

シンポジウム

## 分子生物学の臨床への応用 HBV 変異の臨床的意義

東京女子医科大学 消化器内科

ハセガワ キヨシ カトウ ジュンコ トリイ ノブユキ ハヤシ ナオアキ  
長谷川 潔・加藤 純子・鳥居 信之・林 直諒

(受付 平成5年12月28日)

### Clinical Implication of Hepatitis B Viral Variant

Kiyoshi HASEGAWA, Junko KATO, Nobuyuki TORII and Naoaki HAYASHI

Department of Gastroenterology, Tokyo Women's Medical College

Hepatitis B virus (HBV) induced liver disease has wide range of type of disease, from acute hepatitis, chronic hepatitis, liver cirrhosis and subsequently hepatocellular carcinoma. Previously, these difference of disease type have been thought to be a result of host immune response towards HBV-related protein. Since the method of polymerase chain reaction (PCR) was established, numerous studies of sequence analysis of HBV DNA have been published. These studies revealed that some mutations have a relationship with clinical outcome of hepatitis B virus-induced liver disease. For example, a point mutation in the precore region causes an appearance of stop codon, resulting the termination of HBe antigen production and the seroconversion of HBe antigen. Interestingly, in the fulminant hepatitis (FH) patients, the same mutation in the precore region was found. In order to study the significance of precore mutation in the pathogenesis of FH, we analyzed in vitro replication capacity of HBV DNA from FH patients. As a result, HBV DNA from FH patients showed a high level of replication compared with the wild type HBV DNA. Site directed mutagenesis experiment revealed that additional mutation(s) might be necessary for the high level of replication. To identify the responsible mutation for fulminant hepatitis B, further experiment is needed.

#### 1. はじめに

B型肝炎ウイルス(HBV)の感染は、急性肝炎、劇症肝炎、慢性肝炎、肝硬変、そして肝癌と様々な病変を引き起こす。同じHBVの感染でありながら、これらの病態の差はなぜ起こるのか、いまのところこの問題に対する明快な解答はない。例えば、なぜ、ある患者は急性肝炎になって治癒するのに対し、なぜ、ある患者は劇症化し、不幸な転帰をたどるのか、また、なぜある患者は、無症候性キャリアのまま肝障害も起こらずにいる一方、なぜ一部の患者は、慢性活動性肝炎となり、そしてやがて肝硬変へ移行していくのかなどの臨床重要問題についてもまだ解明されていない。

い。従来、これらの差異は、主に宿主のHBVに対する免疫応答の違いによって説明できるものと考えられていた。ところが、PCR法の開発、普及により、HBV DNAが容易にクローニングされ、HBV DNAの塩基配列解析が盛んになるにつれ、ウイルス変異の頻度が非常に高く、B型肝炎のある病態と変異の起こる部位とに相関がみられる場合があることが明らかになった。その結果、現在では、この病態の差異をきたすメカニズムとして、免疫反応性ととともに、ウイルス変異もまた重要な役割を担っていると考えられている。本稿では、我々の行った実験結果を中心に、HBV DNA変異の臨床的意義について概説する。

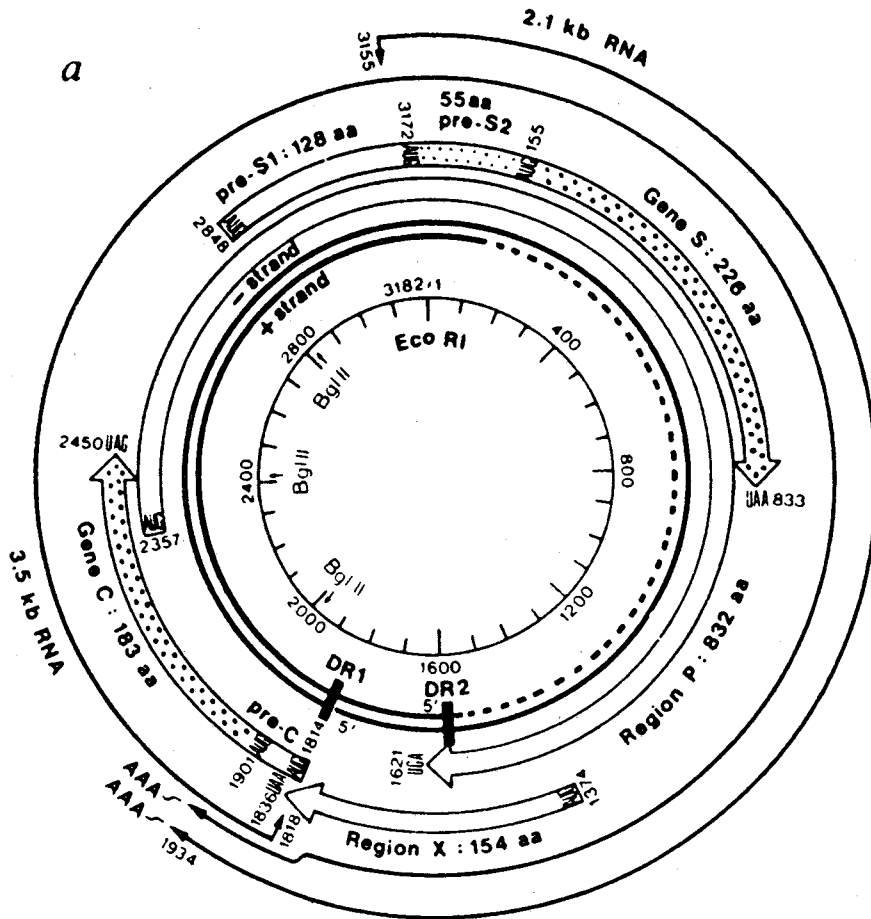


図1 HBVの構造

## 2. なぜHBVに変異が起きやすいか？

HBVの構造を図1に示す。HBVは環状不完全二重鎖のDNAウイルスであり、4種類の蛋白をコードしている。S領域遺伝子のコードする蛋白はウイルスの外被蛋白を構成する。従って、この蛋白は、強い抗原性をもつと同時に宿主の免疫反応から逃がれようとするために、変異の多い部分でもある。C領域遺伝子のコードする蛋白は、ウイルスのヌクレオカプシドを構成する。また、Cの上流には、pre Cと呼ばれる領域があり、pre CとCのひとつながりになった遺伝子からe抗原が産生される。P領域からは、ウイルスのDNAポリメラーゼや、逆転写酵素が作られる。X領域から産生される蛋白の働きについては、まだ不明の点もあるが、いまのところX蛋白は、トランスアクチ

ベーターとしての働きをもつことが知られている。HBV DNAは、これらの4種の蛋白をコードする領域が、相互に重なり合っている構造をとっている。このことは、ウイルスDNAをコンパクトに保つという点で、誠に都合がよい。

HBVは、感染後、48時間以内に肝細胞に入り込む。ウイルスの受容体については、まだ同定されていないが、おそらくは、HBVに特異的なものが存在するだろうと考えられている。HBVが肝細胞内にはいるときに、外被蛋白がはずれ、さらに核内に入るときにさらにヌクレオカプシドがはずれて、裸のDNAとなる。核内に入るとまず、不完全二重鎖が修復されて、完全な二重鎖のDNAとなり、covalently closed circular DNA (ccc DNA) と呼ばれる立体構造をとる。ccc DNAは

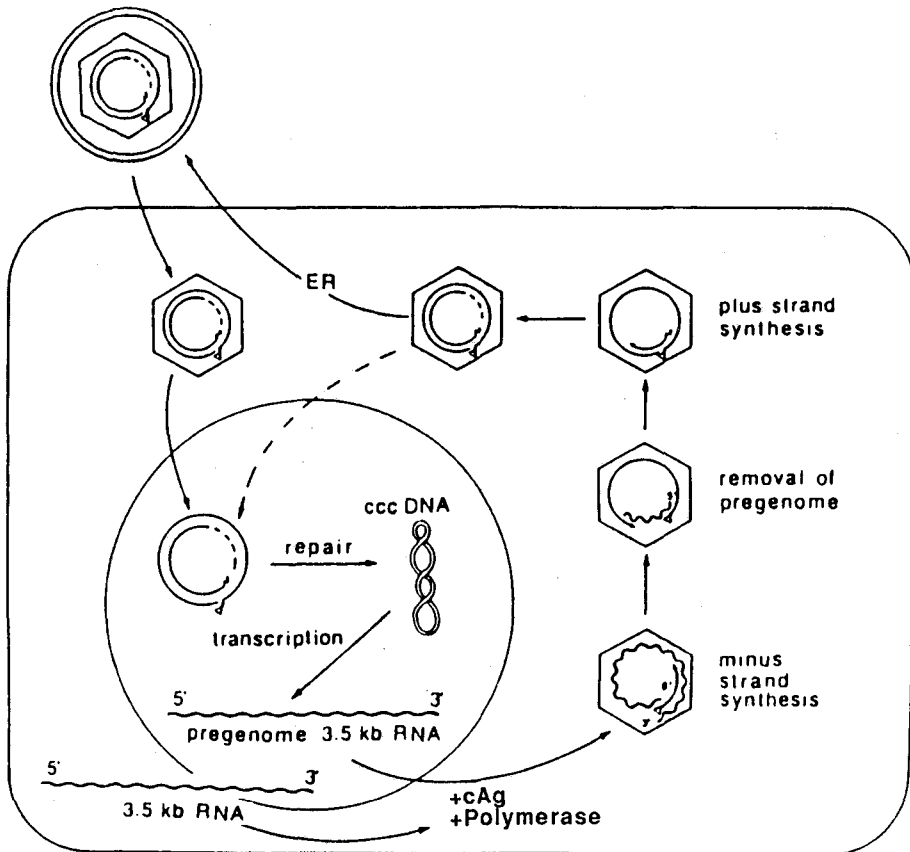


図2 HBVのライフサイクル

転写されて、一部は、ウイルス蛋白の作製に使われ、一部は複製のサイクルに入る。pregenomeと呼ばれる3.5kbのRNAは、細胞質に出てヌクレオカプシドにパッケージングされ、ついでHBV自体がもつ逆転写酵素によってマイナス鎖のDNAが合成される。次に、RNaseによってpregenome RNAは分解され、これと平行してDNAポリメラーゼによって、プラス鎖のDNAが合成される。こうしてできたHBV DNAの一部は、再び核内に入って複製サイクルを繰り返す、一部は、外被蛋白に包まれて、肝細胞外に放出される。HBVのライフサイクルの概略を図2に示す。

このように、HBVはDNAウイルスでありながら、複製の際に一旦RNAに転写され、再びDNAに逆転写されるというライフサイクルをと

る。この転写と、続く逆転写の過程が存在するために変異が起こりやすくなる。

### 3. なぜ劇症肝炎が起こるか？

#### 1) B型劇症肝炎と細胞障害性T細胞

B型肝炎が、ウイルス自体の細胞障害作用ではなく、宿主の免疫系を介して惹起されるという仮説は、いまから20年以上も前に、Dudleyらにより提出された<sup>1)</sup>。後で述べるように、B型肝炎の病態とウイルス変異が重要な関係にあることが次第に明らかになっているが、ウイルス肝炎の本質は、依然として、ウイルスに感染した肝細胞を宿主の免疫系が攻撃することにより惹起されると考えられている。Dudleyらは、強い免疫反応が起これば急性肝炎となり、ほとんど起こらなければ無症候性のキャリアとなり、その中間ならば、慢性肝炎になると考えた。彼らは、その当時、感染肝細胞

表1 B型肝炎患者のT細胞分画の検討

Percentage of various T cell subsets	FH	AH	CH	Controls
CD8	28.3±7.0	26.2±8.8	26.5±5.6	29.7±4.6
CD8 <sup>+</sup> CD11 <sup>-</sup>	25.2±6.5 <sup>1</sup>	18.0±7.1	14.0±4.4	19.3±4.1
CD8 <sup>+</sup> CD11 <sup>+</sup>	3.2±0.6 <sup>2</sup>	7.6±3.7	8.3±5.1	10.5±3.4
CD4	42.4±8.2	42.1±13.4	44.2±6.4	46.0±6.5
CD4 <sup>+</sup> Leu8 <sup>-</sup>	10.2±7.4	16.2±8.3	9.4±4.5	8.6±2.6
CD4 <sup>+</sup> Leu8 <sup>+</sup>	32.2±5.1	26.0±15.7	33.1±4.6	37.8±6.9
CD8 <sup>+</sup> CD11 <sup>-</sup> /CD8 <sup>+</sup> CD11 <sup>+</sup>	8.0±1.6 <sup>2</sup>	2.6±1.3	1.7±1.3	2.1±0.8

1 p<0.05, 2 p<0.01.

表2 劇症肝炎患者におけるCD8陽性細胞分画の経時的検討

	Week after onset of illness	CD8 <sup>+</sup> CD11 <sup>-</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup> CD11 <sup>+</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup> CD11 <sup>-</sup> /CD8 <sup>+</sup> CD11 <sup>+</sup>
Case 1	1	31.8	4.3	7.40
	2	20.5	4.4	4.66
	4	25.1	12.8	1.96
	12	22.3	13.2	1.69
Case 2	1	29.5	3.2	9.22
	4	18.9	9.3	2.03
Control		18.8±4.1	10.4±3.2	2.14±0.8

を攻撃する宿主の免疫反応の主体が、抗体であるのか、細胞障害性T細胞(CTL)であるのか明確にはしていないが、その後の研究の流れをみると、しだいに細胞性免疫が重要視され、免疫学の発展と平行して、抗原特異的なCTLが肝障害を惹起していると考えられるようになってきた<sup>2)3)</sup>。CTLが肝障害を起こしているとすれば、CTL活性の強さによって、肝炎の重症度が規定されることが予想された。そこで我々は、血中のCTLの数をB型肝炎の各病態間で比較検討した(表1)<sup>4)</sup>。その結果、血中では、劇症肝炎群においてのみ、著明なCTLの増加を認めた。また同時に抑制性T細胞(Ts)数が著しく減少していた。このTsの減少は、強いCTL活性を引き起こすと同時に、劇症肝炎患者にしばしばみられる早期のseroconversionを説明できるものと考えられた。また、CTL/Ts比の上昇は、急性肝炎群と比較して有意であり、ほとんど重なりがみられないこと、また、病変の回復に伴いこの比が正常に復していくことから(表2)、劇症肝炎の診断上極めて有効な方法であり、現在我々の教室では、急性肝炎と思われる患

者が来院すると、色々な肝機能のパラメーターを測るとともに、末梢血T細胞分画を全例測定し、治療方針を決定している。

CTLは、末梢血中ばかりでなく、肝組織内でも増加している。我々は、B型の慢性肝炎、劇症肝炎の患者の肝組織に浸潤したTリンパ球のサブセットを、蛍光二重染色法を用いて解析したところ、慢性肝炎、劇症肝炎いずれの場合でも浸潤リンパ球のほとんどは、CTLであることが分かった<sup>5)</sup>。これらのことから、肝障害を起こす免疫反応の主体は、CTLであり、CTLの増加が末梢血中で観察されるかどうかは、病変の強さによるものと推測された。

このように、CTLの量が、劇症肝炎患者において著しく増加していることが分かったが、これらのCTLがすべて、HBV蛋白に特異的であるかどうかは証明されていない。ただ、Chisariらは<sup>6)</sup> envelope領域のエピトープに特異的なCTLクローンを急性肝炎患者のリンパ球から作製したが、慢性肝炎患者のTリンパ球は、それらのエピトープに対してCTL活性を示さなかった。この

表3 B型急性肝炎, 劇症肝炎における preC 領域の変異

Case No.	Age Sex	Days from* onset	ALT**/AST	HBsAg/antiHBs	HBeAg/antiHBe	IgM antiHBc	Outcome	No. of clones studied	nt. 1898	nt. 1901
Fulminant hepatitis										
1	22 F	7	1,010/1,870	-/+	-/-	+	survival	4	4A	4A
2	27 F	4	879/2,925	+/-	-/-	+	death	4	4A	2A/2G
3	25 F	5	5,080/4,165	+/-	-/-	+	death	4	4A	1A/3G
4	61 F	5	1,084/650	+/-	-/+	+	death	3	3A	2A/1G
5	35M	5	1,182/1,712	+/+	+/-	+	death	3	3A	3A
Acute self-limited hepatitis										
6	53M	8	2,427/2,550	+/-	-/-	+	survival	4	4A	4G
7	38M	15	715/1,287	+/-	+/-	+	survival	3	1A/2G	3G
8	41M	23	355/542	+/-	+/-	+	survival	3	3G	3G
9	28 F	15	386/639	+/-	-/+	+	survival	3	3G	3G
10	61M	20	312/831	+/-	+/-	+	survival	3	1A/2G	3G

\*Onset was defined as the beginning of jaundice.

\*\*Peak levels of ALT and AST in IU/L.

表4 アメリカにおけるB型劇症肝炎における preC 領域の検討

	Age/ Sex/race	ALT/AST	sAg/ αHBs	IgM αHBc	αHCV	Risk factors	Other risk	PreC seq.
1	42M-Hisp	858/292	+/-	+	-	IVDA	ETOH	WT
2	71M-White	2,952/ND	+/-	+	-	TF	ETOH	WT
3	21 F-Black	4,490/6,260	+/-	+	-	-	-	WT
4	33 F-White	3,361/3,086	+/-	+	-	IVDA	-	WT
5	37M-White	1,927/1,237	+/+	+	-	IVDA	ETOH	WT

ことから, 急性肝炎患者の CTL は, in vivo すでに HBV 蛋白にたいして強く感作されているため, in vitro でも CTL 活性を示すが, 慢性肝炎患者では, その感作が弱いために in vitro ではその活性が現われないものと考えられた. 即ちこの両者には, CTL 活性に関して量的な相違があると推測される. ただし, 劇症肝炎患者の場合, 個々の CTL 活性が増強されているのか, あるいは, CTL の個数が増えるために mass として CTL 活性が増加するのかどうかはいまのところ不明である.

## 2) 劇症肝炎とウイルス変異

B 型劇症肝炎患者の HBV には, しばしば pre C 領域に変異を伴うことが知られている. pre C 変異の多くは, nt. 1896 の G から A への変異であり, この変異により終止コドンが生じるために, e 抗原が産生されなくなる. したがって, 感染源が明らかな劇症肝炎の場合, その患者を調べてみると e 抗体陽性である<sup>7)</sup>. 以前から, 劇症肝炎は, しばしば e 抗体陽性の患者からの感染に起こること

が知られており<sup>8)</sup>, e 抗体陽性の原因が pre C 変異によることが明らかになった. pre C 変異については, 同様の報告がいくつかみられたが, その後の研究で, 劇症肝炎患者でも野生型の pre C 変異をもつことや (表 4)<sup>9)</sup>, 急性肝炎患者にも pre C 変異がみられること (表 3)<sup>10)</sup> から, pre C 変異は, 劇症肝炎の発症に必須ではないと考えられた. 我々は, pre C 変異の意義について調べるために, 劇症肝炎患者から採取した, pre C 変異を含む HBV DNA を in vitro で複製可能な形に再構築し, 培養肝癌細胞にトランスフェクトして, その複製能を調べた. その結果, 変異株は, 野生株よりはるかに高い複製能を示した. そこで次に, pre C にのみ変異を導入した野生株について同様に調べたところ, これらは, 野生株と同様の複製能を示した. このことから, 劇症肝炎の発症には, ウイルスの複製亢進が関与している可能性があるが, pre C 変異は, この原因にはなっていない (図 3). この変異株の複製亢進の原因については

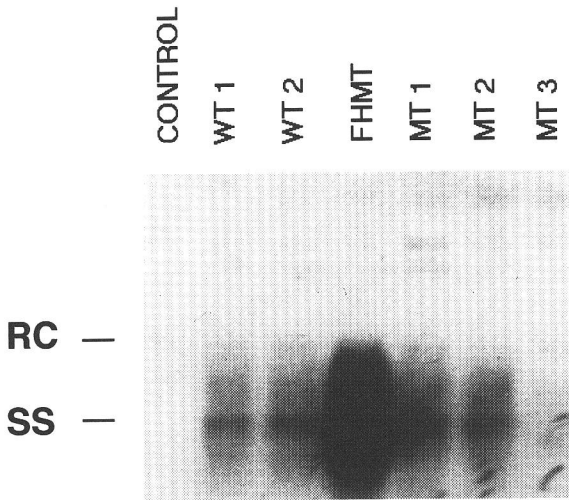


図3 HBV の全長を培養肝癌細胞にトランスフェクトして、細胞内の replicative intermediate を調べた。  
 NC: ネガティブコントロール, WT1: 野生株 (adw), WT2: 野生株 (ayw), FHMT: 劇症肝炎患者由来のクローン, MT1: nt. 1896にGからAへの変異をもつ, MT2: nt. 1899にGからAへの変異をもつ, MT3: nt. 1896と nt. 1899にGからAへの変異をもつ。

現在検討中であるが、他の研究室からもウイルスの複製を亢進させる変異が報告されている。nt. 1183は、Pol 領域の RT と RNase H の境界に当たる部分だが、ここに起こる変異によって、野生株と比較してより強い複製が起こることが、in vitro の実験において確認されている<sup>11)</sup>。したがって、劇症肝炎患者にみられる pre C 変異は、ウイルスの急激な複製に伴い二次的に生じたものであり、これが劇症肝炎の原因になっていないと予想される。実際 pregenome RNA の pre C 領域は、 $\epsilon$  と呼ばれる立体構造をとっており(図 4), RNA の encapsidation の際に、signal sequence として働くことが知られている<sup>12)</sup>。この  $\epsilon$  の構造をみると、pre C の終末の部分には、相対する塩基に mismatch が存在するので、複製が亢進した際には、この mismatch を消失させるような変異が起こりやすくなるものと考えられる。従って、劇症肝炎患者より採取した HBV の複製が亢進している原因としては、従来の仮説とことなり、pre C 以外の領域に起きた変異が原因となっていると考えられる。

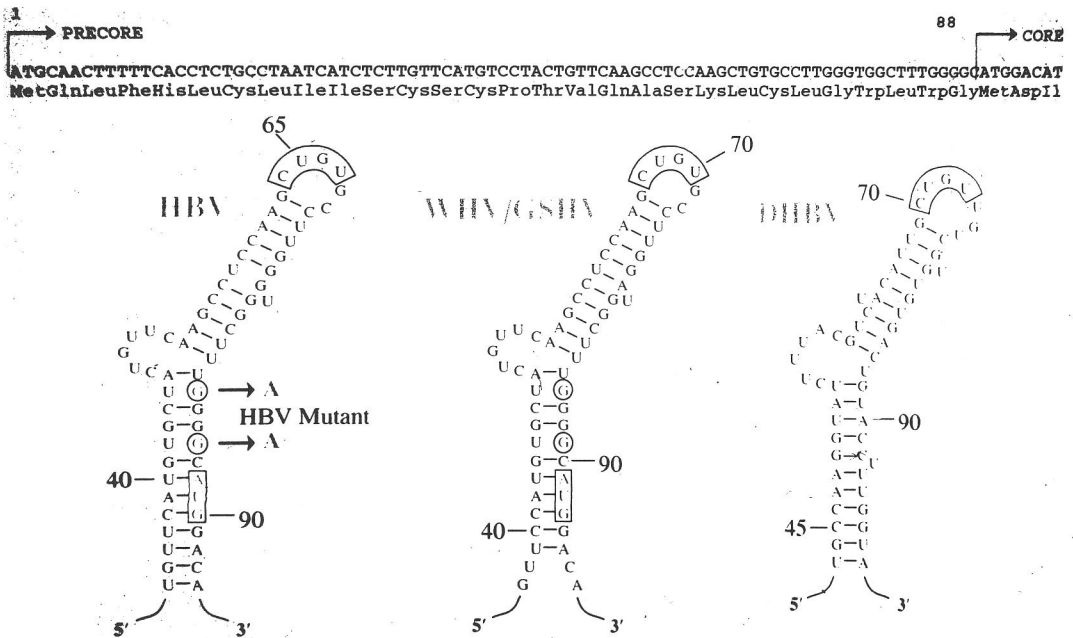


図4  $\epsilon$  の構造を示す。 $\epsilon$  は、各 hepadnavirus の間でよく保存されている。

#### 4. なぜ viral persistence が起こるか？

B型の急性肝炎は、そのわずか一部が劇症化するものの、大部分は慢性化することなく治癒する予後良好の疾患である。したがって、臨床的に、また公衆衛生的に問題となるのは、むしろ将来肝硬変、肝癌へと移行する可能性のある慢性肝炎の方である。HBVが、持続的に感染し、絶えず感染肝細胞をCTLが攻撃し続けることが、慢性肝炎の病態と考えられている。なぜ外来抗原を生体が排除できないのか、なぜviral persistenceが起こるのかについては、まだ不明の点が多いが、これを明らかにするいくつかの試みがなされている。

生体側のウイルスに対する排除機構としては、液性免疫、即ち特異抗体による防御と、細胞障害性T細胞(CTL)による感染細胞の除去が考えられる。このうち、液性免疫の方は、主に初感染の際に、ウイルス排除に働くものと考えられる。持続感染の場合、一般に抗体の標的になるglycoproteinが細胞表面に表出していることはまれか、あるいはごく僅かな場合が多く<sup>13)</sup>、従って、感染細胞は抗体の攻撃を受けにくい。一方、CTLは、多く見積っても100個程度のペプチドが細胞表面に存在すれば活性が誘導される<sup>14)</sup>。これは、抗体がその攻撃に際し必要とする量よりはるかに少ない。これらのことから、HBVのpersistenceを考える場合、初感染からキャリア化する場合には、抗体から逃れるような、慢性感染の持続には、CTLの攻撃から逃れるようなウイルス側の変化が起こっているものと考えられる。

前者の例としては、Carmanら<sup>15)</sup>により報告された、ワクチンに対するescape mutantが挙げられる。彼らの報告によれば、母児感染予防の目的で投与されたワクチンにより、HBs抗体を獲得したにもかかわらず、キャリア化した小児のenvelope領域の塩基配列を解析した結果、N末端から145番目のアミノ酸がGlyからArgへ変化していることが見出された。envelopeの最も強い抗体エピトープは125番目から146番目までの親水性の部分("a"-loop)に存在することが確かめられており<sup>16)</sup>、したがって、Carmanらのescape mutantは、この部分の変異によって、エピトープの抗原

性が変化し、その結果として、ワクチンにより誘導された抗体が、変異したenvelope蛋白を認識できなくなるものと推測された。さらに彼らは、145番目のアミノ酸に変異を有するenvelope蛋白を合成し、この蛋白がポリクローナルなHBs抗体と弱い反応しか示さないことを見出し、in vivoでの現象を立証した<sup>17)</sup>。同様のvaccine induced escape mutantについては、Harrisonら<sup>18)</sup>、Fujiiら<sup>19)</sup>による報告も見られ、いずれにおいても145番目のGlyからArgへの置換がescapeの機序であろうと推論している。

これらの報告は、いずれも、ワクチンが無効であった小児の持続感染の例であるが、大人の場合まれに見られる、急性感染から持続感染の移行については、その機序は、まだ明らかにされていない。ワクチンのescape mutantは、抗体から逃れるばかりでなく、マウスに接種した実験から、その抗原性も弱いことが知られている<sup>17)</sup>。そこで我々は、急性B型肝炎から持続感染に移行した2例の成人例について、S領域の塩基配列を解析したが、いわゆる"a"-loopは野生型であった。このことから、成人のキャリア化の原因としては、Sの抗原性の変化よりもむしろ、その抗原性に変化を及ぼすPre-S領域の変化や、あるいは、感染宿主のHBs抗原に対する免疫能が、多くかかわっているものと考えられる。実際、当教室の山内ら<sup>20)</sup>は、HBsワクチンに対するnon-responderのT細胞に、high-responderのリンパ球の抗体産生を特異的に阻害する抑制活性が備わっていることを見出しており、このような、HBs抗原特異的抑制性T細胞の存在が、初感染のキャリア化と関連しているのかもしれない。

CTLの攻撃から逃れるような変異については次のように考えられる。Chisariらのグループは、HBVのenvelope領域のペプチドに特異的なCTLのクローンを作製し、エピトープの検索を行った<sup>21)</sup>。その結果、CTLエピトープ内には、あるclass Iのタイプに特異的なbinding motifが存在することが分かった。このmotifは、CTL活性の発現に重要であり、したがって、このmotifに変化を与えるようなアミノ酸置換が起こればそ

のペプチドは, CTL の攻撃から逃れると予測される。

### 5. まとめ

以上述べてきたように, HBV に起因する肝障害には, いくつかの臨床上異なる亜型が存在するが, その違いがなぜ起きるかが, ある程度ウイルス変異の側面から説明できるようになってきた。今後は, これらの変異の生物学的な意義について, より詳細な検討が加えられていくものと思われる。

### 文 献

- 1) **Dudley FJ, Fox RA, Sherlock S**: Cellular immunity and hepatitis associated Australia antigen liver disease. *Lancet* 1 : 723-726, 1972
- 2) **Dienstag JL, Bhan AK**: Enhanced in vitro cell-mediated cytotoxicity in chronic hepatitis B virus infection: Absence of specificity for virus-expressed antigen on target cell membranes. *J Immunol* 125 : 2269-2276, 1980
- 3) **Thomson AD, Cochrane MAG, McFarlane IG et al**: Lymphocyte cytotoxicity to isolated hepatocyte in chronic active hepatitis. *Nature* 252 : 721-722, 1974
- 4) **Hasegawa K, Yamauchi K, Furukawa T et al**: Dual color fluorescence analysis of peripheral T cell subsets in hepatitis B virus-induced liver disease. *Hepatology* 8 : 1134-1137, 1988
- 5) 長谷川潔, 大関亨子, 徳重克年ほか: B型肝炎患者の末梢血及び肝組織浸潤リンパ球亜集団の検討—蛍光二重染色法を用いた解析—, *肝臓* 30 : 1652-1657, 1989
- 6) **Nayersina R, Fowler P, Guilhot S et al**: HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J Immunol* 150 : 4659-4671, 1993
- 7) **Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N et al**: A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Eng J Med* 324 : 1705-1709, 1991
- 8) **Okuda K**: Is fulminant B hepatitis more common among infants born to e antigen-negative carrier mothers? *Hepatology* 7 : 974-976, 1987
- 9) **Liang TJ, Hasegawa K, Munoz SJ et al**: Hepatitis B virus precore mutation and fulminant hepatitis in the USA: a PCR-based assay for the detection of specific mutation. *J Clin Invest* 93 : 550-555, 1994
- 10) **Hasegawa K, Huang JK, Wands JR et al**: Association of hepatitis B viral precore mutations with fulminant hepatitis B in Japan. *Virology* 185 : 460-463, 1991
- 11) **Faruqi AF, Roychoudhury S, Greenberg R et al**: Replication-defective missense mutations within the terminal protein and spacer/intron regions of the polymerase gene of human hepatitis B virus. *Virology* 183 : 764-768, 1991
- 12) **Junker-Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H**: A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J* 9 : 3389-3396, 1990
- 13) **Oldstone MBA, Buchmeier MJ**: Restricted expression of viral glycoprotein in cells of persistently infected mice. *Nature* 300 : 360-362, 1983
- 14) **Oldstone MBA, Nerenberg M, Southern P et al**: Virus infection triggers insulin dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of antiself (virus) immune response. *Cell* 65 : 319-331, 1991
- 15) **Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P et al**: Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 336 : 325-329, 1990
- 16) **Howard CR, Stirk HJ, Brown SE et al**: Towards the development of synthetic hepatitis B vaccines. *In* *Viral Hepatitis and Liver Disease* (Zuckerman AJ ed) pp1094-1101, Alan R Liss, New York (1988)
- 17) **Waters JA, Kennedy M, Voet P et al**: Loss of the common "a" determinant of Hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. *J Clin Invest* 90 : 2543-2547, 1992
- 18) **Harrison TJ, Hopes EA, Oon CJ et al**: Independent emergence of a vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *J Hepatol* 13 : S105-S107, 1991
- 19) **Fujii H, Moriyama K, Sakamoto N et al**: Gly 145 to Arg substitution in HBs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus. *Biochem Biophys Res Commun* 184 : 1152-1157, 1992
- 20) **Chiou SS, Yamauchi K, Nakanishi T et al**: Nature of immunological non-responsiveness to hepatitis B vaccine in healthy individuals. *Immunology* 64 : 545-550, 1988
- 21) **Nayersina R, Fowler P, Guilhot S et al**: HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J Immunol* 150 : 4659-4671, 1993