受けた場合は、仔マウスの活動性に影響をあたえることを示唆している。

神経心理疾患の罹患リスク増加は、妊娠中の免疫機能活性化モデルでも見られることから、妊娠期間中のストレスモデルと共通したメカニズムが存在することが示唆される²⁶⁾。実際に、ヒトでは上昇した免疫機能活性化は神経心理疾患のリスクを増大させることが報告されている²⁷⁾。これらに共通したメカニズムの詳細は不明であるが、妊娠時期に母胎が受

けたストレスが胎児の神経発達に影響を与える可能性が高いことを本研究結果を含め実験動物を使用した研究は示している。

5. 結論

本研究において、我々は妊娠後期に慢性的にストレスを受けた母マウスから生まれた仔マウスは成熟後に精神疾患様の行動異常を示すことを報告した。これらの結果は、妊娠中のストレスが仔マウスの脳発達に影響を与え、マウスの成熟後も胎児期に受けた影響が中枢神経系に残っている可能性を示している。本研究結果は、妊娠中のストレスは出生児の神経心理疾患の発症に対するリスクファクターとして重要であることを示している。

謝 辞

本研究は平成29年度川崎医療福祉大学医療福祉研究費の助成により行われたものである。

利益相反 (COI)

なお、本研究は開示すべき利益相反 (COI) 関係にある企業等はない。

文 献

- 1) Kinney DK, Munir KM, Crowley DJ and Miller AM : Prenatal stress and risk for autism. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **32**(8), 1519-1532, 2008.
- 2) Grizenko N, Shayan YR, Polotskaia A, Ter-Stepanian M and Joobor R : Relation of maternal stress during pregnancy to symptom severity and response to treatment in children with ADHD. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, **33**(1), 10-16, 2008.
- 3) Li J, Olsen J, Vestergaard M and Obel C : Attention-deficit/hyperactivity disorder in the offspring following prenatal maternal bereavement: a nationwide follow-up study in Denmark. *European Child and Adolescent Psychiatry*, **19**(10), 747-753, 2010.
- 4) Watson JB, Mednick SA, Huttunen M and Wang X : Prenatal teratogens and the development of adult mental illness. *Development and Psychopathology*, **11**(3), 457-466, 1999.
- 5) van Os J and Selten JP : Prenatal exposure to maternal stress and subsequent schizophrenia: The May 1940 invasion of the Netherlands. *The British Journal of Psychiatry*, **172**, 324-326, 1998.
- 6) Lee CY, Chang YY and Lung FW : The marriage-related risk factors during maternal pregnancy in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Child: Care, Health and Development*, **32**(2), 205-211, 2006.
- 7) Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Huang H, Oishi K, Mori S, Smee DF, Pearce DA, Winter C, Sohr R and Juckel G : Maternal infection leads to abnormal gene regulation and brain atrophy in mouse offspring: implications for genesis of neurodevelopmental disorders. *Schizophrenia Research*, **99**(1-3), 56-70, 2008.
- 8) Zuckerman L and Weiner I : Maternal immune activation leads to behavioral and pharmacological changes in the adult offspring. *Journal of Psychiatric Research*, **39**(3), 311-323, 2005.
- 9) Coe CL, Kramer M, Czéh B, Gould E, Reeves AJ, Kirschbaum C and Fuchs E : Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys. *Biological Psychiatry*, **54**(10), 1025-1034, 2003.
- 10) Fenoglio KA, Brunson KL and Baram TZ : Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: Functional and molecular aspects. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **27**(2), 180-192, 2006.
- 11) Van den Hove DL, Steinbusch HW, Scheepens A, Van de Berg WD, Kooiman LA, Boosten BJ, Prickaerts J and Blanco CE : Prenatal stress and neonatal rat brain development. *Neuroscience*, **137**(1), 145-155, 2006.
- 12) Lewis DA and Levitt P : Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annual Review of Neuroscience*, **25**, 409-432, 2002.

- 13) Barker DJ : The developmental origins of adult disease. *European Journal of Epidemiology*, **18**(8), 733-736, 2003.
- 14) Belnoue L, Grosjean N, Ladevèze E, Abrous DN and Koehl M : Prenatal stress inhibits hippocampal neurogenesis but spares olfactory bulb neurogenesis. *PLoS One*, **8**(8), e72972, 2013.
- 15) Miyagawa K, Tsuji M, Ishii D, Takeda K and Takeda H : Prenatal stress induces vulnerability to stress together with the disruption of central serotonin neurons in mice. *Behavioural Brain Research*, **277**, 228-236, 2015.
- 16) Shoji H, Toyama K, Takamiya Y, Wakana S, Gondo Y and Miyakawa T : Comprehensive behavioral analysis of ENU-induced Discl-Q31L and -L100P mutant mice. *BMC Research Notes*, **5**, 108, 2012.
- 17) Bronson SL and Bale TL : Prenatal stress-induced increases in placental inflammation and offspring hyperactivity are male-specific and ameliorated by maternal antiinflammatory treatment. *Endocrinology*, **155**(7), 2635-2646, 2014.
- 18) Ślusarczyk J, Trojan E, Głombik K, Budziszewska B, Kubera M, Lasoń W, Popiołek-Barczyk K, Mika J, Wędzony K and Basta-Kaim A : Prenatal stress is a vulnerability factor for altered morphology and biological activity of microglia cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **9**, 82, 2015.
- 19) Green MK, Rani CS, Joshi A, Soto-Piña AE, Martinez PA, Frazer A, Strong R and Morilak DA : Prenatal stress induces long term stress vulnerability, compromising stress response systems in the brain and impairing extinction of conditioned fear after adult stress. *Neuroscience*, **192**, 438-451, 2011.
- 20) Koenen KC, Moffitt TE, Poulton R, Martin J and Caspi A : Early childhood factors associated with the development of post-traumatic stress disorder: results from a longitudinal birth cohort. *Psychological Medicine*, **37**(2), 181-192, 2007.
- 21) Weinstock M : Sex-dependent changes induced by prenatal stress in cortical and hippocampal morphology and behaviour in rats: An update. *Stress*, **14**(6), 604-613, 2011.
- 22) Lussier SJ and Stevens HE : Delays in GABAergic interneuron development and behavioral inhibition after prenatal stress. *Developmental Neurobiology*, **76**(10), 1078-1091, 2016.
- 23) Uchida T, Furukawa T, Iwata S, Yanagawa Y and Fukuda A : Selective loss of parvalbumin-positive GABAergic interneurons in the cerebral cortex of maternally stressed Gad1-heterozygous mouse offspring. *Translational Psychiatry*, **4**, e371, 2014.
- 24) Negrón-Oyarzo I, Neira D, Espinosa N, Fuentealba P and Aboitiz F : Prenatal stress produces persistence of remote memory and disrupts functional connectivity in the hippocampal-prefrontal cortex axis. *Cerebral Cortex*, **25**(9), 3132-3143, 2015.
- 25) Bronson SL and Bale TL : Prenatal stress-induced increases in placental inflammation and offspring hyperactivity are male-specific and ameliorated by maternal antiinflammatory treatment. *Endocrinology*, **155**(7), 2635-2646, 2014.
- 26) Howerton CL and Bale TL : Prenatal programming: at the intersection of maternal stress and immune activation. *Hormones and Behavior*, **62**(3), 237-242, 2012.
- 27) Fineberg AM and Ellum LM : Inflammatory cytokines and neurological and neurocognitive alterations in the course of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, **73**(10), 951-966, 2013.

(令和元年6月20日受理)

Relationship between Prenatal Stress and Abnormal Behaviors of Mice Offspring

Yuko FUJIWARA and Hiroshi UENO

(Accepted Jun. 20, 2019)

Key words : maternal stress, mouse, abnormal behavior, offspring

Abstract

Stress and infection during pregnancy are known to be a risk factor for neuropsychiatric disorders such as schizophrenia and attention-deficit hyperactivity disorder. However, it has not been clarified how the influence on a fetus will change by the degree of stress or the period when a mother receives stress during pregnancy. In this study, we examined what behavioral abnormalities occur after offspring mice born from chronically stressed female mice in late pregnancy matured. Female mice received physical stress three times daily from late pregnancy to delivery. After newborn mice matured, we conducted various behavioral experiments to clarify behavioral abnormalities. As a result, the offspring mice born from stressed mice during pregnancy had no significant difference in physical characteristics compared to control mice. The offspring mice had been stressed who during pregnancy showed behavioral abnormalities like neuropsychiatric disorder; increased anxiety - like behavior, increased activity level or decreased sociality. These results indicate that the chronic stress of the female mice in the late pregnancy affects the neuropsychological development of the offspring. This suggests that stress of mothers during pregnancy may be an important risk factor for the development of neuropsychiatric disorders.

Correspondence to : Yuko FUJIWARA

Department of Health and Sports Science
Faculty of Health Science and Technology
Kawasaki University of Medical Welfare
Kurashiki, 701-0193, Japan

E-mail : f-ari@mw.kawasaki-m.ac.jp

(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.29, No.1, 2019 91 – 98)