

94 年度計畫重要研究成果

計畫名稱：Pre-S B 型肝炎病毒突變種評估慢性 B 型肝炎帶原者轉化成肝癌之指標

主持人：黃溫雅 計畫編號：DOH94-DC- 1046

1.計畫之新發現或新發明

本計畫有以下方面的發現：

- (1) pre-S 突變與肝癌的關係
- (2) pre-S 突變與 HBeAg 的關係
- (3) pre-S 突變與病毒 DNA titer 的關係
- (4) pre-S 突變與病毒基因型的關係

這些發縣具有相當的臨床診斷與追蹤的價值，也可提供未來一個新的治療 B 型肝炎患者的新藥物 target。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

本計畫成果題供大眾對於慢性 B 型肝炎與肝癌的相關性。對於 B 型肝炎患者更提供追蹤治療的參考。

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

## 目 錄

	頁 碼
1. 中文摘要.....	( 2 )
2. 英文摘要.....	( 4 )
3. 內文	
(1)前言.....	( 5 )
(2)材料與方法.....	( 9 )
(3)結果.....	( 12 )
(4)討論.....	( 13 )
(5)結論與建議.....	( 14 )
(6)參考文獻.....	( 15 )
(7)圖、表.....	( 20 )

## 中文摘要

B 型肝炎帶原者轉變成肝癌的機率是一般人的 100 倍。因此肝癌的早期發現與早期治療是一個很重要的課題。B 型肝炎病毒的表面抗原是篩檢帶原者的最重要指標。在慢性 B 型肝炎病人中，有些的 B 型肝炎病毒表面抗原發生突變在 Pre-S 的區域。這個表面抗原突變種與肝癌的發生有密切關係。在此計畫中，我們以 Pre-S 突變種來預估病人由慢性 B 型肝炎轉變為肝癌的危險性。我們從 93 年開始著手收集中央健康保險局「全民健康保險加強慢性 B 型及 C 型肝炎治療試辦計畫」的 B 型肝炎帶原者，希望藉由檢測這個 Pre-S 表面抗原突變種來作為肝癌發生的預測因子。在第三年的計畫中將如期完成 pre-S 突變型的分析。也追蹤這些病人的相關病史，治療狀況，以及疾病演化的現況。

在本計畫兩年執行中，我們針對中央健康保險局「加強肝炎防治第五期計畫」及加強慢性 B 型肝炎病患藥物治療中來收集血清檢體，抽取血清中病毒 DNA，利用 PCR 將病毒表面基因放大，將 PCR 產物分別轉殖於質體中並進行定序分析 pre-S 區域的突變情形。目前收集了共 1426 個血清檢體，年齡與性別分佈見附表一。大部份的受檢者在開始服用抗病毒藥物 lamivudine 及 interferon 干擾素之前接受抽血。由於肝癌好發於 40 到 60 歲的男性。因此我們根據年齡選擇 pre-S 突變的分析對象(詳見附表二)，共

分析了 540 位男性。其中已有 77 人在治療後陸續回診並接受抽血。因此，我們將持續追蹤這些患者，來了解服用 lamivudine 及 interferon 後對於 B 型肝炎病毒表面抗原 pre-S 突變種的影響。在已分析的 540 位患者中，有 pre-S 突變的佔有 26.48%，其中 40 到 60 歲的男性更高達 31% (附表三)，顯示肝癌高危險性族群的 pre-S 突變機率甚高。

中文關鍵詞(至少三個): B 型肝炎病毒，肝癌，B 型肝炎病毒表面抗原，Pre-S 突變種

## **English Abstract**

The HBV carrier presents 100-fold increase in risk to develop into HCC. Therefore, it is an important public health issue to early diagnose and treat HBV infection. The HBV surface antigen is an important marker for estimating HBV infection. In the late or nonreplicative stage of HBV infection, a novel type of HBS mutation, the pre-S mutation, has been identified. Such mutations have shown high correlation with HCC progression. This study aims to develop a screening test to predict HCC risk in the chronic HBV carriers.

In this study, we collected sera from the patients that enrolled in the “Hepatitis Protection Health Insurance Program”. The HBV surface gene in these sera was analyzed by nested PCR. The PCR products of HBV surface genes were cloned into TA plasmid cloning vectors and fully sequenced. In total, 1428 serum specimens have been investigated. The age and sex distributions are summarized in Table 1. Most of the participants had blood drawn before receiving the treatments with anti-viral drugs lamivudine and interferon. Given that the HBV-related HCC is predominant in males in the ages of 40 to 60 years old, we focused on the analysis of this population. In total, 540 males in the ages of 40 to 60 were analyzed. Among them, the prevalence rate for pre-S mutations is as high as 31% (Table 3), indicating that the pre-S mutation is a common effect in patients with chronic HBV infection.

Keyword: hepatitis B virus, HBsAg, pre-S mutant HBsAg, hepatocellular carcinoma

## 壹、前言

慢性肝炎、肝硬化及肝細胞癌為國人重要死亡原因，根據民國九十年衛生統計資料顯示，慢性肝病及肝硬化高居台灣地區十大死因第六位，而肝癌更高居台灣地區癌症死亡原因的第二位，其中有很大部分是由 B 型、C 型肝炎病毒所引起，造成台灣每年有超過一萬人為此喪失寶貴生命，其影響至為巨大。根據全民健康保險九十一年醫療費用統計資料顯示，因慢性肝炎、肝硬化及肝癌三種疾病就醫人數總計有 69 萬餘人，較九十年成長 2.77%，醫療費用總計約 55.7 億餘元，占總醫療費用之 1.6%，較九十年成長 9.58%。依據年齡性別分布統計，慢性肝炎就醫人數約 60 餘萬人，較九十年成長 3%，其中女性以 40-50 歲最高，占慢性肝炎就醫人數之 9.39%，男性以 40-50 歲最高，占 14.40%；肝硬化就醫人數約 5.3 萬餘人，與九十年人數相當未成長，其中女性以 60-70 歲最高，占肝硬化就醫人數之 10.59%，男性以 40-50 歲最高，占 16.92%；肝癌就醫人數約 3.2 萬餘人，較九十年成長 3.32%，其中女性男性均以 60-70 歲最高，分別占肝癌就醫人數之 9.47% 與 17.26%。

慢性肝炎診斷就醫者，以 40-50 歲壯年期居多，肝硬化或肝細胞癌則以 60-70 歲老年期居多，而醫學研究亦已證實，肝炎病毒感染與慢性肝炎、肝

硬化及肝細胞癌有密切關係。為加強肝炎防治，行政院衛生署延續過去近二十年來肝炎防治經驗，持續不斷的實施加強措施，以擴大防治成效，繼續進行B型肝炎預防注射、加強肝炎防治衛生教育、提高輸血安全及加強檢測品質管制外，並進行各項肝炎防治研究，以期減少肝炎病毒感染，降低肝硬化及肝細胞癌罹患率，有效治療慢性肝炎患者，以保護國人健康及延長肝炎患者之生命。

在中央健康保險局「加強肝炎防治第五期計畫」及加強慢性B型及C型肝炎病患藥物治療中，透過與行政院衛生署肝炎防治委員會、疾病管制局、醫藥專家等共同討論及合作，自九十二年十月一日起推動「全民健康保險加強慢性B型及C型肝炎治療試辦計畫」，計畫中將治療慢性B型及C型肝炎之藥品，納入新藥給付。希望預防勝於治療，使高危險群（B型肝炎帶原者或家族中有肝癌病史）的群眾作定期追蹤檢查。另健保之成人預防保健有肝功能檢查項目，孕婦產前健康檢查亦包含B型肝炎表面抗原及E抗原檢查（HBsAg、HBeAg），以早期發現，早期接受治療。對於B型肝炎病毒帶原者，B型肝炎的檢測與肝癌的指標因子是很重要的課題。利用適當而敏感的篩檢方法，才能達到早期發現早期治療的效果。

B型肝炎病毒是含有DNA的病毒，基因體呈現部分雙股的情形。長度為3.2 kb，包含四個基因：S，表面基因；C，核心基因；P，複製酶基因；

以及 X 基因 (Feitelson 1985)。目前有幾個假說已被提出來解釋 B 型肝炎感染引起肝癌的原因。而表面抗原一直是檢驗 B 型肝炎病毒帶原者最重要的指標。B 型肝炎表面抗原的表現型式隨著病毒複製情形不同而有所差異。在急性感染期，由主要抗原，也就是小抗原(major/small HBsAg)來表現。這些表面抗原構成病毒粒子的外包鞘，而使個病毒大量複製產生並分泌至肝細胞外。然而，當轉變成慢性感染期時，B 型肝炎病毒的基因基本上會嵌入宿主的染色體中。以表面抗原而言，將會轉變成大抗原(large HBsAg)的表現。大抗原與小抗原之間的差異在於起始點的不同。大抗原蛋白包含 pre-S 序列，原為小抗原的上游啟動子區域。我們在先前的研究中發現，慢性 B 型肝炎的後期有些表面抗原基因會在 pre-S 區域發生突變，而產生了突變型的大抗原蛋白。這些 pre-S 突變種 B 型肝炎病毒表面抗原較易發生在肝硬化及肝癌的組織，似乎意味著這些 pre-S 表面抗原突變種與 B 型肝炎所引發的肝癌之間有著密切的關係。

除了表面抗原外，套膜抗原 HBeAg 也是一個重要指標。套膜抗原代表著 B 型肝炎病毒是否正在進行複製繁殖。也是偵測抗病毒藥物如 lamivudine 及 interferon 干擾素治療效果的重要指標。最近由陳建仁教授所帶領的研究中發現，套膜抗原也是很重要的肝癌預測因子(Yang et al. 2002)。表面抗原陽性者具有比一般人高 9.6 倍的機率發展成肝癌，而表面抗原與套膜抗原都



陽性者則有高達 60.2 倍的機率發展成肝癌。因此合併表面抗原與套膜抗原的偵測是目前最有效對 B 型肝炎帶原者的追蹤。

B 型肝炎病毒近來由慢性 B 型肝炎患者之肝臟細胞分離出 Pre-S<sub>2</sub> 的突變 B 型肝炎表面抗原。這種突變形的 B 型肝炎表面抗原僅存在於晚期或是非複製期的慢性 B 型肝炎感染。此種 B 型肝炎表面抗原的突變型是在表面抗原基因的 Pre-S<sub>2</sub> 區域的 2-55 個核苷酸被刪除以及在表面抗基因的中間起始碼發生單點突變，因此導致了中間型表面抗原(middle surface protein)以及主要型的表面抗原(major surface protein)的合成量減少。近來我們發現肝細胞若持續大量的表現這種突變型的表面抗原，會使得週邊的組織得到較多的生長利益(growth advantage)而造成 clonal expansion。這種 pre-S 突變型的表面抗原蛋白在 B 型肝炎所誘發的肝小節硬化、肝癌早期以及肝癌中大量表現 (Fan et al. 2000, Fan et al. 2001)。因此 B 型肝炎發展成肝癌的過程中 Pre-S<sub>2</sub> 突變型的表面抗原蛋白在之中扮演著一個重要的角色。

## 貳、材料及方法

### 1. 檢體的收集

本次計畫的檢體來源乃是取自於健保局「全民健康保險加強慢性B型肝炎治療試辦計畫」中所收集到的慢性B型肝炎病毒感染的病人血清。這些病人篩檢的原則為：

- (一) HBsAg(+)超過六個月。
- (二) HBeAg(+)超過三個月。
- (三) 無C型肝炎病毒感染。

經由健保局的慢性B型肝炎治療試辦計畫，這些病人將先經由各大醫院消化科門診醫師診斷出已患有慢性B型肝炎病毒感染並符合以上標準，並收集病患病史，病程演變追蹤，以及家族史等相關資料，同時病人的血清定期收集後集中在疾病管制局。粗估B肝患者將有將近一萬五千人適用於這個計畫。我們將利用這些檢體來採樣，並加以下幾點考慮標準：

- (一) 由於慢性肝癌患者發生肝癌得機會為每年0.8%，因此本計畫將收集1500名的病患。以三年的前瞻性研究 (prospective study)的方式，來追蹤這些患者發生肝硬化或肝癌的機率。
- (二) 只收取無感染C型肝炎病毒者。如此，才能避免HCV感染對肝癌

的影響。

(三) 經由「全民健康保險加強慢性 B 型肝炎治療試辦計畫」，將記錄每位病人其它的肝癌危險因子暴露情形，

## 2. DNA 萃取與聚合酵素連鎖反應 (PCR)

將採集到的血清，其中取出 200 $\mu$ l 的檢體體積以專門萃取 DNA 之實驗套組來進行萃取 B 型肝炎病毒的 DNA，萃取後的檢體 DNA 將集中管理保存在零下 20 度，以維持檢體本身的品質。根據 B 型肝炎病毒的基因序列，我們設計出可以涵蓋整個 pre-S 區域的引子序列，pre-S 區域序列包含了 pre-S<sub>1</sub> 與 pre-S<sub>2</sub>。聚合酵素連鎖的反應總體積為 50 $\mu$ l，其中含有 1 倍體積聚合酵素緩衝液，0.15mM dNTP，正向引子及反向引子各為 0.2 $\mu$ M 濃度，1 單位(unit)的聚合酵素(Taq)，檢體 DNA 的體積為 2 $\mu$ l。聚合酵素連鎖反應的反應條件大略設計為：第一階段於 94 $^{\circ}$ C 作用 40 秒，然後降至 57 $^{\circ}$ C 黏合反應 40 秒後，再升溫至 72 $^{\circ}$ C 作用 40 秒，此一階段進行 40 個循環，第二階段於 72 $^{\circ}$ C 作用 7 分鐘。在這只有一次聚合酵素連鎖反應是不夠的，我們必須在利用第一次的聚合酵素連鎖反應所產生的產物，繼續進行第二次的聚合酵素連鎖反應(nested PCR)，使 HBV 濃度低的檢體也能分離出表面抗原 DNA。

### 3. 表面抗原基因定序及分類

在經過第二次聚合酵素連鎖反應後的產物，我們將表面抗原 DNA 接合到 TA 載體上，製備成客隆；，將質體 DNA 萃取出後接著進行基因定序的步驟。每個病人檢體都將經過基因定序的步驟來檢測是否含有 pre-S<sub>1</sub> 或 pre-S<sub>2</sub> 的突變。定序將由成大醫學中心臨醫部負責。我們將集中分析 pre-S 區域的部位，並將基因序列依照不同類型的序列專一性作分類。

## 參、結果

(1) 檢體收集:目前收集了共 1426 個血清檢體，年齡與性別分佈見附表一。大部份的受檢者在開始服用抗病毒藥物 lamivudine 及 interferon 干擾素之前接受抽血。由於肝癌好發於 40 到 60 歲的男性。因此我們根據年齡選擇 pre-S 突變的分析對象(詳見附表二)，共分析了 540 位男性。其中已有 77 人在治療後陸續回診並接受抽血。因此，我們將持續追蹤這些患者，來了解服用 lamivudine 及 interferon 後對於 B 型肝炎病毒表面抗原 pre-S 突變種的影響。

(2) pre-S 突變機率: 在已分析的 540 位患者中，有 pre-S 突變的佔有 26.48%，其中 40 到 60 歲的男性更高達 31% (附表三)，顯示肝癌高危險性族群的 pre-S 突變機率甚高。

## 肆、討論

1. 本研究發現，慢性 B 型肝炎病毒帶原者的病毒表面抗原呈現相當高的 pre-S 突變機率，尤其以 40 到 60 歲的男性為主。此發現代表著 pre-S 突變種將是慢性 B 型肝炎病毒帶原者轉化為肝癌的重要指標。應該廣為推廣。
2. 我們將以前瞻性研究的方式定期追蹤每個個案，並作以下統計分析：
  - (1) pre-S1/S2 突變種與血清 B 型肝炎病毒 DNA 濃度的相關性。
  - (2) lamivudine 及 interferon 治療對於 pre-S1/S2 突變發生與轉化之影響。
  - (3) pre-S1/S2 突變種的發生對於 lamivudine 及 interferon 治療效果是否有所影響。
  - (4) pre-S1/S2 突變種與肝硬化或肝癌發生率的相關性。

## 伍、結論與建議

建議對於血清檢體的收集與郵寄能夠更加有效率，以確保實驗進行順暢。

## 陸、重要參考文獻

1. Beasley, J., Hwang, L. Y., Lin, C. C., and Chien, C. S. Hepatocellular carcinoma and HBV. A prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet*, 2: 11290-11133, 1981.
2. Benn, J., Su, F., Doria, M., and Schneider, R. J. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-related and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J. Virol.*, 70: 4978-4985, 1996.
3. Blackberg J, and Kidd-Ljunggren K. Mutations within the hepatitis B virus genome among chronic hepatitis B patients with hepatocellular carcinoma. *J Med Virol.*71(1):18-23, 2003.
4. Bosch, F. X. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma. In: K. Okuda and E. Tabor (eds.), *Liver Cancer*, pp. 13-28. New York: Churchill Livingstone, 1997.
5. Bréchet, C., Hadchouel, M., Scotto, J., Fonck, M., Potet, F., Vyas, G. N., and Tiollais, P. State of hepatitis B virus DNA in hepatocytes of patients with hepatitis B surface antigen-positive and negative liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 3906-3910, 1981.
6. Chisari, FV, Filippi, P, McLachlan, A, Milich, DR, Riggs, M, Lee, S, Palmiter, RD, Pinkert, CA and Brinster, RL. Expression of hepatitis B virus large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice. *J. Virol.*, 60(3), 88, 1986.



7. Feitelson, M. Molecular components of hepatitis B virus. Boston: Nijhoff Publications, 1985.
8. Fan, Y-F, Lu, C-C Chang, Y-C, Chang, T-T, Lin, P-W, Lei, H-Y, and Su, I-J. Identification of a pre-S<sub>2</sub> mutant in hepatocytes expressing a novel marginal pattern of surface antigen in advanced disease of chronic hepatitis B virus infection. *J. Gastroenterology Hepatology*, 15, 519-528, 2000.
9. Fan T-F, Lu, C-C, Chen, W-C, Yao, W-J, Wang, H-C, Chang, T-T, Lei, H-Y, Shiau, A-L, and Su, I-J. Prevalence and significance of hepatitis B virus (HBV) pre-S mutants in serum and liver at different replicative stages of chronic HBS infection. *Hapatology*, 33, 277-286, 2001.
10. Huang, SN and Chisari FV. Strong, sustained hepatocellular proliferation precedes hepatocarcinogenesis in hepatitis B surface antigen transgenic mice. *Hepatology*, 21(3), 620-6, 1995.
11. Hampton, R. Y. ER stress response: Getting the UPR hand on misfolded proteins. *Curr. Biol.*, 10: 518-521, 2000.
12. Hsieh, Y.-H., Su, I.-J., Wang, H.-C., Chang., W.-W., Lei, H.-Y., Lai, M.-D., Chang, W.-T., and Huang, W. The pre-S mutant surface antigens in chronic hepatitis B virus infection induce oxidative stress and DNA damage. *Carcinogenesis*, 25, 2023-2032, 2004.
13. Hung, J.-H., Su, I.-J., Lei, H.-Y., Wang, H.-C., Lin, W. C., Chang, W.-T., Huang, W., Chang, W. C., Chang, Y. S., Chen, C.-C., and Lai, M. D. Endoplasmic reticulum stress stimulates the expression of cyclooxygenase-2 through activation of NF- $\kappa$ B and pp38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 279, 46384-46392, 2004.

14. Hsu, T., Moroy, T., Etiemble, J., Louise, A., Trepo, C., Tiollais, P., and Buendia, M. A. Activation of c-myc by woodchuck hepatitis virus insertion in hepatocellular carcinoma. *Cell*, 55: 627-635, 1988.
15. Huy, TT, Ushijima, H, Win, KM, Luengrojanakul, P, Shrestha, PK, Zhong, ZH, Smirnov, AV, Taltavull, TC, Sata, T, and Abe, K. High prevalence of hepatitis B virus pre-s mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. *J Clin Microbiol.* 41(12): 5449-5455. 2003.
16. Levy, J. A. *Virology*. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1994.
17. Natoli, G., Avantaggiati, M. L., Chirillo, P., Costanzo, A., Artini, M., Balsano, C., and Levrero, M. Induction of the DNA-binding activity of c-jun/c-fos heterodimers by the hepatitis B virus transactivator pX. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 989-98, 1994.
18. Natoli, G., Avantaggiati, M. L., Chirillo, P., Puri, P. L., Ianni, A., Balsano, C., Levrero, M. Ras- and Raf-dependent activation of c-jun transcriptional activity by the hepatitis B virus transactivator pX. *Oncogene*, 9: 2837-43, 1994.
19. Liu, H, Bowes, RC, van de Water, B, Sillence, C, Nagelkerke, JF and Stevens, JL. Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca<sup>2+</sup> disturbances, and cell death in renal epithelial cells. *J Biol Chem*, 272(35), 21751-9, 1997.
20. Parkin, D. M., Muir, C. S., and Whelan, S. L. *Cancer Incidence in Five Continents*, IARC Publication, 143. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1997.

21. Parkin, D. M., Pisani, P., and Ferlay, J. Estimates of the worldwide incidence of the 18 major cancers in 1985. *Int. J. Cancer*, 54: 1-13, 1993.
22. Pahl, H. L. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus. *Physiol. Rev.*, 79: 683-701, 1999.
23. Serbinova, EA, Kadiiska, MB, Bakalova, RA, Koynova, GM, Stoyanovsky, DA, Karakashev, PC, Stoytchev, TS, Wolinsky, I and Kagan, VE. Lipid peroxidation activation and cytochrome P-450 decrease in rat liver endoplasmic reticulum under oxidative stress. *Toxicol. Lett.*, 47(2), 119-23, 1989.
24. Shafritz, D. A., and Kew, M. C. Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 305: 1067-1073, 1981.
25. Sugauchi, F, Ohno, T, Orito, E, Sakugawa, H, Ichida, T, Komatsu, M, Kuramitsu, T, Ueda, R, Miyakawa, Y, and Mizokami, M. Influence of hepatitis B virus genotypes on the development of preS deletions and advanced liver disease. *J Med Virol.*, 70(4):537-544, 2003.
26. Takada, S., Gotoh, Y., Hayashi, S., Yoshida, M., and Koike, K. Structural rearrangement of integrated hepatitis B virus DNA as well as cellular flanking DNA is present in chronically infected hepatic tissues. *J. Virol.*, 64: 822-828, 1990.
27. Wang, XZ, Lawson, B, Brewer, JW, Zinszner, H, Sanjay, A, Mi, LJ, Boorstein, R, Kreibich, G, Hendershot, LM and Ron, D. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol. Cell. Biol.*, 16(8), 4273-80, 1996.

28. Wang, H-C, Wu, H-C, Chen, C-F, Lei, H-Y, and Su, I-J. Different types of ground glass hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection contain specific pre-S mutants which may induce ER stress and oxidative response. *Am. J. Path.*, 163, 2441-2449, 2003.
29. Wang, H.-C., Chang, W.-T., Chang., W.-W., Huang, W., Lei, H.-Y., Lai, M.-D., , Fausto, N., and Su, I.-J. Upregulation of cyclin A and nodular proliferation of hepatocytes induced by a pre-S<sub>2</sub> deletion mutant in chronic HBV infection. *Hepatology*, 41, 761-770, 2005.
30. Yang, HI, Lu, SN, Liaw, YF, You, SL, Sun, CA, Wang, LY, Hsiao, CK, Chen, PJ, Chen, DS, and Chen, CJ. Hepatitis B e antigen and risk of hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 347, 168-174, 2002

柒、圖表

表一 本計劃收集之血清檢體

年齡	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	≥ 70	總計
男	25	257	277	268	148	63	24	<b>1062</b>
女	3	79	90	81	65	25	21	<b>364</b>
總計	<b>28</b>	<b>336</b>	<b>367</b>	<b>349</b>	<b>213</b>	<b>88</b>	<b>45</b>	<b>1426</b>

表二 本計劃已分析之男性治療前血清檢體

年齡	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	≥ 70	總計
人數	16	50	100	188	117	52	17	<b>540</b>

表三 pre-S 突變種之發生機率

	野生型	Pre-S <sub>1</sub> 突變	Pre-S <sub>2</sub> 突變	Pre-S <sub>1</sub> + pre-S <sub>2</sub> 突變	未知 *	總計	發生率 (%)
年齡							
10-19	13	0	1	0	2	16	6.25
20-29	39	3	1	5	2	50	18
30-39	69	6	4	10	11	100	20
40-49	104	8	33	18	25	188	31.38
50-59	69	4	28	5	11	117	31.62
60-69	34	2	11	0	5	52	25
≥70	11	0	3	1	2	17	23.53
總計	339	23	81	39	58	540	26.48

\*: B 型肝炎病毒濃度在血清中過低，在 PCR 偵測敏感度以下，因此無法得知。

