

新型コロナウイルス検査における簡易抽出型リアルタイムPCR法の有用性の検討

熊谷 遼太^a, 長島 真美^a, 浅倉 弘幸^a, 吉田 勲^b, 河上 麻美代^a, 内田 悠太^a, 永野 美由紀^a, 藤原 卓士^a
 長谷川 道弥^a, 林 真輝^a, 山崎 貴子^a, 加來 英美子^a, 北村 有里恵^a, 矢尾板 優^a, 森 功次^a, 原田 幸子^a
 鈴木 愛^a, 糟谷 文^a, 小杉 知宏^a, 林 志直^a, 千葉 隆司^a, 貞升 健志^c

東京都健康安全研究センターでは2020年1月24日に新型コロナウイルス感染症の国内第3例目の検査を実施し、以降、国内の感染拡大に伴い1日最大500件を超える検査を取り扱ってきている(2020年8月現在)。新型コロナウイルス検査にはリアルタイムPCR法を用い、当初よりRNA抽出には抽出および精製が可能なスピニングカラムを用いてきた。2020年4月以降、新型コロナウイルスの簡易抽出型リアルタイムPCR検査キットが国内の複数メーカーから発売され、RNA精製工程を要しない効率的な検査が可能となった。本研究では、2020年4月から7月までに積極的疫学調査(新型コロナウイルス検査)事業等で当センターに搬入された生体試料および分離培養検体を用い、簡易抽出型リアルタイムPCR法の検出感度および特異度の検討を行った。

その結果、ウイルスRNAに対する簡易抽出型リアルタイムPCR法の検出限界は12~32 copies/ μ Lで、従来法(1.6~32 copies/ μ L)と比較し、やや感度は劣るものの高感度な検査系であることが確認された。また、生体試料を用いた比較では、感染性の高い検体で安定的かつ十分な検出感度を有していた。さらに、短時間で多検体数を処理できることから、大規模流行時の多検体検査において有用であると判断された。

キーワード : 新型コロナウイルス, COVID-19, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2
 リアルタイムPCR法

はじめに

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)は、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)を原因とする感染症で、2019年12月中国武漢市で初めて確認された^{1,2)}。我が国においては、2020年1月16日にCOVID-19患者が初めて報告され、東京都健康安全研究センターにおいても同月24日に国内第3例目(都内第2例目)となるCOVID-19患者(武漢からの旅行者)からSARS-CoV-2を検出した³⁾。以降、国内の感染拡大に伴い検査数が増加し、4月をピークに1日最大500件を超える検体が当センターに搬入された(2020年8月現在)⁴⁾。

当センターにおける当初の新型コロナウイルス検査は、ウイルスの不活化処理をBSL3実験室内で行った後、BSL2実験室でRNAの抽出・精製および遺伝子検査を実施して

いた⁵⁾。遺伝子検査はスピニングカラムにより抽出された精製RNAを用い、Nagashimaら⁶⁾およびShiratoら(国立感染症研究所の病原体検出マニュアル記載)⁷⁾のプライマー・プローブを使用したリアルタイムPCR法(従来法)を用いた(表1)。本法は、精製RNAを用いることで精度および感度の高い検査が可能であるが、RNA抽出工程において海外社製の専用試薬・消耗品を必要とし、新型コロナウイルス禍では、検査が専用試薬等の市場供給量に依存するリスクがあった。

4月中旬以降、新型コロナウイルスの簡易抽出型リアルタイムPCR検査キットが国内の複数のメーカーから販売された。これら検査キットは共通してRNA精製が不要であり、簡単な前処理でリアルタイムPCR法のサンプル調製が可能となる。また、キット付属の試薬以外にRNA抽

表1. 新型コロナウイルス遺伝子検査に用いた従来法リアルタイムPCR法のプライマーおよびプローブ

| Name | Primer / Probe | Sequence (5'-3') | Target gene | Position* | Reference |
|---------------------|----------------|-------------------------------------|-------------|-------------|---------------------------------|
| orf1ab-13215-F | Forward primer | CCg gAA gCC AAT ATg gAT CA | ORF1ab | 13199-13218 | Nagashima, et al. ⁶⁾ |
| orf1ab-13257-R | Reverse primer | gCA ACg gCA gTA CAg ACA ACA | | 13241-13261 | |
| orf1ab-13238-P | Probe | FAM- ATC CTT Tgg Tgg TgC ATC -MGB | | 13222-13239 | |
| NIID_2019-nCoV_N_F2 | Forward primer | AAA TTT Tgg ggA CCA ggA AC | N | 29125-29144 | Shirato, et al. ⁷⁾ |
| NIID_2019-nCoV_N_R2 | Reverse primer | TYT CYT CgT CRA gRg TgT Ag | | 29263-29282 | |
| NIID_2019-nCoV_N_P2 | Probe | VIC- ATg TCg CgC ATT ggC Atg gA-MGB | | 29222-29241 | |

*) Reference Sequence : GenBank Accession No. NC_045512.2

- ^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1
- ^b 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科
- ^c 東京都健康安全研究センター微生物部

出試薬や消耗品を必要しない上、RNA 抽出工程が簡便であり、検査時間の短縮も可能である。その一方で、同様の検査キットについては、過去の検討で検出感度の低下や非特異反応の出現等の課題も報告されている⁸⁾。

今回、我々は国立感染症研究所の病原体検出マニュアルにおいて検出感度が確認されている島津製作所製 Ampdirect™ Technology 2019 新型コロナウイルス検出試薬キット（以降、キット A）および、タカラバイオ社製 SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit（以降、キット B）について、臨床検体およびウイルス分離株を用いて従来法のリアルタイム PCR 法との比較を行い、それぞれの有用性について検討を行ったので、その概要を報告する。

実験方法

1. 供試材料

2020年4月から7月までに積極的疫学調査（新型コロナウイルス検査）事業等において、搬入されたCOVID-19疑い検体（咽頭ぬぐい液、喀痰等）のうち新型コロナウイルス陽性と判定された検体335件を供試した。また、東京都において、Vero系細胞で分離された3株のSARS-CoV-2、TKYE615484（GenBank Accession No. LC567846）およびTKYE614866（LC567849）、TKYE614903（LC567855）の培養上清を供試した。

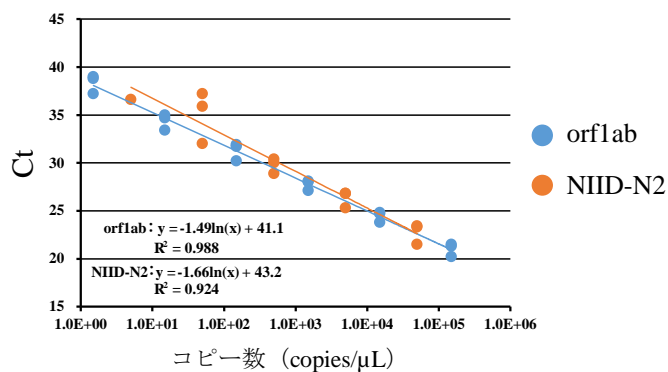


図 1. 従来法における各セット（orflab および NIID-N2）の SARS-CoV-2 遺伝子コピー数に対する Ct 値

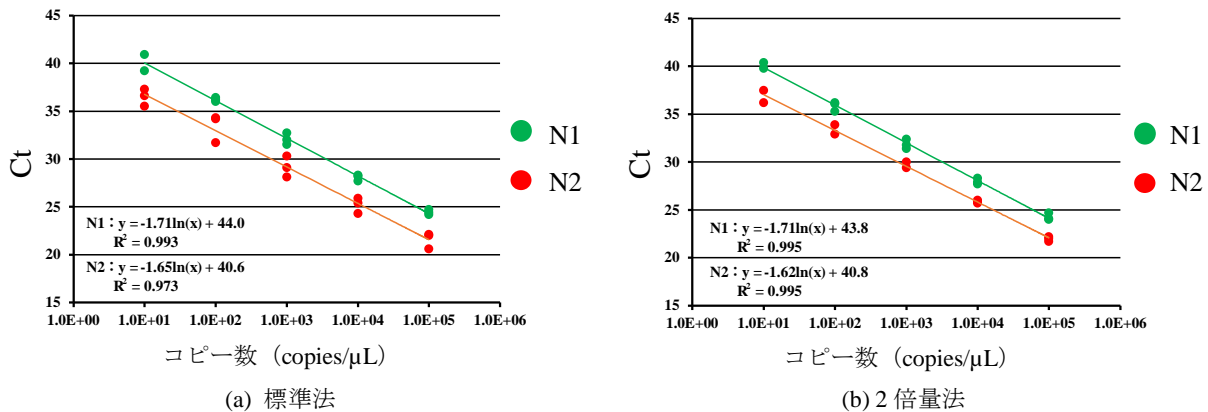


図 2. キット A における各セット（N1 および N2）の SARS-CoV-2 遺伝子コピー数に対する Ct 値

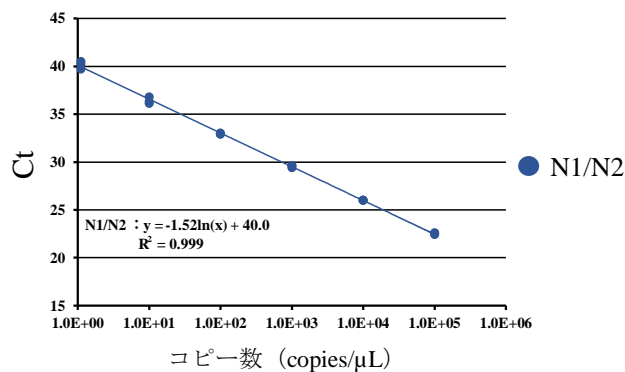


図 3. キット B における SARS-CoV-2 遺伝子コピー数に対する Ct 値

2. 供試材料からのRNA抽出 (従来法)

咽頭ぬぐい液等または分離培養上清140 μL からQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて核酸抽出を行い、RNA抽出液60 μL を作製した。

3. 検出感度の測定および比較検討

1) 標準コントロールの作成および調製

従来法用スタンダードとして、Nagashimaら⁶⁾の報告を参考にORF1abタンパク質をコードする遺伝子領域に設定したプライマーおよびプローブの塩基配列を含む合成DNAを作製した (シグマ・アルドリッチジャパンに合成依頼)。凍結乾燥品をTE溶液で溶解後、10倍段階希釈を行い、 1.5×10^{-1} copies/ μL から 1.5×10^5 copies/ μL までの希釈系列を作製した。同様に、国立感染症研究所から配布されたプライマー、プローブ遺伝子領域を含む合成RNAを用いて 5.0×10^{-1} copies/ μL から 5.0×10^4 copies/ μL までの10倍段階希釈系列を作製した。

簡易抽出型リアルタイムPCR法用スタンダードとして、米国CDCの2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes (CDC法)⁹⁾に記載された2種類のプライマー・プローブセット (2019-nCoV_N1, 2019-nCoV_N2) の塩基配列を含むキットB付属のPositive Control RNA (1.0×10^7 copies/ μL) を用いた。10倍段階希釈を行い、1.0 copies/ μL から 1.0×10^5 copies/ μL までの希釈系列を作製した。

2) ウイルス株に対する検出感度

東京都におけるSARS-CoV-2分離株3株 (TKYE615484, TKYE614866, TKYE614903) の培養上清から得られたRNA抽出液の濃度は、それぞれ 1.2×10^7 copies/ μL , 1.6×10^7 copies/ μL , 3.2×10^7 copies/ μL であった。それぞれ、培養上清を 10^{-5} 倍から 10^{-8} 倍までの希釈系列を作製した後、従来法はこれら希釈上清液から得られたRNA抽出液、簡易型抽出リアルタイムPCR法は上清希釈液をサンプルとし、リアルタイムPCR法を3回ずつ実施した。

4. リアルタイムPCR法

1) 従来法

Nagashima ら⁶⁾ (以降, orflab セット) および Shirato ら⁷⁾ (以降, NIID-N2 セット) のプライマー・プローブセットを検出に用い (表 1), RNA 抽出液 (または標準 DNA・RNA 液) 5 μL , 各プライマー100 μM 0.25 μL , 各プローブ 10 μM 0.25 μL および QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を使用し (最終反応量 25 μL), 50°C40 分, 95°C15 分反応させた後, 94°C15 秒, 60°C1 分のサイクルを 45 回繰り返した。なお検出機器として QuantiStudio 12K Flex Real-time PCR System (サーモフィッシャー) を使用した。

2) キットA

取扱説明書に準じ、標準法 (検体量5 μL , 最終反応量25 μL) および2倍量法 (検体量10 μL , 最終反応量50 μL) の2通りの反応系を検討した。検体と等量のSample Treatment Reagent (標準法: 5 μL , 2倍量法: 10 μL) を混合し, 90°C5分間の加熱処理を行った。その後、本キットのRT-PCR反応液 (Reagent A, B, C mixture) 15 μL (2倍量法: 30 μL) を加え, 42°C10分, 95°C1分反応させた後, 94°C5秒, 60°C30秒のサイクルを45回繰り返した。蛍光検出は N1 : ROX, N2 : FAM, IC : Cy5を用い, 判定は本キットの取扱説明書に準じた。なお、検出機器はQuantiStudio 12K Flex Real-time PCR System (サーモフィッシャー) を使用した。

3) キットB

取扱説明書に従い、検体8 μL とSolutionA 2 μL を混合し, 95°C5分間の加熱処理を行った。その後、本キットのRT-qPCR反応液40 μL を加え (最終反応量50 μL), 52°C5分, 95°C10秒反応させた後, 95°C5秒, 60°C30秒のサイクルを45回繰り返した。蛍光検出はN1/N2 : Cy5を用い, 判定は本キットの取扱説明書に準じた。なお、検出機器はQuantiStudio 12K Flex Real-time PCR System (サーモフィッシャー) を使用した。

表 2. 各リアルタイム PCR 法における SARS-CoV-2 RNA に対する検出感度
分離株 (コピー数)

| 希釈濃度 | TKYE615484 (1.2×10^7 copies/ μL) | | | | TKYE614866 (1.6×10^7 copies/ μL) | | | | TKYE614903 (3.2×10^7 copies/ μL) | | | | 検体量 |
|-------------|--|-----------|-----------|-----------|--|-----------|-----------|-----------|--|-----------|-----------|-----------|--|
| | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} | 10^{-8} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} | 10^{-8} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} | 10^{-8} | |
| 従来法 | 3/3 | 3/3 | 2/3 | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 2/3 | 0/3 | 5 μL [*] (RNA抽出液) |
| キットA (標準法) | 3/3 | 2/3 | 1/3 | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 0/3 | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 0/3 | 0/3 | 5 μL (生体試料) |
| キットA (2倍量法) | 3/3 | 3/3 | 0/3 | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 1/3 | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 1/3 | 0/3 | 10 μL (生体試料) |
| キットB | 3/3 | 1/3 | 0/3 | 0/3 | 3/3 | 2/3 | 1/3 | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 2/3 | 0/3 | 8 μL (生体試料) |

*RNA抽出液5 μL は、生体試料11.7 μL に相当する

4) 従来法とキットA, Bの比較

期間内に搬入された検体について、従来法とキットA, BのCt値の比較を行った。

結果および考察

1. リアルタイムPCR法の定量性と検出感度

1) PCR反応における定量性と検出感度

従来法およびキットA (標準法, 2倍量法), キットBのそれぞれの検出系を用いて, 希釈倍率から算出された単位容量あたりのコピー数を横軸, それぞれのリアルタイムPCR法により測定したCt値を縦軸として検量線の作成を行った。その結果, すべての検出系において, 直線性 (決定係数: 0.924~0.999) が示された (図1~図3)。なお, 従来法の検出感度は1.5 copies/μLであり, 簡易抽出型リアルタイムPCR法 (キットA, B) の各判定基準に基づく検出感度は1.0~10 copies/μLであった。

2) ウイルス株を用いたリアルタイムPCR法の検出感度

分離株3株 (TKYE615484, TKYE614866, TKYE614903) の10倍段階希釈液を用いて, 従来法および簡易抽出型リアルタイムPCR法の感度の比較検討を行った (表2)。3回全てで陽性と判定できたものは, TKYE615484, TKYE614866, TKYE614903の順に, 従来法で10⁻⁶希釈, 10⁻⁷希釈, 10⁻⁶希釈, キットA (標準法) で10⁻⁵希釈, 10⁻⁶希釈, 10⁻⁶希釈, キットA (2倍量法) で10⁻⁶希釈, 10⁻⁶希釈, 10⁻⁶希釈, キットBで10⁻⁵希釈, 10⁻⁵希釈, 10⁻⁶希釈であった。これらのことから, 検出限界は従来法で1.6~32 copies/μL, 簡易抽出型リアルタイムPCR法 (キットA, B) で12~32 copies/μLであることが判明した。簡易抽出型リアルタイムPCR法は, 従来法と比較し, 感度が10倍程度劣るものの高感度な検出系であることが示された。さらに, キットAの2倍量法は, 標準法と比較し感度は同等程度であるものの, Ct値のブレや非特異反応が少ない傾向にあり, より安定した検査結果が得られることが判明した。

2. 生体試料における従来法と各簡易検出リアルタイムPCR法 (キットA, B) のCt値の比較

キットA (標準法): 5月11日~6月8日, キットA (2倍量法): 6月9日~7月19日, キットB: 7月20日~7月31日の各期間に搬入され, 簡易抽出型リアルタイムPCR法 (キットA, B) にて陽性と判定された生体試料について従来法の検査結果と比較した。それぞれの検査法で得られたCt値は, 5グループ (① <25, ② ≥25, <30, ③ ≥30, <35, ④ ≥35, <40, ⑤ ≥40) に分類し比較を行った。その結果, 従来法は簡易抽出型リアルタイムPCR法 (キットA, B) と比較し全体的にCt値が低い傾向があったものの, 同程度のCt値が得られることが確認された。また, 簡易抽出型リアルタイムPCR法のCt値が35サイクル以上においては, 従来法のCt値の方が低い傾向が強くと認められた。現在, 新型コロナウイルスにおいて, ウイルス量とヒトへの感染性の関連性については不明な部分が多い。米国

表 3. 従来法および各簡易抽出型リアルタイム PCR 法 (キット A, B) の Ct 値群の比較

(a) キット A (標準法) および従来法

| 期間: 2020.5.11~2020.6.8 | 従来法 Ct値 | | | | | 合計 |
|------------------------|----------|-----|----------|----------|----------|----|
| | Ct値 | <25 | ≥25, <30 | ≥31, <35 | ≥35, <40 | |
| キットA (標準法) | <25 | 10 | 2 | | | 12 |
| | ≥25, <30 | 4 | 9 | 3 | 1 | 17 |
| | ≥31, <35 | | 6 | 20 | 4 | 30 |
| | ≥35, <40 | | | 9 | 21 | 31 |
| | ≥40 | | | 1 | 3 | 5 |
| 合計 | | 14 | 17 | 33 | 28 | 95 |

単位: 件

(b) キット A (2倍量法) および従来法

| 期間: 2020.6.9~2020.7.19 | 従来法 Ct値 | | | | | 合計 |
|------------------------|----------|-----|----------|----------|----------|-----|
| | Ct値 | <25 | ≥25, <30 | ≥31, <35 | ≥35, <40 | |
| キットA (2倍量法) | <25 | 44 | | | | 44 |
| | ≥25, <30 | 11 | 8 | | 1 | 20 |
| | ≥31, <35 | | 9 | 6 | 1 | 16 |
| | ≥35, <40 | | 1 | 5 | 12 | 20 |
| | ≥40 | | | | 2 | 2 |
| 合計 | | 55 | 18 | 11 | 16 | 102 |

単位: 件

(c) キット B および従来法

| 期間: 2020.7.20~2020.7.31 | 従来法 Ct値 | | | | | 合計 |
|-------------------------|----------|-----|----------|----------|----------|-----|
| | Ct値 | <25 | ≥25, <30 | ≥31, <35 | ≥35, <40 | |
| キットB | <25 | 37 | | | | 37 |
| | ≥25, <30 | 34 | 11 | | | 45 |
| | ≥31, <35 | 1 | 18 | 5 | | 24 |
| | ≥35, <40 | | 1 | 16 | 6 | 24 |
| | ≥40 | | | | 4 | 8 |
| 合計 | | 72 | 30 | 21 | 10 | 138 |

単位: 件

CDC¹⁰⁾の報告では分離培養が可能となるウイルス量はCDC法のCt値で33~35サイクルとされており, この値に境にウイルスの感染性が低下することが推察される。簡易抽出型リアルタイムPCR法は, 感染性の高い検体 (従来法Ct値30サイクル未満) について安定的かつ十分な検出感度を有していることが示唆された。

RNA 抽出液と生体試料をそれぞれ検体として用いた比較において, キット A (標準法) は生体試料でCt値 1.2~7.1 サイクル程度, キット A (2倍量法) はCt値 0.1~4.2 サイクル程度感度が低下した (非公表)。簡易抽出型リアルタイム PCR 法の感度は, 検体の夾雑物により大きく影響を受けることが推察される。キットAではこの影響を考慮し, インターナルコントロール (IC) が添加されており, 1 ウェル反応毎の適格性を評価しながら検査を実施できる。また, キット B についても感度 (Ct 値 1.1~3.8 サイクル程度) が低下したが, IC はないものの非特異波形の出現が非常に少なく, 判定が容易であった (2020年8月現在)。

当センターを含む地方衛生研究所は, 通常業務に加え, 新型コロナウイルス感染症のPCR等検査の増大に対応できるよう検査人員および機器, 試薬等の確保が求められている¹¹⁾。特に検査試薬・用品については, 2020年3月以降, 国内および世界的に新型コロナウイルス検査が急増したこ

とにより、遺伝子検査関連の試薬・消耗品の市場供給が不安定になった。こういったリスクを考慮し、我々は検査試薬・消耗品を十分量確保するとともに、状況に応じて検査法を変更する等、柔軟な検査体制を構築する必要がある。

今回検討を行った簡易抽出型リアルタイムPCR法は、感染性の高い検体において、安定的かつ高い感度で検査を行えることが確認された。本検査法は従来法と異なり、RNA抽出試薬や専用機器を必要とせず効率的かつ簡便に検査を実施できることから、大規模流行時における多検体検査に有用であると考えられた。

ま と め

新型コロナウイルス検査における簡易抽出型リアルタイムPCR法の有用性を確認するため、従来法との比較検討を行った。簡易抽出型リアルタイムPCR法の検出限界は12~32 copies/ μ Lであり、従来法(1.6~32 copies/ μ L)と比較しやや感度は劣るものの高感度な検査系であることが確認された。本検査法は、高感度かつ効率的に検査を実施できることから、大規模流行時の多検体検査に有用であると考えられた。

謝 辞

本検討を実施するにあたり、新型コロナウイルス検査事業等に係る各医療機関および各保健所の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) Du, Z. Wang, L. Cauchemez, S., *et al.*: *Emerg Infect Dis*, **26**, 1049-1052, 2020.
- 2) Bogoch, I. Watts, A. Thomas, A., *et al.*: *J Travel Med*, **27**, taaa008, 2020.
- 3) 東京都福祉保健局・報道発表：新型コロナウイルスに関連した感染症の患者の発生について、2020年1月24日、
<https://www.metro.tokyo.lg.jp/tosei/hodohappyo/press/2020/01/24/20.html> (2020年7月17日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 4) 東京都：新型コロナウイルス感染症対策サイト、
<https://stopcovid19.metro.tokyo.lg.jp/> (2020年7月17日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 5) 東京都健康安全研究センター：当センターにおける新型コロナウイルス検査体制について、
http://www.tokyo-eiken.go.jp/lb_virus/kensa-ncov/
(2020年7月17日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 6) Nagashima, M. Kumagai, R. Yoshida, I., *et al.*: *JJID*, **73**, 320-322, 2020.
- 7) Shirato, K. Nao, N. Katano, H., *et al.*: *JJID*, **73**, 304-307, 2020.
- 8) Meagan, N.E. Oscar, N.W. Shasha, C., *et al.*: *RNA*, **26**, 771-783, 2020.
- 9) Centers for Disease Control and Prevention (CDC): 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes, Jan 24, 2020,
https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/uscdcr-pcr-panel-primer-probes.pdf?sfvrsn=fa29cb4b_2
(2020年7月17日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 10) Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Symptom-Based Strategy to Discontinue Isolation for Persons with COVID-19, May 3, 2020,
<https://www.hssl.org/?view&did=837595> (2020年7月17日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 11) 厚生労働省・事務連絡：新型コロナウイルス感染症に係るPCR検査試薬等の十分な確保について、令和2年4月24日。

Evaluation of Direct Real-time RT-PCR Assay for Detection of SARS-CoV-2

Ryota KUMAGAI^a, Mami NAGASHIMA^a, Hiroyuki ASAKURA^a, Isao Yoshida^a, Mamiyo KAWAKAMI^a,
Yuta UCHIDA^a, Miyuki NAGANO^a, Takushi FUJIWARA^a, Michiya HASEGAWA^a, Masaki HAYASHI^a,
Takako YAMAZAKI^a, Emiko KAKU^a, Yuire KITAMURA^a, Yuu YAOITA^a, Kohji MORI^a, Sachiko HARADA^a,
Ai SUZUKI^a, Fumi KASUYA^a, Tomohiro KOSUGI^a, Yukinao HAYASHI^a, Takashi CHIBA^a and Kenji SADAMASU^a

Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2), was first detected in Wuhan, China in December 2019. In Japan, the first case of a COVID-19 patient was reported on January 16, 2020. The Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, which was able to detect the third case of COVID-19 in Japan, has conducted testing of COVID-19 using nucleic-acid based methods utilizing real-time RT-PCR in order to detect purified viral RNA (standard method). A rapid and straightforward method for the detection of RNA of SARS-CoV-2 without requiring RNA purification (purification-free method) was released by multiple Japanese companies since April 2020.

This study investigated the sensitivity of the standard method and the purification-free method. The standard method was observed to have a detection limit of 1.6-32 copies/ μ L, while that of the purification-free method was 12-32 copies/ μ L. The purification-free method is thus reported to have sufficient and stable detection sensitivity for highly infectious biological specimens.

Keywords: COVID-19, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2, Real-time PCR

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan