

表 題 B 型肝炎ウイルス (HBV) キャリア母体から出生した児における母子感染予防措置後の Occult HBV infection に関する検討

論文の区分 論文博士

著 者 名 横山 孝二

所 属 自治医科大学 医学部 小児科学講座 小児医学部門

---

2018年 1月 30日申請の学位論文

紹介教員 地域医療学系 専攻 生殖・発達医学  
職名・氏名 教授・山形 崇倫

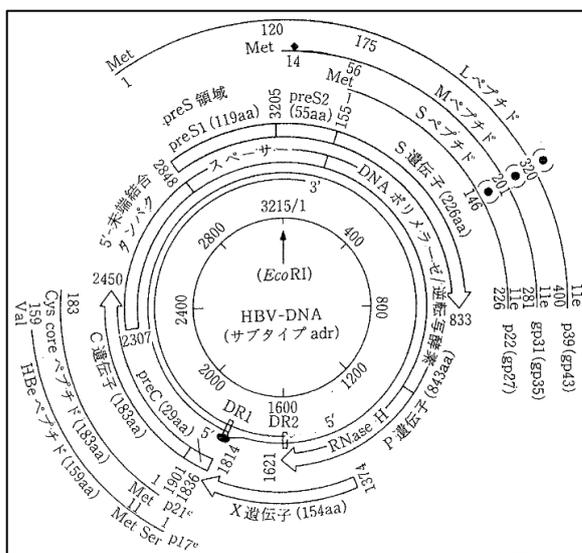
# 目次

1. はじめに	2
2. 目的	5
3. 方法	6
3.1. 対象	
3.2. 倫理的承認	
3.3. 血清 HBV マーカーと HBV DNA の検出法	
3.4. HBV 遺伝子の全塩基配列の決定と分子系統解析	
4. 結果	11
4.1. OBI と RBI の有病率について	
4.2. 母子感染をきたした症例の経過	
4.2.1. 症例 1	
4.2.2. 症例 2	
4.2.3. 症例 3	
4.3. 分離された HBV 遺伝子の比較	
5. 考察	18
6. 結論	21
7. 謝辞	21
8. 参考文献	22

## 1. はじめに

B型肝炎ウイルス（HBV）の発見は、1965年にBlumbergがオーストラリアの原住民の血清からオーストラリア抗原（現在のHBs抗原）を発見したことに端を発する[1]。1968年には大河内、PrinceらによってHBs抗原とB型肝炎との関連が証明された[2, 3]。HBV粒子は1970年に同定され、発見者の名を冠して、Dane粒子と呼ばれている[4]。HBVはヘパドナウイルス科に属し、全長は約3,200塩基で、図1に示す如く一部が一本鎖構造をとる不完全な環状2本鎖DNAウイルスである[5, 6]。ゲノム上には、エンベロープ蛋白をコードしているpreS/S遺伝子、コア蛋白と血中HBe抗原をコードしているpreC/C遺伝子、転写を活性化する働きなどを持つX蛋白をコードしているX遺伝子、DNAポリメラーゼ/逆転写酵素などの酵素蛋白をコードしているP遺伝子に対応する4つのOpen Reading Frame（ORF）が存在する。HBVは8%以上の塩基配列の相違によりgenotype A~Jの10種類の遺伝子型に分類される[7-11]。いくつかの遺伝子型は、さらにA1~A6、B1~B9、C1~C16を含むsubgenotypeに細分化される[12]。日本ではsubgenotype B1とC2が最も多いが、近年、性感染症としてのsubgenotype A2の感染者が増えてきている[13]。

図1 HBV genomeの遺伝子構造



文献5より引用

−strand DNA はゲノムの全長をカバーするが、その5'末端と3'末端は結合しておらず、その両端で10塩基長ほど重複している。

+strand DNA には、open reading frame (ORF) が含まれる。

DR1, DR2 は、HBVの複製、染色体へのHBV DNA断片の取り込みに重要な役割を果たす。

● : 5'末端結合蛋白

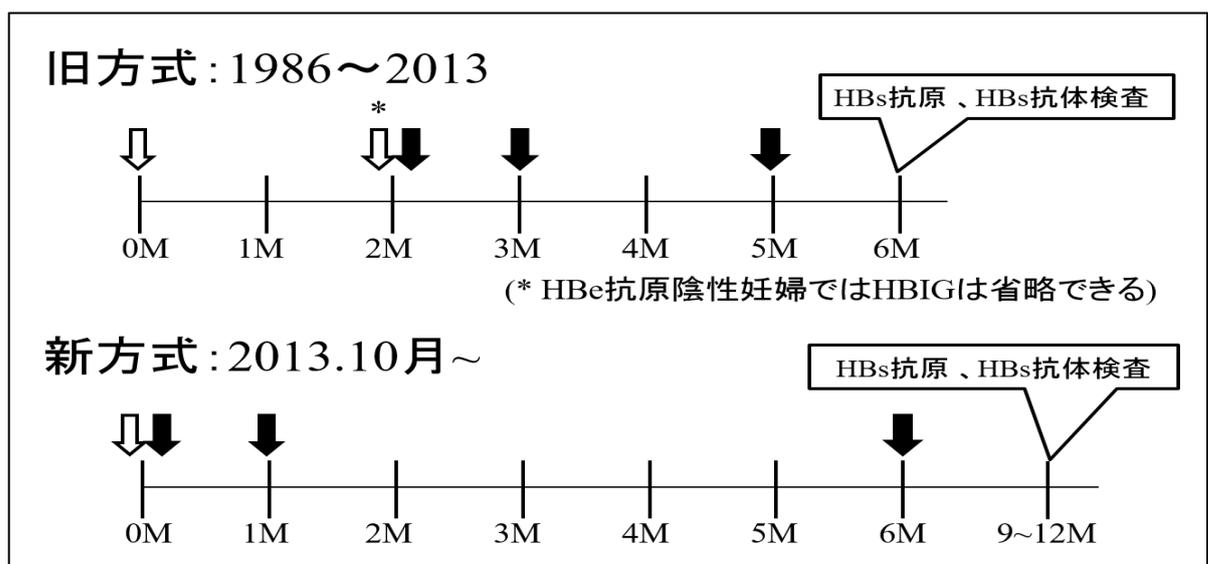
aa : amino acids (アミノ酸残基数)

DR : direct repeat (反復配列)

HBV キャリアは HBs 抗原が 6 か月以上陽性である症例と定義され、HBV キャリア数は、全世界で 2.6 億人、本邦では 110~140 万人と推定されている[14, 15]。HBV は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌を含む急性・慢性肝障害の主要な原因ウイルスであるが、世界で年間約 89 万人が HBV 関連疾患で死亡している[14]。

HBe 抗原陽性の HBV キャリア母体から出生した児に HBV 母子感染予防措置を講じなかった場合、約 85%で母子感染が成立する[16]。世界保健機関（WHO）は、HBV 母子感染予防として HBs 抗原陽性母体から出生した児に対して高力価 HBs 抗体含有免疫グロブリン（HBIG）と HB ワクチンを用いた免疫学的予防を推奨している[17]。WHO が推奨する予防法は、出生直後に HBIG 筋注と HB ワクチン接種を実施し、以降生後 1 か月時と 6 か月時に HB ワクチンを接種する方法である。図 2 に示すように本邦では、1986 年から母子感染予防措置が導入されているが、その方法は当初は WHO が推奨する方法とは異なり、出生直後および生後 2 か月時に HBIG 200 単位を筋注し、生後 2 か月時、3 か月時、5 か月時に HB ワクチン 5  $\mu$ g（0.25 ml）を皮下注射する方法であった。2013 年 10 月からは WHO 方式に準じたものに変更されている。

図 2 日本における母子感染予防措置



白抜き矢印 (↓) は HBIG、黒矢印 (↓) は HB ワクチンの投与を受けたポイントを表す。

HB ワクチン接種に関して、1992 年に WHO は全世界の国々が 1997 年までに HB ワクチンのユニバーサルワクチネーションを導入することを提唱した。しかしながら、日本では前述の如くハイリスク児に対する選択的予防（セレクトティブワクチネーション）のみを行ってきた。しかし、genotype A をはじめとする性感染症としての HBV 感染の拡大、ピアスや刺青（タトゥー）、薬物乱用による不適切な衛生管理、また父子感染や保育施設などでの水平感染など母子感染以外の HBV 感染の発生[18]から HBV 感染率が下がり止まっていることを受け、2016 年 10 月から HB ワクチンが定期予防接種に認定され、出生した全小児に対して HB 免疫学的予防を実施するユニバーサルワクチネーションが開始されている。

潜在性 HBV 感染症（Occult HBV infection ; OBI）は、HBs 抗原が陰性にもかかわらず、血液や肝組織で HBV DNA が検出される状態であり、HBc 抗体や HBs 抗体陽性の有無は問わないとされている[19]。①急性感染のウィンドウ期、②急性肝炎後の複製効率が低い状態、③S 遺伝子の逃避変異の出現、④不十分な中和抗体、⑤宿主の免疫不全、⑥HCV との重感染と OBI の関連が想定されているが[20-22]、母子感染予防措置を施行したにも関わらず母子感染による OBI が起こる機序はいまだ明らかではない。また、日本での HBV キャリア母体産児における OBI の現状およびその有病率に関してもはっきりしていない。

HBs 抗原と HBV DNA がいずれも検出されず、HBs 抗体と HBc 抗体が陽性である場合、HBV 感染既往（Resolved HBV infection ; RBI）と表される。HBs 抗原の陰性化と HBs 抗体の検出は、一般的に HBV 感染後の血清学的回復状態と捉えられているが、RBI 症例において免疫抑制治療時の HBV 再活性化が報告されており[23, 24]、RBI 症例でもウイルスの複製は低いレベルで数十年持続すると考えられている[25]。

すべての HBV 株は HBs 抗原上の免疫防御決定因子である共通抗原決定基「a」を共有している[26]。HBs 抗原には、共通抗原決定基「a」のほかに、「d」と「y」（d/y）、「w」と「r」（w/r）の互いに対をなす型特異抗原決定基が存在し[27]、その組み合わせ

せにより4つの主要なサブタイプ (adw, adr, ayw, ayr) に分けられる。本邦では、adr が80~90%、adw が10~30%を占め、ayr、ayw はごく少数である[27]。型特異抗原決定基 d/y、w/r を決定するアミノ酸部位は、S 遺伝子のコドン 122 とコドン 160 にそれぞれ存在する。コドン 122 のアミノ酸残基がリジンであれば「d」、アルギニンであれば「y」となり、コドン 160 のアミノ酸残基がリジンであれば「w」、アルギニンであれば「r」となる[27]。現在、日本では genotype C (adr) に由来するビームゲン<sup>®</sup> (化学及血清療法研究所、熊本、アステラス製薬株式会社、東京) と genotype A (adw) に由来するヘプタボックス<sup>®</sup> (MSD 株式会社、東京) の2種類の HB ワクチンが用いられている。どちらのワクチンも共通抗原決定基「a」を含有していることから、すべての遺伝子型、血清型に感染予防効果を示すと考えられている。共通抗原決定基「a」は、S 遺伝子のコドン 124~147 にコードされており[28]、HBV 母子感染予防措置実施後の HBV 母子感染と HBV ウイルス変異に関して、この決定基「a」における遺伝子変異がワクチンに対する免疫応答からの逃避 (エスケープ) と関連していることが知られている[28]。S 遺伝子のコドン 145 のグリシンからアルギニンへの変異 (G145R)、コドン 126、コドン 129、コドン 141 のアミノ酸変異がワクチンエスケープ変異として知られているが、G145R は最も主要なワクチンエスケープ変異である[28]。

## 2. 目的

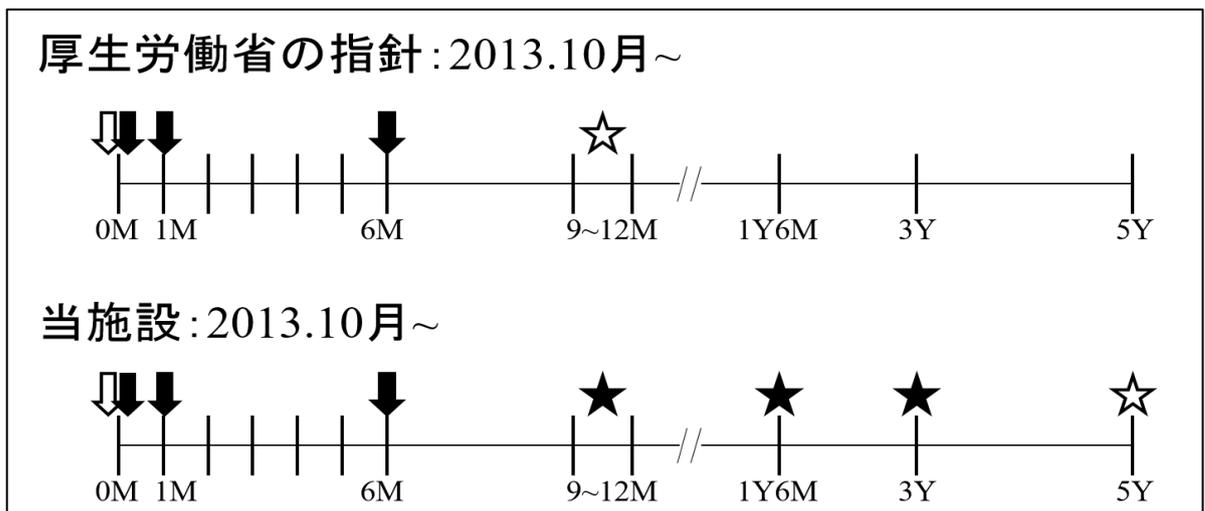
HBV 母子感染予防措置後の OBI に関しては、海外からの報告はあるが[29-32]、本邦における有病率の報告はない。本研究では、自治医科大学とちぎ子ども医療センターにおける母子感染予防措置完了後の OBI の有病率を検討することで、日本における母子感染予防措置の有効性を検討すること、また HBV 母子感染予防措置後 OBI の臨床経過、さらに感染した母子の HBV DNA の分子生物学的解析から、予防措置後 OBI の臨床的特徴、ならびに HBV 遺伝子変異と OBI の関連について検討することを目的とした。

### 3. 方法

#### 3.1. 対象

対象は 2002 年 1 月から 2014 年 12 月の 13 年間に HBs 抗原陽性の HBV キャリア母体から出生し自治医科大学とちぎ子ども医療センターで規定の母子感染予防措置を完遂した児とし、母子感染予防措置過誤に起因する母子感染例は除外した。当施設では、HBV 母子感染予防措置後、生後 9~12 か月時、1 歳 6 か月時、3 歳時、5 歳時に効果判定として、HBs 抗原量、HBs 抗体価を測定しており、また 3 歳までは HBe 抗体価も同時に測定している（図 3）。診療録からこれらの HBV 関連血清マーカーを後方視的に抽出した。HBV 母子感染例では、児および母の血清から DNA を抽出し、nested PCR 法を用いて S 遺伝子領域の HBV DNA 定性を実施し、リアルタイム PCR 法で HBV DNA の定量を行った。さらに HBV 遺伝子の全塩基配列を決定し、母子間の HBV 遺伝子の相同性、および S 遺伝子領域、preC 領域、core promoter 領域における変異の有無を確認した。

図 3 HBV 母子感染予防措置後の経過観察



白抜き矢印 (⇩) は HBIG、黒矢印 (⇩) は HB ワクチンの投与を受けたポイントを表す。  
白抜き星印 (☆) は HBs 抗原、HBs 抗体、黒星印 (★) は HBs 抗原、HBs 抗体、HBe 抗体  
を検査したポイントを表す。

### 3.2. 倫理的承認

本研究は、自治医科大学研究倫理委員会の承認（臨 A\_16-167、臨\_A16-029）を得て実施した。検体の採取と保存は、保護者から書面による同意を得て行い、診療録のデータ使用に関しては、情報公開文書を自治医科大学小児科学講座のホームページ上に掲載し、研究対象者等が情報の使用を拒否できる機会を保障し、また代諾者によるオプトアウトを可とした。

### 3.3. 血清 HBV マーカーと HBV DNA の検出法

HBs 抗原量、HBs 抗体価、HBc 抗体価は当施設内で検査キット（アボットジャパン株式会社、千葉）を用いて測定した。HBV DNA の定性法による検出は、血清 10~100  $\mu$ l から核酸抽出キットであるスマイステスト EX-R&D（日本ジェネティクス株式会社、東京）を用いて DNA を抽出したのち、既報に従い S 遺伝子領域を nested PCR 法で増幅して実施した[33]。プライマー配列を表 1 に示す。PCR 法の概略を示すと、Ampli-Taq DNA ポリメラーゼ（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、神奈川）を PCR 酵素として用い、PCR 装置はサーマルサイクラー（タカラバイオ株式会社、滋賀）を使用した。First-round PCR（1<sup>st</sup> PCR）は、サイクル開始前の熱変性（Initial denaturation）を 94°C で 2 分行ったのち、①熱変性（Denaturation）は 94°C で 30 秒、②アニーリング（Annealing）を 55°C で 30 秒、③伸長反応（Extension）を 72°C で 90 秒を 1 サイクル（以下、94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 90 秒と表記）とし、この 3 ステップを 35 サイクル行い目的とする PCR 産物を増幅した。Second-round PCR（2<sup>nd</sup> PCR）は、同じく Ampli-Taq DNA ポリメラーゼを用いて、25 サイクル（94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 75 秒）で増幅した。アガロースゲル電気泳動を用いて 2<sup>nd</sup> PCR で得られた PCR 産物が目的の DNA であるかどうかを確認した。

### 3.4. HBV DNA の定量

HBV DNA の定量は、既報に従いリアルタイム PCR システム LightCycler® 2.0 Instrument (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社、東京) を用いて行った[34]。定性法と同様の方法で血清から DNA を抽出後、プライマー (TBF-1、TBR-1) と蛍光標識プローブ (TP-02) を用いて PCR による増幅を行った。プローブは、5'末端が FAM (蛍光標識)、3'末端が TAMRA (クエンチャー物質) で修飾されている。プライマーとプローブの塩基配列を表 2 に示す。PCR 条件は、Initial denaturation を 95°C で 10 分行ったのち、50 サイクル (95°C 10 秒, 58°C 5 秒, 62°C 30 秒) で増幅した。10~10<sup>5</sup> ま で 5 段階の濃度勾配をつけたスタンダードを用いて HBV DNA 量を決定した。

**表 1 S 遺伝子領域の nested PCR に用いたプライマーの配列**

	プライマー名	プライマー配列 (5'-3')	注釈*
HB095	1 <sup>st</sup> PCR sense	GAG TCT AGA CTC GTG GTG GAC	nt 244~264
HB184	1 <sup>st</sup> PCR antisense	CGA ACC ACT GAA CAA ATG GCA C	nt 683~704
HB097	2 <sup>nd</sup> PCR sense	GAC TCG TGG TGG ACT TCT CTC	nt 251~271
S2-2	2 <sup>nd</sup> PCR antisense	GGC ACT AGT AAA CTG AGC CA	nt 668~687

\*塩基配列部位は 3,215 塩基長の genotype C (C2) の HBV 株 (AB033550) に準じている

**表 2 リアルタイム PCR に用いたプライマーとプローブの配列**

		プライマー配列 (5'-3')	注釈*
Sense primer	TBF-1	AGA CTC GTG GTG GAC TTC TCT CA	nt 250-272
Antisense primer	TBR-1	TGA GGC ATA GCA GCA GGA TG	nt 409-428
プローブ	TP-02	TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT T	nt 368-392

\*塩基配列部位は 3,215 塩基長の genotype C (C2) の HBV 株 (AB033550) に準じている

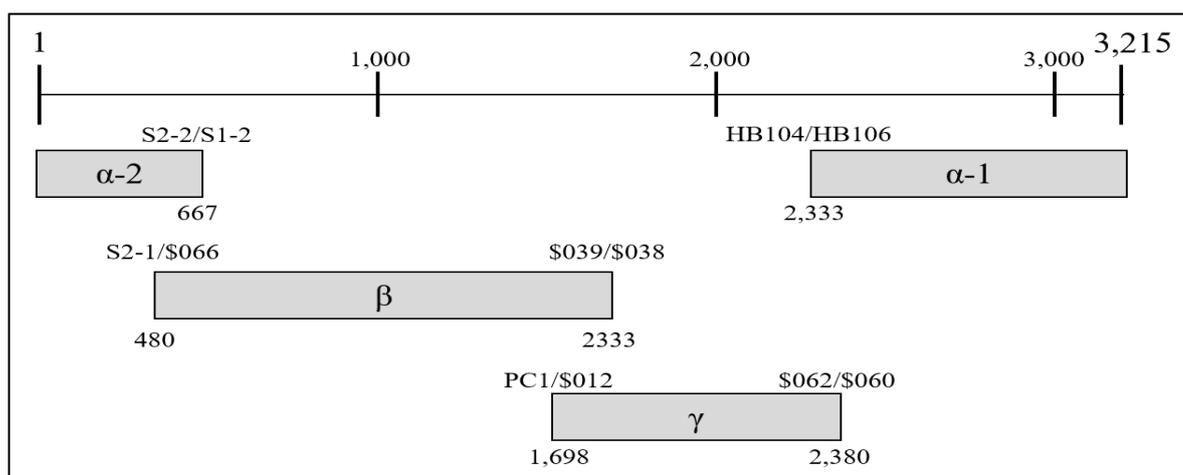
### 3.5. HBV 遺伝子の全塩基配列の決定と分子系統解析

HBV 遺伝子の全塩基配列の決定は、図 4 の如く全遺伝子をそれぞれオーバーラップする 3 領域 ( $\alpha\sim\gamma$ ) に分け、それぞれの領域を nested PCR 法で増幅し[6, 35]、HBV DNA の全塩基配列を決定した。

*TaKaRa Ex Taq* (タカラバイオ株式会社、滋賀) を PCR 酵素として用い、サーマルサイクラーを使用して目的とする産物の増幅を行った。PCR は、3 領域ともに以下に示す同一の条件で実施した。1<sup>st</sup> PCR、2<sup>nd</sup> PCR とともに 94°C 2 分で Initial denaturation を行ったのち、1<sup>st</sup> PCR は 35 サイクル (94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 120 秒)、2<sup>nd</sup> PCR は 25 サイクル (94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 75 秒) でそれぞれ増幅反応を行った。プライマー配列を表 3 に示す。

得られた PCR 産物は、FastGene<sup>TM</sup> ゲル/PCR 抽出キット (日本ジェネティクス株式会社、東京) を用いて精製したのちに、BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (日本ジェネティクス株式会社、東京)、ABI PRISM 3130xl genetic analyzer (サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社、神奈川) を用いて塩基配列の解析 (シーケンス) を行った。得られた DNA のシーケンス解析は遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX version 13.0.3 (ゼネティクス株式会社、東京) を用い、マルチプルアライメントは CLUSTAL Omega version 1.2.0 を用いて解析した[36]。分子系統解析は、MEGA6 version 6.0.6 を使用し、木村の 2 パラメータモデル (Kimura two-parameter model) と bootstrap 法を用いた近隣結合法 (neighbor-joining 法) を用いて系統樹を作成した[37]。

図4 HBV 遺伝子の全塩基配列の決定



塩基番号は3,215塩基長のgenotype C (C2) のHBV株 (AB033550) に準じている。

グレーのブロックは、α領域、β領域、γ領域の断片を示す。ブロックの左上はsense primer、右上はantisense primerであり、それぞれの左側は1<sup>st</sup> PCR、右側は2<sup>nd</sup> PCRで用いたプライマー名を示す。ブロックの下段は、プライマー配列を除いた、PCR産物の塩基配列部位を示す。

表3 全塩基配列の決定に用いたプライマー配列

HBV 全塩基配列の決定 (α 領域)

プライマー名	プライマー配列 (5'-3')	注釈*
HB104 1 <sup>st</sup> PCR sense	AGA CCA CCA AAT GCC CCT ATC	nt 2,297~2,317
S1-2 1 <sup>st</sup> PCR antisense	CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC	nt 685~704
HB106 2 <sup>nd</sup> PCR sense	CCC CTA TCY TAT CMA CAC TTC CG	nt 2,310~2,332
S2-2 2 <sup>nd</sup> PCR antisense	GGC ACT AGT AAA CTG AGC CA	nt 668~687

HBV 全塩基配列の決定 (β 領域)

プライマー名	プライマー配列 (5'-3')	注釈*
S2-1 1 <sup>st</sup> PCR sense	CAA GGT ATG TTG CCC GTT TG	nt 455~474
\$038 1 <sup>st</sup> PCR antisense	AAA GTT GCA TGG TGC TGG TG	nt 1,804~1,823
\$066 2 <sup>nd</sup> PCR sense	TAT GTT GCC CGT TTG TCC TC	nt 460~479
\$039 2 <sup>nd</sup> PCR antisense	ATG GTG CTG GTG AAC AGA CC	nt 1,796~1,815

HBV 全塩基配列の決定 (γ 領域)

プライマー名	プライマー配列 (5'-3')	注釈*
PC1 1 <sup>st</sup> PCR sense	CAT AAG AGG ACT CTT GGA CT	nt 1,653~1,672
\$060 1 <sup>st</sup> PCR antisense	GAT TGA GAT CTT CTG CGA CG	nt 2,414~2,433
\$012 2 <sup>nd</sup> PCR sense	AAT GTC AAC GAC CGA CCT TG	nt 1,679~1,698
\$062 2 <sup>nd</sup> PCR antisense	CTT CGT CTG CGA GGC GAG GG	nt 2,381~2,400

\*塩基配列部位は 3,215 塩基長の genotype C (C2) の HBV 株 (AB033550) に準じている

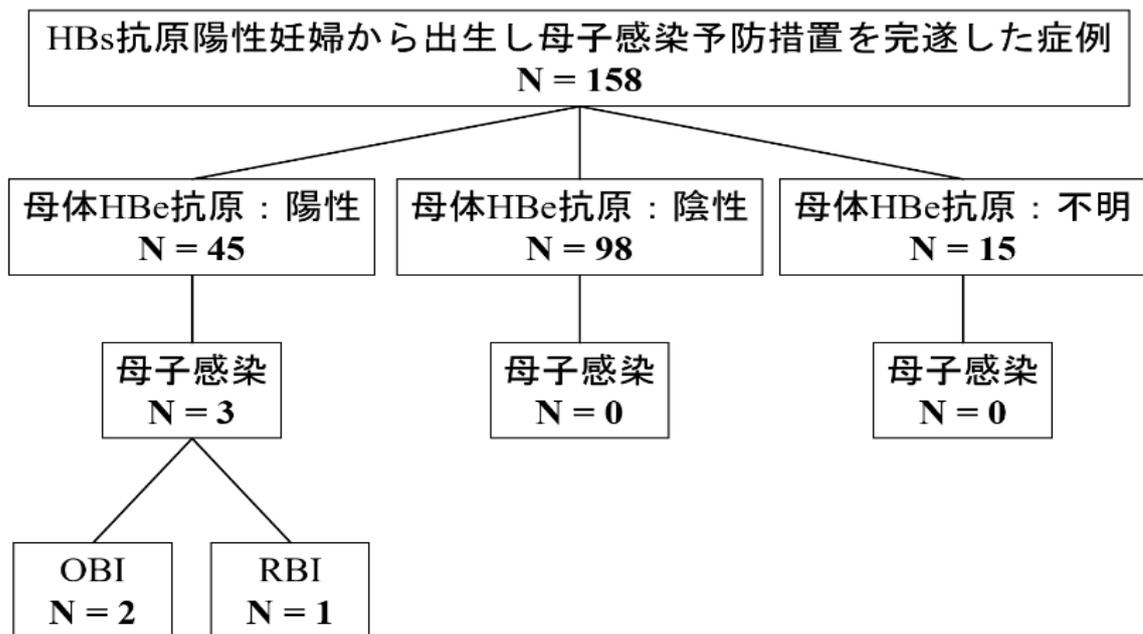
## 4. 結果

### 4.1. OBI と RBI の有病率について

図 5 に示すように HBs 抗原陽性母体から出生した児、総数 158 例が HBIG と HB ワクチンを用いた HBV 母子感染予防措置を完遂した。HBe 抗原陽性母体から出生した児は 45 例、HBe 抗原陰性母体から出生した児は 98 例、HBe 抗原不明が 15 例であった。158 例中、HBV DNA が陽性となり、OBI と診断されたのは 2 例（症例 1 と症例 2）であり、何れも HBe 抗原陽性母体からの出生児であった。また同じく HBe 抗原陽性母体から出生した 1 例（症例 3）が RBI であった。母子感染予防措置を完遂した 158 例中 3 例（1.9%）で HBV 母子感染が発生しており、当施設における OBI と RBI の有病率は、それぞれ 1.3%（2/158）、0.6%（1/158）であると推定された。HBe 抗原陽性 HBV キャリア母体からの出生児に限ると、OBI 4.4%（2/45）、RBI 2.2%（1/45）となる。

図 5 HBs 抗原陽性妊婦からの出生児の内訳と母子感染予防措置後の結果

（文献 52 より引用、一部改変）



OBI : occult HBV infection, RBI : resolved HBV infection

#### 4.2. 母子感染をきたした各症例の経過

症例 1 は HBV 母子感染予防措置の継続で血液中からウイルスは排除された。症例 2 は母子感染予防措置終了後も HBIG を用いた免疫学的予防を継続したが、最終的に顕性感染となった。

RBI と診断された症例 3 を含めた 3 症例の臨床経過を以下に示す。3 症例とその母の特徴を表 4 に示す。

表 4 HBV 母子感染例とその母の特徴 (文献 52 より引用、一部改変)

	症例 1		症例 2		症例 3	
	OBI		OBI		RBI	
HBe 抗原	+		+		+	
HBV DNA (copies/ml)	$2.5 \times 10^9$		$8.1 \times 10^9$		$4.4 \times 10^9$	
母 Genotype (subgenotype)	C (C2)		C (C2)		C (C2)	
PreC 領域	野生株		野生株		野生株	
Core promoter 領域	野生株		野生株		A1762T/G1764A	
分娩様式	経膈分娩		経膈分娩		経膈分娩	
	1 か月	5 か月	1 か月	5 か月	1 か月	6 か月
児 HBs 抗原 (IU/ml)	-	-	0.23	-	0.01	0.00
HBs 抗体 (IU/L)	54.6	123.8	13.22	107.96	109.79	109.09
HBV DNA (copies/ml)	$3.8 \times 10^2$	$<2.0 \times 10$	$3.2 \times 10^3$	$3.2 \times 10^3$	-	-
相同性 (塩基配列)	100%	NA	100%	NA	NA	NA

OBI, occult HBV infection; RBI, resolved HBV infection; NA, not available.

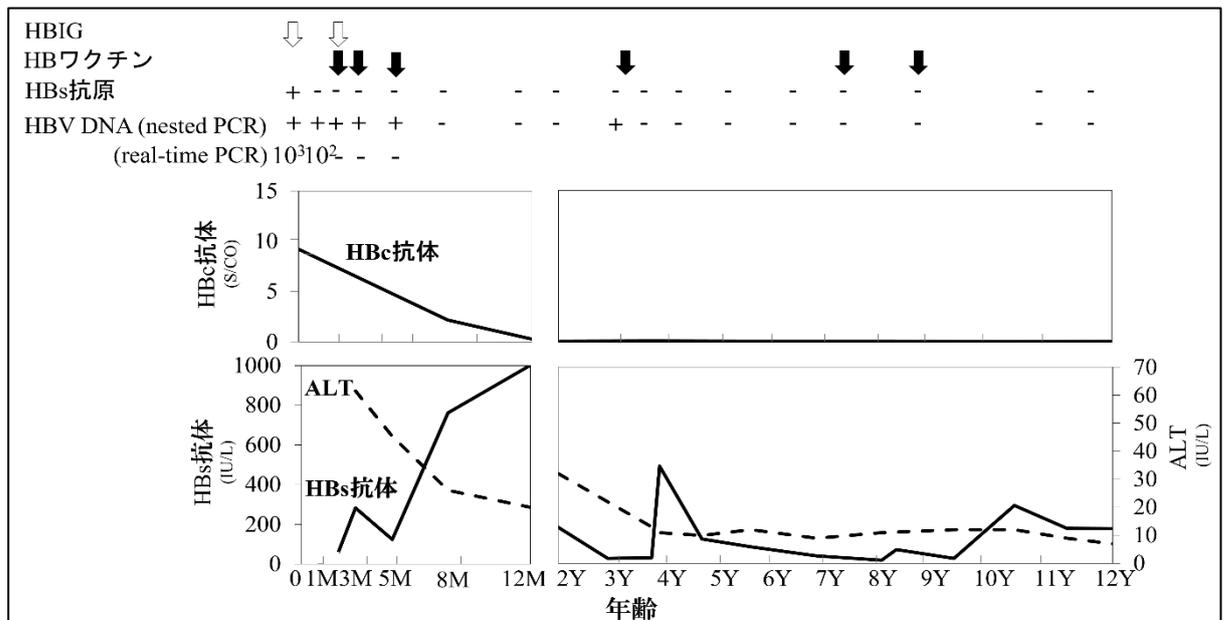
#### 4.2.1. 症例 1 の経過 (図 6)

症例 1 は、HBV DNA  $2.5 \times 10^9$  copies/ml の高ウイルス量 HBV キャリア母体から経膈分娩で出生し (表 4)、出生直後に HBIG が投与された。日齢 2 の血清 HBs 抗原と HBV DNA はいずれも陽性であったが、母子感染予防措置は継続され、予定通りのスケジュールを完遂した。日齢 2 の血清 HBV DNA 量は、 $1.7 \times 10^3$  copies/mL であった。HBs 抗原は 1 か月時に陰性化し、生後 2 か月時から HBs 抗体が陽転したが、HBs 抗体価が低値であった出生時から生後 5 か月までの期間は、nested PCR 法を用いた定性では HBV DNA は陽性であった。母子感染予防措置が完了し、HBs 抗体価が 700 IU/ml を超えた生後 8 か月時から HBV DNA は陰性化した。経過中、HBs 抗体価が 30 IU/ml を下回った 3 歳時に一過性に HBV DNA が検出されたが、ワクチンの追加接種で HBs 抗体価が再上昇した後は再び陰性化した。日齢 2 に採取された血清から分離された HBV 遺伝子には、preC 領域における G1896A などの HBe 抗原を陰性化に導く変異や HBs 抗原蛋白の抗原性に変化をもたらすエスケープ変異はなかった。

症例 1 の兄は、規定の HBV 免疫学的予防を完遂し、母子感染はきたしていない。

図 6 症例 1 の経過

(文献 52 より引用、一部改変)



HBV DNA は nested PCR による定性法、real-time PCR による定量法で検出した。

白抜き矢印 (↓)、黒矢印 (↓) はそれぞれ HBIG、HB ワクチンの投与を受けたポイントを表す。

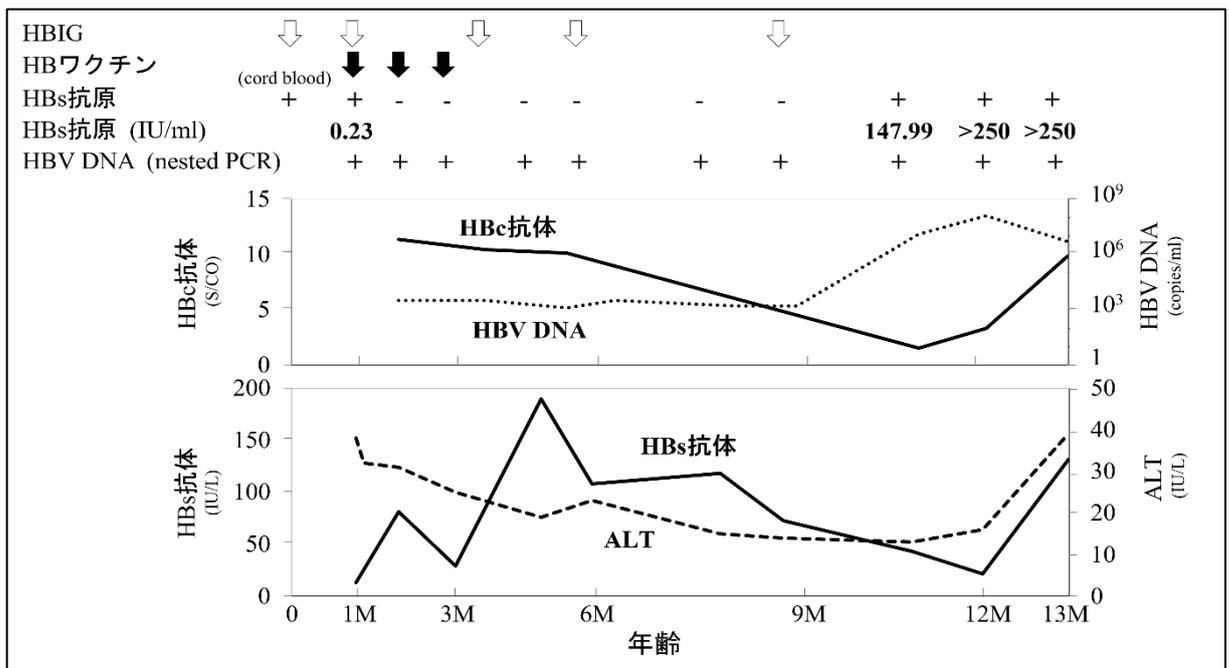
#### 4.2.2. 症例 2 の経過 (図 7)

症例 2 は、HBV DNA 量  $8.1 \times 10^9$  copies/ml の HBs 抗原陽性母体から経膈分娩で出生した (表 4)。出生直後に HBIG の筋注が施行されたが、臍帯血の HBs 抗原は陽性であった。生後 1 か月時の HBs 抗原 0.23 IU/ml (基準値  $<0.05$  IU/ml) と弱陽性であり、HBs 抗体 13.22 IU/L、血中 HBV DNA 量  $3.2 \times 10^3$  copies/ml であったが、HBV 排除目的に母子感染予防措置は継続された。HBs 抗原は生後 2 か月時に一旦陰性化し生後 9 か月時までは陰性であったが、生後 10 か月時に再び検出されるようになり、HBV DNA 量も  $1.3 \times 10^7$  copies/ml と上昇した。G145R 変異は、生後 1 か月時には検出されなかったが、3 回の HB ワクチンと 4 回の HBIG が終了した生後 8 か月時に minor population として出現し、顕性感染となった生後 10 か月時には G145R 変異株に入れ替わっていた (表 5)。

症例 2 の兄は、規定の HBV 免疫学的予防を完遂し、母子感染はきたしていない。

図 7 症例 2 の経過表

(文献 52 より引用、一部改変)



HBV DNA は nested PCR による定性法で検出した。

白抜き矢印 (↓)、黒矢印 (↓) はそれぞれ HBIG、HB ワクチンの投与を受けたポイントを表す。

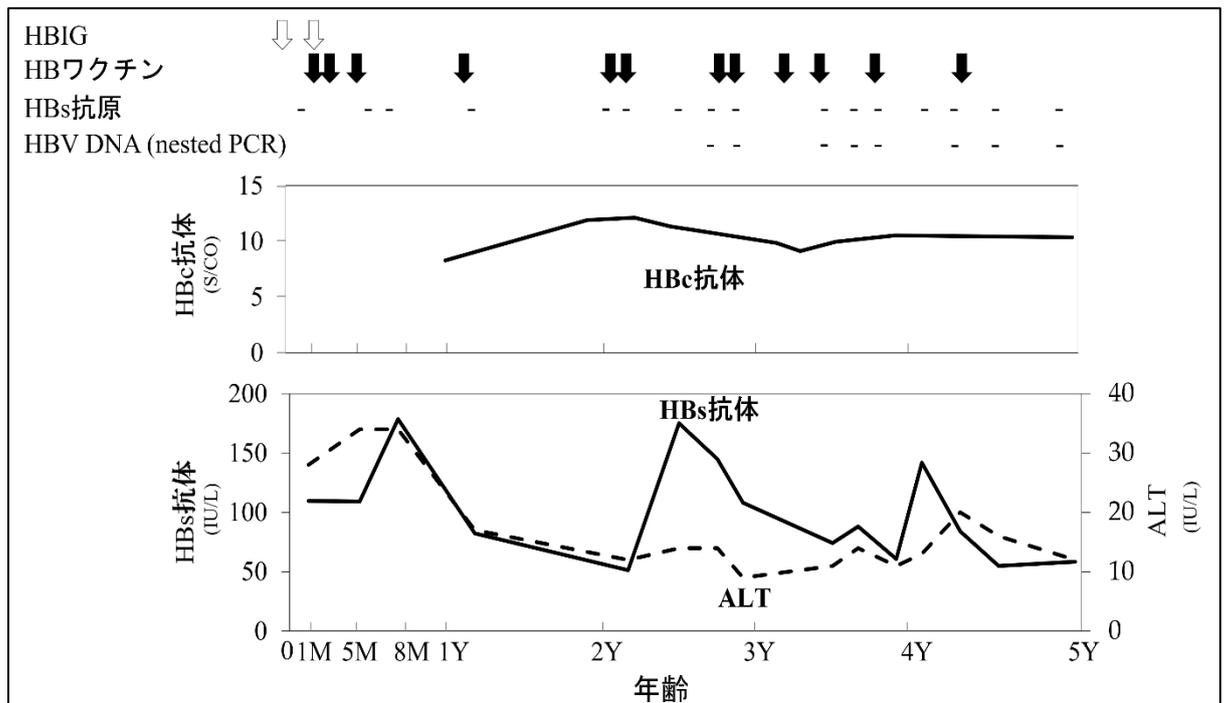
#### 4.2.3. 症例3の経過 (図8)

症例3は、HBV DNA 量  $4.4 \times 10^9$  copies/ml の HBe 抗原陽性 HBV キャリア母体から経膈分娩で出生し (表4)、規定通りの母子感染予防措置を完遂した。生後1か月時から母子感染予防措置を完遂した後の5歳時まで HBs 抗原は持続的に陰性であったが、HBs 抗体価は緩徐に低下し、抗体価維持を目的として HB ワクチンを追加接種した。HBV DNA は一度も検出されていないが、HBc 抗体価は観察期間中 10~12 S/CO と高力価で推移していた。2歳時に血清 500  $\mu$ L を用いて HBV DNA の検出を試みたが、DNA は検出されず、また、肝組織中の HBV ウイルス量を反映するとされる HBV コア関連抗原 (HBcrAg) も陰性であった。本例は、HBV 粒子が肝細胞内に存在しているかどうかは確認できていないが、HBc 抗体高力価から RBI と診断した。

本児の妹は規定の母子感染予防措置を完遂し、9か月時に HBc 抗体は陰性化した。

図8 症例3の経過表

(文献52より引用、一部改変)



HBV DNA は nested PCR による定性法で検出した。

白抜き矢印 (⇩)、黒矢印 (⇩) はそれぞれ HBIG、HB ワクチンの投与を受けたポイントを表す。

#### 4.3. 分離された HBV 遺伝子の比較

症例 1 と症例 2、およびそれぞれの母、そして症例 3 の母から分離された HBV DNA の全塩基配列を決定し、DDBJ/EMBL/GenBank のデータバンクに登録した。それら配列のアクセッション番号は LC155814-LC155820 である。分離されたすべての HBV の遺伝子型は genotype C であり、さらに subgenotype は C2 であった (図 9)。症例 1 の HBV では nt 336 が T と C の混合塩基であったが、母の HBV との相同性は 100% であった。症例 2 と母の HBV は 100% 一致していた。また、症例 3 の母の HBV 遺伝子には、core promoter 領域に A1762T と G1764A の 2 つ変異を認めた (表 4)。

表 5 S 遺伝子のアミノ酸配列の subgenotype C2 コンセンサス株との比較

(文献 52 より引用、一部改変)

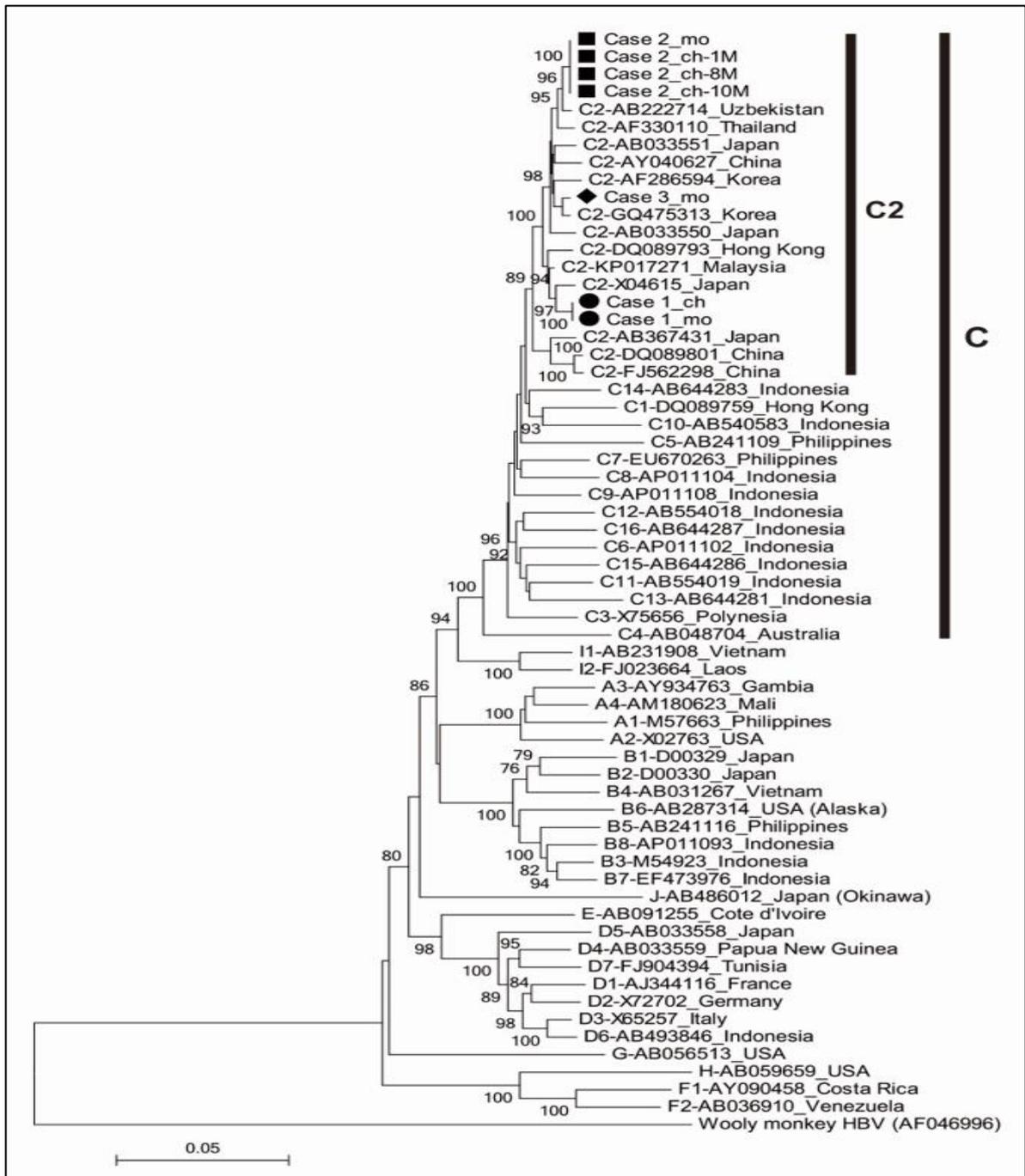
アミノ酸 position	Ref*	症例 1 (C1)		症例 2 (C2)				症例 3 (C3)
		C1_母	C1	C2_母	C2_1M	C2_8M	C2_10M	C3_母
3	N/S	N	N	S	S	S	S	S
7	G	G	G	G	G	G	G	G/R
20	F	F	F	F	F	F	F	F/S
61	S	S	S/L	S	S	S	S	S
68	I/T	T	T	I	I	I	I	I
98	L	L	L	L	L	L	L	L/V
103	M	M	M	M	M	M	M	M/I
123	T	T	T	T	T	T	T	T/A
132	S	S	S	S	S	S	S/F	S
145	G	G	G	G	G	<b>G/R<sup>†</sup></b>	<b>R<sup>†</sup></b>	G
184	A/V	V	V	A	A	A	A	A

\*参照配列は日本で分離された Core promoter 領域と preC 領域に変異のない subgenotype C2 の野生株 18 株を用いた (AB026815, AB033550-AB033553, AB033556-AB033557, AB113879, AB198077, AB198080-AB198081, AB205124, AB362932, AB368296, AB670247, AB670283, AY123041 and X04615)。

†ワクチンエスケープ変異 (G145R) を太字で示す。

図 9 分子系統樹

(文献 52 より引用、一部改変)



全塩基長を決定した遺伝子型 A~J の 62 種の HBV 株に今回の症例とその母を含め neighbor-joining 法で作成した分子系統樹である。ウーリーモンキーHBV (AF046996) を outgroup とし て用いている。症例 1~3 (Case 1~Case 3) はそれぞれ、黒丸 (●)、黒四角 (■)、黒ダイヤ (◆) で示している。

「ch」と「mo」はそれぞれ児と母から分離された株を表しており、「1M」「8M」「10M」は、それぞれ検体が採取された月齢を表している。縦の実線は genotype C、および subgenotype C2 を示している。

## 5. 考察

HBs 抗原陽性母体から出生し母子感染予防措置を実施した児における OBI の有病率は、当施設では 1.3%であったが、報告により大きく異なる。エジプト 1.6%[22]、マヨット（フランス領；アフリカ）2.0%[38]、中国 4.9%[31]と低い有病率の報告もあれば、台湾 10.9%[29]、イラン 28.0%[30]、インド 41.8%[39]と高率な報告もある。このように著しい差異が生じる理由ははっきりしていないが、HBV の遺伝子型、ウイルス量、予防措置法、サンプルサイズ、妊婦と出生児の選定基準などが影響している可能性がある。今回の当施設の症例では、OBI はすべて HBe 抗原陽性母体からの出生児であり、母のウイルス量も  $10^9$  copies/ml を超える高ウイルス量であった。母子感染予防措置成功例における HBe 抗原陽性妊婦の HBV DNA 量（42 例中 14 例で測定）の中央値は、 $4.7 \times 10^7$  copies/ml ( $7.9 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^9$  copies/ml) であり、9 例が  $10^7$  copies/ml 以上で、 $10^9$  copies/ml を上回る母体もあった。HBe 抗原陽性の高ウイルス量母体からの出生児は OBI のハイリスクではあるが、高ウイルス量であるからといって必ずしも OBI となるとは限らない。高ウイルス量の HBs 抗原陽性妊婦に対して、母子感染予防を目的として妊娠中に核酸アナログ製剤を用いた抗ウイルス療法を実施する国もあるが、今回の当施設の症例では抗ウイルス療法を施行した症例はない。よって、妊娠中の抗ウイルス療法が今回検討した OBI の有病率に影響を与えた可能性はない。

母子感染予防対策では、出生児の HBs 抗原や HBV DNA の確認はせずに母子感染予防措置を完遂することを推奨している。今回の OBI の 2 症例（症例 1 と症例 2）は、それぞれ日齢 2 と生後 1 か月時の血清 HBs 抗原が陽性であったことから HBV 感染が疑われ、HBV DNA を検査したことで HBV 感染と判明した。母子感染予防措置後、HBs 抗体価が 10 IU/L を上回っていた場合、HBV に対して免疫状態に達したと判断される[40]。本邦の HBV 母子感染予防対策でも、生後 9~12 か月時に HBs 抗原と HBs 抗体を確認し、HBs 抗原陰性で、かつ HBs 抗体価が  $>10$  IU/L であれば予防措置成功と判断される（図 3）。本 2 例が同様に HBs 抗原検出と HBs 抗体価のみで予防

措置後の効果判定を行っていたら、2症例ともに母子感染予防措置成功例とみなされていた可能性がある。また、症例3ではHBc抗体価を調べていなければRBIと診断されることはなかった。今回の結果は、新生児に対するHBs抗原検査を推奨するものではなく、母子感染予防措置に成功したと考えられている症例の中にOBIやRBIの症例が紛れ込んでいる可能性を認識して予防措置後の経過観察を行うことの重要性、そしてOBI・RBIのスクリーニング検査としてのHBc抗体価モニタリングの有用性を示している。Hsuらも、HBVによる免疫されたHBs抗原陰性の症例に対するOBIのスクリーニングとしてHBc抗体価を用いることを推奨している[41]。

症例1は、HBVに対する能動免疫予防の継続がウイルスの複製を抑制し、結果的に顕性感染を回避できたと考えている。しかしながら、観察期間中HBs抗体価が30 IU/Lを下回った時期に、非常に低いレベルではあるが一過性にHBV DNAが血中より検出された。この結果から、HBs抗体価はある一定の値以上に保つ必要があることが示唆される。Sadeghiら[32]は、母子感染予防措置後にOBIと診断された17例全例が、7歳までにウイルスを排除したと報告しており、彼らは生後にHBワクチンとHBIGを用いてHBs抗体価を適切なレベル(>100 IU/L)に保つことでウイルスを排除できる可能性があると結論づけている。症例2は、HBVに対する免疫学的予防後、S遺伝子領域にエスケープ変異(G145R)が出現した。ウイルス量が非常に少なければ、HBIGでウイルスを中和することで排除できた可能性もあると考えている。対照的に高ウイルス量の場合(症例2ではウイルス量は $10^3$  copies/mlであった)は、200単位のHBIGではウイルスを中和、排除するには十分ではなかった可能性がある。Foaudらは、HBs抗体価が $\geq 100$  IU/Lの場合に免疫状態と判断し、HBs抗体価が10~100 IU/Lであれば十分な抗体獲得ができていないと考え、追加ワクチンを接種すると報告している[22]。また、移植領域ではHBc抗体陽性ドナー肝を用いて移植を実施する場合には、*de novo* HBV感染症を予防する目的でHBIG and/or ラミブジンをレシピエントに投与する[42]。その際に用いられるHBIGの投与量は、肝移植術中の無肝期

(anhepatic phase) に 10,000 単位、移植 1 日目、2 日目にそれぞれ 5,000 単位である。さらに、その後も HBs 抗体価を  $\geq 100$  IU/L に保つように定期的に HBIG 1,000 単位を追加投与している[42]。HBs 抗体価はワクチン接種後時間とともに低下するが[43-45]、一度 HBV に対する免疫を獲得すれば免疫学的記憶は 15 年間持続すると報告されており[43, 45-48]、感染予防目的のワクチン接種による追加免疫は必要ないとされている[14]。しかしながら、Wu らは HBs 抗原陽性母体から出生し、幼児期に母子感染予防措置を受けた若年者における慢性 HBV 感染症の有病率は 15.5% (58/373) であったと報告している[49]。彼らの報告は、HBs 抗原に対する免疫学的記憶は予防措置後 15 年以上経過すると消失する可能性があることを示唆している。そのような症例に対してはワクチン接種による追加免疫が必要であるかもしれない。

HBV は逆転写過程での校正機構を欠いているため、他の DNA ウイルスに比べ変異をきたしやすいことが特徴である[50]。宿主の免疫機構、受動免疫、抗ウイルス療法といった選択圧 (selective pressure) がウイルスの遺伝子変異を誘導する。表面抗原である HBs 抗原における変異はウイルスの免疫認識を低下させる。ワクチンや HBIG によって誘導されるエスケープ変異のほとんどが、共通決定基「a」とともに反応すると報告されている。G145R 変異は、1990 年代初頭に初めて報告された、HBV の表面蛋白に存在する変異の中で最も報告の多いエスケープ変異である[28]。イランや台湾からの報告では、HBV 母子感染予防措置を行った小児における OBI 症例中、それぞれ 71% (10/14)、44% (7/16) で G145R 変異を認めたと報告されている[30, 41]。一方で、同じイランでも別の施設、そして中国からの報告では、OBI 小児において G145R 変異はなかったとされている[31, 51]。なぜこのような相違があるのかははっきりしないが、母子感染予防措置に導入時期 (台湾では、1984 年より母子感染予防措置を導入) による母の変異株保有率などさまざまな要因が OBI に影響しているものと考えられる。

今回報告した OBI 症例の HBV 株はいずれも野生株であり、全塩基配列を決定し

比較した母との一致率も 100%であったこと、また同胞は通常の免疫学的予防で母子感染を来していないことなどから、OBIに関わるウイルス側の要因はないと考えられた。症例 2 においては、G145R 変異株の出現によって顕性感染に至っており、HBIG では中和しきれない変異ウイルスが免疫系をエスケープしたことに起因するものと考えられた。

## 6. 結論

当施設における HBs 抗原陽性母体から出生し母子感染予防措置を完遂した小児の OBI 有病率は低い (1.3%) ことが判明した。しかしながら、小児における OBI の有病率と臨床経過はいまだ不明な点も多い。小児における OBI の有病率とその臨床経過、そして母子感染予防措置における至適 HBs 抗体価を解明するためには、より大きな規模での研究が必要である。

また、HBV 母子感染予防を完遂し HBs 抗原が陰性、かつ HBs 抗体価が 10 IU/L を上回っていたとしても、OBI や RBI の症例が存在する可能性があり、HBV 母子感染は完全には否定できないことが示された。母からの移行抗体である HBc 抗体の陰性化を確認することが OBI・RBI のモニタリング検査として有用である可能性が示唆された。

## 7. 謝辞

研究の機会を与えてくださり、終始励ましてくださった小児科学講座の山形崇倫主任教授に御礼を申し上げます。また、研究計画や論文作成にあたり、懇切丁寧にご指導頂きました感染免疫学講座ウイルス学部門の岡本宏明教授に深謝申し上げます。さらに、DNA 抽出や HBV 塩基配列決定に際しご指導を頂きましたウイルス学教室の高橋雅春先生、西澤 勉先生、長嶋茂雄先生、論文作成にあたりご指導頂きました熊谷秀規先生に感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1 Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "NEW" ANTIGEN IN LEUKEMIA SERA. *JAMA*;191(541-546; 1965.
- 2 Okochi K, Murakami S. Observations on Australia antigen in Japanese. *Vox Sang*;15(5):374-385; 1968.
- 3 Prince AM. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*;60(3):814-821; 1968.
- 4 Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*;1(7649):695-698; 1970.
- 5 岡本宏明. B型肝炎ウイルスの変異と病態. *肝臓*;38(8):477-488; 1997.
- 6 Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, Hiruma K, Tsuda F, Nishizawa T, Takahashi M, Okamoto H. Characterization of seven genotypes (A to E, G and H) of hepatitis B virus recovered from Japanese patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Med Virol*;76(1):24-32; 2005.
- 7 Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol*;69 ( Pt 10)(2575-2583; 1988.
- 8 Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*;81(Pt 1):67-74; 2000.

- 9 Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol*;83(Pt 8):2059-2073; 2002.
- 10 Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol*;82(11):5657-5663; 2008.
- 11 Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*;83(20):10538-10547; 2009.
- 12 Kramvis A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology*;57(3-4):141-150; 2014.
- 13 Yoshikawa A, Gotanda Y, Suzuki Y, Tanaka M, Matsukura H, Shiraishi T, Matsubayashi K, Kon E, Suzuki K, Yugi H. Age- and gender-specific distributions of hepatitis B virus (HBV) genotypes in Japanese HBV-positive blood donors. *Transfusion*;49(7):1314-1320; 2009.
- 14 WHO. Hepatitis B. <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Accessed January 31, 2018.
- 15 海嶋照美, 片山恵子, 田中純子. ウイルス性肝炎の最新疫学. *保健師ジャーナル*;73(6):475-480; 2017.
- 16 横須賀収, 河井重信. B型肝炎ウイルス感染症. In: 白鳥康史 ed. ウイルス肝炎 update. 東京: 中外医学社:75-85; 2005.

- 17 WHO. Guidelines for the Prevention, Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis B Infection. <http://www.who.int/hiv/pub/hepatitis/hepatitis-b-guidelines/en/>. Accessed January 31, 2018.
- 18 藤澤知雄. わが国の B 型肝炎予防体制の現状と課題 (第 1 土曜特集 小児用ワクチン Update) -- (予防接種各論). *医学のあゆみ*;244(1):105-111; 2013.
- 19 Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Brechot P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? *Hepatology*;34(1):194-203; 2001.
- 20 van Hemert FJ, Zaaijer HL, Berkhout B, Lukashov VV. Occult hepatitis B infection: an evolutionary scenario. *Virology*;5(146); 2008.
- 21 Raimondo G, Caccamo G, Filomia R, Pollicino T. Occult HBV infection. *Semin Immunopathol*;35(1):39-52; 2013.
- 22 Foaud H, Maklad S, Mahmoud F, El-Karakasy H. Occult hepatitis B virus infection in children born to HBsAg-positive mothers after neonatal passive-active immunoprophylaxis. *Infection*;43(3):307-314; 2015.
- 23 Shouval D, Shibolet O. Immunosuppression and HBV reactivation. *Semin Liver Dis*;33(2):167-177; 2013.
- 24 Zachou K, Sarantopoulos A, Gatselis NK, Vassiliadis T, Gabeta S, Stefos A, Saitis A, Boura P, Dalekos GN. Hepatitis B virus reactivation in hepatitis B virus surface antigen negative patients receiving immunosuppression: A hidden threat. *World J Hepatol*;5(7):387-392; 2013.

- 25 Michalak TI, Pasquinelli C, Guilhot S, Chisari FV. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. *J Clin Invest*;93(1):230-239; 1994.
- 26 Chiou HL, Lee TS, Kuo J, Mau YC, Ho MS. Altered antigenicity of 'a' determinant variants of hepatitis B virus. *J Gen Virol*;78 ( Pt 10)(2639-2645; 1997.
- 27 Okamoto H, Imai M, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *J Virol*;61(10):3030-3034; 1987.
- 28 Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet*;336(8711):325-329; 1990.
- 29 Mu SC, Lin YM, Jow GM, Chen BF. Occult hepatitis B virus infection in hepatitis B vaccinated children in Taiwan. *J Hepatol*;50(2):264-272; 2009.
- 30 Shahmoradi S, Yahyapour Y, Mahmoodi M, Alavian SM, Fazeli Z, Jazayeri SM. High prevalence of occult hepatitis B virus infection in children born to HBsAg-positive mothers despite prophylaxis with hepatitis B vaccination and HBIG. *J Hepatol*;57(3):515-521; 2012.
- 31 Su H, Zhang Y, Xu D, Wang B, Zhang L, Li D, Xiao D, Li F, Zhang J, Yan Y. Occult hepatitis B virus infection in anti-HBs-positive infants born to HBsAg-positive mothers in China. *PLoS One*;8(8):e70768; 2013.
- 32 Sadeghi A, Yahyapour Y, Poortahmasebi V, Shahmoradi S, Roggendorf M, Karimzadeh H, Alavian SM, Jazayeri SM. Clearance of HBV DNA in immunized

- children born to HBsAg-positive mothers, years after being diagnosed with occult HBV infection. *J Viral Hepat*;23(4):282-285; 2016.
- 33 Takahashi M, Nishizawa T, Gotanda Y, Tsuda F, Komatsu F, Kawabata T, Hasegawa K, Altankhuu M, Chimedregzen U, Narantuya L, Hoshino H, Hino K, Kagawa Y, Okamoto H. High prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses and viremia of hepatitis B, C, and D viruses among apparently healthy populations in Mongolia. *Clin Diagn Lab Immunol*;11(2):392-398; 2004.
- 34 Jardi R, Rodriguez F, Buti M, Costa X, Cotrina M, Valdes A, Galimany R, Esteban R, Guardia J. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real-time fluorescence PCR assay. *Journal of Viral Hepatitis*;8(6):465-471; 2001.
- 35 Mulyanto, Depamede SN, Surayah K, Tjahyono AA, Jirintai, Nagashima S, Takahashi M, Okamoto H. Identification and characterization of novel hepatitis B virus subgenotype C10 in Nusa Tenggara, Indonesia. *Arch Virol*;155(5):705-715; 2010.
- 36 Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res*;38(Web Server issue):W695-699; 2010.
- 37 Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*;30(12):2725-2729; 2013.
- 38 Chakvetadze C, Roussin C, Roux J, Mallet V, Petinelli ME, Pol S. Efficacy of hepatitis B sero-vaccination in newborns of African HBsAg positive mothers. *Vaccine*;29(16):2846-2849; 2011.

- 39 Pande C, Sarin SK, Patra S, Kumar A, Mishra S, Srivastava S, Bhutia K, Gupta E, Mukhopadhyay CK, Dutta AK, Trivedi SS. Hepatitis B vaccination with or without hepatitis B immunoglobulin at birth to babies born of HBsAg-positive mothers prevents overt HBV transmission but may not prevent occult HBV infection in babies: a randomized controlled trial. *J Viral Hepat*;20(11):801-810; 2013.
- 40 Mast EE, Margolis HS, Fiore AE, Brink EW, Goldstein ST, Wang SA, Moyer LA, Bell BP, Alter MJ. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) part 1: immunization of infants, children, and adolescents. *MMWR Recomm Rep*;54(RR-16):1-31; 2005.
- 41 Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Chiang CL, Wu JF, Chen HL. Universal infant immunization and occult hepatitis B virus infection in children and adolescents: a population-based study. *Hepatology*;61(4):1183-1191; 2015.
- 42 Yoshizawa A, Yamashiki N, Ueda Y, Kaido T, Okajima H, Marusawa H, Chiba T, Uemoto S. Long-term efficacy of hepatitis B vaccination as post-transplant prophylaxis in hepatitis B surface antigen (HBsAg) positive recipients and HBsAg negative recipients of anti-hepatitis B core positive grafts. *Hepatol Res*; 2015.
- 43 Ni YH, Huang LM, Chang MH, Yen CJ, Lu CY, You SL, Kao JH, Lin YC, Chen HL, Hsu HY, Chen DS. Two decades of universal hepatitis B vaccination in taiwan: impact and implication for future strategies. *Gastroenterology*;132(4):1287-1293; 2007.
- 44 But DY, Lai CL, Lim WL, Fung J, Wong DK, Yuen MF. Twenty-two years follow-up of a prospective randomized trial of hepatitis B vaccines without booster dose in children: final report. *Vaccine*;26(51):6587-6591; 2008.

- 45 McMahon BJ, Dentinger CM, Bruden D, Zanis C, Peters H, Hurlburt D, Bulkow L, Fiore AE, Bell BP, Hennessy TW. Antibody levels and protection after hepatitis B vaccine: results of a 22-year follow-up study and response to a booster dose. *J Infect Dis*;200(9):1390-1396; 2009.
- 46 Zanetti AR, Mariano A, Romano L, D'Amelio R, Chironna M, Coppola RC, Cuccia M, Mangione R, Marrone F, Negrone FS, Parlato A, Zamparo E, Zotti C, Stroffolini T, Mele A. Long-term immunogenicity of hepatitis B vaccination and policy for booster: an Italian multicentre study. *Lancet*;366(9494):1379-1384; 2005.
- 47 Zhu CL, Liu P, Chen T, Ni Z, Lu LL, Huang F, Lu J, Sun Z, Qu C. Presence of immune memory and immunity to hepatitis B virus in adults after neonatal hepatitis B vaccination. *Vaccine*;29(44):7835-7841; 2011.
- 48 Chaves SS, Fischer G, Groeger J, Patel PR, Thompson ND, Teshale EH, Stevenson K, Yano VM, Armstrong GL, Samandari T, Kamili S, Drobeniuc J, Hu DJ. Persistence of long-term immunity to hepatitis B among adolescents immunized at birth. *Vaccine*;30(9):1644-1649; 2012.
- 49 Wu TW, Lin HH, Wang LY. Chronic hepatitis B infection in adolescents who received primary infantile vaccination. *Hepatology*;57(1):37-45; 2013.
- 50 Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*;93(9):4398-4402; 1996.
- 51 Hamkar R, Aghakhani A, Soufian S, Banifazl M, Ghavami N, Nadri M, Sofian M, Ahmadi F, Razeghi E, Eslamifar A, Ramezani A. Surface gene mutations of hepatitis

B virus among high-risk patients with occult hepatitis B virus infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*;66(3):285-291; 2010.

- 52 Yokoyama K, Kumagai H, Takahashi M, Nagashima S, Okamoto H, Yamagata T. Occult hepatitis B virus infection in immunized children born to carrier mothers. *Pediatrics International*;59:1010-1016; 2017.