

B型肝炎的醫學大躍進— 將分子生物學方法應用於臨床診斷

劉豫寧^{1,2}

¹定勢生醫科技股份有限公司，台北，台灣

²社團法人台灣分子醫學會，台北，台灣

摘要

目前B型肝炎病毒 (hepatitis B virus; HBV) 感染的診斷是以血清學 (serology) 的方法偵測B型肝炎表面抗原 (hepatitis B surface antigen; HBsAg)。然而對更進一步確認病程及評估療效而言，血清學的診斷則無法完全負擔此重任。HBV DNA基因體的各項分子檢測之竄起克服了部分HBV診斷上的困境，它們可以反映患者體內HBV的活動情形及實際狀態。各個國際肝炎組織也在其不斷更新的治療指引中強調B型肝炎病毒分子檢測的重要性。HBV DNA的定量可有效地監控患者體內病毒的廓清情形，以評估抗病毒治療的效果及調整療程，並可協助早期發現抗藥性 (drug resistance) 病毒株的崛起。抗藥性病毒株檢測可確立抗藥性病毒株的存在，讓醫師可即時更換抗病毒藥物。HBV基因型別鑑定則是協助臨床上用藥的參考依據。核前蛋白質 (precore protein) 及基本核心啟動子 (basal core promoter) 的突變 (mutation) 檢測可確診B型肝炎e抗原 (hepatitis B e antigen; HBeAg) 呈陰性 (negative) 之慢性B型肝炎 (chronic hepatitis B; CHB) 患者，並早期評估治療時機。顯然分子檢測已在慢性B型肝炎病患疾病監控上扮演著重要的角色。(生醫 2008;1(3):218-235)

關鍵字：B型肝炎病毒 (hepatitis B virus; HBV)、慢性B型肝炎 (chronic hepatitis B; CHB)、分子診斷 (molecular diagnostics)、抗藥性 (drug resistance)、基因型 (genotype)、病毒定量 (virus quantification)

前言

在亞太地區，與B型肝炎病毒 (hepatitis B virus; HBV) 相關的肝癌 (hepatocellular carcinoma; HCC) 位居癌症死因之第三名¹⁻³，而B型肝炎帶原者佔了10%的人口。慢性B型肝炎

(chronic hepatitis B; CHB) 為一全球性的疾病，影響著全球超過三億五千萬的人口¹，每年約造成100萬人口的死亡⁴。在台灣，肝炎素有國病之稱，在2006年國人十大死因當中，慢性肝病及肝硬化 (cirrhosis) 排名第七，肝癌更高居癌症死因之第二位。HBV及C型肝炎病毒 (hepatitis

通訊作者：劉豫寧

電話：886-2-28092113 ext 16

傳真：886-2-28091541

地址：251台北縣淡水鎮中正東路二段69-7號4樓

電子郵件：yvette@previsionmed.com

2008年5月19日來稿；2008年7月18日修改；2008年8月14日同意刊登

C virus; HCV) 是造成這些肝病的主因，而B型肝炎的盛行率比C型肝炎高得多，台灣約有250萬的B型肝炎帶原者。慢性B型肝炎的病程進展多變，可從無症狀的輕微感染到嚴重的各種慢性肝病，約有15-25%的感染者會遭遇病毒複製 (replication) 所引起的肝臟代謝失調 (liver decompensation)、肝硬化、肝癌等嚴重併發症⁴。

慢性肝炎是全球性的重要傳染疾病，世界各地皆有肝病協會，如亞太地區有亞太肝臟研究協會 (Asian Pacific Association for the Study of the Liver; APASL)，歐洲有歐洲肝臟研究協會 (European Association of Sinological Librarians; EASL)，美國有美國肝臟疾病研究協會 (American Association for the Study of Liver Diseases; AASLD)。這些協會均對慢性B、C型肝炎擬出臨床抗病毒治療及監控指引⁵⁻⁷，且這些指引中都一致建議以傳統型干擾素 (conventional interferon)、干安能 (lamivudine)、干適能 (adefovir dipivoxil) 及貝樂克 (entecavir) 為治療慢性B型肝炎的第一線用藥，它們均為美國食品藥物管理局 (U.S. Food and Drug Administration; FDA) 核准之藥物。這些肝病協會雖均以消滅體內HBV病毒顆粒為最終目標而擬出治療指引，但彼此之間卻互有異同，可能的原因在於病毒亞型及人種不同而對病毒的反應也不盡相同的差異性。而台灣目前則有一針對國人的篩檢、治療與追蹤的指引，可供臨床參考，但仍須進一步整合並期達到全面性的共識。

HBV與肝癌的關係相當複雜。舉例來說，20%的肝癌患者並沒有遭遇肝硬化的過程，且在某些特定地區，如撒哈拉沙漠以南的非洲地區、巴布亞紐幾內亞及台灣，肝癌發生在年輕男性及小孩的情形相對地較為常見，具有高度地域性^{3,8,9}。病毒、宿主 (host) 基因性質及環境因子在肝癌形成 (hepatocarcinogenesis) 的過程中交互影響著。而肝癌風險最高的情形發生於有肝硬

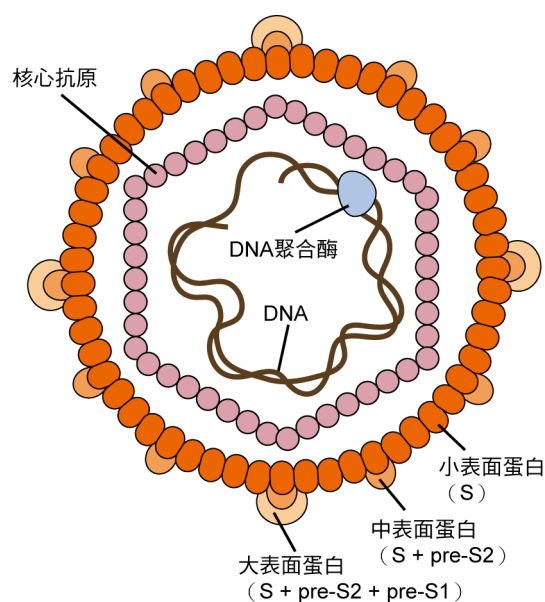
化 (80%)、慢性B型肝炎發生時及當病毒複製活化時^{2,10}，其中就有兩項因素與HBV有密切的關係，肝硬化更是長期肝炎容易產生的結果。同時，最近也有連結血清中HBV DNA含量與肝病進展及肝癌風險的相關數據^{10,11}。此外，B型肝炎e抗原 (hepatitis B e antigen; HBeAg) 的血清轉換 (seroconversion) 亦可明顯降低肝癌的風險²。從治療意義上看來，有效的抗病毒治療可達到HBeAg血清轉換、緩解肝炎活性並進而阻止肝硬化，最終則可減低發展成肝癌的風險。

由慢性B型肝炎逐漸演變成肝硬化甚至肝癌的過程中，已證實有數種與HBV病毒有關之具臨床意義的標的基因 (target gene)，可作為病情監控及臨床診斷上之依據，連帶地相關分子生物學的檢查也被相繼研發出來，本文將針對此部分做詳細的討論。

B型肝炎概述

HBV的基因與複製

HBV為一複雜的病毒 (圖一)，屬於肝去氧核糖核酸病毒科 (Hepadnaviridae)，其複製主要發生在肝臟，但也可在其它器官及淋巴球 (lymphocyte) 中被發現，但HBV如何在肝外組織進行複製繁殖仍須進一步研究探討。HBV為表面具有外套膜 (envelope) 之部分雙股 (partially double strand) DNA病毒，其基因體為一開放式環狀DNA，約由3200個鹼基對 (3.2 kb) 組成 (圖二)。基因體由核心蛋白質 (core proteins)，又稱為核心抗原 (core antigen, HBcAg) 所聚集而成之蛋白質鞘 (nucleocapsid) 包圍。蛋白質鞘外則另有一層外套膜，即為B型肝炎表面抗原 (hepatitis B surface antigen; HBsAg) 之決定因子。HBV的基因體包含4個開放閱讀框架 (open reading frame; ORF)，即4個不同的基因：S、C、P及X基因 (圖二)。S基因生成HBsAg，其



圖一、B型肝炎病毒 (hepatitis B virus; HBV) 其鄧氏顆粒 (Dane particle) 之結構。

HBV在顯微鏡下為一直徑42 nm之顆粒，稱為「鄧氏顆粒」，此結構是由一雙層膜包覆著一個不完整之環狀雙股DNA所構成。HBV的表面具有外套膜 (envelope)，外套膜內為核心抗原 (core antigen, HBcAg) 圍繞而成的蛋白質鞘 (nucleocapsid)，其內則包裹著HBV之部分雙股 (partially double strand) DNA及DNA聚合酶 (DNA polymerase)。HBV之外套膜由三種表面蛋白 (surface protein) 組成，小表面蛋白為S基因的產物；中表面蛋白為前表面抗原2 (pre-surface antigen 2; pre-S2) 基因及S基因之產物；大表面蛋白則為pre-S1加上pre-S2及S基因之產物。其中以小表面蛋白佔絕大多數，中表面蛋白佔5-15%，大表面蛋白則只有約1-2%。(彩圖詳見本刊網頁)

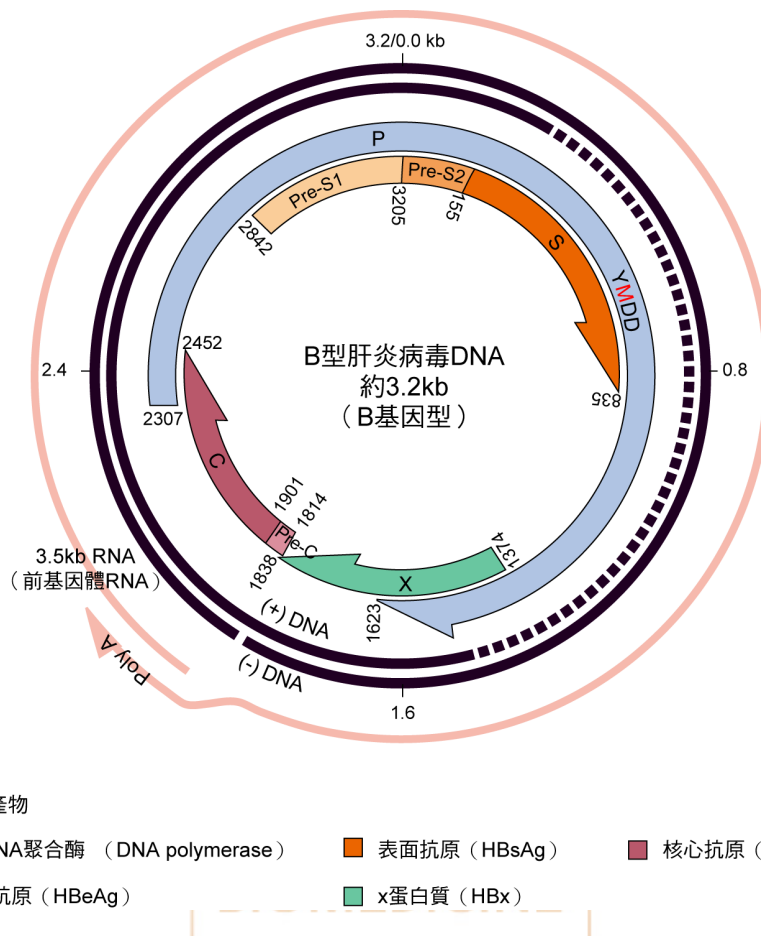
上游 (upstream) 尚有一小段前表面抗原 (pre-surface antigen; pre-S) 基因。HBV的感染就是透過HBsAg與肝細胞表面受體 (receptor) 結合進而進入細胞內進行複製。C基因經由不同之轉譯起始點 (translation initiation site) 產生HBcAg及核前蛋白質，而由核前蛋白質產生的HBeAg之含量常被用來作為測量病毒複製情形的指標。P基因負

責製造DNA聚合酶 (DNA polymerase)，此DNA聚合酶同時具有反轉錄酶 (reverse transcriptase) 活性。X基因產生X蛋白質 (hepatitis B x protein; HBx)，它在病毒複製過程中扮演轉活化蛋白質 (transactivating protein)，有增強HBV複製的作用¹²；它同時也會影響宿主細胞的基因表現及訊息傳遞 (signal transduction)¹³，目前被懷疑可能與肝癌的形成有關。HBV的基因體雖小，但經由各基因間互相重疊 (overlap) 使用，因此可產生4個大型蛋白質，例如S基因完全重疊到P基因，C與P基因也有部分位置重疊 (圖二)。

HBV與大多數病毒的複製起始相同，都是透過與細胞表面受體結合，進入細胞的同時也脫去外套膜 (uncoating)，此時HBV之DNA會進入細胞核內，並開始進行修復 (repair) 機制，將其部分雙股DNA轉變為共價閉合環狀DNA (covalently closed circular DNA; cccDNA)，以作為病毒轉錄 (transcription) 時的模版 (template)。轉錄作用產生之RNA再經由轉譯作用 (translation) 生成各種病毒複製時所需之蛋白質 (圖三)。在HBV基因體複製前，HBV之核心蛋白質會先將3.5 kb之前基因體RNA (pre-genomic RNA; pgRNA) 及DNA聚合酶包裹成核心顆粒 (core particle)，接著在核心顆粒中，由作為前基因體模版 (pregenomic template) 之pgRNA經反轉錄作用 (reverse transcription) 形成完整的負股DNA (negative-strand DNA)，隨之再以負股DNA為模版合成部分正股DNA (positive-strand DNA)。正股DNA通常只有負股DNA的20-80%，為一長度不固定之片段 (圖三)。蛋白質鞘及外套膜則形成包裹著HBV基因體DNA之外殼 (capsid)，最後經由細胞膜以出芽 (budding) 的方式釋出，完成HBV的生活週期 (圖三)。

HBV基因型及其亞型

HBV可透過產道、血液及性行為傳染。造成全球性感染的HBV，可經由血清學鑑定其HBsAg



圖二、以B基因型 (genotype B) 為例之B型肝炎病毒DNA的結構及其基因產物。

HBV的基因體如黑色粗線所示，由一不完整之環狀雙股DNA構成，可經由四個相互部分重疊之開放閱讀框架 (open reading frame; ORF)，即黑色粗線內四個箭號標示的區域—pre-S1/pre-S2/S、X、pre-C/C、P，製造出病毒複製時所需的各種蛋白。S基因上游 (upstream) 還有pre-S基因 (包括pre-S1及pre-S2)，而C基因上游亦有一小段核前基因 (pre-C)。各基因的前後端標示之數字為其在HBV基因體上的始末位置。干安能 (lamivudine) 常見的抗藥性突變 (drug resistance mutation)—YMDD發生於P基因上。最外圍的粉紅色粗線表示前基因體RNA (pregenomic RNA; pgRNA)，全長3.5 kb，可作為病毒DNA複製 (replication) 之模版 (template)。YMDD之Y為酪氨酸 (tyrosine; Tyr, Y)；M，甲硫氨酸 (methionine; Met, M)；D，天門冬氨酸 (aspartate; Asp, N)。(以上位置參考序列ACC. AB033554)。(彩圖詳見本刊網頁)

來區分其亞型 (subtype)。目前已知的亞型主要有四種：adw、adr、ayw及ayr，在台灣是以adw為主。不同的亞型與B型肝炎的致病力無關，只是因地而異而已。HBV目前已有八種基因型 (genotype) 被定義出來，分別為A、B、C、D、E、F、G、H。它們彼此之間的基因序列於S基因

上有4%的差別，於全基因體則有8%的歧異¹⁴。不同基因型各自在地球上有不同的分佈，在台灣是以基因型B及C佔絕大多數，在中國及日本也是以B、C型為主，西藏、印度以D型為主，韓國則主要是C型。

HBV的感染

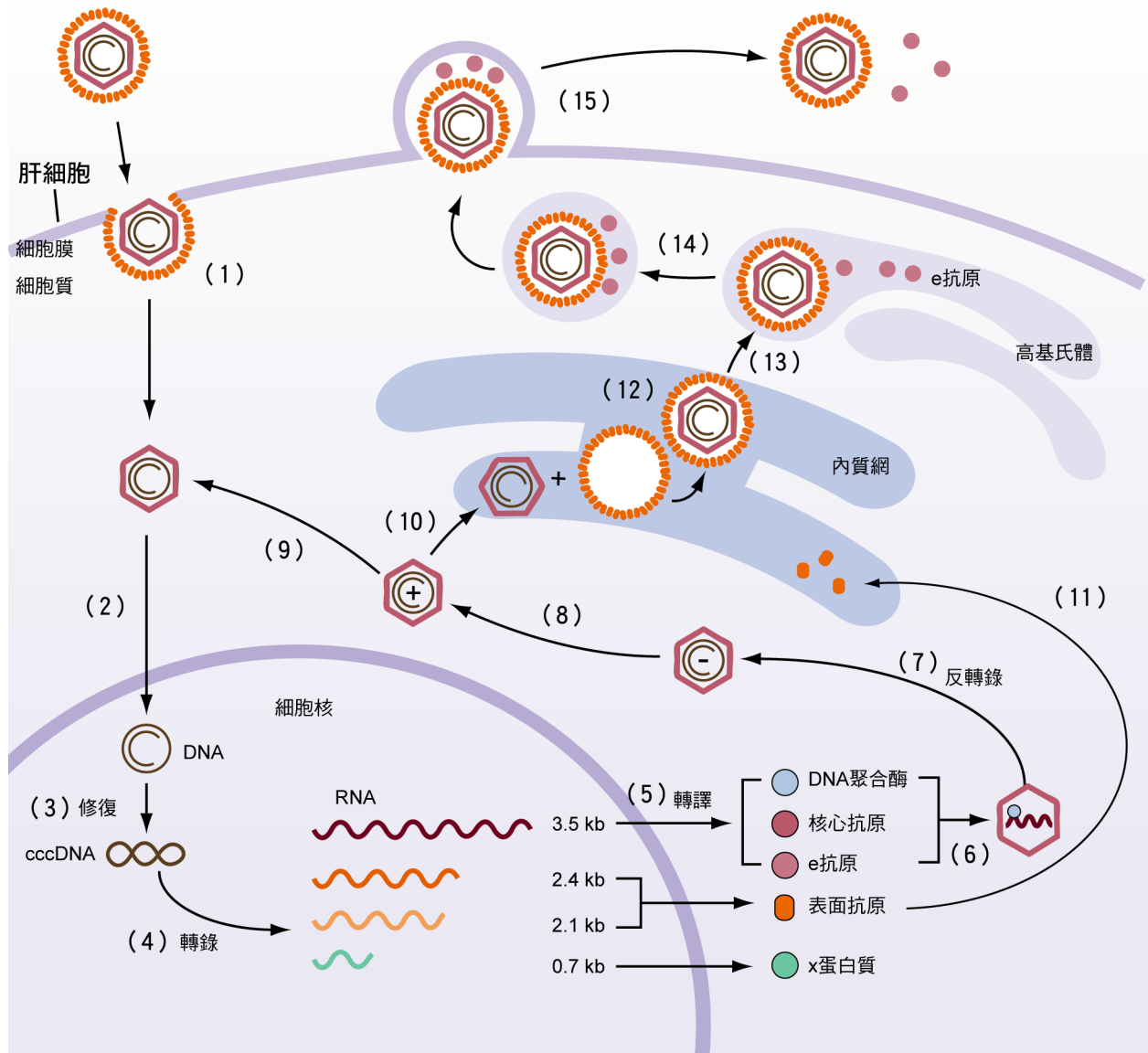
HBV感染的確認診斷方法為檢測血清中HBsAg的存在與否，而一般帶原者則主要以血清學的檢查來做定期追蹤。血清學檢查包括血清中總膽紅素（total bilirubin）、天門冬氨酸轉氨酶（aspartate aminotransferase; AST）、丙氨酸轉氨酶（alanine aminotransferase; ALT）含量，以及HBeAg及B型肝炎e抗體（antibody to hepatitis B e antigen; anti-HBe）呈陽性（positive）或陰性（negative）。另外因為有些患者肝臟異常但不直接反應於肝功能指數，亦須半年做一次肝臟超音波（liver ultrasound）檢查。此外，分子生物學的檢測近年來也被應用於B型肝炎之病情監控上，甚至可協助確立感染的階段。

慢性B型肝炎主要是因為宿主體內對抗肝炎病毒的細胞免疫功能不佳所造成的，因此當急性感染（acute infection）HBV時，即有可能會由急性感染轉為慢性感染（chronic infection）。最常見的情況發生在母體產期的傳染（perinatal transmission），機率高達90%。5歲以下的幼童經由家庭接觸而受到的水平傳染（horizontal transmission）則佔25-30%。另外偶有成人急性感染後會轉為慢性感染（<10%）。這些感染率的差異主要是因為成人具有發育完全之免疫系統，因此有足夠的免疫力對抗HBV的感染，可將病毒一舉殲滅而不致演變成慢性肝炎，這項任務通常是由免疫系統中的毒殺性T淋巴細胞（cytotoxic T lymphocyte）來執行，它會破壞受HBV感染之肝細胞，以清除入侵的HBV。但在經由產期感染的胎兒則沒有這麼幸運，尤其當母體內的e抗原為陽性時，傳染率更是高達95%以上。此時首當其衝的胎兒，其體內只有不成熟的免疫系統，無力對抗外來的HBV，因此容易形成慢性感染而成為B型肝炎帶原者。慢性B型肝炎患者多半是在此時期受到感染。

HBV的慢性感染一般可分為三個階段：免

疫耐受期（immune tolerance）、免疫廓清期（immune clearance）、殘存期（residual phase）（表一）。然而，並非每位患者都會經歷這三個階段¹⁵。在第一階段免疫耐受期，病毒侵入體內，但尚未引發免疫系統的防禦機制，處於免疫系統按兵不動的容忍期，是孩童或年輕人受到感染初期的典型階段，特徵是會有大量的HBV在肝細胞中複製。此時血清中呈現HBeAg陽性，並且可於周邊血中測得大量的HBV DNA（ ≥ 20000 IU/mL）。ALT值多為正常，肝組織切片通常正常，有時可見輕微的發炎，此階段通常持續2-4週，但在經由產期感染的胎兒則可持續數十年。這個階段幾乎是良性的，很少有發展成肝硬化或肝癌的機會。台灣的一個研究團隊曾長時間追蹤240名在產期即感染HBV，且造成長期帶原的成年人¹⁶（平均年齡 27.6 ± 6.2 歲），發現這些成年人每年發展成肝硬化的機率为0.5%，在17年後肝硬化的機率則高達13%。但在平均長達10年半的追蹤當中，並未發現任何感染者發展成肝癌，而其中大多數人（85%）均在20到39歲間獲得HBeAg的血清轉換，亦即HBeAg消失，而轉為產生Anti-HBe的情形。

第二階段為免疫廓清期，通常發生在15-35歲時受到HBV感染的成年人，此時期特徵為血清HBeAg呈陽性，周邊血HBV DNA降低（ ≥ 20000 IU/mL），ALT上升或間歇性的上升，肝臟組織學檢查可發現肝臟有活動性發炎（active inflammation）的現象¹⁵。這個階段可能持續數月到數年，全賴宿主本身免疫系統的效率。若感染時期免疫系統良好則可能持續3-4週後可完全清除體內病毒；若免疫系統不佳，則此階段甚至有機會持續到10年或更久。慢性B型肝炎發展成肝硬化及肝癌的風險完全取決於此時期疾病的活動性，包括持續發炎的時間及發作時的嚴重性及次數。然而此發炎反應的階段通常會走向HBeAg血清轉換且最終會進入不活動的HBsAg帶原期，即慢性感染的第三階段。在一項研究中也觀察到，66-98%的慢性肝炎患者可自發性地產生HBeAg血



圖三、B型肝炎病毒生活史 (life cycle)。

(1) HBV經由細胞膜表面的受體 (receptor) 進入肝細胞中，並脫去外套膜 (uncoating)；(2) HBV DNA進入細胞核；(3) 細胞核中的HBV DNA隨即進行修復 (repair) 機制，將其部分雙股DNA轉變為共價閉合環狀DNA (covalently closed circular; cccDNA)；(4) 以cccDNA做為模版進行轉錄作用 (transcription)；(5) 轉錄後的產物在經由轉譯作用 (translation) 產生各種病毒複製所需的蛋白質；(6) 核心抗原包裹DNA聚合酶及3.5 kb之前基因體RNA，形成一核心顆粒 (core particle)；(7) DNA聚合酶將pgRNA反轉錄 (reverse transcription) 成一完整的負股DNA (negative-strand DNA)；(8) 合成部分正股DNA (positive-strand DNA)；(9) 此一內含不完整環狀雙股DNA之核心顆粒可繼續脫去蛋白質鞘，進入細胞核中DNA修復及其後續反應，亦可進入步驟(10)完成病毒顆粒複製；具完整HBV DNA之核心顆粒進入內質網 (endoplasmic reticulum; ER) 中；(11) 表面蛋白進入內質網中；(12) 表面蛋白圍繞包裹HBV核心顆粒，成為一成熟之HBV病毒顆粒；(13) HBV病毒進入高基氏體 (Golgi apparatus)；(14-15) HBV病毒及其e抗原 (hepatitis B e antigen; HBeAg) 透過高基氏體經由細胞膜以出芽 (budding) 方式釋出至細胞外。(彩圖詳見本刊網頁)

表一、慢性B型肝炎感染各階段之分子標記。

標記	免疫耐受期 (Immuno tolerance)	免疫廓清期 (Immune clearance)	殘存期 (residual phase)	
			不活動帶原者 (Inactive carrier)	e抗原陰性之慢性肝炎 (HBeAg- CHB)
表面抗原 (HBsAg)	+	+	+	+
ALT	正常	上升； 有時會間歇性升高	正常	週期性升高
e抗原 (HBeAg)	+	+	-	-
e抗體 (HBeAg antibody)	-	-	+	+
HBV DNA含量 (IU/ml)	≥ 20000	≥ 20000	< 20000，可能達到 PCR測不到的情形	> 20000或< 20000
肝組織切片	正常或輕微發炎 (肝細胞損傷輕微)	慢性活動性肝炎或 慢性小葉性肝炎	異常程度依廓清期的嚴 重性而定(輕微發炎到 不活動性肝硬化均有可 能)	活動性肝炎

清轉換¹⁷，平均每年發生率約10%¹⁸。

當患者處於不活動性HBsAg帶原者(inactive carrier)階段時，為感染的第三階段，通常具有正常的ALT值，HBeAg呈陰性，且anti-HBe呈陽性。大多數人周邊血中會含有少量的HBV DNA (<20000 IU/mL)，少部分人周邊血的病毒含量甚至微量到高靈敏度的聚合酶鏈鎖反應(polymerase chain reaction; PCR)都無法測得¹⁹。組織學的觀察則可依其在廓清期的嚴重程度而互有差異，範圍可從輕微發炎到輕度纖維化(fibrosis)以致於不活動性肝硬化(inactive cirrhosis)¹⁵。不活動性肝硬化指的是臨床醫師透過臨床症狀、超音波檢查或肝臟切片診斷為肝硬化之患者，其肝功能指數AST、ALT均正常，表示這類患者肝硬化進展處於靜止狀態，或是緩慢進行中。至此階段患者通常已進入肝炎緩解(remission)階段，病毒複製活動極低，因此第三階段也稱為HBV感染殘餘期。

不活動性帶原者階段可能演變成各種結果，諸如永久性的帶原；肝炎的慢性感染獲得痊癒，

即其HBsAg消失且產生s抗體(antibody to hepatitis B surface antigen; anti-HBs)；也有可能經由原始感染的病毒再活化，或不表現HBeAg之突變病毒株(HBeAg- HBV)的出現而再度復發(表一)。但大約70%的帶原者會成為永久性的不活動性帶原者²⁰。此外，持續進行的發炎反應也會造成進一步的肝臟疾病。通常患者被告知其體內產生HBeAg的血清轉換都是令人欣喜的消息，即使在這些病患當中仍有8%的人會形成肝硬化，更有2%的人可能形成肝癌²⁰。不過HBsAg廓清且生成anti-HBs的案例每年也有0.5-0.8%的發生率²¹。

感染慢性B型肝炎的第三階段亦可為HBeAg呈陰性之慢性B型肝炎(HBeAg- CHB)，其特色是HBeAg呈陰性、anti-HBe呈陽性，可測得血清含HBV DNA，ALT呈現波動、不連續性升高的狀態，並可見肝組織切片有活動性發炎的現象(表一)。進展到此階段可以是自然發生的，也可能是源於不活動性帶原者體內免疫抑制的作用。部分患者會直接經歷由HBeAg呈陽性轉變為HBeAg呈陰性的過程²⁰，原因是HBV可能因複製的過程中發生突變(mutation)而產生不表現HBeAg之

變異株。這類變異發生在HBV DNA上的兩個位置—基本核心啟動子 (basal core promoter) 及核前區 (precore region)。基本核心啟動子會驅動HBeAg的轉錄，其最常見的突變位置為A1762T及G1764A¹⁴，一旦突變發生，則HBeAg的表現量將大幅減低。核前區帶有製造核前蛋白質的基因，而HBeAg就是核前蛋白質分泌及代謝後的產物。若核前區第1896個核苷酸 (nucleotide) 發生突變 (G1896A)，會形成一終止密碼子 (stop codon)，使得核前蛋白質無法生成，也就阻斷了e抗原的供應。基本核心啟動子及核前蛋白質的變異可單獨發生也可能同時發生。並非每個HBV帶原者均有機會遭遇核前區G1896A的突變，這關係到HBV的基因型別。不幸的是，有機會遭遇此突變者包含台灣最常見的基因型B型及部分的C型，主要是由於HBV複製時，需要第1896個核苷酸與第1858個核苷酸配對形成一莖-環 (stem-loop) 的二級結構，才得以順利進行²²。而核前區第1858個核苷酸依不同基因型而互有差異，在B、D、E、G及部分的C型中是胸腺嘧啶 (thymidine; T) 或尿嘧啶 (uridine; U)。在A、F及另一部份的C型中則是表現胞嘧啶 (cytidine; C)。因此，G1896A的突變一旦發生，會使得B、D、E、G及部分C型的HBV有更穩定的莖-環結構，如此便更貼近HBV複製時的需求，於是變異株反而更易生存下來。HBeAg呈陰性之慢性B型肝炎在過去多被認為常見於地中海地區，後來陸續在其他許多地方，如美國、北歐及亞洲地區都有發現。在基因型B型盛行的台灣也逐漸重視這群容易被忽視的肝炎患者。目前的研究發現，在台灣常見的HBV基因型B型中，發展成HBeAg呈陰性之慢性肝炎的比例雖然不高，但也佔了約15%²³；佔台灣HBV感染第二大宗的基因型C型更有約30%的機會形成HBeAg呈陰性之慢性B型肝炎，尤其以核前區的突變較為顯著²³。

另外尚有一種稱為隱匿性HBV感染 (occult HBV infection) 的情形。這類感染的患者雖達到HBsAg呈陰性的結果，但仍可利用超感度

PCR/核酸雜交反應 (ultrasensitive PCR/nucleic acid hybridization assays) 檢測出極微量的HBV DNA²⁴。隱匿性HBV感染的臨床意義及這類患者是否可能發展成肝病的證據都仍待釐清，因此，HBsAg的消失目前仍是治療B型肝炎的終極目標。

抗病毒藥劑

B型肝炎至今仍缺乏足以確保一勞永逸的治療藥物，但面對龐大的感染人口，發展能一舉消滅難纏的HBV之抗病毒藥物勢在必行，而確實近年來也陸陸續續有數種針對HBV而衍生出的抗病毒藥物。目前各治療指引都以預防或減緩經由慢性B型肝炎所引發的各種併發症為治療目標。由於HBV在其複製週期中有一依賴RNA反轉錄酶的過程 (RNA-dependent reverse transcriptase step)，此特性與人類免疫缺乏病毒 (Human Immunodeficiency Virus; HIV) 相似³，因此有數種HBV之抗病毒藥物都是先被發展來治療HIV患者，而後才在同時感染HIV及HBV的患者中發現其可同時抑制HBV的複製。目前已有六種經美國FDA認證通過的慢性B型肝炎治療用藥可在臨床上使用，包括：干擾素 α (interferon- α ; IFN- α)、長效型干擾素 α (pegylated IFN- α)、干安能、干適能、貝樂克 (entecavir) 及喜必福 (telbivudine) (表二)。另外，泰諾福韋 (tenofovir disoproxil fumarate) 雖未被證實可用於治療慢性B型肝炎患者，但卻可有效治療同時感染HIV及HBV的患者 (表二)。在這些抗病毒藥物當中，干擾素 α 以及長效型干擾素 α 是唯一有機會消除肝細胞內的cccDNA者，因此也較具治癒的潛力，然而因其副作用較大，故並非適用於所有的B型肝炎患者。抗病毒藥物及干擾素的使用雖各有其優缺點，但目前並沒有足夠的數據可證實兩者合併使用可產生較佳的療效，因此現今的臨床治療上仍以單一療法進行治療。當第一個抗病毒藥物產生時，其研究成果確實令人欣喜，HBV複製可被明顯抑制。但在時間的考驗下，卻是新的抗病毒藥物一再問世，原因就是抗藥性 (drug resistance) 病毒株

表二、慢性B型肝炎抗病毒治療用藥。

藥物	作用機轉	效用	抗藥性	花費 (美元)
干擾素- α (IFN- α)	免疫調節劑 (抑制前基因體RNA包裹進入核心顆粒; 增加肝細胞上核心抗原HBcAg的表現)	HBeAg+ CHB: 20%達病毒反應 ^b ; 6%達完全反應 ^c 。 HBeAg- CHB: 24%達持續反應12個月 (治療結束後), 對照組: 0%。	—	16週: \$6515-7600 ^d
長效型干擾素- α (Pegylated IFN- α)	免疫調節劑	HBeAg+ CHB: 治療六個月後, 較以干安能治療的效果高出10%的患者達生化反應 ^d 及病毒反應。 HBeAg- CHB: 15%以上	—	48週: \$16170
干安能 (Lamivudine)	核苷反轉錄酶抑制劑 (NRTI ^a); 胞嘧啶類似物 (cytidine analog)	HBeAg+ CHB及HBeAg- CHB: 10-15%的人在治療完12個月之後仍達生化及病毒反應。	第一年: 24% 第二年: 42% 第三年: 53%	52週: \$2240
干適能 (Adefovir dipivoxil)	核苷反轉錄酶抑制劑; 去氧腺三磷酸 (dATP) 相似物	HBeAg+ CHB: 病毒反應約20%, 生化反應約50% (與安慰劑相比)。 HBeAg- CHB: 病毒反應7%, 生化反應40%。	第一年: 0% 第二年: 3% 第三年: 11%	48週: \$6038
貝樂克 (Entecavir)	2'端去氧鳥嘌呤 (2'-Deoxyguanosine) 類似物	HBeAg+ CHB: 比用干安能治療更易達成HBV DNA測不到、生化反應、e抗原血清轉換的標準。 HBeAg+ CH: 比用干安能治療更易達成HBV DNA測不到、生化反應的標準。	未受過其它治療的患者: 第一年: 0% 第二年: 0% 干安能治療產生抗藥性之病患: 第一年: 7% 第二年: 9%	48週: \$7203
喜必福 (Telbivudine)	核苷反轉錄酶抑制劑; 去氧胸腺三磷酸 (dTTP) 類似物	目前尚未有「同儕審查 (peer-reviewed)」的相關文獻。	體外試驗可見與干安能有高度交叉抗藥性。	
泰諾福韋 (Tenofovir)	核苷反轉錄酶抑制劑; 去氧腺三磷酸相似物	用於HIV/HBV共同感染患者: 30-75%的患者可達HBV DNA測不到的標準。 HBV單一感染: 80-100%患者可達HBV DNA測不到的標準。	第一年: 0%	
Emtricitabine	核苷反轉錄酶抑制劑; 胞嘧啶類似物	肝組織發炎改善、HBV DNA測不到的比率提高、ALT值正常。 目前已用於治療HIV患者, 可能可用於治療HIV/HBV共同感染之患者。	第一年: 13% 第二年: 18% 體外試驗可見與干安能有高度交叉抗藥性。	

^aNRTI-nucleoside reverse transcription inhibitor。

^b病毒反應: 血清中HBV DNA少於100000 copies/ml, 且HBeAg+ CHB患者中之HBeAg消失。

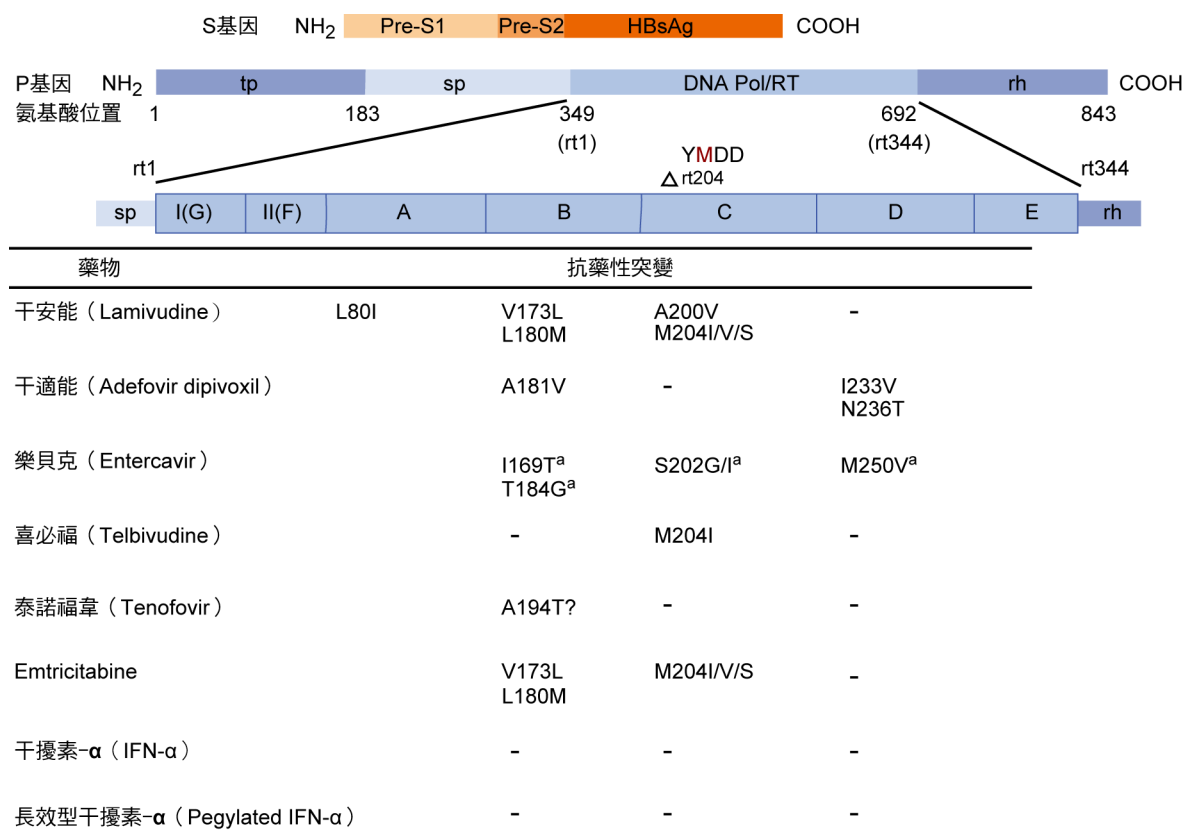
^c完全反應: 生化反應及病毒反應同時達到, 並失去HBsAg。

^d生化反應: ALT值正常。

^e費用均以美元及自費標準標示。干擾素、長效型干擾素、干安能及干適能目前均已具有健保給付, 若患者達給付標準則可大為降低治療費用。貝樂克及喜必福已於台灣上市, 並於2008年8月1日正式納入健保給付。

的異軍突起。經由不同抗病毒藥物的使用, 患者體內可能會產生不同的變異株 (圖四, 表二), 其中以干安能最容易引起抗藥性變異株, 相較於

此, 其它的核苷 (nucleoside) 及核苷酸反轉錄酶抑制劑所引發的變異株則少了許多 (圖四, 表二)。



圖四、B型肝炎病毒聚合酶之抗藥性突變 (drug resistance mutations) 及其與S基因相對應之位置。

此圖表示S基因與P基因互相重疊的相對應部分。P基因尚有四個區域 (domain)，其下方標示的數字為該區域之起始氨基酸 (amino acid) 的序位，rt1及 rt344則分別表示反轉錄酶 (reverse transcriptase) 的第一個氨基酸及第344個氨基酸 (即最後一個氨基酸)。將其中的聚合酶/反轉錄酶 (DNA pol/RT) 區域放大，又可細分為七個次區域 (sub-domain) —G、F、A、B、C、D、E。將目前臨床上使用的抗病毒藥物與其所可能引發的抗藥性突變點之相對位置標示於下面的表格中，其中常見的YMDD突變點位於rt204。^a表示該突變發生於因使用干安能 (lamivudine) 產生抗藥性病毒株之後，再以貝樂克 (entecavir) 治療所產生的突變。泰諾福韋 (tenofovir) 的A194T突變目前尚待更多數據確認。名詞解釋：Tp, terminal protein, 終端蛋白；sp, spacer, 間隔區；rh, RNaseH, 核糖核酸水解酶H。(彩圖詳見本刊網頁)

干適能自從2002年APASL在台北進行的兩年一度會議中制訂出第二版的B型肝炎管控指引後，就開始普及於全球的B型肝炎治療中²⁵，在台灣也已列入健保給付項目，成為干安能治療產生抗藥性病毒株之慢性B型肝炎患者的第二線用藥。

目前應用於肝炎診斷及監控之分子檢測方法

病毒性肝炎又分急性感染及慢性感染。對於B型肝炎而言，急性感染大部分發生在30歲以上的成年人 (約30%)，但也有少數會發生在4歲以下的幼兒中 (約10%)²⁶。感染急性B型肝炎的症狀與其它急性肝炎類似，包括類流感症狀 (influenza-like syndrome) 及右上腹部的疼痛。急性B型肝炎的診斷通常是檢測病毒蛋白質及宿主血清中的抗HBV抗體。由於急性B型肝炎目前並無

分子生物學的方法可協助診斷，因此本文把重點放在慢性感染B型肝炎患者之分子診斷方法上。

目前主要有四種分子檢測方法被應用於感染B型肝炎患者之診斷與監控，它們分別為：病毒定量試驗、基因型別鑑定、抗藥性突變試驗及基本核心啟動子及核前區之突變檢測。每種檢測的意義各不相同，病毒定量試驗是用來測定B型肝炎帶原者周邊血（取血清或血漿部分）中病毒的含量，此為現今最具臨床意義且最被廣泛使用的方法。而其它試驗的應用也越來越被深入發展，然而它們仍存在著許多限制，以下一一探討這些檢測的特色及應用。

定量HBV DNA試驗

B型肝炎的定期追蹤檢查多以傳統血清檢查方式為主，一般而言，這樣就足以協助醫師監控慢性肝炎患者的病況。但分子診斷還是在肝炎患者治療前後的比較上佔據了一塊無可取代的地位。目前已有數篇經由具可信度的專業期刊整理，可提供慢性B型肝炎管理的臨床指引^{5,27-29}。他們一致建議，在慢性B型肝炎的早期病況評估及期間的管理，均可檢測患者周邊血的HBV DNA含量來協助診斷，尤其是在決定治療之初及治療中的監控，更是需要做此試驗來提供有力的診斷依據。台灣的B型肝炎治療指引也正計畫納入HBV DNA定量檢測，它在HBeAg陰性之慢性B型肝炎患者的治療指引中亦被提及，由於這些病患的周邊血病毒含量可能很低，因此更需要敏感性（sensitivity）夠高的分子檢測方式來協助診斷。

過去由於定量檢測試劑普遍缺乏品質管控，不同檢測方法之間也缺乏標準化的法則，加上有限的敏感性，因此將HBV DNA定量應用於臨床上顯得困難重重。如今多種具有廣泛量測範圍、低敏感性的商品化檢測試劑紛紛上市。世界衛生組織（World Health Organization; WHO）也針對HBV DNA定量制訂了一國際標準，統一以IU/ml作為

HBV DNA的定量單位，以供不同商品間的比較。目前在所有慢性B型肝炎的臨床指引中，測定患者血清或血漿中HBV DNA的含量都是一項重要的標準。研究顯示，約有90%的HBeAg陽性之慢性B型肝炎患者帶有超過20000 IU/ml的HBV³⁰，而98%不活動性之B型肝炎帶原者體內的HBV含量少於20000 IU/ml³⁰。在數篇慢性B型肝炎臨床指引中，也定出HBeAg陽性之慢性B型肝炎患者，其血清中病毒閾值為 ≥ 20000 IU/ml（100000 copies/ml）^{7,28,29}。對HBeAg陰性的慢性B型肝炎來說，HBV DNA的定量更成為唯一可監控病毒複製情形之標記。但如何區分HBeAg陰性之慢性B型肝炎及不活動性帶原者則較具爭議，目前建議以2000IU/ml為分野，同時要配合血清學的檢測，低於此閾值者判定為不活動性帶原者²⁷。慢性B型肝炎的治療時機與治癒機會息息相關，在各肝病協會所訂定的臨床指引當中，一致認定需達到活性病毒複製的程度（即HBV DNA ≥ 20000 IU/ml之HBeAg陽性慢性B型肝炎），且ALT持續上升達3-6個月或肝臟組織學檢查呈現中度至重度發炎反應^{5,27}，才得以開始進行治療，而這可能與病程及療效關係重大。此外，最近一研究顯示，HBV DNA含量與肝癌的發展有直接關連¹¹。周邊血HBV DNA含量高於4.22 log₁₀ copies/ml的患者，其得到肝癌的風險比周邊血HBV DNA含量低於3.62 log₁₀ copies/ml的患者高出2-7倍³¹。儘管如此，HBV DNA含量並非最主要的治療決定性因素，部分研究指出，病毒量未必與病情惡化程度成正比，肝硬化也可能發生在含低病毒量（<2000 IU/ml）患者身上³²。

2006年，一篇美國的重要HBV臨床指引提出更多方面的病毒閾值以供參考²⁸。一旦決定開始抗病毒療程，血液中病毒含量的監測即變得相當重要，可作為預測抗病毒反應及抗藥性病毒株出現的有效監控方式，尤其對服用干安能的患者而言，即時定量HBV DNA含量更是意義重大。絕大多數的臨床指引都以能壓制HBV的複製為主要的治療目標，受治療的患者至少每3-6個月需要追蹤一次病毒量^{5,27}。由於HBV對干安能易產生抗藥性

突變，通常建議服用干安能的患者每3個月追蹤一次，而使用其他類核苷酸或類核苷之抗病毒藥物則建議至少每6個月測定一次病毒量²⁸，測定病毒量可協助決定類核苷及類核苷酸抗病毒藥物的治療終點。一份研究指出，當病毒量明顯下降時，可見肝組織發炎的情況改善且HBeAg可發生血清轉換³³。在此情況下，當病毒量少於20000 IU/ml^{27,29}或低於PCR之偵測限值（limit of detection; LoD）（<40 IU/ml）^{5,28}，則可在HBeAg血清轉換後的4到12個月終止療程。然而，目前仍無法定義一絕對的治療終點，主要原因是使用類核苷及類核苷酸抗病毒藥物患者的高復發率。

表三列有目前市售商品化之HBV DNA定量試劑套組，其技術主要可區分為訊號放大（signal amplification）及標的基因放大（target amplification）兩種。不同試劑均有其各自的優缺點。訊號放大的技術依賴的是訊號的增強，而標的基因放大則以PCR技術為主。一般而言，訊號放大試驗的敏感性低於標的基因放大試驗，但由於此法不需要經過HBV DNA純化的步驟，因此適合大量樣品的篩檢。此外，因不必經過基因片段的放大，此法也較不需擔心樣品污染的問題。標的基因放大試驗則提供絕佳的敏感性，因此臨床上評估是否更換新抗病毒藥物抑或使用合併療法時，標的基因放大技術便成了協助診斷的最佳選擇。目前最新一代的標的基因放大之定量方法是利用即時聚合酶鏈鎖反應（real-time PCR），同時兼備標的基因放大及訊號放大的作用，可達到低偵測限值及絕佳的精確度³⁴。目前已有文獻證實，在兩個已被證實具有良好相關性的檢測方法，彼此之間仍可能造成定量結果的差異³⁴⁻³⁷（表三）。因此，患者應以同一檢測法完成全程的病情監控。

縱使是商品化的試劑套組，當其遇到低病毒量的檢體時亦可能有再現性不佳及偽陽性（false positive）的問題^{35,36}（表三）。部分臨床實驗室使用自行製造（in-house）的方法進行HBV DNA之

定量檢測，只要其方法開發前的準備及品管要求完備，亦可有值得信賴的檢測結果。

HBV基因型鑑定

HBV基因型可能影響慢性B型肝炎之病情，也與抗病毒治療是否成功息息相關。在B型肝炎盛行的地區，基因型與肝炎的關係尤其被廣泛地深入探討。如亞洲地區主要感染的基因型是B型及C型，但是一般來說，感染基因型B型的病患比感染C型的患者具有較佳的情況，包括年輕時期即獲得HBeAg血清轉換、活動性肝病的進展較慢、肝硬化的速度也較緩慢³⁸。基因型對肝癌的影響更是複雜，通常感染C型的病患發展成肝癌的風險較高³¹。然而，造成肝癌這樣複雜且難以治療的疾病絕非單一因素可影響，尚牽涉到宿主的年齡及區域性的病毒株³⁸，更具意義的相關性仍須日後益加龐大的研究數據佐證。

此外，基因型與抗病毒藥物的療效也有關係，研究數據顯示，對以干擾素 α 或長效性干擾素 $\alpha 2b$ 治療的HBeAg陽性慢性B型肝炎患者而言，感染基因型A、B型患者的血清轉換率較感染D、C型者佳^{39,40}。另有一文獻指出，對以長效性干擾素 $\alpha 2b$ 治療HBeAg陽性之慢性B型肝炎患者而言，感染基因型A型者其血清轉換率明顯高於感染B、C及D型者⁴¹。然而，基因型是否會影響類核苷酸藥物的治療效果？許多強烈的證據顯示，基因型B型及基因型C型之HBV對干安能的反應無顯著差異⁴²；然而，另有一組團隊，卻發現基因型B型比基因型C型容易達到較佳的持續性反應（sustained response），比例為3：1⁴³。而目前仍無數據顯示HBV DNA對干適能及泰諾福韋的反應有基因型依賴性之差異。

抗藥性病毒株的形成似乎在不同基因型間有相同的發展。由於干安能是最容易引起病毒產生抗藥性之類核苷酸藥物，故這部分的數據多與干安能有關。兩組研究團隊證明，基因型B型及C型

表三、市售商品化之HBV DNA定量試驗。

試劑套組（製造商）	分析方法	分析範圍	試驗範圍
RealTime HBV PCR (Abbott Molecular)	即時定量PCR	9.4×10^9 IU/ml	歐洲，CE ^a ； 美國，ASR ^b
HBV Hybrid Capture II (Digene)	雜交捕捉訊號放大反應 (hybrid capture signal amplification)	1.4×10^5 - 1.7×10^9 copies/ml	美國，RUO ^c
Ultra-sensitive Hybrid Capture II (Digene)	雜交捕捉訊號放大反應	8×10^3 - 1.7×10^9 copies/ml	美國，RUO
Artus HBV PCR (QIAGEN Diagnostics)	即時定量PCR	54 - 3.6×10^9 IU/ml 2.5×10^2 - 1.0×10^9 IU/ml	歐洲，CE
Amplicor HBV Monitor (Roche Diagnostics)	即時定量PCR	10^3 - 4×10^6 copies/ml	歐洲，CE； 美國，RUO
Cobas Amplicor HBV Monitor (Roche Diagnostics)	半自動即時定量PCR	2×10^2 - 2×10^5 copies/ml	歐洲，CE； 美國，RUO
Cobas TaqMan HBV (Roche Diagnostics)	即時定量PCR	1.7×10^2 - 8.5×10^8 copies/ml	歐洲，CE； 美國，ASR，RUO（使用 HighPure extraction）
Versant HBV bDNA 3.0 (Bayer)	支鏈DNA訊號放大反應 (bDNA signal amplification)	3.3×10^3 - 1.0×10^8 copies/ml	歐洲，CE； 美國，RUO

^aCE，歐盟認證 (Conformite Europeene)，可用於臨床檢驗 (in vitro diagnosis; IVD)

^bASR，分析物專用試劑 (analyte-specific reagent)

^cRUO，研究專用 (research use only)

之HBV對干安能產生抗藥性的速度沒有顯著差異^{44,45}。此外，2006年一研究發現基因型D型可能與干適能之抗藥性有關，但仍須進一步深入研究⁴⁶。

總結歷年來之研究成果，發現相較於HCV基因型對慢性C型肝炎治療的影響，HBV基因型對慢性B型肝炎治療的影響相當有限。然而，當最理想的治療方式為干擾素治療時，基因型鑑定則較具意義。有一份臨床指引建議，在決定使用干擾素治療慢性B型肝炎患者之前，最好先確認其基因型別²⁸。

由於基因型鑑定對臨床診斷上的助益有限，因此基因型鑑定試驗目前尚未普及於臨床實驗室中，但國際間仍已開發出多種方法為HBV的感染做型別鑑定，包括：全/部分基因定序、限制酶片段多型性 (restriction fragment length polymorphism; RFLP)、基因型專一性之PCR放大技術、PCR配合雜交反應 (PCR plus

hybridization) 以及血清學的檢查。全基因定序是鑑定型別的黃金標準，此法用於鑑別重組之病毒尤其精確。然而，全基因定序有費力、耗時的缺點，且不易鑑定混合基因型 (mixed-genotype) 之感染。目前多以單一基因定序來取代之，而最常用來鑑別型別的基因為S基因，定序出來的序列可藉由NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) BLAST進行比對以鑑別之。INNO-LiPA (Innogenetics) 是以PCR為基礎之雜交反應的產品，它的放大標的位置在HBsAg的主要親水性區域 (hydrophilic region)，其相對應之序列位於前表面抗原1 (pre-S1) 基因上；以直接定序法為標準，此方法對單一基因型別鑑別之精確度可達97-99.9%⁴⁷，它同時又具有數種優於直接定序法的特徵，如有效鑑定多基因型混合感染，另外，對定序結果不佳之案例，也可用此法解決。但此法仍有5%的機會因病毒DNA在其探針 (probe) 所辨認的基因位置上發生單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism; SNP) 或佚失 (deletion)，而造

成偽陰性 (false negative) 結果⁴⁷。TRUGENE HBV Genotyping kit (Siemens Medical Solutions Diagnostics) 為較新的產品，可針對低病毒量的檢體進行基因型鑑定⁴⁸。

HBV抗藥性病毒株偵測

HBV是可治療的，大多數患者身上均可看到治療過後的良好反應，然而一旦病毒開始反制而產生抗藥性病毒株，情況會變得相當棘手！HBV之所以容易產生突變主要有兩個因素：(1) 當HBV處於活化期時，其高度複製的結果也造成較高的突變率；(2) HBV之DNA聚合酶缺乏校讀 (proofreading) 功能，因此錯誤率也相對提高。通常當患者接受治療有效並達到明顯降低病毒量的效果，但隨後病毒量又升高到10倍以上時，醫師便會開始懷疑是否有抗藥性病毒株的存在³⁰。若治療後的病毒基因序列與治療前有差異，也要考慮到抗藥性是否已產生。目前臨床上所使用的抗HBV藥物有部分已被證實會產生特定之抗藥性病毒株 (圖二)，而臨床檢驗上也是針對這些常見的突變株進行篩檢。

抗藥性病毒株可由表型分析 (phenotype analysis) 或基因定序而得知，各有其優缺點。表型分析負責評估在藥物存在的情況下，突變病毒複製的情形，這牽涉到一些基因工程 (genetic engineering) 的技術，需要將野生型 (wild-type) 之基因序列進行定點突變 (site-directed mutagenesis)，並使這些突變基因表現於細胞中，有時也需運用到動物模型⁴⁹。這種方法可確認抗藥性病毒株是否是經由一組相關之突變共同影響而成，而非只是單一點突變，但對臨床分子診斷實驗室而言，此法過於繁複且費時，完全不符合經濟效益。

以直接基因定序檢測抗藥性病毒株的存在具有多項益處，不僅可鑑定出已知的突變株，也可發掘新的抗藥性突變點。然而，敏感性不足一直

是定序反應的致命傷。一般認為定序反應的敏感性僅達25%，若抗藥性病毒株的含量還很低，則定序方法無法檢測出來，可能會因此錯過替換新藥物之最佳時機。儘管少量的突變株可經由大量選殖 (cloning) 後再定序確認，但如此又增加臨床診斷上的複雜度，同時也降低產生檢查結果的時效性。相較之下，以雜交反應為基礎的檢測就顯得兼具敏感性及臨床便利性，但它也有不足之處，包括：只可鑑定已知的特定突變、每一突變均需設計其專屬的特定探針、探針所辨認的序列上若產生SNP會造成偽陰性⁵⁰。RFLP法與雜交反應法優缺點相似，可達到較佳的敏感性，但也只能針對已知的突變進行偵測，同時，可分析的突變種類還受到限制酶 (restriction enzyme) 所能辨識的序列之限制。然而，此法的花費是最低的。

判讀定序方法的結果並不如一般想像中那麼容易。有些突變可能同時與多種藥物均有關連，如rtA181T突變可見於長期以干安能或干適能治療的患者中⁵¹。有些點突變單獨存在時不會造成抗藥性，但當它與其它點突變同時存在時就會顯現其抗藥性之表型。例如rtL180M單一突變並不會產生干安能抗藥性，但一旦同時存在rtL180M及rtA181T兩種突變時，則會改變rtM204的位置，rtM204為一重要之核苷酸結合區 (nucleotide binding pocket)⁵¹，也就是抗病毒藥物主要攻擊的位置。倘若患者使用多藥物之複合式治療，則其定序結果可能存在著多種序列變異的組合，這些變異不僅與抗藥性相關，也可能是為使抗藥性病毒株更適於生存的補償性突變 (compensatory mutations)，亦或只是不影響表型的SNP⁵¹。

目前已有雜交法及直接定序法的檢測產品上市。INNO-LiPA DR (version 2.0) 可偵測廣泛的突變，包括干安能抗藥性突變的第80 (亮氨酸 (leucine))、173 (纈氨酸 (valine))、180 (亮氨酸)、204 (甲硫氨酸 (methionine)) 個氨基酸及干適能抗藥性突變的第181 (丙氨酸 (alanine)) 及236 (天冬醯胺 (asparagine))

個氨基酸。此法已被拿來與定序法做過比較，可達95%的一致結果⁵²，且較定序法更具敏感性，但仍有偽陰性等問題。另有一新的平台—Affigene HBV DE/3TC assay (Sangtec Molecular Diagnostics AB) 是結合雜交法及定序法的技術，在一微小孔 (microwell) 盤中進行反應，亦可達到很好的檢測效果。

但是抗藥性病毒株的確立並非是上述檢測結果即可直接判定。在一份臨床指引中指出，確立病毒抗藥性突變株的產生通常需要至少兩個有意義的指標相吻合，而衡量抗藥性突變株一般有四種依據：基因型抗藥性 (genotypic resistance)、表型抗藥性 (phenotype resistance)、病毒量爆發 (virologic breakthrough)、生化反應爆發 (biochemical breakthrough)²⁸。基因型抗藥性即直接檢測HBV聚合酶基因是否發生突變；表型抗藥性即以體外試驗證實某基因突變點與抗藥性相關；病毒量爆發即在治療已達持續性反應後，以HBV DNA定量檢測發現病毒量增加10倍以上；生化反應爆發則為在治療達到初始反應後，可見ALT值上升。

HBV基本核心啟動子及核前區突變檢測

HBeAg陰性之慢性B型肝炎需要透過一系列病毒標記的檢查 (HBsAg陽性、HBeAg陰性、可測得HBV DNA的存在) 並搭配血清學的檢查 (anti-HBe陽性)，同時需有肝臟發炎受損 (ALT上升或組織切片可見肝臟惡性發炎) 的證據，才能做出診斷。若要證實HBV確實產生了不表現HBeAg之突變株，則需要靠HBV核心啟動子及核前區突變檢測來確認之。目前已有市售的產品可做此檢查，主要是抗藥性病毒株偵測試劑套組的廠商以同樣的模式將檢查範圍擴及於此，如應用PCR雜交反應的產品—INNO-LiPA HBV PreCore及應用雜交/定序法的產品—Affigene HBV Mutant VL19。PCR雜交反應偵測3個點突變 (核心啟動子第1762及1764個核苷酸、核前區第28個密碼子)；雜交/定

序法則是檢查兩點突變 (核心啟動子第1764個核苷酸及核前區第28個密碼子)。以上兩種方法都已被證實與直接定序法的結果有高度一致性 (約90%)，但對偵測混合病毒株 (同時有野生型及變異株) 而言，它們均優於直接定序法⁵³。由於因檢體低病毒量而檢測不到的情況只發生在雜交/定序法，因此一般認為PCR雜交法具有較佳的敏感性⁵³。HBV基本核心啟動子亦可能與肝病的發展有關，一份研究顯示，在台灣，HBV基因型C型及基本核心啟動子T1762及A1764突變可能與HBV帶原發展成肝硬化有關，此結果將可作為一預測慢性B型肝炎患者病情之分子標記⁵⁴。

慢性B型肝炎分子診斷之未來趨勢

就慢性肝炎患者而言，傳統方法反應患者身體的實際狀況，分子生物學的檢測則是偵測病毒在宿主體內的活動情形，兩者缺一不可。目前已有許多利用核苷酸放大法偵測病毒基因體及其中間產物的方式，增強偵測潛在之HBV感染的敏感性。

隨著科技的日新月異，HBV的臨床診斷依據越來越完備，但並未達到盡善盡美。儘管各項檢測的技術種類繁多，但優劣參半；儘管可作為協助診斷的宿主性或病毒性標記越來越多，但仍有部分介於模糊地帶的患者使臨床診斷不易。因此目前面臨的問題應是如何讓迅速發展的新技術能即時應用在臨床分子診斷上，以及開發更多具有意義的新病毒性標記或宿主性標記，甚至是整合目前的分子檢查，達到一舉數得的目的。例如有一研究團隊已發展出一種可同時檢測HBV抗藥性突變點、核心啟動子及核前區突變點，以及進行基因型別鑑定的高密度陣列法 (high-density array)⁵⁵，不但具有彈性，也具有可大量篩選的便利性，但微陣列在臨床上的應用一直有成本過高的問題難以克服。

HBV病毒的完全清除絕對是大家樂見的理想結果，但目前的研究仍顯示隱匿性HBV感染的存在，因而宣告其為不可能的任務。病毒之所以能持續存在，原因在於肝細胞外的HBV難以掌控、HBV DNA可嵌入宿主基因體中以及細胞內成群的cccDNA。目前臨床上使用的抗病毒藥物對病毒量的減少固然效果顯著，但卻無法有效降低cccDNA的含量。在此部分更進一步的研究及如何在檢測與治療上有所突破，都是將來HBV相關研究可發展的重點。

2007年發表的一篇文獻對目前檢測HBV抗藥性變異株提出一新穎的方法。該研究結果顯示，在干安能常見的YMDD抗藥性變異株產生之後，可在病患的周邊血中測得較高含量的cccDNA，同時以干安能治療的患者，產生YMDD變異株後，其周邊血血清中HBV RNA的含量顯著高於未產生變異株之患者⁵⁶。這項研究以不同的思維切入，或許可解決變異株產生初期，其病毒量相當低以致於難以測得的問題，惟仍須更多證據證實。

B型肝炎患者的抗藥性一直是迫切需要解決的問題，因此可見一代又一代的新藥接踵而至。儘管干安能為目前最容易產生抗藥性的藥物，但是由於此藥物最早被開發出來及使用於臨床上，因此也被研究得最透徹。其它新藥是否也會有抗藥性的問題，或是否更容易產生抗藥性，這些問題都需要靠時間及更多的樣品數來解答。同時，抗藥性病毒株的突變是否單純只由一個點突變造成，或是需要連帶的基因突變相互合作才能造成抗藥性的表型？個人認為應是兩者皆有。目前在HIV方面，利用分析複合性多點突變造成的抗藥性表型，已被例行性地應用於管控HIV抗藥性病毒株的生成。HBV的治療也同樣飽受抗藥性的困擾，整合各抗藥性突變點的位置以作為臨床診斷的依據，並提供比對確立時之便利性應為時勢所趨。目前已有一資料庫—SeqHepB (<http://www.seqvirology.com/seqhepb.html>) 收納大量的HBV基因型序列、抑制HBeAg表現之突變點，及抗藥性

突變之序列，可供臨床上參考，為一現今最完整且全面性的HBV基因序列資料庫。它同時可以將臨床上個別各種資訊登入，進而連結出病程及建議療法供臨床醫師參考。另一特別處是它可顯示隨突變位置不同，可能造成的藥物與反轉錄酶結合區之改變，因而產生不同藥物一反轉錄酶結合的3-D立體結構圖。隨著治療HBV感染的藥物日益增加，這類資料庫也顯得更具實用價值，同時亦可做為國際間交流的一個平台。

引用文獻

1. World Health Organization. Hepatitis B: fact sheet WHO/204, October 2000 revised. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.
2. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, Hsiao CK, Chen PJ, Chen DS, Chen CJ; Taiwan Community-Based Cancer Screening Project Group. Hepatitis e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002;347:168-174.
3. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004;350:1118-1129.
4. World Health Organization. Hepatitis B—an introduction. <http://www.who.int/emc-documents/hepatitis/docs/whocdscrlyo20022/introduction/introduction.html>. (accessed June 18, 2004)
5. Liaw YF, Leung N, Guan R, Lau GK, Merican I, McCaughan G, Gan E, Kao JH, Omata M. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2005 update. *Liver Int* 2005;25:472-489.
6. de Franchis R, Hadengue A, Lau G, Lavanchy D, Lok A, McIntyre N, Mele A, Paumgartner G, Pietrangelo A, Rodés J, Rosenberg W, Valla D; EASL Jury. EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002 Geneva, Switzerland. Consensus statement (long version). *J Hepatol* 2003;39 Suppl 1: S3-25.
7. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007;45:507-539.
8. Germer JJ, Vandenameele JN, Mitchell PS, Harmsen WS, Yao JD. Automated sample preparation for the TRUGENE HIV-1 genotyping kit using the MagNA pure LC instrument. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;49:59-61.
9. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, Liang DC, Shau WY, Chen DS. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. *N Engl J Med* 1997;336:1855-1859.

10. Tang B, Kruger WD, Chen G, Shen F, Lin WY, Mboup S, London WT, Evans AA. Hepatitis B viremia is associated with increased risk of hepatocellular carcinoma in chronic carriers. *J Med Virol* 2004;72:35-40.
11. Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeje UH; REVEAL-HBV Study Group. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006;295:65-73.
12. Nakatake H, Chisaka O, Yamamoto S, Matsubara K, Koshy R. Effect of X protein on transactivation of hepatitis B virus promoters and on viral replication. *Virology* 1993;195:305-314.
13. Caselmann WH. Transactivation of cellular gene expression by hepatitis B viral proteins: a possible molecular mechanism of hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 1995;22:34-37.
14. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69:2575-2583.
15. Yim HJ, Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology* 2006;43:S173-181.
16. Chu CM, Hung SJ, Lin J, Tai DI, Liaw YF. Natural history of hepatitis B e antigen to antibody seroconversion in patients with normal serum aminotransferase levels. *Am J Med* 2004;116:829-834.
17. 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.
18. Bortolotti F, Guido M, Bartolacci S, Cadrobbi P, Crivellaro C, Noventa F, Morsica G, Moriondo M, Gatta A. Chronic hepatitis B in children after e antigen seroclearance: final report of a 29-year longitudinal study. *Hepatology* 2006;43:556-562.
19. Yuen MF, Yuan HJ, Hui CK, Wong DK, Wong WM, Chan AO, Wong BC, Lai CL. A large population study of spontaneous HBeAg seroconversion and acute exacerbation of chronic hepatitis B infection: implications for antiviral therapy. *Gut* 2003;52:416-419.
20. Hsu YS, Chien RN, Yeh CT, Sheen IS, Chiou HY, Chu CM, Liaw YF. Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002;35:1522-1527.
21. McMahon BJ, Holck P, Bulkow L, Snowball M. Serologic and clinical outcomes of 1536 Alaska natives chronically infected with hepatitis B virus. *Ann Intern Med* 2001;135:759-768.
22. Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV. Hepatitis B e antigenegative chronic hepatitis B: natural history and treatment. *Semin Liver Dis* 2006;26:130-141.
23. Farrell GC, Teoh NC. Management of chronic hepatitis B virus infection: a new era of disease control. *Internal Medicine Journal* 2006;36:100-113.
24. Bréchet C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Bréchet P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? *Hepatology* 2001;34:194-203.
25. Liaw YF, Leung N, Guan R, Lau GK, Merican I; Asian-Pacific Consensus Working Parties on Hepatitis B. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: an update. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:239-245.
26. McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, Heyward WL, Bender TR, Francis DP, Maynard JE. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infect Dis* 1985;151:599-603.
27. Proceedings of the European Association for the Study of the Liver (EASL) International Consensus Conference on Hepatitis B. September 14-16, 2002. Geneva, Switzerland. *J Hepatol* 2003;39 Suppl 1:S1-235.
28. Keeffe EB, Dieterich DT, Han SH, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, Tobias H, Wright TL. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: an update. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:936-962.
29. Lok AS, McMahon BJ; Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001;34:1225-1241.
30. Valsamakis A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:426-439.
31. Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, Liaw YF, Lin CL, Liu CJ, Shih WL, Kao JH, 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.
32. Yuan HJ, Yuen MF, Ka-Ho Wong D, Sablon E, Lai CL. The relationship between HBV-DNA levels and cirrhosis-related complications in Chinese with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2005;12:373-379.
33. Mommeja-Marin H, Mondou E, Blum MR, Rousseau F. Serum HBV DNA as a marker of efficacy during therapy for chronic HBV infection: analysis and review of the literature. *Hepatology* 2003;37:1309-1319.
34. Hui CK, Bowden S, Zhang HY, Wong A, Lewin S, Rousseau F, Mommeja-Marin H, Lee NP, Luk JM, Locarnini S, Leung N, Naoumov NV, Lau GK. Comparison of real-time PCR assays for monitoring serum hepatitis B virus DNA levels during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2006;44:2983-2987.
35. Konnick EQ, Erali M, Ashwood ER, Hillyard DR.

- Evaluation of the COBAS Amplicor HBV Monitor assay and comparison with the Ultrasensitive HBV Hybrid Capture 2 assay for quantification of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* 2005;43:596-603.
36. Germer JJ, Qutub MO, Mandrekar JN, Mitchell PS, Yao JD. Quantification of hepatitis B virus (HBV) DNA with a TaqMan HBV analyte-specific reagent following sample processing with the MagNA Pure LC instrument. *J Clin Microbiol* 2006;44:1490-1494.
 37. Laperche S, Thibault V, Bouchardeau F, Alain S, Castelain S, Gassin M, Gueudin M, Halfon P, Larrat S, Lunel F, Martinot-Peignoux M, Mercier B, Pawlotsky JM, Pozzetto B, Roque-Afonso AM, Roudot-Thoraval F, Sauné K, Lefrère JJ. Expertise of laboratories in viral load quantification, genotyping, and precore mutant determination for hepatitis B virus in a multicenter study. *J Clin Microbiol* 2006;44:3600-3607.
 38. Liu CJ, Kao JH, Chen DS. Therapeutic implications of hepatitis B virus genotypes. *Liver Int* 2005;25:1097-1107.
 39. Erhardt A, Blondin D, Hauck K, Sagir A, Kohnle T, Heintges T, Häussinger D. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut* 2005;54:1009-1013.
 40. Flink HJ, van Zonneveld M, Hansen BE, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL; HBV 99-01 Study Group. Treatment with Peg-interferon alpha-2b for HBeAg-positive chronic hepatitis B: HBeAg loss is associated with HBV genotype. *Am J Gastroenterol* 2006;101:297-303.
 41. Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, Marcellin P, Thongsawat S, Cooksley G, Gane E, Fried MW, Chow WC, Paik SW, Chang WY, Berg T, Flisiak R, McCloud P, Pluck N; Peginterferon Alfa-2a HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B Study Group. Peginterferon alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005;352:2682-2695.
 42. Yuen MF, Wong DK, Sablon E, Yuan HJ, Sum SM, Hui CK, Chan AO, Wang BC, Lai CL. Hepatitis B virus genotypes B and C do not affect the antiviral response to lamivudine. *Antivir Ther* 2003;8:531-534.
 43. Chien RN, Yeh CT, Tsai SL, Chu CM, Liaw YF. Determinants for sustained HBeAg response to lamivudine therapy. *Hepatology* 2003;38:1267-1273.
 44. Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Tsubota A, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. The influence of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance during long-term treatment. *J Hepatol* 2003;38:315-321.
 45. Kao JH, Liu CJ, Chen DS. Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance. *J Hepatol* 2002;36:303-304.
 46. Fung SK, Chae HB, Fontana RJ, Conjeevaram H, Marrero J, Oberhelman K, Hussain M, Lok AS. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2006;44:283-290.
 47. Osiowy C, Giles E. Evaluation of the INNO-LiPA HBV Genotyping assay for determination of hepatitis B virus genotype. *J Clin Microbiol* 2003;41:5473-5477.
 48. Gintowt AA, Germer JJ, Mitchell PS, Yao JD. Evaluation of the MagNA Pure LC used with the TRUGENE HBV genotyping kit. *J Clin Virol* 2005;34:155-157.
 49. Shaw T, Bartholomeusz A, Locarnini S. HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation. *J Hepatol* 2006;44:593-606.
 50. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Mangia A, Niro G, Decraemer H, Maertens G, Hulstaert F, De Vreese K, Sablon E. Monitoring drug resistance in chronic hepatitis B virus (HBV)-infected patients during lamivudine therapy: evaluation of performance of INNO-LiPA HBV DR assay. *J Clin Microbiol* 2002;40:3729-3734.
 51. Sablon E, Shapiro F. Advanced in Molecular Diagnosis of HBV Infection and Drug Resistance. *Int J Med Sci* 2005;2:8-16.
 52. Osiowy C, Villeneuve JP, Heathcote EJ, Giles E, Borlang J. Detection of rtN236T and rtA181V/T mutations associated with resistance to adefovir dipivoxil in samples from patients with chronic hepatitis B virus infection by the INNO-LiPA HBV DR line probe assay (version 2). *J Clin Microbiol* 2006;44:1994-1997.
 53. Olivero A, Ciancio A, Abate ML, Gaia S, Smedile A, Rizzetto M. Performance of sequence analysis, INNO-LiPA line probe assays and AFFIGENE assays in the detection of hepatitis B virus polymerase and precore/core promoter mutations. *J Viral Hepat* 2006;13:355-362.
 54. Chen CH, Lee CM, Lu SN, Changchien CS, Eng HL, Huang CM, Wang JH, Hung CH, Hu TH. Clinical Significance of Hepatitis B Virus (HBV) Genotypes and Precore and Core Promoter Mutations Affecting HBV e Antigen Expression in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005;43:6000-6006.
 55. Tran N, Berne R, Chann R, Gauthier M, Martin D, Armand MA, Ollivet A, Teo CG, Ijaz S, Flichman D, Brunetto M, Bielawski KP, Pichoud C, Zoulim F, Vernet G. European multicenter evaluation of high-density DNA probe arrays for detection of hepatitis B virus resistance mutations and identification of genotypes. *J Clin Microbiol* 2006;44:2792-2800.
 56. Hatakeyama T, Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Kawakami Y, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Kawakami H, Yatsuji H, Aisaka Y, Kohno H, Aimitsu S, Chayama K. Serum HBV RNA is a Predictor of Early Emergence of the YMDD Mutant in Patients Treated with Lamivudine. *Hepatology* 2007;45:1179-1186.

B型肝炎病毒分子檢測的臨床意義

黃怡翔

(國立陽明大學臨床醫學研究所副教授、台北榮民總醫院胃腸科主治醫師)

慢性B型肝炎 (chronic hepatitis B; CHB) 是肝硬化 (cirrhosis) 及肝癌的主要原因，在台灣約有60%的肝癌患者與B型肝炎病毒 (hepatitis B virus; HBV) 感染有關，因此慢性B型肝炎的治療對於肝硬化及肝癌的防治極為重要。近年來分子生物學技術的進步，也帶動B型肝炎病毒分子檢測的臨床應用，目前臨床上有關B型肝炎病毒分子的檢測，例如核酸檢測技術 (nucleic acid test; NAT) 已廣泛使用在慢性B型肝炎患者的診斷、決定病患開始治療的時機、治療中及治療後療效的評估以及預後的判斷。本篇論文已介紹B型肝炎病毒之分子生物學及檢測方法，筆者將針對臨床上所應用之B型肝炎病毒分子檢測進一步說明。

突變兩者皆為獨立之肝癌相關危險因子。因此偵測B型肝炎基因型及基本核心啟動子突變用於評估肝癌危險程度有可能成為未來的趨勢¹⁰。

B型肝炎病毒DNA濃度與肝癌的危險性也具關聯性，REVEAL (Risk Evaluation of Viral Load Elevation & Associated Liver Disease/Cancer Study) 研究清楚告訴我們，持續性B型肝炎病毒DNA濃度大於 10^5 copies/ml，其肝癌的危險性可增加10倍以上¹¹。目前臨床上認為，40歲以上仍處於e抗原 (hepatitis B e antigen; HBeAg) 陽性 (positive) 或是病毒DNA濃度高者，應採取較積極的抗病毒藥物治療。

B型肝炎基因型 (genotype)、病毒病毒量 (HBV DNA viral load) 與肝癌風險的相關性

B型肝炎病毒基因分型乃依據其核苷序列差異是否大於8%來決定¹⁻³。在台灣，基因型B (genotype B) 約佔三分之二，基因型C約佔三分之一。近年的研究發現，基因型C較基因型B的慢性B型肝炎患者約晚9-10年才發生e抗原抗體轉換 (e seroconversion)⁴。換言之，基因型C的慢性B型肝炎患者有較長的時期處於免疫廓清期 (immune clearance stage)，意即肝臟有較長的時間處於病毒活躍及發炎期。這種現象也反映在肝癌的危險性，基因型C較基因型B的慢性B型肝炎患者有較高的風險罹患肝癌⁵⁻⁷。也有學者認為，C基因型B型肝炎病毒的肝癌風險是導因於C基因型與A1762T/G1764A之基本核心啟動子 (basal core promoter) 突變的高關聯性⁸⁻⁹。依據陳建仁教授最近所發表的研究顯示，C基因型及基本核心啟動子

B型肝炎病毒量應用於慢性B型肝炎的治療準則

目前美國肝臟疾病研究協會 (American Association for the Study of Liver Diseases; AASLD)¹²、亞太肝臟研究學會 (Asian Pacific Association for the Study of the Liver; APASL)¹³及美國Keeffe教授皆有提出慢性B型肝炎的治療準則 (表一)⁴，依據亞太肝臟研究學會建議，對於e

表一、慢性B型肝炎治療準則的比較。

	HBeAg陽性		HBeAg陰性	
	HBV DNA Cp/ml	ALT	HBV DNA Cp/ml	ALT
AASLD 2007 ¹²	$\geq 10^5$	> 2x 正常值	$\geq 10^5$	> 2x 正常值
APASL 2008 ¹³	$\geq 10^5$	> 2x 正常值	$\geq 10^4$	> 2x 正常值
US Panel 2006 ¹⁴	$\geq 10^5$	> 正常值	$\geq 10^4$	> 正常值

抗原陽性慢性B型肝炎患者，若是其肝臟丙氨酸轉氨酶（alanine aminotransferase; ALT）大於正常值2倍以上且B型肝炎病毒DNA濃度大於 10^5 copies/ml時，必須開始治療；而對於e抗原陰性慢性B型肝炎患者，其肝臟丙氨酸轉氨酶大於正常值2倍以上且B型肝炎病毒DNA濃度大於 10^4 copies/ml時，即須開始治療。

B型肝炎病毒病毒量、基因型與抗病毒藥物治療反應的關聯性

目前經美國食品藥物管理局（U.S. Food and Drug Administration; FDA）核准用來治療慢性B型肝炎的藥物有：干擾素（interferon）、長效干擾素（pegylated interferon）、干安能（lamivudine）、干適能（adefovir dipivoxil）、貝樂克（entecavir）、喜必福（telbivudine）以及最近核准的泰諾福韋（tenofovir）共七種藥物，基本上可分為干擾素及核苷類似物。至於第一線藥物該採取何種藥物治療，除考慮病患年紀、肝功能程度及有無肝硬化代償不良外，B型肝炎病毒分子的檢測也有助臨床醫師做決定。一般而言，基因型A、基因型B及治療前B型肝炎病毒DNA濃度較低者（ $<10^9$ copies/ml）的慢性B型肝炎患者對於干擾素有較佳的治療反應¹⁵。而基因型的差異對於核苷類似物的治療反應並無影響，但是也有研究發現，基因型B的慢性B型肝炎患者比基因型C對於干安能的治療有較持久的病毒反應¹⁶。我們的研究發現，以干安能治療e抗原陰性慢性B型肝炎，治療前B型肝炎病毒DNA的高血清濃度是影響早期病毒復發的相關因子¹⁷。

抗藥性

以核苷類似物治療慢性B型肝炎時，最讓臨床醫師擔心的狀況是抗藥性（resistance）的產生，因為病毒突破（virological breakthrough）會出現

於生化突破（biochemical breakthrough）之前，臨床若是等到生化突破時，其B型肝炎病毒量及預後已不易控制，因此治療期間定期的B型肝炎病毒量監測十分重要。在干安能、貝樂克、喜必福的臨床試驗也發現，在治療的第24週時，若是達到B型肝炎病毒偵測不到的程度，往後產生抗藥性的機會極低¹⁸⁻²⁰。因此路徑圖（roadmap）觀念因應而生²¹。所謂的路徑圖觀念的目的在於避免抗藥性的出現，其要點在於，在治療的第12及24週必須偵測B型肝炎病毒量。在第12週，若是B型肝炎DNA沒有下降1 log以上，必須瞭解病患的從醫性（compliance）；在第24週，若是B型肝炎DNA小於60 IU/ml則可繼續服藥6個月，但是如果B型肝炎DNA仍高於2000 IU/ml必須加藥（add on）治療。

結論

B型肝炎病毒分子生物學的發展帶動臨床醫學的進步，目前B型肝炎病毒的分子檢測已經成為臨床醫師診斷及治療的重要工具。隨著分子生物學的進步，相信未來病毒的分子檢測將會有更廣泛的臨床應用。

引用文獻

1. Norder H, Courouche AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994;198:489-503.
2. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000;81:67-74.
3. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002;83:2059-2073.
4. 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;122:1756-1762.

5. Orito E, Mizokami M. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan. *Intervirology* 2003;46:408-412.
6. Chan HL, Hui AY, Wong ML, Tse AM, Hung LC, Wong VW, Sung JJ. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2004;53:1494-1498.
7. Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, Liaw YF, Lin CL, Liu CJ, Shih WL, Kao JH, 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.
8. Yuen MF, Tanaka Y, Mizokami M, Yuen JC, Wong DK, Yuan HJ, Sum SM, Chan AO, Wong BC, Lai CL. Role of hepatitis B virus genotypes Ba and C, core promoter and precore mutations on hepatocellular carcinoma: a case control study. *Carcinogenesis* 2004;25:1593-1598.
9. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 2003;124:327-334.
10. Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje U, Jen CL, Su J, Wang LY, Lu SN, You SL, Chen DS, Liaw YF, Chen CJ. Association between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1134-1143
11. Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeje UH; REVEAL-HBV Study Group. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006;295:65-73.
12. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007;45:507-539.
13. Liaw YF, Leung N, Kao JH, Piratvisuth T, Gane E, Han KH, Guan R, Lau GKK, Locarnini S for the Chronic Hepatitis B Guideline Working Party of the Asian-Pacific Association for the Study of the Liver. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2008 update. *Hepatol Int* 2008;2:263-283. Available at: <http://www.springerlink.com/content/du475u12q655175j/> Accessed July 27, 2008.
14. Keeffe EB, Dieterich DT, Han SH, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, Tobias H, Wright TL. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in United State: an update. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:936-962.
15. Perrillo RP. Therapy of hepatitis B – viral suppression or eradication? *Hepatology* 2006;43 (2 Suppl 1):S182-193.
16. Chien RN, Yeh CT, Tsai SL, Chu CM, Liaw YF. Determinants for sustained HBeAg response to lamivudine therapy. *Hepatology* 2003;38:1267-1273.
17. 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.
18. Yuen MF, Sablon E, Hui CK, Yuan HJ, Decraemer H, Lai CL. Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy. *Hepatology* 2001;34:785-791.
19. Lai CL, Gane E, Liaw YF, Hsu CW, Thongsawat S, Wang Y, Chen Y, Heathcote EJ, Rasenack J, Bzowej N, Naoumov NV, Di Bisceglie AM, Zeuzem S, Moon YM, Goodman Z, Chao G, Constance BF, Brown NA; Globe Study Group. Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2007;357:2576-2588.
20. Chang TT, Gish RG, de Man R, Gadano A, Sollano J, Chao YC, Lok AS, Han KH, Goodman Z, Zhu J, Cross A, DeHertogh D, Wilber R, Colonno R, Apelian D; BEHoLD A1463022 Study Group. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006;354:1001-1010.
21. Keeffe EB, Zeuzem S, Koff RS, Dieterich DT, Esteban-Mur R, Gane EJ, Jacobson IM, Lim SG, Naoumov N, Marcellin P, Piratvisuth T, Zoulim F. Report of an international workshop: Roadmap for management of patients receiving oral therapy for chronic hepatitis B. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:890-897.