

計畫編號：DOH90-DC-1022

衛生署疾病管制局九十年度委託研究計畫

癌症化學治療與骨髓移植對 B 型肝炎免疫力的影響研究

委託研究成果報告

執行機構：台大醫學院小兒科

計畫主持人：黃立民

研究人員：江伯倫、林凱信、盧孟佑

執行期間：90年2月9日至90年12月31日

* * 本研究報告僅供參考，不代表本局意見 * *

目 錄

頁 碼

封面

目錄

頁碼

一、英文摘要

(2)

二、中文摘要

(3)

三、計劃背景及目的

(5)

四、材料及方法

(8)

五、實驗結果

(12)

六、實驗討論與結論建議

(15)

七、圖表

(18)

八、參考文獻

(19)

共 (21) 頁

Abstract

Abstract:

Hepatitis B virus (HBV) infection is endemic in Taiwan, with a high frequency in adult. It results in cirrhosis, hepatocellular carcinoma and death. HBV vaccines have been largely shown to be effective in preventing infection of healthy children with an efficacy of > 90%. Taiwan has a national policy about routine infant immunization with HBV vaccine since 1985. The efficacy is very fair. But it remains unclear that the Hepatitis B (HB) vaccine would provide the same effective protection in the children who received chemotherapy and bone marrow transplantation. We do not know whether these children would receive the booster of the HB vaccine or not.

In this study, 44 children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and 1515 healthy children were enrolled. We divided the children into 3 groups by the age : 0-5, 5-10, >10 years old. The result showed that a total of 16 (36%) of the ALL children were seronegative for anti-HBs antibody. There was no significant difference between ALL and healthy children in all 3 age-groups. But the geometric mean titers of anti-HBs antibody in the ALL children were significantly lower than that of age-compatible healthy children. After chemotherapy, the anti-HBs titer of the ALL children at 0,6,16 week after treatment had no significant difference.

Keyword: acute lymphoblastic leukemia, anti-hepatitis B surface antigen, hepatitis B vaccine

中文摘要

臺灣是 B 型肝炎高流行地區，帶原者的人數曾經高達佔總人口數的 15% 到 20% 左右。中華民國從民國七十三年實施全國性 B 型肝炎疫苗接種計劃以來，成效卓著，無論在減少帶原者率亦或降低肝硬化、肝癌病患人數方面均有明顯之成果。然而，實施至今以來已十幾年，B 型肝炎疫苗接種計劃對台灣健康兒童免於 B 型肝炎病毒的侵襲，其貢獻是有目共睹的。但是對於一些原本接受過 B 型肝炎疫苗接種而後罹患血液腫瘤疾病的小朋友當他們在接受化學治療後，甚至於接受骨髓移植後，先前所接種的疫苗是否能然具有保護這些所謂免疫妥協病人免於 B 型肝炎病毒的感染呢？我們也想了解到這些罹患血液腫瘤疾病的小朋友們，當他們在接受化學治療後，甚至於接受骨髓移植後，其對先前所接受 B 型肝炎疫苗接種的記憶性免疫能力是否仍然存在，是否有需要追加接種 B 型肝炎疫苗？

本研究收集臺大醫院小兒血液腫瘤部門 70 位病童、270 份血清檢體，其中已完成 44 位小兒急性淋巴性白血病患童之血清檢體檢驗，其中分成 4 組：接受台灣兒童癌症研究群之標準危險群治療計畫(13 人)、高危險群治療計畫(10 人)、最高危險群治療計畫(11 人)、和復發的

病童(10人)。另外收集 1515 位 0-12 歲的正常兒童血清，依年齡 0-5、5-10、>10 歲分成三群，作為對照組。在抗 B 型肝炎表面抗原抗體 (anti-HBs) 方面，結果顯示發病時，有 16 位病童為陰性，28 位為陽性。病童各組之間的發病時抗體濃度以年齡分層統計，並無顯著差異。比較病童與正常對照組，將年齡分層統計，以 Chi-Square 方法分析抗體陽性率，可發現在病童與正常對照組間並無明顯統計上的差異。但以 Student *t* test 分析兩組的抗體濃度，可發現三個年齡層病童的抗體濃度皆比正常對照組為低，統計上皆有顯著差異。病童各組接受化學治療後的第 6 周與 16 周抗體濃度，paired *t* test 皆沒有顯著意義。

中文關鍵詞(至少三個)：急性淋巴性白血病、抗 B 型肝炎表面抗原抗體、B 型肝炎疫苗

計畫緣起及背景：

B 型肝炎病毒乃是造成台灣地區兒童慢性肝臟疾病的主要病毒之一。在台灣這種高流行地區，大部分的 B 型肝炎病毒帶原者都是由於母親的垂直感染，而其他部分的帶原者或是經由家庭親屬間之水平傳染，或是經由污染之不潔針頭及污染之血液製劑。有鑑於此，政府於民國七十三年起開始推廣 B 型肝炎疫苗的全面接種，以期能有效降低台灣地區 B 型肝炎病毒帶原者的數目¹。目前在台灣地區的新生兒，對於 B 型肝炎疫苗的接種分別是在 0、1、6 個月大時；而母親特別為 B 型肝炎 e 抗原帶原者，通常會在出生二十四小時內予以 B 型肝炎免疫球蛋白之注射。施行至今，十歲以下的兒童 B 型肝炎病毒帶原者比率由施行接種計劃前之 9.8% 降至 1.3%²。同時亦有效降低六到九歲兒童的肝炎發生率，從每十萬人之 0.52 降至 0.13³。這種疫苗的接種成效不可不謂之顯著。

然而，B 型肝炎疫苗的接種其保護是有期限的。因為接種 B 型肝炎疫苗所產生的抗體是會隨著時間而逐漸下降，因此增加了新的 B 型肝炎病毒感染的機會。對於這種情形，有些研究報告指出是建議需要 B 型肝炎的追加接種。^{4,5} 對於一些接受過 B 型肝炎疫苗接種的血液腫瘤疾病病童，一般都認為其接種 B 型肝炎疫苗後所產生的抗體保護效能將會大大的受到影響，無論是因為疾病本身亦或是因為日後接受化學治療等免疫抑制劑。也有些研究認為具細胞毒性的化學治療等會影響並改變病人對 B 型肝炎病毒感染的免疫反應。⁶⁻⁸ 曾有研究報告提出在一些 B 型肝炎表面抗體 (anti-HBs) 陽性的病人，抗體會在接受化學治療時消失並在之後發現產生 B 型肝炎病毒感染之急性肝炎。⁹ 不過截至目前為止，大部分的研究多侷限於所謂免疫抑制或免疫妥協病人，無論是癌症患者、腎臟透析患者、肝臟

疾病患者、或 HIV 免疫不全患者等在接種 B 型肝炎疫苗後之反應。免疫抑制或免疫妥協病人，一般均被認為對接種 B 型肝炎疫苗後之表面抗體 (anti-HBs) 產生反應不良，甚至接種 B 型肝炎疫苗之劑量都有人提出要加倍才能達到理想之免疫效果。¹⁰⁻¹⁵

血液癌症病患一般均被認為是病毒性肝炎的易感族群，無論是 B、C 型肝炎病毒、HIV 或是巨細胞病毒，主要是因為此類病人常常反覆輸血或接觸到血液製品¹⁶。所以，對於癌症病患預防 B 型肝炎病毒的感染以避免產生急慢性肝炎或變成帶原者，更加顯得重要。本計劃主要針對癌症兒童在其先前已接受過 B 型肝炎疫苗接種的保護性情況下，如果接受了具細胞毒性之化學治療甚至於接受骨髓移植的前、後，其血液中 B 型肝炎病毒抗體的影響及變化。我們打算收集惡性血液腫瘤疾病的病患，在其接受化學治療前，並在其接受化學治療後，分別在化學治療中的鞏固期及維持期中各收集一次血液檢體。也要針對接受骨髓移植患者在移植前收集血液樣本或接受骨髓移植後約末相隔一個月及兩個月的時間各收集一次血液樣本。如果癌症兒童其接受化學治療後或接受骨髓移植後，其血液中對 B 型肝炎病毒的保護性抗體值已降至 10 mIU/mL 以下，則考慮對此類病患進行 B 型肝炎的追加接種。關於 B 型肝炎的追加接種的話，主要將採取追加接種兩個劑量¹⁷的方法，兩個劑量的間隔為六個月。為了了解再追加疫苗的影響，將會隨機將病人分為兩組，一者接受疫苗追加接種，一者則否。之後並將對於接受疫苗追加接種者在接受疫苗後的第一、六、七個月的時候將採集其血液樣本來監測其接受 B 型肝炎疫苗追加接種後的效果，來分析其在接受化學治療後對追加接種後的效果。

B 型肝炎疫苗政策的成功決定於其接種率，此外很重要的要素是避免疫

苗之第二度失敗 (secondary failure) , 也就是接種者先產生免疫力後又因種種因素使得免疫力消失。癌症病童應該是疫苗第二度失敗最重要的來源 , 本計畫將針對此予以詳細研究 , 並提出適當建議 , 以消弭此黑洞 , 確保 B 型肝炎在台灣絕跡。

材料與方法：

1、病人與檢體之收集

本研究計畫主要以國立台灣大學附設醫院小兒部之惡性血液腫瘤疾病的病患和骨髓移植病人為研究對象。

- (a) 惡性腫瘤化學治療病人：在其接受化學治療前、並在受化學治療後，分別在化學治療中的鞏固期及維持期中的第 6、16、26、52、104 周及治療結束時各收集一次血液檢體 然後每半年抽一次血，定期測試對 B 型肝炎病毒的體液性和細胞性免疫力。
- (b) 接受骨髓移植病人：在移植前及移植後約一、兩個月的時間各收集一次血液樣本，然後每半年抽一次血。定期測試對 B 型肝炎病毒的體液性和細胞性免疫力。

2、測試方法

- A. **體液性免疫**：主要是利用放射性免疫分析法 (Radioimmunoassay) 來偵測 B 型肝炎表面抗原抗體 (anti-HBs)，B 型肝炎核心抗原抗體 (antiHBc) 而 B 型肝炎表面抗原抗體的濃度值若是大於 10mIU/mL，這個值就被認為具有保護能力。

B. 細胞性免疫

I. 周邊血單核球增殖分析

1. 分離 PBMC (peripheral blood mononuclear cells) :全血中加入 heparinize
2. 利用 Ficoll-Hypaque 將細胞分層, 中間的一層取出, 用 HBSS 洗兩次
3. 培養液用 RPMI1640 外加, 1mmol/L glutamine, 1mmol/L sodium pyruvate, 5×10^{-5} mol/L 2-mercaptoethanol, 100U/ml penicillin, 0.1mg/ml streptomycin, 2% human blood type AB serum
4. 於 PBMCs 養在 96well 圓底盤 3×10^5 cells/well 在 0.2ml 培養液中, (HbsAg 5ug/ml)
5. 培養六天後, 加入 H3 後 18 個小時, 利用 B counter 測出每 well 有多少細胞
6. 再將有 HbsAg 刺激的細胞數除以沒有 HbsAg 刺激的細胞數 (Stimulation index)
7. mean+2SD 為標準, 大於此值為 positive
8. cytokine assay:將 PBMCs 的濃度 4×10^6 cell/ml 培養在 24well 盤子。 HbsAg 的濃度為 5ug/ml

II. Intracellular cytokine staining

1. 將 PBMCs 調成 2×10^6 cell/c.c., 準備四根 Facscan 真空管, 每管加入 0.5c.c 的 PBMCs。
2. 在第 1.2 管內加入 HbsAg(3ul), Monesin(2ul), Anti-H-CD28(0.5ul), Mouse IgG1(0.5ul)。第 3.4 管加入 Monesin(2ul)。將此四根 Facscan 真空管放入 37 度 C 細胞培養箱培養 6 小時。
3. 等 6 小時後, 每管加入 2ml washing buffer(2%BSA+0.1%NaN₃ in PBS buffer) 混合均勻。放入離心機 (1500rpm) 10 分鐘, 4 度 C。同一步驟 washing 2 次。
4. 第二次離心後倒掉上清液, 每管皆加入 10ul cytochrome anti-h-CD4, 4 度 C 避光 30 分鐘。
5. 每管加入 2ml PBS 混合均勻, 離心(1500rpm) 10 分鐘, 4 度 C。同一步驟 washing 2 次。
6. 第二次離心後倒掉上清液, 每管皆加入 100ul Fixation buffer(4% paraformaldehyde in PBS) 混合均勻, 室溫 20 分鐘。
7. 每管加入 2ml PBS 混合均勻。放入離心機 (1500rpm) 10 分鐘, 4 度 C。同一步驟 washing 2 次。
8. 第二次離心後倒掉上清液, 每一管加入 100ul permeablization buffer, 室溫 10 分鐘。
9. 第 1.3 管加入 5ul isotype control (Mouse anti-h-IgG1-FITC, IgG1-PE), 第 2.4 管加入 0.5ul mouse anti-h-IL-4-PE 及 0.5ul mouse anti-h-IFN γ -FITC), 室溫避光 30 分鐘。

10. 每一管加入 permeablization buffer 2ul 混合均勻。放入離心機
(1500rpm) 10 分鐘 , 4 度 C 同一步驟 washing 2 次。
11. 第二次離心後倒掉上清液 , 每一管加入 1ml 1% Formaldehyde in
PBS 後上 Facscan。

實驗結果：

目前先追蹤惡性血液腫瘤疾病的病患，已進行收集 70 位病童、270 份血清檢體，其中已完成 43 位小兒急性淋巴性白血病患童之血清檢體檢驗，其中分成 4 組：接受台灣兒童癌症研究群之標準危險群治療計畫(TPOG93SRE/ 18 人)、高危險群治療計畫(TPOG93HR/ 16 人)、最高危險群治療計畫(TPOG97VHR/14 人)、和復發的病童(12 人)。共在這 50 位病童採集到 136 個血清檢體，其中以接受化學治療前 並在接受化學治療後的第 6、16 周(0、6、16 week)之檢體居多。另外收集 1515 位 0-12 歲的正常兒童血清，依年齡 0-5、5-10、>12 歲分成三群，作為對照組。

B 型肝炎核心抗原抗體 (antiHBc)：已進行 44 位病童之初發病血清檢體和所有 1515 位對照組兒童的抗 B 型肝炎核心抗原抗體之效價濃度分析，其中病童有 4 位呈陽性反應，3 位年齡在 6-10 歲，1 位年齡大於 10 歲。與對照組進行 Chi-Square Test 統計分析發現 0-5 歲組病童有 21 人，其 B 型肝炎核心抗原抗體陽性率比對照組低，且有統計上的顯著差異；5-10 歲組病童有 15 人，其 B 型肝炎核心抗原抗體陽性率則比對照組高，且有統計上的顯著差異；>10 歲組病童有 8 人，其 B 型肝炎核心抗原抗體陽性率與比對照組相同，無統計上的差異。

抗 B 型肝炎表面抗原抗體(anti-HBs)：已進行 44 位病童之初發病血清檢體和所有 1515 位對照組兒童的抗 B 型肝炎表面抗原抗體之效價濃度分析，結果顯示發病時，有 16 位病童的抗體濃度小於 10mIU/mL，未達具有保護的效能，是為陰性反應，其餘 28 位的抗體濃度大於 10mIU/mL，視為陽性。但其中 21 位只有低效價抗體反應(Ab titer < 30 mIU/ml)，7 位為高效價抗體反應(Ab titer>30 mIU/ml)。病童各組之間的發病時抗體濃度以年齡分層統

計，並無顯著差異。比較病童與正常對照組，將年齡分層統計，以 Chi-Square 方法分析抗體陽性率，可發現在病童與正常對照組間並無明顯統計上的差異。但以 Student *t* test 分析兩組的抗體濃度，可發現三個年齡層病童的抗體濃度皆比正常對照組為低，統計上皆有顯著差異(圖一)。

病童各組接受化學治療後的第 6 周的抗 B 型肝炎表面抗原抗體之陽性率，其中有 2 位高危險群治療計畫病童與 1 位復發病童由陰性轉變成陽性，不過仍只有低效價濃度。有 1 位最高危險群治療計畫和 2 位高危險群治療計畫病童則由低效價濃度陽性變成陰性。10 位病童則仍維持陰性，皆無統計上明顯之差異。抗 B 型肝炎表面抗原抗體效價濃度，除復發的病童外，其他接受治療計畫的三組全都下降，但統計學上 paired *t* test 沒有顯著意義。第 16 周的抗 B 型肝炎表面抗原抗體之陽性率，其中有 3 位高危險群治療計畫病童、1 位最高危險群治療計畫病童和 1 位復發病童由陰性轉變成陽性，不過仍只有低效價濃度。有 3 位高危險群治療計畫病童則由低效價濃度陽性變成陰性(包括第 6 週的兩位仍持續陰性)。其餘 7 位病童則仍維持陰性，各治療計畫組皆無統計上明顯之差異。抗 B 型肝炎表面抗原抗體效價濃度則是復發組和標準危險群治療計畫組上升外，其餘 2 組治療計

畫的病童，血清抗體濃度皆持續下降(圖二)，但在統計學上 paired *t* test 沒顯著意義。

細胞性免疫：已進行 10 位病童與 5 位正常人之周邊血單核球增殖分析實驗條件測試，發現(1)初發病之檢體因白血病芽細胞會自行分裂，造成周邊血單核球增殖分析時的背景值太高而無法判讀，所以初發病之檢體將不進行此檢驗。(2) 添加 B 型肝炎表面抗原濃度以 30 μ g/ml 刺激效果最好。由於此檢驗需新鮮血液立即進行，故仍持續進行中。

實驗討論：

一、 抗 B 型肝炎核心抗原抗體陽性率：B 型肝炎核心抗原抗體陽性所代表的意義為病童是曾自然感染而非因接受 B 型肝炎疫苗得到抗體免疫力。若是考慮因白血病本身引起之免疫力下降的影響，則應該是造成抗體濃度下降，而使得偽陰性增加而陽性率下降。可是本次結果卻是在 5-10 歲組病童 B 型肝炎核心抗原抗體陽性率則比對照組高，且有統計上的顯著差異。可能需要更多的個案來觀察。

二、 抗 B 型肝炎表面抗原抗體濃度：以抗體濃度小於 10mIU/mL，未達具有保護的效能，是為陰性反應；抗體濃度大於 10mIU/mL，具有保護的效能，是為陽性反應。病童與正常對照組依年齡分層統計，以 Chi-Square 方法分析抗體陽性率，結果並無明顯統計上的差異；但是以 Student *t* test 分析兩組的抗體濃度，三個年齡層病童的抗體濃度皆有顯著降低。由於 B 型肝炎疫苗皆於出生時即接種，當時病童皆未發病，不會影響疫苗的效果，故對 B 型肝炎疫苗的抗體陽性率不會有差異。但由於白血病發病時會引起之免疫力下降的影響，則造成抗體濃度下降，與目前的結果相符。而各治療組之間依年齡分層統計抗體濃度無差異，則表示影響白血病預後和治療的各項危險因子，並不會影響發病時的免疫力。但發病時免疫力的高低是否會影響預後則仍需要時間追蹤觀察。

三、 化學治療對抗 B 型肝炎表面抗原抗體濃度的影響：在治療後第 6 和 16 周抗 B 型肝炎表面抗原抗體效價濃度，各治療組 paired *t* test 皆沒有顯著意義。雖然沒有差異，但是各組的抗體濃度趨勢不同；標準危險群治療計畫組在引導期化學治療後的第 6 周時，抗體濃度最低，之後鞏固期結束的第 16 周，抗體濃度即開始回升，呈先降後升的情形；而高危險群治療計

組和最高危險群治療計畫組則在第 6 周和 16 周的抗體濃度則是持續下降；復發組在第 6 周和 16 周的抗體濃度則是持續上升。引導期為整個化學治療療程中治療強度最高的時段，所以治療結束後第 6 周的抗體濃度除復發組外皆是下降，復發組可能是因病童已接受過長期化療加上復發時白血病的影響，免疫力原本就較差(雖然沒有顯著差異)，經引導期化療達緩解後，白血病的對免疫力的影響被除去，因而抗體濃度上升。鞏固期時則各治療組治療強度不同，標準危險群治療計畫組最輕，所以抗體濃度上升；高危險群治療計畫組和最高危險群治療計畫組則治療強度較強，所以抗體濃度持續下降。不過由於各組個案數仍不多，需收集更多個案才能確定。而治療後免疫力恢復的情況是否會影響預後，則仍需要時間追蹤觀察。

結論

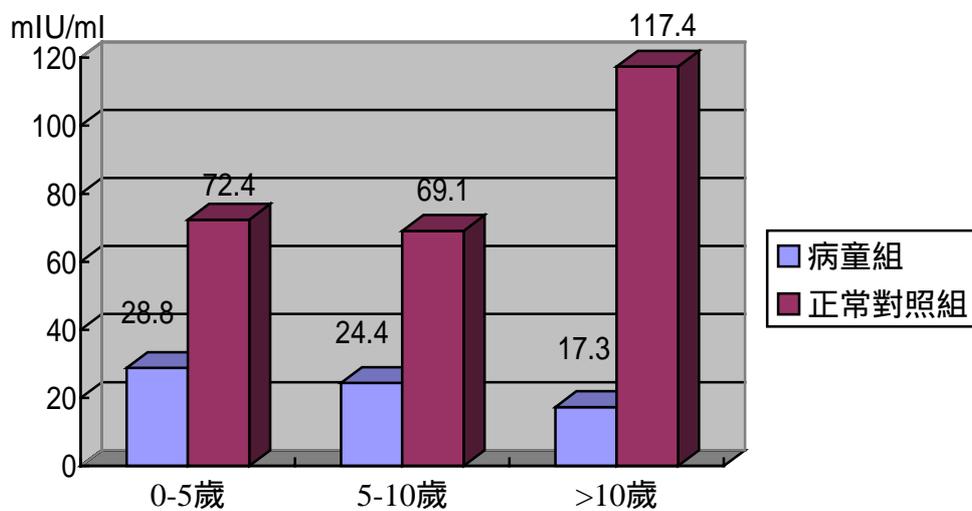
白血病病童發病時，先前接種之 B 型肝炎疫苗仍有保護的效果，但保護力遠比同年齡層的健康孩童低

白血病病童接受化學治療後，B 型肝炎疫苗的保護效果仍有待觀察

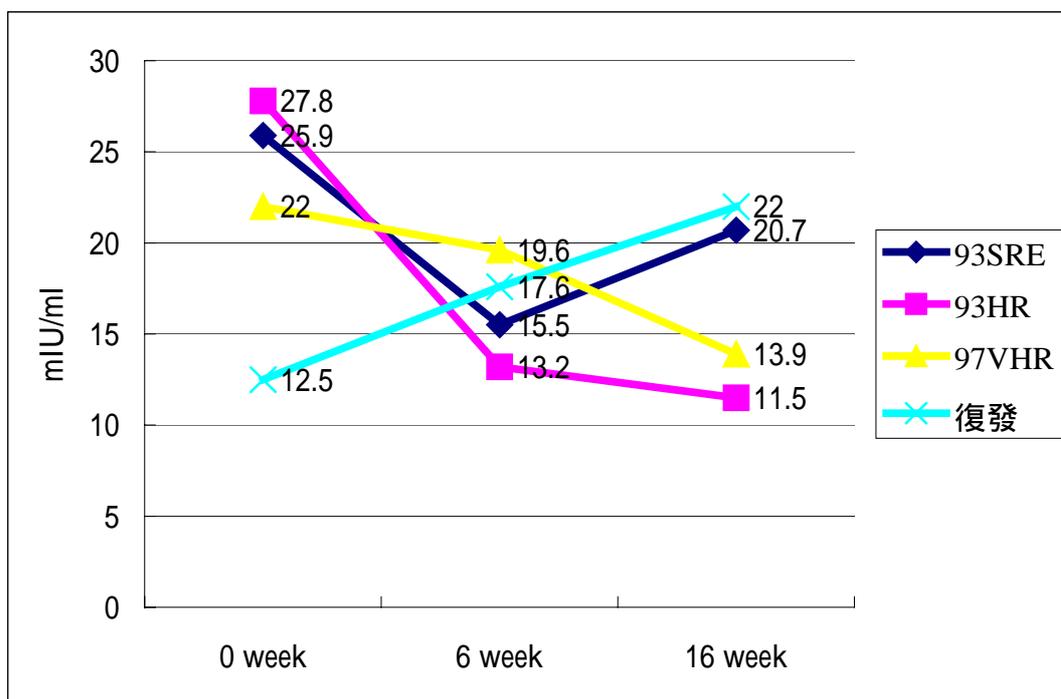
建議

白血病病童發病時追加 B 型肝炎疫苗仍需進一步研究

圖一：各年齡層白血病病童發病時的抗 B 型肝炎表面抗原抗體濃度與正常對照組之比較



圖二：白血病病童抗 B 型肝炎表面抗原抗體濃度在化學治療中的變化



References

1. Chen DS, Hsu NH, Sung JL, et al. A mass vaccination program in Taiwan against hepatitis B virus infection in infants of hepatitis B surface antigen-carrier mothers. *JAMA* 1987; 257: 2597 – 603.
2. Chen HL, Chang MH, Ni YH, Hsu HY, Lee PI, Lee CY, Chen DS. Seroepidemiology of hepatitis B virus infection in children: ten years of mass vaccination in Taiwan. *JAMA* 1996; 276: 906 – 908.
3. Chang MH, Chen CL, Lai MS, et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *NEJM* 1997; 336: 1855-1859.
4. Coursaget P, Yvonnet B, Chotard J, Sarr M, et al. Seven-year study of hepatitis B vaccine vaccine efficacy in infants from an endemic area (Senegal). *Lancet* 1986; 2:1143-1145.
5. Hadler SC, Franics DP, Maynard JE, Thompson SE, et al. Long-term immunogenicity and efficacy of hepatitis B vaccine in homosexual men. *NEJM* 1986; 315: 209-214.
6. Oztop S, Cetingul N, Olgun N, Nisli G, Batur Y, Bilgic A. Hepatitis B infection in children with leukemia and lymphoma. *Turk J Infect* 1988; 2: 267-74.
7. Cetingul N, Kavakli K, Vergin C, et al. Hepatitis B, hepatitis C, CMV and HIV markers in pediatric malignancy. *Turk J Cancer* 1994; 24:175-80.
8. Topeli A, Ozyilkan O, Ozyilkan E, et al. Prevalence of hepatitis C, B and D markers in cancer patients in Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 38-9.
9. Locasciulli A. Santamaria M. Masera G. Schiavon E. Alberti A. Realdi G. Hepatitis B virus markers in children with acute leukemia: the effect of chemotherapy. *Journal of Medical Virology* 1985;15(1):29-33.

10. Kavakli K. Cetingul N. Oztop S. Combined administration of hepatitis B vaccine and hepatitis B immune globulin in children with cancer [letter; comment]. *Pediatric Hematology & Oncology*. 1996;13(3):295-8.
11. Hovi L. Valle M. Siimes MA. Jalanko H. Saarinen UM. Impaired response to hepatitis B vaccine in children receiving anticancer chemotherapy. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 1995;14:931-5.
12. West DJ. Hepatitis B vaccination of immunosuppressed children. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 1995;14:1020.
13. Wagner D. Wagenbreth I. Stachan-Kunstyr R. Flik J. Failure of vaccination against hepatitis B with Gen H-B-Vax-D in immunosuppressed heart transplant recipients. *Clinical Investigator*. 1992;70:585-7.

14. Morgan-Capner P. Hepatitis B vaccine: still has its problems. *Pediatric Hematology & Oncology*. 1995;12:115-6.
15. Kavakli K, Nisli G, Cetingul N, Oztop S, Bilgic A, Ozacar T. Hepatitis B vaccination in children with thalassemia, hemophilia and cancer [letter]. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 1996;15:1140-1.
16. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V. Infectious complications in leukemic patients. *Seminars in Hematology* 1982; 19:193-226.
17. Chen CC, Chang MH, Lee HG, et al. Immunogenicity and reactogenicity of two recombinant hepatitis B vaccines in healthy adolescents on two-dose schedule. *Acta Paediatr Sin* 1999; 40: 157-60.
18. Huang LM, Chiang BL, Lee CY, Lee PI, Chi WK, Chang MH. Long-term response to hepatitis B vaccination and response to booster in children born to mothers with hepatitis B e antigen. *Hepatology* 1999;29: 954-959.