

資 料

岐阜県におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症届出菌株の カルバペネム耐性機序の解析 (2018-2020 年)

野田万希子, 越 勝男, 鈴木崇稔, 古田綾子, 門倉由紀子*, 林 佐代子**, 亀山芳彦

要 旨

2018年から2020年に岐阜県内の保健所(岐阜市保健所を含む)へ報告されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)感染症60例のうち,搬入があった58株のカルバペネム耐性機序の解析を行った。カルバペネマーゼ産生株(CPE)の割合は,2018年が10.5%,2019年が34.8%,2020年が12.5%であり,2019年は顕著に高かった。カルバペネマーゼの種類は,前回(2015~2017年)の解析でも優勢に検出されたIMP型が12株中6株(50.0%)であったが,NDM型が3株,IMI型が2株,いずれにも該当しないタイプ(FRI型)が1株検出され,検出されるカルバペネマーゼの多様化が認められた。さらに,2015年以降にCREとして搬入のあった*Escherichia coli* 8株についてPCRによるO群別,PFGE解析,MLST解析を実施したところ,NDM型のCPEであった3株のうち2株が近縁の株であった。

キーワード:カルバペネム耐性腸内細菌目細菌,薬剤耐性遺伝子,カルバペネマーゼ, β -ラクタマーゼ

1 はじめに

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)感染症は,イミペネムやメロペネム等のカルバペネム系薬剤および広域 β -ラクタム剤に対して耐性を示す腸内細菌目細菌(2016年に腸内細菌科(*Enterobacteriaceae*)に属していた一部の菌種が異なる科に移籍した¹⁾ため,腸内細菌目(*Enterobacteriales*)の階層まで格上げされた²⁾による感染症であり,2014年に感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(感染症法)において5類全数把握疾患に指定された。地域における薬剤耐性菌の流行状況を把握するため,地方衛生研究所で当該耐性菌に係る詳細な解析の実施等を求める厚生労働省課長通知³⁾が2017年に発出され,薬剤耐性菌の解析が全国的に実施されることとなった。

CREのカルバペネム耐性機序の中で重要となるのは,カルバペネム系薬剤の分解酵素であるカルバペネマーゼであり,このカルバペネマーゼを産生する腸内細菌目細菌をcarbapenemase-producing *Enterobacteriales*(CPE)と呼ぶ。CPEが持つカルバペネマーゼ遺伝子はプラスミド上に存在することが多く,カルバペネム耐性を示さない他の腸内細菌目細菌に伝達されその細菌を耐性化させ得ることから,菌種を超えてカルバペネム耐性が拡散することが危惧されている。カルバペ

ネマーゼの種類と分布には特徴があり,本邦ではIMP型のメタロ- β -ラクタマーゼ(MBL)が優勢であるが,インドで初めて発見されたNDM型MBL産生株が国内でも増加傾向にあることが明らかとなっている⁴⁾。日常的にCREの検査を行って地域のカルバペネマーゼ検出の傾向を把握することにより,海外からの持ち込みや持ち込み例を発端とした耐性菌の広がりを探知することが可能となる。

当所では,2015年5月より岐阜市保健所および県保健所に届出されたCRE感染症の患者由来株の収集を開始しており,前回は2015~2017年までの届出分の菌株の特徴について報告した⁵⁾。今回,2018~2020年に届出があったCRE菌株のカルバペネム耐性機序の解析を行った。また,2015年以降にCREとして搬入された*Escherichia coli* 8株について,菌株に共通性があるか追加解析を行ったので併せて報告する。

2 材料と方法

2.1 2018~2020年届出のCREの解析

2.1.1 供試菌株と菌種同定

2018~2020年の期間に届出があったCRE感染症60症例のうち,当所に搬入のあった58株(2018年19株,2019年23株,2020年16株)を用いた。菌種同定はア

岐阜県保健環境研究所:504-0838 岐阜県各務原市那加不動丘1-1

*現 岐阜県西濃保健所:503-0838 岐阜県大垣市江崎町422-3

**現 岐阜県可茂保健所:505-8508 岐阜県美濃加茂市古井町下古井2610-1

ピ20E またはラピッド ID32E アピ (ピオメリュー) により実施した。

2.1.2 カルバペネマーゼ産生を確認する試験とディスク法によるβ-ラクタマーゼのスクリーニング

カルバペネマーゼ産生の有無の確認は、病原体検出マニュアル⁷⁾に従い、modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) または Carba NP テストにより実施した。ディスク法によるスクリーニングは、MBL (IMP 型, NDM 型等) の阻害剤としてメルカプト酢酸ナトリウム (SMA) ディスク (栄研化学) を、Ambler クラス A カルバペネマーゼと AmpC β-ラクタマーゼの両方の阻害剤として3-アミノフェニルボロン酸 (APB, 東京化成工業) を、AmpC β-ラクタマーゼのみの阻害剤としてクロキサシリン (MCIPC, 東京化成工業) を使用し病原体検出マニュアル⁷⁾に従い実施した。基質拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) のスクリーニングは、セフトジジムとセフトキサシムディスク (栄研化学) を用い、阻害剤としてクラブラン酸 (CVA) 含有ディスクを使用し、薬剤ディスクと CVA 含有ディスクとの間に阻止帯が形成された株を陽性とした。

2.1.3 PCR 法による薬剤耐性遺伝子の検出

カルバペネマーゼ遺伝子の検出は、IMP 型, NDM 型, KPC 型, OXA-48 型はすべての菌株について、GES 型, VIM 型, IMI 型, SMB 型, KHM 型は一部の菌株について PCR を病原体検出マニュアル⁷⁾に従い実施した。また、FRI 型の検出は FRI-F : GCAAGCGT GCRGACTTTGGC, FRI-R : TTGTCGTTTTGATTAG GACG (産物サイズ 470 bp) を用い、PCR 条件は他のカルバペネマーゼ遺伝子の検出と同様に実施した。その他に、CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-9 group, TEM 型, SHV 型の ESBL 遺伝子を対象とした PCR⁸⁾と、MOX 型, CIT 型, DHA 型, ACC 型, EBC 型, FOX 型のプラスミド性 AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子を対象とした PCR¹⁰⁾を実施した。

2.1.4 シーケンスによるカルバペネマーゼ遺伝子の解析

病原体検出マニュアル⁷⁾に従って、IMP 型は IMP-1 all プライマー、NDM 型は Pre-NDM-A と Pre-NDM-B プライマーによりダイレクトシーケンスを実施し塩基配列を決定した。また、IMI 型は既報¹¹⁾の IMIRup と IMIstop プライマーを用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列よりアミノ酸配列に置換し、カルバペネマーゼのタイプを決定した。

2.2 CRE として届出された *Escherichia coli* の詳細解析

2.2.1 供試菌株

菌株の収集を開始した 2015 年以降に CRE 感染症の

表 1 供試した CRE *E. coli* 8 株の情報

菌株番号	医療機関	届出年	由来	カルバペネマーゼ ⁷⁾ 遺伝子タイプ	その他のβ-ラクタマーゼ ⁷⁾ 遺伝子
15-234	A	2016	尿	IMP-6	CTX-M-2 group
16-49	B	2016	腹水	—	CIT型
18-83	C	2018	尿	—	CTX-M-9 group
18-281	C	2018	喀痰	NDM-5	—
18-314	C	2019	胆汁	—	CTX-M-9 group
19-146	D	2019	血液	NDM-5	—
20-6	E	2020	尿	—	CTX-M-9 group
20-117	F	2020	尿	NDM-5	—

起因菌として収集された *E. coli* 8 株 (表 1) について、下記の各種解析を実施した。

2.2.2 PCR による O 群別試験 (Og-typing)

O 抗原合成遺伝子を標的とした PCR¹²⁾により、対応する O 抗原遺伝子型 (Og タイプ) を決定した。

2.2.3 パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE)

既報¹³⁾に従って、菌株をアガロース包埋し、Proteinase K (富士フィルム和光純薬) と Lysozyme (富士フィルム和光純薬) 処理後、制限酵素 *Xba* I (TaKaRa) による消化を行い、CHEF-DR II (Bio-Rad) にて電気泳動しバンドパターンを撮影した。系統樹解析は BioNumerics v6.7 (applied Maths) を用い、Dice 法による類似係数を算出して UPGMA 法 (トレランス設定: 1.0%) によって dendrogram を作成した。

2.2.4 Multilocus sequence typing (MLST) 解析

既報¹⁴⁾に従い、7 遺伝子 (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) の塩基配列を決定後、MLST データベース (<https://pubmlst.org/>) に照合し、シーケンス型 (ST) を決定した。

3 結果

3.1 2018~2020 年届出の CRE の解析

58 株の解析結果を表 2 に示す。検出数が多かった菌株は *Klebsiella aerogenes* (18 株), *Enterobacter cloacae* (15 株), *Serratia marcescens*, *K. pneumoniae*, *E. coli* (各 6 株) であった。カルバペネマーゼ産生の有無の確認を mCIM または Carba NP テストにより行ったところ、58 株中 12 株が陽性で CPE と判定された。CPE の割合は 2018 年が 19 株中 2 株 (10.5%), 2019 年が 23 株中 8 株 (34.8%), 2020 年が 16 株中 2 株 (12.5%) であった。CPE と判定された 12 株のうち、ディスク法によるスクリーニングで MBL 産生株 (SMA による阻害+) と判定された株は 9 株、クラス A カルバペネマーゼ産生株 (APB による阻害+, MCIPC による阻害-) と判定された株は 3 株であった。CPE でない (non-CPE) 46 株では、ESBL 産生株 (CVA での阻害+) と判定さ

表2 CRE感染症菌株の検査結果

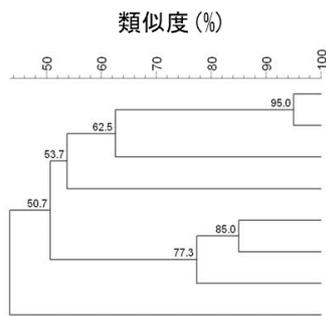
届出年 (事例数)	菌種	株数	カルバペ ネマーゼ 産生+	ディスク法によるスクリーニング				PCR				
				SMA+	APB+ MCIPC-	CVA+	APB+ MCIPC+	カルバペ ネマーゼ	ESBL	AmpC	ESBL AmpC	検出された薬剤耐性遺伝子の 組み合わせ*(株数)
2018年 (19)	<i>S. marcescens</i>	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	
	<i>K. aerogenes</i>	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	
	<i>E. cloacae</i>	3	1	1	0	0	2	1	0	2	0	IMP(1), EBC(2)
	<i>K. pneumoniae</i>	3	0	0	0	3	0	0	3	0	0	CTX-M-1+TEM+SHV(3)
	<i>E. coli</i>	2	1	1	0	1	0	1	1	0	0	NDM(1), CTX-M-9(1)
	<i>C. freundii</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	SHV+CIT(1)
2019年 (23)	<i>E. amnigenus</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	EBC(1)
	<i>K. aerogenes</i>	7	0	0	0	0	7	0	0	1	0	EBC(1)
	<i>E. cloacae</i>	6	4	1	3	0	2	4	0	3	1	IMP+CTX-M-1+TEM+EBC(1), IMI(2), FRI+EBC(1), EBC(2)
	<i>E. asburiae</i>	3	2	2	0	0	1	2	0	2	1	IMP+EBC(2), TEM+EBC(1)
	<i>E. coli</i>	2	1	1	0	1	1	1	1	0	0	NDM(1), CTX-M-9(1)
	<i>K. pneumoniae</i>	2	0	0	0	2	1	0	0	0	2	SHV+DHA(1), CTX-M-9+SHV+DHA(1)
	<i>C. freundii</i>	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	IMP+CIT(1)
	<i>M. morgani</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	DHA(1)
2020年 (16)	<i>S. marcescens</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	<i>K. aerogenes</i>	7	0	0	0	1	2	0	0	0	0	
	<i>E. cloacae</i>	6	1	1	0	0	5	1	0	6	0	IMP+EBC(1), EBC(5)
	<i>E. coli</i>	2	1	1	0	1	0	1	1	0	0	NDM(1), CTX-M-9(1)
Total	58	12	9	3	9	34	12	7	17	5		

* 型、groupの記載省略

れた株が7株、AmpC β-ラクタマーゼ産生株 (APBとMCIPCによる阻害+)と判定された株が36株、ESBLとAmpC β-ラクタマーゼの両方を産生していると判定された株が2株、いずれの阻害剤でも阻害が認められなかった株が1株であった。

PCRの結果、CPEではMBL産生株9株のうち6株がIMP型、3株がNDM型であり、シーケンス解析の結果、IMP型は全株がIMP-1、NDM型はNDM-5であった。クラスAカルバペネマーゼ産生株3株はIMP型、NDM型、KPC型、OXA-48型のPCRではすべて不検出であり、うち2株は追加で行ったPCRでIMI型が検出され、シーケンス解析の結果IMI-1とIMI-9各1株であることが判明した。残りの1株は、検索した9つのカルバペネマーゼ遺伝子すべてが検出されなかったが、FRI型プライマーによりPCRを実施したところ、想定されるサイズにバンドが得られた。その他non-CPE46株ではESBL遺伝子陽性が7株、AmpC遺伝子陽性が12株、ESBL遺伝子とAmpC遺伝子の両方が検出された株が4株、ESBL遺伝子もAmpC遺伝子も検出されなかった株が23株であった。

3.2 CREとして届出された *Escherichia coli* の詳細



解析

8株の解析結果を図に示す。8株のうちNDM-5を保有する3株はOgタイプがそれぞれ異なっていたものの、菌株No. 18-281とNo. 20-117の2株がST167でPFGEパターンの類似度が95.0%であった。また、CTX-M groupのESBL遺伝子を保有する4株のうち菌株No. 15-234とNo. 18-83の2株がOg25 ST131、No. 20-6がOg25でST131と1ローカス違いのST6302であり、この3株はPFGEで相同性77.3%程度のグループを形成していた。

4 考察

CRE感染症届出数は2015~2017年まで8例、9例、13例であったが2018~2020年は19例、23例、18例で増加傾向にあった。また、検出数が多かった上位の菌種は *K. aerogenes*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae*, *E. coli* であり、全国でのサーベイランス集計⁴⁵⁾と一致していた。

CPEの割合は2018年が10.5%、2019年が34.8%、2020年が12.5%であった。2015~2017年はそれぞれ16.7%、22.2%、15.4%であったのと比較すると2018年

菌株No.	検出遺伝子	Og	ST
18-281	NDM-5	OgGp15*	ST167
20-117	NDM-5	OgUT	ST167
16-49	CIT	OgUT	ST38
19-146	NDM-5	Og75	ST2850
15-234	IMP-6, CTX-M-2 group	Og25	ST131
18-83	CTX-M-9 group	Og25	ST131
20-6	CTX-M-9 group	Og25	ST6302
18-314	CTX-M-9 group	Og1	ST38

* 089, 0101, 0163を含む

図 CRE *E. coli* 8株の解析結果

と2020年はやや低かった一方、2019年は顕著に高かった。カルバペネマーゼの種類については、2015～2017年の調査でも当県で優勢に検出されたIMP-1 MBL産生株が今回の調査によっても最も多く検出された。さらに、前回の調査では検出されなかったNDM-5 MBL産生 *E. coli* が2018, 2019, 2020年と毎年1株ずつ検出された。この3株はそれぞれ別の医療機関から届け出されており、いずれも海外渡航歴のない患者由来であった。全国の集計でも海外渡航歴のないNDM-5 MBL産生 *E. coli* の検出数が増加していることが明らかになっており⁴⁵⁾、県内への定着が伺われる結果であった。

また、2019年届出株の解析では、本邦では数例程度しか報告例がないIMI型カルバペネマーゼや、さらには9種類に該当しないタイプ(FRI型)を産生するCPEが検出された。IMI型カルバペネマーゼは *E. cloacae* の染色体上またはプラスミド上に遺伝子が存在するクラスAカルバペネマーゼであり、今回同定されたIMI-1とIMI-9は染色体性として報告されている¹⁵⁾。一方、FRI型カルバペネマーゼはプラスミド性のAmblerクラスAカルバペネマーゼであり、すべて *Enterobacter* 属菌での報告である¹⁶⁾。IMI型、FRI型ともに国内分離報告は少ないが、3例とも海外渡航歴のない患者であることや県内での分離地域に偏りはないことから、国内に常在している可能性がある。今後は、既存の報告と菌種やSTタイプ等クローンの特徴が一致するか、保有する薬剤耐性遺伝子の所在(染色体性/プラスミド性)やIncタイプ等の解析が必要である。

CREとして搬入のあった *E. coli* 8株のO群別試験、PFGE解析、MLST解析を行ったところ、NDM-5を保有する3株のうち2株(No. 18-281とNo. 20-117)はST167であり、PFGEパターンの相同性が高かった。この2株は同じ保健所管内の別の医療機関から届け出されており、患者の疫学情報から関連性は認められなかったが、分離年が異なるにも関わらず相同性の高いクローンであったことは注視すべき結果であった。また、No.18-281はOgタイピングによってO89を含むOgグループであるOgGp15と同定された。NDM-5を産生する *E. coli* O89 ST167は欧州、欧米、東アジア、東南アジアで検出されハイリスククローンであると報告されており¹⁷⁾、本菌株も同様のクローン由来であるかもしれない。また、ESBL産生菌として世界規模での拡散が指摘されているST131が、今回の解析で2株検出された。ST131クローンはキノロン系に耐性を示す株が多く、2000年を境に急激に拡大しているとの報告があり¹⁸⁾、本県のCREの中から検出されたことは市中での拡散を示唆する結果と考えられる。

今回、NDM-5を産生する *E. coli* O89 ST167や、ESBL遺伝子を保有するO25 ST131など薬剤耐性菌として世界的に報告のある特徴を持つ菌株が当県で検出されたことから、今後も同様のクローンの拡散が認められないか発生動向の調査が必要である。また、薬剤耐性菌は薬剤耐性遺伝子が載っているプラスミドの伝達によっても拡散するため、クローンの相同性のみならず薬剤耐性プラスミドの比較も今後必要となる。

CREのカルバペネム耐性機構の解析を行うことで、地域に存在するCPEの出現動向の監視が可能である。本邦で優勢に検出されているIMP型に加え、IMI型やFRI型等の稀なカルバペネマーゼ産生株を検出した。また、岐阜県内では検出されていないものの、国内で検出されるCPEの中ではKPC型、GES型、KHM型などの報告⁴⁵⁾もある他、IMP型とGES型の同時産生株も報告されており¹⁹⁾、本県においても今後も監視が必要と考える。

謝 辞

本調査の実施にあたり、検体収集等にご協力いただきました岐阜市保健所、県保健所の関係各位にお礼を申し上げます。また、FRI型カルバペネマーゼの検査法についてご指導いただきました国立感染症研究所の薬剤耐性研究センターの鈴木里和先生、松井真理先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta RS: Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov., Int J Syst Evol Microb, 66(12), 5575-5599, 2016.
- 2) Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 31st Edition, 2020.
- 3) 平成29年3月28日付厚生労働省健康局結核感染症課長通知：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)感染症等に係る試験検査の実施について
- 4) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌病原体サーベイランス, 2018年：病原微生物検出情報, 40(9), 157-159, 2019.
- 5) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌病原体サーベイランス, 2019年：病原微生物検出情報, 42(6), 123-124, 2021.

- 6) 野田万希子, 門倉由紀子, 酢谷奈津, 亀山芳彦: 岐阜県におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症の届出情報と患者由来株のカルバペネム耐性機序の解析 (2014-2017年), 岐阜県保健環境研究所報, 第26号, 1-4, 2018.
- 7) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル薬剤耐性菌 令和2年6月改訂版 Ver.2.0, 30-48, 2020.
- 8) Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, Yagi T, Yamane K, Wachino J, et al.: PCR classification of CTX-M-type β -lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan, *Antimicrob Agents Chemother*, 50(2), 791-795, 2006.
- 9) Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y: A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan, *FEMS microbial Lett*, 184, 53-56, 2000.
- 10) Perez-Perez FJ, Hanson HD: Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR, *J Clin Microbiol*, 40(6), 2153-2162, 2002.
- 11) David AB, Laura FM, Ross D, Johannes AD, Jeff F, Linda H, et al.: *Enterobacter cloacae* complex isolates harboring *bla_{NMC-A}* or *bla_{IMI}*-type class A carbapenemase genes on novel chromosomal integrative elements and plasmids, *Antimicrob Agents Chemother*, 61(5), e02578-16, 2017.
- 12) Iguchi N, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan: *Escherichia coli* O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping, *J Clin Microbiol*, 53(8), 2427-2432, 2015.
- 13) 勢戸和子, 石川和彦, 藤原恵子, 竹上修平, 小笠原準, 横田正春ら: 近畿ブロックにおけるパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 型別法の施設間変動について—感染研新プロトコールの試用—, 新興・再興感染症研究事業平成15年度総括・分担研究報告, 95-104, 2003.
- 14) Enterobase: Protocols used for MLST of *Escherichia coli* and *Shigella spp.*, <https://enterobase.readthedocs.io/en/latest/mlst/mlst-legacy-info-ecoli.html>
- 15) 澤井恭兵, 田口裕大, 菅野のぞみ, 工藤礼子, 高橋俊司ら: CRE スクリーニング培地により便検体から IMI-1 カルバペネマーゼ産生 *Enterobacter cloacae* complex が分離された1症例, 日本臨床微生物学会雑誌, 31(3), 28-33, 2021.
- 16) 上地あゆみ, 大城春奈, 下地法明, 玉城格, 原國政直ら: 海外渡航歴のない入院患者より FRI 型カルバペネマーゼの新規バリエント *bla_{FRI-7}* を保有する *Enterobacter cloacae* complex を検出した一症例, 日本臨床微生物学会雑誌, 30(4), 59-64, 2020.
- 17) Garcia-Fernandez A, Villa L, Bibbolino G, Trancassini M, Pietropaolo V, et al.: Novel insights and features of the NDM-5-producing *Escherichia coli* sequence type 167 high-risk clone, *mSphere*, 5(2), e00269-20, 2020.
- 18) Price LB, Johnson JR, Aziz M, Clabots C, Johnston B, Tchesnokova V, et al.: The Epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, *H30-Rx*, *mBio*, 4(6), e00377-13, 2013.
- 19) 福田千恵美, 安藤友美, 岩下陽子, 内田順子: 香川県内のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の薬剤耐性遺伝子の検出状況, 香川県環境保健研究センター所報, 第15号, 47-52, 2016.

Detection of Antimicrobial-Resistant Genes from Carbapenem-resistant *Enterobacteriales* Strains in Gifu Prefecture (2018–2020)

Makiko NODA, Katsuo KOSHI, Takatoshi SUZUKI, Ayako FURUTA,
Yukiko KADOKURA*, Sayoko HAYASHI** and Yoshihiko KAMEYAMA

Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:

1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan

** Seino Region Public Health Center:*

Seino General Government Building, 422-3, Ezaki, Ogaki, Gifu 503-0838, Japan

*** Kamo Region Public Health Center:*

Kamo General Government Building, 2610-1, Shimokobi, Kobi, Minokamo, Gifu 505-8508, Japan