

國立臺灣大學公共衛生學院流行病學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Epidemiology

College of Public Health

National Taiwan University

Master Thesis

B型肝炎病毒核基因上變異和肝細胞癌之關係：

縱斷世代研究

Genetic Variation in the Core Gene of Hepatitis B Virus and  
Hepatocellular Carcinoma: A Longitudinal Cohort Study

宋豐仔

Feng-Yu Sung

指導教授：于明暉 博士

Advisor: Ming-Whei Yu, Ph.D.

中華民國97年7月

July, 2008

## 致謝

我，終於畢業了！

首先，我要感謝我的「專屬大廚」—親愛的媽媽，每天辛苦地幫我作無敵美味又健康的便當，讓我可以頭好壯壯，有充沛的體力與論文奮戰；還要感謝我的「專屬司機」—親愛的爸爸，每次在我很早要到校或很晚才能離開學校時，總是不辭辛勞的接送我，讓我可以專心在課業上。

再者，我要感謝我的指導教授-于明暉老師。在這兩年的研究之路上，每次討論老師都會耐心的慢慢引導我，仔細地教導每一個環節，還會與我一起研究新的方法，讓我獲益匪淺。有時，會覺得作研究很辛苦，但一想到老師常常犧牲自己的週末時間來學校與我們討論，更辛苦地在奮鬥著，就覺得自己應該要堅持下去！另外，還要感謝葉昭廷老師、劉俊人醫師、劉信孚老師在我口試期間給予我相當的鼓勵與寶貴意見，同樣讓學生收穫良多。

還要感謝本研究室「大師兄」—惟量學長，從開始作實驗時就一直接受學長的照顧與指導，每次有任何問題學長總是耐心的回答、還常在很晚時陪我等機器，常常給我們鼓勵關心並分享自己的經驗，真的非常感謝惟量學長，你真是我們大家的支柱！還有研究室的助理學姐們：貞萍、耘喬、曉玲與淑瑜，因為妳們在背後的幫忙，我們才有今天的成果。再來就是我的戰友們：珮文、家綺、雅蕙、志偉和宣豪，因為有你們，可以一起肆無忌憚地討論任問題；因為有你們，讓我在研究受挫時有了再站起來的力量，這兩年能跟大家一起打拼，分享喜悅與痛苦，真的很開心！

最後，我要謝謝明翰，謝謝你每次在我要考試或報告時送來的加油簡訊，謝謝你在我研究不順時聽我訴苦，謝謝你還身兼童工與外送，不時送來我最需要的糧食。最後最後，謝謝一路上支持我的朋友與幫忙過我的人，謝謝大家！

宋豐仔 謹誌

中華民國九十七年七月

## 中文摘要

**背景：**HBV core 基因所產生的 HBcAg，是毒殺性 T 淋巴球主要的攻擊目標，core 基因突變會使得被免疫系統辨識的抗原決定位發生改變，因而逃脫免疫反應。本研究探討 HBV core 基因上的突變和肝細胞癌(hepatocellular carcinoma；HCC)自然史的關係。

**材料與方法：**第一階段先利用 nested case-control study 所獲得定序分析資料找尋和 HCC 顯著相關之 genotype-independent 單點核苷酸變異 (single nucleotide polymorphisms；SNP)；第二階段對所找到的 SNPs，發展適當的 TaqMan probe，在一個追蹤 16 年的 case-cohort study 偵測 SNPs 在長時間的穩定性，及 SNPs 對病毒因子和疾病狀態的影響。

**結果：**經過整個 core 基因的全區域掃描，我們發現五個 genotype-independent SNPs 對於 HCC 有保護作用。在基線時，帶有這些 SNPs 之變異型者，其 HBV DNA 濃度、HBeAg 陽性率皆顯著低於野生型，anti-HBe 則相反，而且所帶有的變異型數目和 HCC 或 HBeAg 陽性狀態呈直線負相關。在追蹤期間，變異型相對於野生型穩定性較低。具有變異型者其追蹤期間 ALT 異常和肝硬化的比率皆顯著低於野生型，同時這些變異型和 HBV DNA 長期變動趨勢具有緊密相關性。

**結論：**HBV core 基因突變和 HBeAg 陰轉及病毒複製活性有關，並有可能影響後續疾病狀態。

**關鍵詞：**B 型肝炎病毒、核基因、單點核苷酸變異、HBV DNA 濃度、肝細胞癌

## Abstract

**Background & Aims:** HBcAg which is encoded by HBV core gene is immunological target of cytotoxic T cell. Genetic variation in the core gene changes the structure of epitope and escapes immune response. We investigated the association between genetic variation in the HBV core gene and natural history of hepatocellular carcinoma (HCC).

**Materials & Methods:** First, we used sequence data from a nested case-control study to identify genotype-independent single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with HCC. At the second stage, we developed novel TaqMan probes for identification of viral SNPs. Then an investigation was performed with a case-cohort study on the longitudinal stability of SNPs and their effects on the change of viral factors and disease progression over 16 years of follow-up.

**Results:** We found five genotype-independent SNPs inversely associated with the risk of HCC through a scan of the whole core gene region. At baseline, harboring mutants of the above SNPs were associated with a lower plasma HBV DNA levels and HBeAg-positive rate but a higher prevalence of anti-HBe positivity. There was an inverse linear relationship for the accumulation of core gene mutants with HCC risk and HBeAg positivity. During follow-up, mutants exhibited a lower stability than wild type. The emergence of mutants was associated with sustained normalization of ALT and decreased risk of cirrhosis. It was tightly correlated with change in HBV DNA over time.

**Conclusions:** Mutation in the HBV core gene may play some role in the HBeAg seroconversion and HBV replication activity, and thus affect disease progression.

**Key words:** Hepatitis B virus, core gene, single nucleotide polymorphisms, HBV DNA levels, hepatocellular carcinoma

# 目錄

致謝.....	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iii
研究背景.....	1
材料與方法.....	5
結果.....	10
討論.....	13
參考文獻.....	17



## 圖表目錄

表一. Nested Case-Control study：病例組與對照組進入研究之基本特 徵.....	22
表二. Nested Case-Control study：核苷酸與基因型的關係.....	23
表三. Nested Case-Control study：控制基因型後仍與HCC顯著的SNP其 生物特徵.....	24
表四. Nested Case-Control study：核苷酸變異的累積與HBeAg、anti-Hbe 和HCC的關係.....	25
表五. Longitudinal cohort study：病例組與對照組之基本特徵.....	26
表六. Longitudinal cohort study：SNP長期變異之穩定性.....	27
表七. Longitudinal cohort study：SNP與HCC進程之關係.....	28
表八. Longitudinal cohort study：長期HBV DNA濃度之Trajectory groups 其生物特徵.....	29
圖一. 研究設計之流程圖.....	31
圖二. Longitudinal Cohort study：長期HBV DNA濃度之Trajectory分 析.....	32

## 研究背景

B 型肝炎病毒(hepatitis B virus ; HBV)慢性感染為台灣地區肝細胞癌(hepatocellular carcinoma ; HCC)發生之主要決定因子(1)。根據以往的研究，許多病毒相關因子被發現和 HCC 危險性有關，包括 HBeAg 狀態、病毒基因型、HBV DNA、和特殊病毒基因變異(2-6)。其中研究最多的是 HBeAg，其為一個感染力指標，95%以上的 HBeA 陽性者其週邊血液 HBV DNA 濃度在 100,000 copies/mL 以上(4)，HBeAg 陽性狀態對慢性肝病發展的重要性已有許多研究報告(3, 7)，而且 HBeAg 轉陰 (seroconversion) 是治療上的一個重要評估項目(8)。

但在亞洲地區，大多數肝炎或慢性肝病常在 HBeAg 轉陰以後發生；所謂 HBeAg-negative hepatitis(9, 10)。對於 HBeAg 轉陰以後發生的慢性肝病，HBV DNA 濃度是一個重要可獨立預測 HCC 的危險因子，根據長期追蹤研究，相當一致的發現 HBV DNA 濃度大於  $10^4$  copies/ml HCC 危險性開始顯著上升(4, 11)。最近在台灣地區一個縱斷世代研究 (longitudinal cohort study)，經由對 1143 名 HBsAg 帶原者在追蹤 16 年期間所有血液檢體 HBV DNA 的施測，更發現大部分 HBeAg 轉陰後的 HBsAg 帶原者，長期處於 HBV DNA 穩定狀態，持續高濃度發生 HCC 的危險性較高(12)。

再者就是病毒的基因變異，目前 HBV 可分為 A~H 八種基因型，是以基因核苷酸序列差異大於 8%為鑑定標準(13)。每種基因型都有其特殊的地理位置分布，其中台灣地區主要是 B 與 C 兩種基因型(14)。有研究發現基因型 C 型比 B 型更容易造成嚴重的肝臟疾病包括肝硬化和 HCC(2, 15, 16)，且其 HBeAg 陰轉的時間較晚(6, 16)預後也會比較差(17)。以本研究個案為基礎之前身的一個重疊病例對照研究發現 HBV 基因型 C 型者比 B 型者其罹患 HCC 的危險性較高，且 C 基因型和 HBV DNA 濃度對於 HCC 發生的危險性具有累加式協同作用(4)。相當一致的是；

上述提及的縱斷世代研究，也發現週邊血液 HBV DNA 濃度顯著影響病毒基因型所帶有的危險性，在 HBV DNA 濃度高的狀況，C 和 B 基因型者之累積危險擴增(12)。

除基因型是已知主要和 HCC 相關的病毒因子，另外；近年最常被討論的重要病毒因子是位於 basal core promoter(BCP)上的 A1762T 和 G1764A (BCP 雙突變) 和 precore 上的 G1896A。在人體研究中，相當一致的發現 BCP 雙突變會增加發生肝硬化與 HCC 的危險性(18-22)。而 precore G1896A 是一個 stop codon mutation，其影響最主要的是會造成 HBeAg 的缺失(23)，但對慢性肝病的影響相當不一致，少數研究發現正相關(21, 24)，大部分研究發現無相關或負相關(25-28)，最近台灣地區利用長期追蹤研究庫存的血液檢體進行 nested case-control study，發現 precore G1896A 和 HCC 的相關會隨檢體採集時間至 HCC 發病之期間長短變動，距離罹病愈近時間點採檢，負相關愈強，推論相關程度隨病程不同(22)。

其他病毒基因的變異也被發現與 HBV 慢性感染與藥物治療成效有關。例如在 Lamivudine 治療的患者中常常發現 polymerase 基因上 YMDD(tyrosine, methionine, aspartate, aspartate)出現突變的情形，其突變會導致抗病毒的治療效果不好，使病毒 DNA 濃度再度升高(29-31)；近年來也在肝硬化或 HCC 患者上發現有 Pre-S 基因上 deletion 的情形，且這些 deletion 所在的序列都位於被免疫細胞 T、B 細胞所辨認的 epitope 上(32, 33)，另外針對 HBeAg 陰性的人也在長期追蹤研究發現 pre-S deletion 可預測未來肝硬化的發生(34)。除此之外，當 s gene 上核苷酸位置 145 處由 glycine 變成 arginine 時，還會改變 HBsAg 的抗原性造成疫苗失去作用(35)。

由於 HBV 在複製過程中有反轉錄酶的參與，造成其基因突變情形較常發生(36)，但過去 HBV 病毒基因突變和 B 型肝炎自然史的研究並不多。感染 HBV 後，免疫反應對於清除 HBV 扮演很重要的角色，包括毒殺性 T 淋巴球(cytotoxic T lymphocyte, CTL)、輔助性 T 細胞(helper T cell)及 B 細胞(37, 38)。而由 core 基因所

產生的 HBcAg 就是 CTL 主要攻擊的目標(39, 40)，若 core 基因突變，可能會造成 HBcAg 的結構改變，讓位於 core 基因上被免疫細胞所辨識的抗原決定位(epitope)也發生缺失或變異，使得免疫細胞無法作用，進而使病毒可以逃脫宿主的免疫反應得以存活下來(41)。目前 core 基因上已知的 epitope 包括 CTL epitope：胺基酸位置 18-27 和 141-151(42, 43)；輔助性 T 細胞 epitope：胺基酸位置 1-20、50-69、120-140 和 147-156(44, 45)；和 B 細胞 epitope：胺基酸位置 74-89、107-118 和 130-138 (46, 47)。

在體外細胞研究和動物實驗研究，分別發現在 core 基因上胺基酸位置 50-69 處或 L60V 和 I97L 兩處，若發生變異會降低輔助性 T 細胞反應(48, 49)。除了影響宿主免疫反應外，有研究顯示若 core 基因產生變異會降低病毒的複製(50, 51)，其中一個利用體外 Huh-7 細胞培養的研究就發現，A2339G 單一突變會增加病毒的複製量(52)。但另外也有研究顯示 core 基因突變多在急性肝炎或嚴重肝臟疾病的人，且發生時間大約都在免疫廓清期(immune clearance)(53-55)。在針對台灣 31 位 HBV 帶原且已經過 HBeAg 陰轉的兒童及另外年齡配對的 12 位罹患 HCC 兒童的研究中，發現變異最多的胺基酸位置為 21 和 147 就屬於 CTL epitope，且在 HCC 組有較多的 core 基因胺基酸位置發生突變( $p=0.013$ )(56)。而在另一篇韓國研究中，作者針對 150 位慢性 HBV 帶原者根據其 HBeAg 狀態及是否偵測到 HBV DNA 依序分成 HBeAg(+)/DNA(+)、HBeAg(-)/DNA(+)和 HBeAg(-)/DNA(-)三組觀察 core 基因的變異率，結果發現 core 基因的變異率從第一組到第三組有逐漸升高的狀況，而變異率特別高的胺基酸位置(hot spot)也集中在屬於 T 細胞與 B 細胞 epitope 的 87、97、112 和 130 處，但須注意的是此篇研究對象都是屬於基因型 C 帶原者(57)。

本研究將採用兩階段研究方式進行特殊 core gene 上突變和 HCC 自然史的研究，第一階段利用過去 nested case-control study 所獲得定序分析資料（鍾君明碩士論文）進行 HBV core 基因全基因變異掃瞄，找尋和 HCC 顯著相關之 genotype-independent 的變異；第二階段我們對所找到的變異，利用之前研究定序

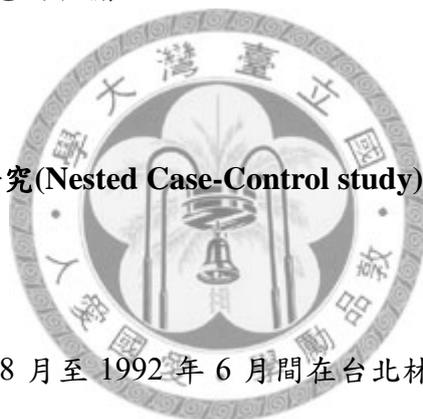
分析資料，發展適當的 TaqMan probe 以進行大規模 case-cohort 的觀察研究，在此階段針對 nt1938、nt2245 進行 TaqMan Real-time PCR 分析，我們不只分析突變在長時間的穩定性，也分析突變對 HBV DNA 隨時間改變趨勢及對追蹤期間長期 ALT 狀態的影響。



## 材料與方法

### 研究設計

本研究採兩階段研究（圖一）。第一階段先以重疊病例對照研究設計，針對 HBV core 基因全區域序列變異掃描，找尋在肝細胞癌病例組與對照組有顯著差異的單一核苷酸變異(single nucleotide polymorphism, SNP)。第二階段針對在重疊病例對照研究中找出有顯著差異的 SNP，發展 Taqman probes，並利用縱斷世代研究設計 (longitudinal cohort study)，偵測這些 SNP 長期的穩定性 (stability) 及其與長期 HBV DNA 和 ALT 狀態的相關性。



### 第一階段重疊病例對照研究(Nested Case-Control study)

#### 研究世代

研究世代為 1988 年 8 月至 1992 年 6 月間在台北林口長庚醫院肝病中心和公保健診中心接受健康檢查三十歲以上的男性無症狀帶原者(HBsAg 為陽性)，所有個案進入研究時皆無 HCC 罹病史，總計 4841 名個案進入研究（公保長庚世代）。

此研究進行前皆有取得研究對象同意。研究對象進入研究時即由受過專業訓練的訪員進行面對面結構式問卷調查，內容包括：基本人口學資料、日常生活習慣及飲食習慣、慢性肝臟疾病的家族史，並於訪問結束時立即使用含有抗凝血劑(肝素，heparin)的真空採血管採集 10c.c.血液檢體，經離心後取得血漿、血清和白血球，分裝後儲存於-70°C 冰箱中，待實驗分析時取出。

研究對象的追蹤方式為每半年到一年進行一次腹部超音波檢查，並收集個案的血液及尿液檢體，進行各項生化檢查與肝功能檢查，同時進行面對面問卷調查，對於未回診或失去追蹤的個案，則透過醫院病歷資料或連結全國癌症死亡登記檔

獲得其罹癌及存活狀況。此世代研究經由台灣大學公共衛生學院研究倫理委員會核准。

#### 病例組和對照組

本研究以之前鍾君明碩士研究的成果資料進行重新分析(58)。僅在此簡述研究對象，追蹤截至 2004 年底，總共診斷出 157 名尚有血液檢體的 HCC 新發病例，HCC 的確診是經由細胞學或病理組織學的診斷；或血清中  $\alpha$ -fetoprotein  $\geq 400$  ng/mL 合併至少一種影像學(包括血管攝影檢查、超音波檢查和電腦斷層掃描)診斷。

依照每名病例進入研究時的年齡(相差在五年內)及血液檢體採集的時間(相差在三個月內)隨機從同一 HBV 帶原者世代選取一至三名對照進行個別匹配，對照組皆須無罹患 HCC 者，共選出 313 名對照組個案。其中部分個案因為以下原因而被排除：1)血液檢體已用完或不足(12 名病例和 26 名對照)；2)HBV DNA levels  $< 10^4$  copies/mL (17 名病例和 89 名對照)，以致定序分析不成功。最後共有 128 名病例及 198 名對照進入實驗分析階段。

## 第二階段縱斷世代研究(Longitudinal cohort study)

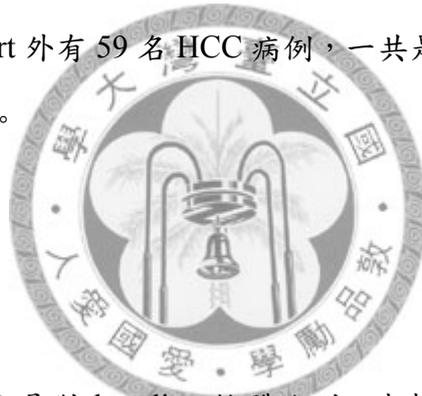
### 病例世代研究 (case-cohort study) 設計

由公保長庚世代選擇公保世代進行病例世代研究，特別選擇此世代是因研究對象具有長達 16 年的血液檢體收集和 HBV DNA、ALT、及腹部超音波長期監測資料，本研究選擇公保世代追蹤截止前所有具有至少兩次追蹤檢體的病例，並由無病的 HBV 帶原者中選取一個隨機樣本(12)。

## 研究對象

至 2004 年 12 月 31 日止，共追蹤了 38001 人年。經過 16 年的追蹤，大約仍有 70% 的追蹤率，共診斷出 112 名 HCC 新發病例，HCC 的確診是經由細胞學或組織病理學的診斷；或血清中  $\alpha$ -fetoprotein  $\geq 400$  ng/mL 合併至少一種影像學(包括血管攝影檢查、超音波檢查和電腦斷層掃描)診斷。

原本 2874 名個案因下列原因排除：1) anti-HCV 陽性或無資料(229 名個案)；2) 有接受抗病毒治療(86 名個案)；3) 只有單一時點的血液檢體(149 名個案)。排除 464 名個案後，剩下 2410 名有效研究個案。接著從中隨機選取一個有 1100 名個案的 subcohort，在排除 16 名個案無問卷訪談的資料或血液檢體不足後，包含 53 名 HCC 病例，加上 subcohort 外有 59 名 HCC 病例，一共是 112 名 HCC 病例與 1031 名非 HCC 個案納入分析。



## SNP 重複測試研究設計

第一時點的測量基本上是對 baseline 檢體施測，少數個案因病毒 DNA 檢體漏失或測不出訊號，是採用 3 年以內的血液檢體代替 (nt1938 有 103 位、nt2045 有 109 位、BCP 為 81 位)。第二時點的挑選條件為 1) 距離第一次測量 4~6 年的檢體；2) 有基線的 SNP 型態資料；3) baseline 須有病毒基因型、HBeAg、ALT 資料；及 4) 有兩點以上的 ALT 資料。最後對於發展出 Taqman probe 的兩 SNP 而言，在 nt1938 和 nt2045 上，其第二時點的個案數分別為 646 名和 884 名，本研究亦對 BCP (nt1762/nt1764) 進行兩時點分析，第二時點有 890 名進入研究。

## 實驗分析

HBV DNA 是用 QIAamp blood mini kit (Qiagen, Chatsworth, CA) 從個案的 200 $\mu$ l

血漿中萃取。HBV DNA 濃度及重疊病例對照研究中 core gene 序列分析方法如之前研究所述(12, 58)。

對於發展單點變異 Taqman probe 實驗，首先針對本研究室資料庫中來自台灣地區 270 位 HBsAg 帶原者之 core 基因序列及 336 位 HBsAg 帶原者之 precore 基因序列進行 alignment，定出野生型和變異型序列，接著著手 Taqman probe 設計，針對設計成功的 nt1938、nt2045 及 nt1762/nt1764 三個 SNP，利用已知序列的檢體(包括不同 SNP 型態、基因型、HBV DNA 濃度)進行二重複測試 probe，所得 real-time 結果幾乎與序列分析結果一致；進一步挑選檢體進行選殖(cloning)，之後對各病毒株序列加以比對，交相驗證 probe 所測得不同型態的變異。本方法最穩定偵測下限為  $10^4$ copies/ml，偵測率分別為 96.2%(nt1938)、99.0%(nt2045) 和 98.4% (nt1762/nt1764)，而偵測下限則可以到小於 215 copies/ml，偵測率分別為 66.7%(nt1938)、63.6% (nt2045) 和 57.6% (nt1762/nt1764)。

SNP 是利用 ABI7900HT(Applied Biosystem, Foster City, CA)進行 Taqman real-time polymerase chain reaction (PCR)。PCR 反應總體積為 5 $\mu$ l，包含 0.125  $\mu$ l 的 Probe 和 primer (40X)，2.5  $\mu$ l 的 Buffer (ABI Taqman Genotyping Master Mix) 1.375 $\mu$ l 的 ddH<sub>2</sub>O 及 1 $\mu$ l 的 HBV DNA，以 50 $^{\circ}$ C 2 分鐘，95 $^{\circ}$ C 10 分鐘，再以 92 $^{\circ}$ C 15 秒，60 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒，此兩步驟重複 50 循環進行反應。

對於部分要作 probe 測試的檢體，首先進行兩次 nested PCR 增幅，再以 1.5% agarose gel 進行電泳分析判定是否成功增幅並夾出所需的基因片段，接著以 Microcon-PCR Centrifugal Filter Device Kit(Millipore, Bedford, MA)進行純化反應，再以純化後之第二次 PCR 產物進行定序前的 sequence reaction，經過酒精沉澱步驟後，利用 ABI 3130 Automatic Sequence (Applied Biosystems, Foster City, CA)進行基因序列分析。

## 統計分析

以 Fisher's exact test 分析 HBV core 基因區域的 SNP 在 HCC 病例組與對照組間的分布是否有差異，定義對照組中頻率最高的核苷酸型態為野生型(wild type)，其餘為變異型(variant type)。接著針對在病例組與對照組有差異的 SNP ( $\alpha < 0.1$ ) 利用 Cochran-Mantel-Haenszel test 在控制病毒基因型(B 型與 C 型)下，找出仍與 HCC 有相關的 SNP，並採用非條件式邏輯式迴歸(unconditional logistic regression)計算 HBV core 基因序列變異對於 HCC 之對比值(odds ratio, OR)。對於核苷酸變異的累積則使用 Mantel-Haenszel  $\chi^2$  test 檢定是否有趨勢性。

在長期追蹤研究方面，使用 Kappa statistic 檢定 SNP 重複測量的穩定性。接著使用 trajectory 方法分析長期 HBV DNA levels 的趨勢。所有連續變項的比較皆使用 t test 或 one-way ANOVA 進行檢定，類別變項則使用 Fisher's exact test 作檢定。統計顯著性考驗皆以雙尾檢定 P 值為判定標準，統計分析皆以 SAS 9.1 套裝軟體進行。



## 結果

### 重疊病例對照研究(Nested case-control study)

病例組和對照組在進入研究年齡、抽菸及喝酒習慣的分佈相似。病毒基因型共有 A/B、B、B/C 及 C 四種，其中以 B 型和 C 型最為常見。病例組的 C 型盛行率(51.8%)顯著多於對照組(13.7%)。HBV DNA 濃度的平均值也是病例組(6.56 log copies/ml)顯著高於對照組(5.71 log copies/ml) ( $p<0.0001$ )。HBeAg 陽性率在病例組較高，但無顯著，而對照組的 anti-HBe 的陽性率則顯著高於病例組( $p<0.0001$ )。另外在基線 ALT 異常頻率的分佈同樣是病例組(30.2%)顯著高於對照組(12.3%)(表一)。

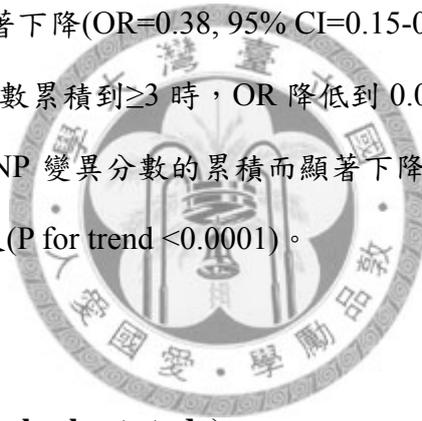
經檢定挑出 33 個 SNP 符合標準( $p<0.1$ )，分別為 nt1933、nt1938、nt1942、nt1961、nt1975、nt2005、nt2008、nt2045、nt2059、nt2080、nt2104、nt2120、nt2131、nt2134、nt2136、nt2170、nt2183、nt2191、nt2201、nt2221、nt2233、nt2239、nt2245、nt2251、nt2260、nt2290、nt2293、nt2296、nt2339、nt2354、nt2357、nt2441 和 nt2443(附表一)。

在控制病毒基因型後，由 33 個 SNP 中挑出 5 個顯著的 SNP (Cochran-Mantel-Haenszel test  $p<0.05$ )，分別為 nt1938、nt1961、nt2239、nt2354 和 nt2441，其中只有 nt2354 位置的變異為 genotype-dependent，其他 4 個 SNP 在控制病毒基因型後，OR 各為： nt1938 (OR=0.31, 95% CI=0.11-0.85)、nt1961 (OR=0.22, 95% CI=0.07-0.65)、nt2239 (OR=0.41, 95% CI=0.17-0.96)和 nt2441 (OR=0.47, 95% CI=0.22-1.01)。另外發現病毒基因型影響 nt2045 位置變異和 HCC 的關係 (test for homogeneity  $P=0.0270$ ) (表二)。

從表三可看出 HBV DNA 濃度在 nt1938、nt1961、nt2045、nt2239 和 nt2441 的變異型皆顯著低於野生型，變異型的 HBeAg 陽性率除了 nt1938 以外，其他 4

個 SNP 的變異型之 HBeAg 陽性率皆顯著較低，而 anti-HBe 陽性率顯著較高。nt2354 變異型的作用和其他 SNP 相反；包括變異型的 HBV DNA 濃度( $p=0.0019$ )、HBeAg 陽性率( $p=0.0155$ )均高於野生型、變異型的 anti-HBe 陽性率反倒顯著低於野生型( $p<0.0001$ )。BCP nt1762/nt1764 的分佈只有在 nt2354 具有顯著差異( $p=<0.0001$ )。進入研究的年齡只有在 nt2441，變異型( $54.1\pm 8.7$  歲)顯著高於野生型( $49.6\pm 8.8$  歲)( $p=0.0013$ )。基線 ALT 異常及 acute exacerbation 盛行率，在所有 SNP 變異型與野生型的分佈皆無顯著差異。

表四顯示隨著 SNP 變異型數目的累積會減低 HCC 的危險性，以 SNP 變異型累積分數“0”為基準，變異分數為 1 時其 OR=0.52, 95% CI=0.25-1.07；在變異分數累積到 2 時，OR 開始顯著下降(OR=0.38, 95% CI=0.15-0.93)，而且愈來愈低 (P for trend<0.0001)，當變異分數累積到 $\geq 3$  時，OR 降低到 0.08 (95% CI= 0.01-0.63)。另外 HBeAg 陽性率隨著 SNP 變異分數的累積而顯著下降 (P for trend<0.0001)，而 anti-HBeAg 陽性率則相反(P for trend <0.0001)。



#### 縱斷世代研究(Longitudinal cohort study)

病例組在進入研究年齡、HBeAg 陽性狀態、HBV DNA 濃度、ALT 異常率和長期追蹤任一次有肝硬化的比率皆顯著高於對照組。病例組基因型 C 型的比率(52.3%)顯著高於對照組(14.3%)( $p<0.0001$ )。在 SNP 部份， nt1938 和 nt2045 在對照組的變異頻率皆高於病例組，分別為 4.8% vs. 0.9% ( $P=0.0633$ )、20.5% vs. 11.8% ( $P=0.0081$ )，BCP nt1762/nt1764 則是在病例組的變異頻率顯著高於對照組(62.6% vs. 25.0%,  $p<0.0001$ )(表五)。

從表六可看出 nt1938 和 nt2045 變異型的穩定性，在分成變異型、duplex、和野生型 3 組的狀況，nt1938 和 nt2045 兩次間隔 4-6 年的測量之再現性，以 kappa 值估計，分別為 0.28 (95% CI=0.19-0.36)和 0.47 (95% CI=0.40-0.54)，BCP 穩定性則

比較高(kappa 值=0.63, 95% CI=0.57-0.68)，若是將 Duplex 或 nt1762/nt1764 任一核苷酸變異併入變異型一起看的話，kappa 值會略微升高到 0.37 (nt1938)、0.49 (nt2045) 和 0.68 (BCP nt1762/nt1764)。另外我們可以從表中發現 nt1938 和 nt2045 其變異型變回野生型的比率(57.1%和 32.9%)皆高於野生型變成變異型的比率(1.9%和 9.9%)，BCP 則無太大差別。

在基線部分，只有 BCP 雙突變的 ALT 異常率顯著高於野生型( $p < 0.0037$ )，ALT 異常率與 acute exacerbation 狀況在其他 SNP 皆無顯著差異。在追蹤期間，nt1938 和 nt2045 其變異型之 ALT 長期異常（定義： $>40$  IU/L 超過 50%來檢數）、

肝硬化和 HCC 的比率皆顯著低於野生型。BCP 雙突變則是相反的狀況（表七）。

圖二為 HBV DNA 濃度追蹤期間 trajectory 分析結果，共可分為三組，分別為穩定低的第一組、穩定高的第二組與漸降的第三組，其在整個族群的分佈各為 60%、32%及 8%。從表八可看出漸降組不論在 HBeAg 陽性狀態、ALT 異常、acute exacerbation、肝硬化與 HCC 的比率皆明顯高於其他兩組，而基因型 C 型在漸降組所佔的比率也是最高，另外“漸降組”進入研究的年齡是三組中最年輕的一組。在 SNP 變異部份，對於單時點 SNP 在進入研究時的測量而言，HBV DNA 濃度在“漸降組”的 nt1938 與 nt2045 變異率明顯低於其他兩組，且有隨“穩定低”、“穩定高”和“漸降”次序愈來愈低的趨勢。BCP 雙突變率則反之。在考慮長期兩時點變異(相隔 4-6 年)測量後，結果類似。

## 討論

關於 HBV 基因序列變異與 HCC 之關係的研究多集中在某些特定區域，包括 BCP、precore、polymerase 和 pre S 區域(21, 22, 29, 31, 32, 34)，對於 core 基因部份的研究相當少。然而從之前的研究知道 core 基因包含了許多被免疫細胞所辨識的 epitope，若其變異可能會導致免疫逃脫反應產生，在致病機轉上扮演重要的角色(39, 41, 43, 49)。本研究目的在於探討 HBV core 基因上特殊的突變在整個 HCC 疾病自然史所扮演的角色，這些單核苷酸變異為 genotype-independent，是以可能並非病毒株與生俱來的變異型，而反映免疫和病毒慢性長期感染交相作用結果。

和以往對 HBV 基因變異所做的 case-control study 不同，本研究的優點在於第一階段探索性分析採用了 nested case-control study，血液檢體的採集是在發生 HCC 前，所以可以探討 HBV core 基因突變和預測之後 HCC 發展的關係。既然目前有關 HCC 產生的機轉主要導向慢性病毒感染和免疫交相作用所引起的肝細胞發炎反應(59-61)，我們再利用第二階段的縱斷世代研究，包含了 16 年間 HBV DNA 所有時點的長期追蹤資料，深入分析 core 基因突變與長期病毒複製活性的關係。

為進行龐大樣本數的縱斷世代研究分析，本研究的另一個特點是發展可以快速檢測突變的探針(TaqMan probe)，此法之優點在可以快速且大量的偵測，且比起序列分析其偵測下限可以到小於 215 copies/ml，但因為此 probe 設計原理為 allele specific hybridization，是利用 probe 序列上單一 SNP 的變異影響 probe 與所要測試之 DNA 檢體是否能緊密結合，進而使螢光發光或不發光，藉以辨識檢體為哪個 SNP 型，因此當 SNP 附近的核苷酸變異也很多時，可能就無法設計出適合的 probe，若在未來要應用到臨床上是一個需要克服的問題。

本研究發現了 5 個 genotype-independent SNP 對於 HCC 有保護作用，分別為

1938、nt1961、nt2239、nt2441 和 nt2045，特殊的是；nt2045 只有在基因型 C 的狀況對 HCC 具有顯著保護作用。在這五個 SNP 中，nt1938 和 nt2045 被順利發展出探針，得以進行第二階段的縱斷世代研究，經由對基線和 4-6 年追蹤期間 nt1938 與 nt2045 位置變異的比較，發現這兩個位置的變異穩定性不高(kappa 檢定值分別為 0.28 與 0.47)，而且由從變異型變回野生型的比率皆比從野生型變成變異型的比率來的高，這個現象支持本研究的假說，此兩個 SNP 變異皆極可能為”突變”(mutation)而非長期的變異(variant)。因本研究對象事先剔除曾經接受抗病毒藥物治療者，所以推論此突變為自然產生。

這些找到的 SNP 不僅各自具有作用，隨著這些 SNP 突變的累積越多，HCC 的危險性下降。為何這五個 SNP 突變的累積會降低 HCC 的危險性呢？我們發現不僅在基線進行的橫斷分析，這五個 SNP 突變型和野生型比較均具有有顯著較低的 HBV DNA 濃度、HBeAg 陽性率，和較高的 anti-HBe 陽性率。利用縱斷世代研究 HBV DNA 多時點的追蹤資料，發現分成三組 HBV DNA 長期狀態具有最好的模式適合度，而 nt1938 和 nt2045 的突變率也是在起始最高而高速率下降的”漸降”組具有最低的頻率，”漸降”組同時反映最高的基線 HBeAg 頻率和基因型 C 頻率、和進入研究年齡較年輕。

有趣的是；”漸降”組追蹤期間的 acute exacerbation ( $>5xULN$ )、肝硬化（由定期超音波測量）、ALT 異常、以致最後 HCC 發生亦均顯著偏高，而 nt1938 和 nt2045 也和這些追蹤期間的疾病狀態大部分呈顯著負相關，此觀察結果暗示這些 Core 基因的突變可能在 HBeAg 陰轉時或之後發生，和所謂 HBeAg-negative hepatitis B 有關。HBV 慢性感染的過程主要可以分為四期，分別為免疫耐受期(immune tolerance)、免疫廓清期(immune clearance)、病毒低複製期(low replication)和再活化期(reactivation)(62, 63)。當進入免疫廓清期，免疫細胞開始辨認病毒抗原並把其清除，此時的特徵為 HBeAg 會從陽性轉成陰性，anti-HBe 也開始產生，病毒 DNA 濃度下降，因為受到免疫細胞攻擊肝細胞發炎指標 ALT 會上升，少部份人會在此

期產生急性發炎進而產生嚴重的肝病 (62, 64)。以往的研究也都發現，core 基因的突變大多發生在免疫廓清期時(54, 55)。

另外根據最近的一篇針對 3386 位 B 肝慢性帶原者作序列分析，觀察病毒 quasi-species 的演化與 HBeAg 陰轉間關係之研究，也發現在 HBeAg 陰轉後其 precore/core genetic diversity 有顯著升高的情形，HBeAg 陰轉當時的 genetic evolution rate(substitution/nt/month)也比陰轉前後都來得高；而在 HBeAg 未陰轉的人其 HBV DNA 濃度高、genetic diversity 低和免疫反應也較弱，顯示這些基因變異是由於為了要逃脫免疫細胞作用因而產生天擇上的結果(65)，與本研究觀察到的現象一致。

而為甚麼這些變異型 HBV DNA 濃度都顯著比野生型低呢？過去有許多體外研究發現 core 基因與病毒的成熟與分泌有關，因而影響到病毒的複製(51, 66, 67)。nt2239 位在第 113 個胺基酸位置，已有研究指出此位置和第 117 個胺基酸位置若發生變異，會使得 pregenomic RNA 無法順利被包被(encapsidation)，進而影響病毒的複製能力(50)。其他 4 個 SNP 目前則還無直接證據，有待進一步體外研究。

本研究在第一階段與第二階段結果相異是在和 ALT 的關係，在第一階段並無發現這些 SNP 變異和 ALT 異常(大於 1 倍 ULN)有差異，這可能是因為第一階段只有基線資料，且 ALT 變動很大，影響其變動的因素也有很多，所以無法單由基線資料推測；而第二階段則有發現 nt1938 和 nt2045 變異型分佈在長期 ALT 異常(定義： $>40$  IU/L 超過 50%來檢數)有差異，ALT 長期異常者可能表示其長期受到免疫攻擊，而 nt1938 和 n2045 的變異型在此組分佈較正常與異常少於 50%來檢數兩組都低，可再次驗證這兩個 SNP 可能為“escape mutant”，而讓免疫細胞無法活化，肝細胞沒有受到攻擊 ALT 也就不會長期異常；而 SNP 變異與 acute exacerbation 的關係在兩階段都無相關，可能第一是因為本資料 acute exacerbation 人數太少的關係，需要進一步再研究。

總結，本研究發現了一些 core 基因上新的突變對於 HCC 有保護作用、會有 DNA 濃度較低的情形且多產生在 HBeAg 陰轉後；在長期追蹤時期還發現 nt1938 和 nt2045 變異型較少產生長期 ALT 異常（定義： $>40$  IU/L 超過 50%來檢數）和肝硬化，顯示 core 基因上的特殊突變很有可能為逃脫免疫的結果，讓我們對於 core 基因上特殊變異點在 HCC 自然史當中扮演的角色有進一步的瞭解。



## 參考文獻

1. Lu SN, Su WW, Yang SS, Chang TT, Cheng KS, Wu JC, et al. Secular trends and geographic variations of hepatitis B virus and hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Int J Cancer* 2006;119:1946-52.
2. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000;118:554-9.
3. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002;347:168-74.
4. Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, Liaw YF, Lin CL, Liu CJ, et al. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:265-72.
5. Yuen MF, Tanaka Y, Shinkai N, Poon RT, But D, Fong DYT, et al. Risk for hepatocellular carcinoma with respect to hepatitis B virus genotypes B/C, specific mutations of enhancer II/core promoter/precore regions and HBV DNA levels. *British Medical Journal* 2008;57:98.
6. Ni YH, Chang MH, Wang KJ, Hsu HY, Chen HL, Kao JH, et al. Clinical relevance of hepatitis B virus genotype in children with chronic infection and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:1733-8.
7. Yuen MF, Fung SK, Tanaka Y, Kato T, Mizokami M, Yuen JCH, et al. Longitudinal Study of Hepatitis Activity and Viral Replication before and after HBeAg Seroconversion in Chronic Hepatitis B Patients Infected with Genotypes B and C. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:5036.
8. Zoulim F, Perrillo R. Hepatitis B: reflections on the current approach to antiviral therapy. *J Hepatol* 2008;48 Suppl 1:S2-19.
9. Lai CL, Shouval D, Lok AS, Chang TT, Cheinquer H, Goodman Z, et al. Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006;354:1011-20.
10. 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:S173-81.
11. Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, et al. Risk of Hepatocellular Carcinoma Across a Biological Gradient of Serum Hepatitis B Virus DNA Level. In: *Am Med Assoc*; 2006. p. 65-73.
12. Wu CF, Yu MW, Lin CL, Liu CJ, Shih WL, Tsai KS, et al. Long-term tracking of hepatitis B viral load and the relationship with risk for hepatocellular carcinoma in men. In: *Oxford Univ Press*; 2008. p. 106.

13. Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol* 2004;14:3-16.
14. Liu CJ, Kao JH, Chen DS. Therapeutic implications of hepatitis B virus genotypes. *Liver Int* 2005;25:1097-107.
15. Kramvis A, Kew MC. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. *J Viral Hepat* 2005;12:456-64.
16. Chu CM, Liaw YF. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with a higher risk of reactivation of hepatitis B and progression to cirrhosis than genotype B: a longitudinal study of hepatitis B e antigen-positive patients with normal aminotransferase levels at baseline. *J Hepatol* 2005;43:411-7.
17. Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Orito E, Mizokami M, Yamashiro T, et al. Preponderance of hepatitis B virus genotype B contributes to a better prognosis of chronic HBV infection in Okinawa, Japan. *J Med Virol* 2002;67:484-9.
18. Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, Michitaka K, Ishikawa K, Ichida T, et al. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group. *Hepatology* 2001;33:218-23.
19. 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;124:327-34.
20. Chen CH, Lee CM, Lu SN, Changchien CS, Eng HL, Huang CM, et al. 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;43:6000-6.
21. Tong MJ, Blatt LM, Kao JH, Cheng JT, Corey WG. Basal core promoter T1762/A1764 and precore A1896 gene mutations in hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma: a comparison with chronic carriers. *Liver Int* 2007;27:1356-63.
22. Chou YC, Yu MW, Wu CF, Yang SY, Lin CL, Liu CJ, et al. Temporal relationship between hepatitis B virus enhancer II/basal core promoter sequence variation and risk of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2008;57:91-7.
23. Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, Wands JR, Ben-Porath E. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Engl J Med* 1991;324:1705-9.
24. Liu CJ, Chen BF, Chen PJ, Lai MY, Huang WL, Kao JH, et al. Role of hepatitis B viral load and basal core promoter mutation in hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *J Infect Dis* 2006;193:1258-65.

25. Akarca US, Greene S, Lok AS. Detection of precore hepatitis B virus mutants in asymptomatic HBsAg-positive family members. *Hepatology* 1994;19:1366-70.
26. Karino Y, Toyota J, Sato T, Ohmura T, Yamazaki K, Suga T, et al. Early Mutation of Precore (A1896) Region Prior to Core Promoter Region Mutation Leads to Decrease of HBV Replication and Remission of Hepatic Inflammation. *Digestive Diseases and Sciences* 2000;45:2207-2213.
27. Chen WN, Oon CJ. Mutations and deletions in core promoter and precore stop codon in relation to viral replication and liver damage in Singaporean hepatitis B virus carriers. *Eur J Clin Invest* 2000;30:787-92.
28. Chan HL, Hui AY, Wong ML, Tse AM, Hung LC, Wong VW, et al. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2004;53:1494-8.
29. Bock CT, Tillmann HL, Torresi J, Klempnauer J, Locarnini S, Manns MP, et al. Selection of hepatitis B virus polymerase mutants with enhanced replication by lamivudine treatment after liver transplantation. *Gastroenterology* 2002;122:264-73.
30. Zoulim F. Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection. *Antiviral Res* 2004;64:1-15.
31. Schildgen O, Sirma H, Funk A, Olotu C, Wend UC, Hartmann H, et al. Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. *N Engl J Med* 2006;354:1807-12.
32. Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology* 2006;130:1153-68.
33. Lin CL, Liu CH, Chen W, Huang WL, Chen PJ, Lai MY, et al. Association of pre-S deletion mutant of hepatitis B virus with risk of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1098-103.
34. Chen CH, Hung CH, Lee CM, Hu TH, Wang JH, Wang JC, et al. Pre-S deletion and complex mutations of hepatitis B virus related to advanced liver disease in HBeAg-negative patients. *Gastroenterology* 2007;133:1466-74.
35. Kalinina T, Iwanski A, Will H, Sterneck M. Deficiency in virion secretion and decreased stability of the hepatitis B virus immune escape mutant G145R. *Hepatology* 2003;38:1274-81.
36. Locarnini S, McMillan J, Bartholomeusz A. The hepatitis B virus and common mutants. *Semin Liver Dis* 2003;23:5-20.
37. Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007;85:16-23.

38. Chisari FV. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest* 1997;99:1472-7.
39. Hunt CM, McGill JM, Allen MI, Condreay LD. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology* 2000;31:1037-44.
40. Locarnini S. Molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 2004;24 Suppl 1:3-10.
41. Lee YI, Hur GM, Suh DJ, Kim SH. Novel pre-C/C gene mutants of hepatitis B virus in chronic active hepatitis: naturally occurring escape mutants. *Journal of General Virology* 1996;77:1129-1138.
42. Bertoletti A, Southwood S, Chesnut R, Sette A, Falco M, Ferrara GB, et al. Molecular features of the hepatitis B virus nucleocapsid T-cell epitope 18-27: interaction with HLA and T-cell receptor. *Hepatology* 1997;26:1027-34.
43. Missale G, Redeker A, Person J, Fowler P, Guilhot S, Schlicht HJ, et al. HLA-A31- and HLA-Aw68-restricted cytotoxic T cell responses to a single hepatitis B virus nucleocapsid epitope during acute viral hepatitis. *J Exp Med* 1993;177:751-62.
44. Ferrari C, Bertoletti A, Penna A, Cavalli A, Valli A, Missale G, et al. Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Clin Invest* 1991;88:214-22.
45. Cao T, Desombere I, Vanlandschoot P, Sallberg M, Leroux-Roels G. Characterization of HLA DR13-restricted CD4(+) T cell epitopes of hepatitis B core antigen associated with self-limited, acute hepatitis B. *J Gen Virol* 2002;83:3023-33.
46. Sallberg M, Ruden U, Magnus LO, Harthus HP, Noah M, Wahren B. Characterisation of a linear binding site for a monoclonal antibody to hepatitis B core antigen. *J Med Virol* 1991;33:248-52.
47. Colucci G, Beazer Y, Cantaluppi C, Tackney C. Identification of a major hepatitis B core antigen (HBcAg) determinant by using synthetic peptides and monoclonal antibodies. *J Immunol* 1988;141:4376-80.
48. Torre F, Cramp M, Owsianka A, Dornan E, Marsden H, Carman W, et al. Direct evidence that naturally occurring mutations within hepatitis B core epitope alter CD4+ T-cell reactivity. *J Med Virol* 2004;72:370-6.
49. Liu Z, Luo K, He H, Hou J. Hot-spot mutations in hepatitis B virus core gene: eliciting or evading immune clearance? *J Viral Hepat* 2005;12:146-53.
50. Lee SM, Park SG, Park E, Lee JY, Jung G. The 113th and 117th charged amino acids in the 5th alpha-helix of the HBV core protein are necessary for pgRNA encapsidation. *Virus Genes* 2003;27:227-35.
51. Koschel M, Oed D, Gerelsaikhon T, Thomssen R, Bruss V. Hepatitis B virus core gene mutations which block nucleocapsid envelopment. *J Virol* 2000;74:1-7.
52. Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Nakayama N, Mochida S, Mizokami M.

- Influences on hepatitis B virus replication by a naturally occurring mutation in the core gene. *Virology* 2007;365:285-91.
53. Ehata T, Omata M, Chuang WL, Yokosuka O, Ito Y, Hosoda K, et al. Mutations in core nucleotide sequence of hepatitis B virus correlate with fulminant and severe hepatitis. *J Clin Invest* 1993;91:1206-13.
  54. Akarca US, Lok AS. Naturally occurring hepatitis B virus core gene mutations. *Hepatology* 1995;22:50-60.
  55. Luo KX, Yang J, Liang ZS. [Correlation between HBV pre-C/C gene mutations and advanced pathologic activity in chronic hepatitis B]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 1994;33:763-6.
  56. Ni YH, Chang MH, Hsu HY, Tsuei DJ. Different hepatitis B virus core gene mutations in children with chronic infection and hepatocellular carcinoma. *Gut* 2003;52:122-5.
  57. Kim HJ, Lee DH, Gwak GY, Choi MS, Lee JH, Koh KC, et al. Analysis of the core gene of hepatitis B virus in Korean patients. *Liver Int* 2007;27:633-8.
  58. 鍾君明. B型肝炎病毒核基因序列變異與肝細胞癌之關係：重疊病例對照研究 台灣大學; 2006.
  59. Bertolotti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *Journal of General Virology* 2006;87:1439-1449.
  60. Huang CF, Lin SS, Ho YC, Chen FL, Yang CC. The immune response induced by hepatitis B virus principal antigens. *Cell* 2006;3:97-106.
  61. Giovanna F, Bortolotti F, Francesco D. Natural history of chronic hepatitis B: Special emphasis on disease progression and prognostic factors. *Journal of Hepatology* 2008;48:335-352.
  62. Lin CL, Kao JH. Hepatitis B viral factors and clinical outcomes of chronic hepatitis B. *J Biomed Sci* 2008;15:137-45.
  63. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007;45:507-39.
  64. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol* 2008;48:335-52.
  65. Lim SG, Cheng Y, Guindon S, Seet BL, Lee LY, Hu P, et al. Viral Quasi-Species Evolution During Hepatitis Be Antigen Seroconversion. *Gastroenterology* 2007;133:951-958.
  66. Koschel M, Thomssen R, Bruss V. Extensive mutagenesis of the hepatitis B virus core gene and mapping of mutations that allow capsid formation. *J. Virol* 1999;73:2153-2160.
  67. Nassal M. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol* 1992;66:4107.

表一. Nested Case-Control study：病例組與對照組進入研究之基本特徵

變項名稱	病例組 (n=116)		對照組 (n=154)		P 值
	No	%	No	%	
進入研究年齡(歲)					
30-39	15	12.9	22	14.3	0.8165
40-49	49	42.2	56	36.4	
50-59	28	24.1	41	26.6	
≥60	24	20.7	35	22.7	
抽菸					
無	73	63.5	98	63.6	1.0000
有	42	36.5	56	36.4	
無資料	1				
喝酒					
無	92	80.0	122	79.2	1.0000
有	23	20.0	32	20.8	
無資料	1				
病毒基因型 <sup>a</sup>					
A/B	0	0.0	1	0.7	<0.0001
B	51	44.7	128	83.7	
B/C	4	3.5	3	2.0	
C	59	51.8	21	13.7	
無法分別	2		1		
HBV DNA濃度 (log copies/ml)					
平均值 ± SD	6.56 ± 1.78		5.71 ± 1.61		<0.0001
HBeAg					
陰性	98	84.5	135	88.8	0.3609
陽性	18	15.5	17	11.2	
無資料	0		2		
AntiHBe					
陰性	48	41.4	28	18.4	<0.0001
陽性	68	58.6	124	81.6	
無資料	0		2		
基線ALT					
≤40 IU/liter	81	69.8	135	87.7	0.0004
>40 IU/liter	35	30.2	19	12.3	
基線Acute Exacerbation <sup>b</sup>					
無	113	97.4	153	99.4	0.3174
有	3	2.6	1	0.7	

<sup>a</sup> 病毒基因型將A/B、B、B/C合併為非C基因型

<sup>b</sup> 基線Acute Exacerbation定義為基線ALT>200 IU/liter

表二. Nested Case-Control study：核苷酸與基因型的關係

核苷酸	總和				基因型B型				基因型C型				P 值 <sup>a</sup>	P 值 <sup>b</sup>	OR <sup>c</sup>	95% CI			
	病例組		對照組		病例組		對照組		病例組		對照組								
	(n=116)	(n=154)	(n=51)	(n=128)	(n=59)	(n=21)													
No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%								
<b>nt1938</b>																			
T	109	94.0	129	83.8	1.00	48	94.1	106	82.8	1.00	56	94.9	18	85.7	1.00	0.9507	0.0179	0.31	(0.11-0.85)
C	6	5.2	23	14.9	0.33	(0.14-0.80)	2	3.9	20	15.6	0.30	(0.09-1.05)	3	5.1	3	14.3	0.32	(0.06-1.74)	
A	1	0.8	1	0.7		1	2.0	1	0.8		0	0.0	0	0.0					
G	0	0.0	1	0.7		0	0.0	1	0.8		0	0.0	0	0.0					
P 值	0.0126				0.0568				0.1821										
<b>nt1961</b>																			
T	109	94.0	128	83.1	1.00	50	98.0	107	83.6	1.00	53	89.8	17	81.0	1.00	0.1733	0.0053	0.22	(0.07-0.65)
A	3	2.6	9	5.8	0.32	(0.13-0.76)	0	0.0	7	5.5	0.10	(0.01-0.78)	3	5.1	2	9.5	0.48	(0.12-1.91)	
C	1	0.8	10	6.5		0	0.0	8	6.3		1	1.7	2	9.5					
G	3	2.6	7	4.6		1	2.0	6	4.7		2	3.4	0	0.0					
P 值	0.0081				0.0054				0.4416										
<b>nt2045</b>																			
T	100	86.2	118	76.6	1.00	38	74.5	97	75.8	1.00	56	94.9	16	76.2	1.00	0.0270	0.3952	0.76	(0.39-1.48)
A	16	13.8	36	23.4	0.52	(0.27-1.00)	13	25.5	31	24.2	1.07	(0.51-2.26)	3	5.1	5	23.8	0.17	(0.04-0.80)	
P 值	0.0610				0.8497				0.0263										
<b>nt2239</b>																			
A	104	89.7	120	77.9	1.00	44	86.3	99	77.3	1.00	54	91.5	17	81.0	1.00	0.9635	0.0365	0.41	(0.17-0.96)
C	6	5.2	19	12.3	0.32	(0.15-0.71)	4	7.8	17	13.3	0.40	(0.15-1.11)	2	3.4	1	4.8	0.42	(0.09-2.06)	
T	3	2.6	11	7.1		1	2.0	9	7.0		2	3.4	2	9.5					
G	0	0.0	2	1.3		0	0.0	2	1.6		0	0.0	0	0.0					
_d	3	2.6	2	1.3		2	3.9	1	0.8		1	1.7	1	4.8					
P 值	0.0035				0.0858				0.3641										
<b>nt2354</b>																			
A	53	45.7	108	70.1	1.00	49	96.1	106	82.8	1.00	2	3.4	0	0.0	1.00	0.703	0.0128	0.18	(0.04-0.80)
C	63	54.3	45	29.2	2.79	(1.69-4.61)	2	3.9	21	16.4	0.20	(0.04-0.87)	57	96.6	21	100.0	NA <sup>e</sup>	NA	
G	0	0.0	1	0.7		0	0.0	1	0.8		0	0.0	0	0.0					
P 值	<0.0001				0.0263				1.0000										
<b>nt2441</b>																			
T	104	89.7	118	76.6	1.00	43	84.3	96	75.0	1.00	56	94.9	17	81.0	1.00	0.3231	0.044	0.47	(0.22-1.01)
C	11	9.5	35	22.7	0.38	(0.19-0.77)	8	15.7	31	24.2	0.56	(0.24-1.31)	3	5.1	4	19.1	0.23	(0.05-1.12)	
G	1	0.9	1	0.7		0	0.0	1	0.8		0	0.0	0	0.0					
P 值	0.0061				0.2334				0.0733										

<sup>a</sup> Breslow-Day test P for homogeneity of the OR

<sup>b</sup> Cochran-Mantel-Haenszel statistics 之 P 值

<sup>c</sup> Cochran-Mantel-Haenszel 之 OR

<sup>d</sup> “\_”表示該位置核苷酸產生deletion的情形，deletion者未納入分析

<sup>e</sup> not available, NA

表三. Nested Case-Control study：控制基因型後仍與HCC顯著的SNP其生物特徵

	nt1938		P 值	nt1961		P 值	nt2045		P 值	nt2239		P 值	nt2354		P 值	nt2441		P 值												
	變異型 <sup>a</sup>			野生型(T)			變異型			野生型(T)			變異型			野生型(T)			變異型		野生型(T)									
	(n=32)	(n=238)		(n=33)	(n=237)		(n=52)	(n=218)		(n=41)	(n=224)		(n=109)	(n=161)		(n=48)	(n=222)													
No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%													
進入研究年齡(歲)																														
平均值±SD	51.4±8.6	50.3±9.0	0.4912	52.4±9.1	50.1±8.9	0.1718	52.3±8.8	49.9±8.9	0.0876	52.9±8.0	50.0±9.1	0.0514	50.5±8.6	50.3±9.2	0.8641	54.1±8.7	49.6±8.8	0.0013												
HBV DNA 濃度 (log copies/ml)																														
平均值±SD	5.26 ± 1.21	6.18 ± 1.77	0.0004	5.25 ± 0.86	6.19 ± 1.80	<0.0001	5.39 ± 1.08	6.24 ± 1.83	<0.0001	5.38 ± 1.16	6.17 ± 1.79	0.0005	6.49 ± 1.91	5.79 ± 1.55	0.0019	5.29 ± 1.00	6.24 ± 1.82	<0.0001												
HBeAg																														
陰性	28	93.3	205	86.1	0.3918	33	100.0	200	85.1	0.0114	50	100.0	183	83.9	0.0007	41	100.0	188	84.7	0.0039	87	80.6	146	91.2	0.0155	47	100.0	186	84.2	0.0013
陽性	2	6.7	33	13.9		0	0.0	35	14.9		0	0.0	34	15.3		0	0.0	34	15.3		21	19.4	14	8.8		0	0.0	35	15.8	
無資料	2							2			2							2			1		1			1		1		
AntiHBe																														
陰性	4	13.3	72	30.3	0.0554	4	12.1	72	30.6	0.0373	3	6.0	73	33.5	<0.0001	5	12.2	67	30.2	0.0211	47	43.5	29	18.1	<0.0001	3	6.4	73	33.0	0.0001
陽性	26	86.7	166	69.7		29	87.9	163	69.4		47	94.0	145	66.5		36	87.8	155	69.8		61	56.5	131	81.9		44	93.6	148	67.0	
無資料	2							2			2							2			1		1			1		1		
病毒基因型 <sup>b</sup>																														
A/B	0	0.0	1	0.4	0.1531	0	0.0	1	0.4	1.0000	0	0.0	1	0.5	0.0069	0	0.0	1	0.5	0.0611	1	0.9	0	0.0	<0.0001	0	0.0	1	0.5	0.0086
B	25	80.7	154	65.3		22	66.7	157	67.1		44	84.6	135	62.8		33	80.5	143	64.7		24	22.6	155	96.3		40	85.1	139	63.2	
B/C	0	0.0	7	3.0		1	3.0	6	2.6		0	0.0	7	3.3		1	2.4	6	2.7		3	2.8	4	2.5		0	0.0	7	3.2	
C	6	19.4	74	31.4		10	30.3	70	29.9		8	15.4	72	33.5		7	17.1	71	32.1		78	73.6	2	1.2		7	14.9	73	33.2	
無法分別	1		2			0		3			0		3			0		3			3		0			1		2		
基線ALT																														
≤40 IU/liter	29	90.6	204	85.7	0.5898	30	90.9	203	85.7	0.5902	46	88.5	187	85.8	0.8225	35	85.4	194	86.6	0.8061	93	85.3	140	87.0	0.7211	45	93.8	188	84.7	0.1097
>40 IU/liter	3	9.4	34	14.3		3	9.1	34	14.3		6	11.5	31	14.2		6	14.6	30	13.4		16	14.7	21	13.0		3	6.3	34	15.3	
基線Acute Exacerbation <sup>c</sup>																														
無	32	100.0	234	98.3	1.0000	33	100.0	233	98.3	1.0000	51	88.1	215	98.6	0.5773	41	100	220	98.2	1.0000	108	99.1	158	98.1	0.6499	48	100.0	218	98.2	1.0000
有	0	0.0	4	1.7		0	0.0	4	1.7		1	1.9	3	1.4		0	0.0	4	1.8		1	0.9	3	1.9		0	0.0	4	1.8	
HCC																														
否	25	78.1	129	54.2	0.0126	26	78.8	128	54.0	0.0081	36	69.2	118	54.1	0.0610	32	78.0	120	53.6	0.0035	46	42.2	108	67.1	<0.0001	36	75.0	118	53.1	0.0061
是	7	21.9	109	45.8		7	21.2	109	46.0		16	30.8	100	45.9		9	22.0	104	46.4		63	57.8	53	32.9		12	25.0	104	46.9	
nt1762/nt1764 <sup>d</sup>																														
野生型(A/G)	18	64.3	118	51.1	0.4198	17	51.5	119	52.7	0.8490	30	60.0	106	50.7	0.4241	28	70.0	106	49.3	0.0557	32	31.4	104	66.2	<0.0001	25	58.1	111	51.4	0.6130
變異型(T/A)	10	35.7	98	42.4		15	45.5	93	41.2		19	38.0	89	42.6		12	30.0	94	43.7		57	55.9	51	32.5		17	39.5	91	42.1	
其他	0	0.0	12	5.2		1	3.0	11	4.9		0	0.0	11	5.3		0	0.0	12	5.6		11	10.8	1	0.6		1	2.3	11	5.1	
deletion/frameshift	0	0.0	3			0	0.0	3	1.3		1	2.0	3	1.4		0	0.0	3	1.4		2	2.0	1	0.6		0	0.0	3	1.4	
無資料	11					11					11					15					11					11				

<sup>a</sup>除了對照組頻率最高的核苷酸為野生型外，其餘核苷酸型態皆歸類為變異型，但是deletion並不納入分析

<sup>b</sup>只有針對基因型 B型及C型作P值之計算

<sup>c</sup>基線Acute Exacerbation定義為基線ALT>200 IU/liter

<sup>d</sup>只有針對野生型與變異型作P值計算

表四. Nested Case-Control study：核苷酸變異的累積與HBeAg、anti-Hbe和HCC的關係

核苷酸變異 累積數目 <sup>a</sup>	HBeAg(+) (n=35)		HBeAg(-) (n=233)		P 值	trend P <sup>b</sup>	AntiHBe(+) (n=192)		AntiHBe(-) (n=76)		P 值	trend P	病例組 (n=116)		對照組 (n=154)		P 值	trend P	OR <sup>c</sup>	95% CI
	No	%	No	%			No	%	No	%			No	%	No	%				
	-1	19	55.9	49			21.4	<0.0001	<0.0001	32			16.8	36	50.0	<0.0001				
0	14	41.2	84	36.7			71	37.2	27	37.5			44	38.9	54	35.5			1.00	
1	1	2.9	49	21.4			43	22.5	7	9.7			15	13.3	35	23.0			0.52	(0.25-1.07)
2	0	0.0	31	13.5			29	15.2	2	2.8			8	7.1	25	16.5			0.38	(0.15-0.93)
3	0	0.0	12	5.2			12	6.3	0	0.0			1	0.9	11	7.2			0.08	(0.01-0.63)
4	0	0.0	4	1.8			4	4.2	0	0.0			0	0.0	4	2.6				
無資料 <sup>d</sup>	1		4				1		4				3		2					

<sup>a</sup> 此處為nt1938、nt1961、nt2045、nt2239、nt2354和nt2441共6個核苷酸的累積，令所有核苷酸野生型皆為0，除nt2354變異令為"-1"，其他核苷酸變異皆令為"1"

<sup>b</sup> Mantel-Haenszel chi-square test for linear trend

<sup>c</sup> 調整進入研究之年齡(連續變項)；累積數目3個與4個併在一起合算OR

<sup>d</sup> 無資料為nt2239是"deletion"者



表五. Longitudinal cohort study：病例組與對照組之基本特徵

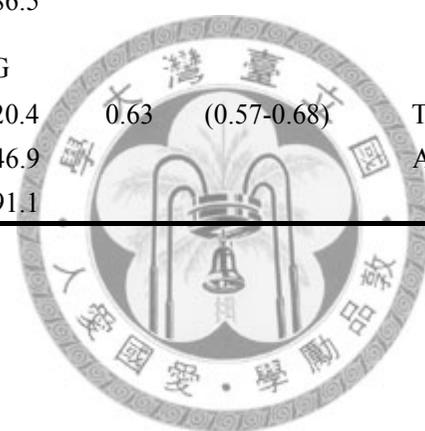
變項名稱	病例組 (n=112)		對照組 (n=1031)		P 值
	No	%	No	%	
進入研究年齡(歲)					
30-39	13	11.6	371	36.0	<0.0001
40-49	40	35.7	398	38.6	
50-59	29	25.9	161	15.6	
≥60	30	26.8	101	9.8	
病毒基因型					
B	47	42.3	825	81.3	<0.0001
B/C	6	5.4	45	4.4	
C	58	52.3	145	14.3	
無法分別	1		16		
HBeAg					
陰性	93	84.5	914	90.8	0.0418
陽性	17	15.5	92	9.2	
無資料	2		25		
HBV DNA 濃度 (log copies/ml)					
平均值±SD	5.91 ± 2.02		4.40 ± 1.91		<0.0001
基線ALT					
≤40 IU/liter	83	74.8	962	93.3	<0.0001
>40 IU/liter	28	25.2	69	6.7	
無資料			1		
Acute Exacerbation <sup>a</sup>					
無	106	94.6	986	95.6	0.6277
有	6	5.4	45	4.4	
肝硬化 <sup>b</sup>					
無	35	34.7	911	94.1	<0.0001
有	66	65.4	57	5.9	
無資料	11		63		
nt1938					
T(野生型)	106	97.3	908	90.8	0.0633
T/C Duplex	2	1.8	44	4.4	
C(變異型)	1	0.9	48	4.8	
無訊號	3		31		
nt2045					
T(野生型)	96	87.3	737	74.8	0.0081
T/A Duplex	1	0.9	46	4.7	
A(變異型)	13	11.8	202	20.5	
無訊號	2		46		
nt1742/nt1764					
A/G(野生型)	35	32.7	697	70.1	<0.0001
Mixed	5	4.7	49	4.9	
T/A(變異型)	67	62.6	249	25.0	
無訊號	5		36		

a Acute Exacerbation<sup>a</sup> 定義為長期ALT之任一點>200 IU/liter

b 定義為長期檢查中任一次有被超音波照到肝硬化者

表六. Longitudinal cohort study : SNP長期變異之穩定性

基線	隔4~6年						Kappa	95% CI	基線	隔4~6年				Kappa	95% CI
			T/C Duplex		T					C/Duplex		T			
nt1938 (n=586)	C		T/C Duplex		T		0.28	(0.16-0.39)	C/Duplex		T		0.37	(0.23-0.51)	
C(變異型)	7	33.3	2	9.5	12	57.1			C/Duplex	17	34.7	32			65.3
T/C Duplex	6	21.4	2	7.1	20	71.4			T	17	3.2	520			96.8
T	10	1.9	7	1.3	520	96.8									
nt2045 (n=717)	A		T/A Duplex		T		0.47	(0.40-0.54)	A/Duplex		T		0.49	(0.42-0.56)	
A(變異型)	98	63.2	6	3.9	51	32.9			A/Duplex	62.8	68	37.2			86.5
T/A Duplex	7	25.0	4	14.3	17	60.7			T	72	13.5	462			86.5
T	53	9.9	19	3.6	462	86.5									
nt1762/nt1764 (n=742)	T/A		Mixed		A/G		0.63	(0.57-0.68)	T/A / Mixed		A/G		0.68	(0.62-0.74)	
T/A(變異型)	152	73.8	12	5.8	42	20.4			T/A / Mixed	181	76.0	57			24.0
Mixed	12	37.5	5	15.6	15	46.9			A/G	45	8.9	459			91.1
A/G	29	15.0	16	48.5	459	91.1									



表七. Longitudinal cohort study : SNP與HCC進程之關係

變項名稱	nt1938				P 值	nt2045				P 值	nt1762/nt1764				P 值
	變異型 <sup>a</sup>		野生型			變異型		野生型			變異型		野生型		
	(n=95)	(n=1014)	(n=261)	(n=833)		(n=370)	(n=732)								
No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%				
基線															
ALT															
≤40 IU/liter	90	94.7	922	91.0	0.2566	241	92.3	761	91.4	0.7020	325	88.1	684	93.4	0.0037
>40 IU/liter	5	5.3	91	9.0		20	7.7	72	8.6		44	11.9	48	6.6	
無資料			1			1					1				
Acute Exacerbation <sup>b</sup>															
無	95	100.0	1010	99.6	1.0000	260	99.2	831	99.8	0.2435	368	99.5	730	99.7	0.6059
有	0	0.0	4	0.4		2	0.8	2	0.2		2	0.5	2	0.3	
追蹤期間															
ALT異常性 <sup>c</sup>															
正常	56	62.9	502	55.4	0.0590	144	61.3	406	54.6	0.0101	172	52.4	393	59.4	0.0430
異常≤50%	27	30.3	262	28.9		70	29.8	214	28.8		97	29.6	185	28.0	
異常>50%	6	6.7	142	15.7		21	8.9	124	16.7		59	18.0	84	12.7	
無資料	6		108			27		89			42		70		
Acute Exacerbation <sup>d</sup>															
無	91	95.8	968	95.5	1.0000	252	96.2	792	95.1	0.6138	346	93.5	705	96.3	0.0475
有	4	4.2	46	4.5		10	3.8	41	4.9		24	6.5	27	3.7	
肝硬化 <sup>e</sup>															
無	88	96.7	830	87.6	0.0058	232	94.7	669	86.0	0.0001	272	78.2	640	93.8	<0.0001
有	3	3.3	118	12.5		13	5.3	109	14.0		76	21.8	42	6.2	
無資料	4		66			17		55			22		50		
HCC															
否	92	96.8	908	89.6	0.0184	248	94.7	737	88.5	0.0031	298	80.5	697	95.2	<0.0001
是	3	3.2	106	10.5		14	5.3	96	11.5		72	19.5	35	4.8	

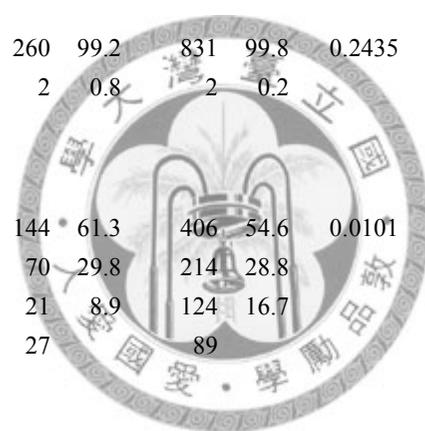
<sup>a</sup> Duplex型併入變異型中做分析

<sup>b</sup> Acute Exacerbation定義為基線ALT>200 IU/liter

<sup>c</sup> 正常表示長期ALT皆≤40 IU/liter；異常≤50%表示ALT>40 IU/liter之頻率小於所有來訪次數之一半；異常>50%表示ALT>40 IU/liter之頻率大於所有來訪次數之一。

<sup>d</sup> Acute Exacerbationa 定義為長期ALT之任一點>200 IU/liter

<sup>e</sup> 定義為長期檢查中任一次有被超音波照到肝硬化者



表八. Longitudinal cohort study：長期HBV DNA濃度之Trajectory groups其生物特徵

變項名稱	穩定低 <sup>a</sup> (n=686)		穩定高 (n=367)		漸降 (n=90)		P 值
	No	%	No	%	No	%	
進入研究年齡(歲)							
平均值±SD	45.2 ± 9.2		47.0 ± 9.3		42.9±8.5		0.0001
nt1938							
野生型	597	90.2	328	91.9	89	98.9	0.0078
變異型 <sup>b</sup>	65	9.8	29	8.1	1	1.1	
無資料	24		10				
nt1938兩時點變異							
野生型→野生型	226	85.6	225	89.6	69	97.2	0.1524
變異型→變異型	8	3.0	9	3.6	0	0.0	
野生型→變異型	11	4.2	5	2.0	1	1.4	
變異型→野生型	19	7.2	12	4.8	1	1.4	
無資料	422		116		19		
nt1938兩時點變異							
野生型→野生型	226	85.6	225	89.6	69	97.2	0.0130
其他 <sup>c</sup>	38	14.4	26	10.4	2	2.8	
無資料	422		116		19		
nt2045							
野生型	473	73.5	273	75.6	87	96.7	<0.0001
變異型	171	26.6	88	24.4	3	3.3	
無資料	42		6				
nt2045兩時點變異							
野生型→野生型	225	59.1	170	64.4	67	93.1	<0.0001
變異型→變異型	61	16.0	53	20.1	1	1.4	
野生型→變異型	43	11.3	27	10.2	2	2.8	
變異型→野生型	52	13.7	14	5.3	2	2.8	
無資料	305		103		18		
nt2045兩時點變異							
野生型→野生型	225	59.1	170	64.4	67	93.1	<0.0001
其他	156	40.9	94	35.6	5	6.9	
無資料	305		103		18		
nt1762/nt1764							
野生型	450	69.2	217	59.8	65	73.0	0.0039
變異型	200	30.8	146	40.2	24	27.0	
無資料	36		4		1		
nt1762/nt1764兩時點變異							
野生型→野生型	255	63.9	159	58.5	45	63.4	<0.0001
變異型→變異型	70	17.5	95	34.9	16	22.5	
野生型→變異型	24	6.0	12	4.4	9	12.7	
變異型→野生型	50	12.5	6	2.2	1	1.4	
無資料	287		95		19		
nt1762/nt1764兩時點變異							
野生型→野生型	255	63.9	159	58.5	45	63.4	0.3499
其他	144	36.1	113	41.5	26	36.6	
無資料	287		95		19		

變項名稱	穩定低 <sup>a</sup> (n=686)		穩定高 (n=367)		漸降 (n=90)		P 值
	No	%	No	%	No	%	
病毒基因型							
B	529	78.8	302	82.7	41	45.6	<0.0001
B/C	31	4.6	14	3.8	6	6.7	
C	111	16.5	49	13.4	43	47.8	
無資料	15		2				
HBeAg							
陰性	657	98.2	335	93.8	15	16.7	<0.0001
陽性	12	1.8	22	6.2	75	83.3	
無資料	17		10				
基線ALT							
≤40 IU/liter	647	94.3	324	88.5	74	82.2	<0.0001
>40 IU/liter	39	5.7	42	11.5	16	17.8	
無資料			1				
ALT異常性 <sup>d</sup>							
正常	457	72.8	112	35.0	14	18.0	<0.0001
異常≤50%	133	21.2	132	41.3	29	37.2	
異常>50%	38	6.1	76	23.8	35	44.9	
無資料	58		47		12		
Acute Exacerbation <sup>e</sup>							
無	679	99.0	340	92.6	73	81.1	<0.0001
有	7	1.0	27	7.4	17	18.9	
肝硬化 <sup>f</sup>							
無	621	95.5	269	80.3	56	66.7	<0.0001
有	29	4.5	66	19.7	28	33.3	
無資料	36		32		6		
HCC							
否	654	95.3	3017	83.6	710	77.8	<0.0001
是	32	4.7	60	16.4	20	22.2	

a 三組分類依據為長期HBV DNA 濃度趨勢，參照圖二

b Duplex型併入變異型中做分析

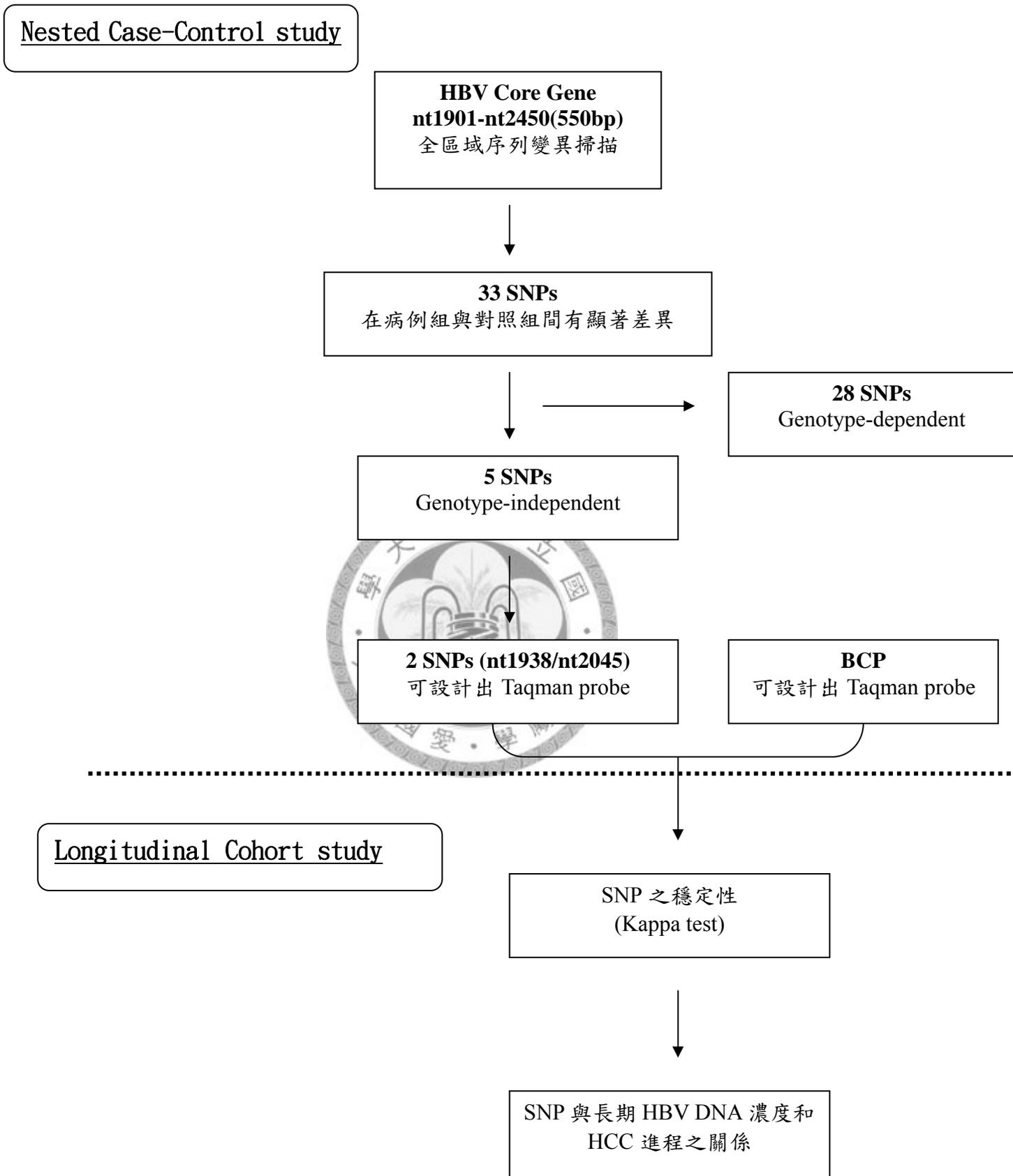
<sup>c</sup> 其他包含"變異型→變異型"、"野生型→變異型"和"變異型→野生型"

<sup>d</sup> 正常表示長期ALT皆≤40 IU/liter；異常≤50%表示ALT>40 IU/liter之頻率小於所有來訪次數之一  
異常>50%表示ALT>40 IU/liter之頻率大於所有來訪次數之一半

<sup>e</sup> Acute Exacerbationa 定義為長期ALT之任一點>200 IU/liter

<sup>f</sup> 定義為長期檢查中任一次有被超音波照到肝硬化者

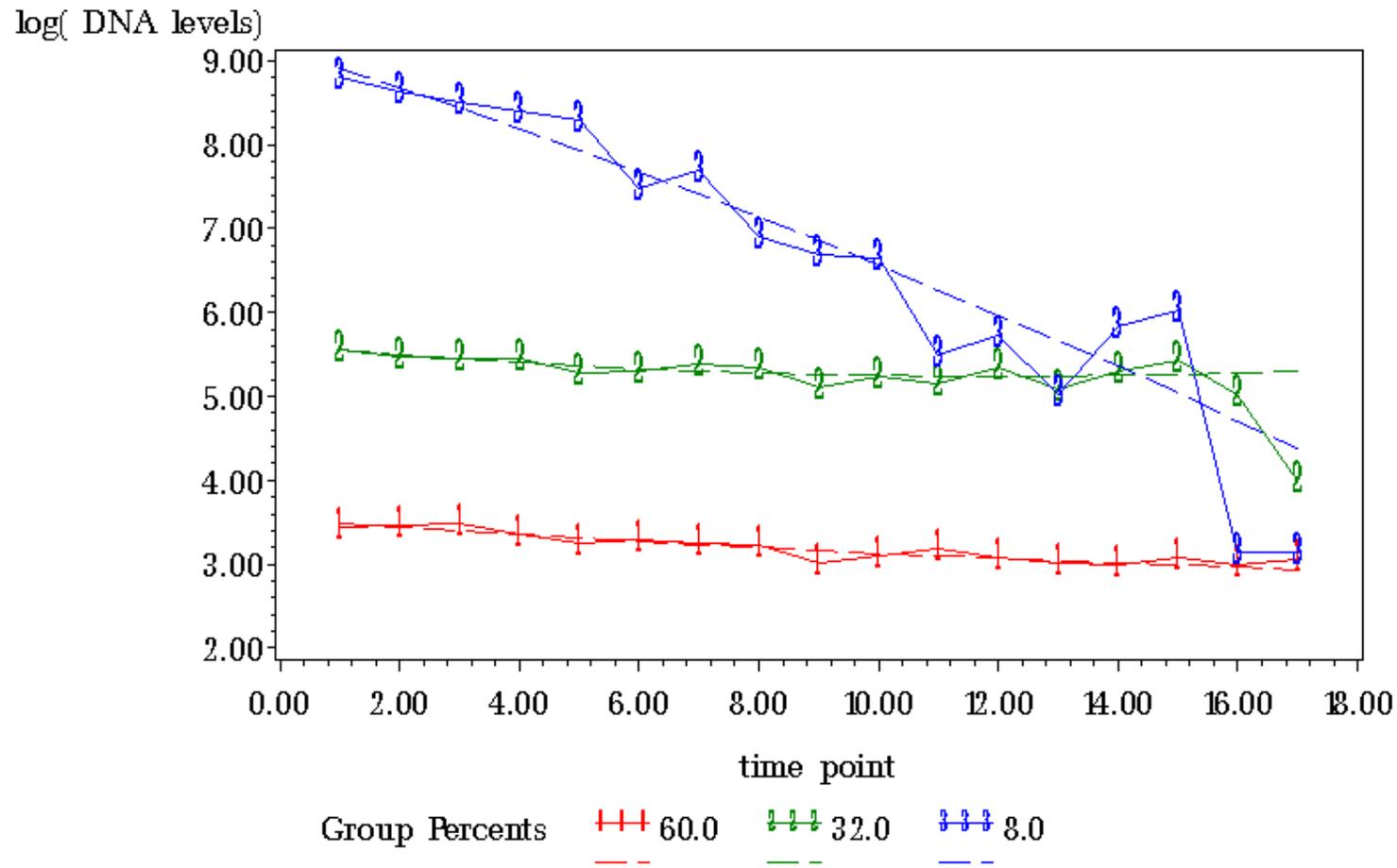
圖一. 研究設計之流程圖



圖二. Longitudinal Cohort study : 長期HBV DNA濃度之Trajectory分析

# Longitudinal HBV DNA levels

Cnorm Model



Group1 : 穩定低, Group2 : 穩定高, Group3 : 漸降