

유전자재조합 B형간염 백신의 기본접종 5년 후 추적항체역가에 관한 연구

김현정 · 이창연 · 황광수*

고신대학교 의과대학 소아과학교실, 문화병원*

= Abstract =

5 Years Follow up Study of Anti HBs Titer After Basic Immunization by Recombinant HBV Vaccine

Hyun Jung Kim, M.D., Chang Yeun Lee, M.D. and Kwang Soo Hwang, M.D.*

*Department of Pediatrics, College of Medicine, Kosin University,
Department of Pediatrics*, Moon Hwa Hospital, Pusan, Korea*

Purpose : Although there are a lot of the reports about the persistence of anti HBs titer of plasma derived HBV vaccine, it is difficult to find the follow up studies of the recombinant HBV vaccine. We performed this study to compare the persistence of anti HBs titer by vaccination schedule and the seronegative rate of 5 years later according to Anti HBs titer after basic immunization in neonatal period by recombinant HBV vaccination.

Methods : This study was performed on 420 neonates at Pusan Moon Hwa Hospital from April to December 1993, followed up for 5 years after basic immunization by recombinant HBV vaccine. The anti HBs titer test was done by radioimmunoassay(RIA AUSAB, Abbott laboratories). The positive anti HBs level that would protect against HBV infection was defined as a level equal to or greater than 10mIU/mL.

Results : In this study the seronegative rate after 5 years was 5% in 2 month schedule group, 25.5% in 6 month schedule group($P>0.05$). In 2 month schedule group the seronegative rate was 20% when anti HBs titer is lower than 200mIU/mL, 0% when more than 200mIU/mL($P>0.05$). In 6 month schedule group the seronegative rate was 66.7% when anti HBs titer was lower than 200mIU/mL, 40% when 200~499.9mIU/mL, 23.9% when 500~999.9mIU/mL, 22.5% when more than 1000mIU/mL.

Conclusion : In this study the seronegative rate after 5 years of recombinant HBV vaccination was 5~25.5%. The persistence of anti HBs titer was statistically irrelevant to schedule. The seronegative rate after 5 years was statistically irrelevant to anti HBs titer after basic immunization.

Key Words : Recombinant HBV, Anti HBs titer, Seronegative rate

서 론

B형 간염은 전세계적인 보건문제로 그 감염자 수는 2억 5천만명 이상이며 매년 약 5천만명의 새로운 감염이 일어난다고 추계되고 있으며, B형 간염에 대한 특별한 치료법이 없는 상태에서 가장 중요한 것은 예방을 통해 B형간염바이러스(hepatitis B virus; HBV) 감염을 억제하는 것이다¹⁾.

Beasley 등²⁾은 수직 전파된 HBeAg 양성 신생아 중 90%가 만성 HBeAg 보균자로 이행되고, 이들은 성인의 만성간염, 간경변증, 간세포암을 일으킨다고 하므로 HBV 감염은 우리나라 국민보건상 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 1971년 Krugman³⁾ 등이 B형간염백신의 간염 예방효과를 보고한 이래, 제조방법이 다른 수종의 백신이 실제 임상에서 사용되고 있고, 현재까지 많은 연구에 의해 B형간염 백신의 면역성, 안정성은 인정되고 있다^{4~7)}. 최근 우리나라에서도 각종 혈장백신에 의한 항체 생성률은 78~95%로 다양하게 보고 되었으며^{8~11)}, 유전자재조합 백신에 대해서도 82~99%로 보고되어 유전자재조합 백신이 혈장백신을 대체할 수 있는 우수한 백신으로 보고되었다^{12~14)}.

하지만 성인이나 소아에서 혈장백신의 투여 후의 다년간의 추적관찰에 대한 보고는 있었으나^{15~17)} 신생아에서의 유전자재조합 백신의 추적관찰에 대한 보고가 아직 국내에는 없어, 이에 저자들은 신생아시기에 유전자재조합 백신을 투여한 후, 접종방법에 따른 5년 후의 항체의 지속성과 각각의 항체역가에 따른 5년 후 항체음전율에 대해 알아보고자 본 연구를 시도하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상 및 방법

1993년 4월부터 12월까지 부산 문화병원에서 출생한 신생아중 부모의 동의하에 유전자재조합 백신인 LG화학 간염백신(Euvax-B[®])을 접종 받은 420례 중 5년 후인 1998년까지 추적 검사가 가능했던 114례를 대상으로 하였다. 이중 출생시, 생후 1개월,

생후 2개월 방법(이하 2개월 접종방법)으로 접종한 20명을 Group I, 출생시, 생후 1개월, 생후 6개월 방법(이하 6개월 접종방법)으로 접종한 94명을 Group II로 하였다. 항체가 검사는 3회 접종 후 1개월 이상 경과후 3개월 이내(추적 전 항체역가)와 5년 후(추적 후 항체역가)에 검사를 시행하였다. Anti HBs의 검사는 방사면역측정법(Radioimmunoassay, RIA AUSAB, Abbott laboratorie, USA)으로 시행하였다. Anti HBs의 역가는 RIA unit로부터 계산 후 mIU/mL로 표시하였고, 최소방어치(minimum protective level)를 10mIU/mL로 정의하였으며, 이 이상이면 항체가 양성으로 판정하였다

2. 통계처리

통계자료의 검증은 PC SAS(statistical Analysis System) version 6.12를 사용하였다. 두군 사이의 비교는 Chisquare test를 적용하여 P값이 0.05 이하일 때 통계학적으로 유의하다고 판정하였고, GMT(Geometric Mean Titer)는 Student's test 를 이용하여 비교 분석하였다.

결 과

1. 대상분포

유전자재조합 백신을 접종한 420명(항체 양성자: 417명)의 신생아 중 5년 후에 추적된 114명을 대상으로 하였다. 2개월 접종방법은 146명의 양성자중 20명(14%) 6개월 접종방법은 271명의 양성자중 94명(35%)이 추적되었다. 각각의 Group 안에서 추적 전과 추적 후의 항체역가의 분포양상에는 큰 차이가 없었다(Table 1).

2. Group I, II에서의 항체 역가변동

Group I에서 5년 후 추적된 20명의 검사결과 중 항체 음성률은 5%이었고, Group II에서 5년 후 추적된 94명의 검사결과중 항체음성률은 25.5%이었다. 5년 후의 항체 음성률이 6개월 접종 방법이 2개월 접종 방법보다 높게 나타났으나, 통계학적으로 유의성을 보이지 않았다($P>0.05$, Table 2, 3, Fig. 1). Group I에서 5년 후 추적검사때 항체역가가 음성이

Table 1. Anti HBs Titer of 417 Case after Basic Immunization and 114 Case Who Had Follow up Test after 5 Years

Anti HBs titer after basic immunization	Group I				Group II			
	after basic immunization		follow up test		after basic immunization		follow up test	
	NO	%	NO	%	NO	%	NO	%
10~99.9	16	10	2	10	6	2.2	1	1
100~999.9	65	44.5	10	50	34	12.5	9	9.6
1000 \leq	65	44.5	8	40	231	85.2	84	89.3
Total	146	100	20	100	271	100	94	100
Follow up rate	14%				35%			

Table 2. Distribution of Anti HBs Titer of 20 Follow up Case 5 Years after Basic Immunization in Group I

AntiHBstiterafter basic immunization	Anti HBs titer of follow up				
	NO	<10(%)	10~99.9(%)	100~999.9(%)	1000 \leq (%)
≤ 199.9	5	20	80	0.0	0.0
200~499.9	3	0.0	66.7	33.3	0.0
500~999.9	9	0.0	77.8	22.2	0.0
1000 \leq	3	0.0	66.7	33.3	0.0
Total	20	5	75	20	20

Table 3. Distribution of Anti HBs Titer of 94 Follow up Case 5 Years after Basic Immunization in Group II

Anti HBs titer after basic immunization	Anti HBs titer of follow up test				
	NO	<10(%)	10~99.9(%)	100~999.9(%)	1000 \leq (%)
≤ 199.9	3	66.7	0	33.3	0
200~499.9	5	40	20	0	40
500~999.9	46	23.9	58.7	4.3	13
1000 \leq	40	22.5	62.5	10	5
Total	94	25.5	56.4	7.4	10.6

되는 경우가 기본접종 후 항체역가가 200 이하인 경우가 20%, 200~499.9에서 0%, 500~999.9에서 0%, 1000 이상에서는 0%로 나타났다. 하지만 기본접종 후 항체역가와 항체음성률과의 통계학적 유의성은 없었다($P>0.05$, Fig. 2). Group II에서 5년 후 추적검사시 항체역가가 음성이 되는 경우가 기본접종 후 항체역가가 200 이하인 경우가 66.7%, 200~499.9

에서 40%, 500~999.9에서 23.9%, 1000 이상에서는 22.5%로 나타났다. 기본접종 후 항체역가가 낮을수록 항체음성률은 높았으나 통계학적인 유의성은 없었다($P>0.05$ Fig. 3).

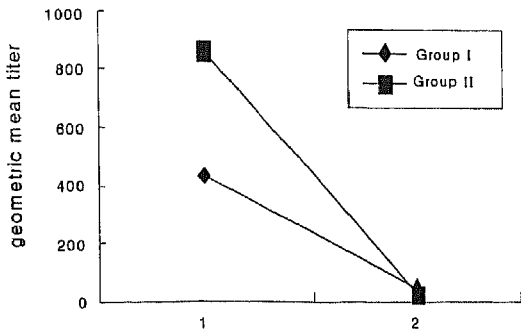


Fig. 1. Level of Geometric Mean Titer after Basic Immunization and 5 Years later in Group I, II.
1: After basic immunization
2: 5 years later

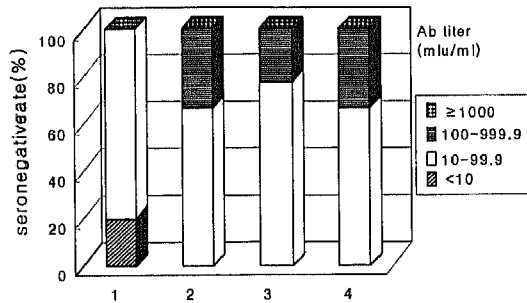


Fig. 2. Distribution of The Seronegative Rate of 5 Years later according to Anti HBs Titer after Basic Immunization, Group I.
1: Ab titer <200(mIU/mL)
2: 200 ≤ Ab titer <500(mIU/mL)
3: 500 ≤ Ab titer <1000(mIU/mL)
4: 1000 ≤ Ab titer(mIU/mL)

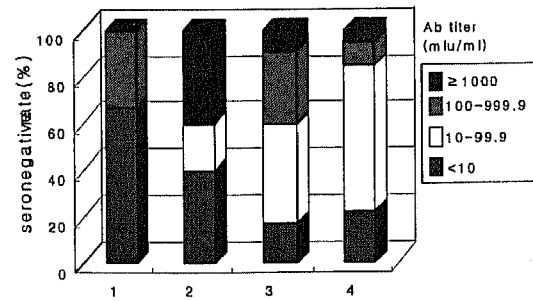


Fig. 3. Distribution of The Seronegative Rate of 5 Years later according to AntiHBs Titer after Basic Immunization, Group II.
1: Ab titer <200(mIU/mL)
2: 200 ≤ Ab titer <500(mIU/mL)
3: 500 ≤ Ab titer <1000(mIU/mL)
4: 1000 ≤ Ab titer(mIU/mL)

고 찰

B형 간염은 우리나라 만성 간염의 가장 흔한 원인이다. 산모가 HBeAg 양성인 경우 감염된 신생아는 90% 이상, 소아때 감염되면 20%, 성인이 급성 B형간염에 걸리면 1~2%가 만성으로 이행된다. 따라서 효과적인 주산기 B형간염 예방대책은 HBV 퇴치의 초석이라고 할 수 있다.

1971년 Krugman 등³⁾이 HBsAg을 함유한 혈장을 열처리한 후 인체에 능동 면역시킨 결과 69%에서 예방효과가 있었다고 보고한 이래 1980년경부터 임상에서 사용할 수 있는 백신제제가 시판되게 되었으며 최근에는 제조방법이 다른 종류의 백신이 실제 임상에서 사용되고 있다.

혈장백신은 우수한 능동면역으로 인식되나, 백신의 생산가격이 높고 원료공급의 어려움으로 백신의 생산이 제한되고 AIDS 등 다른 바이러스에 의한 오염가능성을 완전히 배제할 수가 없다^{18~21)}. 이에 값싸고 안전한 새로운 백신생산방법에 대한 연구가 활발해져 혈장백신과는 다른 방식으로 효모 숙주인 *Saccharomyces cervisiae* system을 이용한 유전자재조합 백신이 개발되어 면역성과 안전성에서 혈장백신과 유사한 것으로 밝혀져 혈장백신을 대체하게 되었다^{11~13, 20~24)}. 손 등²⁵⁾에 의하면 *Hansenula polymorpha* system을 이용한 유전자재조합 백신 또한 면역성이 높고 안전하다고 보고하였다.

백신의 접종방법은 미국의 CDC²⁶⁾에서 10세 미만의 소아에 대하여 백신을 1개월 간격으로 2회접종 후 6개월에 다시 한번 투여하는 방법을 권장하고 있으며, Hall 등²⁷⁾은 2차접종과 3차접종의 간격이 4개월 이상일 때 1~2개월 간격으로 접종시보다 값이 더 높았다고 하였다. Mahoney 등²⁸⁾은 1차와 2차접종 사이의 간격은 항체역가에 큰 역할을 하지 못하지만 마지막 접종의 간격이 길수록 항체역가의 값이 더 높았다고 하였다.

본 연구에서는 유전자재조합 백신을 2개월 방법과 6개월 방법으로 접종했을 경우 추적 전 항체양성률은 각각 98.6, 99.6%였으며, 평균항체역가는 각각 432.6, 856.5mIU/mL로 6개월 방법이 2개월 방법보다 유의하게 높아(P value<0.05) 이전의 보고와

일치하였다. 하지만 5년 후 추적 관찰에서는 항체음성률은 각각 5, 25.5%로 나타났고 평균항체역가는 각각 46, 27mIU/mL로 항체역가의 지속성과 접종방법은 통계학적인 유의성은 없었다(P value>0.05).

즉 2차접종과 3차접종 사이의 간격이 길수록 면역형성이 우수하였으나, 다년간의 항체역가의 지속성과 접종방법과는 상관관계가 없었다. 하지만 2개월 접종방법에서 추적 관찰된 대상의 수가 너무 작아 앞으로 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

항체역가의 지속성은 추가접종의 필요성과 시기를 결정하는데 주요한 자료이다. Halder 등²⁹⁾은 동성연애자에서 5년 추적관찰시 항체음성률이 42% 가량 되었고 평균항체역가가 항체의 지속성을 반영한다고 했으며 중등도의 항체역을 보인 경우 54%에서 3년 내에 항체가 소실되었으며 높은 항체역을 가진 경우 5년 추적관찰시 7% 가량만이 항체가 소실되었다고 하며, Hall 등²⁷⁾은 소아에서의 B형간염에 대한 방어기간에 대해서는 확정된 것은 없지만 어른에서는 9년까지는 방어력이 있다고 했으며 5년에서 9년까지 추적관찰시 항체음성률이 20~60%였으나, HBV에 노출시 면역기억반응(anamnestic antibody response)이 일어난다고 하였다. Coursaget 등³⁰⁾은 Senegal 어린이에서 B형 간염백신은 첫 5년 동안은 방어력이 100%이지만 6~7년 내에는 67%로 감소한다고 하였다. Jilg 등³¹⁾은 기본접종 후의 최고 항체가와 항체역가가 10mIU/mL 이하로 떨어지는 시기와는 상관관계가 있다고 했으며, 항체역가가 100 이하의 경우에는 6개월 이내에 재접종을, 100~1000사이의 경우 1~2년경에 항체검사를, 1000 이상의 경우는 4~6년경에 항체검사를 해서 재접종을 해야한다고 했다. 본 연구에서 신생아시기에 기본접종 후 5년 추적관찰시 5~25.5%가 항체가 소실되었으며, 항체역가를 199.9 이하, 200~499.9, 500~999.9, 1000 이상으로 나눴을 경우 각각의 항체음성률은 20~66.7, 40, 23.9, 22.5%로 기본접종 후 최고 항체가가 높을수록 항체음성률은 낮았으나, 통계학적 유의성은 없었다. 연속적인 조사가 필요하나 본 연구는 현실적으로 실현이 어려워 5년 후 추적 항체역가를 조사하여 기본접종 후 최고항체가와와의 관계를 연구하였다. 타 보고와 같이 연속적인 조사에

의한 최고 항체가와 항체음성화가 되는 시기와와의 관계에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

추가접종에 대해서는 아직도 논란이 많은 바 많은 연구^{29~33)}에 의하면 최고항체역가로서 항체유지 지속기간을 추측할 수 가 있어 추가접종 시기를 알 수 있다고 하였으며 Jilg 등³⁴⁾은 항체역가가 감소한 수년간 HBV에 대한 면역학적기억이 있으나 항체역을 유지하고 면역반응기억을 새로이 하기 위해서는 추가접종이 필요하다고 했으며 Tayler 등³⁵⁾은 3회의 기본접종 후 항체가가 낮거나 검출되지 않아도 HBV 감염에 대한 방어능력이 있다고 하였으며 이는 면역학적 기억반응에 의한 것이라고 하였으며 최소 방어치만으로 추가접종 시기를 결정할 수 없다고 하였다.

항체역가의 유지를 위해서는 추가접종이 필요한 것으로 보이나 항체역가가 낮더라도 면역학적 기억반응에 의해 HBV 감염에 대한 예방의 가능성이 있다는 점과 추가접종 등의 시기 등은 향후 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

목 적 : 혈장백신의 항체의 지속성에 관한 보고는 다양하지만, 유전자재조합 백신의 추적관찰에 대한 연구는 많지 않아 저자들은 신생아시기에 유전자재조합 백신을 기본접종 후 접종방법에 따른 5년 후 항체의 지속성과 기본접종 후 각각의 항체역가에 따른 5년 후 항체음전율에 대해 알아보고자 본 연구를 시도하였다.

방 법 : 1993년 4월부터 12월까지 부산 문화병원에서 태어난 신생아 420례중 유전자재조합 백신을 기본접종 후 5년까지 추적관찰이 가능했던 114례를 대상으로 하였다. 기본접종 후와 5년 후 항체역가의 검사는 RIA로 시행하였다.

결 과 :

- 1) 2개월 접종을 하였을 경우 5년째 항체음성률은 5%이고, 6개월 접종을 하였을 경우 5년째 항체음성률은 25.5%이었다(P value <0.05).
- 2) 2개월접종시 항체역가가 199.9 이하시 5%, 200~499.9시 0%, 500~999.9시 0%, 1,000 이상시 0%가 5년 추적검사시 항체음전이 되었다.

3) 6개월 접종시 항체역가가 199.9 이하시 66.7%, 200~499.9시 40%, 500~999.9시 23.9%, 1,000 이상시 22.5%가 5년 추적검사시 항체음전이 되었다.

결론 : 이연구에서는 유전자재조합 백신의 5년 후 항체음전율은 5~25.5%였고, 항체가 지속성은 접종방법과는 통계학적인 유의성을 보이지 않았고, 기본접종 후의 항체역가에 따른 5년 후 항체음전율과도 통계학적인 유의성은 보이지는 않았다.

참 고 문 헌

- 1) Chung WK, Yoo JY, Sun HS, Lee HY, Lee IJ, Kim SM, et al. Prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus : A comparison between the efficacy of passive and passive-active immunization in Korea. *J Infect Dis* 1985;151: 280-286.
- 2) Beasley RP, Hwang LY, Lee GGY, Lan CC, Roan CH, Hwang FY, et al. Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infection with hepatitis B immunoglobulin and hepatitis B vaccine. *Lancet* 1983;2:1099-102.
- 3) Krugman S, Giles JP, Hammond J. Viral hepatitis type B(MS-2 strain). *JAMA* 1971;217:41-5.
- 4) 정환국, 신희식, 정규원. 가열 비활동화한 B형 간염 Vaccine의 안전성과 면역성에 대한 임상적 관찰(제 1보). *대한의학협회지* 1985;28:675.
- 5) 김세종, 문희식, 남광우, 홍경표, 이상혁, 유주용. B형 간염 백신의 면역 성 및 안정성에 관한 연구. *대한내과학회지* 1987;33:96.
- 6) Goudeau A, Denis F, Mounier M, Dubois F, Klein J, Godefroy A, et al. comparative multicenter study of the immunogenicity of different hepatitis B vaccines in healthy volunteers. *Postgr Med J* 1987;63(suppl 2):S125.
- 7) Scheirman N, Gesemann KM, Kreuzfelder E, Paar D. Effects of a recombinant yeast-derived hepatitis B vaccine in healthy adults. *Postgr Med J* 1987;63(suppl 2):S115.
- 8) 김병길, 김호택, 김규언, 송경순. B형 간염예방 접종 후의 항체 생성효과에 대한 조사 연구. *소아과* 1986;29:1072-8.
- 9) 박정환, 천병렬. 제조 공정이 다른 두가지 B형 간염 백신의 면역가 및 기본 접종 3년 후 항체역가. *대한의학협회지* 1991;34:557-66.
- 10) 강지혜, 홍영미, 이승주. B형 간염 예방접종후 항체가 변화에 관한 연구. *소아과* 1990;33: 598-604.
- 11) 김순호, 손한철. B형 간염 백신의 임상효과에 관한 연구. *대한임상병리학회지* 1985;17:381-6.
- 12) 강애실, 김종신, 허재원, 이창연, 박재선. 신생아기에 접종한 B형 간염 백신의 종류와 접종방법에 따른 면역 효과에 관한 연구. *소아과* 1995; 38:1525-33.
- 13) 강진경, 김용범, 김경희, 하성규. 효모로부터 생산된 B형 간염 백신의 면역성 및 안정성. *대한내과학회잡지* 1986;31:318-21.
- 14) 윤명순, 김영훈, 한상영, 조균제, 문한규. Recombinant B형간염 Vaccine의 안전성과 면역성에 대한 연구임상적 관찰. *대한의학협회지* 1986;29:884-9.
- 15) 이준영, 민용식, 김창휘, 이상주. 신생아가 B형 간염 예방접종 후 용량 시간 경과에 따른 항체가 변동에 관한 연구. *소아과* 1993;36:656-63.
- 16) 김현수, 최송규, 김주한, 조덕서, 김세종. B형간염 백신의 면역성에 관한 10년간 추적관찰. *대한내과학회지* 1997;52:49-57.
- 17) 변유란, 김완신, 조정진. B형간염백신접종 4년 후 항체보유에 관한연구. *가정의학회지* 1992; 13:35-41.
- 18) Stevens CE, Taylor PE, Rubinstein P, Ting Rcr, Bodner AJ, Bodner Sarngaharan MG, et al. Safety of the hepatitis B vaccine. *N Engl J med* 1985;312:375-6.
- 19) Purcell RH, Gerin JL : Prospects for second and third generation hepatitis B vaccines. *Hepatology* 1985;5:159.
- 20) 서정기. 예방접종 : B형간염백신. *대한의학협회지* 1991;34:257-69.
- 21) Hollinger FB. hepatitis B Vaccines-to Switch or Not to Switch. *JAMA* 1987;257:2634-6.
- 22) Keyserling HL, West DJ, Hesley TM, Bosley C, Wiens BL, Calandra GB. Antibody reponses of healthy infants to recombinant hepatitis B vaccine administered at two, four, and twelve or fifteen months of age. *J Pediatr* 1994;125:67-9.

- 23) Poovorawan Y, Sanpavat S, Pongpunlert W, Chumdermpadetsuk S, Senfrakul P, Safary A. Protective efficacy of a recombinant DNA hepatitis B vaccine in neonates of HBeAg positive mothers. JAMA 1989;261:3278-81.
- 24) Just M, Berger R, Just v. Reactogenicity and immunogenicity of a recombinant hepatitis B vaccine compared with a plasma derived vaccine in young adults. Postgraduate Medical Journal 1987; 63 Suppl 1:S121-3.
- 26) Center for Disease Control. Postexposure prophylaxis of hepatitis B. MMWR 1984;33:285-9.
- 25) 손영모, 남궁란, 김영채, 이계희, 이옥재. 유전자 재조합 B형 간염바이러스 백신(Hepavax-Gene)의 면역원성 및 안전성. 대한간학회지 1997;1: 58-64.
- 27) Hall CB, Easton JG, Granoff DM, Gromisch DS, Haslsey NA, Kohl S, et al. Universal hepatitis B immunization. Pediatrics 1992;89:795-800.
- 28) Mahoney FJ, Kane M. Hepatitis B vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines. 3rd ed. WB Saunders co, 1999:158-82.
- 29) Hadler SC, Francis DP, Maynard JE, Thompson SE, Judenson FN, Echenberg DF, et al. Long-term immunogenicity and efficacy of hepatitis B vaccine in homosexual man. N Eng J Med 1986;315:209.
- 30) Coursaget P, Yvonne B, Chotard J, Sarr M, Vincerot P, N'Doye, et al. Seven year study of hepatitis B vaccine efficacy in infants from an endemic area(Senegal). Lancet 1986;2:1143.
- 31) Jilg W, Schmidt M, Deinhardt F, Zachoval R. Hepatitis B vaccination, how Long Dose Protection Last? Lancet 1984;2:458.
- 32) Benhamou E, Courouse AM, Laplanche A, Jungers P, Tron JF, Crosiner J. Long term results of hepatitis B vaccination in patients on dialysis(letter). N Eng J Med 1986;314:1710.
- 33) International group. Immunization against hepatitis B. Lancet1998;876.
- 34) Jilg W, Schmidt M, Deinhardt F. Decline of anti HBs after hepatitis B vaccination and timing of revaccination. Lancet 1990;335:173-4.
- 35) Tayler PE, Stevens CE. Persistence of antibody to hepatitis B surface antigen after vaccination with hepatitis B vaccine. In: Zuckerman AJ, editor. Viral Hepatitis and Liver Disease. New York: Alan R Liss Inc, 1998:995.