

- Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233–2239.
- Watanabe, H., Hoshino, K., Sugita, R., Asoh, N., Watanabe, K., Oishi, K., Nagatake, T., 2004. Possible high rate of transmission of nontypeable *Haemophilus influenzae*, including β -lactamase-negative ampicillin-resistant strains, between children and their parents. *J. Clin. Microbiol.* 42, 362–365.
- Yano, H., Suetake, M., Kuga, A., Irinoda, K., Okamoto, R., Kobayashi, T., Inoue, M., 2000. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of nasopharyngeal flora in children attending a day care center. *J. Clin. Microbiol.* 38, 625–629.
- Zhan, G.G., Palatnick, L., Nichol, K.A., Low, D.E., Hoban, D.J., 2003. CROSS Study Group: antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* respiratory tract isolates: results of the Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study, 1997–2002. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1875–1881.



解説

肺炎球菌ワクチン* — 5年後の再接種の是非 —

大石 和 徳**

Key Words : pneumococcal vaccine, revaccination, serotype specific antibody, safety

はじめに

肺炎球菌は成人においては肺炎を含む下気道感染症の主要な起炎菌である。近年、本菌の多剤耐性化が臨床的な問題となっている。このような背景から、本邦でも高齢者における肺炎球菌ワクチンへの期待が高まっており、現実には肺炎球菌ワクチン接種も普及しつつある。しかしながら、今後は日本として肺炎球菌ワクチンをどのように利用していくのかという、国家方針が重要になる。肺炎球菌ワクチンを勧告するか否か、インフルエンザ同様に二類疾病として定期予防接種化が可能か否かを早急に検討する必要がある。また、現在承認されていない再接種の問題も残されている。本稿では成人における肺炎球菌ワクチンの再接種の是非について考察する。

肺炎球菌莢膜ポリサッカライドと その効果

肺炎球菌はグラム陽性双球菌で多糖体(ポリサッカライド)からなる莢膜に覆われている。莢膜ポリサッカライド(CPS)には少なくとも90の莢膜血清型が存在する¹⁾。T細胞依存性の蛋白質抗原と異なり、CPSはT細胞非依存性抗原である。ヒトにおいては蛋白質抗原がIgG1サブクラスを誘導するのに対し、CPSは主にIgG2サブクラスを誘導する。このCPS特異的IgGによる補体依存性オプソニン活性は肺炎球菌感染症に対する宿主

感染防御の中心的役割を果たすとされている²⁾³⁾。

肺炎球菌CPSワクチンが承認されて以来、これまでに多くの肺炎球菌ワクチンによる免疫能正常者における菌血症を伴う肺炎、髄膜炎などの侵襲性肺炎球菌性感染症に対する予防効果に関する報告がある^{4)~6)}。このような、研究結果を受けて、米国Advisory Committee on Immunization Practice (ACIP)は肺炎球菌ワクチン接種を以下の対象者に推奨している(表1)⁷⁾。免疫能正常者においては65歳以上の高齢者、2~64歳で慢性心疾患、慢性肺疾患、糖尿病の患者、無脾状態の患者に対して明らかな証拠に基づくAランクの推奨をしている。免疫正常者でも2~64歳で慢性肝疾患、アルコール中毒、脳脊髄液漏の患者にはBランク(中等度の証拠)、HIV感染者を含む免疫不全患者にはCランク(明らかな有効性の証明がない)の推奨をしている。

一方、成人における肺炎球菌感染症の大半は菌血症を伴わない(非侵襲性)肺炎である。これまでに実施されたいくつかのprospective studyにおいては、肺炎球菌ワクチンの菌血症を伴わない肺炎球菌性肺炎に対する予防効果は明らかになっていない^{8)~10)}。しかしながら、これらの研究では肺炎球菌ワクチンの効果を示すには対象者数が不十分であったことが指摘できる。その後、Jacksonらは47,365人の65歳以上の高齢者を対象とした23価肺炎球菌ワクチンの効果に関するretrospective studyの結果を報告した¹¹⁾。23価肺炎球菌ワクチン接種は、本研究においても確

* Pneumococcal vaccine : is revaccination recommended five years after the initial vaccination?

** Kazunori OISHI, M.D.: 長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療分野(〒852-8523 長崎市坂本1-12-4); Department of Internal Medicine, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852-8523, JAPAN

表1 肺炎球菌ワクチンの適応および勧告

| 接種推奨の対象 | 期待される有効性 | 再接種 |
|--|----------|--|
| 65歳以上 | A | 前回接種が65歳未満であったか、接種後5年以上経過している場合 |
| 2~64歳で 慢性心疾患, 慢性肺疾患, 糖尿病 | A | 必要なし |
| 2~64歳で 慢性肺疾患, 髄液漏, アルコール依存症 | B | 必要なし |
| 2~64歳で 機能的または解剖的無脾症 | A | ・11歳以上: 前回接種後5年以上経過 ・10歳以下: 前回接種後3年 |
| 2~64歳で 特殊環境下の人種・民族 (アラスカ先住民・アメリカインディアンを含む) | C | 必要なし |
| 2歳以上の免疫不全状態 ①HIV感染, ②悪性腫瘍, ③ネフローゼ症候群, 慢性腎不全, ④免疫抑制状態(臓器移植, 長期にわたるステロイド療法など) | C | ・初回接種後5年以上経過 ・10歳以上で前回接種後3年 |

期待される有効性. A:疫学的, 臨床的に高い有効性あり. B:疫学的, 臨床的に満足できる有効性あり. C:有効性は必ずしも証明されていないが, ハイリスクであり個々における有効性を期待.

(文献⁷⁾より引用)

かに肺炎球菌性菌血症を40%減少させているものの, 市中肺炎の発症および死亡を有意に減少させることができなかった. これに対し, Nicholらはretrospective cohort studyにおいて, 肺炎球菌ワクチン接種は慢性肺疾患患者における肺炎による入院リスクと死亡率を低下させ, さらには直接的な医療コストを軽減させると報告している¹²⁾. 今後, 本邦における肺炎球菌ワクチンの菌血症を伴わない肺炎に対する効果についてさらなるエビデンスの蓄積が必要と考えられる.

一方, スウェーデンにおいてインフルエンザワクチンと23価肺炎球菌ワクチンによる20万人を超える65歳以上の高齢者を対象としたインフルエンザ・肺炎球菌性肺炎の予防効果に関する大規模な前向き研究が実施されている¹³⁾. 本研究において両ワクチン接種群は, 非接種群に対して, インフルエンザ感染, 肺炎球菌性肺炎の発症率, および死亡率の有意な減少が認められている. このように, 肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンの併用による高齢者肺炎に対する効果が明らかとなっている. さらに, Nicholは同様

の効果慢性肺疾患において検討している. 彼女らは, 肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンの併用により, いずれのワクチン接種も受けなかった場合に比較して肺炎による入院のリスクは63%低下し, 死亡のリスクは81%低下したとしている¹⁴⁾. これらの研究結果と本邦で65歳以上の高齢者に対してインフルエンザワクチンが定期予防接種化されている現実を考え合わせれば, 今後は本邦においても肺炎球菌ワクチン単独の効果よりも肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンの併用接種の効果を評価するのがより現実的であろう.

肺炎球菌ワクチン初回接種後の血清型特異免疫応答の維持

肺炎球菌ワクチン接種後に感染防御抗体として機能する血清型特異抗体は少なくとも5年間以上維持されるとされている¹⁵⁾. しかしながら, 宿主側要因によりワクチン接種後の血清型特異抗体応答や抗体の維持期間は異なることが知られている.

Sankilampiらは62名の高齢者に対して、23価肺炎球菌ワクチン接種後の血清中IgG抗体濃度の推移を接種3年後までEIA法を用いて測定している¹⁶⁾。血清型4, 6B, 9V, 14, 19F, 23Fに対する抗体濃度(相乗平均濃度)は接種1か月後に十分に増加(2.6~5.3倍)を示した。接種後3年間で、血清型4, 9V, 23Fでは接種前値に接近し、血清型6B, 19Fでは接種前値と同等にまで低下したとしている。血清型14型は例外であり、接種3年後でも接種前の3倍の抗体濃度を維持していた。血清中血清型抗体IgG濃度は、血清型や年齢、性別にかかわらず経年的に低下し、血清型抗体IgG濃度の維持期間の重要な予測因子は最初の抗体応答の程度であったとしている。これらの結果から、著者らは高齢者に対する肺炎球菌ワクチンの再接種を初回接種の3~4年後に実施するべきとしている。

Rubinsらは基礎疾患を有する53名の高齢者を対象に、23価肺炎球菌ワクチン接種後の血清中特異IgG濃度を接種後16か月までELISA法で測定した¹⁷⁾。高齢者における接種1か月後の血清中特異IgG濃度は有意に増加し、その増加は若年者(平均28歳)と同等であった。また、接種16か月後まで接種前レベルに比較して有意に高い濃度を維持していたと報告している。しかしながら、彼らは高齢者の中に20%程度の低応答者が存在することも指摘している。

肺炎球菌ワクチン再接種後の血清型特異免疫応答

Mufsonらは14価ワクチンを接種した56~79歳の15名に6年後に23価ワクチンを接種し、その後の血清中特異抗体濃度の動態を検討した¹⁸⁾。初回接種後に、12価の血清型特異的抗体濃度は平均で接種前の3.1倍の上昇が認められたのに対し、再接種後には平均1.5倍の上昇が認められた。また、彼らは再接種後に重篤な副反応が認められないことにも言及した。結論として、再接種は安全であり、特異抗体誘導は初回接種の約半分程度であると報告した。

一方、Davidsonらも、慢性疾患患者において23価肺炎球菌ワクチン接種の初回接種と6年以上後の再接種による免疫誘導能について同様に

比較した¹⁹⁾。彼らは12価の血清中特異抗体濃度を測定し、初回接種後の抗体濃度が前値の1.4倍以上となった割合(平均54%)と再接種後の抗体濃度が前値の1.4倍以上となった割合(平均54.7%)を比較し、両者の特異抗体応答は同等であったと報告している。

肺炎球菌ワクチンの再接種と安全性

Jacksonらは50歳から74歳までの年齢層で、過去に肺炎球菌ワクチン接種歴のない901名、少なくとも5年前に肺炎球菌ワクチン接種歴のある513名を対象として、接種前の血清中特異IgG濃度とワクチン接種による副反応の関連性について検討している²⁰⁾。その結果、接種後6日以内の発熱は初回接種、再接種いずれにおいてもほとんど認められなかった。しかしながら、局所反応は再接種群が、初回接種群に比較して有意に多かった。また、接種後2日間における症状としては腕の痛みが頻繁に認められ、初回接種が57%に対し、再接種では74%であった。さらに、再接種と局所副反応について検討したところ、大きな局所反応(少なくとも10.2cm以上)の頻度は再接種群(11%)では初回接種群(3%)に比較して有意に高かった。しかしながら、これらの局所反応は接種後平均3日以内に自然に消失した。さらに、免疫能の正常な成人において、接種前の血清型特異IgG濃度と大きな局所反応(10.2cm以上)との関連性を検討した。4, 14, 23Fのすべての血清型において高い血清中特異IgG濃度を有する人において大きな局所反応(少なくとも10.2cm以上)が認められることが報告されている。彼らは結論として、肺炎球菌ワクチンが推奨される対象において再接種により自然軽快する局所反応がより頻繁に起こるが、この副反応により再接種が禁忌となることはないとしている。

5年後の再接種の是非

これまでに、米国ACIPは23価肺炎球菌ワクチンの再接種を推奨している(表1)。65歳以上の健康な高齢者で、前回接種が65歳未満であったか、接種後5年以上経過している場合には再接種をAランクで推奨している。また、機能的または解剖学的無脾症の11歳以上で前回接種後5年以

上経過した人、あるいは10歳以下で前回接種後3年経過した人にも同様のAランク推奨をしている。しかしながら、本邦においては1987年の肺炎球菌ワクチンの認可時に再接種は認めないとされたままであり、その後の添付文書の改訂は実施されていない。

前述したように、高齢者においては肺炎球菌ワクチン接種後、血清型特異抗体濃度は接種後5年以内に減衰することも報告されており¹⁶⁾、初回接種5年後以降には再接種の必要性が考えられる。また、再接種後の血清型特異抗体応答は、初回と同等もしくは約半分であることが報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾。再接種による安全性については、初回接種に比較して大きな局所反応を示す頻度が多くなるものの、平均3日以内に自然消失し、禁忌になる程度の副反応は認められなかった²⁰⁾。これらの結果から、肺炎球菌ワクチンの再接種は妥当と考えられる。現在、厚生労働省は肺炎球菌ワクチンの再接種の認可に向けて検討中であり、今後の動向に注目したい。

おわりに

現在、本邦における65歳以上の高齢者における肺炎球菌ワクチンの接種率はその販売数から推定し約2%である。米国の同年齢の対象における接種率(64%)と比較すると、本邦における接種率が極端に低いことがわかる²¹⁾。この違いは、65歳以上の高齢者に対して米国ACIPが肺炎球菌ワクチンを勧告し、さらにメディケアという医療保険によりその費用を償還されていることに起因している。したがって、現在の本邦における急務は、高齢者の健康対策として肺炎球菌ワクチンを勧告し、定期接種化を実施することである。この実現のためには、日本独自の肺炎球菌ワクチンの有用性に関するエビデンスを提示していく必要がある。

文 献

- 1) Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microb 1995; 33 : 2759.
- 2) Vioarsson G, Jonsdottir I, Jonsson S, et al. Opsonization and antibodies to capsular and cell wall polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 1994; 170 : 592.
- 3) Musher DM, Chapman AJ, Goree A, et al. Natural and vaccine-related immunity to *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 1986; 154 : 245.
- 4) Butler JC, Shapiro ED, Carlone GM. Pneumococcal vaccines : History, current status, and future directions. Am J Med 1999; 107(1A) : 69S.
- 5) Shapiro ED, Berg AT, Austrian R, et al. The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. N Eng J Med 1991; 325 : 1453.
- 6) Fedson DS. The clinical effectiveness of pneumococcal vaccination : a brief review. Vaccine 1999; 17 : S85.
- 7) Center for Disease Control. Prevention of pneumococcal diseases : Recommendations of Advisory Committee on Immunization Practice. MMWR 1997; 46 (No.RR8) : 1.
- 8) Simberkoff MS, Cross AP, Al-Ibrahim M, et al. Efficacy of pneumococcal vaccine in high risk patients : results of a Veterans Administration Cooperative Study. N Eng J Med 1986; 315 : 1318.
- 9) Ortvist A, Hedlund J, Burman L, et al. Randomised trial of 23-valent pneumococcal capsular polysaccharide vaccine in prevention of pneumonia in middle-aged and elderly people. Lancet 1998; 351 : 399.
- 10) Koivula I, Sten M, Leinonen M, et al. Clinical efficacy of pneumococcal vaccine in the elderly : a randomized, single-blind population-based trial. Am J Med 1997; 103 : 281.
- 11) Jackson LA, Neuzil KM, Yu O, et al. Effectiveness of pneumococcal vaccine in older adults. N Eng J Med 2003; 348 : 1747.
- 12) Nichol KL, Baken L, Wuorenma J, et al. The health and economic benefits associated with pneumococcal vaccination of elderly persons with chronic lung disease. Arch Intern Med 1999; 159 : 2437.
- 13) Christenson B, Lundbergh P, Hedlund J, et al. Effects of a large-scale intervention with influenza and 23-valent pneumococcal vaccines in adult aged 65 years or older : a prospective study. Lancet 2001; 357 : 1008.
- 14) Nichol KL. The additive benefits of influenza and pneumococcal vaccinations during influenza sea-

- sons among elderly persons with chronic lung disease. *Vaccine* 1999 ; 17 : S91.
- 15) Fedson DS, Musher DM, Eskola J. In : Plotkin SA, Orenstein WA, editors. *Pneumococcal vaccine : Vaccines*. 3rd ed. Philadelphia : W.B. Saunders Co ; 1999. p. 553.
- 16) Sankilampi U, Honkanen PO, Bloigu A, et al. Persistence of antibodies to pneumococcal capsular polysaccharide vaccine in the elderly. *J Infect Dis* 1999 ; 176 : 1000.
- 17) Rubins JB, Puri AKG, Loch J, et al. Magnitude, duration, quality, and function of pneumococcal vaccine responses in elderly adults. *J Infect Dis* 1998 ; 178 : 431.
- 18) Mufson MA, Hughey DF, Turner CE, et al. Revaccination with pneumococcal vaccine of elderly persons 6 years after primary vaccination. *Vaccine* 1991 ; 9 : 403.
- 19) Davidson M, Bulkjow LR, Grabman J, et al. Immunogenicity of pneumococcal revaccination in patients with chronic diseases. *Arch Intern Med* 1994 ; 154 : 2209.
- 20) Jackson LA, Benson P, Sneller V-P, et al. Safety of revaccination with pneumococcal polysaccharide vaccine. *JAMA* 1999 ; 281 : 243.
- 21) CDC. Influenza and pneumococcal vaccination coverage among persons aged > 65 years and persons aged 18-64 years with diabetes or asthma-United States. *MMWR* 2003 ; 53 : 1007.

* * *

トピックス

I. 日常診療においてよくみられる肺炎
1. 細菌性肺炎（肺炎球菌性肺炎を中心に）

大石 和徳 吉嶺 裕之

要 旨

肺炎球菌性肺炎の成立機序として、呼吸器ウイルスの先行感染による気道上皮細胞への菌付着の重要性が示唆される。本邦の114症例の成人における肺炎球菌性肺炎症例の臨床像と起炎菌の薬剤耐性を検討した。患者の平均年齢は67.4歳で、菌血症頻度(2.6%)、致命率(4.4%)は欧米の成績に比較して低率であった。起炎菌のペニシリンおよびマクロライド耐性は高いものの、重症度および致命率と薬剤耐性との関連は明らかでなかった。〔日内会誌 94：2256～2260, 2005〕

Key words：肺炎球菌，気道上皮付着，薬剤耐性，マクロライド併用療法

はじめに

肺炎は本邦における死因の第四位であり、2003年には約9万5千人が肺炎で死亡している。細菌性肺炎は多様な呼吸器病原性菌により惹起される肺実質感染症であり、市中肺炎のうちの大部分を占めている。細菌性肺炎の病因は市中肺炎と院内肺炎とで大きく異なるが、市中肺炎の起炎菌としては肺炎球菌が最も頻度が高く、市中肺炎の約20～40%を占めている。肺炎球菌に続いて、インフルエンザ菌、黄色ブドウ球菌、モラクセラ・カタラーリス、肺炎桿菌、ストレプトコッカス・ミレーリーグループ、嫌気性菌等がこれらに続く。本稿では肺炎球菌性肺炎について診断、治療の現状とその問題点について記載する。

1. 細菌性肺炎の成立機序

ライノウイルスやインフルエンザをはじめとするウイルス性上気道炎による気道障害は病原性菌の上気道への付着を助長し、その後の二次性細菌性肺炎を惹起する。これまでに、肺炎球菌は菌体表面のphosphorylcholine (PC) を介して、細胞表面上のplatelet activating factor (PAF) リセプターに結合し、細胞内に侵入することが知られている。その後、このような肺炎球菌の宿主細胞への付着・侵入機序とウイルス感染のかかわり合いから、新たな肺炎成立機序が明らかになっている。すなわち、ライノウイルスを *in vitro* で感染させた気道上皮細胞にはPAFレセプター発現が増強し、肺炎球菌の付着が亢進することが示されている¹⁾。また、インフルエンザウイルスを *in vitro* で肺上皮細胞に感染させた場合に、肺炎球菌の付着能が亢進することも報告されている。この実験系にノイラミニダーゼ阻害剤であるoseltamivirを添加すると菌付着が低下することから、インフルエンザウイルスのノ

おおいし かずのり，よしみね ひろゆき：長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療分野

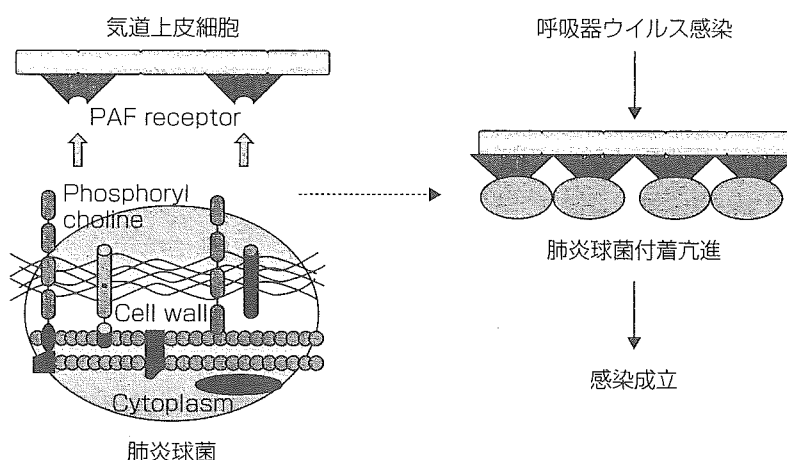


図 1. 肺炎球菌呼吸器感染症の成立機序

呼吸器ウイルス感染に伴う気道上皮細胞表面上のPAFレセプター発現が増加し、肺炎球菌の気道上皮付着が亢進する

イラミニダーゼは気道傷害を介して肺炎球菌付着に関与することが示されている。さらに、マウス肺炎実験モデルにおいてもインフルエンザウイルス先行感染において肺炎球菌性肺炎が重症化することも明らかになっている。

一方、Madhiらは南アフリカの乳幼児を対象とした研究において、ウイルス関連肺炎に肺炎球菌が重要な役割を果たすことを示唆している²⁾。すなわち、乳幼児の肺炎球菌性肺炎の診断における血液培養の感度は低く、他に感度の高い診断法は無い。一方、HIV感染の無い乳幼児に対しては肺炎球菌コンジュゲートワクチン接種がその侵襲性肺炎球菌性感染症を85～97%抑制する事実から、このワクチン効果がウイルス肺炎における肺炎球菌の役割を明らかにするための感度の高いプローブとなると考えられる。この著者らは乳幼児のワクチン接種群 (n=18,245) におけるウイルス関連肺炎の発症頻度をプラセボ群 (n=18,268) と比較し、コンジュゲートワクチンはインフルエンザA, RSV, パラインフルエンザウイルスの検出された肺炎の発症を22～45%も抑制したとしている。この結果は、肺炎球菌がウイルス関連肺炎の発症に重要な役割を果たすこと、またこれらのウイルスが細菌性肺炎の

発症に関与していることを示唆している。

同様にインフルエンザ菌と気道上皮の付着・侵入機構にもPAFレセプターが関与する事が報告されている。この事実から、肺炎球菌と同様に先行するウイルス感染がインフルエンザ菌感染の頻度を増加させることが推察される。

上述の報告を要約すると、呼吸器ウイルスは気道上皮細胞を傷害し、レセプター発現を亢進することで、肺炎球菌の付着を増加させ、感染増悪のリスクを高めていることが示唆される(図1)。

2. 診断の進歩：肺炎球菌尿中抗原

最近、肺炎球菌尿中抗原検査 (Binax NOW *Streptococcus pneumoniae*) が保険適応になり、その臨床応用が進んでいる³⁾。この検査法は、肺炎球菌感染症患者の血中抗原が尿中に濃縮され、尿中抗原陽性になることを利用して開発された。尿検体は採取が容易であり、気道分泌物等のように口腔内細菌による汚染の可能性も無い。従って、肺炎球菌尿中抗原検査は肺炎球菌による肺炎、菌血症、髄膜炎等の簡便な細菌学的補助診断として意義がある。

1) 肺炎球菌尿中抗原検査の原理

本キットはimmunochromatographic membrane assayの原理を利用した、肺炎患者の尿中および髄膜炎患者の髄液中の肺炎球菌莢膜共通多糖抗原 (C-polysaccharide) の迅速検出法である。

2) 臨床成績

51例の肺炎球菌性肺炎症例における肺炎球菌尿中抗原検出において、菌血症を伴う28例、菌血症を伴わない23例における尿中抗原陽性率はそれぞれ82.1%と78.3%といずれも高率で、両者間の差は認められなかった。全体の尿中抗原検査の感度は80.4%で特異度は97.2%であった。これらの結果は、菌血症の存在にかかわらず、肺炎球菌性肺炎における尿中抗原は、とりわけ菌血症を伴わない肺炎球菌性肺炎の診断に有用であることを示唆している。さらに英国における肺炎球菌性菌血症107例を対象とした検討においても、尿中抗原検査の感度は82%、特異度は97%であった。また、尿中抗原は治療7日後でも80~90%が陽性であった。

3) 肺炎球菌抗原検査の問題点

小児における鼻咽頭への肺炎球菌の定着が尿中抗原結果に影響することが報告されている。鼻咽頭に肺炎球菌を保有している小児(66.6%)の尿中抗原陽性率は明らかに肺炎球菌を保有しない小児の陽性率(32.9%)より高かったと報告されている。また、肺炎球菌を保有していない小児において尿中抗原陽性率が高い理由として、低いレベルの肺炎球菌定着あるいはC-polysaccharideを保有する*Streptococcus mitis*の定着による可能性が考えられている。

さらに、肺炎発症後の患者において数週間も尿中抗原が陽性になることも報告されており、尿中抗原陽性の判定には肺炎球菌肺炎既往の有無に十分留意する必要がある。

3. 本邦の肺炎球菌性肺炎の実態調査

1) 肺炎球菌性市中肺炎の特徴 (表1)

近年、本邦をはじめとする東アジア諸国において、肺炎球菌のβラクタム耐性やマクロライド耐性の頻度が高まり、その抗菌薬治療上の問題点が指摘されている。今回、我々は全国20施設で肺炎球菌性市中肺炎の臨床像、起炎菌の薬剤耐性、血清型の実態を調査した。研究実施期間は2001~2003年で、通常の方法で肺炎を診断し、細菌学的には喀痰および血液培養を実施して起炎菌を決定した。114例において、肺炎球菌は109例が喀痰、3例が血液、1例が胸水、1例が気管支肺胞洗浄液から分離され、菌血症を伴う肺炎球菌性肺炎の頻度は欧米に比較して低かった。また、114例中、89例(78.1%)は入院し、残りの25例は外来で治療された。患者の平均年齢は67.4歳(20~99歳)で、男性が59.6%を占めていた。全症例の71.9%に基礎疾患が認められ、その内訳は慢性呼吸器疾患(39.5%)、糖尿病(12.3%)、脳血管障害(8.8%)などであった。日本呼吸器学会のガイドラインに従った重症度分類では、重症33.3%、中等症42.1%、軽症24.6%であった。入院患者の平均在院日数は軽症でも15.9日、中等症24.1日、重症34.3日と、欧米に比較して明らかに在院日数は長かった(図2)。これらの114症例中、109例(95.6%)は治療により軽快したものの、5例(4.4%)が死亡した。この致命率4.4%は欧米の成績に比較すると低率であった。図3には入院症例のうち治癒例(n=77)と死亡例(n=5)の入院日数を示した。死亡例では入院日数が1週間未満であり、急速な経過を示した事が伺える。

2) 肺炎球菌の薬剤感受性と耐性遺伝子

肺炎球菌114株のペニシリン感受性成績では、26株(22.8%)がペニシリン耐性であり(MIC 2μg/mlが25株、4μg/mlが1株)、ペニシリン非感受性(MIC>0.12μg/ml)以上は66株(57.9%)

表 1. 肺炎球菌性市中肺炎 114 症例の臨床像の特徴

| | |
|-----------|-------------------|
| 平均年齢 | 67.4 歳 (男性 59.6%) |
| 菌血症陽性例 | 2.6% |
| 基礎疾患合併 | 71.9% |
| 慢性呼吸器疾患合併 | 39.5% |
| 重症例の頻度 | 33.3% |
| 致命率 | 4.4% |

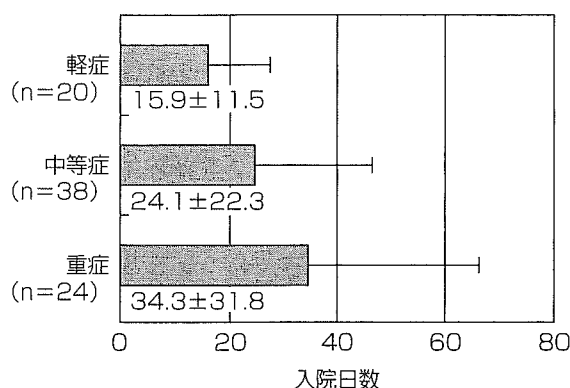


図 2. 肺炎球菌性肺炎患者の入院日数
軽症、中等症、重症例の順に入院日数は延長している。軽症でも入院日数は 2 週間を超えている。

であった。肺炎球菌のβラクタム耐性を担っている *pbp* 遺伝子変異の検討では、42 株 (36.8%) が *pbp1a* + 2*x* + 2*b* 遺伝子変異を有し (genotypic PRSP), 28.1% が *pbp2x* 遺伝子変異を有していた。 *pbp1a* + 2*x* + 2*b* 遺伝子変異株の MIC は 0.25~4.0 μg/ml, MIC50 が 2μg/ml とペニシリン耐性を示すのに対し, *pbp2x* 遺伝子変異株は MIC 範囲 0.03~0.13μg/ml, MIC50 が 0.03μg/ml とペニシリン感受性であった。 *pbp* 遺伝子変異を認めなかったのは 13 株 (11.4%) のみに過ぎなかった。

一方、肺炎球菌 114 株のマクロライド耐性に関与する *erm B* 遺伝子, *mef A* 遺伝子の頻度についても検討した。 *erm B* 遺伝子は 23S rRNA methylase の methylation をコードし, *mef A* 遺伝子はマクロライドの efflux に関与するとされている。結果として、114 株中 *erm B* 遺伝子保有株 (50 株: 56.1%) が最も多く、続いて *mef A* 遺伝子保有株 (26 株: 22.8%), 遺伝子非保有株 (24 株: 21.1%),

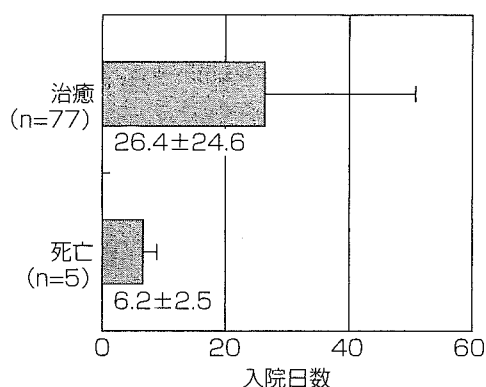


図 3. 肺炎球菌性肺炎患者の入院日数
死亡例の入院日数は 1 週間以内と短かく、死亡症例の経過が早い。

mef A + *erm B* 遺伝子保有株 (7 株: 6.1%) の順であった。 *erm B* 遺伝子保有株は *mef A* 遺伝子保有株に比較してエリスロマイシン耐性が顕著 (MIC: 0.5~128μg/ml, MIC50 = 128μg/ml) であった。

3) 肺炎球菌性肺炎の重症度および致命率と薬剤耐性

114 症例の肺炎球菌肺炎の重症度と起炎菌の薬剤耐性遺伝子保有との関連性について検討した。ペニシリン感受性株である *pbp2x* 株は重症の傾向を示し, *pbp1a* + 2*x* + 2*b* 株はより軽症の傾向が認められた。しかしながら、重症度および致命率とペニシリン耐性遺伝子の分布に明らかな有意差は認められなかった。同様に、重症度および致命率とマクロライド耐性遺伝子分布との関連性も認められなかった。

4. 治療の問題点と最近の動向

これまでに、Metlay らは成人の菌血症を伴う肺炎球菌性肺炎患者において、ペニシリン非感受性肺炎球菌がその院内死亡のリスク因子になると報告している⁴⁾。しかしながら、我々の成績では菌血症を伴わない肺炎球菌性肺炎が大半で、致命率も 4.4% と低率であったこともあり、死亡と肺炎球菌のペニシリン耐性との間には明らか

な関係は認められていない。これまでの多くの研究においても、肺炎球菌性肺炎の死亡とペニシリン耐性の相関は明らかでない。さらには、最近の論文は不適切なβラクタム剤による治療であっても結果的に肺炎の致命率を上昇させていないとしている。一方、肺炎球菌性肺炎のマクロライド耐性と治療失敗が相関するとした報告がある。当然ながら、肺炎球菌のマクロライド耐性が高い地域では市中肺炎患者のマクロライド単剤治療には注意が喚起されている。

このように、現時点の肺炎球菌性肺炎の治療において、起炎菌の薬剤耐性に伴う治療失敗はある。しかしながら、適切な治療の有無にかかわらず、致命率の増加を招く事態は起こっていないと言えよう。

近年、海外では肺炎球菌肺炎に対するβラクタム剤とマクロライド剤の有用性が注目されている。Martinezらは、過去10年間の菌血症を伴う409症例の肺炎球菌性肺炎のβラクタム剤ベースのエンペリックな治療を評価し、マクロライド系薬の併用が肺炎死亡のリスクを低下させると報告している⁵⁾。この結果は、起炎菌未定の、入

院が必要な市中肺炎の治療にβラクタム剤とマクロライド系薬併用の推奨を支持している。さらに、この結果は他のレトロスペクティブ研究により確認されており、今後プロスペクティブ研究により重症肺炎に対するβラクタム剤とマクロライド系薬併用療法の評価が早急に求められている。

文 献

- 1) Ishizaka S, et al: Effects of rhinovirus infection on the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to cultured human airway epithelial cells. *J Infect Dis* 188: 1928-1939, 2003.
- 2) Madhi SA, et al: A role for *Streptococcus pneumoniae* in virus-associated pneumonia. *Nat Med* 10: 811-813, 2004.
- 3) 陳 蒙, 大石和徳: 肺炎球菌尿中抗原検出法. *日本臨床* 63: 159-162, 2005.
- 4) Metlay JP, et al: Impact of penicillin susceptibility on medical outcome for adult patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis* 30: 520-528, 2000.
- 5) Martinez JA, et al: Addition of a macrolide to β-lactam-based empirical antibiotic regimen is associated with lower in-hospital mortality for patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis* 36: 389-395, 2003.

特集/最近の肺炎

肺炎球菌性肺炎とその対策

大 石 和 徳

はじめに

肺炎球菌はグラム陽性双球菌であり、小児や成人に肺炎、髄膜炎、敗血症、中耳炎、副鼻腔炎などの全身性、上気道および下気道感染症を惹起する。とりわけ、成人における市中肺炎の原因菌の約20~40%を占める最も重要な呼吸器病原性菌である。本稿では本邦における成人の肺炎球菌性肺炎の臨床像、起炎菌の薬剤耐性、ワクチンによる予防戦略について記載する。

I. 成人における肺炎球菌性肺炎

今回、我々は2001~2003年の期間に全国20施設において肺炎球菌性市中肺炎の臨床像、起炎菌の薬剤耐性、血清型の実態を調査した。各診療施設で肺炎を診断し、細菌学的には喀痰および血液培養を実施して起炎菌を決定した。114例において、肺炎球菌は109例が喀痰、3例が血液、1例が胸水、1例が気管支肺胞洗浄液から分離され、菌血症を伴う肺炎球菌性肺炎の頻度は2.6%であった。この菌血症を伴う肺炎の頻度はこれまでの本邦や欧米の成績に比較して低かった¹⁾。また、114例中89例(78.1%)は入院し、残りの25例は外来で治療された。患者の平均年齢は67.4歳(20~99歳)で、男性が59.6%を占めていた。全症例の71.9%に基礎疾患が認められ、その内訳は慢性呼吸器疾患(39.5%)、糖尿病(12.3%)、脳血管障害(8.8%)などであった。日本呼吸器学会のガイドラインに従った重症度分類では、重症33.3%、中等症42.1%、軽症24.6%であった。入院患者の平均在院日数は軽症でも15.9日、中等症24.1日、重症34.3日と、欧米に比較して明らかに在院日数は長かった。これらの114症例中、109例(95.6%)は治療により軽快したものの、5例(4.4%)が死亡した。この致命率も欧米の成績に比較すると低率

であり、菌血症を伴う肺炎の頻度が低いことが起因していると推察された²⁾。

II. 肺炎球菌の薬剤感受性と耐性遺伝子

肺炎球菌114株のペニシリン感受性成績では、26株(22.8%)がペニシリン耐性であり(MIC 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が25株、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が1株)、ペニシリン非感受性(MIC > 0.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$)以上は66株(57.9%)であった。肺炎球菌の β ラクタム耐性を担っている *pbp* 遺伝子変異の検討では、42株(36.8%)が *pbp1a+2x+2b* 遺伝子変異を有し(ゲノタイプ PRSP)、28.1%が *pbp2x* 遺伝子変異を有していた。*pbp1a+2x+2b* 遺伝子変異株のMICは0.25~4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、MIC50が2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とペニシリン耐性を示すのに対し、*pbp2x* 遺伝子変異株はMIC範囲0.03~0.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、MIC50が0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とペニシリン感受性であった。*pbp* 遺伝子変異を認めなかったのは13株(11.4%)に過ぎなかった。

一方、肺炎球菌114株のマクロライド耐性に関与する *erm B* 遺伝子、*mef A* 遺伝子の頻度についても検討した。*erm B* 遺伝子は23S rRNA methylase の methylation をコードし、*mef A* 遺伝子はマクロライドの排出に関与するとされている。結果として、114株中 *erm B* 遺伝子保有株(50株: 56.1%)が最も多く、続いて *mef A* 遺伝子保有株(26株: 22.8%)、遺伝子非保有株(24株: 21.1%)、*mef A+erm B* 遺伝子保有株(7株: 6.1%)の順であった。*erm B* 遺伝子保有株は *mef A* 遺伝子保有株に比較してエリスロマイシン耐性が顕著(MIC: 0.5~128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、MIC50 = 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$)であった。

III. 血清型分布

これまでに全国的な肺炎球菌感染症の血清型

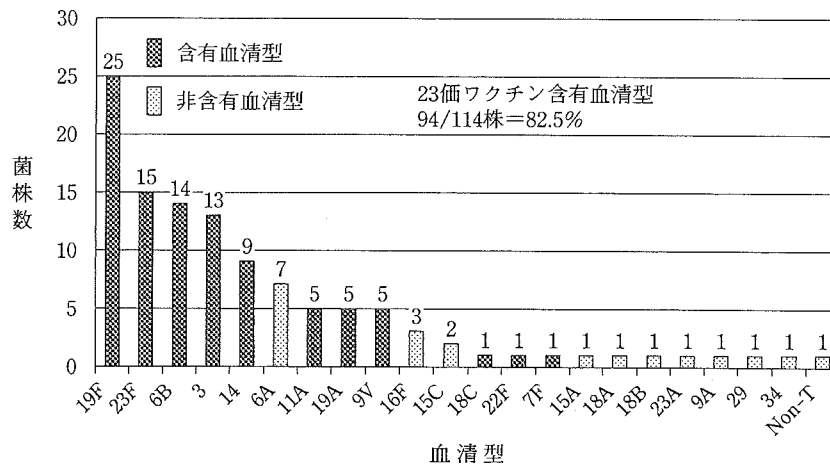


図 1 肺炎球菌114株の血清型分布

分布としては、福見らが1980～84年に590症例の肺炎球菌感染症を対象として報告している³⁾。この報告では、血清型分布は、頻度の高い順に3 (12.7%)、19F (9.3%)、23F (6.8%)、6B (5.9%)であり、これら590株における23価ワクチンカバー率は72.9%であった。一方、今回の研究において市中肺炎球菌性肺炎114症例から分離された起炎菌の血清型分布は、頻度の高い順に19F (29.1%)、23F (13.2%)、6B (12.3%)、3 (11.4%)であった(図1)。114株中の94株(82.5%)は23価ワクチンに含有される血清型を有していた。ワクチン非含有血清型としては6A、16F、15Cなどが認められた。

IV. 肺炎球菌ワクチンによる 予防戦略

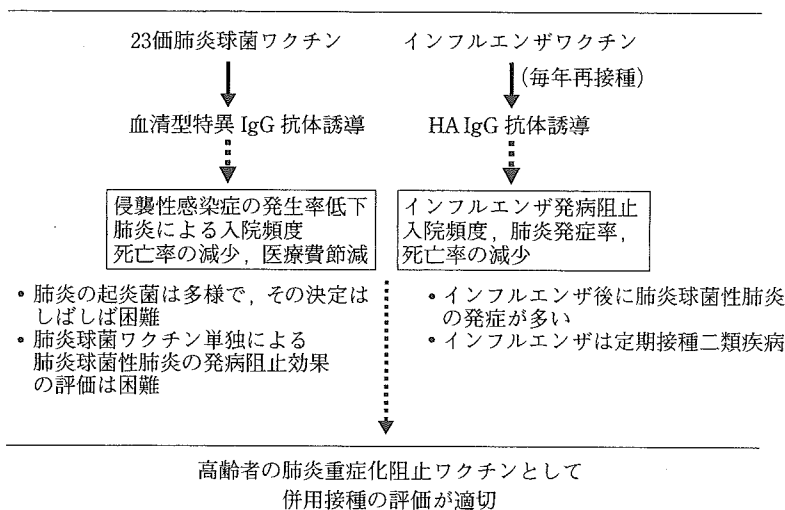
本邦の国民衛生動向によれば肺炎は第4位の死因であり、2003年には94,900人が肺炎で死亡している。今回の肺炎球菌性肺炎における成績に基づき、肺炎の死亡率を4.4%とし、肺炎のうち肺炎球菌が起炎菌として占める割合を30%とすると、647,045人(94,900×0.3/0.044)が毎年肺炎球菌性肺炎に罹患していると推定できる。また、今回の検討では成人の肺炎球菌性肺炎114症例の平均年齢は67.4歳、また71.9%に慢性呼吸器疾患、糖尿病、脳血管障害などの基礎疾患が認められた。このような結果から、基礎疾患を有する65歳以上の高齢者が肺炎球菌性肺炎のハイリスク患者と考えられた。さらには、本邦における成人の市中肺炎起炎菌としての肺炎球菌の大半は *pbp* 遺伝子変異やマクロライド耐性遺伝子を獲得し、その薬

剤耐性は顕著であることも明確になった。このような背景から、肺炎球菌ワクチンによるハイリスク患者に対する予防戦略は重要な課題と考えられる。

本邦において23価肺炎球菌ワクチンは1988年に承認された。欧米においては、これまでに多くの23価肺炎球菌ワクチンによる免疫能正常者における菌血症を伴う肺炎、髄膜炎などの侵襲性肺炎球菌性感染症に対する予防効果に関する報告がある³⁾。このような、研究結果を受けて米国のAdvisory Committee for Immunization Practice (ACIP) は肺炎球菌感染症の予防が推奨される対象について示している。免疫能正常者では65歳以上の高齢者、2～64歳で慢性心疾患、慢性肺疾患、糖尿病の患者、無脾状態の患者に対して明らかな証拠に基づくAランクの推奨をしている。免疫正常者でも2～64歳で慢性肝疾患、アルコール中毒、脳脊髄液漏の患者にはBランク(中等度の証拠)、HIV感染者を含む免疫不全患者にはCランク(明らかな有効性の証明が無い)の推奨をしている。一方、本邦の成人における肺炎球菌感染症の大半は菌血症を伴わない肺炎であり、肺炎球菌ワクチンの菌血症を伴わない肺炎に対する有効性は重要な問題である。Nicholらは、retrospective cohort studyにおいて、慢性肺疾患患者における菌血症を伴わない肺炎球菌性肺炎を有意に予防したと報告している⁵⁾。しかしながら、これまでのprospective studyにおいては、肺炎球菌ワクチン単独による菌血症を伴わない肺炎球菌性肺炎に対する予防効果は明らかになっていない。

一方、肺炎球菌性肺炎はしばしばインフルエン

表 1 肺炎球菌ワクチンの位置付け



ザ後肺炎として発症することが知られている。最近, このような臨床的経験をサポートする肺炎球菌感染の分子機構が明らかになりつつある。肺炎球菌の菌体表面のフォスホリルコリンは血管内皮細胞上の血小板活性化因子 (PAF) リセプターを介して結合し, 肺炎球菌は細胞内に侵入することが知られている。その後, ライノウイルスを *in vitro* で感染させた気道上皮細胞には PAF レセプター発現が増強し, 肺炎球菌付着も亢進することが報告された⁶⁾。また, インフルエンザウイルスを *in vitro* で肺上皮細胞に感染させた場合にも肺炎球菌の付着能が亢進する。この系にノイラミニダーゼ阻害剤である oseltamivir を添加すると菌付着が低下することから, インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼは気道傷害を介して肺炎球菌付着に関与すると考えられる⁷⁾。さらに, マウス肺炎実験モデルにおいてはインフルエンザウイルス先行感染により肺炎球菌性肺炎が重症化することも明らかになっている。

本邦において2001年から65歳以上の高齢者に対するインフルエンザワクチンの定期接種 (二類疾病) が実施されるようになり, この年齢のインフルエンザワクチンの予防接種率は50%を超えたとされている。本邦におけるこのような背景から, 肺炎球菌ワクチンを単独で評価するより, 65歳以上の高齢者に対するインフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチンの併用効果を評価することがより有意義と考えられる (表1)。欧米では, これまでにインフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチンによる259,627人の65歳以上の高齢者を対象とした

大規模な前向き研究が実施されている⁸⁾。本研究において両ワクチン接種群は, 非接種群に対して, インフルエンザ感染, 肺炎球菌性肺炎の発症率, および死亡率の有意な減少が認められている。このように, 肺炎球菌ワクチンの高齢者肺炎に対する効果がインフルエンザワクチンとの併用で明らかとなっている。Nichol は同様の効果について慢性肺疾患を有する高齢者において検討している。この研究では, 肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンの併用により, いずれのワクチン接種も受けなかった場合に比較して肺炎による入院のリスクは63%低下し, 死亡のリスクは81%低下したとされている⁹⁾。従って, 本邦においても65歳以上の高齢者に対する肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンの併用効果が期待され, 今後の日本独自のエビデンスの提示が求められている。米国では65歳以上の高齢者に対する肺炎球菌ワクチン接種率は65%に及び, さらに2010年までにカバー率を90%に引き上げたいとしている¹⁰⁾。一方, 本邦における65歳以上の高齢者 (約2,200万人) のワクチン接種率は2.2%と未だ低率である。今後, 本邦における肺炎球菌ワクチン接種率の一層の向上が必要である。

文 献

- 1) Ishida, T., Hashimoto, T., Arita, M. et al.: Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients. *Chest*, 114: 1588-1593, 1999.
- 2) Bartlett, J. G., Mundy, L. M.: Community-acquired pneumonia. *N. Engl. J. Med.*, 333: 1618-1624, 1995.
- 3) Fukumi, H., Kaneko, Y., Agata, T. et al.: Studies on clinical application of pneumococcal vaccine: dis-

- tribution of *Streptococcus pneumoniae* in Japan. Kansensho Gakkai Zasshi, 58: 39-52, 1984.
- 4) Shapiro, E. D., Berg, A. T., Austrian, R. et al.: The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. N Eng J Med, 325: 1453-1460, 1991.
 - 5) Nichol, K.L., Baken, L., Wuorenma, J. et al.: The health and economic benefits associated with pneumococcal vaccination of elderly persons with chronic lung disease. Arch Intern Med, 159: 2437-2442, 1999.
 - 6) Ishizaka, S., Yamaya, M., Suzuki, T. et al.: Effects of rhinovirus infection on the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to cultured human airway epithelial cells. J Infect Dis, 188: 1928-1939, 2003.
 - 7) Peltola, V. T., Mcculders, J. A.: Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase. Pediatr Infect Dis, 23: S87-97, 2004.
 - 8) Christenson, B., Lundbergh, P., Hedlund, J. et al.: Effects of a large-scale intervention with influenza and 23-valent pneumococcal vaccines in adult aged 65 years or older: a prospective study. Lancet, 357: 1008-1011, 2001.
 - 9) Nichol, K. L.: The additive benefits of influenza and pneumococcal vaccinations during influenza seasons among elderly persons with chronic lung disease. Vaccine, 17: S91-S93, 1999.
 - 10) CDC: Influenza and pneumococcal vaccination coverage among persons aged > 65 years and persons aged 18-64 years with diabetes or asthma-United States. M. M. W. R., 53: 1007-1012, 2003.
-

Pathogenicity of H5 influenza viruses for ducks

N. Kishida¹, Y. Sakoda¹, N. Isoda¹, K. Matsuda², M. Eto³,
Y. Sunaga³, T. Umemura², and H. Kida¹

¹Laboratory of Microbiology, Department of Disease Control,
Graduate School of Veterinary Medicine,
Hokkaido University, Sapporo, Japan

²Laboratory of Comparative Pathology, Department of Disease Control,
Graduate School of Veterinary Medicine,
Hokkaido University, Sapporo, Japan

³Animal Quarantine Service, Ministry of Agriculture,
Forestry and Fisheries, Isogo, Yokohama, Japan

Received October 12, 2004; accepted November 22, 2004
Published online March 3, 2005 © Springer-Verlag 2005

Summary. Four H5N1 highly pathogenic avian influenza (HPAI) viruses and an avirulent reassortant H5N1 virus were tested for their pathogenicity in domestic ducks. A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) (Ck/Yamaguchi/04) isolated from a dead bird during the HPAI outbreak in Japan and A/duck/Yokohama/aq-10/03 (H5N1) (Dk/Yokohama/03) isolated from duck meat at a quarantine inspection for importation from China replicated in multiple organs including the brain of ducks. The ducks infected with Ck/Yamaguchi/04 did not show any clinical signs, while those infected with Dk/Yokohama/03 showed neurological signs. The ducks infected either with A/Hong Kong/483/97 (H5N1) or A/tern/South Africa/61 (H5N3), or with an avirulent H5N1 reassortant, did not show any clinical signs. Virus-specific antibodies were detected in the sera of the ducks infected with each of the five strains tested, indicating that all of the viral strains infected and replicated in the birds. Dk/Yokohama/03 grew in multiple organs more rapidly than did Ck/Yamaguchi/04. Considerable titers of virus were detected in the brain of the ducks infected with Dk/Yokohama/03 and these birds showed neurological signs. The present results demonstrate that the pathogenicity of influenza viruses for ducks does not correlate with that for chickens and that replication of the virus in the brain is critical for ducks to show neurological signs.

Introduction

Influenza virus has two major surface glycoproteins – hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), and 15 HA and 9 NA subtypes are recognized at present.

The pathogenicity of influenza viruses for chickens ranges from asymptomatic infections to the development of systemic diseases with low to high mortality. Highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus strains are restricted to those with H5 and H7 HA, although not all viruses of these subtypes cause HPAI [2].

In 1997 in Hong Kong, H5N1 influenza virus caused HPAI outbreaks on chicken farms. In the same year, 18 people were infected with the virus, and 6 died [15]. The depopulation of poultry halted the transmission of H5N1 viruses to humans in Hong Kong. Since then, H5N1 influenza viruses have been circulating among poultry in Asia [3, 10, 14]. In December 2003 in Korea, H5N1 HPAI virus caused outbreaks of influenza in 16 poultry farms. H5N1 HPAI outbreaks have also occurred in Vietnam, Thailand, China, Laos, Cambodia and Indonesia. Human cases of H5N1 virus infection were reported in Vietnam and Thailand.

During the outbreaks in Asia, in January 2004, a chicken farm was affected in Yamaguchi prefecture, the first outbreak of HPAI in Japan for 79 years [11]. In February, another H5N1 HPAI outbreak occurred among 11 Japanese bantams (*Gallus gallus*) that were raised as pets in Oita prefecture. Also in February, H5N1 HPAI outbreaks occurred at a layer farm and a broiler farm in Kyoto prefecture. The depopulation of chickens in the corresponding farms and intensive measures for prevention halted the spread of HPAI.

Various species of birds including ducks are susceptible to infections of influenza A virus [4]. Although A/FPV/Rostock/34 (H7N1) was exceptionally pathogenic for ducks [1], most of the HPAI viruses for chickens do not cause any clinical signs for ducks. H5N1 virus was recovered only from the respiratory organs or intestinal tracts of infected ducks [7, 9, 13, 14]. However, H5N1 virus isolated from a wild duck in Hong Kong in 2002 caused systemic infection, neurological dysfunction and death in ducks. It was postulated that the ability to transmit to central nervous system (CNS) was central to the pathogenicity of this virus [10].

In the present study, ducks were experimentally infected with Ck/Yamaguchi/04 isolated from a dead bird during the first outbreak of HPAI in Japan, Dk/Yokohama/03, A/Hong Kong/483/97 (H5N1) (HK/483/97), and A/tern/South Africa/61 (H5N3) (Tn/SA/61), and with reassortant R (Dk/Mong-Dk/Mong) as an avirulent control, and the growth kinetics of the viruses was compared.

Materials and methods

Viruses

Ck/Yamaguchi/04 was provided by the National Institute of Animal Health, Ibaraki, Japan. Dk/Yokohama/03 was provided by the Animal Quarantine Station, Yokohama, Japan. HK/483/97 and Tn/SA/61 were used as virulent strains. These four viruses are highly pathogenic for chickens (data not shown). R (Dk/Mong-Dk/Mong) was a reassortant H5N1 virus generated from A/duck/Mongolia/54/01 (H5N2) and A/duck/Mongolia/47/01 (H7N1) which were avirulent and isolated from fecal samples of migratory ducks in our laboratory. The H5N1 and H5N3 influenza A viruses used in this study were propagated in 10-day-old chicken embryonated eggs for 48 h at 35 °C.

Experimental infection of ducks

Five-week-old ducks (cherryvalley) were purchased from a duck farm in Hokkaido, Japan. The viruses were inoculated intranasally at a 50% egg infectious dose (EID₅₀) of 10^{8.0}. Each of the viral strains was inoculated into six ducks. The respiratory organs (trachea and lungs), liver, kidneys, spleen, pancreas, colon and blood were collected at 3 and 14 days post-infection (p.i.). The infectivity of the virus in the tissues of the ducks was measured in embryonated chicken eggs [8]. The growth kinetics of Ck/Yamaguchi/04 and Dk/Yokohama/03 in ducks was compared. The ducks were inoculated intranasally at an EID₅₀ of 10^{6.0}. The trachea, lungs, liver, spleen, kidneys, heart, pancreas, colon, brain and bursa were collected everyday after the inoculation for 7 days.

Experimental infections were performed in a BL3+ biosafety facility at the Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Japan.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

For the detection of the antibodies to influenza viruses in duck sera, ELISA was used according to Kida et al. [5]. Purified R (Duck/Mong-Duck/Mong) was used as ELISA antigens. The microtiter plates (FALCON 35-3912, USA) were coated with antigens (20 µg/ml). Goat anti-chicken IgG-h + 1 conjugated to horseradish peroxidase (Bethyl, Inc., USA) was used. TMBZ (3,3',5,5'-Tetramethyl benzidin) (TAUNS, Japan) was used as an enzyme substrate. The absorbance was read at dual wavelengths of 450 nm and 630 nm with a microplate reader.

Histopathological examination

The organs were fixed in 20% phosphate-buffered formalin (pH 7.2). The organs were sectioned at 4 µm and stained with hematoxylin and eosin for light microscopy. For the detection of avian influenza virus antigens in the tissues, all the sections were stained using the streptavidin-biotin immunoperoxidase complex method (Histofine SAB-PO (R) kit, Nichirei Corp., Tokyo) with rabbit anti-A/duck/Pennsylvania/10128/84 (H5N2) hyperimmune serum at a 1:1,000 dilution as the primary antibody.

Results*Pathogenicity of influenza viruses for ducks*

To define the pathogenicity for ducks of H5 influenza viruses highly pathogenic for chickens, Ck/Yamaguchi/04, Dk/Yokohama/03, HK/483/97, Tn/SA/61 and R (Dk/Mong-Dk/Mong) were inoculated intranasally into ducks.

Virus was recovered from multiple organs of all the three birds infected with Ck/Yamaguchi/04 and from the brains of two of them on day 3 p.i. (Table 1). The birds infected with Ck/Yamaguchi/04 did not show any clinical signs during 14 days observation. Virus was recovered from multiple organs of all the three birds, from the brain of two of the birds and from the blood of one of the three ducks infected with Dk/Yokohama/03 on day 3 p.i. Two of the three ducks infected with Dk/Yokohama/03 showed neurological signs in the observation period of 14 days. One showed blindness, and continuous head-shaking between day 4 p.i. and day 8 p.i. The other showed intermittent head-shakes on day 5 p.i. The ducks infected with HK/483/97 did not show any clinical signs. Virus was recovered only from the respiratory organs, kidneys and colon. The ducks infected with Tn/SA/61 did not show any clinical signs. At day 3 p.i., low titers of virus were

Table 1. Recovery of virus from ducks experimentally inoculated with H5 influenza viruses

| Virus | Virus titer ^{a,*} | | | | | |
|-------------------------------|---|-------|---------|-------|-------|----------------|
| | Respiratory organs (Trachea and Lungs) | Liver | Kidneys | Colon | Brain | Blood |
| Ck/Yamaguchi/04 (H5N1) | 5.5 | 3.7 | 4.5 | 3.0 | 2.5 | — ^b |
| | 5.5 | 2.7 | 4.7 | 3.7 | — | — |
| | 5.7 | 2.7 | 4.7 | ≤2.3 | ≤1.7 | — |
| Dk/Yokohama/03 (H5N1) | 3.5 | ≤1.7 | 4.7 | 4.5 | — | — |
| | 6.3 | 4.0 | 5.3 | 5.3 | 2.7 | ≤2.3 |
| | 4.3 | 3.3 | 6.3 | 3.8 | 3.6 | — |
| HK/483/97 (H5N1) | 3.3 | — | — | 3.0 | — | — |
| | 5.5 | — | 5.3 | 4.5 | — | — |
| | 4.7 | — | ≤1.7 | — | — | — |
| Tn/SA/61 (H5N3) | — | — | — | — | — | — |
| | ≤1.7 | — | 2.5 | — | — | — |
| | — | — | — | — | — | — |
| R(Dk/Mong-Dk/ Mong) (H5N1) | — | — | — | — | — | — |
| | — | — | — | — | — | — |
| | — | — | — | — | — | — |

^aOrgans: log EID₅₀/g, Blood: log EID₅₀/ml

^b<1.5 log EID₅₀/g in organs, <0.5 log EID₅₀/ml in blood

*Organs were collected on day 3 p.i. from ducks infected with each virus for titration

recovered from respiratory organs and kidneys of one of the 3 ducks. Virus was not recovered from the ducks infected with R (Dk/Mong-Dk/Mong) on days 3 and 14 p.i. The serum antibodies to the virus were detected in the birds infected with each of the strains by ELISA on day 14 p.i. (Table 2). No virus was recovered in any of the ducks on day 14 p.i.

In the brain of the duck which showed blindness and neurological signs such as persistent head-shaking from 4 to 8 days p.i., gross lesions were atrophy and a change to white matter in the brain. The microscopic lesion was severe virus encephalitis with encephalomalacia (necrosis), edema, perivascular cuffing, swelling of endothelial cells, infiltration and proliferation of microglia, degeneration and necrosis of nerve cells, and calcification (data not shown). In the brain of the duck which showed neurological signs such as intermittent head-shaking on day 5 p.i., perivascular cuffing and edema of ambient parenchyma of brain were observed (data not shown). In the brain of the duck which did not show any signs, the microscopic lesion was similar to that of the blind duck. Despite the presence of virus at high titers in the respiratory tract, liver, kidneys and colon (Table 1), no histopathological signs were observed in trachea, lungs, kidneys, liver, spleen, pancreas and colon. In the ducks infected with HK/483/97, Tn/SA/61, Ck/Yamaguchi/04 or R (Dk/Mong-Dk/Mong), no histopathological lesions were observed in any organs.

Table 2. Pathogenicity of H5 influenza viruses for ducks

| Virus | Virus dissemination on day 3 p.i. | Clinical signs | Immune response |
|---------------------------|------------------------------------|---|-----------------|
| Ck/Yamaguchi/04 (H5N1) | multiple organs | — ^a | + ^c |
| Dk/Yokohama/03 (H5N1) | multiple organs | blindness, head-shaking ^b | + |
| HK/483/97 (H5N1) | respiratory organs, kidneys, colon | — | + |
| Tn/SA/61 (H5N3) | respiratory organs, kidneys | — | + |
| R(Dk/Mong-Dk/Mong) (H5N1) | — | — | + |

^aAll three ducks did not show any clinical signs during 14 days observation

^bOne of the three ducks showed blindness and head-shaking, one of them showed head-shaking during 14 days observation

^cThe serum antibodies to the virus were detected in the ducks infected with each of the strains by ELISA on day 14 p.i.

The present results demonstrate that both Ck/Yamaguchi/04 and Dk/Yokohama/03 replicate efficiently in multiple organs of infected ducks. Ck/Yamaguchi/04 did not show pathogenicity for ducks, but Dk/Yokohama/03 showed neurological pathogenicity for ducks. HK/483/97 and Tn/SA/61 neither replicated efficiently, nor showed pathogenicity for ducks. R (Dk/Mong-Dk/Mong) which is a reassortant virus of avirulent viruses isolated from wild ducks did not show pathogenicity for ducks.

Comparison of the growth kinetics of Ck/Yamaguchi/04 and Dk/Yokohama/03 in ducks

Although both Ck/Yamaguchi/04 and Dk/Yokohama/03 replicated in multiple organs, there was an obvious difference in that the ducks infected with Ck/Yamaguchi/04 did not show any clinical signs whereas those infected with Dk/Yokohama/03 showed neurological signs. To elucidate the difference in the pathogenicity of these isolates for ducks, Ck/Yamaguchi/04 and Dk/Yokohama/03 were inoculated into 11 ducks each and the tissues were collected sequentially for determining the virus titer and histopathological analysis. Table 3 shows the results of the titration and dissemination to organs and blood.

In the ducks infected with Ck/Yamaguchi/04, virus was recovered from the respiratory organs, kidneys, colon, liver and blood on day 2 p.i. Virus was detected at a low titer in the brain of only one of the infected ducks on day 3 p.i. From the blood of the ducks, the recovery of low titers was made from one of the two ducks examined on days 2 and 3 p.i. None of the ducks infected with Ck/Yamaguchi/04 showed any clinical signs.

Virus was recovered from respiratory organs, liver and blood of the ducks infected with Dk/Yokohama/03 on day 1 p.i. On day 2 p.i., virus was recovered from all of the organs and blood samples of the ducks infected. Virus was detected