

封面式樣

計畫編號：DOH98-DC-1014

行政院衛生署疾病管制局 98 年度科技研究發展計畫

多中心、長期追蹤研究抗藥性 B 型肝炎病毒的診斷
與治療：病毒基因體突變與療效的整合性分析

全程計畫總報告

執行機構：國立陽明大學臨床醫學研究所

計畫主持人：吳肇卿

研究人員：吳肇卿、蘇建維、王勝永、陳貞吟

執行期間：98 年 5 月 1 日至 100 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意

目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
一、中文摘要	(3)
二、英文摘要	(6)
三、前言	(9)
四、材料與方法	(15)
五、結果	(21)
六、討論	(25)
七、結論與建議	(27)
八、計畫重要研究成果及具體建議	(29)
九、參考文獻	(30)
十、表	(36)
十、圖	(38)
	共 (46) 頁

摘 要

背景：目前口服抗病毒藥物治療慢性 B 型肝炎之療效仍尚未臻理想。因此如何融合患者之臨床表徵、病毒活性、免疫系統對抗病毒之能力以及成本效益觀念，量身訂做最適宜的治療藥物與策略，並及早偵測出抗藥性肝炎之發生，仍值得進一步研究。

研究方法：探討現今健保治療慢性 B 型肝炎之條件中，發生生化數值突破與確實發生抗藥性病毒株之機率與其相關性，敏感、正確且最方便的偵測抗藥性病毒株的方法。

研究發現：

1. 本研究總共收入 1123 位慢性 B 型肝炎急性發作且服用干安能患者。其中 e 抗原陽性 618 位，e 抗原陰性者 505 位；目前已有 353 位患者存有歷次足夠的血清供作病毒濃度分析。
2. 干安能治療前，血清 HBVDNA $< 10^9$ copies/mL、ALT 值 > 200 IU/L 且在治療中第 6 個月時血清 HBVDNA 小於 10^4 copies/mL 之患者，較不容易造成抗藥性肝炎復發之產生，為較佳之反應者(better responder)，未來發生臨床上抗藥與基因型抗藥(genotypic resistance)皆顯著較低。
3. 治療過程中，若產生 ALT > 40 IU/mL，保留血清做抗藥性分析。本研究分析 170 人多血點共 516 個病毒株的基因定序分析，檢視干安能相關的 rt180/181/204 抗藥性氨基酸位點，有 96 人發現干安能抗藥突變之病毒株。以 rtM204+rtL180 產生突變之機率最高，其中 rtM204V + rtL180M 42 位，rtM204I 37 位，rtM204I + rtL180M 15 位。
4. 本研究分析 347 例病案共 689 個血清檢體的 INNO-LiPA 測試。其中，260 人測得野生株；其餘 134 人測得各種抗藥性病毒株，以 rt204 產生突變之機率最高。本研究在 13 位病人中觀察到，INNO-LiPA 可在基

因定序法無法測得抗藥性病毒株時檢測出干安能相關之抗藥性突變株。同時 INNO-LiPA 可更早測得抗藥性病毒株，可提早 0.97 到 7.5 個月測得抗藥性病毒株 (平均 3.37 ± 2.520 mo)。

5. 患者在再次治療時，有一半的機會血清中利用較敏感的突變株分析方法已經可測得抗藥性病毒株，而回溯分析也發現這些抗藥性病毒株早在開始治療的早期即可測得。治療前 ALT 較高、治療中第 6 個月時 ALT 較低的患者，再次治療時有較高的傾向為野生株。
6. 治療中第 6 個月的 INNO-LiPA 如果無法測得突變株，之後使用干適能作為救援療法，病毒對於治療反應較佳。
7. 在產生干安能抗藥性突變株之 B 型肝炎病毒中，已有部分患者產生對其他藥物抗藥型之突變株，如 rtA194T/rtV214A 等 tenofovir 可能之相關突變。

結論：干安能治療前，血清 HBVDNA $< 10^9$ copies/mL、ALT 值 > 200 IU/L 且在治療中第 6 個月時血清 HBVDNA 小於 10^4 copies/mL 之患者，較不容易造成抗藥性肝炎復發之產生，為較佳之反應者(better responder)，未來發生臨床上與基因型抗藥皆顯著較低。干安能抗藥患者，使用干安能加上干適能救援治療確實較直接轉換干適能策略的效果為佳。治療中第 6 個月以及再次治療時，使用更敏感的病毒突變分析檢測如 INNO-LiPA 可較傳統基因定序法無法測得抗藥性病毒株時更早測得抗藥性病毒株

建議事項：使用干安能治療第 6 個月測定 HBVDNA，可以有效預測將來是否會發生抗藥性病毒株或是停藥後復發之現象，可作為治療過程中，監測病毒活性與評估療效之重要參考指標。干安能抗藥患者，使用干安能加上干適能救援治療確實較直接轉換干適能策略的效果為佳。治療中第 6 個月以及再次治療時，使用更敏感的病毒突變分析檢測，對於選擇抗病毒藥

物，可提供治療策略與用藥的重要參考。

關鍵詞：B 型肝炎；抗藥性；干安能

Abstract

Background: The efficacy of oral anti-viral therapy for chronic hepatitis B (CHB) is still not satisfactory till now. Short term therapy might lead to the flares of hepatitis after the cessation of therapy, whereas long-term therapy was often associated with the emergence of drug-resistant mutants. It is crucial to tailor the treatment strategy according to the clinical manifestations, virological effect, baseline and on-treatment response as well as cost-effectiveness.

Methods: To evaluate the factors to be associated with therapy efficacy, virological breakthrough as well as the emergence of drug-resistant hepatitis for CHB patients with oral antiviral therapies.

Results: This study has enrolled 1123 CHB patients receiving lamivudine therapy, including 618 patients with positive HBeAg and the remaining 505 patients with negative HBeAg. We have analyzed the therapy efficacy of the 353 patients with complete demographic, virological, and biochemical data. It showed that 42.4% of the patients with baseline serum HBVDNA $< 10^9$ copies/mL, ALT levels > 200 IU/L, and serum HBVDNA $< 10^4$ copies/mL at 6 months of therapy had lower incidence of developing biochemical breakthrough and drug resistant mutants. They may be the better responder of lamivudine therapy. They have significantly lower incidence of clinical and genotypic resistance following the treatment. Besides, for patients with baseline HBVDNA level more than 10^8 copies/mL or serum HBVDNA $> 10^4$ copies/mL at 6 months of therapy had higher incidence of developing hepatitis relapse after the cessation of therapy in comparison to their counterparts. We have analyzed 170 patients with biochemical breakthrough (ALT > 40 IU/mL) during lamivudine therapy and cloned 516 viral variants. There were 119 patient with genotype B and 51 with genotype C. We have analyzed 347 patients by INNO-LiPA. 134 patients were found to have several mutation patterns, especially in rt204. INNO-LiPA is more sensitive than the Sanger sequencing method. 13 patients

had drug-resistant mutants detected by INNO-LiPA when the Sanger sequencing method was unable to detect those mutants. INNO-LiPA detected drug-resistant mutants 0.97 to 7.5 months earlier than the Sanger sequencing method (3.37 ± 2.520 mo). 51% of patients had mutants detected by INNO-LiPA at the time of receiving re-treatment of antiviral therapy. These mutants can be detected in the early stage of antiviral treatment. Higher pre-treatment ALT and lower ALT level at 6 months of therapy were associated with undetectable mutants at the time of re-treatment. Failure to detect mutant by INNO-LiPA at 6 months of therapy was associated with better virological response in the follow-up antiviral therapy of adefovir. Variants potentially resistant to other anti-viral drugs were disclosed such as rtA194T/rtV214A .

Conclusion: For patients receiving lamivudine therapy for CHB, baseline serum HBVDNA $< 10^9$ copies/mL, ALT levels > 200 IU/L, and serum HBVDNA $< 10^4$ copies/mL at 6 months of therapy had lower incidence of developing biochemical breakthrough and genotypic resistance. Lamivudine adding adefovir is better than switching to adefovir in treating lamivudine-resistance. They may be the better responders of lamivudine therapy. INNO-LiPA is more sensitive than the Sanger sequencing method does, and may detect drug-resistant mutants earlier. High percentage of patients had mutants detected by INNO-LiPA at the time of receiving re-treatment. Failure to detect mutant by INNO-LiPA at 6 months of therapy was associated with better virological response in the follow-up therapy of adefovir.

Suggestion: Baseline HBV DNA, serum ALT level and HBVDNA level at 6 months of lamivudine therapy could predict the emergence of drug-resistant hepatitis flares during therapy, as well as reactivation of virus and hepatitis flares after the cessation of therapy. Lamivudine adding adefovir is better than switching to adefovir in treating lamivudine-resistance. A more sensitive mutational analysis method such as INNO-LiPA provides better understandings

to guide the therapy during treatment or at re-treatment.

Keywords: hepatitis B, drug resistance, lamivudine

前 言

B 型肝炎是全球最重要的感染症之一。據估計全世界 B 型肝炎病毒感染約二十億人，其中約三億五千萬人會轉變成慢性肝炎(1-3)。B 型肝炎病毒的感染，會造成不同的臨床表徵，包括急性肝炎、猛爆性肝炎、慢性帶原狀態、慢性肝炎、肝硬化甚至肝細胞癌等(4)。B 型肝炎病毒的持續複製與活化，會造成肝硬化及肝細胞癌等不良預後的機會增加(5-9)。因此，有效的壓制 B 型肝炎病毒複製，可以減緩疾病的進展、減少肝細胞癌之發生並改善預後(1, 10, 11)。但是以藥物治療病原體，常會導致抗藥性的產生，目前醫學上對於以抗生素治療細菌已有良好基礎，並深入探討其發生機轉與治療對策。然而對於治療病毒所引發之抗藥性（如 B 型肝炎病毒、愛滋病毒以及流行性感冒病毒等），目前尚未完全釐清其機轉，其臨床與研究之重要性逐漸變得重要，必須詳加監測，並提出有效之防治策略。

干安能(Lamivudine)為一核苷類似物(nucleoside analogue)，它會藉由抑制 B 型肝炎病毒的反轉酶(reverse transcriptase)及 DNA 聚合酶(polymerase)來壓抑病毒的複製(12-17)，以減少肝炎發作、肝細胞壞死、纖維化及不良預後之發生。此外病患之醫囑順從性及安全性亦相當優越，1998 年美國食品藥物管理局 FDA 正式核准干安能用於治療慢性 B 型肝炎。在台灣，干安能也由衛生署核准成為治療慢性 B 型肝炎病毒感染的口服藥物。由於干安能在停藥之後經常發生復發現象(18, 19)，因此目前對於適當的干安能治療療程還沒有定論。臨床試驗顯示一年的干安能治療對於 e 抗原陽性之慢性 B 型肝炎患者能夠比安慰藥組提高 e 抗原陰轉率並且減少肝細胞的發炎程度(15, 17, 20, 21)，此外，治療前血清轉氨酶(ALT)值是影響 e 抗原陰轉率的重要因子；若是 2 倍正常值以上，一年的 e 抗原陰轉率約為 34%；若是 5 倍正常值以上，一年的 e 抗原陰轉率更可以達到 50%。然而後續的研

究發現干安能治療的 e 抗原陰轉持續性並不穩定(22)，在患者接受短期的干安能治療(9.3 ± 2.9 months)後，一年及兩年的 e 抗原再現(reversion)率分別為 35.7%及 49.2%。後續研究發現超過一年的干安能延長治療(extended treatment)，對大多數病患可以持續抑制 B 型肝炎病毒的複製，維持血清 ALT 值正常，並且可以提高 e 抗原陰轉的比例(23-27)。然而長期的干安能治療會增加病毒的抗藥性，篩檢出具抗藥性的突變型 B 型肝炎病毒，最常見的突變發生在 B 型肝炎病毒聚合酶中 YMDD 的區域(M204V/I 或 M552V/I)產生 valine 或是 isoleucine 取代 methionine 的突變(28, 29)，但是由於突變型 B 型肝炎病毒其複製速率不如野生型的 B 型肝炎病毒(30-33)，因此產生抗藥性的突變型 B 型肝炎病毒後，臨床上血清 ALT 值多半不會高於治療前的起始值(23-27)，然而臨床上干安能治療產生病毒的抗藥性後也可能發生嚴重的肝炎發作，造成肝功能代償失調甚至致死(34, 35)。因此干安能治療的時間並不容易拿捏。治療的時間不夠，未達到治療目標前便率爾停藥，容易發生復發現象，此外治療產生之 e 抗原陰轉之持續性並不可靠，達到陰轉後太快停藥(小於六個月)也容易復發(1, 2)，然而干安能治療的時間太長又可能產生抗藥性的突變型 B 型肝炎病毒，增加嚴重肝炎的危險。因此如何才能夠達到最大的治療效果值得進一步研究。此外，不同治療療程所引發之抗藥性、停藥後復發、對後續自然病史與再度治療療效之影響，這些治療策略之成本效益分析目前仍少有研究。但其結果可作為健保政策調整之重要參考。

B 型肝炎病毒目前已知有 8 種基因型(A 到 H)，台灣地區以基因型 B 及 C 為主(9, 36-38)，歐洲的研究發現基因型 A 較基因型 D 有 20 倍的危險性產生干安能的抗藥性(39)，我們先前針對 e 抗原陰性慢性 B 型肝炎病患的研究發現 B 型肝炎病毒基因型對於干安能的療效以及停藥後的復發並沒

有顯著的影響(40)。但是對於 e 抗原陽性之慢性 B 型肝炎，最近的研究認為性別、B 型肝炎病毒基因型及治療達到 e 抗原陰轉後延長治療是決定干安能治療後 e 抗原陰轉能否持久的重要因子(41-44)。因此 B 型肝炎病毒基因型對於干安能治療的重要性仍值得進一步研究。此外，近年來有部分研究發現 B 型肝炎病毒核前區的突變(包括 G1896A 突變以及啟動子 A1762T, G1764A 雙重突變)以及干安能抗藥性病毒株之突變(包括反轉錄酶 rtL80V/I 以及 rtA181V/T 以及其他尚未被發現之突變)，可能與藥物治療之抗藥性有關(45-50)。但其是否對實際治療慢性 B 型肝炎之療效、抗藥性發生之時間與肝炎嚴重性，以及對救援用藥療效之影響，仍未完全明瞭，亦需要更多的研究來釐清，並提供臨床醫師診治患者之參考。

目前對於慢性 B 型肝炎患者服用干安能發生抗藥性的診斷，包括生化數值之突破(biochemical breakthrough)(在治療過程中發生 ALT 值超過正常值上限以上)、病毒突破(virological breakthrough) (血清病毒量達到最低點後，接連兩次，並相隔一個月以上，上升 10 的一次方以上)以及基因型之突破(genotypic breakthrough)(病毒產生會造成抗藥性之突變)(51)。從過往的研究發現，越早偵測出抗藥性病毒株之發生，在臨床上尚無肝臟生化檢查異常之現象之前，即投予救援用藥，治療之效果越佳，且救援用藥爾後發生抗藥性之機會亦隨之降低。因此如何及早診斷抗藥性，是當今以口服抗病毒藥物治療慢性 B 型肝炎之最重要課題。目前有一些方法可用於診斷抗藥性病毒株之發生，包括基因定序(sequencing)，RFLP, INNO-LiPA 等(52)。本研究將探討敏感、正確且最方便的偵測抗藥性病毒株的方法，以增加治療之療效並減少抗藥性肝炎復發之機率。

以干安能治療慢性 B 型肝炎並發生抗藥性時，目前的治療策略包括停用干安能，轉為干適能或是高劑量(每日 1 毫克)貝樂克使用；或是繼續服

用干安能，且加上干適能使用。依據之前的研究顯示，後者較不易產生第二線藥物之抗藥性(1, 51-53)。然而限於經費以及目前健保仍未開放病毒血清濃度與抗藥性之檢測，對於服用干安能且發生肝臟生化數值突破(ALT > 80 U/mL)之患者，即開始給予干適能治療兩年，但原來之干安能不再給付。如此策略下，有多少患者是屬於真正發生干安能抗藥性病毒株且產生病毒突破，以及這種轉移干適能單一治療，對於後續之治療反應，是否跟當時之 B 型肝炎病毒濃度有無或是高低有關，仍待進一步之研究來探討。

除了干安能以外，近來有三種口服抗 B 型肝炎病毒藥物陸續獲衛生署以及健保核准用於治療慢性 B 型肝炎，包括干適能(Adefovir)、喜必福(Telbivudine)以及貝樂克(Entecavir) (1, 52, 53)。這些藥物均可以有效抑制 B 型肝炎病毒之複製、使肝臟生化檢查回復正常、改善肝臟組織之發炎與纖維化，進而改善患者之預後。且與干安能相較，因這些藥物抑制病毒之能力較高或是病毒發生抗藥性之突變所需之門檻較高等優點，在臨床應用上，這些藥物已漸漸取代干安能。然而，與干安能相仿，這些藥物之短期使用，停藥後肝炎復發之機率仍然極高，而長期服藥亦會面臨到抗藥性與昂貴藥費之問題。因此對於這些藥物之療效評估，產生抗藥性之檢測與治療策略之選擇，成本效益分析等亦均是肝炎研究以及照顧病人之重要課題。

目前關於治療慢性 B 型肝炎所產生之抗藥性，近來研究發現，治療前及治療中血清 HBV DNA 較高之患者，較容易產生抗藥性之突變株病毒；而在治療過程中，迅速而有效地壓制病毒複製，可以減少抗藥性之發生(52,53)。因此，使用干安能來治療慢性 B 型肝炎，必須很謹慎的追蹤病人，包括定期的肝臟生化檢查、腹部超音波、血清 HBV DNA 及抗藥性突變株檢測等，早期監測抗藥性造成肝病發作或不良預後（如肝功能代償失

調、肝硬化或肝細胞癌等)，是不可或缺的必要檢查。在本研究團隊先期「治療慢性 B 型肝炎病人不同方法或不同療程的療效、復發率與抗藥性發生率、預後與成本效益的比較」之研究中，台灣多醫學中心共收入 355 位以干安能治療慢性 B 型肝炎且有完整病毒分析結果之病患。發現患者在使用干安能過程中，有 83 位患者在血清肝轉氨酶(ALT)降至正常後，ALT 於服藥中再度升高且達正常上限二倍以上，這些病人的病毒分析證明大多數是產生抗藥性，這些患者服用干安能 6 個月時，血中 HBV DNA 值較沒有這個現象的病人療程為高，因此治療 6 個月時血中 HBV DNA 濃度有預測療效及未來是否產生抗藥性的價值。至於抗藥性之確實發生機率、抗藥性病毒株突變位置以及抗藥性病毒株出現後之臨床表徵與治療策略，對公共衛生、醫療政策與學術上均有極高的價值，但在前次研究，因限於經費與研究人力，無法全數完成，極待充足的經費以支付大量的多中心病人的血液標本的後續病毒分析。

本研究即延續及根基於先前的研究，預計將繼續收入在長期追蹤過程中，有 300-350 位有完整臨床資料與歷次保留完整血清之患者，至少收集 1200 個樣本，並預期在追蹤過程中，有 100-150 位患者將產生干安能抗藥性。本研究團隊將探討 1.現今健保治療慢性 B 型肝炎之條件中，發生生化數值突破與確實發生抗藥性病毒株之機率與其相關性，敏感、正確且最方便的偵測抗藥性病毒株的方法；2.比較產生抗藥性之救援用藥時機，如發生生化數值突破、病毒突破(virological breakthrough)、或是在偵測到抗藥性病毒株(genotypic resistance)時，即給予用干適能或貝樂克，對於後續臨床與病毒反應之影響；3.抗藥性病毒不同序列的突變、基因型與病毒濃度等因素對於後續臨床與病毒反應之影響；4.患者服用干安能產生抗藥性後，不同治療策略（干安能續用加上干適能或是干安能停藥直接轉為干適

能等)，對於後續臨床與病毒反應之影響，及對干適能產生抗藥性機率的影響；5.是否可從臨床資料與病毒檢驗找尋出抗病毒藥物(包括干安能、干適能、喜必福與貝樂克)治療之”超級反應者”(super responder)；6.不同治療策略之成本效益分析；7.性別因素對於口服抗病毒藥物治療 B 型肝炎之療效、抗藥性以及治療策略之影響。

預期本研究對現今健保慢性 B 型肝炎治療之療程、結果與成本效益分析，以及發生抗藥性之治療策略重加檢討，提出具體的參考數據，以供政策與治療方針的參考。

材料與方法

病患收治條件

- (1)慢性 B 型肝炎患者，且血清 B 型肝炎表面抗原(HBsAg) 陽性 6 個月以上。
- (2)血清 ALT 值於最近 6 個月內有兩次正常值上限兩倍以上。
- (3)依據 93 年 8 月全民健康保險局公告之「全民健康保險加強慢性 B 型及 C 型肝炎治療試辦計畫」，符合 e 抗原陽性或陰性、血清 ALT 值高於正常值 2 倍之慢性 B 型肝炎患者且接受全民健康保險給付口服抗病毒藥物干安能(Lamivudine) (100 毫克，每日一錠)、干適能(adefovir) (10 毫克，每日一錠)、喜必福(telbivudine) (600 毫克，每日一錠)、貝樂克(entecavir) (0.5 毫克，每日一錠) 治療之患者，其中 ALT 值介於正常值 2~5 倍之慢性 B 型肝炎患者必需接受肝臟切片檢查確定 HBcAg 的存在。
- (4)符合 e 抗原陽性或陰性、血清 ALT 值高於正常值 2 倍之慢性 B 型肝炎患者，但患者拒絕接受切片檢查或是未符合健保規定而自費使用治療口服抗病毒藥物干安能(Lamivudine) (100 毫克，每日一錠)、干適能(adefovir) (10 毫克，每日一錠)、喜必福(telbivudine) (600 毫克，每日一錠)、貝樂克(entecavir) (0.5 毫克，每日一錠) 治療。
- (5)經醫師充分解釋，且簽署受試者同意書。

排除條件

- (1)血清 creatinine 值大於 > 1.5 mg/dl
- (2)血液常規嗜中性球 (neutrophil)小於 < 1000 cells/mL
- (3)血色素(hemoglobin)小於 10 g/dL
- (4)C 型肝炎病毒、D 型肝炎病毒或是愛滋病毒感染

- (5)有腹水，食道靜脈曲張破裂出血，肝性腦病變或是肝細胞癌
- (6)最近半年內服用抗病毒藥物或是免疫抑制劑

口服抗病毒藥物療程

- (1)HBeAg 陽性：原則接受 18 個月的口服抗病毒藥物治療，達到血清轉氨酶(ALT)值正常且 e 抗原陰轉，持續治療六個月，當 18 個月治療期滿時，若是尚未達到血清 ALT 值正常及 e 抗原陰轉，告知病患停藥復發或是繼續治療產生抗藥性病毒的可能性，由病患決定是否繼續自費接受治療。比較 ≤ 18 個月、18-24 個月、 ≥ 24 個月至 e 抗原陰轉，並持續治療六個月的療效、停藥復發、抗藥性機率、預後與經濟效益。
- (2)HBe 抗原陰性的病人 18 個月的口服抗病毒藥物治療治療期滿，如果病人願意繼續自費接受治療，將持續治療二至三年，比較 ≤ 18 個月、18-24 個月、 ≥ 24 個月的療效、停藥復發、抗藥性機率、預後與經濟效益。
- (3)發生干安能抗藥性 B 型肝炎病毒突變株與 biochemical breakthrough 的病人則依照健保給付規定，停用干安能，改投予干適能(adefovir) (10 毫克，每日一錠)或貝樂克(1 毫克，每日一錠)治療；或是經臨床醫師詳細解釋各種治療策略之優劣後，由患者決定是否採用除健保給予干適能 (10 毫克，每日一錠)外，以自費方式繼續服用干安能錠。
- (4)從前未曾使用口服抗病毒藥物，第一次使用干適能，且發生干適能抗藥性 B 型肝炎病毒突變株與 biochemical breakthrough 的病人，依照目前診斷共識(52)，建議繼續服用干適能，但自費使用干安能(100 毫克，每日一錠)、喜必福(600 毫克，每日一錠)，或貝樂克(entecavir) (0.5 毫克，每日一錠)。使用貝樂克患者，可以考慮停用干適能。
- (5)從前未曾使用過干安能(不論是否發生干安能之抗藥性)，目前使用干適

能，且發生干適能抗藥性 B 型肝炎病毒突變株與 biochemical breakthrough 的病人，建議繼續服用干適能，但自費使用貝樂克 (entecavir) (1 毫克，每日一錠)。

- (6)發生喜必福或是貝樂克抗藥性 B 型肝炎病毒突變株與 biochemical breakthrough 的病人則依照健保給付規定，停用原來之口服抗病毒藥物喜必福或是貝樂克，改投予干適能(adefovir) (10 毫克，每日一錠)治療；或是經臨床醫師詳細解釋各種治療策略之優劣後，由患者決定是否採用除健保給予干適能(10 毫克，每日一錠)外，以自費方式繼續服用喜必福或是貝樂克(52)。

治療終點以及抗藥性之定義：

- (1)生化緩解(biochemical remission)：指達到血清轉氨酶(ALT)值正常。
- (2)病毒緩解(virological remission)：指以 PCR 測定方式達到血清偵測不到 HBV DNA。
- (3)e 抗原陰轉(HBeAg seroconversion)：指達到血清 e 抗原消失、且 e 抗體出現。
- (4)持續緩解(sustained remission)：指生化與病毒緩解在停止干安能治療後六個月仍持續。
- (5)生化數值之突破(biochemical breakthrough)：在治療過程中發生 ALT 值超過正常值上限以上。
- (6)病毒突破(virological breakthrough)：血清病毒量達到最低點後，接連兩次，並相隔一個月以上，上升 10 的一次方以上
- (7)基因型之突破(genotypic breakthrough)：病毒產生會造成抗藥性之突變

病患追蹤

- (1)參與本研究之病患以門診治療及追蹤為主。進入本研究後，首先檢驗基

礎生化檢驗（包括 ALT, AST, total bilirubin, albumin, prothrombin time, AFP 等）、病毒血清檢驗（包括 HBeAg, anti-HBeAb, HBV DNA 及 B 型肝炎病毒基因型測定及定序等），之後開始加上服用口服抗病毒藥物干安能(Lamivudine) (100 毫克，每日一錠)、干適能(adefovir) (10 毫克，每日一錠)、喜必福(telbivudine) (600 毫克，每日一錠)、貝樂克(entecavir) (0.5 毫克，每日一錠)治療，每日一錠。

- (2) 病患必須接受每個月定期檢驗血清 ALT 值，若有 ALT 值異常上升，則依肝功能狀況改為每 1~2 週抽血偵測，每次抽血除一般例行項目外，會多保留 5ml 血液檢體作 B 型肝炎病毒量及序列分析。
- (3) 對於 e 抗原陽性之患者，每三個月測定血清 e 抗原及 e 抗體。
- (4) 對於無肝硬化之患者，每六個月測定血清甲型胎兒蛋白 (AFP) 以及腹部超音波檢查；對於已發生肝硬化之患者，則每三個月測定血清甲型胎兒蛋白 (AFP) 以及腹部超音波檢查。若超音波檢查有疑似肝腫瘤病灶，則進一步安排電腦斷層或是磁振造影檢查做進一步之確認。
- (5) 在治療過程中，若出現肝臟生化檢查 ALT 值異常或是臨床醫師懷疑有抗藥性時，依照前述口服抗病毒藥物療程之原則，調整治療策略與藥物。並將當次以及前三個月內所存之血，作 B 型肝炎病毒量測定與抗藥性病毒株之分析，方法如下所述三種(直接定序法、限制酶片段多型性分析法以及 INNO-LiPA 法)，以期尋找出敏感、迅速、正確且能及早偵測出抗藥性病毒株出現之突變之方法。

HBV DNA 病毒量偵測

本研究將採用 Cobas TaqMan HBV Kit (Roche Diagnostic System, Basel, Switzerland)(其偵測下限值為 6 IU/mL)，進行 HBV DNA 病毒量偵測。

B 型肝炎病毒基因型與核前區集合啟動子突變分析

B 型肝炎病毒基因型依據文獻報告採 S 片段之限制酶片段多型性分析法 restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)(54)，以及基因型 A 至 F 可依此法區分。B 型肝炎病毒基因型與核前區集合啟動子突變分析採用 B 型肝炎病毒定序與基因族譜分析。

B 型肝炎病毒抗藥性突變種基因之檢測

(1) 直接定序法(direct sequencing)：

突變種基因序列依據文獻報告如表一之引子作聚合酶鏈反應(28, 49)，再讀出基因序列。

(2) INNO-LiPA，採用(INNO-LiPA HBV DR v2 strip, Innogenetics, Ghent, Belgium).

統計分析

(1) 統計分析利用 Statistical Program for Social Sciences (SPSS 17.0 for Windows, SPSS. Inc., Chicago, IL, USA) 軟體。連續變數主要以 Student's t test 或 Mann-Whitney U-test 檢測，類別變數主要以 Pearson Chi-squared analysis 或 Fisher's exact test 檢定。所有統計結果以雙尾 (two-tail) 檢定且 P 值小於 0.05 視為統計上有意義之差別。

(2) 比較 ≤ 18 個月、18-24 個月、 ≥ 24 個月的療效、停藥復發、抗藥性機率、預後與經濟效益。各組間年齡、性別、治療前 ALT、Albumin、Total bilirubin、prothrombin time、生化緩解率，病毒緩解率、e 抗原陰轉率、停藥後復發率、及抗藥型突變種發生率分別以 Fisher's exact test、chi-square test、或是 Wilcoxon rank-sum test 比較。影響復發及抗藥性之宿主與病毒因子將加以分析。

(3) 檢測基礎(baseline)及治療後每三個月之血清病毒量，以比較 area under the curve from corresponding receiver operating curves (AUROC) 之方法，找尋出對治療反應極佳之超級反應者(super responder)或是療效不佳之不

反應者(non-responder)之最佳預測因子。

- (4) 比較兩種診斷抗藥性病毒株之方法(直接定序法及 INNO-LiPA 法)，以 Fisher's exact test 或 chi-square test 比較其敏感性、特異性、陽性預測率、陰性預測率以及正確率。
- 以 Kaplan-Meyer 方法、Log-rank test 以及 Cox regression test 來估計並比較不同治療策略發生抗藥性之機率即危險因子。

結 果

1. 本研究總共收入 1123 位慢性 B 型肝炎急性發作且服用干安能患者。其中 e 抗原陽性 618 位，e 抗原陰性者 505 位；接受健保干安能療程者 381 位，健保療程結束後自費延長治療者 274 位，另外 468 位自費治療。目前已有 353 位患者存有歷次足夠的血清供作病毒濃度分析。
2. 在使用干安能過程中，有 83 位患者 ALT 值在降至正常後，於服藥過程中再度升高，稱為生化數值突破(Biochemical breakthrough, ALT > 80 U/L)，這些病人很可能產生抗藥性，分析發現這些患者服用干安能之療程較沒有這個現象的患者為長(23.8 ± 21.0 mo vs. 21.3 ± 16.6 mo, $P=0.005$)
3. 在停藥追蹤過程中有 121 位患者產生肝炎復發現象(ALT > 80 IU/mL)；肝炎復發患者，服用干安能之療程較沒有復發者為短(19.1 ± 18.0 mo vs. 32.6 ± 21.6 mo, $P=0.008$)。
4. 以干安能治療 E 抗原陽性之 650 位患者中，有 124 位於治療第三個月產生 E 抗原消失之反應，其相關因子之分析於圖一，發現治療前血清 albumin, bilirubin, ALT, AST, HBV DNA 值以及治療後第 3 個月的 HBV DNA 值是影響早期 E 抗原消失之重要因子，但性別與此治療早期反應無關。
5. 關於發生生化數值突破與否的相關危險因子分析，我們發現治療前血清 HBV DNA 並無顯著相關性，但在治療中第 6 個月時血清 HBV DNA 大於 10^4 copies/mL 者將來發生生化值突破現象者較小於或等於 10^4 copies/mL 者為高($P=0.001$)。(如圖二)
6. 干安能治療前，血清 HBV DNA < 10^9 copies/mL、ALT 值 > 200 IU/L 且在治療中第 6 個月時血清 HBV DNA 小於 10^4 copies/mL 之患者(約佔全體患者 42.4%)，較不容易造成抗藥性肝炎復發之產生，為較佳之反應

者(better responder)。(如圖三)

7. 此較佳之反應者(better responder)未來發生臨床上抗藥與基因型抗藥(genotypic resistance)皆顯著較低(P 值分別為 0.001 以及 <0.001)。(如圖三之一與圖三之二)。
8. 進一步分析干安能抗藥患者，治療中第 6 個月時血清 HBV DNA 小於 10^4 IU/mL 之患者，抗病毒治療過程中，發生 HBV DNA 小於檢驗偵測下限的比例較高(P 值為 0.002)。如果治療過程中 HBV DNA 小於檢驗偵測下限，從起始治療到產生抗藥性與病毒突破現象的時間(28.7 與 37.3 個月)，皆較未發生此現象者長(18 與 18.8 個月，P 值分別為 0.03 以及 0.002)。
9. 至於停藥後復發，治療前血清 HBV DNA 大於 10^8 copies/mL 或是治療第 6 個月時血清 HBV DNA 大於 10^4 copies/mL 者，較容易有停藥後復發現象發生(P 值分別為 0.005 以及 0.045)。
10. 對於 e 抗原陽性患者，若從前接受過干安能治療而再次治療，治療後發生持續血清反應(HBeAg seroconversion)者之比率較初次治療者為低(57.7% vs. 79.7%)。e 抗原消失的患者普遍年齡較小(35.3 歲 vs 47.2 歲, $P < 0.001$)。治療中第 6 個月時血清 HBV DNA 小於 10^2 IU/mL 之患者，累積 e 抗原消失的比例較高(50.0% vs 28.7%, $P 0.002$)。
11. 本研究同時分析 170 例病案再次治療的患者的病毒與的 INNO-LiPA 測試，在再次治療時，已有 51%(77 位)的病患有 INNO-LiPA 可測得之突變病毒株。治療前 ALT 較高、治療中第 6 個月時 ALT 較低的患者，再次治療時有較高的傾向為野生株(510.7 vs 305.7 IU/mL、29.1 vs 37.4 IU/mL, P 值 0.002 與 0.01)。再次治療時，具野生株患者的 ALT 相對較高 (446.8 vs 306.3, $P 0.13$)，同時 e 抗原消失時間較短 (15.9 個月 vs

28.6 個月, P 0.09), 產生 e 抗體的時間顯著較短 (16.4 個月 vs 29 個月, P 0.03)。

12. 根據臨床抗藥產生與否作進一步分析, 治療次數越多而總治療時間越長, 較易產生抗藥。第 6 個月的肝臟生化檢測、病毒量、與 INNO-LiPA 有放要性與否和臨床抗藥有關。(表二)。
13. 再次治療是否有可測得的突變病毒株與治療前與治療中第 6 個月的病毒量在此研究中並沒有顯著的相關性。但是多血點的 INNO-LiPA 發現, 再次治療具有突變株的患者, 在治療過程中, INNO-LiPA 可測得發現血液中之突變株的時間顯著較短 (6.6 個月 vs 29.9 個月, P<0.001)。
14. 本研究同時分析, 即使最後產生干安能抗藥患者, 治療中第 6 個月的 INNO-LiPA 如果無法測得突變株, 使用干適能作為救援療法, 則在救援治療後, 病毒量達到小於檢驗偵測下限所需的時間較短(18.6 vs 35 個月, P 0.09)。治療中第 6 個月時血清 HBV DNA 小於 10^4 IU/mL 之患者, 在救援抗病毒治療過程中, 病毒量達到小於檢驗偵測下限所需的時間顯著較短(17.1 vs 49.7 個月, P 0.02)。
15. 進一步分析干安能直接轉換(switch)或加上(addon)干適能治療不同的策略, 發現直接轉換比加上干適能的患者, 要達到 ALT 正常與病毒量達到小於檢驗偵測下限所需的時間皆顯著較長(11.2 vs 6.29 個月與 33.1 vs 15.3 個月, P 值 0.03 與 0.002)。進一步分析, 治療中第 6 個月時血清病毒量小於 10^4 IU/mL 之患者, 在直接轉換(switch)的治療策略中, 病毒量達到小於檢驗偵測下限所需的時間顯著較短 (26.7 vs 52.9 個月, P 0.02)。
16. 治療過程中, 若產生 ALT > 40 IU/mL 或 HBe 抗原測定值升高時, 保留血清做抗藥性分析。本研究分析 170 人多血點 516 個病毒株的基因定序

分析。檢視干安能相關的 rt180/181/204 抗藥性氨基酸位點，有 96 人發現干安能抗藥突變之病毒株。(圖四) 以 rtM204V+rtL180M 產生突變之機率最高，其中 rtM204V+rtL180M 42 位，rtM204I 37 位，rtM204I+rtL180M 15 位。

17. 本研究挑選疑有抗藥性病人進行 INNO-LiPA 的測試。本研究挑選 347 例病案共 689 個血清檢體的 INNO-LiPA 測試。其中，260 人測得野生株；其餘 134 人測得各種抗藥性病毒株，以 rt204 產生突變之機率最高，共 122 人(91%)。
18. 本研究在 13 例病例中觀察到，即使病毒株之基因定序分析呈野生株基因序列，INNO-LiPA 已測得抗藥性之突變存在。(圖五中紅框) 同時發現，INNO-LiPA 檢測可更早測得抗藥性病毒株，在目前已完成的配對資料，可提早 0.97 到 7.5 個月測得抗藥性病毒株 (平均 3.37 ± 2.520 mo)。
19. 定序分析發現在產生干安能抗藥性突變株之 B 型肝炎病毒中，已有部分患者產生對其他藥物抗藥型之突變株。如果檢視已報導過的口服抗病毒藥抗藥性相關 rt80/ 135/ 173/ 180/ 181/ 184/ 194/ 202/ 204/ 214/ 229/ 236/ 250 氨基酸位點，有 106 人發現在這些位點突變病毒株，如 rtA194T/rtV214A 等 tenofovir 可能之相關突變。(圖六)
20. 研究同時發現，在產生干安能抗藥性突變株之 B 型肝炎病毒中，部分患者同時存在表面抗原基因突變。在分析的 170 位病患中，最主要的與疫苗可能相關的表面抗原逃脫突變(vaccine escape mutants)為 sR126S、佔 5.3%，初步分析發現基因型對於表面基因突變發生機率與位置無明顯相關。(圖七)

討 論

本研究發現干安能治療前，血清 HBVDNA $< 10^9$ copies/mL、ALT 值 > 200 IU/L 且在治療中第 6 個月時血清 HBVDNA 小於 10^4 copies/mL 之患者 (約佔全體患者 42.4%)，較不容易造成抗藥性肝炎復發之產生，為較佳之反應者(better responder)，這些較佳反應者，未來發生臨床上抗藥與基因型抗藥(genotypic resistance)皆顯著較低。但這些較佳反應者，推估 5 年發生生化突破的機率約 33.4%。因此即使是較佳反應者，嚴密的監測肝臟生化檢查以及血清病毒量，以及早因應發生抗藥性之對策，是干安能治療時必須詳加考慮的地方。

基因定序分析較不敏感，即使測得序列呈野生株基因型，用其他較敏感的突變株分析方法，如 INNO-LiPA，仍可測得抗藥性之突變存在。同時 INNO-LiPA 檢測可更早測得抗藥性病毒株。再次治療者有一半的機會血清中已經可測得抗藥性病毒株，而回溯分析也發現抗藥性病毒株早在治療的早期即可測得。因此建議以口服抗病毒藥物治療慢性干安能治療中能夠提早測得抗藥性病毒株以及早因應相對的抗藥對策，可減少抗藥性肝炎復發。因此干安能治療中使用較敏感的突變株分析方法有其重要的角色。

此外，本研究發現，對於 e 抗原陽性患者，若從前接受過干安能治療而再次治療，治療後發生持續血清反應者之比率較初次治療者為低。而且其發生抗藥性之時間亦較初次治療者為短。代表再次治療者之血清中，可能已篩檢出抗藥性病毒株，只是因其複製能力較野生型為低，在物競天擇的環境中被野生型病毒株壓抑，一旦再次治療，野生型病毒株在藥物選擇的壓力下即會迅速地被抗藥性病毒株所替代，容易在治療過程中快速產生抗藥性。因此建議以口服抗病毒藥物治療慢性 B 型肝炎，必須起始即採取最強力且有高抗藥性突變門檻的藥物，治療中需時時監測肝臟生化檢查以

及 HBVDNA，達到治療目標後需加上適當期間的保固延長治療，方可停藥，如此才能避免抗藥性肝炎的一再發生。

目前慢性 B 型肝炎之治療仍未臻理想，以口服的抗病毒藥為例，短期的治療易導致停藥後復發，然而長期的治療會增加病毒的抗藥性，篩檢出具抗藥性的突變型 B 型肝炎病毒，臨床上甚至也可能發生嚴重的肝炎發作，造成肝功能代償失調甚至致死。因此如何才能夠達到最大的治療效果值得進一步研究。因此如何融合患者之臨床表徵、病毒活性、免疫系統對抗病毒之能力以及成本效益觀念，量身訂做最適宜的治療藥物與策略，是目前許多醫學家戮力以赴的目標。

結論與建議

1. 在使用干安能治療前，可能已有抗藥性病毒株之存在；而多次使用干安能治療，更容易造成抗藥性病毒株之產生以及治療反應不易持續。
2. 在使用干安能過程中，發生的抗藥性突變以 rtM204V+rtL180M 最為常見。
3. 使用干安能治療第 6 個月測定 HBVDNA，可以有效預測將來是否會發生抗藥性病毒株、停藥後復發與治療中發生病毒反應。可作為治療過程中，監測病毒活性並評估療效與決定治療策略之重要參考指標。
4. 干安能治療前，血清 HBVDNA $< 10^9$ copies/mL、ALT 值 > 200 IU/L 且在治療中第 6 個月時血清 HBVDNA 小於 10^4 copies/mL 之患者，較不容易造成抗藥性肝炎復發之產生，為較佳之反應者(better responder)。干安能治療較佳之反應者未來發生臨床上抗藥與基因型抗藥(genotypic resistance)皆顯著較低。
5. 患者在再次治療時，有一半的機會血清中利用較敏感的突變株分析方法已經可測得抗藥性病毒株，而回溯分析也發現這些抗藥性病毒株早在開始治療的早期即可測得。治療前 ALT 較高、治療中第 6 個月時 ALT 較低的患者，再次治療時有較高的傾向為野生株。
6. 治療中第 6 個月的 INNO-LiPA 如果無法測得突變株，之後使用干適能作為救援療法，病毒對於治療反應較佳。
7. 干安能直接轉換比加上干適能的患者，要達到 ALT 正常與病毒量達到小於檢驗偵測下限所需的時間皆顯著較長。治療中第 6 個月時血清病毒量小於 10^4 IU/mL 之患者，在直接轉換的治療策略中，病毒反應所需的時間顯著較短。
8. 本研究在 13 位病人中觀察到，INNO-LiPA 可在基因定序法無法測得抗

藥性病毒株時檢測出干安能相關之抗藥性突變株。同時 INNO-LiPA 檢測可更早測得抗藥性病毒株，可提早 0.97 到 7.5 個月測得抗藥性病毒株 (平均 3.37 ± 2.520 mo)。

9. 在產生干安能抗藥性突變株之 B 型肝炎病毒中，已有部分患者產生對其他藥物抗藥型之突變株，如 rtA194T/rtV214A 等 tenofovir 可能之相關突變。至於基因型與各種抗藥性病毒株對於後續救援藥物治療之影響，仍需後續研究來進一步分析。
10. 在產生干安能抗藥性突變株之 B 型肝炎病毒中，亦已有部分患者同時存在表面基因突變現象。初步分析發現基因型對於表面基因突變發生機率與位置無明顯相關，然而這些突變與後續治療之療效與抗藥性之影響，仍需後續研究探討。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 干安能治療前，血清 HBVDNA $< 10^9$ copies/mL、ALT 值 > 200 IU/L 且在治療中第 6 個月時血清 HBVDNA 小於 10^4 copies/mL 之患者，較不容易造成抗藥性肝炎復發之產生，為較佳之反應者(better responder)。未來發生臨床上抗藥與基因型抗藥(genotypic resistance)皆顯著較低。
2. 治療中第 6 個月以及再次治療時，使用更敏感的病毒突變分析檢測如 INNO-LiPA 更敏感的病毒突變分析檢測如 INNO-LiPA 可較傳統基因定序法無法測得抗藥性病毒株時更早測得抗藥性病毒株。
3. 干安能抗藥患者，使用干安能加上干適能救援治療確實較直接轉換干適能策略的效果為佳。
4. 慢性 B 型肝炎之治療應融合患者之臨床表徵、病毒活性、免疫系統對抗病毒之能力，量身訂做最適宜的治療藥物與策略。

參考文獻

1. Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2009; 373: 582-592.
2. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic Hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 507-539.
3. Kao JH. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 643-650
4. Chen DS. From hepatitis to hepatoma: lesions from type B viral hepatitis. *Science* 1993; 262: 369-370
5. Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, Liaw YF, Lin CL, Liu CJ, Shih WL, Kao KH, Chen DS, Chen CJ. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 265-272.
6. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, Hsiao CK, Chen PJ, Chen DS, Chen CJ. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002; 347: 168-174.
7. Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeje UH. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295: 65-73.
8. Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006; 130: 678-686.
9. Su CW, Huang YH, Huo TI, Shih HH, Sheen IJ, Chen SW, Lee PC, Lee SD, Wu JC. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology* 2006; 130: 1625-1635.
10. Lin SM, Sheen IS, Chien RN, Chu CM, Liaw YF. Long-term beneficial effect of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 1999; 29: 971-975.
11. Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, Farrell G, Lee CZ, Yuen H, Tanwandee T, Tao

- QM, Shue K, Keene ON. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 1521-1531.
12. Doong SL, Tsai CH, Schinazi RF, Liotta DC, Cheng YC. Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by 2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine and related analogues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8495–8499.
13. Chang CN, Skalski V, Zhou JH, Cheng YC. Biochemical pharmacology of (+) and (') 2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine as anti-hepatitis B virus agents. *J Biol Chem* 1992; 267: 22414–22420.
14. Dienstag JL, Perrillo RP, Schiff ER, Bartholomew M, Vicary C, Rubin M. A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection. *N Engl J Med* 1995; 333:1657–1661.
15. Lai CL, Chien RN, Leung NWY, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, *et al.*, The Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1998; 339: 61–68.
16. Dienstag JL, Schiff ER, Mitchell M, Casey DE, Gitlin Jr N, Lisoos T, Gelb LD *et al.*, Extended lamivudine retreatment for chronic hepatitis: maintenance of viral suppression after discontinuation of therapy. *Hepatology* 1999; 30: 1082–1087.
17. Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Hann HWL, Goodman Z, Crowther L, *et al.*, Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 1999; 341: 1256–1263.
18. Byun KS, Kwon OS, Kim JH, Yim HT, Chang YJ, Kim JY, Yeon JE, Park JJ, Kim JS, Bak YT, Lee CH. Factors related to post-treatment relapse in chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1838-1842
19. Asselah T, Ripault MP, Castelnau C, Giuily N, Boyer N, Marcellin P. The current status of antiviral therapy of chronic hepatitis B. *J Clin Virol* 2005; 34: S115-S124.
20. Schalm SW, Heathcote J, Cianciarra J, Farrell G, Sherman M, Willems B,

Dhillon A, Moorat A, Barber J, Gray DF. Lamivudine and alpha interferon combination treatment of patients with chronic hepatitis B infection: a randomized trial. *Gut* 2000; 46:562-568.

21. Schiff ER, Dienstag JL, Karayalcin S, Grimm IS, Perrillo RP, Husa P, de Man RA, Goodman Z, Condreay LD, Crowther LM, Woessner MA, McPhillips PJ, Brown NA. International Lamivudine Investigator Group: Lamivudine and 24 weeks of lamivudine/interferon combination therapy for hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B in interferon nonresponders. *J Hepatol* 2003; 38:818-826.

22. Song BC, Suh DJ, Lee HC, Chung YH, Lee YS. Hepatitis B e antigen seroconversion after lamivudine therapy is not durable in patients with chronic hepatitis B in Korea. *Hepatology*. 2000; 32: 803-6.

23. Liaw YF, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Chien RN, Dent J, Roman L, Edmundson S, Lai CL. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000;119:172-180.

24. Leung NWY, Lai CL, Chang TT, Guan R, Lee CM, Ng KY, Lim SG, Wu PC, Dent JC, Edmundson S, Condreay L, Chien RN. Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology* 2001; 33: 1527-1532.

25. Chang TT, Lai CL, Liaw YF, Guan R, Lim SG, Lee CM, Ng KY, Leung KKY, Nicholls GJ, Pearce MA, Dent JC. Incremental increases in HBeAg seroconversion and continued ALT normalization in Asian chronic HBV (CHB) patients treated with lamivudine for four years. *Antivir Ther* 2000; 5: 44.

26. Guan R, Lai CL, Leung NWY, Lim SG, Lee CM, Ng KY, Chang T-T, Nicholls GJ, Dent JC. Efficacy and safety of 5 years lamivudine treatment of Chinese patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16: A60.

27. Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote EJ, Hann HWL, Woessner M,

- Stephenson SL, Gardner SD, Gray DF, Schiff ER. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology* 2003; 124: 105-117.
28. Allen MI, DesLauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrell DLJ, Brown N, Condey LD. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology* 1998; 27: 1670-1677.
29. Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. The HEP DART International Committee: Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001; 33:751-757.
30. Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR. Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. *Hepatology* 1998; 27:628-633.
31. Ling R, Harrison TJ. Functional analysis of mutations conferring lamivudine resistance on hepatitis B virus. *J Gen Virol* 1999; 80:601-606.
32. Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, Masaki T, Lan KH, Carriho FJ, Omata M. YMDD motif in hepatitis B virus DNA polymerase influences on replication and lamivudine resistance: a study by in vitro full-length viral DNA transfection. *Hepatology* 1999; 29: 939-945.
33. Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NWY, Atkins M, Hunt C, Brown N, Woessner M, Boehme R, Condey L. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy of patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003;36: 687-696.
34. Bartholomew MM, Jansen RW, Jeffers LJ, Reddy KR, Johnson LC, Bunzendahl H, Condey LD, Tzakis AG, Schiff ER, Brown NA. Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. *Lancet* 1997; 349: 20-22.
35. Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, Bain VG, Kneteman NM, Tyrrell DL. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to

lamivudine in vivo. *Hepatology* 1996; 24: 714-717.

36. Hadziyannis SJ, Vassilopoulos. Immunopathogenesis of hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B infection. *Antiviral Res* 2001; 52: 91-8.

37. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Hepatitis B genotypes correlate with the clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118: 554-9.

38. Huang YH, Wu JC, Chang TT, Sheen IJ, Huo TI, Lee PC, Su CW, Lee SD. Association of Core Promoter/Precore Mutations and Viral Loads in e Antigen-negative Chronic Hepatitis B Patients. *J Viral Hepatitis*. 2006; 13: 336-342

39. Zöllner B, Petersen J, Schröter M, et al. 20-fold increase in risk of lamivudine resistance in hepatitis B virus subtype adw. *Lancet* 2001; 357: 934-5.

40. Huang YH, Wu JC, Chang TT, Sheen IJ, Lee PC, Huo TI, Su CW, Wang YJ, Chang FY, Lee SD. Analysis of clinical, biochemical and viral factors associated with early relapse after lamivudine treatment for hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients in Taiwan. *J Viral Hepatitis* 2003;10:277-284

41. Chien RN, Yeh CT, Tsai SL, Chu CM, Liaw YF. Determinants for sustained HBeAg response to lamivudine therapy. *Hepatology*. 2003; 38: 1267-73.

42. Honkoop P, de Man RA, Niesters HGM, Zondervan PE, Schalm SW. Severe acute exacerbation of chronic hepatitis B virus infection after withdrawal of lamivudine therapy. *Hepatology* 2000; 32: 635-639.

43. Lok ASF, Lai CL, Leung N, Yao GB, Cui ZY, Shiff ER, Dienstag JL, Heathcote EJ, Little NR, Griffiths DA, Gardner SD, Castiglia M. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2003;125:1714-1722.

44. Rizzetto M, Tassopoulos NC, Goldin RD, Esteban R, Santantonio T, Heathcote EJ, Lagget M, Taak NK, Woessner MA, Gardner SD. Extended lamivudine treatment in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2005;42:173-179.

45. Zoulim F, Durantel D, Deny P. Management and prevention of drug resistance in chronic hepatitis B. *Liver Int* 2009;29(s1):108-115.
46. Svicher V, Gori C, Trignetti M, et al. The profile of mutational clusters associated with lamivudine resistance can be constrained by HBV genotypes. *J Hepatol* 2009;50:461-470.
47. Warner N, Locarnini S. The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/sW172* mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound. *Hepatology* 2008; 48:88-98.
48. Villet S, Pichoud C, Billoud G, et al. Impact of hepatitis B virus rt A181 V/T mutants on hepatitis B treatment failure. *J Hepatol* 2008; 48:747-755.
49. Mizokami M, Nakano T, Orito E, et al. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS letters* 1999;450:66-71
50. Pallier C, Rodriguez C, Brillet R. Complex dynamics of hepatitis B virus resistance to adefovir. *Hepatology* 2009; 49:50-59.
51. Ghany M, Liang TJ. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2007; 132: 1574-1585.
52. Keeffe EB, Dieterich DT, Han SHB. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: 2008 update. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 12:1315-1341.
53. European association for the study of the liver. EASL clinical practice guideline: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 50:227-242.
54. Mizokami M, Nakano T, Orito E, et al. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS letters* 1999; 450:66-71.

表一、直接定序法 (direct sequencing) 作聚合酶鏈反應使用之引子序列

PCR primer name	sequence(5' to 3')	nt. no. at HBV genome
HBMF2	GTC,TAG,ACT,CGT,GGT,GGA,CTT,CTC,TC	246-271
B840R	ACC,CCA,TCT,TTT,TGT,TTT,GTT,AGG	861-838
B377F	GGA,TGT,GTC,TGC,GGC,GTT,T	375-393
B840R	ACC,CCA,TCT,TTT,TGT,TTT,GTT,AGG	861-838
Direct sequencing primer name		
B840R	ACC,CCA,TCT,TTT,TGT,TTT,GTT,AGG	861-838

表二、依據臨床抗藥分類的特徵

Table 1. Demographic data according to clinical resistance

	All patients (n = 268)	Resistance (n = 159)	No resistance (n = 109)	p *
Patient demographics				
Age (years) (mean, 25 and 75 percentiles)	42.4 (31.4-50.3)	42.0 (32.9-48.9)	42.8 (29.8-52.5)	0.66
Sex (M:F)	203:64	120:39	83:26	1
HBeAg (positive:negative)	139:129	89:70	50:59	0.11
Genotype (A:B:C)	1:142:83	1:87:55	0:55:28	0.67
Total number of treatment (mean)	1.64	1.76	1.47	0.009
Total duration of treatment (weeks)	250.1 (89.1-367.7)	298.3 (156.1-397.1)	179.9 (67.0-275.7)	<0.0001
Baseline				
Total bilirubin (mg/dL)	2.8; 0.8-1.8	2.52; 0.6-1.6	3.3; 0.8-2.0	0.35
ALT (U/L)	440.3; 154-548	398; 134.5-533.2	502.5; 198-582	0.09
AST (U/L)	265.4; 83.8-302.2	244.5; 74.5-285	296.1; 95-312.5	0.22
Viral load (IU/ml)	7.8x10 ⁷ ; 2.7x10 ⁵ -1.1x10 ⁸	8.7x10 ⁷ ; 5.3x10 ⁵ -1.1x10 ⁸	6.5x10 ⁷ ; 1.1x10 ⁵ -9.1x10 ⁷	0.25
6-month of 1st course of treatment				
Total bilirubin (mg/dL)	0.9; 0.6-1.1	0.9; 0.6-1.0	1.0; 0.6-1.3	0.08
ALT (U/L)	41.0; 21-40	49.8; 23-45.3	28.7; 18-35	0.02
AST (U/L)	30.2; 21-33	32.5; 22-36.8	26.9; 19-31	0.03
Viral load (IU/ml)	1.6x10 ⁶ ; 34-1.1x10 ³	2.6x10 ⁶ ; 44-8.3x10 ³	5.3x10 ⁴ ; 16-316	0.07
INNOLiPA (LAM wildtype:resistance)	140:33	77:25	63:8	0.03
End of 1st course of treatment				
Total bilirubin (mg/dL)	0.8; 0.5-1.1	0.8; 0.5-1.1	0.9; 0.5-1.1	0.59
ALT (U/L)	37.9; 19-35	49.2; 21.8-435.5	25.8; 17-31	0.04
AST (U/L)	28.3; 19-29	32.4; 21-31	23.8; 19-28	0.02
Viral load (IU/ml)	3.5x10 ⁶ ; ND-1.4x10 ³	5.6x10 ⁶ ; ND-8.7x10 ³	1.3x10 ⁶ ; ND-188	0.25

Note. Data presented are means, 25 and 75 percentiles.

ND, undetectable. LAM, lamivudine.

* p value: comparison between patients with presence of resistance defined by either biochemical or virological breakthrough, switch or add on an antiviral drug for rescue.

圖一、療效分析：治療後第3個月早期 HBeAg 消失之因子分析



衛生署疾病管制局

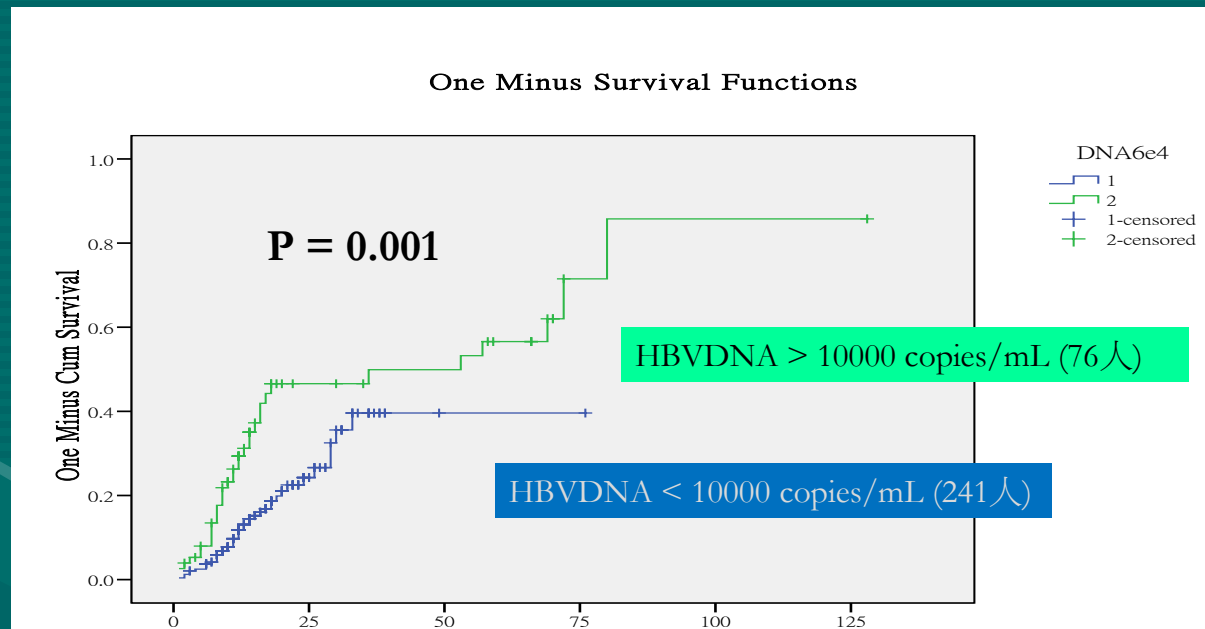
療效分析- HBeAg loss at 3 months

■ HBeAg at 3 months of LAM therapy: 124/650 (19.1%)

	HBeAg (+)	HBeAg loss	P
Sex (M/F) (%)	312/138 (69.3%/30.7%)	71/29 (71%/29%)	0.836
Age (yr), mean ± SD	35.9±11.4	33.2±8.9	0.132
Pre-Tx Albumin (g/dL) , mean ± SD	4.15 ± 0.17	3.80 ± 0.60	0.025
Pre-Tx Bilirubin (mg/dL) , mean ± SD	1.89±3.25	3.12±6.38	0.011
Pre-Tx AST (U/L) , mean ± SD	283.4±355.8	450.4±495.1	0.007
Pre-Tx ALT (U/L) , mean ± SD	481.8±505.4	637.4±618.3	<0.001
Pre-Tx HBVDNA < 10 ⁶ copies/ml	61 (17.6%)	25(29.1%)	0.026
3 Months HBVDNA < 10 ⁴ copies/ml	61 (49.2%)	20(69.0%)	0.086

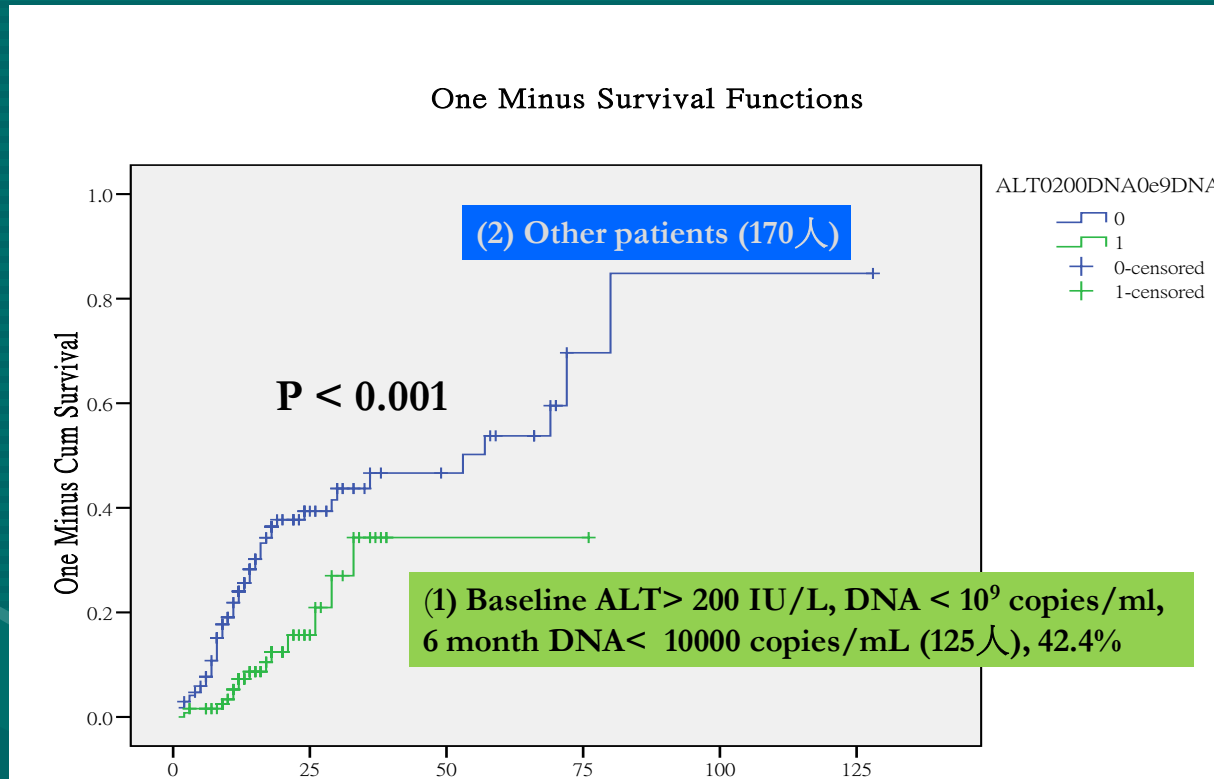
圖二、干安能治療六個月血清 B 型肝炎病毒 DNA 與將來發生生化突破之關係

The correlation of serum HBVDNA levels at the 6 months of lamivudine therapy and the emergence of biochemical breakthrough



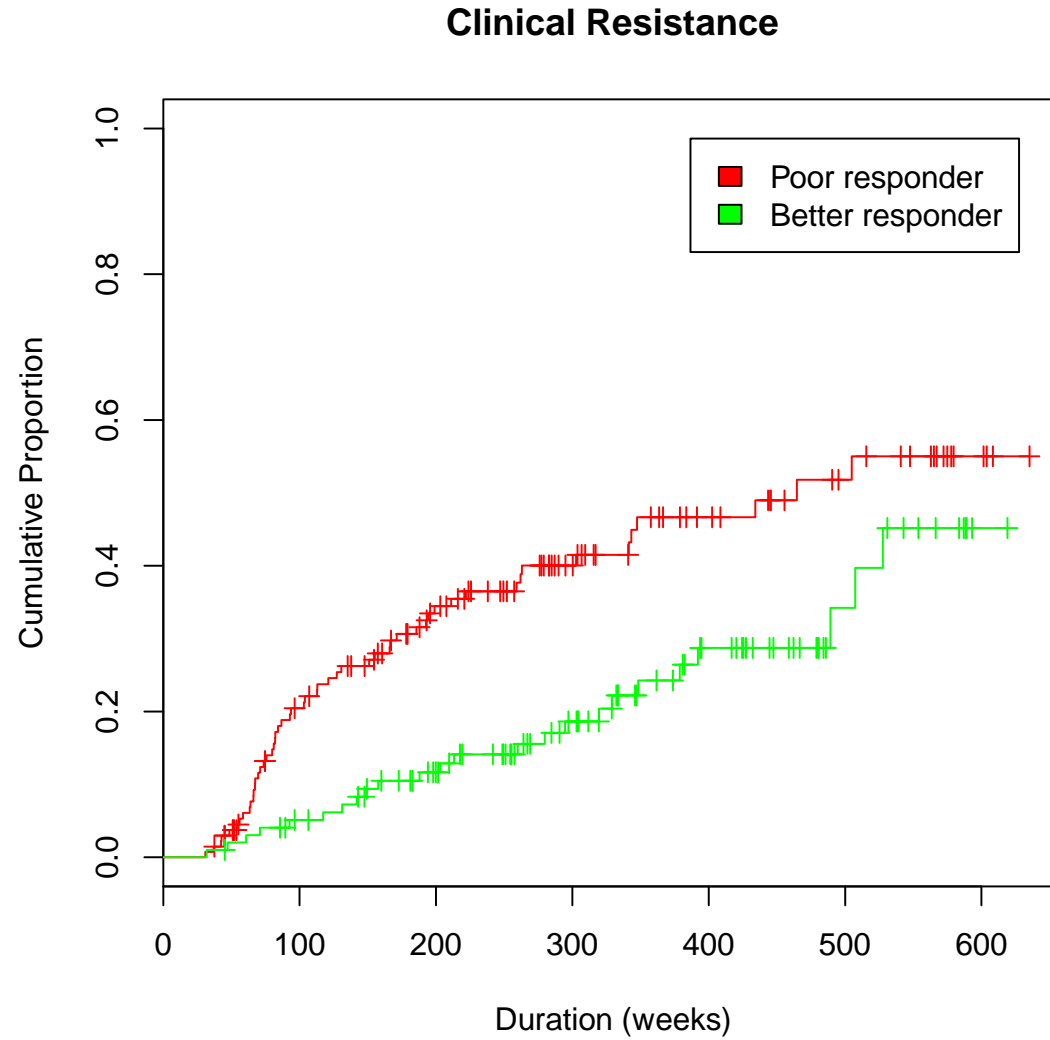
Years	1	2	3	4	5
HBVDNA < 10 ⁴ copies/ml	11.8%	24.3%	39.6%	39.6%	39.6%
HBVDNA > 10 ⁴ copies/ml	29.4%	46.6%	49.9%	49.9%	56.6%

圖三、干安能治療較佳反應者與將來發生生化突破之關係

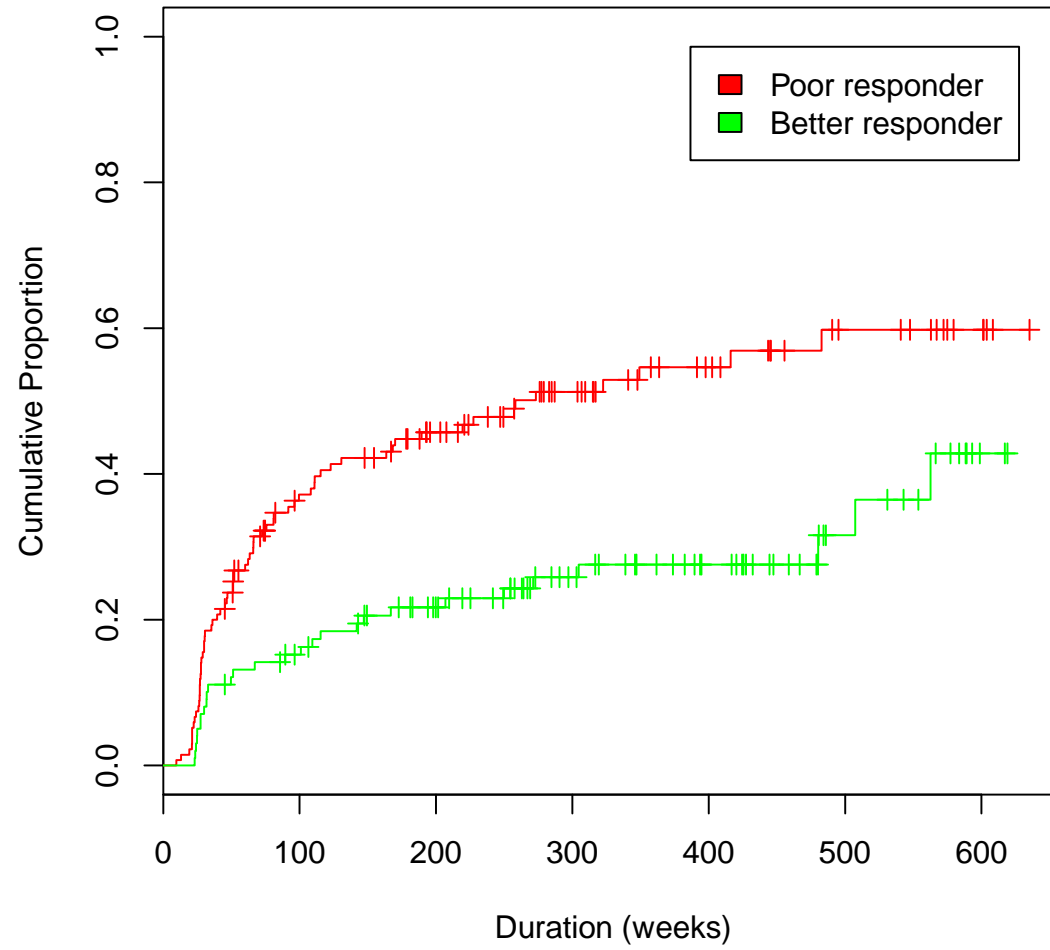


Years	1	2	3	4	5
1 (better responder)	8.3%	15.7%	34.3%	34.3%	34.3%
2	24.0%	39.4%	46.7%	46.7%	53.8%

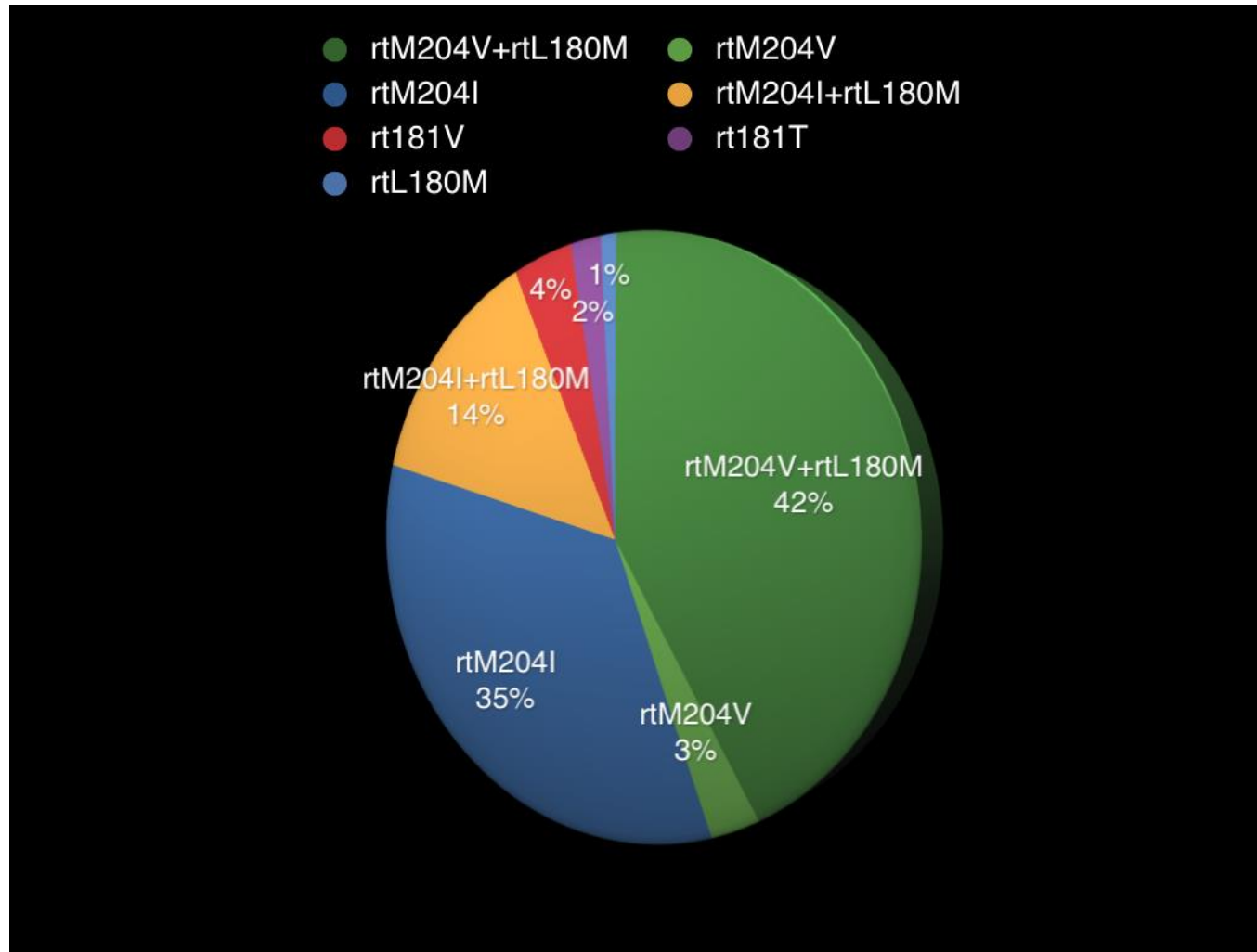
圖三之一、干安能治療較佳反應者與將來發生臨床抗藥之關係



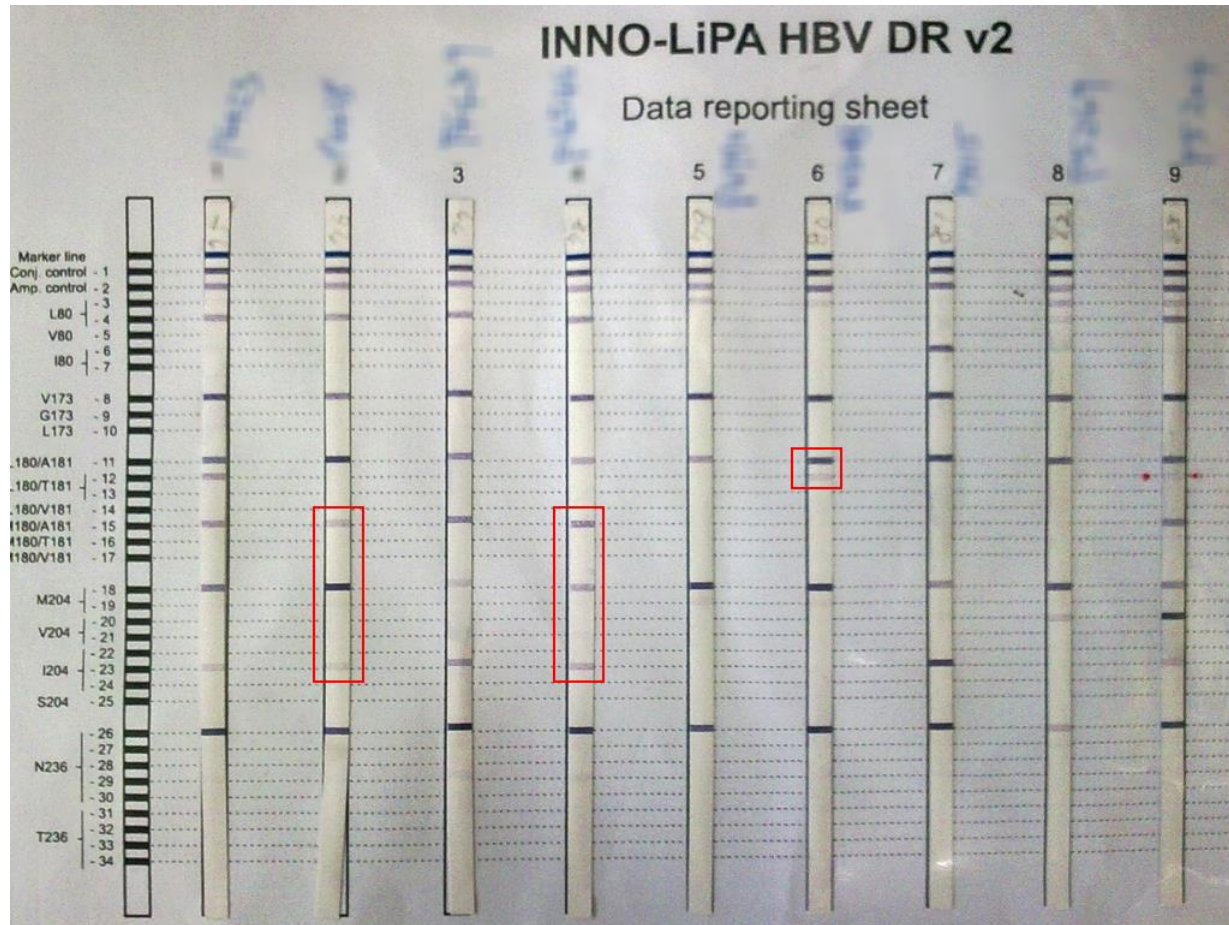
圖三之二、干安能治療較佳反應者與將來發生基因型抗藥之關係
genotypic resistance



圖四、干安能治療後基因定序法抗藥性病毒株之分析



圖五、INNO-LiPA 分析干安能治療相關之抗藥性病毒株



圖六、干安能治療後基因定序法分析對其他藥物抗藥型相關之抗藥型突變

Mutation	Total, N = 170 (%)	Patient(s) with genotype		p
		B, N = 119 (%)	C, N = 51 (%)	
Adefovir				
rtA181T	2 (2.1)	0 (0)	2 (6.9)	0.09
rtA181V	4 (4.2)	2 (3.0)	2 (6.9)	0.58
rtN236T	7 (4.1)	6 (5.0)	1 (2.0)	0.45
rtL80I/V + rtM204I	11 (6.5)	7 (5.9)	4 (7.8)	0.74
rtV84M/rtS85A	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.00
Entecavir				
rtI169T	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.00
rtT184A	2 (1.2)	2 (1.7)	0 (0)	0.58
rtT184L	1 (0.6)	0 (0)	1 (2.0)	0.30
rtS202I	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.00
rtM250V	2 (1.2)	2 (1.7)	0 (0)	0.58
Tenofovir				
rtA194T	5 (2.9)	5 (4.2)	0 (0)	0.32
rtL180M+rtA194T +rtM204V	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.00
rtV214A	3 (1.8)	0 (0)	3 (5.9)	0.03
rtQ215S	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.00

圖七、 干安能治療後相關的表面抗原逃脫突變

S gene escape mutants				
Mutation	Total N = 170 (%)	Patient(s) with genotype		P
		B, N = 119 (%)	C, N = 51 (%)	
Vaccine escape mutants				
sT126S	9 (5.3)	7 (5.9)	2 (3.9)	0.726
sT131N	2 (1.2)	1 (0.8)	1 (2.0)	0.511
sM133L	5 (2.9)	5 (4.2)	0 (0)	0.324
sK141E	2 (1.2)	1 (0.8)	1 (2.0)	0.511
sD144E	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.000
sG145R	6 (3.5)	5 (4.2)	1 (2.0)	0.670
Any	24 (14.1%)	19 (16.0%)	5 (9.8%)	0.345
Diagnostic escape mutants				
sP120T/A/Q	1 (0.6)	1 (0.8)	0 (0)	1.000
sT131K	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.000
sD144A	3 (1.8)	2 (1.7)	1 (2.0)	1.000
sG145R	6 (3.5)	5 (4.2)	1 (2.0)	0.670
Any	10 (5.7%)	8 (6.4%)	2 (3.9%)	0.726