

計畫編號：DOH91-DC-1052

行政院衛生署九十一年度
研究計畫

慢性 B 型肝炎病毒感染與人體基因變異型的相關性

研究報告

執行機構：台灣大學醫院小兒部

計畫主持人：陳慧玲

研究人員：李秉穎、張美惠

執行期間：91 年 1 月 1 日至 91 年 12 月 31 日

* * 本研究報告僅供參考，不代表本署意見 * *

目 錄

	頁 碼
封面	(1)
目錄	(2)
壹、中文摘要	(3)
貳、英文摘要	(4)
參、報告內容	
(一) 前言	(5-9)
(二) 研究對象與方法	(9-14)
(三) 結果	(14-15)
(四) 參考文獻	(16-22)
	共 22 頁

中文摘要

得到 B 型肝炎病毒感染以後，大部分會自行痊癒，但是有些人會變成帶原者，這種帶原狀態的原因一直困擾著醫學界，最近的研究則發現人類 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 基因的變異型與 mannose-binding lectin (MBL) 的基因變異都可能與慢性 B 型肝炎感染的發生有關。 MBL 是一種與免疫調理(opsonization)作用有關的蛋白質，TNF- α 則是對抗病原的一種重要細胞激素，其 promoter 的基因變異也會影響到人體對很多感染與其他疾病的感受性。

台灣的慢性 B 型肝炎感染特別多，值得深入研究此現象是否跟這些基因變異有關。台灣一般人口的基因變異型發生率是否與西方國家不同，也是一個值得深入探討的問題。如果同時做這兩種基因變異的研究，不但可以強化研究對照的敏感度而獲致確切的結論，也可以觀察是否不同種族會受到不同基因變異型的影響。此外，也需要研究這些基因變異與慢性 B 型肝炎感染的病程變化是否相關，所以在國內需要做一個樣本數夠大的前瞻式研究，藉以釐清慢性 B 型肝炎感染的致病機轉。初步結果顯示，未曾接種疫苗帶原兒童的 TNF- α promoter 變異型比率高於健康成人對照組(Chi-square test with Yates' correction, $P = 0.038$)，MBL 基因變異型比率則無明顯差別 ($P > 0.05$)。曾經接種疫苗帶原兒童的 TNF- α promoter 變異型比率也高於健康成人對照組(Chi-square test with Yates' correction, $P < 0.001$)，MBL 基因變異型則無明顯差別 ($P > 0.05$)。

關鍵詞：B 型肝炎、基因變異、帶原

英文摘要

The cause of chronic carriage of hepatitis B virus (HBV) remains obscure despite of many efforts trying to explore the underlying mechanism. Some recent studies suggest that polymorphism of tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene and mannose-binding lectin (MBL) gene may be related to the carrier state of HBV. Among them, MBL is a protein that is closely related to the opsonization of immune reaction. TNF- α is an cytokine that play an important role in regulating the immune response.

Taiwan is highly prevalent for chronic HBV infection. It is worthwhile to study whether the gene polymorphism may be related to the high carrier rate in Taiwan. Our first-year result showed that the rate of TNF- α promoter variation was significantly higher in both unvaccinated and vaccinated carrier children than in the healthy adult control. On the other hand, the rate of MBL gene variation was similar between the carrier children and the healthy adults.

Key words: hepatitis B, gene polymorphism, carrier

前言

對於全世界而言，B 型肝炎感染都是一個極為重要的公衛課題，它在世界不同地區的盛行率各不相同。台灣地區在全面接種 B 型肝炎疫苗以前，一般人口的慢性帶原率在 10% 與 20% 之間 [1,2]。這些帶原者之中，大約有 40 - 50% 是來自母子之間的周產期傳染 [2]，其餘則是來自水平傳染。在水平傳染的途徑之中，最重要的是使用未經過完全消毒的注射器械，與來自具有高傳染性的家族成員的感染 [3]。

為什麼某些個人無法清除 B 型肝炎病毒而導致慢性感染，其機制一直無法被完全釐清。以病毒的觀點來看，B 型肝炎病毒所製造的核心抗原除了可以表現於肝細胞表面以外，也可以被切除部份而成為 e 抗原被釋放到細胞外。e 抗原的生理意義不明，但因為核心抗原是細胞性免疫反應的作用目標，所以有學者認為這種釋放到細胞外的 e 抗原可能可以引致免疫耐受性 (immune tolerance)，而導致慢性感染 [4,5]。也有研究發現對抗核心抗原與 e 抗原的抗體，可以抑制細胞毒殺性 T 細胞 (cytotoxic T cell) 的功能 [6,7]。在發生垂直傳染的時候，帶原母親會將大量的核心抗體傳給嬰兒，所以有學者相信這是引起嬰兒帶原的重要原因之一 [4,7]。國內的研究則發現 e 抗原陽性母親的核心抗體較低的話，其小孩比較容易得到感染，顯示母親的核心抗體對於是否發生母子間的垂直傳染也有作用 [8]。此外，最近發現 B 型肝炎病毒至少有 A 至 F 等六種基因型 (genotype)，台灣的帶原者大多感染 B 與 C 兩種基因型，其中 B 基因型比較容易在在比較年輕的年齡就導致肝癌，而 C 基因型比較容易導致嚴重的肝炎變化 [9]。這些發現顯示，B 型肝炎病毒的某些特質會影響到感染之後的臨床預後。

如果以人類宿主的觀點來看慢性 B 型肝炎感染，感染年齡無疑是很重要的一個因素。母親在小孩出生前後的周產期可能將病毒傳給

新生嬰兒，如果母親是 B 型肝炎 e 抗原陽性的帶原者，其血液中的病毒濃度較高，她們所生的小孩大約有 65-93% 的機會會變成慢性帶原者；如果母親是 B 型肝炎 e 抗原陰性的帶原者，其血液中的病毒濃度較低，所以她們所生的小孩會變成帶原者的比率比較低，大約為 10% [2, 10, 11]。根據台灣地區接種疫苗前的血清流行病學調查資料 [12,13]，台灣地區兒童在嬰兒期的 B 型肝炎帶原率為 5%；到了一至二歲之間，帶原率上升到 10% 左右。此後一直到十五歲以前，帶原率一直維持在 10% 左右。兒童的 B 型肝炎核心抗體陽性率則隨著年齡逐漸上升，在十五歲的時候陽性率達到 50%。可見台灣地區大部分的帶原者，都是在三歲以前就得到 B 型肝炎病毒感染。年齡比較大以後才得到感染的話，變成帶原者的機會比較小。

母親是 e 抗原陽性的帶原者，她們的小孩子在出生時注射 B 型肝炎免疫球蛋白與 B 型肝炎疫苗以後，還是有百分之五到百分之十左右的比率會變成帶原者。這些疫苗失敗的原因，到目前為止一共發現了幾個可能的原因，包括子宮內感染 [14]、母親傳給小孩的病毒量太高 [15]、先天遺傳上對於 B 型肝炎疫苗沒有辦法產生有效的免疫反應 [16]、B 型肝炎病毒表面抗原的變異 [17, 18]。

一般認為有些人之會變成慢性感染，最主要的因素可能是個人的免疫反應有些缺陷 [19]。以前大家都認為負責清除受到 B 型肝炎病毒感染的肝臟細胞的免疫反應主要是細胞性免疫反應，根據急性與慢性 B 型肝炎的研究結果顯示，這種細胞性免疫反應主要是藉由自然殺手細胞 (natural killer cell) 與細胞毒殺性 (cytotoxic) T 細胞來達成 [20,21]，而 T 細胞免疫反應所對抗的抗原主要是核心抗原 [21,22]。但是根據 transgenic mouse 的實驗，卻發現細胞毒殺性 T 細胞與抗原非特異性的巨噬細胞 (macrophage) 所分泌的 γ -干擾素

(interferon- γ)與 α -腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)就可以抑制 B 型肝炎病毒的基因表現與複製，而不需要殺死受感染的肝細胞 [23]。當肝臟受到其他病毒感染的時候，肝臟巨噬細胞所分泌的 γ -干擾素與 α -腫瘤壞死因子也可以達到清除 B 型肝炎病毒的結果 [24]。最近的研究開始將焦點放在漿液性免疫因子對慢性 B 型肝炎感染的影響，包括 TNF- α 基因變異型 (polymorphism) [25] 與 mannose-binding lectin (MBL)的基因變異 [26]。

MBL 是一種 calcium-dependent lectin，它藉由 MBL-associated serine protease 可以活化補體素 (complement)與吞噬作用，並且直接作為 opsonin 而加強吞噬作用，這種作用可能是因為 MBL 一方面可以跟糖蛋白抗原終端上的 mannose 基結和，一方面可以跟巨噬細胞上面的 collectin 接受器結合 [27-30]。MBL 基因之 codon 54 與 57 的點突變會導致 MBL 血清濃度下降，而出現 opsonic effect 的缺陷與免疫功能不全現象 [31,32]。其基因另一個比較少見的 codon 52 突變，也曾經被報告會導致 MBL 濃度下降 [33]。MBL 的基因與其 promoter 發生突變時，曾經被報告與嚴重感染有關 [31, 34-38]。Thomas 等人於 1996 年的研究報告發現，33 位慢性 B 型肝炎感染的白種人中，有 9 (27%)位在 MBL 基因的 codon 52 發生突變，罹患急性 B 型肝炎者則有 11% (2/19)具有這種基因突變，這些比率明顯高於對照組的 4% (4/98)，但是這種基因變異型在亞洲的慢性 B 型肝炎感染則沒有特別常見，MBL 基因的 codon 54 與 codon 57 之突變率則與慢性 B 型肝炎帶原現象無相關性 [26]。後來有一篇來自德國的報告，則認為慢性 B 型肝炎感染與 MBL 基因變異型無關 [39]。

前述認為 MBL 與慢性 B 型肝炎感染無關的德國報告，來自第一個認為慢性 B 型肝炎感染與 TNF- α 基因變異型有關的研究單位

[25]。TNF- α 是對抗病原的一種重要細胞激素，在慢性 B 型肝炎感染的時候，肝臟的 TNF- α 系統與 TNF- α 接受器都會有增加的現象 [40-41]。TNF- α 基因位於 MHC 的 class III 區域，位於此基因前面的 promoter 如果發生某些基因變異，會影響到 TNF- α 的基因表現。其中，-308 位址由 G 變成 A 時，TNF- α 的表現會加強 [42]，另一個常見在-238 位址也是由 G 變成 A 的變異，則尚不知道在功能上的影響 [43]。曾經有報告顯示-308 位址的變異，會比較容易得到腦部瘧疾感染 [44]與 mucocutaneous leishmaniasis [45]。此外，-308 與-238 位址的變異都曾經被報告與發生肺結核與瘧疾貧血有關 [46]，最近這種基因變異的研究報告愈來愈多，曾經被報告與之有相關性的疾病包括敗血性休克 [47]、brucellosis [48]、IgA nephropathy [49]、myeloma [50]、dilated cardiomyopathy [51]、包括肝臟移植在內之異體移植排斥反應 [52,53]、慢性 C 型肝炎的病程惡化 [54,55]、systemic lupus erythematosus 與其他自體免疫疾病 [56-58]、癌症 [59]等。1998 年 Höhler 等人的研究發現，慢性 B 型肝炎感染病人中有 25% (18/71) 出現 TNF- α promoter 在-238 位址的變異，此比率明顯高於急性肝炎者的 6% (2/32)與一般對照者的 7% (7/99)。TNF- α promoter 在-308 位址的變異則與慢性 B 型肝炎感染無關，所以他們認為 TNF- α promoter 基因的變異型會使病毒的清除出現缺陷[25]。

台灣的慢性 B 型肝炎感染特別多，值得深入研究此現象是否跟這些基因變異有關。雖然前述基因變異型與慢性感染的相關性有不同結論，但在 Thomas 等人的研究中，只收集到 20 位華人帶原者，實在無法作出確切的結論。台灣一般人口的基因變異型發生率是否與西方國家不同，也是一個值得深入探討的問題。如果同時做這兩種基因變異的研究，不但可以強化研究對照的敏感度而獲致確切的結論，也

可以觀察是否不同種族會受到不同基因變異型的影響。此外，曾經有人發現 TNF- α promoter 基因變異與慢性 C 型肝炎感染的臨床嚴重程度有關，也需要研究這種變異與慢性 B 型肝炎感染的病程變化是否相關，所以在國內需要做一個樣本數夠大的前瞻式研究，藉以釐清慢性 B 型肝炎感染的致病機轉。本研究預計以三年的時間收集數百名帶原者，並且前瞻式地追蹤其病程變化，藉以釐清前述兩種基因變異型對慢性 B 型肝炎感染的影響。

研究對象與方法

[研究對象]

1. 未接種疫苗之帶原兒童：二百名在 1984 年前出生未接種過疫苗的 B 型肝炎帶原兒童。
2. 接種過疫苗的帶原兒童：從以前本科對於 B 型肝炎疫苗保護效力的長期研究之中，收集約五十名接種過疫苗的帶原兒童。
3. 未接種疫苗的帶原成人：五十名。
4. 對照組：為了考慮到疫苗接種可能會影響到基因變異型在對照組的比率，收集一百名有 B 型肝炎表面抗體的健康成人作為對照，此外也收集一百名接種疫苗後有 B 型肝炎表面抗體的兒童作為另一種對照。

[基本資料調查]

1. 年齡、性別、生日、抽血日期、身高、體重、祖籍(以祖父輩為準)、居住地。

2. 有否接種過 B 型肝炎疫苗與 B 型肝炎免疫球蛋白、接種劑次、疫苗種類。
3. 第一次知道 B 型肝炎帶原的年齡。
4. 母親是否為帶原者、出生時母親有否 e 抗原、家中成員數目、其他家族成員是否有帶原者。
5. 過去是否有過 e 血清轉變 (e-seroconversion)。
6. 過去肝功能檢查時，異常檢查值的最高值。
7. 過去是否有異位性皮膚炎、過敏性結膜炎、過敏性鼻炎、支氣管性氣喘等過敏性疾病的病史。
8. 過去是否有文獻上曾經提及跟基因變異型有關的疾病，包括敗血症、自體免疫疾病、腫瘤、心肌病變、腎臟病與其他嚴重感染，並詢問過去因病住院的次數。
9. 家族中是否有早年過世的成員，若有，詢問疾病種類。
10. 成人：抽菸、喝酒。

[前瞻式追蹤]

對於三百名帶原者做為期三年的前瞻式追蹤，每半年抽血一次。第一次抽血做基因變異型的分析，以後每次抽血(含第一次抽血)檢驗 B 型肝炎表面抗原、B 型肝炎 e 抗原、B 型肝炎 e 抗體、alanine aminotransferase (ALT)。有黃疸或其他臨床症狀的時候，抽血時間縮短為每一至三個月。每一次回診追蹤的時候，詢問最近半年發生感冒與其他疾病的次數。

[血清學檢驗]

B 型肝炎表面抗原、B 型肝炎 e 抗原、B 型肝炎 e 抗體、B

型肝炎核心抗體 B 型肝炎表面抗體等使用 enzyme immunoassay (Murex Biotech Limited, UK)檢驗，ALT 使用自動分析儀定量。

1. 帶原者第一次抽血除了做基因變異的鑑定以外，也檢查 ALT、B 型肝炎表面抗原、B 型肝炎 e 抗原與 B 型肝炎 e 抗體 如果發現表面抗原變成陰性，則加做 B 型肝炎表面抗體
2. 非帶原者檢驗 B 型肝炎表面抗原、B 型肝炎核心抗體與 B 型肝炎表面抗體。

[周邊血液單核球的分離]

由研究對象身上取得加有 heparin 的血液檢體，再利用 Ficoll-Hypaque 離心的方法將周邊血液單核球(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)分離出，進一步利用 Hank's 溶液清洗三次後，再進行接下來的實驗。

[MBL 基因變異分析]

1. 實驗分析步驟主要根據 Jack 等人於 1997 年發表之報告 [60]。
2. 以標準程序分離白血球細胞之 genomic DNA。
3. 製造 MBL-universal heteroduplex generator(MBL-UHG)，此人工基因節段含有兩個核酸插入與三個核酸缺失 [60]。
4. 對於 genomic DNA 與 MBL-UHG 均以 PCR 製造含有 MBL 基因 exon 1 的節段，primers 為 CTG TGA CCT GTG AGG ATG C 與 GGAACCA Ggtacgtgtgg。
5. 混合各 15 μ l 的上述兩種 PCR 產物，在 94^oC 加熱 3 分鐘，然後以每 45 秒降低 1^oC 的速度冷卻到 37^oC 以形成

heteroduplexes。加入 3.5 μ l 標準 sucrose loading buffer，在 20% nondenaturing polyacrylamide minigel 行電泳反應。

6. Heteroduplex 反應產物做核酸序列分析。

[TNF- α promoter 基因變異分析]

1. 實驗分析步驟主要根據 Thomas 等人於 1997 年發表之報告 [25]。
2. 以標準程序分離白血球細胞之 genomic DNA。
3. 以 PCR 增幅位於-396 至-69 的 TNF- α promoter 核酸序列，primers 為 TTC CTG CAT CCT GTC TGG AA 與 CAG CGG AAA ACT TCC TTG GT。
4. PCR 反應產物做核酸序列分析。

[統計分析]

1. MBL 與 TNF- α promoter 的基因變異型是否會影響到：
 - A. B 型肝炎帶原狀況
 - a. 所有帶原者與非帶原對照互相比較
 - b. 接種疫苗與未接種疫苗帶原者分別與其適當的對照族群比較
 - c. 分析哪一種基因變異型在台灣比較有相關性
 - d. 先分開比較 MBL 與 TNF- α promoter 基因變異對帶原的影響，然後將 MBL 與 TNF- α promoter 基因變異合併為一個指標，比較對帶原率的影響
 - B. 慢性 B 型感染的病程
 - a. 對於 ALT 值(包括追蹤過程之平均值與最高值)有

無統計相關

- b. 對於 e 抗原陽性率有無相關
 - c. 對於以前 e 血清轉變年齡有無影響 (只針對能分辨 e 轉換年齡之個案進行分析)
 - d. 在追蹤過程中, e 血清轉變率會否受到影響
 - e. 與第一次知道帶原的年齡有無相關性
 - f. 先分開比較 MBL 與 TNF- α promoter 基因變異對病程的影響, 然後將 MBL 與 TNF- α promoter 基因變異合併為一個指標, 比較對病程的影響
- C. 家族帶原狀態
- a. 根據母親是否為帶原者, 將帶原者分為可能垂直傳染與可能水平傳染等兩組, 分別分析基因變異的影響
 - b. 分析基因變異型是否影響到家裡有否其他帶原者
 - c. 先分開比較 MBL 與 TNF- α promoter 基因變異對家族帶原狀態的影響, 然後將 MBL 與 TNF- α promoter 基因變異合併為一個指標, 比較對家族帶原狀態的影響
- D. 其他因素的影響
- a. 在非帶原之對照組中, 基因變異型是否與表面抗體濃度相關。
 - b. 與過去文獻上曾經提及跟基因變異型有關的疾病的相關性, 包括過敏性疾病、敗血症、自體免疫疾病、腫瘤、心肌病變、腎臟病、癌症與其他嚴重感染

- c. 與過去平均住院次數有無相關 (成人與兒童分開分析)。
- d. 與家中成員早年死亡有無相關。
- e. 控制上述因素與煙酒習慣、年齡、性別等因素以後，做多變數分析，以探討基因變異型與帶原、慢性感染病程、其他疾病的相關性是否存在、是否為獨立性相關。
- f. 先分開比較 MBL 與 TNF- α promoter 基因變異對各種因素的影響，然後將 MBL 與 TNF- α promoter 基因變異合併為一個指標，比較對各種因素的影響

2. 統計方法

A. 頻率性數據

- a. Chi-square test with Yates' correction：兩組間比較
- b. 卡方考驗：三組以上互相比較

B. 連續性變數

- a. 兩組間比較：Mann-Whitney test
- b. 兩組以上比較：Kruskal-Wallis test

C. 多變數分析：logistic regression

D. 統計上顯著相關或顯著差異之 P 值：小於 0.05

- 3. 所有資料鍵入電腦資料庫，並且進行統計分析。

結果

[研究對象]

已收集 295 名帶原兒童，其中 230 位 1984 年前出生，所以並未接種過 B 型肝炎疫苗，這些個案均在兒童期就已知為慢性帶原者，並在本科長期追蹤，其中 91 名已經發生 e 轉換，e 轉換發生的年齡在 45 位為已知，其他幾位則因為不規則追蹤或來診時就已經為 e 抗原陰性所以無法判斷 e 轉換之年齡。另外 65 名帶原兒童為接種疫苗以後仍然得到感染，其中 5 位已經發生 e 轉換。

未接種疫苗的帶原成人收集 45 名，其帶原時間不明，均在成人期才知道有帶原現象。另外收集 90 名有 B 型肝炎表面抗體的健康成人作為對照。這些個案的白血球 DNA 均加以分離及保存。

[初步分析結果]

90 名健康成人的 DNA 分析，TNF- α promoter 在-238 位址有變異的比率為 5.6 % (5/90)，在 MBL 基因有變異的比率為 4.4% (4/90)，230 名未曾接種疫苗的帶原兒童之中，TNF- α promoter 在-238 位址有變異的比率為 14.8 % (34/230)，在 MBL 基因有變異的比率為 7.0% (16/230)，65 名曾經接種疫苗的帶原兒童之中，TNF- α promoter 在-238 位址有變異的比率為 16.9 % (17/65)，在 MBL 基因有變異的比率為 6.2% (4/65)。這些初步結果顯示，未曾接種疫苗帶原兒童的 TNF- α promoter 變異型比率高於健康成人對照組 (Chi-square test with Yates' correction, $P = 0.038$)，MBL 基因變異型比率則無明顯差別 ($P > 0.05$)。曾經接種疫苗帶原兒童的 TNF- α promoter 變異型比率也高於健康成人對照組 (Chi-square test with Yates' correction, $P < 0.001$)，MBL 基因變異型則無明顯差別 ($P > 0.05$)。

參考文獻

1. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, et al. Incidence of hepatitis B virus infections in preschool children in Taiwan. *J Infect Dis* 1982 ; 146: 198-204.
2. Stevens CE, Beasley RP, Tsui JJ, et al. Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan. *N Engl J Med* 1975; 292: 771-4.
3. Hsu SC, Chang MH, Ni YH, Hsu HY, Lee CY. Horizontal transmission of hepatitis B virus in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutri* 1993; 16: 66-9.
4. Thomas HC, Jacyna M, Waters J, Main J. Virus-host interaction in chronic hepatitis B virus infection. *Semin Liver Dis* 1988; 8: 342-9.
5. Milich DR, James JE, Hughes JL. Is a function of the secreted HBe antigen to induce immunological tolerance in utero. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6599-603.
6. Mondelli M, Vergani GM, Alberti A, Eddleston ALWF, Williams R. Specificity of T cell cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection: evidence that T cells are directed against HBV core antigen expressed on hepatocytes. *J Immunol* 1982; 129: 2773-9.
7. Pignatelli M, Waters J, Lever A, Thomas HC. Cytotoxic T cell response to the nucleocapsid proteins of HBV in chronic hepatitis: evidence that antibody modulation may cause protracted infection. *J Hepatol* 1987; 4: 15-22.
8. Chang MH, Hsu HY, Huang LM, Lee PI, Lin HH, Lee CY. The role of transplacental hepatitis B core antibody in the mother-to-infant transmission of hepatitis B virus. *J Hepatol* 1996; 24: 674-9.
9. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118:554-9.
10. Beasley RP, Hwang LY, Lee CY, et al. Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infections with hepatitis B immune globulin (HBIG) in combination with HB vaccine. *Lancet* 1983; ii: 1099-102.
11. Beasley RP, Trepo C, Stevens CE, et al. The e antigen and vertical

- transmission of hepatitis B surface antigen. *Am J Epidemiol* 1977; 105: 94-8.
12. Tsen YJ, Chang MH, Hsu HY, et al. Seroprevalence of hepatitis B virus infection in children in Taipei, 1989: five years after a mass hepatitis B vaccination program. *J Med Virol* 1991; 34: 96-9.
 13. Chen HL, Chang MH, Ni YH, et al. Seroepidemiology of hepatitis B virus infection in children: ten years of mass vaccination in Taiwan. *JAMA* 1996; 276: 906-8.
 14. Lin HH, Lee TY, Chen DS, et al. Transplacental leakage of HBeAg-positive maternal blood as the most likely route in causing intrauterine infection with hepatitis B virus. *J Pediatr* 1987; 111: 877-81.
 15. Lee SD, Lo KJ, Wu JC, et al. Prevention of maternal-infant hepatitis B virus transmission by immunization: the role of serum hepatitis B virus DNA. *Hepatology* 1986; 6: 369-73.
 16. Hsu HY, Chang MH, Ho HN, et al. Association of HLA-DR14-DR52 with low responsiveness to hepatitis B vaccine in Chinese residents in Taiwan. *Vaccine* 1993; 11: 1437-40.
 17. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336: 325-9.
 18. Lee PI, Chang LY, Lee CY, Huang LM, Chang MH. Detection of hepatitis B surface gene mutation in carrier children with or without immunoprophylaxis at birth. *J Infect Dis* 1997; 176: 427-30.
 19. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B immunopathogenesis. *Ann Rev Immunol* 1995; 13:29-60.
 20. Eggink HK, Houthoff HJ, Juitema S, Gips CH, Poppema S. Cellular and humoral immune reactions in chronic active liver disease: lymphocyte subpopulations in liver biopsies of patients with untreated idiopathic auto-immune hepatitis, chronic active hepatitis B, and primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 1982; 50: 17-24.
 21. Mondelli M, Vergani GM, Alberti A, Eddleston ALWF, Williams R. Specificity of T cell cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection: evidence that T cells are directed against HBV core antigen expressed on hepatocytes. *J Immunol* 1982; 129:

- 2773-9.
22. Rossol S, Marinos G, Carucci P, Singer MV, Williams R, Naoumov NV. Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 1997; 99: 3025-33.
 23. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996; 4:25-36.
 24. Guidotti LG, Borrow P, Hobbs MV, Matzke B, Gresser I, Oldstone MBA, Chisari FV. Viral cross talk: intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:4589-94.
 25. Höhler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Büschenfelde KH, Rittner C. A tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. *Clin Exp Immunol* 1998; 111:579-82.
 26. Thomas HC, Foster GR, Sumiya M, McIntosh D, Jack DL, Turner MW, Summerfield JA. Mutation of gene for mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet* 1996; 348:1417-9.
 27. Taylor ME, Brickell PM, Craig RK, Summerfield JA. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. *Biochem J* 1989; 262: 763-71.
 28. Kuhlman L, Joiner K, Ezekowitz RAB. The human mannose binding protein functions as an opsonin. *J Exp Med* 1989; 169: 1733-45.
 29. Ohta M, Okada M, Yamashima I, Kawasaki T. The mechanism of carbohydrate mediated complement activation by the serum mannan-binding protein. *J Biol Chem* 1990; 265: 1980-84.
 30. Malhotra R, Laursen SB, Willis AC, Sim RB. Localization of the receptor binding site in the collectin family of proteins. *Biochem J* 1993; 293: 15-19.
 31. Sumiya M, Super M, Tabona P, et al. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 1992; 337: 1569-70.
 32. Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AVS, et al. High frequency in African and non-African populations of independent mutations in the mannose

- binding protein gene. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 709-15.
33. Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JAL, et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* 1994; 40: 37-44.
 34. Summerfield JA, Ryder S, Sumiya M, et al. Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* 1995; 345: 886-89.
 35. Garred P, Madsen HO, Hofmann B, Svejgaard A. Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan-binding-protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. *Lancet* 1995; 346: 941-43
 36. Hibberd ML, Sumiya M, Summerfield JA, Booy R, Levin M, Meningococcal Research Group. Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. *Lancet* 1999; 353:1049-53.
 37. Neth O, Hann I, Turner MW, Klein NJ. Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. *Lancet* 2001; 358:614-8.
 38. Peterslund NA, Koch C, Jensenius JC, Thiel S. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infection after chemotherapy. *Lancet* 2001; 358:637-8.
 39. Höhler T, Wunschel M, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Büschenfelde KH, Rittner C. No association between mannose-binding lectin alleles and susceptibility to chronic hepatitis B virus infection in German patients. *Exp Clin Immunogenet* 1998; 15:130-3.
 40. Marinos G, Naoumov NV, Rossol S, Torre F, Wong PYN, Gallati H, Portmann B, Williams R. Tumor necrosis factor receptors in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterol* 1995; 108:1453-63.
 41. Fang JWS, Shen WW, Meager A, Lau JYN. Activation of the tumor necrosis factor- α system in the liver in chronic hepatitis B virus infection. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:748-53.
 42. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, Di Giovine GS, Duff GW. Effects of a tumor necrosis factor (TNF- α) promoter base

- transition on transcriptional activity. *Br J Rheumatol* 1994; 33:89.
43. Pociot F, D'Alfonso, Compasso S, Scorza R, Richiardi PM. Functional analysis of a new polymorphism in the human TNF α gene promoter. *Scand J Immunol* 1995; 42:501-4.
44. McGuire W, Hill AVS, Allsopp CEM, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994; 371:508-11.
45. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1995; 182:1259-64.
46. Hill AVS, Ruwende C, McGuire W, et al. Association of the TNF-238 promoter polymorphism with susceptibility to tuberculosis and malaria in Africa. *Hum Immunol* 1996; 47:118.
47. Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, et al. Association of TNF2, a TNF- α promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality. *JAMA* 1999; 282:561-8.
48. Caballero A, Bravo MJ, Nieto A, Colmenero JD, Alonso A, Martin J. TNF- α promoter polymorphism and susceptibility to brucellosis. *Clin Exp Immunol* 2000; 121:480-3.
49. Shu KH, Lee SH, Cheng CH, Wu MJ, Lian JD. Impact of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism on IgA nephropathy. *Kidney Intern* 2000; 58:783-9.
50. Davies FE, Rollinson SJ, Rawstron AC, Roman E, Richards S, Drayson M, Child JA, Morgan GJ. High-producer haplotypes of tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha are associated with an increased risk of myeloma and have an improved progression-free survival after treatment. *J Clin Oncol* 2000; 18:2843-51.
51. Ito M, Takahashi H, Fuse K, Hirono S, Washizuka T, Kato K, et al. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in Japanese patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Japan Heart J* 2000; 41:183-91.
52. Middleton PG, Taylor PR, Jackson G, Proctor SJ, Dickinson AM. Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute

- graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants. *Blood* 1998; 92:3943-8.
53. Bathgate AJ, Pravica V, Perrey C, Therapondos G, Plevris JN, Hayes PC, Hutchinson IV. The effect of polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 genes in acute hepatic allograft rejection. *Transplantation* 2000; 69:1514-7.
54. Höhler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Büschenfelde KH, Rittner C. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -238 is associated with chronic active hepatitis C infection. *J Med Virol* 1998; 54:173-7.
55. Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM, Jonsson JR. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 31:828-33.
56. Lu LY, Ding WZ, Fici D, Deulofeut R, Cheng HH, Cheu CC, Sung PK, Schur PH, Fraser PA. Molecular analysis of major histocompatibility complex allelic associations with systemic lupus erythematosus in Taiwan. *Arth Rheumat* 1997; 40:1138-45.
57. Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E, van der Linden MW, Keijsers V, Schreuder GM, et al. TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arth Rheumat* 2000; 43:129-34.
58. Fraile A, Nieto A, Beraun Y, Vinasco J, Mataran L, Martin J. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1998; 51(5 Pt 1):386-90.
59. Chouchane L, Ahmed SB, Baccouche S, Remadi S. Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha promoter region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. *Cancer* 1997; 80:1489-96.
60. Jack D, Bidwell J, Turner M, Wood N. Simultaneous genotyping for all three known structural mutations in the human mannose-binding lectin gene. *Human Mut* 1997; 9:41-6.