

による予防を考慮する必要がある。

(3) 輸血による感染

1970年に献血者に対するHBs抗原検査が開始されてからは輸血による感染は激減した。しかし、その後も感染例は存在しており、1989年にHBc抗体検査が導入され、さらに近年NAT(核酸増幅検査)によるHBV-DNAの検査が開始された。これらの対応により輸血によるHBV感染はきわめてまれになったが、まだ撲滅されていない。最近の日本赤十字の輸血情報によると、34~45万本の輸血に対して1件の受血者に感染すると推定されている。

(4) 性行為による感染 (sexually transmitted disease : STD)¹⁶⁾

近年、STDによる感染と推測される症例が増加している。これらのうち大部分は不顕性感染で、本人が気づかないうちにHBs抗体が陽転する例が多い。しかし時にB型急性肝炎を発症する例があり、まれではあるが劇症化する症例もある。

これまでSTD感染例はキャリア化することはまれであったが、近年、慢性化する報告例が増加している。わが国のHBVキャリアの大半はgenotype BとCであるが、近年のSTD感染例でキャリア化する症例の多くはgenotype Aの頻度が高いとされている。

(5) 医療機関内感染

近年、医療機器の消毒が厳重にされるようになり、機器を介しての感染はないと考えられるが、HBV感染者の血液に汚染された針の針刺しによる感染は起こりうるため、HBs抗体陰性の医療従事者はHBワクチンを接種すべきである。

4. 自然経過と予後

B型急性肝炎は成人と同様に小児でも経験されるが、新生児・乳児期のB型急性肝炎は無症状のことが多い。HBe抗体陽性の母親から生まれた児は、ほとんどHBVに感染することはないが、生後2~3か月に約10%に一過性感染がみられ、まれではあるが劇症肝炎もみられる¹²⁾。劇症肝炎は死亡率が高く生体肝移植が行われなければ約2/3が死亡する¹⁷⁾。現在、母子感染防止対策によりこの一過性感染は激減した。

小児期には、B型急性肝炎の合併症としてGianotti病がみられることがあり、顔面、体幹、四肢の伸側に特徴的な発疹をみる。このGianotti病の一部はキャリア化することがある。また最近、父子感染やアトピー性皮膚炎児への水平感染が問題となっている¹⁰⁾。

B型慢性肝炎のほとんどは、周産期の感染、すなわちHBe抗原陽性母親からの垂直感染例であり無症状である。衛藤ら¹⁸⁾によると垂直感染例の約1/3はSCを認め、SC後に肝機能は正常化する。一方、慢性肝炎で発見された小児は、約60%はSCし、その内80~90%が10歳までにSCする。また観察開始3年以内に約50%と高頻度にSCがみられる¹⁹⁾。諸外国と日本のSC率の差異はgenotypeの違いによると考えられる。しかしSCし肝機能が正常化してもHBe抗原陽性、HBe抗体陰性へと逆SCし、再び肝機能異常を来す例(成人ではHBV DNAが 10^5 コピー/ml以上のことが多い)が存在するのでSCしても発癌を念頭にした経過観察が必要である²⁰⁾。わが国ではHBVキャリアのHBs抗原が消失し、HBs抗体陽性となることは非常にまれである²¹⁾。B型慢性肝炎の経過中にHB腎症を発症する例があるが、HBe抗体へSCすると腎症は自然に軽快する。また、移動性の関節痛を経験することもある。

肝硬変は小児期にはまれであるが存在する。欧米では小児期の肝硬変はほとんどがD型肝炎やC型肝炎の合併例とされる。肝癌の発症は、まれではあるが重要であり、本邦でも肝癌を発症した小児例が報告されている²²⁾。肝癌発症のリスクファクターは、成人では、男性、45歳以上で肝機能異常を示すもの、肝硬変、などがあげられる。また、HBV genotype Ba型(Bアジア型:中国、台湾に多い)は肝癌発症率が高い。ただし、沖縄県はgenotype Bj(B日本型)が多いが肝癌の発症は少ない。現在のところ小児の肝癌発症のメカニズムは明らかでない。台湾では母子感染予防により、小児期の肝癌発症を減少させている²³⁾。

このようにB型慢性肝炎は、肝機能異常が存在する時はもちろん、SC後に肝機能が改善した後に再度肝機能が異常となる場合があることや、肝機能異常の有無にかかわらず肝癌を発症する例があることから、HBVキャリアは生涯にわたって定期的に経過を観察する必要がある。特に肝癌発症には注意が必要で、定期的な α -フェトプロテイン、PIVKA-II、超音波検査を行うべきである。

5. 治療の適応

現時点でも小児期のHBV感染症に対するコンセンサスが得られた治療法はない。HBVによる劇症肝炎に関しては疾患が致死性なので、対照群を設けたりすることやランダム化による臨床研究は倫理的な配慮から不可能であり、

エビデンスのレベルは低い。また、小児のB型慢性肝炎の治療に関しても目標が肝硬変・肝癌への阻止であるため、長期にわたる追跡をしないと最終的な効果判定を下すことができず、未だにそのような報告は報告されていない。さらに近年HBV genotypeの違いによりその臨床像が大きく異なることが判明しており²⁹⁾、このことを踏まえた治療方針を検討する必要性も指摘されている。

(1) 肝生検の適応基準

初診時に急性肝炎か慢性肝炎の急性増悪か血液検査や画像検査だけでは判断が困難な場合があるが、急性肝炎と慢性肝炎では治療方針が大きく異なることから、その鑑別のために肝生検を行って組織学的な評価を行う。凝固能低下がみられてからでは肝生検を行うのは困難であり、タイミングを逃さないようにすることが重要である。経過観察中のHBVキャリア患児において肝機能異常が持続する場合も、組織学的な病変の進行度の把握と治療方針の決定のために肝生検を行う必要がある。したがって、HBV感染症患児で肝機能異常がみられた場合は基本的には肝生検の適応がある。

(2) 各病型の治療の時期

①急性肝炎あるいは劇症肝炎

原則として急性肝炎では治療の必要はないが、劇症化を予測する必要がある。小児においては急性肝炎のうち、どの程度が劇症化するかのprospective studyはないので不明である。プロトロンビン時間が40%未満あるいはヘパラスチンテストが30%未満を呈した場合は、肝疾患診療を専門とする小児科医と連携をとりながら、インターフェロンや抗ウイルス薬による抗ウイルス療法と血漿交換などの人工肝補助療法を行う。

②慢性肝炎

本邦における小児のB型慢性肝炎は約80%がgenotype C、約10%がgenotype Bjである。Genotype Cは慢性肝炎が遷延しやすく、難治である²⁹⁾。成人B型慢性肝炎の予後不良因子にHBe抗原陽性がある。さらに、HBe抗原陽性慢性肝炎の肝硬変推移率は年間12.2%、肝硬変は年間5.6%で非代償性肝硬変へ移行し、非代償性肝硬変の年間死亡率は39%とされる²⁶⁾。このような背景から小児や思春期年齢の患者においてもHBe抗原陽性で肝機能異常がある症例にはインターフェロン(IFN)療法を中心とした抗ウイルス療法が行われることがある²⁷⁾。一般に治療の対象はHBe抗原陽性で6か月以上にわたりトランスアミナーゼ高値が持続し、肝生検でpiecemeal necrosis, bridging necrosisあるいは小葉の炎症が強く、肝硬変へと進展する可能性が予測される例である²⁷⁾。治療はトランスアミナーゼ正常かつHBe抗原陰性かつHBV DNA量が 10^5 copies/ml未満を目標とする。但し、HBe抗原陰性化からトランスアミナーゼ正常化までには1~2年を要する場合もある。治療の最終的な目標は、肝硬変や肝癌への進展の阻止にあるが、若年者においても、成人においても肝癌をIFN療法で阻止できるエビデンスはない²⁸⁾²⁹⁾。

6. 治療法

(1) インターフェロン

1976年にGreenbergら³⁰⁾が成人のB型慢性肝炎に対してIFNが有効であることを初めて報告して以来、欧米では成人を対象として多くの臨床試験が行われた。それらをまとめると、IFN治療群ではHBe抗原陰性化率が40~70%、HBs抗原陰性率が20%近いという優秀な成績が得られた³¹⁾。わが国ではB型慢性肝炎に対するIFN療法は1986年に保険適応となった。承認当初はIFNの投与期間は4週間に制限されていた。この4週間(28回)の短期治療成績では、HBe抗原陰性化率は20%弱と欧米に比較すると明らかに不良であった³¹⁾。そして2000年4月からは、わが国でもHBe抗原陽性のB型慢性肝炎に対してIFNを6か月間使用できる長期投与が承認され、現在では成人に対しては週3回、6か月の長期間欠投与が主体となっている。わが国ではこの長期間欠投与によりHBe抗原陰性化率は30~40%とされる³¹⁾。

一方、小児のB型慢性肝炎に対するIFN療法に関して、欧米では5~10MIU/m²/日、週3回6か月投与が標準的である。欧米でコンセンサスの得られた治療対象はHBe抗原陽性かつ血清HBV-DNA陽性であり、血清HBV-DNA量は低いし中等度に留まる、トランスアミナーゼは異常高値、年齢は2歳以上としている³²⁾。禁忌としては重大な基礎疾患がある場合や、自己免疫疾患などである³²⁾。そして治療群では治療終了12か月以内で25~50%は血清HBV-DNAは陰性化しており対照群とは有意差をもって効果的である。

わが国における小児のB型慢性肝炎に対するIFNの治療試験は1991年に白木ら³³⁾が報告しており、IFN- α の連日28日間投与によって短期的には強い抗ウイルス効果が確認され、一方で急性期のインフルエンザ様症状、血球減少、精神的な影響などは成人よりも軽く、安全性には問題がなかった。しかし、その後は小児に対する大規模な短期投与法や長期間欠投与法の治療報告はなく、現時点でもIFN治療の長期的な治療効果は不明である。IFN療法に

より HBe 抗体が陽転した例からも長期経過後に肝細胞癌が発症した例があり³⁹⁾、最終的には治療群と非治療群における発癌率を検討し、治療効果の有無を判定する必要がある。わが国を含む東南アジアでは HBV の持続感染は主に乳幼児期に成立し、またわが国の HBV は genotype C が主体であるが、いずれも IFN の反応は不良と予測される要因であることから、IFN 単独療法だけでは限界もある。今後はラミブジンと IFN の併用療法³⁴⁾³⁵⁾や、C 型慢性肝炎の治療で行われている週 1 回の投与が可能で有効性も高い pegylated IFN (Peg-IFN) の導入³⁶⁾なども検討する必要がある。いずれにしろ、小児の B 型慢性肝炎の治療は小児の QOL を考えると成人とは異なり短期間で終了する治療法を選択すべきである。

(2) 経口抗ウイルス薬

最近、HBV に対する経口抗ウイルス薬の開発が進んでいる。成人では IFN よりも高頻度で用いられている。代表的なものがラミブジンであるが、その他の薬剤の開発と治験の進行もめざましい。

①ラミブジン

ラミブジンは HBV の逆転写酵素阻害薬であり、強力な抗ウイルス作用を示す。わが国でも 2000 年 11 月から B 型慢性肝炎に対して保険適応となった。経口薬で副作用も少ないことから、成人領域では広く使われるようになってきている。

小児の B 型慢性肝炎に対する有効率は、海外での多施設における検討(ラミブジン 3mg/Kg/日 1 日 1 回投与)では、投与 52 週時において肝機能の正常化 55%、SC 率 22%、HBV-DNA 陰性化 61% であった³⁶⁾。この成績は成人に関する海外やわが国での報告とほぼ同程度の有効率である³⁷⁾。この報告に基づいて 2003 年に米国 FDA は 2 歳以上の慢性 HBV 感染小児に対してラミブジンの使用を認可している。また IFN とラミブジンを中心とした小児 B 型慢性肝炎の治療方針が提唱されている¹⁷⁾。

ラミブジンはわが国では小児への投与経験はきわめて少なく、安全性も確立されておらず、使用する際は十分な説明を行って同意を得るべきである。小児での適応は、IFN 無効例、IFN 禁忌例、HBV 関連肝硬変や劇症肝炎、悪性腫瘍や臓器移植のために免疫抑制療法を受ける HBV キャリアなどに限定される。

ラミブジンの問題点として投与中にラミブジン耐性の YMDD 変異株が出現することが挙げられる。小児での YMDD 変異株の出現頻度は、52 週間投与で 19% と報告されている³⁶⁾。YMDD 変異株が出現しても肝機能が正常であれば、そのままラミブジンの内服を継続する。しかし一部の例では肝炎の増悪を伴うことがあり、その場合は後述のようにアデフォビルを併用することが勧められる。

ラミブジンの副作用は軽微であり、欧米の小児を対象とした臨床研究でも重篤な有害事象は報告されていない³⁶⁾。わが国でも投与経験は少ないがとくに重大な副作用は報告されていない³⁸⁾。ラミブジンは経口薬剤であり、IFN 療法に比べて通院回数が少なく患者の利便性が良い、副作用も少ない、などの利点がある。

②アデフォビル、エンテカビル

アデフォビルは、ラミブジン耐性株に有効であり、YMDD 変異株による肝炎の再発に対してはアデフォビルの追加投与が適応となる³⁹⁾。わが国でもアデフォビルがラミブジン耐性株に対して 2004 年 10 月から保険適応となった。さらに 2006 年 7 月から抗ウイルス作用が強く、長期間投与でも変異株がほとんどみられないエンテカビルが保険適応となった⁴⁰⁾。内科領域では新規の B 型慢性肝炎症例に投与する抗ウイルス薬としてエンテカビルが第一選択薬となりつつある。ただしアデフォビル、エンテカビルとも小児に対する安全性は確立されていない。

(3) その他の治療

肝庇護療法にはトランスアミナーゼ値を一時的に改善する効果があるが、抗ウイルス効果は全く望めない。現時点ではトランスアミナーゼの異常値が持続し、IFN や経口抗ウイルス薬による治療が難しい場合には肝庇護療法を選択することがある。しかし、肝機能改善薬には B 型慢性肝炎治療でのエビデンスは少なく、漫然と肝庇護療法を行うことは適切な治療の時期を逸し、病態の増悪につながる可能性もあるため、肝疾患診療を専門とする小児科医の管理の下に治療を行うべきである。

①グリチルリチン製剤

強力ネオミノファーゲン C[®] (SNMC) 長期投与は C 型慢性肝炎においては、血清トランスアミナーゼ値の低下、肝硬変への進展予防や肝癌の発生予防の効果が認められている⁴¹⁾。B 型慢性肝炎においては血清トランスアミナーゼ値を低下させる効果はある。しかし、血清ウイルス量の低下や HBe 抗原から HBe 抗体への SC を促進する効果はなく、発癌を含む長期予後への効果についてのエビデンスは乏しい⁴²⁾。SC 時には必ず肝機能異常を伴い、成人ではこの時、劇症化する例があるが、小児での劇症化の報告はほとんどない。従って小児期の B 型慢性肝炎に対しては SC 時であっても SNMC を使用する根拠は少ない。

②ウルソデオキシコール酸 (UDCA)

B型慢性肝炎ではUDCAは有意にALTを低下させる効果があるが⁴³⁾、ウイルス学的、臨床的、組織学的予後に関するデータはない。小児B型肝炎に使用するエビデンスは乏しい。

③小柴胡湯

小柴胡湯は血清トランスアミナーゼ値低下、HBe抗体産生促進、HBe抗原からHBe抗体へのSC促進を目的に投与されてきたが^{44)~46)}、IFNとの併用で重篤な間質性肺炎を起こすことが報告され、最近ではその使用頻度は減った。

7. 感染防止

HBVの感染が成立するのは、ウイルスを含む血液などの体液が体内に入る場合であり、感染している人の血液や体液になるべく触れないことが感染予防上、大切である⁴⁷⁾。

(1) 母子感染防止

HBs抗原陽性の全ての妊婦からの出生児が母子感染予防措置の対象となる。この予防措置については1995年4月から健康保険診療で行うことができるようになり、HBワクチン終了後のHBs抗原、HBs抗体検査、および追加ワクチン接種についても保険診療の対象となった⁴⁸⁾。

母子感染のリスクファクターとして、母体のHBe抗原陽性やHBV DNA高値があげられる。母親がHBe抗原陽性の場合80~90%が母子感染し、高率にキャリア化する。また母親がHBe抗体陽性の場合は6~7%が母子感染し、そのほとんどは一過性感染となるが、まれに劇症肝炎を発症する。このようにHBVキャリア化や劇症肝炎を防ぐ意味でも母子感染予防は重要である。

出生した児に対してはHBIGを2回とHBワクチンを3回投与する。HBワクチンを接種しても抗体上昇が得られない場合があるため、児の血中の獲得HBs抗体価が十分に得られなかったり、検出されなくなった場合には、適宜HBIG、HBワクチンを追加投与する。なお、母親のHBe抗原が陰性の場合には2か月時のHBIG投与は省略可能である^{48)~51)}。

HBs抗原検査は生後1か月時と6か月時に行う。臍帯血は偽陽性となることがあるので検査しない。3歳以下の児にHBVが感染するとキャリア化しやすいことが知られており⁵²⁾、少なくとも3歳までは十分な抗体価を維持すべきである⁴⁹⁾⁵¹⁾。生後6か月目の検査でHBs抗体が陽性であることを確認した場合でも、生後1年目、2年目、3年目まではHBs抗体の検査を行い、HBs抗体が陰性化していた場合にはHBワクチンを追加接種して、HBs抗体が陽性である状態を維持しておくことが必要である。

少数ではあるが母子感染予防措置を受けた後にHBs抗原が陽転する例が存在することが1990年に報告された⁵³⁾。HBs抗原の抗原決定基に変異を生じることで、宿主の免疫機構から逃れる変異株 (escape mutant) が出現すると考えられている⁵³⁾。この変異株の発生は2歳までに出現してくることが多いので、この時期のHBs抗原陽転に留意する⁵⁴⁾⁵⁵⁾。

低出生体重児に対するHBIG接種は成熟児と同様に生後速やかに行い、投与量は体重に関係なく通常1ml (200単位)とするが、出生体重が小さい場合は複数の接種部位に分割して投与する。HBワクチン接種は予防接種ガイドラインに基づき、出生日から月齢で接種を進めていくが、出生体重2,000g未満の児では抗体産生が悪いと言われており、専門医に問い合わせることが推奨される⁵⁰⁾。

HBワクチン接種法は国際的には生後早期から開始する方法が一般的であるが、時にHBs抗体価の上昇しにくい場合があるため、経時的にHBs抗体検査を行っていく必要がある。またアジア諸国や米国など多くの国が、乳児期に全員HBワクチンを接種している (universal vaccination)⁵⁶⁾。台湾やガンビアなどでのuniversal vaccinationの導入後、小児のHBs抗原陽性率が1/5~1/10に低下したと報告されている⁵⁷⁾。本邦でも母子感染が激減していることや、水平感染であってもキャリア化することがある genotype A のHBV感染が増加していることから、今後水平感染防止が重要になってくる可能性があり、将来の危険性を考えると universal vaccination の導入が望ましい。

(2) 家庭内感染防止

家庭の日常生活の場でHBVに感染することは少ない。HBVキャリアと握手した場合、軽くキスした場合、食器を共用した場合、などでは感染しないと考えられている。HBV感染予防のための具体的な方法については、「8. 患児と家族の指導」の項を参照されたい。

HBVキャリアの人が結婚を予定し、相手がHBs抗体陰性であることがわかった場合には、家庭内感染の可能性があるためHBワクチンを接種しておくことが望ましいが、現状では保険外診療となる。

父子間、兄弟間、などの水平感染は母子感染ほどリスクは高くないが、重症のアトピー性皮膚炎がある場合や、

HBe 抗原陽性など HBV キャリアの血中ウイルス量が高い場合には水平感染を起こすことが比較的多いため⁵⁸⁾、HB ワクチンを接種することが望ましい。ただしこの場合も保険適応外となり、任意接種の扱いになる。

(3) STD 防止

HBV は性行為で感染する場合があります。STD としての側面を持っている。HBV に感染している人の血液は C 型肝炎ウイルス (HCV) やエイズウイルス (HIV) に感染している人の血液に比べて感染力が強く、精液や体液、分泌物などの中にウイルスが混入することがあり、これらを介して HBV の感染がみられることがある。

HBV による性感染のリスクがある場合には、他の性行為感染症の予防にも効果があるコンドームの使用が勧められる。

(4) 薬物乱用の防止

他人と注射器を共用して覚せい剤、麻薬等を注射した場合は、血液を介して HBV が感染する恐れがある。非合法の薬物 (覚せい剤、麻薬等) の注射をしないこと、ピアスをするときは、清潔な器具であることを必ず確かめることが重要である。この点に関しては家庭や学校での教育や指導が重要である。

8. 患児と家族の指導⁶⁾

(1) 日常生活について

通常、小児期の B 型慢性肝炎は自覚症状がほとんどないので、日常生活には制限はなく、食事、運動、予防接種、かぜ薬の服薬など健康児と区別する必要はない。しかし、黄疸を伴うような肝炎の急性増悪時や、非代償性肝硬変の場合は入院が必要になる。

B 型慢性肝炎は自覚症状がないまま肝病変が進行する場合もあり、まれであるが小児でも発癌する例もあるので、専門施設での定期的な診療が必要である。

(2) 感染予防について

① 一般的注意

母子感染の予防が最も重要であるが、父子感染などの水平感染もあるので、可能な限り同居家族の HBV 感染状況を把握し、HBV キャリアがいる場合は未感染者に HB ワクチン接種を勧める。水平感染は血液や体液 (唾液、浸出液、精液など) を介しておこる。特にウイルス量が多い場合 (HBe 抗原陽性者、HBV DNA 高値) は感染力が強いため、その血液や体液の扱いには注意を要する。具体的には血液や体液が付着したティッシュなどはむき出しにならないようにビニール袋などにいれて廃棄する。外傷や鼻出血などはできるだけ自分で手当できるように指導する。乳幼児に口移して食べ物を与えない。手指に血液や体液が付着した場合は、石けんを用いて流水でよく洗っておく。床や服を汚染した場合は、市販の次亜塩素酸ナトリウム液 (5~6%) を 0.1% (1,000ppm) に希釈したものに浸して消毒しておく。消毒用アルコールは HBV の感染予防に対して無効であること、血液や体液がそのまま乾燥すると長期間感染源となり得ることに注意する。カミソリ、歯ブラシ、クシは個人専用とし、共有しないことが大切である。HBV キャリアがアトピー性皮膚炎に罹患していて、出血を伴う掻爬痕や浸出液を認める場合は、その部分をできるだけ包帯やガーゼなどで覆う。

② 乳幼児期の注意

ウイルス量が多い乳幼児では、よだれ (唾液) も感染源になることから、おもちゃなど身の回りのものはこまめに洗浄し、できるだけ他の乳幼児には使わせないようにする。

③ 学校生活における注意

HBV キャリアであることは保護されるべき重要な個人情報なので、原則的には保育所・幼稚園・学校など第三者に伝える必要はないと思われる。しかし、施設における感染予防に対する責任意識の高まりから、児が HBV キャリアであるということをあらかじめ知りたいという施設側の希望は強くなっている。告知する場合は感染者差別に対する配慮が不可欠である。

④ 思春期・青年期の注意

性交渉、不法薬物の使用、ピアスのまわし空けなど、HBV 感染の危険性が比較的高い時期である。一般論として、この時期には本人、教育者に対し血液を介する感染症、STD としての HBV 感染予防の啓蒙が重要となる。なお喫煙や習慣的飲酒の害の説明も同様に行う。HBV キャリアのパートナーには HB ワクチンを接種してもらうことが望ましいこと、HB ワクチン未接種の相手との性交渉時にはコンドームを使用することを勧める。献血はしない。挙児を希望する女性には、母子感染予防の意義を理解してもらう。

なお、本診療指針の作成は、厚生労働科研「C型肝炎ウイルス等の母子感染防止に関する研究」の研究活動の一環として行われた。

参考文献

- 1) Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004 ; 350 : 1118—1129.
- 2) Weber B. Recent developments in the diagnosis and monitoring of HBV infection and role of the genetic variability of the S gene. *Expert Rev Mol Diagn* 2005 ; 5 : 75—91.
- 3) Chemin I, Trepo C. Clinical impact of occult HBV infections. *J Clin Virol* 2005 ; 34 Suppl 1 : S15—21.
- 4) Yim HJ, Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection : what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology* 2006 ; 43 (2 Suppl 1) : S173—181.
- 5) Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, et al. WHO Collaborative Study Group. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang* 2001 ; 80 : 63—71.
- 6) Yao JD, Beld MG, Oon LL, et al. Multicenter evaluation of the VERSANT hepatitis B virus DNA 3.0 assay. *J Clin Microbiol* 2004 ; 42 : 800—806.
- 7) Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence : comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988 ; 69 : 2575—2583.
- 8) Liu CJ, Kao JH, Chen DS. Therapeutic implications of hepatitis B virus genotypes. *Liver Int* 2005 ; 25 : 1097—1107.
- 9) Fung SK, Lok AS. Management of hepatitis B patients with antiviral resistance. *Antivir Ther* 2004 ; 9 : 1013—1026.
- 10) 土井 悟, 会津研二, 山本光章, 他. B型肝炎父子感染キャリアとなった重症アトピー性皮膚炎児の1例. *日児誌* 2005 ; 109 : 1247—1254.
- 11) 白木和夫, 谷本 要, 岡田隆好. HBV 母児感染の疫学. *肝胆臓* 1986 ; 13 : 493—501.
- 12) Shiraki K, Yoshihara N, Sakurai M, et al. Acute hepatitis B in infants born to carrier mother with the anti-body to hepatitis B e antigen. *J Pediatr* 1980 ; 97 : 768—770.
- 13) 清水 勝, 杉山照幸, 高橋善彌太, 他. 家族内感染—特に夫婦間感染—. *日本臨床* 1995 ; 53(増刊:分子ウイルス病学(下)) : 350—356.
- 14) Tajiri H, Tanaka Y, Kagimoto S, et al. Molecular evidence of father-to-child transmission of hepatitis B virus. *J Med Virol* 2007 ; 79 : 922—926.
- 15) 藤澤卓爾, 牛島高介, 大和靖彦, 他. 我が国の小児 HB ウイルス感染症の現状と予防対策の実態調査. *日児誌* 2005 ; 109 : 363—369.
- 16) 鶴沼直雄 : STD としての HBV 感染. *日本臨床* 2004 ; 62 : 199—202.
- 17) Broderick AL, Jonas MM. Hepatitis B in children. *Semin Liver Dis* 2003 ; 23 : 59—68.
- 18) 衛藤 隆, 秦堅佐工, 桜井迪朗, 他. 垂直感染により B型肝炎ウイルスキャリアとなった小児の自然経過について. *肝臓* 1987 ; 28 : 391—398.
- 19) 木村昭彦, 松行真門, 栗谷典量, 他. 小児 B型慢性肝炎未治療例の eAg から eAb への Seroconversion. *日児誌* 1990 ; 94 : 2073—2074.
- 20) Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B : update of recommendations. *AASLD Practice Guideline. Hepatology* 2004 ; 39 : 857—861.
- 21) 衛藤 隆, 秦堅佐工, 桜井迪朗, 他. 小児期の HBV 持続感染者における HBs 抗原消失例について. *肝臓* 1985 ; 26 : 1965.
- 22) Tanaka T, Miyamoto H, Hino O, et al. Primary hepatocellular carcinoma with hepatitis B virus-DNA-integration in a 4-year-old boy. *Hum Pathol* 1986 ; 17 : 202—204.
- 23) Chang MH, Chen CJ, Lai MS, et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. *Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. N Engl J Med* 1997 ; 336 : 1906—1907.
- 24) 折戸悦朗, 溝上雅史. HBV キャリアの地理的遺伝子分布. *肝胆臓* 2004 ; 49 : 425—430.
- 25) 大森 格, 鳥居信之, 長谷川潔, 他. Genotype A 急性 B型肝炎の臨床的特徴とラミブジン投与後の長期予後(genotype B, C との比較). *肝臓* 2005 ; 46 (suppl) : A115.
- 26) 藤澤知雄, 白木和夫. 肝臓疾患の診断と治療ガイドライン. *小児科臨床(増刊号)* 2002 ; 55 : 1327—1334.
- 27) 乾あやの, 藤澤知雄, 阿部賢治. B型肝炎母子感染防止事業前後における HBV genotype の変遷. *肝臓* 2005 ; 46 (suppl) (2) : A385.
- 28) 三田村圭二, 柴田 実. 長期予後からみた B型慢性肝炎に対するインターフェロン療法の適応. *内科* 1999 ; 84 : 274—279.
- 29) Fujisawa T, Komatsu H, Inui A, et al. Long-term outcome of chronic hepatitis B in adolescents or young adults in follow-up from childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000 ; 30 : 202—207.
- 30) Greenberg HB, Pollard RB, Lutwick LI, et al. Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis. *N Engl J Med* 1976 ; 295 : 517—522.
- 31) 郡司俊秋, 小俣政男. B型慢性肝炎に対する治療法とその選択基準. *日本臨床* 2004 ; 62 増刊号. ウイルス性肝炎(下) : 309—312.
- 32) Jara P, Bortolotti F. Interferon-alpha treatment of chronic hepatitis B in childhood : a consensus advice based on experience in European children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999 ; 29 : 163—170.
- 33) 白木和夫, 松本脩三, 今野多助, 他. 小児の B型慢性肝炎に対するインターフェロン α (BALL-1) の臨床効果につ

- いて。肝胆膵 1991 ; 22 : 669—681.
- 34) D'Antiga L, Aw M, Atkins M, et al. Combined lamivudine/interferon- α treatment in 'immunotolerant' children perinatally infected with hepatitis B : a pilot study. *J Pediatr* 2006 ; 148 : 228—233.
 - 35) Lau GKK, Piratvisuth T, Luo KX, et al. Peginterferon alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005 ; 352 : 2682—2695.
 - 36) Jonas MM, Kelley DA, Mizerski J, et al. Clinical trial of lamivudine in children with chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2002 ; 346 : 1706—1713.
 - 37) 谷川久一, 市田文弘, 鈴木 宏, 他. B型慢性肝炎に対するGG714(Lamivudine)の長期投与試験. 肝胆膵 1998 ; 36 : 597—611.
 - 38) 田尻 仁, 沢田 敦, 恵谷ゆり, 他. ラミブジンによる小児期・青年期B型慢性肝炎の治療経験. 日児誌 2005 ; 109 : 1022—1026.
 - 39) Benhamou Y, Bochet M, Thibault V, et al. Safety and efficacy of adefovir dipivoxil in patients co-infected with HIV-1 and lamivudine-resistant hepatitis B virus : an open-label pilot study. *Lancet* 2001 ; 358 : 718—723.
 - 40) Lai CL, Rosmawati M, Lao J, et al. Entecavir is superior to lamivudine in reducing hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis B infection. *Gastroenterology* 2002 ; 123 : 1831—1838.
 - 41) Kumada H. Long-term treatment of chronic hepatitis C with glycyrrhizin [Stronger Neo-Minophagen C (SNMC)] for preventing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2002 ; 62 (Suppl 1) : 94—100.
 - 42) Dhiman RK, Chawla YK. Herbal Medicine for liver disease. *Dig Dis Sci* 2005 ; 50 : 1807—1812.
 - 43) Zhou J, Wang C, Wu S. Efficacy of ursodeoxycholic acid therapy on chronic hepatitis. *J Clin Hepato-Biliary Dis* 1995 ; 11 : 148—150.
 - 44) 佐藤俊一, 石川和克, 千葉俊明. B型慢性肝炎に対する小柴胡湯の臨床効果. 消化器科 1991 ; 15 : 39—49.
 - 45) 田尻 仁, 古座岩宏輔, 尾崎由和, 他. 小児HBVキャリアーについての臨床的検討—肝炎発症例における小柴胡湯の効果—. 日児誌 1990 ; 94 : 1811—1815.
 - 46) 白木和夫, 谷本 要, 富樫武弘, 他. HBe抗原陽性小児慢性B型肝炎に対する小柴胡湯の有効性に関する検討. 小児科臨床 1991 ; 44 : 2146—2151.
 - 47) B型肝炎について～一般的なQ&A. ウイルス肝炎研究財団 : <http://www.vhfj.or.jp/>
 - 48) 白木和夫. 「B型肝炎母子感染防止事業」の改定をめぐって. 日児誌 1995 ; 99 : 1075—1078.
 - 49) 藤沢知雄, 尾上昌弘, 乾あやの. HBVの母子感染と予防対策. 日本臨床 1995 ; 53spp : 342—349.
 - 50) 須磨崎亮. B型肝炎—現況, ワクチン, 母子感染—. 小児科臨床 1997 ; 60 : 1880—1886.
 - 51) 長田郁夫, 白木和夫. 肝炎ウイルス母子感染防止とその意義. 小児科診療 1998 ; 73 : 1127—1134.
 - 52) 福田信臣, 小島峯雄, 足立信幸, 他. 幼児におけるHBウイルスcarrier成立年齢について. 肝臓 1978 ; 19 : 936—940.
 - 53) Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990 ; 336 : 325—329.
 - 54) Fujii H, Moriyama K, Sakamoto N, et al. Gly145 to Arg substitution in HBs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 ; 184 : 1152—1157.
 - 55) Zhu Q, Lu Q, Kiong S, et al. Hepatitis B virus S gene mutants in infants infected despite immunoprophylaxis. *Chin Med J* 2001 ; 114 : 352—354.
 - 56) 白木和夫. なぜ日本では, B型肝炎ワクチンのuniversalvaccinationを行わないのか?. 小児内科 2004 ; 36 : 1312—1314.
 - 57) Goldstein ST, Fiore AE. Toward the global elimination of hepatitis B virus transmission. *J Pediatr* 2001 ; 139 : 343—355.
 - 58) Davis LG, Weber DJ, Lemon SM. Horizontal transmission of hepatitis B virus. *Lancet* 1989 ; 22 : 889—893.

Molecular Evidence of Father-to-Child Transmission of Hepatitis B Virus

Hitoshi Tajiri,^{1*} Yasuhito Tanaka,² Seiiti Kagimoto,³ Jun Murakami,⁴ Daisuke Tokuhara,⁵ and Masashi Mizokami²

¹Osaka General Medical Center, Osaka, Japan

²Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan

³Saitama Children's Medical Center, Saitama, Japan

⁴Tottori University Faculty of Medicine, Tottori, Japan

⁵Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

At present in Japan, only high-risk infants born to chronic hepatitis B virus (HBV)-infected mothers are given HBV vaccine. However, children can contract the virus from other HBV-infected family members, including fathers. The aim of this study is to present substantial and unequivocal evidence of father-to-child transmission of HBV infection using techniques including homology analysis and phylogenetic analysis. Thirteen chronic HBV-infected members of five families that included eight children and their respective fathers were enrolled in this study. Homology analysis and phylogenetic analyses of 2 coding region, the S gene and X gene, from the HBV genome were performed comparing the 13 nucleotide sequences from the 13 subjects. The nucleotide homology among the five sets of fathers and children was quite high (99.3–100%). A phylogenetic tree constructed on the 13 nucleotide sequences showed that all 5 sets of fathers and children were grouped into the same cluster with high bootstrap values. These results strongly indicate that father-to-child transmission is an important route of HBV infection in Japan and it is recommend that universal vaccination against HBV infection be instituted immediately in Japan for all children, in accordance with the WHO recommendation of 1997. *J. Med. Virol.* 79:922–926, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: HBV vaccine; phylogenetic tree; universal vaccination; maternal transmission

INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) infection can be acquired during infancy and early childhood [Lok et al., 1987]. Infants and young children can contract the virus from other HBV-infected family members including

mothers, fathers, and siblings. Evidence for mother-to-child transmission of HBV infection during the perinatal period has been presented in previous studies [Szmuness et al., 1973; Heathcote et al., 1974]. In Japan only high-risk infants born to chronic HBV-infected mothers have been given the HBV vaccine since 1986, according to a selective vaccination policy of the Japan Administration for Health and Welfare. This policy has been successful in terms of the reduction of the number of HBV carrier infants contracting the virus from their HBV carrier mothers [Tada et al., 1992]. Maternal transmission is a leading cause of HBV infection in children, as determined by a recent study in Japan, and father-to-child transmission is second [Fujisawa et al., 2005]. Although several studies have addressed the latter as a considerably important route among established transmission routes of HBV [Williams et al., 1987; Milas et al., 2000; Zhuo et al., 2000; Erol et al., 2003], most of these studies have used serological methods. Therefore, convincing evidence of father-to-child transmission has not been provided, except for a few studies that used modern biomolecular techniques, including homology analysis [Lin et al., 1990, 2005; Shimizu et al., 2003]. However, these studies examined only a small number of families and two of these studies presented only data obtained using homology analysis without performing molecular evolutionary analyses of HBV. Only a recent report has shown father-to-child transmission in single family by using phylogenetic analyses of the entire pre-S gene [Lin et al., 2005].

On the basis of disease burden and the availability of safe and effective vaccines, WHO recommended that by

Grant sponsor: Japan Health Labor Sciences Research Grant.

*Correspondence to: Hitoshi Tajiri, Department of Pediatrics, Osaka General Medical Center, 3-1-56 Bandaihigashi, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8558, Japan. E-mail: tajiriji@gh.pref.osaka.jp

Accepted 16 January 2007

DOI 10.1002/jmv.20916

Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com)

the end of the 20th century, hepatitis B vaccine should be incorporated into routine infant and childhood immunization programs for all countries [Van Damme et al., 1997]. However, in some countries and areas, universal vaccination has not yet been introduced due to the shortage of financial resource or because of national policy; this includes Japan and England [Kao and Chen, 2002; Hahne et al., 2003]. Thus, substantial intrafamilial transmission of HBV infection to children has occurred in countries and areas where universal vaccination has not yet been practiced [Kao and Chen, 2002].

The aim of this study is to present substantial and unequivocal evidence for father-to-child transmission of HBV infection by using techniques, including both homology analyses and phylogenetic analyses of two coding region, the S gene and X gene, from the HBV genome.

MATERIALS AND METHODS

Members of 5 families, which included 12 children and their parents, were enrolled in this study (Table I). The members of family A were tested for hepatitis B surface antigen (HBsAg) when the father (A-F) was diagnosed with liver cirrhosis associated with HBV infection. The members of family B and C were tested for HBsAg when the fathers were found to be chronic HBV carriers in a routine health examination in their respective companies. In family D, the index case (D-2) was found to be a chronic HBV carrier by chance. In family E the index case (E-1) presented with acute hepatitis B. Blood samples from 13 subjects including 8 HBV-infected children and their fathers were subjected to molecular

analysis. HBsAg and anti-HBs antibodies were determined by radioimmunoassay.

Two independent HBV DNA sequences bearing the large S region and X/precore/core regions were amplified by PCR with hemi-nested primers by the method described previously [Sugauchi et al., 2001]. Usually, two independent genes should be compared for molecular evolutionary analyses, because HBV sometimes has intra- or inter-genotype recombination, that is, Ba (Asian type) bearing a recombination event with genotype C in the precore/core regions. As previously reported [Mizokami et al., 1999; Kao et al., 2004], the S gene is suitable for HBV genotyping, and core promoter/precore sequences include critical mutations for liver disease progression. Hence, in this study two independent sequences in the S region and the enhancer II/core promoter-precore/core regions were determined. In brief, nucleic acids were extracted from 100 µl of serum using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Inc., Hilden, Germany). PCR for the large S genes was performed with sense primer (HB1F:5'-AAGCTCTGC-TAGATCCCAGAGT-3' [nt 18-39]) and antisense primer (HB1R:5'-GAAACATAGAGGTGCCTTGAGCAG-3' [nt 557-534]) for 40 cycles (94°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min [6 min in the last cycle]) in a 96-well cycler (GeneAmp 9700, Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CA). The PCR for the X/precore/core genes was performed with sense primer (HB7F:2.5'-CATGGAGACCACCG-TGAACGC-3' [nt 1607-1627]) and antisense primer (HB7R-2: 5'-CCTGAGTGCTGTATGGTGAGG-3' [nt 2072-2052]) for 40 cycles, under the same conditions as in the above PCR. Amplicons were run by electrophoresis on 3% agarose gel, stained with ethidium bromide, and observed in the UV light. Thereafter, PCR

TABLE I. Demographic Data of the Members of Five Families With Father-to-Child HBV Transmission

		Age	Sex	HBs Ag	HBs Ab	HBe Ag	HBe Ab	HBV DNA	AST U/l	ALT U/l	ID
Family-A	Father	45	M	+	-	+	-	+	63	52	Osaka-2
	Mother	43	F	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	
	A-1	10	F	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	
Family-B	A-2	8	F	+	-	+	-	+	40	35	Osaka-1
	Father	41	M	+	-	+	-	+	20	16	
	Mother	39	F	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	
	B-1	14	F	+	-	+	-	+	26	25	Osaka-3
	B-2	12	F	+	-	+	-	+	123	206	Osaka-4
B-3 ^a	10	F	-	+	ND	ND	ND	ND	ND		
B-4 ^a	7	F	-	+	ND	ND	ND	ND	ND		
Family-C	Father	36	M	+	-	+	-	+	27	47	Osaka-12
	Mother	35	F	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	
	C-1	11	M	+	-	+	-	+	22	27	
Family-D	C-2	v6	F	+	-	+	-	+	52	58	Osaka-11
	Father	32	M	+	-	+	-	+	19	20	Osaka-15
	Mother	33	F	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	
	D-1	5	M	+	-	+	-	+	32	29	Osaka-13
Family-E	D-2	3	F	+	-	+	-	+	112	191	Osaka-14
	Father	33	M	+	-	+	-	+	49	87	Osaka-9
	Mother	33	F	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	
	E-1	3	F	+	-	+	-	+	3148	3051	Osaka-8
	E-2 ^a	0	M	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	

ND, not done; ID of each subject is also indicated in the figure.

^aPost vaccination.

products were directly sequenced with Prism Big Dye (Applied Biosystems, Foster City, CA) in the ABI 3100 DNA automated sequencer.

Reference sequences were retrieved from the DDBJ/EMBL/GenBank database and their accession numbers used for identification. Nucleotide sequences of HBV were aligned by the program CLUSTAL X, and the genetic distance was estimated with the six-parameter method [Gojobori et al., 1982] in the Hepatitis Virus Database [Robertson et al., 1998]. Based on these values, a phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method with the mid-point rooting option [Saitou and Nei, 1987]. To confirm the reliability of the phylogenetic tree, bootstrap resampling tests were performed 1,000 times.

RESULTS

In family A, one of two children (A-2) was shown to have a mild degree of liver dysfunction (AST 40 U/L, ALT 35 U/L) (Table I). She underwent a liver biopsy that showed a moderate degree of chronic active hepatitis according to the histological activity index. Since diagnosis she was treated with lamivudine for 24 months. Another child (A-1) tested negative for HBsAg and immediately received active immunization against HBV infection, and was confirmed to have seroconverted to anti-HBs antibodies. In family B, two of four children were found to be chronic HBV carriers and the remaining two who had previously received active immunization against HBV infection were confirmed to have remained seroconverted to anti-HBs antibodies. One of the two HBV-infected children (B-2) showed elevated serum transaminase levels (ALT 206 U/L) and was diagnosed with chronic hepatitis B. The serum transaminase values of the other child (B-1) were within the normal range and thus regarded as an asymptomatic carrier. In family C, two children tested positive for HBsAg. The serum transaminase values of the first child (C-1) were within the normal range and the second child (C-2) showed slightly elevated levels of serum transaminase (ALT 58 U/L). In family D, the index case (D-2) was found to be a chronic HBV carrier during an examination of fever of unknown origin and elevated levels of serum transaminase (ALT 191) were noted. Her father (D-F) and brother (D-1) tested positive for HBsAg and were regarded as asymptomatic carriers. In family E, the index case (E-1) presented with lethargy, fever, and abdominal pain. She tested positive for HBsAg, HBV DNA, and IgM type anti-HBc antibodies and was diagnosed with acute hepatitis B. Laboratory examinations showed remarkable elevations in serum transaminases with peak values of AST 3148 and ALT 3051, transient coagulopathy (nadir prothrombin time; 52%) and cholestasis (serum level of total bile acids, 362 μ mol/L). The members of family E were examined for HBsAg and the father (E, F) was diagnosed with chronic hepatitis B (ALT 87). An 11-month-old brother tested negative for HBsAg. The boy had received active immunization against HBV

infection during early infancy and was confirmed to have seroconverted to anti-HBs antibodies.

All the mothers from the five families tested negative for HBsAg and positive for anti-HBs antibodies. Since they never received active immunization against HBV infection nor presented with episodes of acute hepatitis B, they were considered to be cured of acute HBV infection, without any apparent symptoms, which was supposedly transmitted from their husbands.

The members of these five families, including fathers and children, were examined by molecular analyses to elucidate the possibility of father-to-child transmission of HBV. All the subjects belonged to genotype C, which is most prevalent in Japan. The nucleotide homology of the large S and X-core regions between the child (A-2) and her father (A-F) in family A were 99.9 and 99.2%, respectively. The homology of the large S region among the children (C-1 and C-2) and their father (C-F) was 99.8 and 99.9%, respectively. The homology of the X-core region was perfectly identical in family C. The homology of each region between the child (E-1) and her father (E-F) was 99 and 100%, respectively. The DNA sequences were perfectly identical in families B and D.

A phylogenetic tree constructed based on the 13 nucleotide sequences showed that all 5 sets of fathers and children were grouped into the same cluster with high bootstrap value (Fig. 1). These results strongly indicate that father-to-child transmission may have played a role as the route of HBV infection of the children in these five families.

DISCUSSION

This study demonstrated father-to-child transmission of HBV in five sets of fathers and children by using homology analyses and phylogenetic analyses of the coding regions of the HBV genome. Although it seems likely that HBV was transmitted to the present children from their fathers when only the fathers were HBV carriers in the family, it remains possible that they may have contracted HBV infection from non-family HBV carriers outside their household. Thus, to confirm father-to-child transmission of the virus, molecular analysis is necessary. In the present study, this approach with the use of the HBV genome was useful in showing father-to-child transmission of the virus. Since the results of this study are derived from a relatively large number of subjects as compared to the previous studies that reported on one or two families [Lin et al., 1990, 2005; Shimizu et al., 2003], the present study provides substantial evidence for father-to-child transmission of HBV infection by using techniques including both homology analyses and phylogenetic analyses.

In some areas or countries, both parent-to-child and sibling-to-sibling horizontal transmission might be the main routes of intrafamilial spread of HBV infection [Milas et al., 2000; Zhuo et al., 2000; Erol et al., 2003]. HBV infection of fathers as well as mothers has increased the prevalence of HBV infection in their

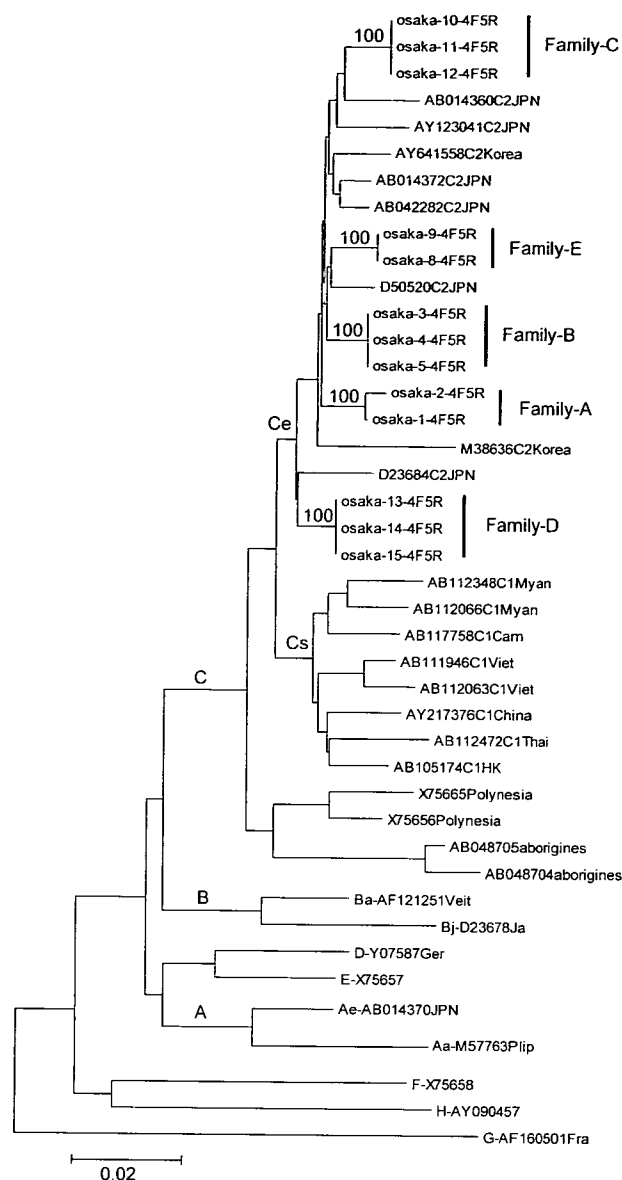


Fig. 1. A phylogenetic tree constructed based on the X gene, precore region and core gene sequences spanning 757 bp. Together with 20 sequences of genotype C retrieved from the database, the 13 HBV/C sequences determined in the present study were subjected to phylogenetic analyses, along with 9 HBV isolates representative of genotypes Aa, Ae, Ba, Bj, D, E, F, G, and H. Isolates sequenced in the present study are shown with 'osaka' plus numbers within five family. Reference isolates from the database are identified with accession numbers. The length of the horizontal bar indicates the number of nucleotide substitutions per site. The figures on nodes indicate the percentage of occurrences by bootstrap analysis of 1,000 replicates.

offspring [Milas et al., 2000]. Intrafamilial transmission of HBV infection is attributable to small wounds, wound exudates, or saliva [Davis et al., 1989]. Those studies suggest that father-to-child transmission may be a considerably important among possible transmission routes.

This study has clearly shown that eight children from five families contracted HBV from their fathers. Three of the eight children were shown to have normal levels of

transaminase and thus were regarded as asymptomatic carriers. Four of the eight were diagnosed with chronic hepatitis B, and one of the four is being treated with lamivudine for 24 months. The remaining one of the eight presented with a severe degree of acute hepatitis B, accompanied with some degree of coagulopathy and cholestasis. These findings show that father-to-child transmission of HBV causes not only chronic carriage of HBV but also a considerable degree of morbidity, including acute and chronic hepatitis in their children. These results suggest that father-to-child transmission of HBV should be blocked to eliminate paternally-transmitted HBV infection in children, as in the case of maternal transmission of HBV.

Another intriguing finding of this study is the fact that all the mothers from the present five families seemed to have contracted HBV infection and were cured. All of them were negative for HBsAg and positive for anti-HBs antibodies at the time of this study. Since they had no episode of acute hepatitis B nor had received active immunization against HBV infection, they could have contracted the virus from their husbands and were cured of acute HBV infection without any apparent symptoms. Since sexual transmission of HBV infection is a well-known phenomenon, spouses of HBV-infected husbands should be protected against HBV infection as well as their children. Transmission of the virus from persons with acute hepatitis B to other persons living in the same household is largely limited to sexual partners [Davis et al., 1989]. Thus, it seems unlikely that the mothers of the five families transmitted the virus to their children before seroconversion during the highly contagious period of acute hepatitis B.

In conclusion, this study provides substantial evidence that HBV is transmitted from father to children. Thus, the present report strongly emphasizes that HBV vaccination should be provided in early childhood to those children who live with chronic HBV-infected fathers. In this context, spouses of HBV-infected husbands should also be protected from HBV infection. It is strongly recommended that Japan public health agencies should re-examine the current policy of prevention of HBV transmission for children as soon as possible so that universal vaccination against HBV infection is immediately instituted in Japan for all children, as WHO has recommended [Van Damme et al., 1997].

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Japan Health Labor Sciences Research Grant (Research on hepatitis and BSE).

REFERENCES

- Davis LG, Weber DJ, Lemon SM. 1989. Horizontal transmission of hepatitis B virus. *Lancet* 1:889-893.
- Erol S, Ozkurt Z, Ertek M, Tasyaran MA. 2003. Intrafamilial transmission of hepatitis B virus in the eastern Anatolian region of Turkey. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15:345-349.
- Fujisawa T, Ushijima K, Yamato Y, Nakashima E, Maeda K, Kumagai M, Kimura A. 2005. Current state of prevalence and prevention of

- childhood hepatitis B infection in Japan. (English abstract). *J Jpn Pediatr Soc* 109:363–369.
- Gojobori T, Ishii K, Nei M. 1982. Estimation of average number of nucleotide substitutions when the rate of substitution varies with nucleotide. *J Mol Evol* 18:414–423.
- Hahne S, Ramsay M, Soldan K, Balogun K, Mortimer P. 2003. Hepatitis B incidence among South Asian children in England and Wales: Implications for immunisation policy. *Arch Dis Child* 88:1082–1083.
- Heathcote J, Gateau P, Sherlock S. 1974. Role of hepatitis-B antigen carriers in non-parenteral transmission of the hepatitis-B virus. *Lancet* 2:370–371.
- Kao JH, Chen DS. 2002. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis* 2:395–403.
- Kao JH, Chen DS. 2004. Hepatitis B virus genotypes and core promoter variant. *Gastroenterology* 126:633.
- Lin HJ, Lai CL, Lau JY, Chung HT, Lauder IJ, Fong MW. 1990. Evidence for intrafamilial transmission of hepatitis B virus from sequence analysis of mutant HBV DNAs in two Chinese families. *Lancet* 1:208–212.
- Lin CL, Kao JH, Chen BF, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. 2005. Application of hepatitis B virus genotyping and phylogenetic analysis in intrafamilial transmission of hepatitis B virus. *Clin Infect Dis* 41:1576–1581.
- Lok AS, Lai CL, Wu PC, Wong VC, Yeoh EK, Lin HJ. 1987. Hepatitis B virus infection in Chinese families in Hong Kong. *Am J Epidemiol* 126:492–499.
- Milas J, Ropac D, Mulic R, Milas V, Valek I, Zoric I, Kozul K. 2000. Hepatitis B in the family. *Eur J Epidemiol* 16:203–208.
- Mizokami M, Nakano T, Orito E, Tanaka Y, Sakugawa H, Mukaide M, Robertson BH. 1999. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Lett* 450:66–71.
- Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, Gojobori T, Maertens G, Mizokami M, Nainan O, Netesov S, Nishioka K, Shin i T, Simmonds P, Smith D, Stuyver L, Weiner A. 1998. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: Proposals for standardization. *Arch Virol* 143:2493–2503.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425.
- Shimizu T, Horiuchi T, Kamitsuji H, Murakami T, Tamai H. 2003. Horizontal transmission of hepatitis B from a father to two brothers. *Eur J Pediatr* 162:804–805.
- Sugauchi F, Mizokami M, Orito E, Ohno T, Kato H, Suzuki S, Kimura Y, Ueda R, Butterworth LA, Cooksley WG. 2001. A novel variant genotype C of hepatitis B virus identified in isolates from Australian Aborigines: Complete genome sequence and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 82:883–892.
- Szmunes W, Prince AM, Hirsch RL, Brotman B. 1973. Familial clustering of hepatitis B infection. *N Engl J Med* 289:1162–1166.
- Tada H, Uga N, Fuse Y, Shimizu M, Nemoto Y, Wakae E, Okamoto Y, Mishina J, Baba K. 1992. Prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus carrier state. *Acta Paediatr Jpn* 34:656–659.
- Van Damme P, Kane M, Meheus A. 1997. Integration of hepatitis B vaccination into national immunisation programmes. *BMJ* 314:1033–1036.
- Williams SJ, Craig PI, Liddle C, Batey RG, Farrell GC. 1987. Hepatitis B in Australia: Determinants of intrafamily spread. *Aust NZ J Med* 17:220–227.
- Zhuo J, Tao G, Ebrahim SH, Wang S, Luo Z, Wang H. 2000. The relationship of hepatitis B virus infection between adults and their children in Guangxi Province. *China J Hepatol* 33:628–631.