

トピックス：日本脳炎ワクチン問題

3-2. マウス脳由来不活化日本脳炎ワクチンの評価

倉根 一郎

国立感染症研究所ウイルス第一部

日本脳炎は日本脳炎ウイルスの感染によって起こる急性脳炎である。脳炎を発症した場合、約20%の患者は死亡、約50%は精神神経に後遺症を残す重篤な疾患である。日本において1960年代1000人以上であった患者数は激減し、1990年以降は10人以下の患者発生である。このような患者数の減少にマウス脳由来不活化日本脳炎ワクチンが果たした役割は非常に大きなものがある。平成17年、日本脳炎ワクチン接種との因果関係が否定できない健康被害（急性散在性脳脊髄炎、(Acute Disseminated Encephalomyelitis, ADEM)）の発生により、厚生労働省より「日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨の差し控えについて」の勧告がなされた。本勧告は行政的判断によるものであり、科学的にマウス脳由来日本脳炎ワクチンと急性散在性脳脊髄炎の因果関係が科学的に証明されたことによるものではない。現在、組織培養細胞由来日本脳炎ワクチンの開発が進んでいるが、早期の実用化による積極的勧奨の再開が待たれている。

1. はじめに

日本脳炎は日本では1966年までは毎年1,000人以上、時に約5,000人を超える患者が発生していた。その後患者数は激減し1972年以降は100人以下、1990年以降は10人以下の患者発生である。このような劇的な患者数の減少は、複合的な要因によっていると理解されているが、マウス脳由来日本脳炎ワクチンが果たした役割は非常に大きなものがある。日本脳炎ワクチンの接種は、1954年から勧奨接種、1967年から特別対策、1976年から定期接種として行われ、今日まで高い接種率を保っている。

日本脳炎ワクチン接種を高い接種率で導入することにより、日本脳炎患者数が激減している例は、日本のみでなく、韓国、台湾においても見られる。さらに、中国においても、近年、弱毒生ワクチンおよびハムスター腎細胞由来不活性化ワクチンの接種率を上げることにより、日本脳炎患者数を大幅に減少させている。これらのことから、日本脳炎

ワクチンが日本脳炎対策にいかに関与しているかが理解できる。

2. 日本脳炎ウイルス

日本脳炎ウイルスはフラビウイルス科、フラビウイルス属のウイルスである。直径40-50 nmでエンベロープを有する球形のウイルスである。エンベロープは糖蛋白(E蛋白)と膜蛋白(M蛋白)の2種類の蛋白を有する。内部には直径約30nmのコア蛋白よりなるカプシッドが存在する。C, PreM, Eの3種類の構造タンパク遺伝子が5'末端側にあり、NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5の7種類の非構造タンパク遺伝子が3'末端側にある¹⁾。E蛋白は中和抗体、赤血球凝集阻止(HI)抗体が認識する蛋白であり防御免疫誘導の主体となる蛋白である。世界各地で分離された日本脳炎ウイルスはE遺伝子配列から5つの遺伝子型(Genotype)に分類されている。しかし、血清型としては一つの血清型に含まれる。

3. 日本脳炎ウイルスの感染環

日本脳炎ウイルスは蚊-ブタ-蚊の感染サイクルで維持される。ある種のトリもウイルスの自然界での維持に関与しているし、またウイルスをある地域から他の地域へ運ぶ役割を果たしていると考えられている。主な媒介蚊はイエカであり、わが国においてはコガタアカイエカ(*Culex tritaeniorhynchus*)が最も重要な媒介蚊である。コガタア

連絡先

〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1
国立感染症研究所ウイルス第一部
TEL: 03-5285-1111 (内線2502)
FAX: 03-5285-1169
E-mail: kurane@nih.go.jp

カイエカは灌漑された田圃や浅い溝等で繁殖する。ヒトは蚊-豚-蚊-ヒトのサイクルで感染する。この場合、豚は高いウイルス血症をおこすことにより、このブタを吸血した多くの蚊を感染させる増幅動物でもある。ヒトからのヒトへの感染はない。感染者の多くは不顕性感染に終わり、脳炎の発症は300～1,000人に1人と報告されている。

4. 日本脳炎

日本脳炎は日本脳炎ウイルスの感染によって起こる急性脳炎である。感染後6～16日の潜伏期を経て、頭痛、発熱、食欲不振、悪心、嘔吐、眩暈等で発症する。小児では腹痛、下痢を伴うことが多い。これらの症状に続き、項部硬直、光線過敏、意識障害、易興奮性、仮面用顔貌、筋硬直、脳神経麻痺、四肢の振戦、麻痺、病的反射が出現する。感覚障害はまれである。脊髄症状や球麻痺症状もまれに起こる。小児においては痙攣が起こることも多い¹⁾。特異的な治療法はない。対処療法が中心であり、特に高熱と痙攣の管理、脳浮腫のコントロールが重要である。脳炎を発症した場合、約20%の患者は死亡、約50%は精神神経に後遺症を残して回復する²⁾。日本脳炎はアジアの農村地域に主にみられる脳炎であり、東アジア、東南アジア、南アジアにいたるほとんどの国において患者発生が知られている。しかし、1998年にはオーストラリア大陸においても日本脳炎患者の発生が報告され、もはやアジアのみに存在する脳炎ではなく、オセアニアへの広がりが見られるようになってきている。

5. マウス脳由来不活化ワクチン

マウス脳由来不活化日本脳炎ワクチンの開発は1930年代から行なわれ、日本独自の技術によりマウス脳由来の不活化ワクチンが1954年実用化にいたった。その後5回の大きな改良が加えられ現在に至っている。日本においては1989年それまでの中山株から、免疫原性が高く、各国の分離株に対してより高い交叉性を持った中和抗体を誘導する北京株に変更になった³⁾。しかし従来の中山株ワクチンも、海外輸出用に製造されている。北京株ワクチンでは、北京株ワクチンに比べて抗原価を2倍に上げ、接種量を半減させた。

1) ワクチンの製造方法と品質管理

マウス脳由来ワクチンは以下のように製造されている(「生物学的製剤基準」に基づく)⁴⁾。ただし、製造法の詳細については各製造所ごとに異なる点がある。

- ① 生後3-5週の健康なマウス脳内にウイルスを接種し、脳炎症状を呈し死亡直前のマウス脳を採る。
- ② 緩衝性生理食塩液を加えて磨砕し、遠心して上清を採り、アルコール沈殿法、硫酸プロタミン処理法、高速遠心法その他の操作を行い、これをウイルス浮遊液とする。
- ③ ホルマリン等を用いてウイルスを不活化する。

- ④ 原液を緩衝性生理食塩液で希釈しこれを最終バルクとする。この際チメロサルを添加する事ができるが、一部製造所でチメロサルを含まない製品が生産されている。
- ⑤ これを、バイアル等に充填し小分製品とする。小分製品については各製造所において以下の試験が行なわれている。PH試験(pH6.8-7.4)、蛋白質含量試験(80 μg/ml以下)、チメロサル含量試験(0.012w/v%以下)、ホルムアルデヒド含量試験(0.01w/v%以下)、無菌試験、不活化試験(生後約4週のマウス10匹以上に、1匹当り検体0.03mlを脳内に注射して14日間観察する。この間いづれの動物も異常を示してはならない)、力価試験(マウスに免疫し、産生された中和抗体をVero細胞上のプラーク減少法により測定し、標準品と同等以上でなければならない)
- ⑥ さらに国立感染症研究所が実施する国家検定において、物理的性状試験、蛋白質含量試験、ホルムアルデヒド含量試験、無菌試験、不活化試験、異常毒性否定試験並びに力価試験の全てに合格した製剤に「国家検定合格証紙」が添付され、実用に供されている。これらの試験は全ロットについて行なわれている。

2) ワクチンの性状

無色透明あるいはわずかに白濁した液状で、各0.5mlあるいは1ml用量のバイアル、または近年では2つの製造所で0.5ml用量のプラスチック注射筒(針付)に封入されている。保存は10℃以下であり、有効期限は国家検定合格後1年とされている。主として輸出用ワクチンとして製造されている凍結乾燥剤は、やや黄白色味を帯びた粉状固体で、1mlあるいは10ml用量のバイアルに封入されている。添付の溶剤(滅菌蒸留水)を規定量加えて使用する。保存温度は液状ワクチンと同様であるが、有効期限は5年である。

3) 接種法と接種目的

予防接種法で決められた対象者(6-90ヶ月、通常3歳)に通常皮下に0.5mlずつを1～2週間の間隔で2回接種する初回免疫(1期初回、2回目)と、1年後に0.5mlを1回接種する追加免疫(1期追加)の計3回の第1期免疫を行なう。3歳未満の小児には0.25mlずつを同様の用法で皮下に注射する。この3回の基礎免疫により、被接種者の90%以上が感染防御に必要な血中中和抗体を3年以上持続できると報告されている。さらに、9-12歳時(通常9歳)に第2期接種、14-15歳(通常14歳)に第3期接種が行なわれていたが、第3期接種については平成17年に廃止されている。

日本脳炎ワクチンの防御効果は90%以上と報告されている⁵⁾。日本脳炎の感染防御には血中の中和抗体が主要な役割を果たすと考えられている⁶⁾。従ってワクチン接種の目的は、日本脳炎ワクチンの被接種者の血中に高い中和抗体を産生し、これを出来るだけ長期間持続させて個人のウイ

ルス感染を予防することにある。日本脳炎ワクチンがウイルスの感染自体を防御している（いわゆる Sterile immunity が成立している）のか、あるいは感染自体は防御しないが発症を防御しているかについては、種々の意見がある。おそらくは、状況によって両方の機序であり、非常に高いレベルの中和抗体が誘導されている場合には Sterile immunity が成立している。一方、中和抗体のレベルが低下してきた場合には、感染自体は防御せず感染が成立し、体内で日本脳炎ウイルスはある程度増殖するが免疫機序によって押さえ込まれ発症は予防すると考えられる。このことは、ヒトによってはワクチンには含まれていない非構造蛋白である NS1 に対する抗体が存在することによって証明される。

6. マウス脳由来不活化日本脳炎ワクチンの副反応

現在使用されている日本脳炎ワクチンの副反応は厚生労働省結核感染症課が実施している予防接種副反応報告および予防接種後健康状況調査報告書によって集計、報告されている⁷⁾。予防接種副反応報告はワクチン接種により副反応が発生した場合、医師、医療関係者、保護者等からの任意の届出が都道府県を介して報告されたものを集計したものである（表1）。後方視的調査であり、報告された副反応とワクチン接種との因果関係を詳細に調査し確定したものではない。従って、ワクチン接種とは関係のない報告が紛れ込んでいる可能性もある。しかし、全国的な報告である

という意味で意義がある。一方、予防接種後健康状況調査は全国都道府県の定点医療機関において、各定期予防接種に関し定点あたり 40 - 100 名の接種者において接種後 28 日間に認められた副反応を集計したものである（表2）。日本脳炎ワクチンに関しては、発熱、局所反応、痙攣、蕁麻疹、発疹が調査項目となっている。前方視的調査である長所はあるが、あくまで定点医療機関での集計であり、ワクチン接種者全員を対象としたものではない。

予防接種副反応報告によれば、平成6年から15年の10年間に脳炎・脳症27件（うち急性散在性脳脊髄炎（Acute Disseminated Encephalomyelitis, ADEM）は18例）が報告されている。また、他の神経系副反応として、痙攣38例、運動障害3例、その他の神経障害20例も報告されている。年間日本脳炎ワクチン接種者が約400万人とすると、ADEMは年度ごとのばらつきを考慮しても約100万-200万接種に1人報告されていることになる。この数値は他の報告ともほぼ一致する⁸⁾。

一方平成8年から14年の予防接種後健康状況調査報告書によれば、6ヶ月-7歳児における37.5℃以上の発熱を見ると、1期初回1回目、2回目および1期追加で平均約8.7%、局所反応は平均10.7%となっている。ワクチン2期、3期接種では37.5℃以上の発熱と局所反応の平均は、それぞれ2.3%と12.7%であった。一方、痙攣は1期接種で平均0.06%2期、3期接種ではなしであった。

表1. 予防接種副反応報告によるマウス脳由来不活化日本脳炎ワクチン接種後の神経系副反応報告件数（平成6 - 15年度）

脳炎・脳症	27
ADEM, ADEM 疑い	18
その他脳炎, 脳症	9
痙攣	38
有熱性（熱性痙攣）	19
無熱性	16
記載なし, 不明	3
運動障害	3
その他の神経障害	20
一過性しびれ, 脱力	6
意識喪失	3
視神経炎	1
末梢神経麻痺	4
低カリウム性周期性四肢麻痺	1
失調性歩行障害	2
その他	3

表 2. 予防接種後健康状況調査によるマウス脳由来不活化日本脳炎ワクチン接種後の神経系副反応報告件数（平成 8 - 14 年度）

	1 期			2 期	3 期
	初回	2 回	追加		
対照者数 (人)	13,986	9,829	8,655	3,245	1,076
痙攣総数	0.04% (6 人)	0.09% (9 人)	0.06% (5 人)	0	0
有熱性痙攣	0.04% (6 人)	0.08% (8 人)	0.03% (3 人)	0	0
無熱性痙攣	0	0.01% (1 人)	0.02% (2 人)	0	0

7. 急性散在性脳脊髄炎

(Acute Disseminated Encephalomyelitis, ADEM)^{9), 10)}

急性散在性脳脊髄炎はウイルスや細菌感染後あるいはワクチン接種後数日—4 週後（多くは 1—2 週後）におこるアレルギー性の脳脊髄炎である。病変部位により症状は多彩であるが、発熱、頭痛、悪心、嘔吐、痙攣、運動障害、意識障害等を示す。单相性の経過を取り、再発はしないと考えられている。ステロイド療法により通常予後は良く、多くの場合完全に回復するが、重症化する例もある。我が国における発生頻度は明確にはなっていないが、厚生労働省研究班の中間報告では 15 歳以下で 100 万人当たり年 1—3 例程度と概算されている。

8. マウス脳由来日本脳炎ワクチンの評価

現行マウス脳由来ワクチンはわが国における長年の品質改良の努力の結果、その安全性と有効性が確立されてきたものである。現在、世界保健機関（WHO）が国際的に使用しうる日本脳炎ワクチンとして認めている唯一のものである。また、定期および臨時予防接種による健康被害に対する国の救済制度である予防接種健康被害認定数においても、日本脳炎ワクチンによる健康被害が国内で使用されている他のワクチンに比し多いわけではない。しかし、マウス脳を用いることに起因する幾つかの問題点を残していることも事実である。たとえば、①マウス脳由来の物質の混入を限りなく少なくするとしても、ゼロにすることは困難である。②今回のように、急性散在性脳脊髄炎がおこった場合、マウス脳由来物質との因果関係を完全に否定することが難しい。③原材料採取工程に熟練作業員による手作業が必要であり、大量処理が困難である。このため価格が高価となり、特に日本脳炎ワクチンを必要とする発展途上国に行き渡りにくい。④マウスの確保が将来的に不安定になる可能性がある。⑤製造に使用したマウスの焼却に伴う環境への負荷、あるいは大量のマウスを用いることに対して抵抗感等がある。

平成 17 年 5 月 30 日、厚生労働省より各都道府県に対し「定期の予防接種における日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨の差し控えについて」の勧告がなされた。その理由とし

て、平成 3 年以降日本脳炎ワクチン接種による急性散在性脳脊髄炎の因果関係が否定できない、あるいは肯定できる健康被害が 13 例（うち重症例 4 例）が報告されていたが、さらに平成 17 年、重症例である 15 例目（重症例としては 5 例目）が発生したこととしている。今回の厚生労働省による「ワクチン接種の積極的勧奨の差し控えについて」の勧告は行政的な判断に基づくものであり、科学的には以下のような疑問が残る。

1) 日本脳炎ワクチンの使用と今回の重症 ADEM 事例因果関係については「接種日と発症日の日数を考慮すると、ワクチンが原因ではないということを否定できない」というものであると判断される。さらに、従来、日本脳炎ワクチンによる ADEM 患者として報告された例において、ADEM を引き起こす他の要因がどこまで追求されたかについては疑問が残る。従って、今回、問題となっている ADEM 症例が日本脳炎ワクチンによって引き起こされたことを示す科学的証拠は現在のところ十分には示されていない。（ただし、その因果関係を科学的に完全に否定することも困難である）。今回の判断は、行政的判断としては尊重すべきであろうが、科学的にはその因果関係を十分に示唆する証拠が十分ではないと考えられる。

2) 上述のように、ADEM に関する近年の全国レベルでの調査では、15 歳以下の小児人口 100 万人あたり年間 1-3 例であり、日本脳炎ワクチン接種との関連が否定できるとされる ADEM 報告数 100 万—200 万接種に 1 人と同等かやや高い。従って、今回問題となった日本脳炎ワクチン使用後の ADEM 事例がこのような症例の紛れ込みである可能性を否定できない。

3) 日本脳炎は日本においては致死率約 20%、死亡を免れたとしても精神神経に後遺症を残しての回復が約 50% である。従って、日本脳炎を発症した場合には、死亡を免れたとしても、後遺症を有した人生を送ることとなることが多い重篤な疾患である。近年、日本脳炎患者の報告数は 10 人未満であるが、日本脳炎ワクチンの積極的勧奨を差し控えることにより、ワクチン未接種者は増加する。これら未接種者に、日本脳炎がどの程度発生するかは予測が難しいが、発生した場合には、たとえその患者数が比較的少数としても患者個々にとっては人生を左右する大きな問題であ

ることは重視すべきである。

9. 新型ワクチンと内在する問題点

組織培養細胞を用いたワクチンの製造については、Vero細胞を用いた生ポリオワクチンと不活化狂犬病ワクチンが実用化され、さらに1987年にはWHOより「ワクチン製造用培養細胞の基準」が示され、培養細胞によるワクチン開発の環境が整ったことが大きい。Vero細胞を用いた日本脳炎ワクチンの開発については、既に日本と米国で報告がある。日本で開発されているVero細胞由来日本脳炎ウイルスは形状、性状及びE蛋白の抗原性についてもマウス脳由来ウイルスと同等であり、免疫原性、力価そして安定性は同等であったと報告されている^{11, 12)}。また、ワクチンの品質管理もマウス脳由来ワクチンに比し容易であることは想像される。

しかし、このVero細胞由来ワクチンがマウス脳由来ワクチンより低リスクであり、副反応の発生が低く、重篤な副反応は出ないとするヒトにおけるデータは現在のところない。勿論、マウス脳由来でないことから神経組織に由来する物質による副反応は起こりえないが、Vero細胞がサル腎臓由来の細胞であることに起因する新たな副反応は理論上ありうるし、また日本脳炎ウイルス粒子に対する免疫応答が副反応という形で現れることもありうる。さらに、Vero細胞由来不活化日本脳炎ワクチン接種後に偶然全く異なる原因によるADEMが発生し、接種日を考慮するとワクチン接種との関連が否定できない、という状況も当然起こりうる。特に一部マスコミ等においては、組織培養細胞(Vero細胞)由来不活化日本脳炎ワクチンは副反応が全く起こらないような完全無欠のワクチンであるような論調を取るものも見られる。そのようなワクチンができることは強く願うが、現実には副反応が皆無であることは予想しがたく、ヒトにおける組織培養細胞由来不活化日本脳炎ワクチンの特に副反応に関しては特に今後のデータの蓄積が重要である。

10. おわりに

上述のように、日本脳炎ウイルスは蚊—ブタ(トリ)—蚊の感染環により維持され、ブタは感染蚊を増やす増幅動物ともなる。わが国においては日本脳炎ウイルスの伝播は6月頃からブタの感染が確認され始め、その後ヒトの感染が起こる。このような、ヒトへの感染経路を考えれば、日本脳炎の発症を防ぐためには、ワクチンによってヒトに防御免疫を付与する、及び、蚊との接触を極力防ぐことが現実的な対策である。ブタをワクチンにより免疫することにより、ヒトへの感染を防ぐことは、理論的には考えられるが、現実的には困難であり、どの国においてもこのような方策は採られていない。従って、ヒトへのワクチン接種は、日本脳炎に対するヒトの防御にとっては第一の選択である

といえる。今回の接種勧奨の中止により、接種率は大きく低下していると考えられる。しかし、日本脳炎ワクチンの接種自体が中止されたわけではなく、日本脳炎ウイルスの活動が見られる地域に居住する接種対象者は、日本脳炎ワクチンを受けることができる。マウス脳由来日本脳炎ワクチンは国際的に認められている唯一の日本脳炎ワクチンであるという事実は今でも変わりが無い。また、今回の勧奨中止により、本ワクチンが果たしてきた役割に対する評価が変わるべきではない。一方、現実的にマウス脳由来ワクチンによる勧奨再開が行政的に困難であるとすれば、新型ワクチンの実用化と、新ワクチンによる勧奨の早期再開が強く求められる。

引用文献

- 1) Monath TP, Tsai TF: Flaviviruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG eds. *Clinical Virology*. ASM Press, Washington, D.C. pp 1097-1151, 2002.
- 2) 松永泰子, 矢部貞夫, 谷口清州, 中山幹男, 倉根一郎: 日本における近年の日本脳炎患者発生状況. 厚生省伝染病流行予測調査および日本脳炎確認患者個人票(1982-1996)に基づく解析. *感染症学雑誌* 73: 97-103, 1999.
- 3) 堀内清, 渡辺邦子, 窪谷弘子, 小島朝人, 安田幹司: 新しい日本脳炎ワクチンの開発. *臨床とウイルス* 23: 290-300, 1995.
- 4) 根路銘玲子, 倉根一郎: 日本脳炎ワクチン. *臨床検査* 49: 399-415, 2004.
- 5) Oya A: Japanese encephalitis vaccine. *Acta Pediatr Jpn* 30:175-184, 1988.
- 6) Hoke CH, Nisalak A, Sangawhipa N, Jatanasen S, Laorakapongse T, Innis BL, Kotchasenee S, Gingrich JB, Latendresse J, Fukai K, Burke DS: Protection against Japanese encephalitis by inactivated vaccines. *N Engl J Med* 319: 608-614, 1988.
- 7) 大矢達男: 日本脳炎ワクチン. *小児看護* 27: 1595-1599, 2004.
- 8) Ohtaki E, Matsuishi T, Hirano Y, Maekawa K: Acute disseminated encephalomyelitis after treatment with Japanese B encephalitis vaccine (Nakayama-Yoken and Beijing strains). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 59: 316-317, 1995.
- 9) Stonehouse M, Gupta G, Wassmer E, whitehouse WP: Acute disseminated encephalomyelitis: recognition in the hands of general pediatricians. *Arch Dis Child* 88: 122-124, 2003.
- 10) Garg RK: Acute disseminated encephalomyelitis. *Postgrad Med J* 79: 11-17, 2003.
- 11) 石川豊数, 吉井洋紀, 大西敏之, 他: 継代培養細胞を用いた不活化日本脳炎の開発. *臨床とウイルス* 26: 340-350, 1998.
- 12) Kuzuhara S, Nakamura H, Hayashida K, Obata J, Abe M, Sonoda K, Nishiyama K, Sugawara K, Takeda K, Honda T, Matsui H, Shigaki T, Kino Y, Mizokami H, Tanaka M, Mizuno K, Ueda K: Non-clinical and phase I clinical trials of a Vero cell-derived inactivated Japanese encephalitis vaccine. *Vaccine* 21:4519-4526, 2003.

Evaluation of mouse brain-derived, inactivated Japanese encephalitis vaccine

Ichiro KURANE

Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama,
Shinjuku-ku Tokyo 162-8640 Japan

Japanese encephalitis (JE) is a serious encephalitis caused by JE virus. Approximately 20% of JE patients die and 50% patients recover with neuro-psychiatric sequelae. In Japan, the number of JE patients was over 1000 per year in 1960s; however, the number decreased dramatically and has been less than 10 since 1990. Ministry of Health, Labour and Welfare suspended the strong recommendation for vaccination with the mouse brain-derived JE vaccine, because of cases who developed acute disseminated encephalomyelitis (ADEM) after vaccination with JE vaccine. However, it has not been fully confirmed on scientific bases that ADEM was caused by mouse brain-derived JE vaccine. Tissue culture derived-JE vaccine is under development. It is expected that this new vaccine will come to the market soon and that the recommendation of universal vaccination with JE vaccine will be implemented at the earliest occasion.