

計畫編號：DOH95-DC-1201

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

建立台灣 B 型及 C 型肝炎病毒之流病基因資料庫 (第二年)

## 研究報告

執行機構： 國立台灣大學

計畫主持人：劉俊人 醫師

共同主持人：楊志元博士、葉秀慧博士

研究人員： 邱建元、吳秉儒

執行期間： 95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見\*

# 目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	( 2 )
中文摘要	( 3-5 )
英文摘要	( 6-8 )
本文	
一、前言	( 9-16 )
二、材料與方法	( 17-21 )
三、結果	( 22-31 )
四、討論	( 31 )
五、結論與建議	( 32-33 )
六、參考文獻	( 34-39 )

共 ( 39 ) 頁

## 中文摘要：

中文關鍵詞(至少三個)：B 型肝炎，C 型肝炎，預後，干擾素，核酸類似物，病毒因子，基因體

**背景及目的：**慢性肝炎危害國民健康眾所皆知。台灣地區之慢性肝炎主要經由肝炎病毒感染所造成。過去研究已知台灣病毒性肝炎之主要致病原為 B 型肝炎病毒。因此行政院於民國七十年八月核定『加強 B 型肝炎防治計畫』，其中包括新生兒全面預防注射 B 型肝炎疫苗。目前仍約有 6% 因未能接種疫苗或接種無效而可能變為慢性帶原者，再加上原有約 260 萬的 B 型肝炎帶原者，故往後數十年間，慢性 B 型肝炎病毒感染之後遺症如肝硬化和肝細胞癌仍舊是國人健康的大敵。然而並非每一個人皆會演變成慢性肝炎、肝硬化和肝細胞癌。在自然病史方面，目前已知所有 B 型肝炎患者中，約 60-70% 可維持健康、不活動帶原狀態，甚至持續終生。而其餘 30-40% 的患者則屢次發生肝細胞發炎，並以不同速度進展至肝硬化，最後演變成肝細胞癌或其他末期肝疾。至目前為止，對這些慢性肝炎患者而言，我們仍無法有效預測患者未來的演變，只能被動地觀察。此外，C 型肝炎病毒感染亦是一個全球性的健康課題，據世界衛生組織評估，全世界約有 1 億 7 千萬人為 C 型肝炎病毒帶原者，C 型肝炎病毒感染在歐美國家遠較 B 型肝炎病毒感染來得重要，是其慢性肝病和肝臟移植的最主要原因。臨床流行病學的研究已急性 C 型肝炎病毒感染至少會有一半以上會變成慢性肝炎，其中 20% 左右會導致硬化，而肝硬化患者每年有 3-5% 會發生肝癌。在台灣，C 型肝炎亦相當普遍。過去的研究已顯示我國 B 型肝炎表面抗原陰性之慢性肝炎、肝硬化以及肝癌患者中約百分之七十與 C 型肝炎有關。C 型肝炎病毒感染後最顯著的特點是慢性率極高，可達 85%。慢性 C 型肝炎患者約有 20% 最後會演變成肝硬化，目前並無有效疫苗加以預防，故亦為我國民

重要之健康問題。

在治療方面，現今可使用干擾素(傳統型和長效型)和核酸類似物(如 lamivudine、adefovir 和 ribavirin)來控制慢性病毒性肝炎。這些特殊治療代表著控制慢性病毒性肝炎的長足進展。臨床研究指出約 20-40% 接受治療者，其肝炎可加以控制，甚至根除之。據此，許多醫師每天施行這些抗病毒療法。然而，這些治療本身會有顯著的副作用，而且非常昂貴(約 10 到 30 萬新台幣)。因為治療成效有限，費用昂貴，且帶來顯著的副作用，臨床醫師殷切盼望能了解那些病患對治療反應較好，據此便能依個人差異而施予合適的抗病毒藥物。因此，研究慢性病毒性肝炎的決定因子是需要而且重要的。

本計劃中，我們將探索和**研究病毒性肝炎的最中心課題**，決定感染者長期預後的因子，和決定目前內科療法成效的因子。

**方法：**病毒性肝炎事實上是宿主和病毒交互作用的產物。他們的作用部分是經由影響自然病史和治療反應的個別基因體所勾勒。因此，我們計劃藉由病毒基因體分析來確認這些病毒因子。此等研究需要收納一大群已證實有慢性 B 型和 C 型肝炎的患者，包括已接受或未接受抗病毒治療者，且其追蹤期需長達 10 到 30 年。如此確定且清楚的臨床表現型是必須的。其次，一個良好保存的帶原者收錄時血清庫對廣泛的病毒基因體分析而言是絕對需要的。最後，計畫應能採納和應用先進的基因技術，能有效快速且大量地研究這些基因體的變異。現有證據大多來自醫院，取樣有誤差，可能無法反映在一般社區慢性病毒性肝炎患者；另一方面，可收錄人數有限，治療後追蹤期間也不夠長或常失去追蹤，而無法確定病毒基因體變異對自然病程的影響以及對抗病毒治療的長期療效。本研究之目的即在於建立完整資料庫，並評估探討各種病毒因子對患者自然預後之影響，對患者

治療反應之影響，以及若接受治療這些抗病毒藥物治療對患者長期預後之影響。

我們與台大公共衛生學院陳建仁教授合作，利用社區 B 型及 C 型肝炎患者長期追蹤之基本資料、檢驗值等數據，以及收納病患時所收集之血清加以分析各種病毒因子。同時，我們透過與疾病管制局楊志元博士和林思鳳研究員合作，蒐集參與「全民健康保險加強慢性 B 型及 C 型肝炎治療試辦計畫」之醫療院所提供符合該計畫所涵蓋之適應症範圍個案之治療前、治療中、治療結束時與治療結束後六個月之血清（妥善保存於 $-80^{\circ}\text{C}$ ），進行各種病毒因子包括基因型、病毒量、核前區 A1896 與基底核驅動子區段 T1762/A1764 等分析，結合登錄於衛生署疾病管制局「全民健康保險加強慢性 B 型及 C 型肝炎治療試辦計畫個案通報及登錄系統」之病人基本資料、治療方式與檢驗數值等資料，共同進行短期治療效果之評估。

**初步成果：**經與台大公共衛生學院陳建仁教授合作之下，我們已經順利取得收納病患時所收集之血清，包括 3,644 位 HBsAg 帶原者和 500 位 anti-HCV 陽性患者。至 95 年 10 月為止，我們已經順利完成 3,644 位 B 型肝炎帶原者和 300 位 C 型肝炎帶原者的各種病毒因子資料分析。治療族群方面，我們已收集 693 名有治療前後一系列血清檢體之慢性 B 型肝炎患者及 1,575 名慢性 C 型肝炎患者之血清檢體，正陸續完成病毒學相關檢驗及核酸定序分型分析中。

**預期成果：**本計畫預期建立完整 B 型及 C 型肝炎病毒之流病資料庫，瞭解各種病毒因子對患者自然預後和治療反應之影響。在未來則將希望透過與衛生署國民健康局死亡及癌症登錄系統之連線，了解這些病毒因子及抗病毒藥物治療對患者長期預後之影響。

**English Abstract:**

**Key word:** hepatitis B, hepatitis C, prognosis, interferon, nucleoside analogue, viral factors, genomics

**Background and Aims:** Chronic viral hepatitis is an important health problem in Taiwan. Chronic hepatitis B virus infection is the main cause. Among the hepatitis B carriers, about 60% patients remain healthy and asymptomatic, even to the end of their life. In contrast, some of the other carriers developed bouts of hepatitis activity, progressed to liver cirrhosis at different speed, and eventually some into liver cancer or other end-stage liver diseases. To effectively control this virus infection, a mass vaccination program was launched since 1984. Till now, the HBsAg carriage rate in children and adolescents drops dramatically. However, there are still around 3 million HBV carriers at risk of progression into advanced liver disease in Taiwan and waiting to be treated. Chronic hepatitis C virus infection is the second most common cause of chronic liver disease in Taiwan. For hepatitis C infection, around 20-30 % completely recovers from acute infection but around 70%~80% become persistently infected. Among the chronic infected patients, 20-30% is at risk of progression into end-stage liver diseases and liver cancer. Unfortunately, effective prophylactic vaccine is still not available.

For hepatitis B and C treatment, there are now interferon (conventional and pegylated) and nucleoside analogs (lamivudine, ribavirin and adefovir). These specific treatments represent a great advancement in treating chronic hepatitis patients. Clinical studies have indicated that around 20-65% of the treated patients respond and their hepatitis is either controlled or even eradicated. Accordingly, many physicians practice these antiviral therapies almost daily. However, these treatments carry significant side effects and also very expensive.

Because of the expensive cost and significant side effects, physicians are

eager to know which patients will have progressive liver diseases and should be treated, which patients are likely to be responsive so the treatment can be individualized, and what are the long-term outcomes in those patients who receive anti-viral therapy. Although previous studies clearly demonstrated that in those who successfully controlled or eradicated the virus, the risk of progression into liver cirrhosis or developing hepatocellular carcinoma decreased, the data were mostly derived from clinical trials. Whether similar benefit could be obtained in the general chronic viral hepatitis patients remain to be examined. From another aspect, the case number studied and follow-up period was still limited.

The clinical outcomes of chronic viral hepatitis are partly determined by the interplay between host and virus genomes. In this study, we try to examine the viral factors by viral genomic and load analysis. To achieve this goal, a large population of chronic viral hepatitis patients with clear clinical phenotypes and a well preserved serum bank is needed.

**Methods:** As for the community population, in corporation with Prof. Chien-Jen Chen, who is in charge of a large community cohort (including 3644 HBV carrier and 500 anti-HCV carrier) for more than 10 years with clear clinical information and well collected serum samples at enrollment, we tested these viral factors in the enrolled subjects with chronic hepatitis B or C. We further correlated these viral factors with their clinical manifestations after long-term follow-up. As for the hospital-based population, taking advantage of the reimbursement program from the Bureau of National Health Insurance to treat chronic hepatitis B and C, we investigated the treatment efficacy and long-term benefit in the proposal. The number of patients under or completing treatment was 10,394 for chronic hepatitis B and 6,034 for chronic hepatitis C at the end of March 2006. Based on this large population, we tried to clarify which patients and which virus genotypes are likely to be responsive. In the future, through

linking to the cancer and mortality registry data bank in the Department of Health every 5 years, we will study the long-term impact of antiviral therapy on the development of hepatocellular carcinoma and on the reduction of liver-related death in Taiwan.

***Preliminary and anticipated results:*** At present (Oct. 2006), we have already finished the virologic analysis in 3,644 subjects with chronic HBV infection and 300 subjects with chronic HCV infection. In the two months, we will continue to test for all these viral factors in the remaining 200 subjects with chronic HCV infection. The relevant work in the treated population will be accomplished in cooperation with co-PI Dr. Yang JY in CDC. In the near future, we will develop a viral genomic bank data in both community cohort without any intervention and hospital-based cohort who received antiviral therapy. These data will help clarifying the role of viral genomic factors in the pathogenesis and treatment outcomes of chronic hepatitis B and C.



## 一、前言

慢性肝炎危害國民健康眾所皆知。台灣地區之慢性肝炎主要經由肝炎病毒感染所造成。過去研究已知台灣病毒性肝炎之主要致病原為 B 型肝炎病毒[3,18]。因此行政院於民國七十年八月核定『加強 B 型肝炎防治計畫』，其中包括新生兒全面預防注射 B 型肝炎疫苗。我國 B 型肝炎防治自民國 71 年起推展，其中高危險群新生兒之預防注射於民國 73 年展開，而於 75 年擴展至全部新生兒，對我國肝炎防治已獲得很大的正面效果，本研究小組先前曾調查其演變，由中正區小兒之帶原率自 1984 年之 10% 降至 1999 年之 0.7% 即顯而易見。然而仍約有 6% 因未能接種疫苗或接種無效而可能變為慢性帶原者，再加上原有約 260 萬的 B 型肝炎帶原者，故往後數十年間，慢性 B 型肝炎病毒感染之後遺症如肝硬化和肝細胞癌仍舊是國人健康的大敵。然而並非每一個人皆會演變成慢性肝炎、肝硬化和肝細胞癌。過去研究指出在自然病程中約 30-40% 帶原者會演變成慢性肝炎，每年約 2% 慢性 B 型肝炎患者會演變成肝硬化，每年約 3-10% 肝硬化患者會得到肝細胞癌。即使肝功能正常的不活動 B 型肝炎帶原者每年仍有約 0.1% 會得到肝細胞癌。C 型肝炎病毒感染亦是一個全球性的健康課題，據世界衛生組織評估，全世界約有 1 億 7 千萬人為 C 型肝炎病毒帶原者，C 型肝炎病毒感染在歐美國家遠較 B 型肝炎病毒感染來得重要，是其慢性肝病和肝臟移植的最主要原因。臨床流行病學的研究已急性 C 型肝炎病毒感染至少會有一半以上會變成慢性肝炎，其中 20% 左右會導致硬化，而肝硬化患者每年有 3-5% 會發生肝癌。在台灣，C 型肝炎亦相當普遍。過去的研究已顯示我國 B 型肝炎表面抗原陰性之慢性肝炎、肝硬化以及肝癌患者中約百分之七十與 C 型肝炎有關。C 型肝炎病毒感染後最顯著的特點是慢性率極高，可達 85%。慢性 C 型肝炎患者約有 20% 最後會演變成肝硬化，目前並無有效疫苗加以

預防，故亦為我國民重要之健康問題。

而在治療方面，臨床試驗證實現有抗病毒治療能有效控制或根除 20 到 65%慢性肝炎患者之病毒、減少肝細胞發炎壞死[11,12,13,26,34,37,38,52]。初步臨床觀察也支持經抗病毒治療者，尤其是達到良好療效者，可減緩或避免肝纖維化惡化、減少肝代償不全、肝硬化及肝細胞癌的發生，甚至於能延長患者的壽命。慢性 B 型肝炎的持續存在，乃肇因於宿主免疫系統無法將被感染的肝細胞完全清除，而 B 型肝炎病毒可以以 ccc 型 DNA 潛藏於肝細胞核中，半生期長，更是成為往後新 HBV 複製的模板。因此，治療 B 型肝炎的主要短期目標是抑制病毒，降低感染力，使病毒複製的標記，如 e 抗原和血清 HBV DNA，持續消失，血清 GOT、GPT 值恢復正常，並使肝組織發炎改善。干擾素可抗病毒及調節免疫能力，是早期經核准用來治療慢性 B 型肝炎的藥物，惟其缺點在於（1）治療效果仍不盡理想，（2）大多數肝硬化患者、器官移植接受者、和化學治療接受者不宜接受干擾素治療，（3）e 抗原陰性的 B 型肝炎患者，治療後復發率高，（4）治療費用昂貴以及在療程中有副作用。優點則是治療期間明確，治療成功者復發率低且無抗藥性的問題。干安能 (lamivudine) 學名為 2'-deoxy-3'-thiacytidine，俗名為 3-TC，是一種核酸類似物 (nucleoside analogue)，可有效抑制 HBV 的聚合酵素，使新的 HBV DNA 不會再製造。相較於干擾素，lamivudine 治療具有簡易口服、副作用極少等優點，尤其是針對器官移植及化學治療患者，B 型肝炎復發的預防或治療有不錯的效果。但最需注意的是治療對象的選擇和開始治療的適當時機。對 AST、ALT 值完全正常或稍微升高的患者，不建議接受此藥治療，以減少突變種的發生。而 AST、ALT 值超過正常值 5 倍以上的患者，亦應先採取觀察的策略，但若因急性發作過於厲害而導致肝功能代償失調，則應趁早接受 lamivudine 治療。其缺點則是治

療期較不明確、出現抗藥突變種、以及停藥後復發的問題。目前，在台灣這兩種藥物已正式上市用來治療 B 型肝炎並納入試辦計畫中。此二者雖無法完全根除病毒，但對某些人(20 到 65%)而言確實可以有效抑制病毒複製並使肝臟發炎狀態改善，但是否因此便可減少或延緩肝硬化及肝細胞癌的發生，則有待長期追蹤。最近，有初步資料支持干擾素和干安能治療的中期療效。長庚醫院林等追蹤 67 位接受干擾素治療和 34 位未接受治療的患者長達 12 年，結果發現接受干擾素治療者發生肝細胞癌較少 (1.5%比 12%)，存活率較高[Lin SM et al, 1999]。另一希臘研究同樣指出追蹤 209 位接受干擾素治療和 195 位未接受治療的患者平均達 6 年，結果發現接受干擾素治療者發生存活率較高 [ $P=0.048$ ; Papatheodoridis GV et al, 2001]。長庚醫院廖運範教授最近代表 9 個亞太國家或地區、41 個醫院報告以干安能治療 B 型肝炎相關肝硬化的臨床試驗結果，發現經平均 32 個月的治療，與未接受治療者相比之下，肝代償不全 (8%比 18%) 及肝細胞癌發生 (4%比 7%) 的比率較低。但這些證據仍舊不足、且追蹤期間不夠長。

在慢性 C 型肝炎治療方面，目前被認可用來治療的方式為干擾素合併抗病毒藥物 ribavirin 組合療法，其中干擾素有短效的干擾素(3 百萬單位皮下注射每週三劑)，也有長效型干擾素(每週皮下注射)，而 ribavirin 依病人體重每日口服 800-1200mg (至少 10.6 mg/kg)。由過去的臨床使用經驗已經知道大約有 40-60%的慢性 C 型肝炎患者對干擾素合併 ribavirin 的治療可以達到清除 C 型肝炎病毒的目的。現在比較明瞭的是病毒基因型非第一型和治療前病毒濃度較低(即 $<80$  萬 IU/ml)者，對於干擾素或干擾素合併 ribavirin 治療之病毒持久反應(SVR)較佳。長效干擾素合併 ribavirin 的療法進一步提升單一 C 型肝炎患者的病毒廓清率。計多研究指出 C 型肝炎病毒廓清率約六成至七成，對不易治療的第一型 C 型肝炎病毒，其廓清率也可增高至四

成。國內國內五大醫學中心聯合完成以干擾素合併抗病毒藥物 ribavirin 組合療法治療慢性 C 型肝炎的臨床試驗，同樣證實針對基因型非第一型 C 型肝炎病毒，以短效干擾素合併 ribavirin 可達九成以上的病毒廓清率，而針對基因型第一型 C 型肝炎病毒，以六個月長效干擾素合併 ribavirin 仍可達七成的病毒廓清率。最近國內外研究更初步支持干擾素治療的中期療效。日本研究指出經干擾素單一治療之患者與未接受治療者相比之下，經平均 5 年追蹤，發生肝細胞癌較少，存活率較高；有病毒持久反應者，此療效更為顯著。台大楊等同樣發現經干擾素治療之患者與未接受治療者相比之下，經平均 8 年追蹤，發生肝細胞癌較少，存活率較高；有病毒持久反應者，此療效更為顯著。更重要的是我們發現接受干擾素合併 ribavirin 治療與接受干擾素單一治療相比之下，可更進一步減少肝細胞癌的發生(詳見附表)。同樣地，這些證據仍舊不足、且追蹤期間不夠長。

#### **慢性 B 型和 C 型肝炎長期自然病程以及治療療效亟待解決之問題：**

如前所述，約 30-40% 患者慢性 B 型肝炎會惡化。抗病毒治療僅對 20-65% 慢性 B 型肝炎患者，可以達到理想的療效。由於治療費用昂貴且副作用多，我們亟需釐清那些患者會惡化而需要接受治療，針對需要接受治療患者則需找到與治療反應有相關的病毒決定因子。類似情形也發生在慢性 C 型肝炎患者身上。由臨床流行病學的研究已知急性 C 型肝炎病毒感染至少會有 60% 以上會變成慢性肝炎，其中 20% 左右會導致肝硬化，而肝硬化患者每年有 3-5% 會發生肝細胞癌。

#### **病毒因子：基因型、病毒量、核前區 A1896、基底核驅動子區段 T1762/A1764**

**慢性 B 型肝炎** 不同人種常見疾病以及對藥物治療反應並不相同。有趣地是，不同 B 型肝炎病毒變異株與慢性肝炎自然演變過程和對抗病毒療效也有很大不同[4,8,14,19,20-23,36,42,43,46-48,50,56]。在病毒演化的過程

中，基因體的變化日積月累，病毒基因分型的觀念於焉產生。依 B 型肝炎病毒基因體全長核酸序列的異質性可區分出不同的基因型，目前已有 8 種 B 型肝炎病毒基因型被鑑別出來，分別為基因型 A~H。基因型 B 和 C 大多分佈在 B 型肝炎盛行的亞洲。我們曾鑑別 100 例 B 型肝炎無症狀帶原者和 170 例慢性肝炎和肝細胞癌患者之 B 型肝炎病毒基因型，發現台灣以基因型 B 和 C 最為常見。與年齡相配對的無症狀帶原者相較之下，基因型 C 在肝硬化和年齡大於 50 歲的肝細胞癌患者較為盛行，而年齡小於 35 歲的非肝硬化肝細胞癌患者則以基因型 B 感染較多。後續來自中國、日本和西方國家之報告也證實 B 型肝炎病毒基因型與臨床病程和預後有關。而由干擾素或 lamivudine 治療慢性 B 型肝炎的反應上來看，病毒基因型也與療效有關。我們曾分析接受干擾素治療的慢性 B 型肝炎患者，發現治療成功者中，基因型 B 佔 76%，基因型 C 佔 24%，而治療失敗者中，基因型 B 佔了 46%，基因型 C 則佔 54%，因此可見 B 型肝炎病毒基因型 C 對干擾素的治療反應較差。就 lamivudine 治療慢性 B 型肝炎的療效而言，我們亦發現基因型 B 感染者有較高的持久反應率(B 型肝炎 e 抗原消失和肝功能正常)和較低的抗藥性突變率。由於目前的資料多顯示不同的 B 型肝炎病毒基因型確有不同的臨床和病毒學特性，如致病力或對抗病毒藥物的治療反應等。但未來則需要大規模的前瞻性研究以及和國外不同 B 型肝炎病毒基因型的對照研究來加以驗證 B 型肝炎病毒基因型的生物學特性和臨床意義。

除了上述病毒基因型以外，病毒量、病毒基因體變異在肝病進展、肝細胞癌發生、發生 B 型肝炎急性發作和抗病毒療效如 lamivudine 療效的影響也曾被探討[1,2,6,9,15,23-25,27-33,35,36,40,41-44,47-49,51,53,56-58]。過去許多研究指出核前區 1896A 變異與肝病進展有關。我們進一步發現 B 型肝炎病毒基因體基底核驅動子區段 1762T/1764A 變異與肝細胞癌發生有關。

此外，國人曾探討病毒 e 抗原和病毒量變動對疾病病程的影響，結果發現 e 抗原陽性患者在長達 10 年追蹤過程中，產生肝細胞癌的機率比 B 型肝炎非帶原者高 60 倍[53]。至於發生 B 型肝炎急性發作的患者，在追蹤過程中 B 型肝炎病毒量的增加而非病毒基因體的變異與急性發作有較密切的關聯[30]。到底那一個或那些病毒因子對肝病進展的影響最大？影響的先後順序為何？可否利用這些因子在不同肝病階段來預測患者的預後則是亟待釐清的課題。

**慢性 C 型肝炎** 在自然病程方面，C 型肝炎病毒感染後最顯著的特點是慢性率極高，可達 85%。慢性 C 型肝炎患者約有 20% 最後會演變成肝硬化，目前並無有效疫苗加以預防，故亦為我國民重要之健康問題。會影響長期預後的因子目前仍不明確，在病毒因子方面已知與基因型有關，其他資料仍未明瞭。

而除了病毒基因型、病毒量和治療方式以外，有文獻指出病毒基因體中干擾素敏感性決定區段 (Interferon sensitivity determining region, ISDR; E2 and NS5A region of HCV genome) 變異也與抗病毒療效有關。這些病毒因子與療效和自然病程的相關性有待大規模臨床流行病學及病毒基因庫來加以釐清。未來，若有其他病毒因子被報告與疾病進展或治療反應有關，我們也將加以分析。

### 慢性 C 型肝炎患者與肝細胞癌發生相關的因子：多變數迴歸分析

Parameter	Factors	Hazard Ratio (95% C.I.)	p value
<b>According to different therapy regimen</b>			
Age (yr)	50	1	0.041
	>50	2.94 (1.05, 8.26)	
Fibrosis	F0, F1	1	0.044
	F2, F3	3.25 (1.04, 10.23)	
Genotype	1	1	

	2	0.58 (0.21, 1.61)	NS
Therapy regimen	No treatment	1	
	IFN monotherapy	0.88 (0.27, 2.88)	NS
	IFN + RBV*	0.26 (0.07, 0.94)	0.04

#### According to different therapy response

Age (yr)	50	1	
	>50	2.90 (1.03, 8.12)	0.043
Fibrosis	F0, F1	1	
	F2, F3	3.13 (1.00, 9.75)	0.049
Genotype	1	1	
	2	0.69 (0.24, 1.92)	NS
Therapy response	No treatment	1	
	Therapy not responsive	0.87 (0.29, 2.63)	NS
	Therapy responsive**	0.19 (0.04, 0.88)	0.034

### 過去相關研究的問題所在

但這些證據大多來自醫院，取樣有誤差，可能無法反映在一般社區慢性病毒性肝炎患者；另一方面，可收錄人數有限，治療後追蹤期間也不夠長或常失去追蹤，而無法確定病毒基因體變異對自然病程的影響以及對抗病毒治療的長期療效。

在治療方面，抗病毒治療對 20-65% 慢性病毒性肝炎患者而言，的確可以達到理想的療效。但這些臨床試驗的結果是否可外推至一般慢性病毒性肝炎患者則需要進一步加以證實。當中關鍵的不同點在於接受臨床試驗的患者常需符合嚴格的臨床、病毒學、和組織學篩選條件，相對一般慢性病毒性肝炎患者而言，這些條件的歧異性則非常地大，因此，臨床上經抗病毒治療可以觀察到的療效也可能不同。另一方面，接受臨床試驗的患者的數目有限，少見的副作用可能不會在臨床試驗中被發現。因此，抗病毒治療的真正療效及少見副作用常需在藥物上市後進行大規模監測才能釐清。此外，欲釐清抗病毒治療後長期的療效，大規模自開始治療時便長期

追蹤這些慢性病毒性肝炎患者是絕對需要的。欲達到此一目的的困難處在於單一醫療院所能收錄醫治此等患者的容量有限，陸續病患接受治療時距很大，且患者在完成治療後常失去追蹤，無法探究長期預後。

欲釐清這些議題，大規模長期追蹤這些慢性 B 型及 C 型肝炎患者，有清楚臨床病程，其次有一個良好保存的帶原者收錄時血清庫對廣泛的病毒基因體分析而言是絕對需要的。

### 研究策略

本研究之目的即在於評估探討各種病毒因子對患者長期預後以及治療反應之影響。為達此目的，我們與台大公共衛生學院陳建仁教授合作，利用社區 B 型及 C 型肝炎患者長期追蹤之基本資料、檢驗值等數據，以及收納病患時所收集之血清加以分析。此社區追蹤族群之特色在於涵蓋不同都市發展程度的地區，以維持樣本的代表性；人口穩定而遷移率低，便於確診及篩檢之追蹤。平均追蹤已長達 10 年，可以觀察到肝細胞癌的個案發生。最重要地，這些接受追蹤的族群在一開始收錄時便已保存血清，方便進行病毒基因體變異的分析。

本計畫也直接利用登錄於疾病管制局「全民健康保險加強慢性 B 型及 C 型肝炎治療試辦計畫個案通報及登錄系統」病人之基本資料、治療方式、檢驗值等數據或其他可收集到之相關資料，以及直接利用疾病管制局所收集保存於參與試辦計畫醫事機構內之病患治療前、治療結束時和治療結束後 6 個月之血清，進行短期治療效果之評估。

本計畫同時希望建立完整資料庫，在未來透過與衛生署國民健康局死亡及癌症登錄系統之連線，了解這些抗病毒治療對患者長期預後之影響，以及各種病毒因子對患者長期自然預後和治療反應之影響。



## 二、材料與方法

### 收集研究族群

#### 社區族群

本研究的目的是在於評估探討各種病毒因子對患者長期預後之影響。為達此目的，我們將與台大公共衛生學院陳建仁教授合作，利用社區 B 型和 C 型肝炎患者長期追蹤之基本資料、檢驗值等數據，以及收納病患時所收集之血清。該社區追蹤研究選取台北縣三芝鄉、新竹縣竹東鎮、嘉義縣朴子市、屏東縣高樹鄉、澎湖縣馬公市、湖西鄉和白沙鄉等七鄉鎮市做為研究地區。該研究地區之選取乃根據下列條件：1 )涵蓋不同都市發展程度的地區，以維持樣本的代表性；2 )研究地區有績效優良的省立醫院或衛生所，以配合篩檢工作之進行；3 )社區民眾合作意願高，預期會踴躍參加篩檢；4 )人口穩定而遷移率低，便於確診及篩檢之追蹤。

最後在 1991 至 1992 年間，約有 11900 位 30 至 65 歲的男性和 12000 位 30 至 65 歲的女性被邀請並同意參加本研究。每一位參加者在填寫同意書後，隨即進行問卷、抽血以及各種血清和生化學檢驗。本研究進行追蹤至 2000 年 9 月為止。

之後，該研究利用國家癌症檔和死亡檔找出追蹤期間發生肝細胞癌的個案。診斷肝細胞癌的方便包括肝功能檢驗、胎兒蛋白、腹部超音波檢查、影像學檢查或切片病理檢查。

針對肝細胞癌的個案，我們以個案對照配對方式探討病毒因子與肝細胞癌發生的相關性。

#### 治療族群

本計畫直接利用登錄於疾病管制局「全民健康保險加強慢性 B 型及 C 型肝炎治療試辦計畫個案通報及登錄系統」病人之基本資料、治療方式、

檢驗值等數據或其他可收集到之相關資料，以及直接利用疾病管制局所收集保存於參與試辦計畫醫事機構內之病患治療前、治療結束時和治療結束後 6 個月之血清，進行短期治療效果之評估。此部分工作主要透過與疾病管制局楊志元博士和林思鳳研究員合作完成。

## 研究方法

針對這些慢性 B 型肝炎患者，我們收集基本資料及血清，以進行病毒學相關檢驗。我們在社區追蹤族群進行 3,644 名慢性 B 型肝炎患者及 500 名慢性 C 型肝炎患者之病毒學相關檢驗及核酸定序分型分析。本年計畫中我們預計在接受抗病毒治療族群進行 300 名慢性 B 型肝炎患者及 300 名慢性 C 型肝炎患者之病毒學相關檢驗及核酸定序分型分析。

### 社區族群

#### 慢性 B 型肝炎：

- a. HBV DNA 定性反應
- b. HBV DNA 病毒定量反應
- c. HBV 基因型 (包括基因型 B 型和基因型 C 型)
- d. 核前區 A1896 和基底核驅動子區段 T1762/A1764

#### 慢性 C 型肝炎：

- a. HCV RNA 定性反應
- b. HCV RNA 病毒定量反應
- c. HCV 基因型 (主要分為第一型和非第一型)

### 治療族群

#### B 型肝炎治療族群：

- a. HBV DNA 定性反應：治療前
- b. HBV DNA 病毒量：治療前、治療結束時、治療結束後 6 個月

- c. HBV 基因型 (基因型 B 型和基因型 C 型)：治療前。
- d. 核前區 A1896 和基底核驅動子區段 T1762/A1764: 治療前。

#### **C 型肝炎治療族群：**

- a. HCV RNA 定性反應：治療前、治療結束時、治療結束後 6 個月
- b. HCV RNA 定量反應：治療前、治療結束時、治療結束後 6 個月
- c. HCV 基因型(第一型和非第一型)：治療前。
- d. ISDR (interferon sensitivity-determining region)：治療前。

#### **分析方法：**

##### **HBV 相關檢驗：**

血清肝炎病毒標記(HBeAg、anti-HBe)：利用已上市套組進行測試。

HBV DNA 定量以及定型反應：採即時 (real-time) PCR assay，可同時定量和定型。

##### ➤ 第一組反應引子和探針：

◇ 反應引子：nucleotide (nt)1232-1251 和 nt1599-1581，產物：polymerase 片段，368 bp

◇ Anchor 探針引子：nt1436-1455

◇ Sensor 探針引子：nt1414-1434

##### ➤ 第二組反應引子和探針：

◇ 反應引子：nt1261-1279 和 nt1600-1580，產物：polymerase 片段，340 bp

◇ Anchor 探針引子：nt1552-1576

◇ Sensor 探針引子：nt1533-1550

##### ➤ 即時 PCR 反應條件：

Reagent Formulation	Thermal Cycling Profile
0.3mcM each of the probes	45°C, 30 min
2 mM magnesium chloride	95°C, 3 min
500 nM each primer	10 cycles of
1 mcl FastStart DNA Master Hybridization Mixture ( <i>Taq</i> DNA polymerase, PCR reaction buffer, 10 mM magnesium chloride, and dNTP mixture	95°C, 10 sec; 60°C, 10 sec (decrease by 1°C per cycle); 72°C, 30 sec
2 mcl DNA	40 cycles of
10 mcl total volume	95°C, 10 sec; 56°C, 10 sec; 72°C, 30 sec

a. HBV DNA 定量：加入已知濃度的 HBV 檢體，我們劃出標準曲線，藉此進一步推算出每一檢體的 HBV 濃度。本方法能可靠地偵測及定量 100 copies/mL 以上的血清病毒濃度 [55]。

b. HBV 基因型定型：藉此即時 PCR 反應，我們亦可區分 HBV 基因型，其原理在於利用不同基因型 HBV 位於 sensor 探針引子上的核酸序列差異，分別設計出專一於基因型 B 和基因型 C 的 sensor 探針引子，此一差異會反應在熔解溫度(melting temperature)上，最後由分析熔解曲線尖峰出現的時間便可區分出 HBV 基因型 B 和基因型 C。

c. 即時 PCR 機器：Roche LightCycler

**核前區 A1896、基底核驅動子區段 T1762/A1764：**

實驗方法：

100 mcL 病人血清將用來利用自動化 DNA 萃取機器 (MagNA Pure LC, Roche Diagnostics Applied Science, Germany) 進行 DNA 萃取，最後溶於 50 mcL 之洗出液 (elution buffer) 中。

取 4 mcL 萃取之 DNA 溶液，利用螢光染劑標定之雜交引子

(fluorescence labeled hybridization probes) 所產生之螢光共振能量傳遞 FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 的原理來進行單一反應定量及基因型之檢測方法，針對檢體進行 HBV 病毒之即時定量 PCR 反應，之後利用 PCR 結束之產物所進行之溶化曲線分析所顯現之特定溶化溫度來區分不同之病毒基因型。

為偵測 HBV 病毒之特定基因體變異，包括 basal core promoter T1762/A1764 及 precore stop codon A1896，我們將進行 PCR 及直接基因體定序分析。自涵蓋此三個位點之病毒基因體片段之外側序列選擇適合之配對引子 (primer set)，進行 PCR 增殖反應。之後針對增殖之基因體片段進行定序分析。

#### **HCV 相關檢驗：**

治療族群 HCV RNA 定量定性利用已上市通過國際(CE 或 FDA)核准認證之分子診斷試劑。

HCV RNA 定量以及決定 HCV 基因型：將採即時 PCR 法加以定量和定型。已設計合適 anchor 和 sensor 探針引子，正積極開發中。

HCV RNA 定性反應：將採我們過去常採用的巢式 PCR 法，其偵測下限為 100 copies/mL，方法請參考已發表文獻 [16,26]。

HCV ISDR 定序反應：將採我們過去常採用的 PCR 法以及後續直接定序法，方法請參考已發表文獻 [54]。

**倫理規範：**所有人體檢體包括血清之收集及測試，皆在取得收錄受試者同意書後進行。本計畫已送醫院倫理委員會審核。

### 三、重要研究結果

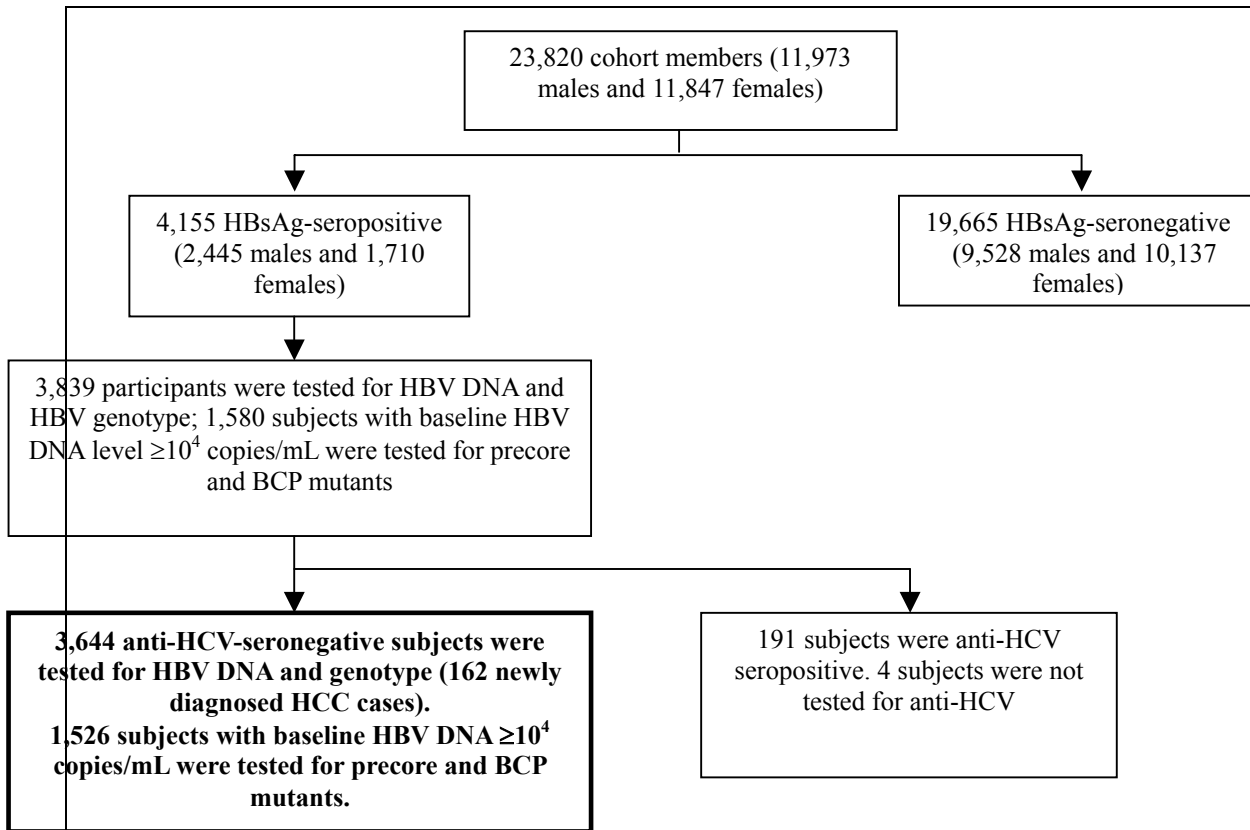
#### 社區族群

與台大公共衛生學院陳建仁教授及楊懷一博士合作下，我們已順利取得收納病患時所收集之血清。包括 3,644 位 HBsAg 帶原者和 500 位 anti-HCV 陽性患者(見下圖一)。目前已完成 3,644 位 anti-HCV 陰性之 B 型肝炎帶原者和 300 位 anti-HCV 帶原者的各種病毒因子資料分析。

我們發現在此長期追蹤之 HBsAg 帶原者社區族群，近一半感染 HBV genotype B，四分之一感染 genotype C (見下表一)。在病毒濃度 $\geq 10^4$  copies/mL 之族群中，核前區突變率為 47%，核心驅動子突變率為 29% (見下表二)。

在病毒濃度 $\geq 10^4$  copies/mL 之族群中，我們發現 HBV genotype C 和 BCP A1762T/G1764A 突變是發生肝細胞癌的獨立危險因子，然而核前區 G1896A 突變之存在卻是對發生肝細胞癌有保護作用(見下表三及表四)。

同樣在病毒濃度 $\geq 10^4$  copies/mL 之族群中，BCP A1762T/G1764A 突變對發生肝細胞癌的影響在 HBeAg 陽性，病毒濃度 $\geq 10^7$  copies/mL，和 genotype C 感染等次族群最明顯(見下表五)。相對地，基因型和核前區 G1896A 突變對發生肝細胞癌的影響，在 HBeAg 陰性和病毒濃度 $< 10^7$  copies/mL 之次族群最明顯。女性帶原者感染基因型 C 比基因型 B 有顯著異常增加肝細胞癌發生之危險 (見下表六)。



**Figure 1. Flow of participants in the study on genotype and mutants of HBV and risk of HCC**

前兩年計畫實施之初步成果如下：

表一：3,644 個社區族群 B 型肝炎帶原者的各種臨床和病毒學資料

**Basic Characteristics of Study Cohort (N=3644)**

<b>Variables</b>	<b>No. (%)</b>	<b>Variables</b>	<b>No. (%)</b>
Gender		HBeAg	
Female	1465 (40)	Negative	3094 (85)
Male	2179 (60)	Positive	550 (15)
Age		HBV DNA, copies/mL	
30-39	1217 (33)	<100 (Undetectable)	882 (24)
40-49	1016 (28)	100-9999	1013 (28)
50-59	1049 (29)	10000-99999	746 (21)
60-65	362 (10)	100000-999999	380 (10)
Cigarette smoking*		≥10 <sup>6</sup>	623 (17)
No	2457 (68)	Liver cirrhosis at entry	
Yes	1184 (32)	No	3573 (98)
Alcohol consumption**		Yes	71 ( 2)
No	3206 (88)	Genotype	
Yes	431 (12)	B	1773 (49)
ALT, U/L		B+C	100 ( 3)
<45	3435 (94)	C	889 (24)
≥45	209 ( 6)	DNA undetectable	882 (24)

\*Data not available for 3 participants.  
\*\*Data not available for 7 participants.



**表二：1,526 個 HBV DNA  $\geq 10^4$  copies/mL 之社區族群 B 型肝炎帶原者的核前區 1896 及核心驅動子 1762/1764 病毒學資料**

Mutants	No. (%)
Precore (1896)	
G (Wild-type)	641 (42.0)
A (typical mutant)	717 (47.0)
G+A (Mixed type)	168 (11.0)
BCP (1762/1764)*	
A/G (Wild-type)	876 (57.4)
T/A (Typical mutant)	436 (28.6)
H/A	6 (0.4)
H/H	82 (5.4)
A/A	27 (1.8)
A/H	11 (0.7)
A/T	1 (0.1)
H/G	3 (0.2)
G/A	2 (0.2)
T/G	2 (0.1)
H/C	1 (0.1)
G/H	1 (0.1)
D/D	78 (5.1)

\* H: Both wild type and typical mutants were detectable; D: Deletion; categories other than wild-type and typical mutant were classed as mixed-type.

表三：B 型肝炎帶原者的各種病毒學因子與肝細胞癌發生的相關性

**Incidence Rate and Adjusted Hazard Ratio of HCC for HBV Genotype and Mutants**

	No. of cohort members	Person-years of follow-up	No. of HCC cases	Incidence rate (per 100,000 person-years)	Adjusted hazard ratio* (95% CI)
<b>HBV genotype</b>					
B	1773	21921.9	67	305.6	1.0 (Referent)
B+C	100	1235.0	2	161.9	0.6 (0.2-2.6)
C	889	10689.7	84	785.8	2.7 (1.9-3.7)†
<b>Among subjects with HBV DNA <math>\geq 10^5</math> copies/mL (N=984)</b>					
<b>Precore mutant</b>					
Wild type	489	5819.6	58	996.6	1.0 (Referent)
G1896A	364	4445.7	19	427.4	0.3 (0.2-0.5)†
Mixed type	131	1468.9	24	1633.9	1.6 (0.9-2.6)
<b>BCP mutant</b>					
Wild type	522	6463.6	28	433.2	1.0 (Referent)
A1762T/G1764A	285	3177.0	51	1605.3	3.0 (1.9-4.9)†
Mixed type	177	2093.5	22	1050.9	2.1 (1.2-3.8)§

表四：與肝細胞癌發生相關危險因子之多變項分析與迴歸分析

Variable		Adjusted hazard ratio (95% CI)
Gender	Female	(Referent)
	Male	2.5 (1.6-4.0)†
Age, year	30-39	(Referent)
	40-49	4.4 (2.4-8.1)†
	50-59	6.6 (3.7-11.9)†
	≥60	9.0 (4.7-17.3)†
Cigarette smoking	No	(Referent)
	Yes	1.1 (0.8-1.6)
Alcohol consumption	No	(Referent)
	Yes	1.6 (1.1-2.4)§
ALT, U/L	<45	(Referent)
	≥45	1.2 (0.7-1.8)
Cirrhosis at entry	No	(Referent)
	Yes	7.9 (5.2-11.9)†
HBV DNA, copies/mL	100-<10 <sup>4</sup>	(Referent)
	10 <sup>4</sup>	1.8 (1.0-3.1)§
	10 <sup>5</sup>	3.5 (2.0-6.1)†
	≥10 <sup>6</sup>	5.0 (3.1-8.1)†
HBV genotype	B	(Referent)
	C	2.5 (1.8-3.5)†
	B+C	0.7 (0.2-2.9)

† P<0.001.

‡ P<0.01.

§ P<0.05.

表五：1,526 個 HBV DNA  $\geq 10^4$  copies/mL 之社區族群 B 型肝炎帶原者，病毒基因型、核前區 1896 及核心驅動子 1762/1764 與肝細胞癌發生相關危險因子之次族群分析

Variable		Genotype C vs. B	Precore mutant vs. wild type	BCP mutant vs. wild type
		Adjusted hazard ratio* (95% CI)		
Gender	Female	5.2 (1.8-14.5)‡	0.2 (0.1-0.7)§	2.6 (0.8-8.6)
	Male	1.5 (1.0-2.3)	0.3 (0.2-0.5)†	1.7 (1.0-2.7)§
Age, year	<50	2.2 (1.2-4.2)§	0.3 (0.2-0.7)‡	1.6 (0.8-3.2)
	$\geq 50$	1.7 (1.0-2.8)	0.2 (0.1-0.4)†	1.6 (0.9-3.0)
HBeAg	Negative	1.9 (1.1-3.4)§	0.3 (0.1-0.5)†	1.2 (0.6-2.1)
	Positive	1.3 (0.7-2.3)	1.0 (0.4-2.7)	3.0 (1.5-6.0)‡
HBV DNA, copies/mL	$<10^7$	2.5 (1.5-3.9)†	0.2 (0.1-0.4)†	1.3 (0.8-2.2)
	$\geq 10^7$	0.8 (0.4-1.6)	0.8 (0.3-2.1)	5.1 (2.3-11.7)†
Liver cirrhosis at entry	No	1.9 (1.2-3.0)‡	0.3 (0.2-0.5)†	1.6 (1.0-2.6)§
	Yes	1.5 (0.6-4.0)	0.4 (0.1-1.2)	1.6 (0.4-5.8)
Genotype	B	(Not included)	0.3 (0.1-0.5)†	1.5 (0.8-2.9)
	C		0.4 (0.2-0.8)§	2.3 (1.2-4.5)§
Precore	Wild-type	1.7 (1.0-2.9)§	(Not included)	1.9 (1.1-3.3)§
	G1896A	2.6 (1.0-6.7)		1.4 (0.5-3.6)
	Mixed	1.9 (0.8-4.6)		1.6 (0.6-4.7)
BCP	Wild type	1.3 (0.6-2.8)	0.2 (0.1-0.6)†	(Not included)
	A1762T/G1764A	1.8 (1.0-3.2)	0.3 (0.1-0.6)‡	
	Mixed	3.5 (1.2-9.5)§	0.3 (0.05-1.3)	

\* Adjustment for gender, age, HBV DNA, genotype, precore and BCP mutant except for the stratifying variables.

† P<0.001.

‡ P<0.01.

§ P<0.05.

表六：與肝細胞癌發生相關危險因子之多變項迴歸分析：依性別分析

	Female	Male
	Adjusted hazard ratio (95% CI)	Adjusted hazard ratio (95% CI)
Age in 1-year increment	1.14 (1.08-1.21) <sup>†</sup>	1.08 (1.05-1.10) <sup>†</sup>
Genotype		
B	(Referent)	(Referent)
C	4.1 (1.5-11.1) <sup>‡</sup>	1.4 (0.9-2.2)
B+C	0.0	0.4 (0.1-2.7)
Precore mutant		
Wild-type	(Referent)	(Referent)
G1896A	0.3 (0.1-0.9) <sup>§</sup>	0.3 (0.2-0.5) <sup>†</sup>
Mixed type	1.8 (0.6-5.9)	1.4 (0.8-2.3)
BCP mutant		
Wild-type	(Referent)	(Referent)
A1762T/G1764A	2.6 (0.8-8.5)	2.0 (1.3-3.2) <sup>‡</sup>
Mixed type	2.8 (0.7-10.5)	1.4 (0.8-2.5)

<sup>†</sup> P<0.001; <sup>‡</sup> P<0.01; <sup>§</sup> P<0.05.

表七：293 個社區族群 C 型肝炎帶原者的各種病毒因子資料

HCV RNA	
病毒量範圍(cpm)	患者數目
detectable	200 (68.3%)
undetectable	93 (31.7%)
10 <sup>5</sup>	144 (49.1%)
10 <sup>3</sup> - 10 <sup>5</sup>	52 (17.7%)
< 10 <sup>3</sup>	4 (1.4%)
Genotype	
1	111 (55.5%)
Non-1	89 (44.5%)

## 治療族群

截至 95 年 3 月為止，共有 10,394 位慢性 B 型個案及 6,034 位 C 型肝炎個案接受試辦計畫治療。目前針對已完成治療之個案，可完整收集治療前、治療結束時、以及治療結束後追蹤 6 個月時之血清者，慢性 B 型肝炎個案有 693 位，慢性 C 型肝炎個案有 1575 位。目前疾病管制局楊志元博士和林思鳳研究員正針對這些個案進行分析中。

在未來第三年計畫中，我們將繼續收集治療族群之基本資料、檢驗值等數據及血清檢體，建立資料庫及血清庫。並計畫繼續完成治療族群 300 名慢性 B 型肝炎患者(有治療前後一系列血清檢體之慢性 B 型肝炎患者)及 500 名慢性 C 型肝炎患者之病毒學相關檢驗及核酸定序分型分析。其病毒學相關檢驗及核酸定序分型分析工作將與疾病管制局楊志元博士另撰寫計畫共同完成之。下列二表附上初步分析結果。

表八：124 個治療族群 B 型肝炎帶原者的各種治療前病毒學資料

HBV	No. (%)
Genotype	
B	70 (56.5)
C	25 (20.2)
PCR undetectable	29 (23.4)
HBV DNA level	
<10 <sup>5</sup> copies/ml	63 (50.8)
≥10 <sup>5</sup> copies/ml	61 (49.2)

表九：96 個治療族群 C 型肝炎帶原者的各種治療前病毒學資料

HCV	No. (%)
Genotype	
1b	57 (59.4)
2a	19 (19.8)
2b	2 (2.1)
Not analyzable	15 (15.6)
PCR undetectable	3 (3.1)

#### 四、討論

##### 計劃執行中預期遭遇之困難以及解決方法：

1. 我們預計在社區追蹤族群進行 393 名慢性 C 型肝炎患者之病毒學相關檢驗。但一開使我們利用 300 位病人之血漿進行 HCV 病毒分析時，結果僅 20% 患者 HCV 病毒 PCR 呈陽性反應，且病毒濃度偏低。我們分析原因發現含 heparin 之血漿檢體會干擾病毒之萃取，因此後來我們重新利用冷凍血清檢體萃取病毒，成功率便大增且得到相符之病毒濃度。(見表十)。其餘 C 型肝炎血清之相關檢驗，我們將積極完成，以利後續流行病學之統計。
2. 在治療族群方面，接受治療個案之臨床資料和血清檢體收集並不容易，此部分工作正透過與疾管局楊志元博士和林思鳳研究員、以及台灣消化系醫學會賴明陽前理事長以及臺大醫院肝炎研究中心主任高嘉宏教授合作繼續完成中。治療後之檢體收集成效的確不佳，我們將繼續努力收集相關檢體。
3. 為了解患者長期之預後，未來將透過與衛生署國民健康局死亡及癌症登錄系統之連線，有效取得患者長期發生死亡及癌症之相關資料。
4. 因目前受檢人數很多，資料繁複，正透過與流行病學專家楊懷一博士合作探討各種病毒因子對病程和治療反應的影響。

表十：利用含 heparin 之血漿檢體萃取 393 名慢性 C 型肝炎患者病毒結果

HCV RNA	
病毒量範圍(cpm)	患者數目
detectable	78 (19.8%)
undetectable	315 (80.2%)
10 <sup>5</sup>	14
10 <sup>3</sup> 10 <sup>5</sup>	20
< 10 <sup>3</sup>	44
Genotype	
1	54 (69.2%)
Non-1	24 (30.8%)

## 五、結論與具體建議

在社區族群 B 型肝炎帶原者方面，我們發現近一半帶原者感染 genotype B，四分之一感染 genotype C，此發現證實過去以醫院族群為主之流行病學調查，亦即在台灣 genotype B 最常見，genotype C 次之。而在病毒濃度  $\geq 10^4$  copies/mL 之族群中，核前區突變率為 47%，核心驅動子 (BCP) 突變率為 29%。

在病毒濃度  $\geq 10^4$  copies/mL 之族群中，HBV genotype C 和 BCP A1762T/G1764A 突變是發生肝細胞癌的獨立危險因子。基於這些發現，我們建議 HBV genotype C 和核心驅動子 A1762T/G1764A 突變種感染之 B 型肝炎帶原者屬於發生肝細胞癌的高危險群，應更密切追蹤其 alfa-fetoprotein 及腹部超音波。另一方面，此群病毒濃度高之慢性 B 型肝炎患者應該更積極地被加以治療，同時我們建議在未來應進行大型臨床試驗來證實是否可藉由抗病毒藥物長期抑制病毒複製而減少肝細胞癌的發生。

我們的研究進一步發現發生肝細胞癌的危險依性別、HBeAg 陽性、病毒濃度、基因型、核前區 G1896A 突變、核心驅動子 A1762T/G1764A 突變等各種臨床及病毒因子而有所不同。舉例而言，核心驅動子 A1762T/G1764A 突變對發生肝細胞癌的影響在 HBeAg 陽性，病毒濃度  $\geq 10^7$  copies/mL，和 genotype C 感染等次族群最明顯。相對地，基因型和核前區 G1896A 突變對發生肝細胞癌的影響在 HBeAg 陰性和病毒濃度  $< 10^7$  copies/mL 等次族群最明顯。女性帶原者感染基因型 C 比基因型 B 有顯著異常增加肝細胞癌發生之危險。依此，我們建議未來除了檢驗收錄病患時的血清檢體外，也應收集並檢驗慢性 B 型肝炎病患追蹤過程中的檢體。另外，我們也建議應依患者之性別、性別、HBeAg 狀態、病毒濃度及基因型、核前區 1896 核苷酸狀態、核心驅動子 1762/1764 雙核苷酸狀態等各種臨床及病毒因子建立個人化預測模式，用以預測肝細胞癌發生之危險機率。若有



所成果，將是在台灣肝細胞癌防治工作上的一大突破。

在社區族群 C 型肝炎帶原者方面，因血清檢體之檢驗尚未完成且資料繁複，目前正積極完成中，並將透過與流行病學專家合作探討各種病毒因子對病程的影響。因此，尚無法針對患者治療方面和醫療決策方面提出具體建議。

在治療族群方面，同樣地，因受檢人數多、治療前後血清檢體之收集仍不齊全、且資料繁複，除積極繼續收集檢體並進行檢驗外，也將透過與統計學專家合作探討各種病毒因子對治療反應的影響。因此，尚無法針對患者治療方面和醫療決策方面提出具體建議。

## 六、參考文獻

1. Alberti A: Can serum HBV-DNA be used as a primary end point to assess efficacy of new treatments for chronic hepatitis B? *Hepatology* 2003;38:18-20.
2. Carman W, Thomas HC, Domingo E: Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example. *Lancet* 1993;341:349-53.
3. Chen DS: From hepatitis to hepatoma: lessons from type B viral hepatitis. *Science* 1993;262:369-70.
4. Chisari FV, Ferrari C: Hepatitis B immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995;13:29-60.
5. Chu CJ, Hussain M, Lok AS: Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology* 2002;122:1756-62.
6. Chu CJ, Hussain M, Lok ASF: Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 2002;36:1408-15.
7. Chu CM: Natural history of chronic hepatitis B virus infection in adults with emphasis on the occurrence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15 (Suppl.):E25-30.
8. Ding X, Mizokami M, Yao G, et al: Hepatitis B virus genotype distribution among Chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 2001;44:43-7.
9. Gauthier J, Bourne EJ, Lutz MW, et al : Quantitation of hepatitis B viremia and emergence of YMDD variants in patients with chronic hepatitis B treated with lamivudine. *J Infect Dis* 1999;180:1757-62.
10. Gunther S, Fischer L, Pult I, et al: Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv Virus Res* 1999;52:125-37.
11. Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, et al: Adefovir Dipivoxil

- 438 Study Group. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003;348:800-7.
12. Heathcote EJ, Shiffman ML, Cooksley WG, et al: Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N Engl J Med* 2000;343:1673-80.
  13. Heathcote J: Treatment of HBe antigen-positive chronic hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003;23:69-80.
  14. Hou J, Schilling R, Janssen HLA, et al: Molecular characteristics of hepatitis B virus genotype A confer a higher response rate to interferon treatment. *J Hepatol* 2001;34 (Suppl. 1): 15.
  15. Hunt CM, McGill JM, Allen MI, Condey LD: Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology* 2000;31:1037-44.
  16. Kao JH, Tsai SL, Chen PJ, et al: A clinicopathologic study of chronic non-A, non-B (type C) hepatitis in Taiwan: comparison between posttransfusion and sporadic patients. *J Hepatol* 1994;21:244-9.
  17. Kao JH, Chen DS: Overview of Hepatitis B and C Viruses. In: Goedert JJ, ed. *Infectious Causes of Cancer: Targets for Intervention*. Totowa: Humana Press Inc., 2000;313-30.
  18. Kao JH, Chen DS: Recent updates in hepatitis vaccination and the prevention of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2002;97:269-71.
  19. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al : Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Microbiol* 2002;40:1207-9.
  20. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al : Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000;118:554-9.
  21. Kao JH, Liu CJ, Chen DS: Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance. *J Hepatol* 2002;36:303-4.

22. Kao JH, Wu NH, Chen PJ, et al: Hepatitis B genotypes and response to interferon therapy. *J Hepatol* 2000;33:998-1002.
23. Kao JH: Hepatitis B viral genotypes: Clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:643-50.
24. Kidd-Ljunggren K, Oberg M, Kidd AH: The hepatitis B virus X gene: analysis of functional domain variation and gene phylogeny using multiple sequences. *J Gen Virol* 1995;76:2119-30.
25. Kramvis A, Kew MC: The core promoter of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 1999;6:415-27.
26. Lai MY, Kao JH, Yang PM, et al: Long-term efficacy of ribavirin plus interferon alfa in the treatment of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1996;111:1307-12.
27. Lee KM, Cho SW, Kim SW, et al: Effect of virological response on post-treatment durability of lamivudine-induced HBeAg seroconversion. *J Viral Hep* 2002;9:208-12.
28. Liaw YF, Tai DI, Chu CM, Pao CC, Chen TJ: Acute exacerbation in chronic type B hepatitis: comparison between HBeAg and antibody-positive patients. *Hepatology* 1987;7:20-3.
29. Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, et al: Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1999;179:775-82.
30. Liu CJ, Chen PJ, Lai MY, Kao JH, Chen DS: Hepatitis B virus variants in patients receiving lamivudine treatment with breakthrough hepatitis evaluated by serial viral loads and full-length viral sequences. *Hepatology* 2001;34:583-9.
31. Liu CJ, Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS: Molecular epidemiology of hepatitis B viral serotypes and genotypes in Taiwan. *J Biomed Sci* 2002;9:166-70.

32. Liu CJ, Kao JH, Shau WY, et al: Naturally occurring hepatitis B surface gene variants in chronic hepatitis B virus infection: correlations with viral serotypes and clinical stages of liver disease. *J Med Virol* 2002;68:50-9.
33. Lok AS, Akarca U, Greene S: Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4077-81.
34. Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH: Management of hepatitis B: 2000-summary of a workshop. *Gastroenterology* 2001;120:1828-53.
35. Lok AS, Lai CL: Acute exacerbations in Chinese patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection. Incidence, predisposing factors and etiology. *J Hepatol* 1990;10:29-34.
36. Magnius LO, Norder H: Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 1995;38:24-34.
37. Marcellin P, Chang TT, Lim SG, et al : Adefovir Dipivoxil 437 Study Group. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003;348:808-16.
38. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of Hepatitis C: 2002-June 10-12, 2002. *Hepatology* 2002;36:S3-S20.
39. Ogata N, Cote PJ, Zanetti AR, et al: Licensed recombinant hepatitis B vaccines protect chimpanzees against infection with the prototype surface gene mutant of hepatitis B virus. *Hepatology* 1999;30:779-86.
40. Ohkubo K, Kato Y, Ichikawa T, et al : Viral load is a significant prognostic factor for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;94:2663-8.

41. Okamoto H, Imai M, Kametani M, et al: Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54 year old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. *Japan J Exp Med* 1987;57:231-6.
42. 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;69:2575-83.
43. Orito E, Ichida T, Sakugawa H, et al: Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology* 2001;34:590-4.
44. Orito E, Mizokami M, Ina Y, et al: Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7059-62.
45. Perrillo RP: Acute flares in chronic hepatitis B: the natural and unnatural history of an immunologically mediated liver disease. *Gastroenterology* 2001;120:1009-22.
46. Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, et al: Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002;123:1848-56.
47. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al: A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000;81:67-74.
48. Thakur V, Guptan RC, Kazim SN, et al: Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:165-70.
49. Torre F, Naoumov NV: Clinical implications of mutations in the hepatitis B virus genome. *Eur J Clin Invest* 1998;28:604-14.
50. Wai CT, Chu CJ, Hussain M, et al: HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than

- genotype C. *Hepatology* 2002;36:1425-30.
51. Wallace LA, Carman WF: Surface gene variation of HBV: scientific and medical relevance. *Viral Hepatitis Rev* 1997;3:5-16.
  52. Yang HC, Lai MY, Chen PJ, et al : Combination of interferon and ribavirin reduces the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C (Submitted)
  53. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, et al : Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002;347:168-75.
  54. Yang SS, Lai MY, Chen DS, Chen GH, Kao JH: Mutations in the NS5A and E2-PePHD regions of hepatitis C virus genotype 1b and response to combination therapy of interferon plus ribavirin. *Liver Int* 2003;23:426-33.
  55. Yeh SH, Tsai CY, Kao JH, et al: Quantification and genotyping of hepatitis B virus in a single reaction by real-time PCR and melting curve analysis. *J Hepatol* 2004;41:659-66.
  56. Zhang X, Zoulim F, Habersetzer F, et al: Analysis of hepatitis B virus genotypes and pre-core region variability during interferon treatment of HBe antigen negative chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1996;48:8-16.
  57. Zuckerman AJ: Effect of hepatitis B virus mutants on efficacy of vaccination. *Lancet* 2000;355:1382-84.