

C型肝炎病毒基因分型及其臨床重要性

謝佩真 郭行道¹ 卓文春 廖永樑 林靖南

財團法人奇美醫學中心 病理部臨床病理科 ¹內科部肝膽腸胃科

摘要

C型肝炎病毒是造成輸血性肝炎、非A、B型肝炎的主因。C型肝炎以長期緩慢性病徵為主，常發展成慢性的重大疾病，包括：肝纖維化、肝硬化與肝癌。依據C型肝炎病毒基因的序列，將現行所有的C型肝炎病毒分成6個基因型，而主要分型序列位在C型肝炎之E1、NS5B與core基因內。目前C型肝炎治療以干擾素(interferon)與雷巴威林(ribavirin)合併12-72週給藥。然而就感染第一型與第四型的C肝病毒患者而言，僅有40-50%病人可有效的消滅血中病毒，相對於感染第二型、第三型C肝病毒個體而言，有高達80%可達成此狀態。文獻指出：藥物的療效與C型肝炎基因型和突變處有關。因此，在治療C型肝炎前，辨別C型肝炎病毒之基因分型與突變分析對於臨床評估與治療方式就相當重要。本文將針對HCV基因的組成、各型別目前的治療方式，以及臨床上常用的HCV基因分型檢測法做些概略的陳述。

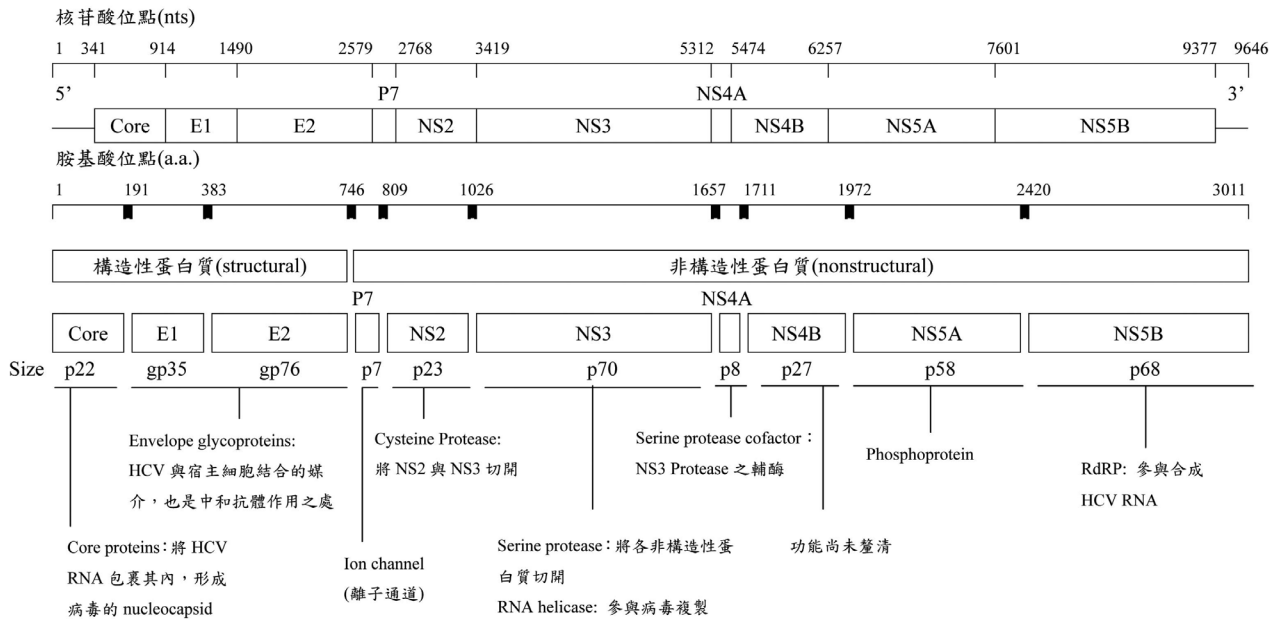
關鍵詞：HCV基因分型(HCV genotype)
肝炎(Hepatitis)
干擾素(Interferon)
雷巴威林(Ribavirin)

前言

C型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)最早是在1989年，由Qui-Lim Choo與George Kuo等人於感染非A非B型肝炎(non-A, non-B hepatitis)病人血清中所分離鑑定而得，是最早直接以分子生物學法選殖出之病毒¹。迄今，全球約有超過一億七千萬人已被證實感染HCV，比例高達全球總人口數的3%^{2,3}。當被HCV感染後，有70~80%的人是無症狀的，約有20~30%會產生急性感染，出現疲倦、厭食、黃疸…等症狀；只有15-25%的人會因免疫系統的作用而清除體內

的HCV RNA，有高達75-85%的病人會成為慢性感染；而慢性HCV感染的病人中，在未來的20年後有10-20%可能演變成肝硬化，每年甚至有1-4%肝硬化的病人會轉化成肝癌^{4,5}。

HCV為RNA病毒，會因為中性演化(neutral evolution)、適應性突變(adaptive mutations)、病毒複製缺失及病毒重組等因素累積造成其基因的多變性，大致可分成1~6等六大基因型(genotype)，包含了數十種亞型(subtype)，不同的基因型具有高地域性的差異，對於抗病毒藥物的感受性也不盡相同，因此了解HCV基因型



圖一：HCV基因組及產物此全長基因組以isolate H77 (Accession number AF009606)為樣本。

在C型肝炎的診斷、治療上，甚至是疫苗的開發是相當重要的。本文將針對HCV基因的組成，基因型的起源、分類與流行病學，各型別目前的治療方式，以及臨床上常用的HCV基因分型檢測法做些概略的陳述。

基因組成 (Genomic organization)

HCV隸屬於黃熱病毒科(Flaviviridae)肝炎病毒屬(Hepacivirus)，具有外套膜 (envelope)，帶有一段正性-正股RNA (positive-sense)作為其遺傳物質。此基因組長約10,000個核糖核酸，其中包含了5' 端非轉譯區(untranslated region/UTR)，一個開放讀碼區(open reading frame/ORF)，以及3' 端非轉譯區(UTR)。基因組在宿主細胞體內會轉譯生成polyprotein precursor，再經由宿主與病毒的蛋白酶切割成特有的病毒蛋白質，包括：3個構造性蛋白質(C,E1,E2)，7個非構造性蛋白質(P7, NS2, NS3, NS4, NS5)⁶⁻⁹ (圖一)，功能如下：

一、5'UTR：此區域包含一段IRES (internal ribosomal entry site)，為40S ribosomal element結合決定位，是為轉譯作用起始所必須¹⁰⁻¹³。此區段的RNA序列在各基因型中的相似度最高，因此是臨床上最常用來偵測HCV RNA的區段。

二、Core/C：為HCV之病毒核心(core protein)，是一種鹼性的RNA-binding protein，與RNA結合，將HCV RNA包裹其內，形成病毒的nucleocapsid，目前已證與誘發肝硬化甚至肝癌有關¹⁴⁻¹⁶。另外，此區會經由不同的讀碼區(reading frame)而合成一個約160個胺基酸大小的蛋白質，稱之為ARFP (alternative reading protein) 或F (frame shift)蛋白質，但功能目前尚未釐清¹⁷。此外，核心蛋白之第70個或第91個氨基酸多型性，亦可作為標準治療HCV之療效預測因子^{18,19}。

三、Envelope /E1, E2：E1與E2為糖蛋白，會以非共價結合成heterodimers鑲嵌在宿主細胞內的ER lumen上，再經由宿主與病毒的蛋白酶切割成E1與E2。E1即HCV套膜蛋白gp35；E2即C型肝炎病毒套膜蛋白gp70。E2已被證實會與宿主肝臟細胞表面的CD81結合，進而促進HCV進入宿主細胞²⁰。此區段的序列具有高度變異性(HVR)，以逃避宿主免疫系統的攻擊，增加潛伏性感染的機會。

四、P7：位於構造性蛋白質基因與非構造性蛋白質基因之間，具有離子通道(ion channel)的功能^{21,22}。

五、NS2：合成HCV之蛋白酶(Cysteine Protease)，

用以將NS2與NS3切開。

六、NS3：合成HCV之絲胺酸蛋白酶(Serine Protease)與RNA解旋酶(RNA helicase/ NTPase)，這些酵素活性是病毒複製所不可或缺的，而NS3 Serine Protease負責將各非構造性蛋白質切開，且已被證實會藉由抑制RIG-1TLR3訊息傳遞路徑而影響宿主的先天免疫系統^{23,24}，因此可作為抗病毒藥物的標靶，已有相關研究使用Serine Protease inhibitor來治療C型肝炎病毒感染²⁵。

七、NS4：包含NS4A、NS4B兩種蛋白質，NS4A為NS3 Protease輔酶；NS4B的功能目前尚未釐清。

八、NS5：包含NS5A、NS5B兩種蛋白質，NS5A其上許多的絲胺酸根可被細胞的激酶(包括：AKT, P70S6K, MEK1, MKK6…)磷酸化成hypophosphorylated及hyperphosphorylated形式，有些研究指出此區的變異具阻斷干擾素治療的效果²⁶；NS5B除了作為cis-acting replication element外，並可合成RNA-dependent RNA polymerase/RdRp，參與合成負股RNA以及正股RNA，是病毒複製時所需要的必備條件，因此也是抗病毒藥物的重要標的²⁷⁻³⁰。文獻指出：儘管在體外實驗中，E2、NS3/4與NS5A都與干擾素治療抗性相關³¹⁻³⁴。但臨床的研究統計只證實了NS5A蛋白質中某段干擾素感受性決定區域(interferon sensitivity determining region; ISDR)、PKR binding domain之突變以及完整的NS5A蛋白質可能與干擾素的療效有關³⁵⁻³⁷。近來更有研究直指，除了這些與抗藥性有關的基因外，更有可能合併整個HCV基因體內其他位置突變而造成治療的失敗^{38,39}。

九、3' UTR：包含了一個約40個核苷酸長的非變異區(nonessential variable region, poly U/UC tract)，一個高度保留區，及一個3'X domain，但詳細功能目前尚未釐清⁴⁰。

基因變異性(Genetic diversity)

1991年第一個HCV完整基因首先被定序出來⁴¹，隨後陸續分離出其他的病毒株並完成定序，然而卻發現這些不同的病毒株存在這高達33%以上的差異性⁴²。在第二屆C型肝炎與其他相關病

表一：C型肝炎病毒基因型分類依據

分類	表示符號	定義	核苷酸序列的差異性(%)
基因型(genotype)	1-6	不同C型肝炎病毒分離株基因的異質性	30~35
亞型(subtype)	abc...	同一基因型不同病毒分離株基因間的差異性	20~25
類種(quasispecies)		同一亞型因複製過程而累積的突變	1~10

毒研討會(the 2nd International conference of HCV and Related Viruses)後，統一將HCV依序列變異程度的不同做系統性的分類，以便於往後的研究。HCV大致可分成1~6等六大基因型(genotype)，各基因型中核苷酸序列的差異在30~35%以上；每種基因型中又可區分出a、b、c、d...等數種亞型(subtype)，各亞型之間核苷酸的差異約在20~25%；然而同一亞型不同來源的病毒株其核苷酸序列仍存在著約10%左右的差異性，因為在RNA複製(RNA-dependent RNA replication)過程中，用來複製基因體的反轉錄酶或RNA複製酶缺乏校對(proofreading)的功能所致，將這類差異歸為不同的類種(quasispecies)(表一)^{8,9,43-45}。

HCV六種主要的基因型主要起源於500-2000年前不等，各個亞型約起源70-200年前，可見這些變異是一點一滴長期累積而成的結果。在HCV完整基因組中，以5' UTR、Core、NS3、3' UTR等區域的變異較小，E1、E2、NS5A等區域則具有高度變異性，尤其是E2的高度變異區(HVR)。HCV基因的多樣性除了中性演化(neutral evolution)外，還有適應性突變(adaptive mutations)、病毒複製缺失、病毒重組等因素累積而成^{8,9}。

一、中性演化

在被HCV感染的黑猩猩，於急性感染期和慢性感染8年後，偵測體內C型肝炎病毒核苷酸序列的變化，發現平均每年每個位點約有 1.44×10^{-3} 會產生變異的機率；NS5區域每年每個位點約有 4.1×10^{-4} 的機會產生突變；E1區域每年每個位點產生變異的機率約為 7.1×10^{-4} ^{46,47}，長久累積而成neutral sequence drift，這些改變通常未改

變氨基酸序列，並未影響到病毒蛋白質的表現及功能，然而此類改變卻造就了C型肝炎病毒高地域性的差異。

二、適應性突變

HCV爲了適應宿主體內的免疫機制，並抵抗抗病毒藥物的攻擊，因而產生了適應性突變，尤以E區及NS區更爲常見。在E區中有一段高度變異區(hyper variable region, HVR)，藉此逃避宿主體內抗體的作用；NS3、NS5B區基因的突變不僅影響蛋白質的活性，也會改變與宿主細胞的作用；NS5A區的突變將改變其被磷酸化的程度，進而影響病毒複製的速度⁴⁸。HCV即藉由此廣泛的變異性來逃避宿主細胞型與體液型免疫系統的攻擊，這也是C型肝炎病毒疫苗難以發展的緣故之一。

三、病毒複製缺失

因爲RNA病毒在RNA複製過程中，用來複製基因體的反轉錄酶或RNA複製酶缺乏校對(proofreading)的功能，每進行一次複製，就有十萬分之一至萬分之一的出錯機率，雖然HCV病毒體(virions)的半存留期(half-life)約只有2.7小時，但複製病毒的速度每天卻可達到1012個病毒體之高，可見影響之鉅⁴⁹⁻⁵¹。

四、病毒重組

當同時暴露在不同基因型的HCV時，病毒在複製過程中，RNA可能會產生重組的現象，基因型2與基因亞型1b重組態(genotype2/1b recombinant)，以及基因型1a與1b重組態(genotype 1a/1b recombinant)均已被證實存在病人體內⁵²⁻⁵⁴，表示不同基因型間或同一基因型的不同亞型之間均可能發生重組。雖然目前存在的重組型不多，倘若未來重組型日益增多時，對於基因型的診斷、抗病毒藥物的療程、預後的評估等都將是一大挑戰。

全球分布

HCV基因型具有高地域性的差異，基因型1-3最爲常見，廣泛分佈美國、歐洲及亞洲地區(包括：日本、中國、台灣和泰國)，基因型4主要發生於中東、埃及、中非，基因型5-6則是主要在南非和東南亞。基因亞型3a感染者通常多爲

表二：全球各地HCV基因型分佈

基因型	亞型	分佈
1	a	廣佈於北歐和美國，與毒品濫用有關
	b	廣佈於全世界，是最常見的基因型，分佈於日本、台灣、南歐和東歐，感染者通常較爲年長，主要起因於輸血、接種疫苗以及過去30-70年來濫用毒品的共用針頭傳染所致。 在日本約有73%的病入是被1b所感染。 在台灣約有50-70%的病入是被1b所感染。
2	a、b	地中海國家及遠東地區(如：日本)
	c	較常發生於北義大利
3	a	最常見於歐洲國家的毒品濫用者
4	a	較常發生在中東、埃及、中非，與傳統療法(如Biharzia injections)有關
5	a	主要發生在南非
6	a	在香港、越南、印尼等東南亞國家，以及澳洲廣爲流行

注射毒品的年輕人，基因亞型1b的感染者則通常較爲年長(表二)。在非洲與東南亞國家HCV基因的變異性與其他地區不盡相同，亞型的變異較其他地區來的多，這說明了HCV在很早以前便存在於非洲及東南亞國家，基因型2主要分佈於西非，基因型1、4主要發生在中非，而基因型3較常見於南亞、東南亞，基因型6則主要分佈於東南亞，這些地區的流行是本土性的，起源不同，並非由他區域傳染而來^{8,9,55}。

在台灣HCV以基因亞型1b的感染最爲廣泛，約佔50-70%。基因亞型1b感染的患者病程通常較爲嚴重，較易演變成肝癌。HCV感染的肝癌患者中約有60.3%爲基因亞型1b，所佔比例較慢性肝炎(38.7%) ($P = 0.003$)或肝硬化(38.7%) ($P < 0.001$)來的高；而基因亞型2a或2c感染的肝癌患者只占約16.8%，較慢性肝炎(36.8%) ($P < 0.001$)或肝硬化(38.7%) ($P < 0.001$)低，可見基因亞型1b是肝癌的重要危險因子^{56,57}。但也有其他不同的論點反駁此現象，不外乎基因型不能從其他影響肝臟疾病進展的元素中(例如：年紀、感染期、病毒量、飲酒、生活習慣等)區別開來作爲獨立元素，故無法展開前瞻性研究⁵⁸⁻⁶¹。此外，HCV基因型的分佈在臺灣地區具有城鄉差異，在北台灣基因亞型1b約佔了58-73%，基因亞型2a約有7.4-26%；南台灣基因亞型1b約佔48-64.3%，而基因亞型2a也占約35.7-41.4%⁶²⁻⁶⁶，

以高雄地區為例，高雄市、高雄縣梓官鄉及桃源鄉以基因亞型1b感染為主，所佔比例分別為47%、61.9%與76.9%；馬沙溝則以基因亞型2a為主，佔約63.5%⁶⁷。

抗病毒藥物治療效果

目前臨床上用來治療C型肝炎的用藥主要是長效型的干擾素 (pegylated interferon (IFN) alfa 和雷巴威林 (ribavirin)。基因型1感染的患者以IFN治療後，約只有10-20%的病人體內的病毒可以完全被清除；若結合IFN和ribavirin，也僅有40-50%患者可以痊癒，而基因型2和基因型3則分別約有50%或70-80%的機率可以被治癒⁶⁸⁻⁷⁰。基因型1較易造成潛伏感染，所引發的肝病也較基因型2和基因型3嚴重，尤其是基因亞型1b，復發的機率也較其他基因型高^{9,71}。綜合上述，可見感染的HCV基因型對於治療的劑量、時間的重要性，偵測HCV基因型是治療過程的一項重要指標。

茲將美國國家衛生院 (National Institutes of Health, NIH) 於2002年訂下C型肝炎治療的標準^{2,72-75}、2007發表於台灣醫學雜誌⁷⁶與世界知名期刊⁷⁷以及2008年發表於台灣消化醫學期刊之C型肝炎治療建議⁷⁸整理如下：血清HCV RNA陽性之慢性C肝患者皆應考慮接受肝穿刺檢查判定肝組織發炎程度及纖維化級別。肝纖維化程度達一級以上時，患者應接受治療。無纖維化者，定期追蹤即可，除非病人有強烈意願接受根治性治療。無治療者臨床追蹤5~10年後，可考慮再次肝穿刺檢查，作為治療與否的依據。治療方式與基因型別有關，整理於表三中，容下分述：

一、基因型1 (Genotype 1)

HCV基因型1感染的病人在進行治療前，建議先以肝臟切片或肝臟超音波、血清學(如：ALT、AFP…)等非侵入性檢查評估疾病的嚴重度。若未出現任何異常現象，且血清中HCV RNA病毒量<50 IU/ml者，並不需要給予治療，持續追蹤即可。若出現ALT持續增加、肝臟發炎或纖維化、甚至肝硬化等病症，則需給予pegylated IFN alfa合併ribavirin治療之：

(一)、pegylated IFN alfa-2a每週給予180 μ g (或每人每公斤每週可以給予1.5 μ g之Pegylated IFN alfa-2b)；體重75公斤以下者每天合併給予1.0 g的ribavirin，體重超過75公斤者則提高劑量至1.2 g，治療48週為一完整療程。在治療12週後，進行第一次的評估：血清中HCV RNA病毒量較治療前減少超過100倍，此稱早期病毒學反應(early virology response, EVR)，持續給予治療；反之，表示此療程並未達到抑制病毒的效果，則考慮停止療程，若持續治療只是期望減緩病程。在治療24週後，若病毒量仍低於檢測極限，持續進行完整個48週的療程後，有較高機率可以保有持續病毒反應(sustained viral response, SVR)，徹底清除HCV RNA，此時血清中HCV RNA應該仍是低於檢測極限；相反的，若HCV RNA依舊存在於血清中，建議停止療程，若持續治療祇是期望減緩病程。EVR為良好的陰性預測因子，也就是說：未達到，EVR患者，較無機會達成SVR。

(二)、尚未治療前血清中HCV RNA病毒量<400,000 IU/ml者，每人每公斤每週可以給予1.5 μ g之Pegylated IFN alfa-2b (或Pegylated IFN alfa-2a每週給予180 μ g)，並合併給予ribavirin治療，在治療4週後，血清中HCV RNA病毒量即低於檢測極限者，即快速病毒反應(RVR, rapid virological response)，持續給予治療，在治療24週後仍偵測不到病毒者，即可完成治療 (表三)。RVR為良好的陽性預測因子，亦即：達到RVR的患者，較容易達成SVR。反之，針對治療中第4或12週仍為病毒陽性反應者，延長至72週治療則療效較48週為佳。

二、基因型2或3 (Genotype 2 or 3)

IFN和ribavirin治療在基因型2或3感染的患者中，約有70-80%可以達到SVR的效果，且所需的Ribavirin劑量及治療時間均較基因型1少和短，因此，基因型2或3感染的病患通常建議不須經肝臟切片或其他非侵入性檢查即可直接進行療程。Pegylated IFN alfa給予劑量與基因型1相同(Pegylated IFN alfa-2a每週給予180 μ g，若是Pegylated IFN alfa-2b每人每公斤每週可以給予1.5 μ g)，每天合併給予0.8 g的ribavirin，如此

治療24週後，SVR效果相當高，血清中HCV RNA可被徹底清除之機會相當高。近來，有幾個研究證實：對於基因型2、3的慢性C型肝炎，若病人有達成RVR，則以長效型干擾素合併Ribavirin每天1~1.2 g (視體重決定劑量)，治療12~16週療程，其效果與24週完整療效相當^{79,80}。

三、基因型4、5或6 (Genotype 4, 5 or 6)

由於臨床上被基因型4、5或6的HCV感染病人較為少見，因此尚未經過臨床試驗建立一個完整的規範，目前僅先參照基因型1治療的標準，需完成整個48週的療程，對於哪些病人治療效果不佳，建議需停止治療者，目前仍不清楚(表三)。

分子基因分型 (Molecular genotyping)

HCV基因型的分佈具有地域性，而不同的基因型感染對於疾病的癒後、藥物治療效果有不同的影響，因此基因型的檢測相當重要。目前常用的檢測法如下：

一、定序後進行親緣分析(phylogenetic analysis)

HCV基因型的檢測以定序後進行親緣分析為標準的參考方法，目前以NS5、core、E1及5'UTR區段最常用來做為分析序列的標地。然而此法較為複雜，成本也較為昂貴，並不是在所有實驗室都能進行，而且有可能會忽略到多種基因型的共同感染。目前市面上常用的

表三：目前之C型肝炎治療準則

基因型	治療方式	療程				完成療程24週後
		治療4週後	治療12週後	治療24週後	治療48週後	
1	原始病毒量>600000 IU/ml, Pegylated IFN α -2a 180 μ g (每週), 合併 ribavirin 1.0 g (每天, 體重<75kg.) -1.2 g (體重 \geq 75kg)。		HCV RNA減少超過100倍或 HCV RNA(-), 持續治療	HCV RNA(-), 持續治療 HCV RNA(+), 停止療程或持續治療以減緩病程	HCV RNA(-), 完成療程。	HCV RNA(-), 保有持續病毒反應(SVR), 有機會徹底清除體內HCV。
	原始HCV RNA病毒量 <400,000 IU/ml; Pegylated IFN α -2b 1.5 μ g (每公斤, 每週), 合併 ribavirin 1.0-1.2g (每天)	有RVR者, 可考慮24週完成治療。	HCV RNA減少低於100倍, 停止療程或持續治療以減緩病程 檢測血中HCV RNA, 瞭解是否有EVR。	有RVR者, 且治療24週後, HCV(-), 完成療程。無RVR者, 繼續治療至48週才完成療程。	48週完成療程者, 發率較24週復療程低。	HCV RNA(-), 保有持續病毒反應(SVR), 有機會徹底清除體內HCV。
2或3	Pegylated IFN α -2a 180 μ g (每週), 或Pegylated IFN α -2b 1.5 μ g (每公斤, 每週), 合併 ribavirin 0.8g (每天)	檢測血中HCV RNA, 瞭解是否有RVR。可考慮12/16週完成治療。無RVR者, 需24週完整治療。		HCV RNA(-), 完成療程。 HCV RNA (+), 停止療程或持續治療以減緩病程。		HCV RNA(-), 保有持續病毒反應(SVR), 有機會徹底清除體內HCV。
4、5或6	Pegylated IFN α -2a 180 μ g (每週), 或Pegylated IFN α -2b 1.5 μ g (每公斤, 每週), 合併 ribavirin 1.0-1.2 g (每天)			療程未定, 目前比照基因型1做治療。	HCV RNA(-), 完成療程。	HCV RNA(-), 保有持續病毒反應(SVR), 有機會徹底清除體內HCV。

EVR: early virologic response (在治療12週後, 血清中HCV RNA病毒量較治療前減少超過100倍)。

RVR: rapid virologic response (治療4週後, 血清中HCV RNA病毒量即低於檢測極限者; <50 IU/ml)。

SVR: sustained virologic response(停止治療24週後, 此時血清中HCV RNA應該仍是低於檢測極限; <50 IU/ml)。

TRUGENE HCV 5' NC Genotyping Kit (Visible Genetics Inc., Toronto, Ontario, Canada)即利用此法^{81,82}。

二、限制酶片段長度多型性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)

C型肝炎病毒5'UTR或NS5區之核苷酸序列在某些基因型間的差異，恰可被某些限制酶(如：HinfI、BstNI、BstUI、SrfI和HinfI)切成大小不等的片段，然而並未能詳細區分出各個亞型^{43,83,84}。

三、反向線形探針雜交法(reverse hybridization line probe assay)

以各型別特異的探針(genotype-specific probes)和來自病人血清中HCV核酸的PCR產物進行雜交。目前廣為使用的INNOLiPA (Bayer Corp., Tarrytown, N.Y.) HCV基因分型試劑所使用的探針即是針對5'UTR區域進行雜交⁸⁵⁻⁸⁷。然而基因型1和基因型6之5'UTR區域核苷酸序列極為相似難以區分，基因亞型6c-6i和基因亞型1a/1b容易誤判，要確實區分出基因型1與基因型6的各個亞型，必須合併運用其他區域(如：core, E1, NS5b...)作為標的^{82,88}，因此研發新一代的LiPA試劑：VERSANT HCV Genotype 2.0 assay (Bayer HealthCare, Ghent, Belgium)，探針雜交的標地除了5'UTR區域，另包含了core區域，增加了專一性，能正確的將基因型6的亞型與基因亞型1a/1b區分出來⁸⁹。

四、即時聚合酶連鎖反應 (real-time PCR)

即時聚合酶連鎖反應 (real-time PCR)的高靈敏度、高專一性、快速的特性，在最近幾年已被廣泛用於分子診斷。自2002年開始，real-time PCR 也被陸續應用到HCV的基因型檢測^{68,69}，大致可分成SYBR green detection、Lightcycler probes、target-specific TaqMan probes三類。SYBR green detection、Lightcycler probes是利用不同型別其解離溫度 (melting temperatures, T_m) 的差異來作為分型的基準^{90,92}；target-specific TaqMan probes則是針對不同型別分別設計多組探針，利用各探針所標定的不同螢光來做鑑別^{93,94}。然而這些方法多數只能用於區分基因型1或非基因型1，近來已有學者能利用multiplex

real-time RT-PCR 區分出6種基因型⁹⁵，不過各亞型的鑑定仍尚未突破。

結論

經由學者多方面的努力與統計研究證實：以雷巴威林與干擾素合併治療C型肝炎之療效與HCV基因型有關。而HCV基因本身的多變性對於分子檢驗、抗病毒藥物的治療或是疫苗的開發都是相當大的挑戰，因此在系統性的分類標準訂定後，準確的HCV基因分型檢測法是相當重要的，有了正確的分型才能給予適當的治療。雖然干擾素雷巴威林與合併治療無法完全的治癒某些C肝患者，但新開發的藥物如：蛋白質酶抑制物(Ciluprevir, Telaprevir, Boceprevir)、RNA聚合酶抑制物包括類核苷物(Valopicitabine, R-1626)、非核苷類似物(HCV-796, XTL-2125)等等⁹⁶，配合干擾素、雷巴威林等合併治療，都有機會可將血中HCV RNA清除，若能因此建立哪些藥物適用於哪種基因型別，就更有可能達到SVR。此外倘能徹底了解HCV基因型在台灣的分布情形，我們便能建立一套適合台灣地區的治療準則，進而冀望將台灣地區的C型肝炎疾病徹底消除。

參考文獻

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-62.
2. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. *NIH Consensus State Sci Statements* 2002; 19: 1-46.
3. Koziel MJ, Peters MG. Viral hepatitis in HIV infection. *N Engl J Med* 2007; 356: 1445-54.
4. Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 2006; 3: 47-52.
5. Zoulim F, Chevallier M, Maynard M, Trepo C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection. *Rev Med Virol* 2003; 13: 57-68.
6. Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV): 2006 Update. *Int J Med Sci* 2006; 3: 29-34.
7. Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 2005; 436: 933-8.
8. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol* 2004; 85: 3173-88.
9. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes.

- Clin Microbiol Rev 2000; 13: 223-35.
10. Han JH, Shyamala V, Richman KH, et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88: 1711-5.
 11. Otto GA, Puglisi JD. The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. Cell 2004; 119: 369-80.
 12. Pestova TV, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ, Hellen CU. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. Genes Dev 1998; 12: 67-83.
 13. Spahn CM, Kieft JS, Grassucci RA, et al. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40S ribosomal subunit. Science 2001; 291: 1959-62.
 14. Hope RG, Murphy DJ, McLauchlan J. The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. J Biol Chem 2002; 277: 4261-70.
 15. Lerat H, Honda M, Beard MR, et al. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. Gastroenterology 2002; 122: 352-65.
 16. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. Nat Med 1998; 4: 1065-7.
 17. Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. Semin Liver Dis 2005; 25: 105-17.
 18. Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, et al. A matched case-controlled study of 48 and 72 weeks of peginterferon plus ribavirin combination therapy in patients infected with HCV genotype 1b in Japan: amino acid substitutions in HCV core region as predictor of sustained virological response. J Med Virol 2009; 81: 452-8.
 19. Mori N, Imamura M, Kawakami Y, et al. Randomized trial of high-dose interferon-alpha-2b combined with ribavirin in patients with chronic hepatitis C: Correlation between amino acid substitutions in the core/NS5A region and virological response to interferon therapy. J Med Virol 2009; 81: 640-9.
 20. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. Science 1998; 282: 938-41.
 21. Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. FEBS Lett 2003; 535: 34-8.
 22. Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, et al. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 6104-8.
 23. Gale M, Jr., Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. Nature 2005; 436: 939-45.
 24. Meylan E, Curran J, Hofmann K, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. Nature 2005; 437: 1167-72.
 25. De Francesco R, Migliaccio G. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. Nature 2005; 436: 953-60.
 26. Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. Virology 2001; 284: 1-12.
 27. Ivashkina N, Wolk B, Lohmann V, et al. The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. J Virol 2002; 76: 13088-93.
 28. Moradpour D, Brass V, Bieck E, et al. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. J Virol 2004; 78: 13278-84.
 29. Schmidt-Mende J, Bieck E, Hugle T, et al. Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. J Biol Chem 2001; 276: 44052-63.
 30. You S, Stump DD, Branch AD, Rice CM. A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. J Virol 2004; 78: 1352-66.
 31. Hofmann WP, Zeuzem S, Sarrazin C. Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon alpha-based antiviral therapy. J Clin Virol 2005; 32: 86-91.
 32. Foy E, Li K, Wang C, et al. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. Science 2003; 300: 1145-8.
 33. Taylor DR, Tian B, Romano PR, et al. Hepatitis C virus envelope protein E2 does not inhibit PKR by simple competition with autophosphorylation sites in the RNA-binding domain. J Virol 2001; 75: 1265-73.
 34. Ukai K, Ishigami M, Yoshioka K, et al. Mutations in carboxy-terminal part of E2 including PKR/eIF2alpha phosphorylation homology domain and interferon sensitivity determining region of nonstructural 5A of hepatitis C virus 1b: their correlation with response to interferon monotherapy and viral load. World J Gastroenterol 2006; 12: 3722-8.
 35. Castelain S, Khorsi H, Roussel J, et al. Variability of the nonstructural 5A protein of hepatitis C virus type 3a isolates and relation to interferon sensitivity. J Infect Dis 2002; 185: 573-83.
 36. Kobayashi M, Watanabe K, Ishigami M, et al. Amino acid substitutions in the nonstructural region 5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and its relation to viral load and response to interferon. Am J Gastroenterol 2002; 97: 988-98.
 37. Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. J Virol 2002; 76: 11079-90.
 38. Munoz de Rueda P, Casado J, Paton R, et al. Mutations in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 of hepatitis C virus genotype 1 and their relationships to

- pegylated interferon-ribavirin treatment responses. *J Virol* 2008; 82: 6644-53.
39. Torres-Puente M, Cuevas JM, Jimenez-Hernandez N, et al. Genetic variability in hepatitis C virus and its role in antiviral treatment response. *J Viral Hepat* 2008; 15: 188-99.
40. Yanagi M, St Claire M, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2291-5.
41. Choo QL, Richman KH, Han JH, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 2451-5.
42. Okamoto H, Kurai K, Okada S, et al. Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology* 1992; 188: 331-41.
43. Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, et al. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994; 19: 13-8.
44. Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995; 21: 570-83.
45. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19: 1321-4.
46. Okamoto H, Kojima M, Okada S, et al. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 1992; 190: 894-9.
47. Smith DB, Pathirana S, Davidson F, et al. The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol* 1997; 78 (Pt 2): 321-8.
48. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000; 290: 1972-4.
49. Domingo E, Escarmis C, Sevilla N, et al. Basic concepts in RNA virus evolution. *Faseb J* 1996; 10: 859-64.
50. Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF. Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 1998; 148: 1667-86.
51. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998; 282: 103-7.
52. Colina R, Casane D, Vasquez S, et al. Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2004; 85: 31-7.
53. Kalinina O, Norder H, Magnius LO. Full-length open reading frame of a recombinant hepatitis C virus strain from St Petersburg: proposed mechanism for its formation. *J Gen Virol* 2004; 85: 1853-7.
54. Kalinina O, Norder H, Mukomolov S, Magnius LO. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol* 2002; 76: 4034-43.
55. Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; 42: 962-73.
56. Lee CM, Hung CH, Lu SN, et al. Viral etiology of hepatocellular carcinoma and HCV genotypes in Taiwan. *Intervirology* 2006; 49: 76-81.
57. Lee CM LS, Hung CH, Tung WC, Wang JH, Tung HD, Chen CH, Hu TH, Changchien CS, Chen WJ. Hepatitis C virus genotypes in southern Taiwan: prevalence and clinical implications. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100: 767-74.
58. Ikeda K KM, Someya T, et al. Influence of hepatitis C virus subtype on hepatocellular carcinogenesis: a multivariate analysis of a retrospective cohort of 593 patients with cirrhosis. *Intervirology*. 2002; 71-8.
59. Reid AE, Koziel MJ, Aiza I, et al. Hepatitis C virus genotypes and viremia and hepatocellular carcinoma in the United States. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1619-26.
60. Chuang WL, Yu ML, Dai CY, Chang WY. Treatment of chronic hepatitis C in southern Taiwan. *Intervirology* 2006; 49: 99-106.
61. Yu ML, Lin SM, Chuang WL, et al. A sustained virological response to interferon or interferon/ribavirin reduces hepatocellular carcinoma and improves survival in chronic hepatitis C: a nationwide, multicentre study in Taiwan. *Antivir Ther* 2006; 11: 985-94.
62. Chen CH, Sheu JC, Wang JT, et al. Genotypes of hepatitis C virus in chronic liver disease in Taiwan. *J Med Virol* 1994; 44: 234-6.
63. Chen DS. Hepatitis C virus in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Princess Takamatsu Symp* 1995; 25: 27-32.
64. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Genotypes of hepatitis C virus in Taiwan and the progression of liver disease. *J Clin Gastroenterol* 1995; 21: 233-7.
65. Lin HH, Kao JH, Mizokami M, et al. Serotypes, genotypes and levels of hepatitis C viremia in pregnant women in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 1996; 95: 429-34.
66. Wu JS, Lee HF, Hsiao HL, et al. Genotype distribution of hepatitis C virus infection in Taiwan. *J Med Virol* 1994; 44: 74-9.
67. Yu ML, Chuang WL, Chen SC, et al. Changing prevalence of hepatitis C virus genotypes: molecular epidemiology and clinical implications in the hepatitis C virus hyperendemic areas and a tertiary referral center in Taiwan. *J Med Virol* 2001; 65: 58-65.
68. Pawlotsky JM. Mechanisms of antiviral treatment efficacy and failure in chronic hepatitis C. *Antiviral Res* 2003; 59: 1-11.
69. Zeuzem S. Heterogeneous virologic response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well? *Ann Intern Med* 2004; 140: 370-81.
70. Zeuzem S YE, Benhamou Y, et al. Sustained virologic response rates with albinterferon alfa-2b plus ribavirin treatment in IFN naive chronic hepatitis C genotype 1 patients. *Hepatology* 2007; 46(Suppl):317A.
71. Resti M, Jara P, Hierro L, et al. Clinical features and progression of perinatally acquired hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2003; 70: 373-7.

72. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C 2002 (June 10-12, 2002). *Gastroenterology* 2002; 123: 2082-99.
73. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C: 2002--June 10-12, 2002. *Hepatology* 2002; 36: S3-20.
74. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S21-9.
75. Hughes CA, Shafran SD. Chronic hepatitis C virus management: 2000-2005 update. *Ann Pharmacother* 2006; 40: 74-82.
76. 莊萬隆、余明隆。慢性C型肝炎之治療。 *台灣醫學* 2007; 11.
77. McCaughan GW, Omata M, Amarapurkar D, et al. Asian Pacific Association for the Study of the Liver consensus statements on the diagnosis, management and treatment of hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 615-33.
78. 黃信彰、劉俊人、洪肇宏、李全謨、余明隆。C型肝炎治療建議。 *台灣消化醫學雜誌* 2008; 25(Suppl): 24-45.
79. Yu ML, Dai CY, Huang JF, et al. A randomised study of peginterferon and ribavirin for 16 versus 24 weeks in patients with genotype 2 chronic hepatitis C. *Gut* 2007; 56: 553-9.
80. Mangia A, Santoro R, Minerva N, et al. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med* 2005; 352: 2609-17.
81. Halfon P, Trimoulet P, Bourliere M, et al. Hepatitis C virus genotyping based on 5' noncoding sequence analysis (Trugene). *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1771-3.
82. Weck K. Molecular methods of hepatitis C genotyping. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5: 507-20.
83. Nakao T, Enomoto N, Takada N, Takada A, Date T. Typing of hepatitis C virus genomes by restriction fragment length polymorphism. *J Gen Virol* 1991; 72 (Pt 9): 2105-12.
84. Pohjanpelto P, Lappalainen M, Widell A, Asikainen K, Paunio M. Hepatitis C genotypes in Finland determined by RFLP. *Clin Diagn Virol* 1996; 7: 7-16.
85. Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, et al. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993; 74 (Pt 6): 1093-102.
86. Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, Hernandez F, Maertens G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2259-66.
87. Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, et al. Hepatitis C virus genotyping by means of 5'-UR/core line probe assays and molecular analysis of untypeable samples. *Virus Res* 1995; 38: 137-57.
88. Chinchai T, Labout J, Noppornpanth S, et al. Comparative study of different methods to genotype hepatitis C virus type 6 variants. *J Virol Methods* 2003; 109: 195-201.
89. Noppornpanth S, Sablon E, De Nys K, et al. Genotyping hepatitis C viruses from southeast Asia by a novel line probe assay that simultaneously detects core and 5' untranslated regions. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3969-74.
90. Bullock GC, Bruns DE, Haverstick DM. Hepatitis C genotype determination by melting curve analysis with a single set of fluorescence resonance energy transfer probes. *Clin Chem* 2002; 48: 2147-54.
91. Fujigaki H, Takemura M, Takahashi K, et al. Genotyping of hepatitis C virus by melting curve analysis with SYBR Green I. *Ann Clin Biochem* 2004; 41: 130-2.
92. Schroter M, Zollner B, Schafer P, et al. Genotyping of hepatitis C virus types 1, 2, 3, and 4 by a one-step LightCycler method using three different pairs of hybridization probes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2046-50.
93. Lindh M, Hannoun C. Genotyping of hepatitis C virus by Taqman real-time PCR. *J Clin Virol* 2005; 34: 108-14.
94. Rolfe KJ, Alexander GJ, Wreghitt TG, et al. A real-time Taqman method for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Virol* 2005; 34: 115-21.
95. Cook L, Sullivan K, Krantz EM, Bagabag A, Jerome KR. Multiplex Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Determination of Hepatitis C Virus Genotypes. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4149-50.
96. Soriano V, Peters MG, Zeuzem S. New therapies for hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 313-20.

The Genotype of Hepatitis C Virus Has Important Clinical and Therapeutic Implications

Pei-Chen Hsieh, Hsing-Tao Kuo¹, Wen-Chun Cho, Yung-Liang Liao, and Ching-Nan Lin

*Department of Pathology, ¹Department of Internal Medicine;
Chi-Mei Foundation Hospital, Tainan, Taiwan*

Hepatitis C virus (HCV) is a major causative agent of transfusion-associated and community-acquired non-A, non-B hepatitis that often develops into malignant chronic diseases, including liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. All currently known isolates of HCV can be divided into six phylogenetically distinct groups by mainly using the proportion of identical nucleotides regions within the core, E1, and NS5B. Currently, hepatitis C standard therapy consists of the combination of pegylated interferon and ribavirin, administered for 12-72 weeks. However, only 40-50% of patients infected with HCV genotypes 1 or 4 obtain a sustained virological response, compared with 80% of individuals infected with genotypes 2 or 3 who obtain a sustained virological response. Many reports show the therapeutic efficacy of hepatitis C depends on the HCV genotype, and mutations in several subgenomic regions of hepatitis C virus. Thus, it is important to know the genotype and subgenomic mutations of HCV in patients before the duration of HCV therapy. In this paper, we would narrate the importance of HCV genotypes in therapeutic implications and make a statement about the structure of HCV genome, the HCV therapy and the method of HCV genotypes detection. (J Intern Med Taiwan 2009; 20: 309-319)