

R
008.8
4413-3
87

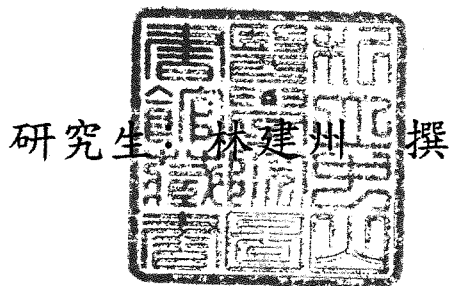
私立中山醫學院醫學研究所碩士論文
Master Thesis, Institute of Medicine
Chung Shan Medical & Dental College

指導教授:楊繼江 P. H. D

何美鄉 M. D, M. P. H

B 型肝炎核心次型抗體在感染後血清表面抗原陽
性者與陰性者之比較

A comparative study of hepatitis B anti-core
subclasses among surface antigen seropositive
(chronic carrier) and seronegative (antigen
cleaner) individuals following HBV infection



中華民國八十七年六月

中山醫學院圖書館



C050012

參考書恕不外借

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 醫學研究所
_____ 組 86 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱: B 型肝炎核心次型抗體在感染後血清表面抗原陽性者與陰性者之比較

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 ____ 年 __ 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名: 楊繼江

研究生簽名: _____ 林建州 _____ 學號: R84127

(親筆正楷)

林建州

日期: 民國 _87_ 年 _8_ 月 _1_ 日

-
- 備註: 1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：

在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發，須交付美金 45 元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入 10%的權利金約美金 20 元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣 500 元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如 第 5 項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。

4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：

在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。

5. 本案聯絡電話: (02)7377746 江守田、王淑貞

地址: 台北市和平東路二段 106 號 17 樓 1702 室

研究生姓名: 林建州 聯絡電話: (07) 3458946

地址: 高雄市大中路110巷52弄13號

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院醫學研究所論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

私立中山醫學院醫學研究所教授

蔡嘉哲 博士

蔡嘉哲

私立中山醫學院醫技系副教授

林克亮 博士

林克亮

中央研究院生物醫學研究所副研究員

沈志揚 博士

沈志揚

中央研究院生物醫學研究所副研究員

何美鄉 博士

(論文指導教授)

何美鄉

私立中山醫學院醫技系副教授

楊繼江 博士

(論文指導教授)

楊繼江

學生林建州論文題目為B型肝炎核心次型抗體在感染後血清表面抗原陽性者與陰性者之比較，其論文已經中山醫學院醫學研究所碩士論文口試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：楊繼江 副教授

簽名：楊繼江

何美鄉 副研究員

簽名：何美鄉

中華民國八十七年六月八日

誌 謝

三年在職的求學生涯，期間因工作及住家地點常於台北、台中、高雄三地奔波，這一路走來心境的轉折變化五味雜陳，研究所所學唯知「獨立」和「自信」才是最大收穫。

楊老師繼江在學問靠自己的教授及求真嚴謹態度下，尚未調適學習壓力之際，教導之聲已然猶歷在耳。去年其赴美至何大一實驗室研究期間也一再以 E-mail 要求作好研究及學術發表等，讓工作多年的我更備感自我實力的不足和研讀的重要。

何老師美鄉在衛生署流行病學專業人員訓練時職亦曾請其指導，老師在流行病學的專業和研究分析時的條理清晰，時而糾正我處理事情的不良觀念和思考邏輯等，多年來蒙其教誨甚多。作個流行病學專業人員，博學、慎思、明辨更是我要努力的方向。

吳所長聰能讓我「既升官又讀書」，衷心的感激其宏量與栽培。林組長進三、劉科長定萍、李分所長鏡梯等直屬長官在業務上的體諒和厚愛；年前亦奉派赴日研習檢疫實務訓練等，均給職學習和磨練的機會。學校中林世傑、李瑤玲、邱慧玲老師、大里仁愛醫院陳桔根主任、中研院助理意倩、彥俐、學妹祥芬及博士後研究員雅菁等，在研究和學業上亦有所指導和協助。對曾經關心和幫助過的師長朋友們，在此未能一一致謝，但非常感謝你們的支持和指導。

多年來若我是恣意飛遠飛高的風箏，妻子怡玲不諱是牽引我安定和成長的那隻手；感謝其對家庭的付出與辛勞。今日畢業若稍有長進，祈能應用所學為單位和社會略盡棉薄之力。

目 錄

	頁次
誌謝	2
目錄	3
表次	5
圖次	6
中文摘要	8
英文摘要	9
英文縮寫及字義	10
第一章 前言	11
第二章 文獻探討	13
第一節 B型肝炎流行病學	13
一、世界B型肝炎流行現況	13
二、台灣B型肝炎流行現況	13
三、B型肝炎所引發疾病	14
四、台灣B型肝炎疫苗推行現況	14
第二節 B型肝炎病毒形態	15
第三節 B型肝炎血清學	15
一、B型肝炎病毒血清學標幟	15
二、免疫球蛋白及次型免疫球蛋白	16
三、B型肝炎病毒清除免疫機轉假說	16
四、IgG subclasses 免疫作用假說	17
五、相關B型肝炎IgG subclasses 免疫反應	18

	頁次
第三章材料與方法	20
第一節 檢驗原理	20
第二節 B型肝炎核心抗原試盤對 IgG subclasses 之評估	20
一、測試者血清	20
二、anti-HBc 試盤來源	21
第三節 研究對象	21
一、北區公保健診者	21
二、抗原清除族群和帶原族群	21
三、血清保存	22
第四節 實驗方法	22
第五節 儀器	23
一、酵素免疫分析洗滌機	23
二、酵素免疫分析比色器	23
第四章 結果	24
第一節 B型肝炎 anti-HBc 試盤測試比較	24
一、測試者肝炎血清標幟分類	24
二、anti-HBc 試盤 IgG subclasses 反應結果	24
第二節 B型肝炎抗原清除和帶原族群核心次型抗體間 之比較	25
一、研究對象基本資料	25
二、兩族群 IgG subclasses 平均吸光值之差異性	25
三、兩族群 IgG1 和 IgG3 個別吸光值之相關性	26
第五章 討論	29
參考文獻	32

表 次

	頁次
表一	HBV anti-HBc 試盤種類比較表 39
表二	測試者 HBV 血清標幟分類表 40
表三	HBV 兩族群性別及各年齡層之比較表 41
表四	HBV 兩族 IgG1 和 IgG3 個別吸光值比較表 42

圖 次

		頁次
圖一	W 試盤對 HBV 測試者 anti-HBc subclasses 反應圖	43
圖二	B 試盤對 HBV 測試者 anti-HBc subclasses 反應圖	44
圖三	E 試盤對 HBV 測試者 anti-HBc subclasses 反應圖	45
圖四	自行連結抗原 anti-HBc 試盤 IgG subclasses 反應圖	46
圖五	G 試盤對 HBV 測試者 anti-HBc subclasses 反應圖	47
圖六	五種試盤其 anti-HBc subclass 反應平均值比較圖	48
圖七 a	HBV 抗原清除族群各年齡層 anti-HBc subclasses 比較圖	49
圖七 b	HBV 帶原族群各年齡層 anti-HBc subclasses 比較圖	50
圖八 a	HBV 抗原清除族群男性各年齡層 anti-HBc subclasses 曲線圖	51
圖八 b	HBV 抗原清除族群女性各年齡層 anti-HBc subclasses 曲線圖	52
圖九 a	HBV 帶原族群男性各年齡層 anti-HBc subclasses 曲線圖	53
圖九 b	HBV 帶原族群女性各年齡層 anti-HBc subclasses 曲線圖	54
圖十	HBV 抗原清除族群 anti-HBc IgG1 和 IgG3 個別吸光值 之相對分佈圖	55
圖十一	HBV 抗原清除族群各年齡層 anti-HBc IgG1 和 IgG3 個別吸光值之相對分佈圖	56
圖十二	HBV 帶原族群 anti-HBc IgG1 和 IgG3 個別吸光值 之相對分佈圖	57

	頁次
圖十三 HBV 帶原族群各年齡層 anti-HBc IgG1 和 IgG3 個別吸光值之相對分佈圖	58
圖十四 a HBV 帶原族群 anti-HBc IgG1 和 IgG3 個別吸光值 對肝功能指數異常者之關係圖	59
圖十四 b HBV 帶原族群 anti-HBc IgG1 和 IgG3 吸光值 對男性肝功能指數異常者之關係圖	60
圖十四 c HBV 帶原族群 anti-HBc IgG1 和 IgG3 吸光值 對女性肝功能指數異常者之關係圖	61

中文摘要

B 型肝炎帶原族群和抗原清除族群其核心次型抗體的差異比較，本研究是利用酵素免疫分析法來檢測。為了了解不同來源的核心抗原是否會影響各核心次型抗體 IgG(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) 的吸光值，我們採用了國內 (G 和 E 廠牌)、國外 (W 和 B 廠牌) 及自購 (C 廠牌) 所製的核心抗原試盤，分別檢測包括 B 型肝炎帶原者、清除者、疫苗注射者及未曾感染者等 12 名測試者其核心次型抗體，結果在各不同來源試盤中均有不同的反應，其中以 G 抗原試盤吸光值最佳。而各抗原試盤驗證了，不同核心抗原決定點和核心次型抗體會有不同的結合反應。

採用 G 核心抗原試盤測試 B 型肝炎抗原清除族群 (表面抗原陰性，表面抗體陽性) 434 人及帶原族群 (表面抗原陽性，表面抗體陰性) 96 人。發現抗原清除族群核心次型抗體反應以 IgG3>IgG1 為主，而帶原族群反應以 IgG1>IgG3 為主，和 Sällberg 等 (1990) 研究次型抗體 IgG1>>IgG3>IgG4 次序相符，但本研究 IgG1 和 IgG3 兩者間吸光值差異不明顯。比較抗原清除族群和帶原族群兩者平均吸光值有著明顯的差異，推測 anti-HBc IgG1 和 IgG3 在帶原者轉變至抗原清除者中，兩者更換和肝炎病毒清除時扮演著重要角色，可能和 Th1 和 Th2 機制的轉換有關。

次型抗體的研究可作為各病毒或病源感染時的特定檢測工具，在釐清疾病各時期的免疫學作用機制，對傳染源的免疫治療、疫苗發展及防治等工作均有所幫助。

Abstract

The quantities of IgG subclasses against hepatitis B virus core antigen (anti-HBc) in hepatitis B virus (HBV) infected-individuals were measured by enzyme immunoassay (EIA). The relative quantity of IgG subclasses among chronic HBV carriers and among those who had no detectable HBV viral antigen was compared.

Four commercially-available hepatitis B core antigens (HBcAg) were tested to be used as antigen for coating EIA plates. Differences in OD values were obtained by each antigen, suggesting that different epitopes of HBc antigens might have different binding capabilities to each anti-HBc IgG subclass. Comparison between the 96 chronic HBsAg carriers and the 434 individuals who tested negative for HBsAg serology showed that both groups had nondetectable level of IgG2 and IgG4. Chronic carriers had significantly higher level of IgG1 and IgG3, regardless of age and sex. The OD value of IgG1 was higher than IgG3 in HBsAg chronic carriers, whereas in those who cleared HBsAg the OD value of IgG3 was higher than IgG1. Both the level of IgG1 and IgG3 decreased with increasing age. The difference in the relative level of IgG1 and IgG3 among the chronic HBV carriers and noncarriers might have implication in the immunological response in relation to Th1 and Th2 pathways.

英文縮寫及字義

HBV	hepatitis B virus	B 型肝炎病毒
anti-HBc	HBV core-antibody	B 型肝炎病毒核心抗體
anti-HBe	HBV e-antibody	B 型肝炎病毒 e 抗體
anti-HBs	HBV surface antibody	B 型肝炎病毒表面抗體
HBe Ag	HBV e-antigen	B 型肝炎病毒 e 抗原
HBs Ag	HBV surface antigen	B 型肝炎病毒表面抗原
AH	acute hepatitis	急性肝炎
CH	chronic hepatitis	慢性肝炎
LH	liver cirrhosis	肝硬化
PHC	primary hepatocellular carcinoma	原發性肝癌
Ig	immunoglobulin	免疫球蛋白
MHC	major histocompatibility complex	主組織相容複合體
Th	T-helper cell	輔助 T 細胞
IFN	interferon	干擾素
ORFs	open reading frames	解譯架構
EIA	enzyme immunoassay	酵素免疫分析法
OD	optical density	吸光值

第一章 前言

台灣是B型肝炎病毒 (hepatitis B virus HBV) 盛行及肝癌罹患率高的地區 (health and vital statistic, 1997 ; Chen et al., 1987-8 ; Liaw 1994) 。台灣地區四十歲以上的人有 90 % 人口曾受過B型肝炎病毒的感染，帶原人數約有 300 萬人 (許, 1990) ，這些感染者在長期帶原下可引發肝硬化、肝癌等疾病而導致死亡 (Feitelson, 1992 ; Hess, 1993) 。

台灣自 1984 年實施初生嬰兒 B 型肝炎疫苗注射後使曾高達 15-20% 的帶原率逐年下降至 5% 以下，B 型肝炎疫苗的效力 (efficacy) 雖高，但還是有少部份的接種者出現疫苗無效的情形，這是目前對 B 型肝炎病毒防治所面臨的問題，一般學界認為可能和免疫機制有關 (Carotenuto et al., 1995 ; Hsu et al., 1996 ; Milich., 1997) 。目前了解，B 型肝炎病毒的分子結構，具有不同抗原決定位 (epitope) ，免疫系統因不同抗原的刺激而產生不同抗體及次型抗體 (subclasses) (Townsend et al., 1997) 。

患者在感染 HBV 一段時期後即可產生 anti-HBc ，而且存在感染者體內甚長的時間，這是曾經感染過 HBV 一個重要指標 (Mushaahwar et al., 1981) 。B 型肝炎病毒若持續存在於感染者超過六個月後則被認為是慢性帶原者 (chronic carrier, CH) ，這過程感染者體內會有免疫球蛋白 (Immunoglobulin Ig) A、G、D、M、E 等亞型 (isotype) 產生，其中有 IgG 亦有 1, 2, 3, 4 等次型的產生 (Sällberg et al., 1988-91 ; Maruyama et al., 1993) 。B 型肝炎病毒感染者在病毒基因已清除後成為非帶原者，亦有核心次型免疫球蛋白 anti-HBc IgG1, 2, 3, 4 的變化 (Sällberg et al., 1989) 。

不同來源的 B 型肝炎疫苗 (HBs Ag) 會產生不同次型抗體反應

結果，例如基因合成疫苗會刺激 IgG1 及 IgG4 的產生 (Skvaril et al., 1984 ; Borzi et al., 1992)，血漿疫苗則刺激 IgG1 的產生 (Carotenuto et al., 1995) 等。因此不同來源 B 型肝炎核心抗原 (hepatitis B core antigen HBc Ag)，是否因抗原結構部份的改變經由與 MHC classes I 或 MHC classes II 分子的結合，而走向 Th1 或 Th2 路徑，造成 IgG 次型抗體分佈的類型與比率上的差異 (Tsai et al., 1992 ; Jung et al., 1995 ; Milich et al., 1997)。

目前，在有關人體內清除 HBV 的免疫機制，其機轉尚未十分的清楚。但是以老鼠為模式研究報告中，則有較明確的證實如何清除 HBV 免疫機制 (Milich et al., 1997)。但有關人體清除 HBV 雖已了解 HBs Ag 依循 T cell dependent 路徑清除，但尚有部份感染者轉變為慢性帶原者。另以 HBs Ag 所製作的肝炎疫苗注射，大部份注射者皆可產生 IgG1 subclasses 抗體 (Borzi et al., 1992 ; Carotenuto et al., 1995)，但卻有 anti-HBs 免疫反應失效的現象 (Chen et al., 1988 ; Carotenuto et al., 1995)。

本研究以 HBc Ag 所引起的 anti-HBc 為探討對象，試圖找出目前尚未釐清，可能不同於 anti-HB 免疫機轉的假說，以了解人體免疫機制如何清除 HBV 感染的盲點。台灣地區未接受疫苗注射但感染過 B 型肝炎病毒者，多數 (90%) 為抗原已清除者，目前的研究尚缺乏對抗原清除者血清流行病學方面的探討。

因此，本研究主要目的有：(1) 了解 B 型肝炎病毒清除者 (antigen clearance) 和帶原者 (chronic carrier) anti-HBc subclasses 消長情形和免疫機制之相關性。(2) 在研究本實驗之前，我們也須了解與解決不同來源的 B 型肝炎核心抗原測試組劑對不同族群的血清測試，其 anti-HBc subclasses 反應結果是否有差異性。

第二章 文獻探討

第一節 B型肝炎流行病學

一、世界B型肝炎流行狀況

世界上約2億5千萬人口感染B型肝炎 (Maynard, 1990)，在開發中國家出生的嬰兒或小孩其感染率約有15%。在歐洲義大利、希臘和非洲及東南亞等地區有較高的人口呈B型肝炎陽性率，尤其在南非及東南亞肝炎感染後，血清陽轉率平均高達50%。感染HBV而轉變成慢性B型肝炎帶原者，在全世界約有300萬人(5%)。同樣的，早期的原發性肝癌(primary hepatocellular carcinoma, P.H.C)也通常發生在上述盛行地區(Feitelson, 1992)。流行病學調查結果顯示，HBV感染者和PHC具有相關性，這類型肝癌人數佔全世界人口約25萬至1百萬人。在美國地區每年約5000人死於PHC (Tong et al., 1994)。

二、台灣B型肝炎流行現況

B型肝炎病毒(hepatitis B virus)在台灣地區是嚴重感染疾病。早期未實施全面B型肝炎疫苗預防注射前，B型肝炎帶原率高達15~20%，是世界上高盛行率地區之一。在台灣地區，因肝炎所引發肝組織病變(肝癌)年平均10萬感染者有27人之死亡率，居癌症死亡原因排行之首(Health and vital statistic, 1996)；是影響台灣地區全民健康之重要公共衛生問題(許, 1990)。

研究曾指出B型肝炎感染途徑經由母親傳染具有相當的重要性。在台灣地區母親為HBsAg陽性帶原者所產下的新生兒，有86%-96%可經由母體傳染成為帶原者；如果母親為anti-HBe陽性帶原者，則約6%-21%的新生兒會成為帶原者(許, 1990)。

三、B 型肝炎所引發疾病

B 型肝炎所引發病程可分為急性肝炎 (acute hepatitis AH) 與慢性肝炎 (chronic hepatitis CH)。臨床病徵又分有症狀肝炎 (symptomatic hepatic) 及無症狀肝炎 (asymptomatic hepatitis ASH)。

人體經感染 B 型肝炎病毒後其中有 90% 會自然痊癒，有 1% 會合併感染 D 型肝炎病毒而形成猛爆性肝炎 (fulminate hepatitis) (Hess, 1993)。其它 9% 在感染六個月後還帶有 HBsAg，其中 50% 會逐漸痊癒，另 50% 感染者會成為未有症狀的帶原狀態或形成慢性活動性肝炎進而演變成肝癌、肝硬化及因 HBV 所引起的心臟疾病、腎臟病等 (Feitelson, 1992)。

四、台灣 B 型肝炎疫苗推行現況

台灣自 1984 年 7 月開始推動「B 型肝炎防治計畫」，針對具有 HBsAg 及 HBeAg 陽性反應母親所產的新生兒，注射法國巴斯德廠所生產之 B 型肝炎血漿疫苗；並自 1987 年 9 月開始改用法國巴斯德廠技術轉移國內保生公司所生產的 B 型肝炎血漿疫苗 (許, 1990)。

為了解疫苗注射後之免疫效果，多項研究曾針對不同年齡、不同族群在注射疫苗後進行疫苗評估，皆顯示免疫成效良好 (Chen et al., 1987)。近年的研究報告顯示，新生兒自接受疫苗注射後 HBsAg 陽性率降至 1%，保護效益達 93.3%。HBsAg 陰性母親所生之嬰兒在接受四劑國產 B 型肝炎血漿苗，目前沒有成為 B 型肝炎帶原者的個案報告，且有 91% 產生保護性抗體，anti-HBs 之幾何平均效價值均超過 100 mIU/ml。由此可顯示台灣地區在實施大規模 B 型肝炎預防

注射後，對於預防 B 型肝炎感染及慢性帶原者已發揮了良好的保護效果（許, 1990）。

第二節 B 型肝炎病毒形態

HBV 屬肝病毒科（hepadnaviruses），本科亦包括土撥鼠肝炎病毒、北京鴨肝炎病毒等。B 型肝炎病毒在電子顯微鏡下呈圓球型、柱狀型等。HBV 大小直徑約 42nm 病毒顆粒（virion）又稱 Dane particle，可由感染細胞內釋放出直徑大小約 22 nm 的 HBsAg particle 到血液中來。

HBV 構造上有表面抗原（HBV surface antigen HBsAg）、核心抗原（HBV core antigen HBcAg）或 e 抗原（HBV e-antigen HBeAg）。從基因圖譜上來分析，B 型肝炎病毒 DNA 蛋白可直接從 DR1 和 DR2 開始，製造表面 S 蛋白、e 蛋白、C 蛋白、聚合酶蛋白質引子（polymerase -protein primer for replication）、X 蛋白等。在 HBc Ag 的解譯架構（open reading frames ORFs）前面有一個 87base 的區域稱為核前區（pre core），這個區域可被轉譯（translate）成 29 個胺基酸的單胜（oligopeptide）接到核心抗原上，這個接合使得核心抗原的結構改變，產生新的抗原決定位，即 HBeAg。

第三節 B 型肝炎血清學

一、B 型肝炎病毒血清學標幟

B 型肝炎病毒當其 HBsAg 和 HBeAg 被釋放到血液中時，游離之顆粒隨著血液循環全身，故可由血液中檢測出 HBsAg 和 HBeAg。然而 HBcAg 在血液中是檢測不出的；因為 HBV 複製時，HBcAg 並不分泌到

肝細胞外，所以檢測不到 HBcAg。即使肝細胞破裂，HBcAg 也很快被血液中高濃度的核心抗體中和，水解產生 HBeAg 釋放到血液中 (Takahashi et al., 1979)。

一般而言，人體在感染 HBV 六個月內，患者血清內可被檢測出 HBsAg、HBeAg、anti-HBc。痊癒者可檢測 anti-HBc 及 anti-HBs 或 anti-HBe (Mushahwar et al., 1981)。慢性帶原者 (chronic carrier) 只能檢測出 anti-HBc 和長久持續製造及分泌的 HBsAg。

二、免疫球蛋白及次型免疫球蛋白

免疫球蛋白 (Immunoglobulin Ig) 分有 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE 等不同亞型 (isotype)。在急性期首先出現的是 IgM，其次是出現 IgG，IgG 在對抗外來疾病的侵入或其它外在抗原抗體免疫清除等佔有極重要角色。

IgG 的次型 (subclass) 分有 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 等，依序所佔 IgG 的百分比約 65 : 23 : 8 : 4 (約 8 : 3 : 1 : 0.5 比例)。當外來侵入抗原為蛋白質 (protein) 時，主要可引起 IgG1、IgG3、IgG4 的產生。若侵入抗原為醣類 (polysaccharide) 時，則主要引起 IgG2 的產生。IgG4 不和補體結合作用而 IgG1、IgG3 可以和補體結合作用 (Akbar et al., 1991)。

三、B 型肝炎病毒清除免疫機轉假說

HBV 的清除主要靠細胞性的免疫作用 (cell-mediated immune response) 也就是毒殺 T 細胞 (killer T cell) 的清除作用。輔助 T 細胞 (helper T cell Th) 由兩種路徑來輔助清除病毒工作，第一是 Th1 刺激吞噬細胞 (macrophage) 來消除病毒。另一是 Th2 細胞

刺激 B 細胞 (B cell) 產生免疫球蛋白 (抗體) ，也就是依賴體液免疫作用 (humoral immunity response) 方式來清除病毒。在不同病毒侵入時，因不同抗原結構，故引發不同次型 IgG 免疫球蛋白；這些不同 IgG subclasses 的免疫機轉，在老鼠實驗研究中曾被報告 (Milich et al., 1997) 。但在人體感染宿主免疫系統中，個別的作用並不完全清楚，不過類似的感染產免疫情形在疫苗或其它疾病感染中常被研究。

B 型肝炎病毒蛋白部分可視為不同 epitopes ，故可引發不同的免疫機轉。例如：病毒核套蛋白 (envelope protein) 可引發 T Cell dependent 免疫機制。核心蛋白 (nucleoprotein) 則可引起 T cell independent 和 T cell dependent 免疫機制 (Milich et al., 1986) 。在急性 B 型肝炎中 T 細胞 (T4 cell) 出現數量比慢肝炎出現較多 (Ferrari et al., 1990) 。另有報告在急性肝炎中產生 anti-HBc 免疫球蛋白，可測出 IgA1, IgM, IgG 等亞型 (Sällberg et al., 1989) 。在慢性感染中可檢測得 IgG subclasses 1. 2. 3. 4 的增遞情形，因此 IgG subclasses 可進一步了解病毒清除的免疫機轉或肝炎病程的變化的指標 (Sällberg et al., 1988. 1990-1) 。

四、IgG subclasses 免疫作用假說

IgG1 是疾病傳染過程中，最主要出現反應之免疫球蛋白 (Linde, 1985) ，也是 HBV 感染時主要免疫球蛋白 (Sällberg et al., 1988-90) 。HBV 誘使 IgG1 出現的假說是當肝病毒在複製時其核心抗原分佈在肝細胞表面，並刺激 B 細胞作用 (Akbar et al., 1991) 產生 IgG1 ；也有認為是病毒構造上的糖蛋白 (glycoprotein) 所引誘產生 (Urban et al., 1994) 。

IgG2 在病毒感染過程中似乎較不重要 (Skvaril et al., 1986 ; Linde 1985) , 反而在細菌感染中最常出現之免疫球蛋白 (Hassan et al., 1994 ; Islam et al., 1995) ; IgG2 對碳氫化合物 (carbohydrate) 是有特異性反應 (Riesen et al., 1976) 。但在疫苗注射研究中發現，由基因合成肝炎疫苗若是不含醣體 (glycosylated) , 也就是碳氫化合物成份，是可引發 IgG2 subclass 反應 (Borzi et al., 1992) 。

五、相關 B 型肝炎 IgG subclasses 免疫反應

(A) 疫苗注射

經由注射 B 型肝炎 cDNA HBsAg 疫苗，可引發 anti-HBs subclasses IgG1 及 IgG2 (Borzi et al., 1992) 。採用血漿製劑 (plasma derived) 注射時，主要產生 IgG1 (Carotenuto et al., 1995) 。其它不同廠牌所製疫苗如: H-B-Vax, Merk, Sharp & Dohme 等，則主要引起 IgG1 及 IgG4 的產生 (Skvaril et al., 1984) 。

(B) HBV 各病徵時其 IgG subclasses 反應情形

在自然感染下 HBV , anti-HBs IgG subclasses 的產生以 IgG3 和 IgG1 為主 (Morell et al., 1983) 。急性肝炎患者其 anti-HBc 抗體產生以 IgG1 為主，其次伴隨著 IgG3 和 IgG4 (Sällberg et al., 1989 ; Akabar et al., 1991) 。Sällberg (1990-1) 曾指出在慢性肝炎患者其核心次型抗體產量是 $IgG1 \gg IgG3 > IgG4$ 。肝炎疾患各症狀中 ASC 主要的為 IgG1 反應，LC 患者則呈 $IgG3 > IgG1$ 之反應 (Akabar et al., 1991) 。在病理切片免疫染片中亦染出以 IgG3 為主 (Torgano et al., 1995) 。應用來 B 型肝炎各病程中 IgG subclasses 的反應結果，可進一步了解及推估 Th1 和 Th2 是如何去幫助清除肝病

毒顆粒 (Maruyama et al., 1993 ; Milich et al., 1997) 。

在肝炎急性期時 anti-HBc IgG subclasses 最先出現 IgG1 和 IgG3 ， IgG3 若持續存在，可能顯示抗原仍在宿主体內且持續被複製以刺激抗體的產生 (Sällberg et al., 1988-89) 。在德國麻疹研究報告中發現 IgG3 出現是緊跟在 IgM 後面出現，所以 IgG3 在早期就已出現了，且隨 IgM 的力價 (titer) 下降而 IgG3 力價上升 (Linde, 1985) 。有報告發現 IgG3 可能由 IgM 重鏈 (heavy chain) 轉變 (switch) 而來 (Marcu et al., 1982) 。另有報告指出，醣蛋白 (glycoprotein) 可引發 IgG1 和 IgG3 免疫反應 (Urban et al., 1994) 。

IgG4 常會出現在過敏 (allergy) 時 (Shakib et al., 1980) ，且 IgG4 不和補體結合。有報告假設，HBV 感染者其 anti-HBc IgG4 可能作為阻擋 (block) 其它體液性或細胞性細胞毒殺已受病毒感染之肝細胞，使肝細胞減少受損 (Akbar et al., 1991) 。

第三章 材料與方法

第一節 檢驗原理

檢驗方法以抗體抗原酵素免疫分析法 (enzyme immunoassay EIA)。利用抗原和抗體特異性結合能力，以酵素呈色反應予以定性或定量欲檢測核心抗體結果。

抗體抗原酵素免疫連結設計是，以連結及固定 B 型肝炎核心抗原在試盤上加入血清，在一定溫度條件下讓血清中的抗體和定量抗原作特異性結合，洗去未結合血清抗體；再加入特異性之老鼠抗人類單株免疫球蛋白 IgG1.2.3.4 等次型單株抗體 (mouse anti-human IgG1.2.3.4)，和已連結抗體結合，並洗去多餘未連結之抗體。再加上兔子抗老鼠連結酵素抗體 (rabbit anti-mouse conjugate) 和單株次型抗體結合，層層結合形成含有酵素之結合物：核心抗原 + 測試血清 (核心抗體) + 特異性抗核心次型單株抗體 (老鼠抗人體抗體) + 酵素連結特異性之抗核心次型抗體 (兔子抗老鼠抗體)。最後，加入酵素可以反應之呈色劑。若含酵素抗體和抗原結合愈多則呈色劑顏色反應愈深，相對的結合的愈少則呈色劑顏色愈淺，以特定波長 (495 nm) 之分光比色計測定。

各結果吸光值予以標準化，每次測試的試盤皆作有陽性對照血清，校正在不同時段操作下所得測試者之吸光值。校正公式：校正值 = 檢測各次型抗體吸光值 × 每盤各次型抗體結果平均值 / 每盤陽性對照值，其統計利用 SAS 電腦統計軟體作分析及校正工作。

第二節 B 型肝炎核心抗原試盤對 IgG subclasses 之評估

一、測試者血清

血清來源是 1997 年 4 月間至台中中山醫學院附設醫院門診者血

清 12 名，及 1996 年間中央研究院生醫所員工抽血者 2 名，另備有陽性及陰性對照血清各一瓶。檢體來源登記有年齡、性別、採血時間及 B 型肝炎 HBsAg、anti-HBs、anti-HBc、HBe Ag、anti-HBe 等血清標幟測試結果（表二）。

二、anti-HBc 試盤來源

anti-HBc 試盤有來自英國衛爾康（Wellcozyme[®]）、德國貝易寧（Enzygnost[®]）及台灣廠牌永進（EverNew[®]）、普生（Anticorase B-96[®]）等商品化試盤。試盤中抗原的來源，兩個國外廠商註明是來自 HBc 基因合成。兩個國內牌商說明書上則未註明。自行連結試盤的，其核心抗原購自國外生物科技公司（BIOTEC[®]）所製，利用大腸桿菌基因為載體，複製及合成 B 型肝炎核心抗原。本研究各試盤來源分別以 W, B, E, C, G 代號表示之（表一）。

第三節 研究對象

一、北區公保健診者

台灣北部地區約有四萬名公保健診者，1994 年期間曾至台北公保中心作健康檢查有抽血檢驗者。檢驗項目肝炎血清標幟包括 HBs Ag、anti-HBs，肝功能 AST、ALT 等生化學檢查。以上肝炎血清標幟用美商亞培公司酵素免疫分析法檢測，AST、ALT 等肝機能酵素用生化酵素法檢測，檢驗結果及基本資料均建檔備查，本研究血清及資料來源由中央研究院生醫所何美鄉醫師提供。

二、抗原清除族群和帶原族群

由公保健診者中選取 434 人 HBsAg 陰性、anti-HBs 陽性，96 人 HBsAg 陽性、anti-HBs 陰性族群（表三）。

三、血清保存

測試者採 3-5ml 血液。採血試管在離心機以 3500rpm 轉速離心 5 分鐘後，分離採血試管上層血清液至每小試管中，每小試管各分裝 1 毫升血清，記錄並貯存在 -70 °C 冰箱中，實驗前三十分鐘拿出解凍，取完血清即歸回原位。

第四節 實驗方法

測試者血清以磷酸緩衝液（phosphophate buffer）加上 0.05 % TWEEN20 及 1 % 牛血清蛋白（bovine serum albumin）之酵素免疫稀釋緩衝液（ELISA buffer diluent），分別以 1 : 100 的血清稀釋比例。取 100 毫升已稀釋血清，放入 96 孔 B 型肝炎核心抗原試盤中（普生公司所製），放在 37 °C 培養箱中，90 分鐘靜置培養，取出以酵素免疫清洗液清洗試盤各孔三次。各試孔加入老鼠抗人類單株抗體（mouse monoclonal antibody）：分別 IgG1（clone NL16）、IgG2（clone GOM2）、IgG3（clone ZG4）和 IgG4（clone RJ4），是依 1 : 2000 和酵素免疫稀釋緩衝液比例稀釋單株抗體各 100 毫升放入試孔中。放置在 37 °C 培養箱，90 分鐘培養。（以上步驟每位測試者均需測試 IgG1, 2, 3 和 4 等四種單株次型抗體）。90 分鐘培養後，以酵素免疫清洗液清洗三次試孔。再加入 1 : 5000 酵素免疫稀釋緩衝液比例稀釋兔子抗老鼠連結酵素抗體（rabbit anti-mouse conjugate），取 100 毫升酵素抗體至各試孔中。放置在 37 °C 培養箱，90 分鐘培養取出，以酵素免疫清洗液清洗三次試孔。最後，加上鄰苯

二胺 (ortho-phenyl diamine OPD) 呈色液 50 毫升，放在 37°C 培養箱下，靜置 15 分鐘後，以 495nm 波長分光比色計判讀。

第五節 儀器

一、酵素免疫分析洗滌機

洗滌機 (ELISA WASHER BIORAD[®])，在瓶中加入酵素免疫清洗液 (ELISA washing buffer)，設定每試盤自動清洗三次，洗條時每一次注入 500 毫升/孔之清洗液至各試孔內，接著再自動吸乾試孔中已清洗液至廢棄瓶中。

二、酵素免疫分析比色器

分析比色器 (spectrophotometer Biorad[®])，選用 495nm 波長來檢測各試盤反應吸光值 (optical density OD)，而比色器可連續掃描 96 孔試盤，結果以試紙表列。

第四章 結果

第一節 B型肝炎 anti-HBc 試盤測試比較

一、測試者血清肝炎標幟分類

12名測試者HBV血清標幟分別驗有HBsAg、anti-HBs、anti-HBc、HBe Ag、anti-HBe等項目(表二)。由肝炎血清標幟反應可區分A、B、C、D四種族群：A族群為HBsAg、anti-HBc陽性，曾經感染且為HBV的帶原者(HBsAg carrier)(編號1、4、6、7、14)。B族群為HBsAg陰性、anti-HBc陽性，過去曾經感染過HBV且表面抗原已清除者(antigen clearance)(編號2、3、5)。C族群為anti-HBs陽性，但未測有HBsAg，可能為疫苗注射者(vaccines)或因不明抗原刺激所反應(編號12、13)。D族群為在血清中未檢測出有任何HBV之抗原或抗體標幟，可能未曾感染過HBV(non-infected)(編號8、9、10、11)。

二、anti-HBc 試盤 IgG subclasses 反應結果

各不同來源HBV anti-HBc 試盤，以代號W、B、E、C、G代表各廠牌試盤，包括國內外不同廠牌來源之核心抗原試盤，而代號C試盤為自行購買HBc Ag，並用連結試劑讓抗原吸附在空白試盤中，和其它試盤一同檢測其結果(表一)。依實驗操作方法，每名測試者均測有anti-HBc IgG1, 2, 3, 4等吸光值反應。而每一不同來源試盤，在同一條件下測試，可發現各不同試盤吸光值反應不一(圖一至圖五)，W試盤(Wellcozyme[®])較高外，B試盤(Enzygnost[®])反應皆低於0.1以下。國內廠牌及自行連結試盤有較高吸光值。其中G試盤(Anticorase B-96[®])各族群均有較高吸光值出現，IgG1平均值最高者為0.64。各廠牌及各血清吸光值皆有強弱不一表現，其平均吸

光值表現以 G 試盤吸光值較明顯，且各族群間有明顯差異的區分。因此，以下研究對象其 anti-HBc subclasses，均以 G 試盤為 HBc 抗原做檢測材料。

第二節 B 型肝炎抗原清除和帶原族群核心次型抗體間之比較

一、研究對象基本資料

研究對象有 B 型肝炎病毒感染抗原清除者 434 人和帶原者 96 人。雖然抗原清除族群各年齡層人數較帶原族群人數為多，但整體而言兩族群中男、女性在各年齡層的人數分佈比例沒有明顯的差異（ $P > 0.05$ ）。男性和女性兩者的總人數比例在這兩族群中也是相近的約 57:43（表三）。隨著年齡層的提升，這兩族群中男性人數之比例是逐漸多於女性。

二、兩族群 IgG subclasses 平均吸光值之差異性

這兩族群，其 IgG 次型抗體（IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4）之平均吸光值在各年齡層是被檢驗與比較。在測量 IgG 次型抗體平均吸光值，我們將各檢測值予以標準化校正，由各盤測試值求得該次實驗核心次型抗體的平均值，除以該盤的陽性對照值，求得兩者間的一個係數，係數再乘以測試值成為校正值，以電腦 SAS 統計軟體將檢測 530 位 anti-HBc subclasses 吸光值予以標準化。因 IgG1 和 IgG3 之平均吸光值均達到可測試範圍，而 IgG2 及 IgG4 吸光值普遍低於可測試範圍，故 IgG 次型抗體平均吸光值之差異性比較，將著重於 IgG1 和 IgG3 的分析。

（A）年齡

抗原清除族群中 IgG1 及 IgG3 平均吸光值，是隨著年齡增加有逐

漸下降之趨勢(圖七 a)。除了在 20-29 年齡層外,其他各年齡層 IgG3 平均吸光值是大於 IgG1。相反於抗原清除族群, IgG1 平均吸光值在帶原族群是大於 IgG3 平均吸光值(圖七 b),而以在 30-50 年齡層中, IgG1 平均吸光值最高,隨年齡層的提升, IgG1 和 IgG3 亦有下降的趨勢。在圖七 a 和 b 中,可明顯發現帶原族群其 IgG1 和 IgG3 之平均吸光值在各年齡層均大於抗原清除族群。

(B) 性別

以男、女性別所作年齡層曲線,在抗原清除族群男、女性在年齡層大於 30 歲以上均顯示 IgG3 高於 IgG1(圖八 a. b)。男性在 30 歲年齡層之前其 IgG1 平均吸光值是大於 IgG3(圖八 a),女性則無此現象(圖八 b)。在帶原族群裏,男女性不論在任何年齡層其 IgG1 均高於 IgG3(圖九 a. b)。男性在 30 至 60 年齡層裏有著較高 IgG1 和 IgG3 平均吸光值。然而女性在年齡大於 50 歲則有一顯著的增加在 IgG1 及顯著下降的 IgG3 平均吸光值。帶原族群男、女性平均吸光值均較抗原清除者為高。

三、兩族群 IgG1 和 IgG3 個別吸光值之相關性

由以上 1 和 2 的結果中,發現 IgG1 和 IgG3 平均吸光值在抗原清除和帶原族群中是有明顯的差異性存在。為了進一步了解個別吸光值 IgG1 和 IgG3 之間是否真有差異;也就是說不受個別高、低值因平均後所產生的誤差干擾,我們分析 IgG3 個別吸光值大於 IgG1 個別吸光值的人數 ($IgG3 > IgG1$), IgG3 個別吸光值近似 IgG1 個別吸光值人數 ($IgG3 \approx IgG1$) 和 IgG3 個別吸光值小於 IgG1 個別吸光值人數 ($IgG3 < IgG1$) 之比例。IgG1 和 IgG3 之個別吸光值取誤差正負 0.1。

(A) 抗原清除族群 IgG1 和 IgG3 個別吸光值

在圖表四，抗原清除族群中 $IgG3 > IgG1$ 人數佔 40.5%，略為高於 $IgG3 \doteq IgG1$ 人數百分比 (35.9%)。在相對比較圖中 (圖十) 亦可發現，個體之 IgG1 和 IgG3 相對吸光值集中在 IgG1 約為 0.2 和 IgG3 約為 0.4 之區域內。抗原清除族群以年齡層區分，男女性在各年齡層其 IgG1 及 IgG3 個別吸光值人數隨年齡增加有下降的趨勢 (圖十一)。

(B) 帶原族群 IgG1 和 IgG3 個別吸光值

帶原族群中 $IgG1 > IgG3$ 人數則佔 74%，顯示大部份的個體在帶原族群中，相對於抗原清除族群，含有較高的 IgG1 吸光值 (表四)。由相對比較圖來看，發現帶原族群人數在 IgG1 以 0.5 吸光值為切點基準，IgG1 大於 0.5 吸光值的人數相當高 (94/96) (圖十二)。與先前的結果，在抗原清除族群其 IgG1 和 IgG3 相對吸光值集中在 0.2 和 0.4 之區域內比較下顯示出，帶原個體含有高吸光值 IgG1 和 IgG3 但在肝炎病毒表面抗原清除後，其抗體的產生量不論是 IgG1 或 IgG3 均有下降之趨勢。帶原族群各年齡層男、女性之 IgG1 和 IgG3 相對分佈沒有明顯差異 (圖十三)，此結果建議帶原個體其抗體產生似乎不受年齡的差異所影響。

(C) 肝功能指數與帶原族群中 IgG1 和 IgG3 之關係

先前研究結果指出，帶原族群有較高的 IgG1 和 IgG3 吸光值比較於抗原清除族群，如此 IgG1 和 IgG3 吸光值隨著表面抗原之存在而增加，是否和肝功能指數 ALT、AST 異常者有無相互關係探討如下。因限制於四十歲以上健診者才作肝功能測試；因此我們針對四十歲以上抗原帶原者 52 人其肝功能做比較發現 AST、ALT 兩者皆大於 25 IU/ml 者有 9 人。以 IgG1 在 0.5 吸光值為切點基準，9 人中其 IgG3 吸光值大於 0.75 只有一人，是 $IgG3 > 0.75$ 總人數的 1/14。而 IgG3

吸光值小於 0.75 有 8 人, 是 IgG3 < 0.75 總人數的 8/38 (圖十四 a)。
IgG3 吸光值和肝功能異常兩者之間並未有顯著的差異 ($p > 0.05$)。
此外, 肝功能指數異常者和 IgG3 吸光值也並未有性別上之差異
($P > 0.05$) (圖十四 b.c)。

第五章 討論

在檢測 anti-HBc subclasses 的研究中發現，採用不同來源肝炎核心抗原，其反應結果是有差異的（圖六）。G 試盤中（Anticorase B-96[®]）其 IgG1 和 IgG3 吸光值分別可達 0.65 及 0.35。在 E 試盤（EverNew[®]）IgG1 和 IgG3 吸光值則可達 0.32 和 0.11，另兩種國外試盤吸光值 IgG1 和 IgG3 皆低於 0.2，如此差異結果可能是因為各廠牌其抗原來源不同，抗原決定位（epitope）亦有所不同所致（Bridget et al., 1986）。

在探討 IgG subclasses 吸光值之差異性中，帶原族群在不分男女性別與年齡層之下，大多數帶原者體內有較高的 IgG1 含量（表四），然而若以男女性別和年齡層區分，可以看見高含量的 IgG1 帶原者大都落在 30 至 60 年齡層。如此結果建議，30-60 歲的帶原者仍有較高的出現，當 HBV 在複製時其核心抗抗原分佈在肝細胞表面，並刺激 B 細胞作用產生 IgG1（Akbar et al., 1991；Power et al., 1994）。

抗原清除族在不分男女性別與年齡層，個體則普遍含有略高之 IgG3 含量或相近於 IgG1 之量。但隨著年齡層的提升，IgG3 含量有逐漸高於 IgG1 之趨勢（圖七 a）。此結果顯示，抗原清除者其核心抗體反應是在持有 IgG3 抗體之下，IgG1 含量趨於下降，轉為以 IgG3 為主。由 anti-HBc IgG1 抗體反應為主的帶原者至以 anti-HBc IgG3 反應為主的抗原清除者之結果，意味著核心抗原的存在與否可能會影響 T cell（Th1, Th2）作用路線的改變，在人體免疫反應機制中 Th1 和 Th2 作用路線均可刺激 IgG1 和 IgG3 的產生（Milich et al., 1997）。而 Th1 路徑以產生 IgG1 為主，Th2 路徑以產生 IgG3 為主，因此，當個體處於帶原狀態下，由於核心抗原的存在引來 Th1

作用機制產生大量的 IgG1。當核心抗原清除後，免疫機制將會由 Th1 轉為 Th2 作用機制，而以 IgG3 為主。如此之 Th1 和 Th2 消長之現象，或許可提供用各次型抗體之特性做被動免疫治療（Moreall et al., 1983, Ishizaka et al., 1995）。此外，肝功能異常的在本研究中不顯著在帶原族群與抗原清除族群中，說明了受病毒感染之肝細胞無太大之受損。

各 subclasses 在近來研究方向包括：（一）、由各免疫次型球蛋白的表現情形，來解釋各 T 細胞作用路線（Th1, Th2），進一步評估各疫苗在黏膜、皮下、肌肉不同路徑注射或吸收之效果（Major et al., 1996；Pertmer et al., 1996）。（二）、可解釋 CH, AH 病程及 ASC, CAH, LC, CPH 不同 HBV 病徵發展及預後情形（Akbar et al., 1991）。（三）、對因在低力價血清中 anti-HBc 反應，可檢測 anti-HBc subclasses IgG1，進一步確認是否為曾遭 HBV 感染，有確實 anti-HBc 存在（Sällberg et al., 1989）。（四）、了解各次型抗體在各種抗原刺激下的特性反應，可應用於免疫球蛋白被動免疫治療（Morell et al., 1983；Ishizaka et al., 1995）。（五）評估各抗原決定位，其產生不同抗體反應結果，可用來評估使用基因疫苗之研發所需基因片斷（Bridget et al., 1986；Urban et al., 1994）。

本研究由各不同來源抗原試盤證實，不同核心抗原產生不同抗體。對大部份 B 型感染抗原清除者，此研究首次報告核心次型抗體的反應為 IgG3>IgG1。而帶原者原核心次型抗體的反應則為 IgG1>IgG3，和 Sällberg（1990）等研究其次型抗體為 IgG1>>IgG3>IgG4 的結果是相似的。而 IgG1 對抗原的清除在帶原者和清除者間有著極大差異，應為抗原主要清除免疫蛋白。IgG3 對抗原

是否存，在本研究中以肝功能 AST 和 ALT 指數異常者，和在帶原族群中，其本身 IgG3 吸光值之高低作一比較，兩者並無顯著相關（ $P>0.05$ ）。可續由抗原族群或抗原清族群中，其血清內病毒 DNA 之檢測和 IgG3 再作比較，是否兩者有相關反應。IgG subclasses 可作為臨床上檢測工具，及釐清疾病免疫學各種作用機制，也可進一步對疫苗等防治工作跨出一步。

參考文獻

- Akbar, S. M. F., Horiike, N., Onji, M., Ohta, Y.
(1991) :Immunoglobulin G subclasses of antibodies to hepatitis B core antigen in HBs antigen positive liver diseases. *J. Gast. & Hepat.* 6:71-75.
- Allen, J. E., Maizels, R. M. (1997) :Th1-Th2:reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunol. Today.* 18:387-392.
- Borzi, R. M., Dal Mote, P., Honorati, M. C., Facchini, A. (1992) :IgG subclass distribution of anti-HBs antibodies following vaccination with cDNA HBsAg. *J. Immunol. Meth.* 146:17-23.
- Bridget Ferns, R., Tedder, R. S. (1986) :Human and monoclonal antibodies too hepatitis B core antigen recognize a single immunodominant epitope. *J. Med. Virol.* 19:193-203.
- Carotenuto, P., Quinti, I., Pontesilli, O., Hall, A. J., De Lange, G. G., Whittle, H. C., D'amelio, R., Aiuti, F. (1995) :Response to hepatitis B vaccine in a cohort of Gambian children. *Ped. Inf. Dis* 14:215-20.
- Chen, D. S., Hsu, H. M., Sung, J. L. (1987) : A mass vaccination program in Taiwan against hepatitis B virus infection in infants of hepatitis B surface antigen-carrier mothers. *JAMA* 257:2597-2603.
- Chisari, F. V. (1995) :Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 13:29-60.
- Costantino, P. J., Gare, N. F., Warmington, J. R (1995) :Humoral immune responses to systemic *Candida albicans* infection in inbred mouse strains. *Immunol & Cell Bio.* 73:125-133.

- Deplazes, P., Smith, N. C., Arnold, P., Lutz, H., Eckert, J
 (1995) : Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dog to
 Leishmania infantum and other parasites. *Para. immunol.*
 17:451-458.
- Feitelson, M. (1992) : Hepatitis B virus infection and primary
 hepatocellular carcinoma. *Clin. Micro. Rev.* 5:275-301.
- Ferrari, C., Penna, A., Bdrtoletti, A., Valli, A., Antoni, A. D.,
 Giuberti, T., Cavalli, A., Petit, M. A., Fiaccadori, F.
 (1990) : Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded
 antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection.
J. Immunol. 145:3442-3449.
- Hassan, J., Feighery, C., Bresnihan, B., Keogan, M., Fitzgerald, M. X.,
 Whelan, A. (1994) : Serum IgA and IgG subclasses during treatment
 for acute respiratory exacerbation in cystic fibrosis : analysis
 of patients colonised with mucoid or non-mucoid strains of
 pseudomonas aeruginosa. *Immunol. Inv.* 23:1-13.
- Health and vital statistic 1. general health statistics 1996
 republic of China Taipei, Taiwan, Department of Health, Excutive
 Yan sep. 1997
- Hess, G. (1993) : Virological and serological aspects of hepatitis
 B and the delta agent. *Gut* supplement:S1-S5.
- Hsu, H. M., Chen, D. S., Chuang, C. H. (1988) : Efficacy of a mass
 hepatitis B vaccination program in Taiwan: studies of 3464
 infants of hepatitis B surface antigen-carrier mothers. *JAMA*
 260:2231-2235.
- Hsu, L. C., Lin, S. R., Hsu, H. M., Chao, W. H., Hsieh, J. T., Wang, M. C.,
 Lu, C. F., Chang, Y. H., Ho, M. S. (1996) : Ethnic differences in
 immune responses to hepatitis B Vaccine. *Am. J. Epi.* 143:718-

24.

- Hsu, S. M. , Chen, D. S. , Chuang, C. H. , Lu, C. F. , Jwo, D. M. , Lee, C. C. , Lu, H. C. , Cheng, S. H. , Wang, Y. F. , Wang, C. C. , Lo, W. J. , Shih, C. J. , Sung, J. L. (1988) :Efficacy of a mass hepatitis B vaccination program in Taiwan-Studies on 3464 infants of hepatitis B surface antigen-carrier mothers. *J. A. M. A.* 260:2231-2235.
- Ishizaka, S. T. , Piacente, P. , Siva, J. , Mishkin, E. M. (1995) :IgG subtype is correlated with efficiency of passive protection and effector function of anti-herpes simplex virus glycoprotein D monoclonal antibodies. *J. Inf. Dis.* 172:1108-11.
- Islam, D. , Wretlind, B. , Ryd, M. , Lindberg, A. A. , Christensson, B (1995) :Immunoglobulin subclass distribution and dynamics of Shigella-Specific antibody responses in serum and stool samples in shigellosis. *J. Med. Microbiol.* 63:2054-2061.
- Jung, M. C. , Diepolder, H. M. , Spengler, U. , Wierenga, E. A. , Zchoval , R. , Hoffmann, R. M. , Eichenlaub, D. , Frosner, C. , Will, H. , Pape , G. R. (1995) :Activation of heterogeneous hepatitis B (HB) core and e antigen specific CD4+ T-cell population during seroconversion to anti-HBe and anti-HBs in hepatitis B virus infection . *J. Virol.* 69:3358-3368.
- Lau, J. Y. N. , Wright, T. L. , (1993) :Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet* 342:1335-1344.
- Liaw, Y. F. (1994) :Viral hepatitis in Taiwan :status in the 1990s. *Viral Hepatitis and Liver Disease* 419-421.
- Linde, A. , Andersson, J. , Lundgren, G. , Wahren, B. (1987) :Subclass reactivity to Epstein-Barr virus capsid antigen in primary and reactivated EBV infections. *J. Med. Virol.* 21:109-121.

- Linde, G. A. (1985) : Subclass distribution of rubella virus-specific Immunoglobulin G. *J. Clin. Microbiol.* 21:117-113.
- Major, A. S., Cuff, C. F. (1996) : Effects of the route of infection on immunoglobulin G subclasses and specificity of the Reovirus-specific humoral immune response. *J. Virol.* 59:68-5974.
- Marcu, B., Cooper, M. D. (1982) : New view of the immunoglobulin heavy-chain switch. *Nature (London)* 9:327-336.
- Maruyama, T., McLachlan, A., Lino, S., Koike, K., Kurokawa, K., Milich, D. R. (1993) : The serology of chronic hepatitis B infection revisited. *J. Clin. Invest.* 91:2586-2595.
- Maynard, J. E. (1990) ; Hepatitis B: Global importance and need of control. *Vaccine* 8:S18.
- Milich, D. R., Schödel, F., Hughes, J. L., Jones, J. E., Peterson, D. L. (1997) : The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets : antigen structure can affect Th cell phenotype. *J. Virol.* 71:2192-2201.
- Milich, D. R., McLachlan, A., (1986) : The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell independent and a T-cell dependent antigen, *Science* 12:1398-1401.
- Mondelli, M., Vergani, G. M., Alberti, A., Vergani, D., Portmann, B., Eddleston, A. L. W. F., Williams, F. (1982) : Specificity of T lymphocyte Cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection : evidence that T cells are directed against HBV core antigen expressed on hepatocytes. *J. Immunol.* 129:2773-2778.
- Morell, A., Roth-Wicky, B., Skvaril, F. (1983) : Immunoglobulin G Subclass restriction of antibodies against Hepatitis B surface Antigen. *Inf. & Immunity* 39:565-568.

- Mushahwar, Isa. K., Dienstag, J. L., Polesky, H. F., Mcgrath, L. C., Decker, R. H., Overby, L. R. (1981) : Interpretation of various serological profiles of hepatitis B virus infection. *A. J. C. P.* 773-777.
- Pertmer, T. M., Roberts, T. R., Haynes, J. R. (1996) : Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J. Virol.* 70:6119-6125.
- Power, D. C. (1994) : Effect of age on serum immunoglobulin G subclass antibody responses to inactivated influenza virus vaccine. *J. Med. Virol.* 43:57-61.
- Riesen, W. F., Skaril, F., Braun, D. G. (1976) : natural infection of man with group A streptococci. *Scand. J. Immunol.* 5:383-390.
- Sällberg, M., Magnius, L. O. (1989) : Enzyme immunoassay for anti-hepatitis B core (HBc) immunoglobulin G1 and significance of low-level results in competitive assays for anti-HBc. *J. Clin. Microbiol.* 27:849-853.
- Sällberg, M., Norder, H., Linde, A., Magnius, L. O. (1988) : Subclass pattern of anti-HBc IgG in chronic hepatitis B: Relation to HBcAg/anti-HBe and HBV-DNA. *Viral Hepatitis & Liver Disease* 244-247.
- Sällberg, M., Norder, H., Lindh, G., Magnius, L. O. (1991) : IgG subclasses in circulating immune complexes with hepatitis B e antigen in chronic hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.* 84:116-121.
- Sällberg, M., Norder, H., Magnius, L. O. (1990) : Comparison of class and subclass distribution of antibodies to the hepatitis B core and B e antigens in chronic hepatitis B. *J. Med. Virol.* 30:1-6.

- Sällberg, M., Norder, H., Weiland, O., Magnius, L.O. (1989) :
 Immunoglobulin isotypes of anti-HBc and anti-HBe and hepatitis
 B virus (HBV) DNA elimination in acute hepatitis B
J. Med. Virol. 29:296-302.
- Shakib, F., Stanworth, D. R. (1980) : Human IgG subclasses in health
 and disease . *Ricerca Clin. Lab.* 10:561-580.
- Skavril, F., Joller-Jemelka, H. (1984) : IgG Subclasses of Anti-HBs
 Antibodies in Vaccinated and Nonvaccinated Individuals and in
 Anti-HBs Immunoglobulin Preparations. *Int. Archs. Allergy
 appl. Immunol.* 73:330-337.
- Smucny, J. J., Kelly, E. P., Macarthy, P. O., King, A. D. (1995) : Murine
 immunoglobulin G subclass responses following immunization with
 live dengue virus of a recombinant dengue envelope protein.
Am. J. Trop. Hyg. 53:432-437.
- Sundqvist, V-A., Linde, A., Wahren, B. (1984) : Virus-specific
 immunoglobulin G Subclasses in herpes simplex and
 Varicella-Zoster virus infections. *J. Clin. Microbiol.*
 20:94-98.
- Takahashi, K., Akahane, Y., Gotanda ,., Mishiro, T., Imai, M.,
 Miyakawa, Y., Mayumi, M. (1979) : Demonstration of hepatitis B e
 antigen in the core of Dane particles. *J. Immunol.* 122:275-279.
- Tong, M. J., Hwang, S. J. (1994) : Hepatitis B virus infection in Asian
 americans. *Gas. Clin. North. Am.* 23:569
- Torgano, G., Vecchi, M., Podda, M., Zuin, M., Arosio, E.,
 Battezzati, P.M., De Franchis, R. (1995) : Primary biliary
 cirrhosis is associated with specific changes in liver IgG
 bearing cell subpopulations. *J. Hepat.* 22:545-550.

- Townsend, K., Sällberg M., O'dea J., Banks, T., Driver, D., Sauter, S., Chang, S. M., Jolly, D. J., Mento, S. J., Milich, D. R., Lee, W. T. L. (1997) : characterization of CD8+ cytotoxic T-lymphocyte responses after genetic immunization with retrovirus vectors expressing different form of the hepatitis B virus core and e antigens. *J. Virol.* 71:3365-3374.
- Tsai, S. L., Chen, P. J., Lai, M. Y., Yang, P. M., Sung, J. L., Huang, J. H., Hwang, L. H., Chang, T. H., Chen, D. S. (1992) : Acute exacerbations of chronic type B Hepatitis are accompanied by increased T cell responses to hepatitis B core and e antigens. *J. Clin. Invest.* 89:87-96.
- Urban, M., Winkler, T., Landini, M. P., Britt, W., Mach, M. (1994) : Epitope-specific distribution of IgG subclasses against antigenic domains on glycoprotein of human cytomegalovirus. *J. Inf. Dis.* 169:83-90
- Van Loon, A. V., Heesen, F. W. A., Van der logt, J. T. M. (1987) : Antibody isotype response after human cytomegalovirus infection. *J. Virol. Meth.* 15:101-107.
- Vene, S., Franzè, C., Niklasson, B. (1994) : Development of specific antibody patterns and clinical symptoms following Ockelbo virus infection. *Arch. Virol.* 134:61-71.
- Wong, V. S., Egner, W., Elsey, T., Brown, D., Alexander, G. J. M. (1996) : Incidence, character and clinical relevance of mixed cryoglobulinaemia in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Clin. Exp. Immunol.* 104:25-31.
- 許須美 (1990) : 台灣地區 B 型肝炎流行病學與預防注射的推動及評估
行政院衛生署

表一 HBV anti-HBc 試盤種類比較表

試盤代號 產品	W	B	E	G	C
試盤抗原	HBc Ag	HBc Ag	HBc Ag	HBc Ag	HBc Ag
產品廠商	國外商品 Commercial kit	國外商品 Commercial kit	國內商品 Commercial kit	國內商品 Commercial kit	國外製劑 自行連結抗 原試盤
抗原製成	基因工程	基因工程	未記載	未記載	E coli 基因 表達
試盤規格	96 孔/盤	96 孔/盤	96 孔/盤	96 孔/盤	96 孔/盤 (NUNC)

表二 測試者 HBV 血清標幟分類表

族群分類	檢體編號	採血日期	性別	年齡	HBs Ag	anti-HBs	anti-HBc	HBe Ag	anti-HBe
A	1	860408	男	25	+	-	+	+	-
A	2	860408	女	19	+	-	+	-	-
A	4	860408	男	60	+	-	+	+	-
A	6	860410	男	40	+	-	+	+	-
A	7	860407	男	26	+	-	+	+	-
A	14	850123	男	36	+	-	+	+	-
B	3	860409	女	22	-	+	+	-	-
B	5	860409	女	24	-	+	+	-	-
C	12	860409	女	21	-	+	-	-	-
C	13	850516	女	45	-	+	-	-	-
D	8	860409	男	40	-	-	-	-	-
D	9	860409	男	31	-	-	-	-	-
D	10	860403	女	29	-	-	-	-	-
D	11	860402	女	20	-	-	-	-	-

族群分類

A : chronic carrier B : HBs Ag clearance

C : vaccinees D : non-infected

表三 HBV 兩族群性別及各年齡層之比較表

	抗原清除族群 [#]		帶原族群 ^{\$}	
	男	女	男	女
年齡層	人數%	人數%	人數%	人數%
20-29	3 0.7	15 3.5	1 1.0	4 4.2
30-39	61 14.1	88 20.2	20 20.8	18 18.8
40-49	92 21.2	69 15.9	19 19.8	16 16.8
50-59	56 12.9	13 3.0	10 10.4	2 2.1
60-70	33 7.6	4 0.9	5 3.3	1 1.0
小計	245 56.5	189 43.5	55 57.3	41 42.7
總人數	434 人		96 人	

#抗原清除族群 HBs Ag(-) anti-HBs(+)

\$帶原族群 HBs Ag(+) anti-HBs(-)

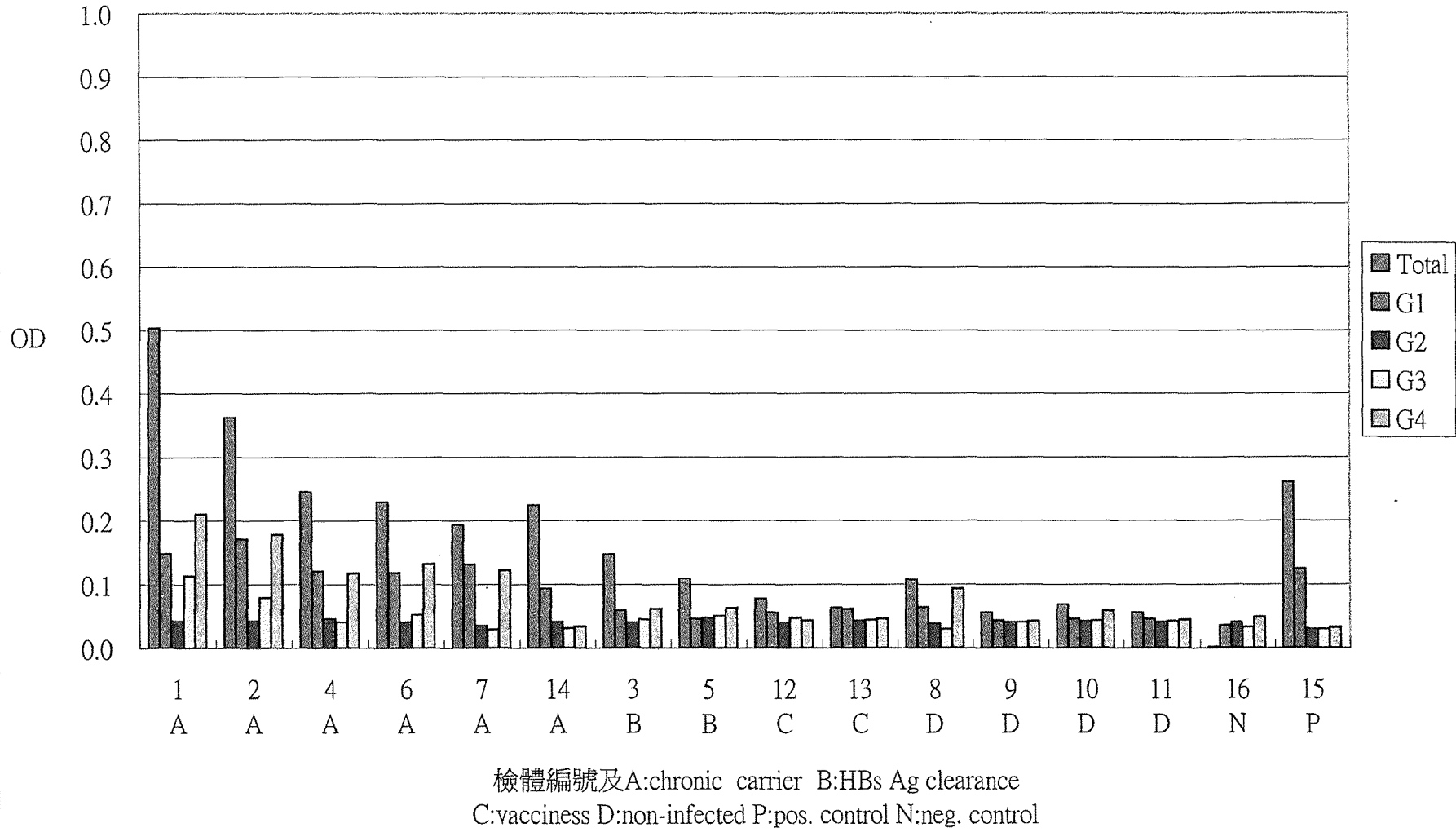
表四 HBV 兩族群 IgG1 和 IgG3 個別吸光值比較表

G1/G3 [#]	抗原清除族群		帶原族群	
	人數	百分比	人數	百分比
G3>G1	176	40.5	18	18.8
G3≈G1	156	35.9	7	7.2
G3<G1	103	23.6	71	74.0
總人數	434 人		96 人	

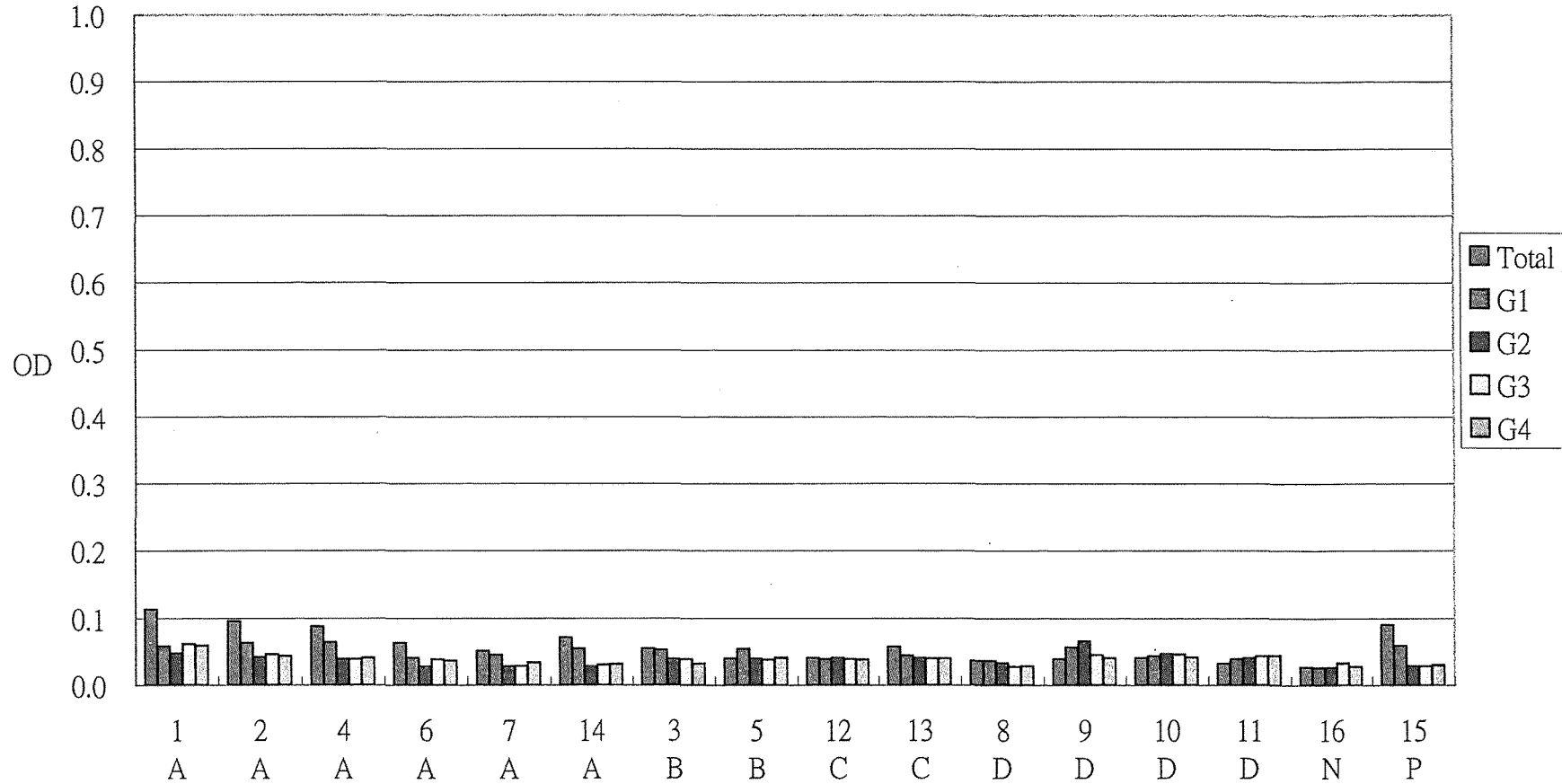
#IgG3 和 IgG1 原吸光值各加減 0.1 誤差值

並相互比較兩者高低所佔之比例。

圖一 (W) anti-HBc試盤 IgG subclasses 反應圖

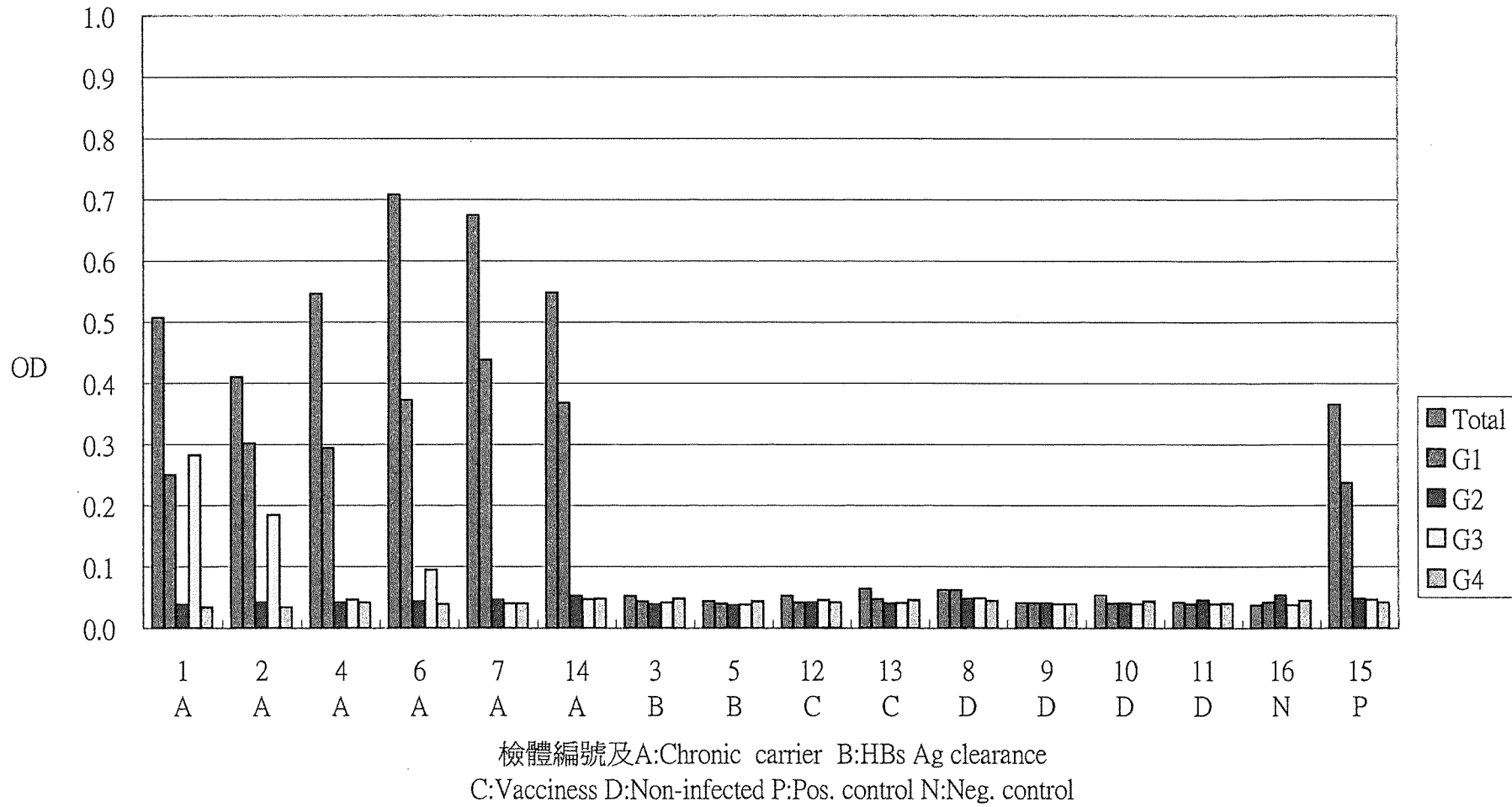


圖二 (B) anti-HBc試盤 IgG subclasses 反應圖

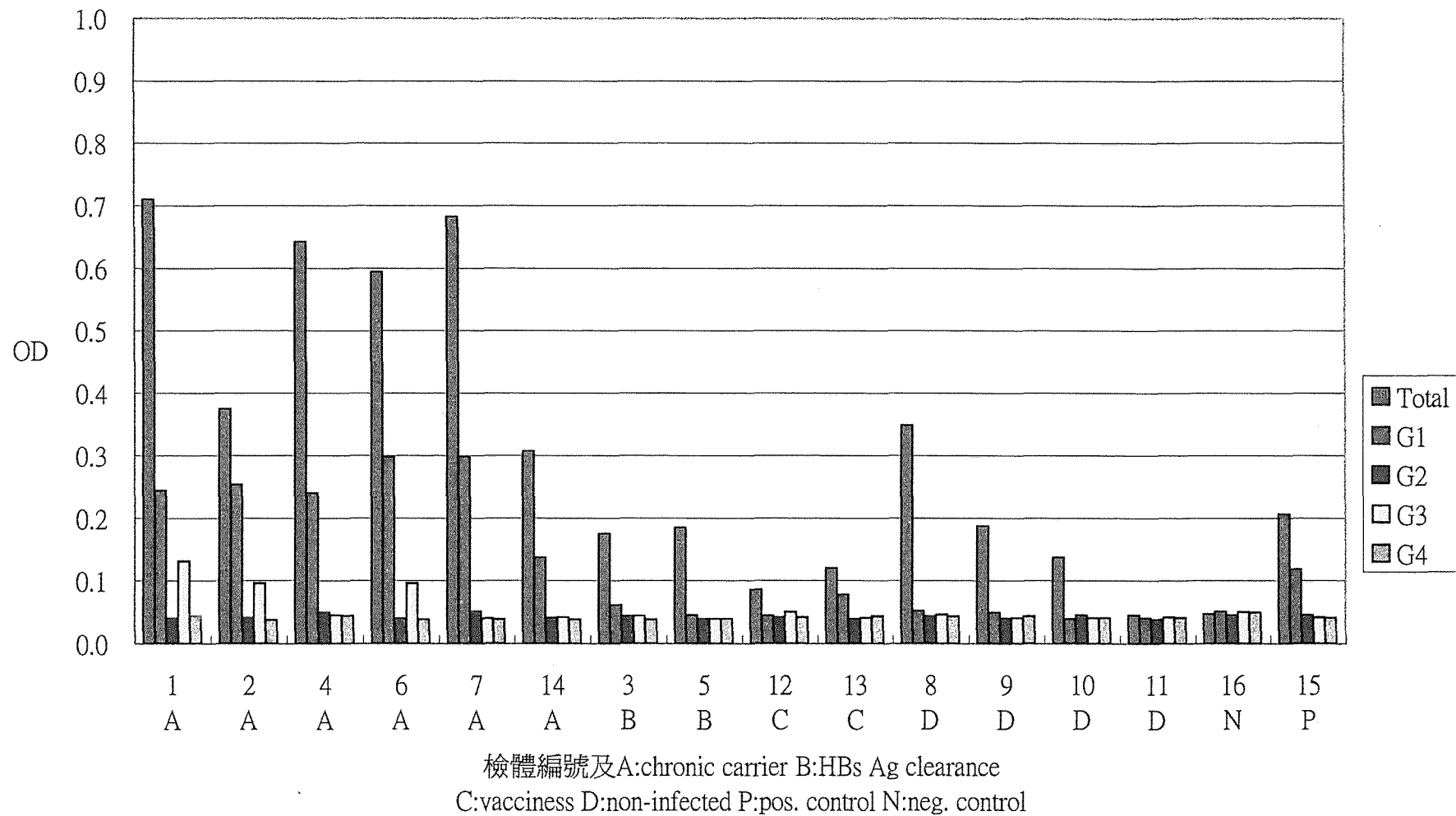


檢體編號及A:chronic carrier B: HBs Ag clearance
 C:vacciness D:non-infected P:pos. control N:neg. control

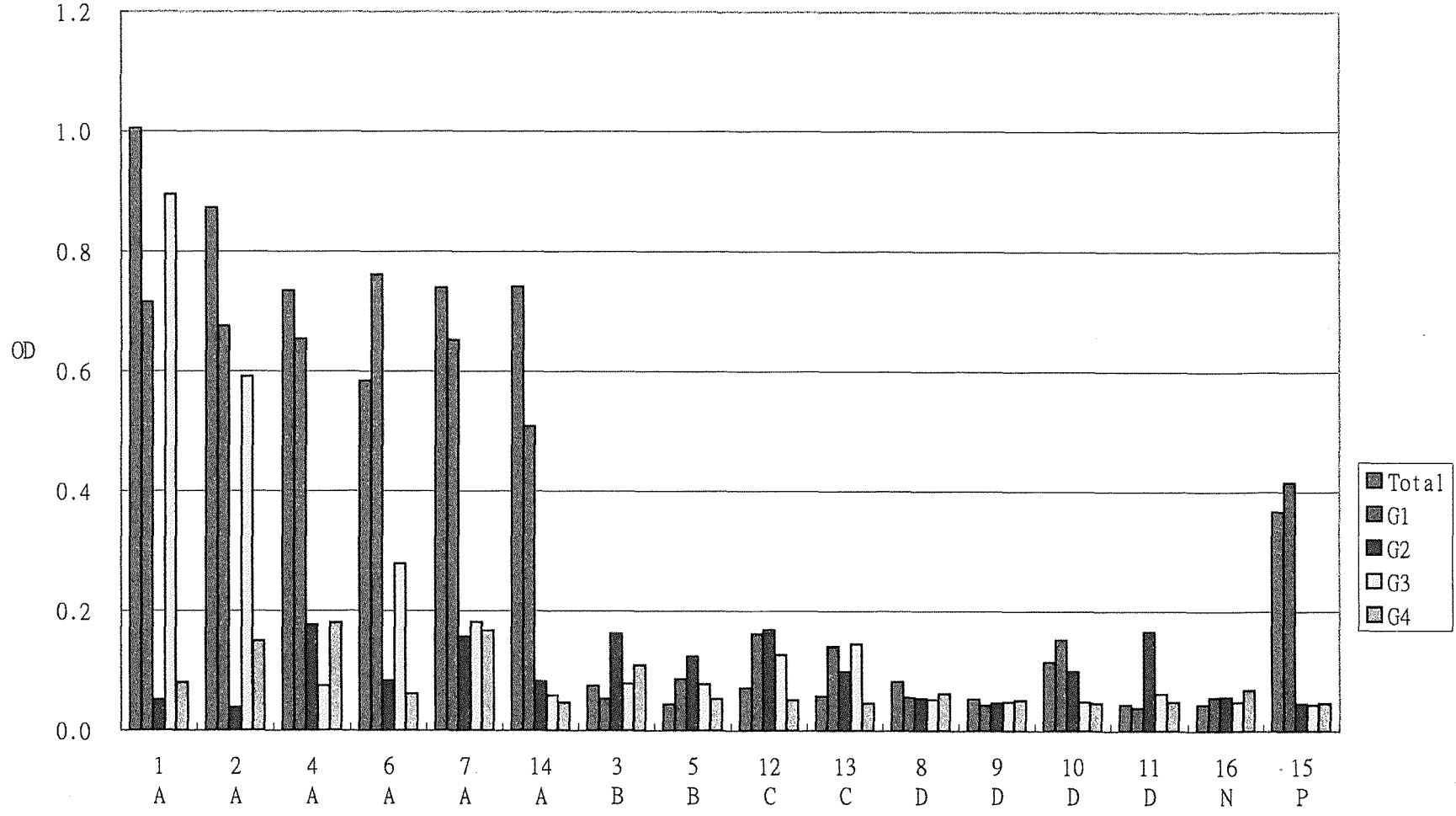
圖三 (E) anti-HBc試盤 IgG subclasses反應圖



圖四 自行連結抗原 anti-HBc試盤 I gG subclasses反應圖

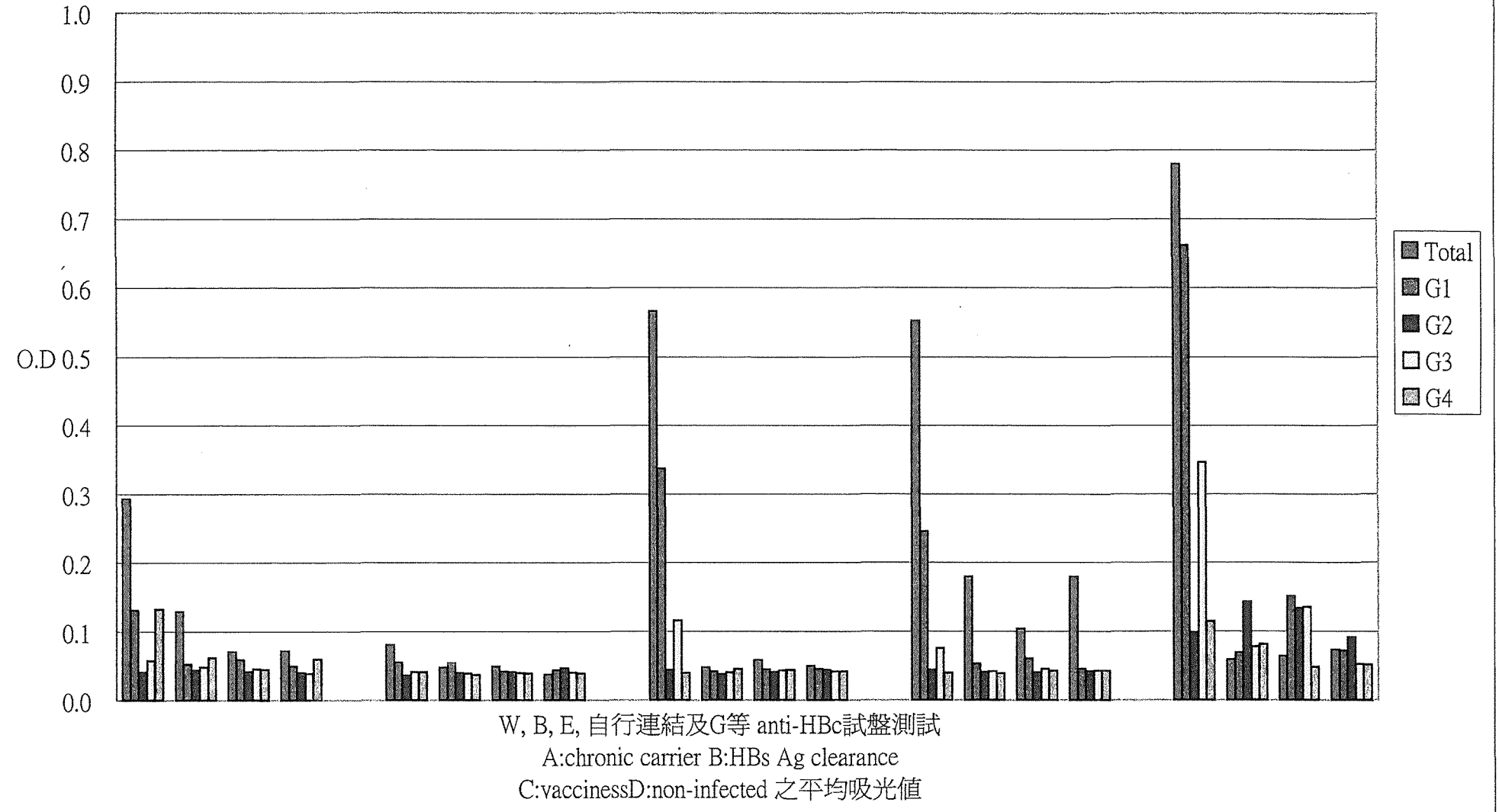


圖五 (G)anti-HBc試盤 IgG subclasses 反應圖

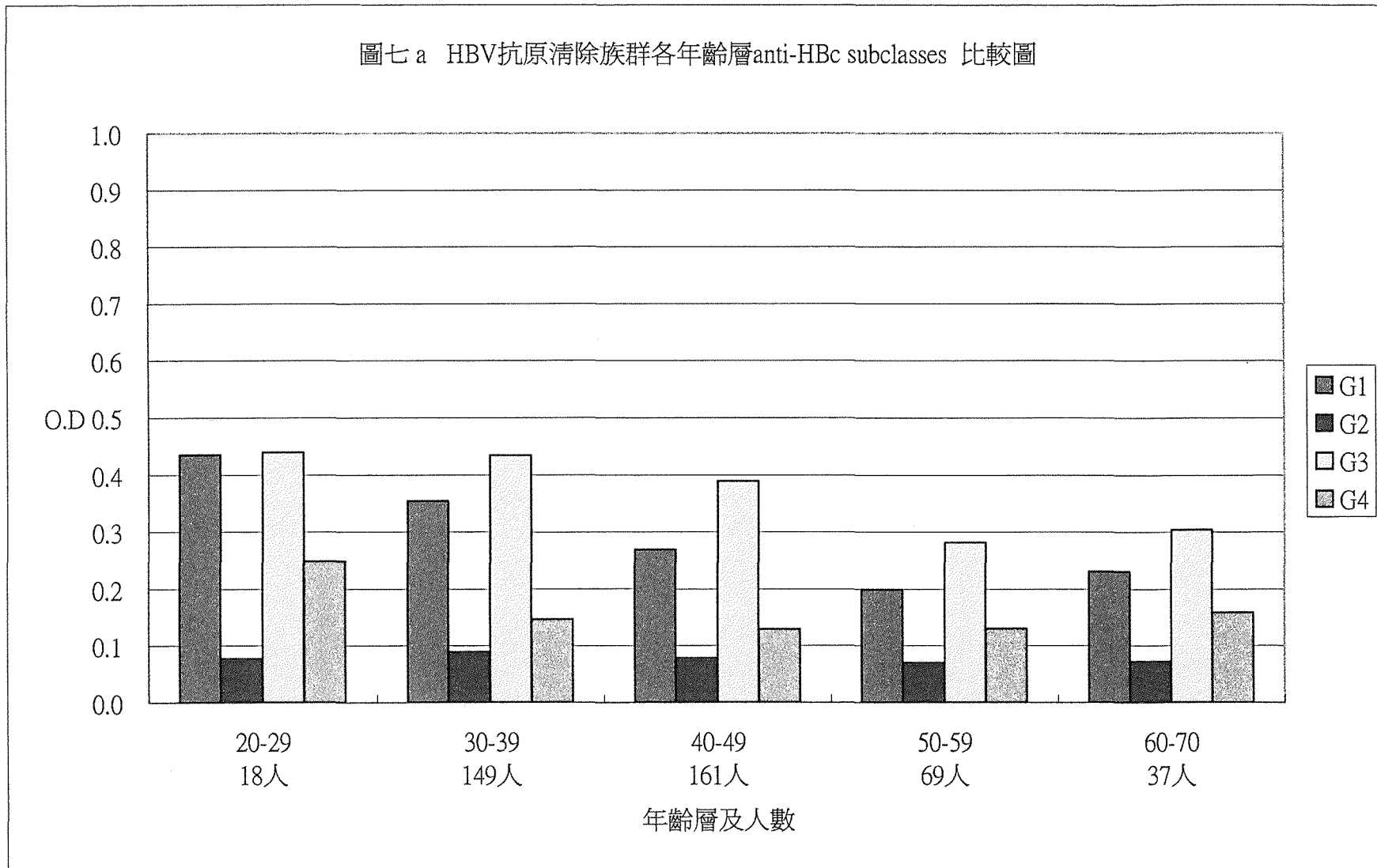


檢體編號及A:chronic carrier B:HBs Ag clearance
C:vacciness D:non-infected P:pos.control N:neg.control

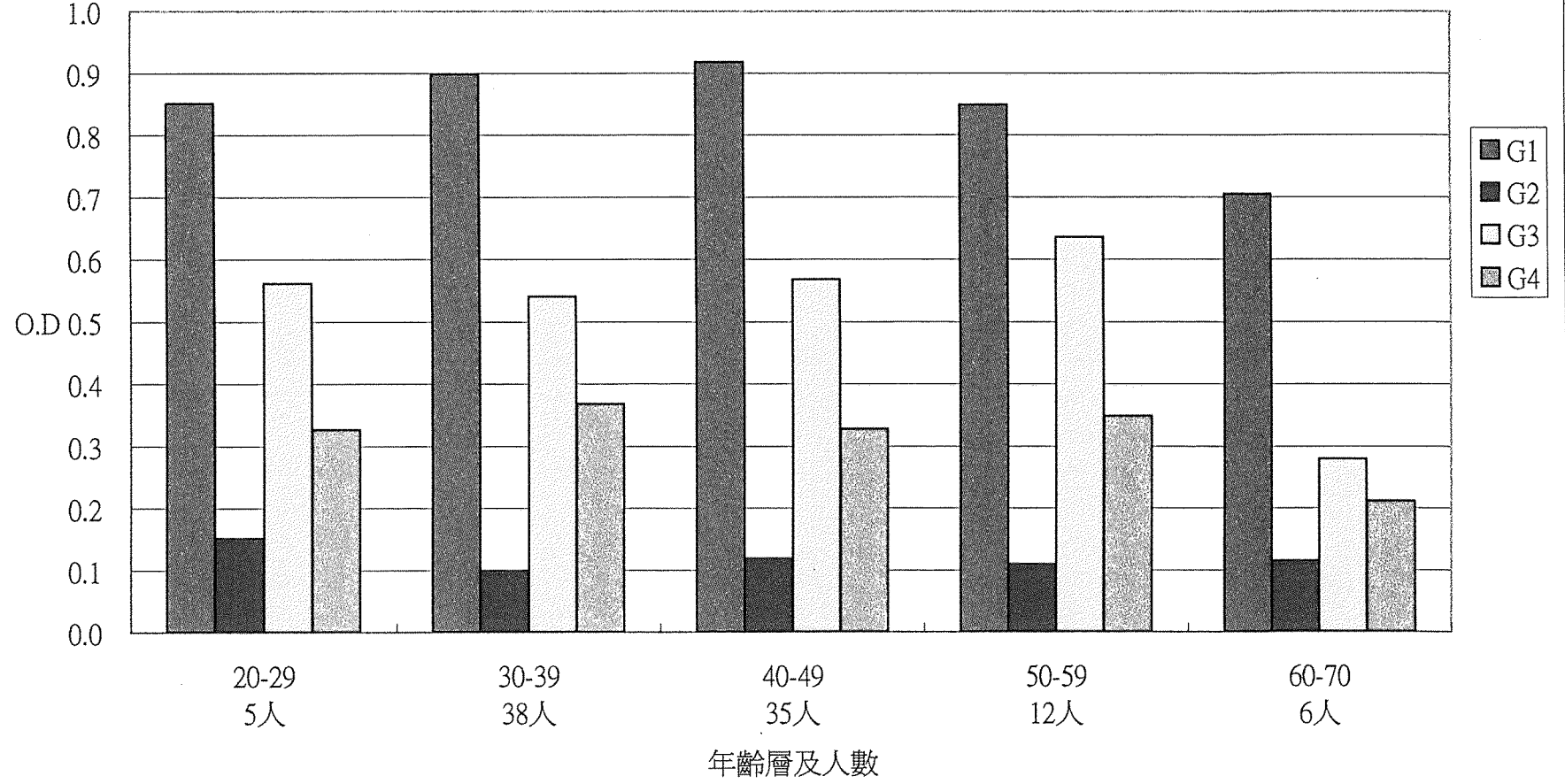
圖六 五種anti-HBc 試盤 IgG subclasses 反應平均值比較圖



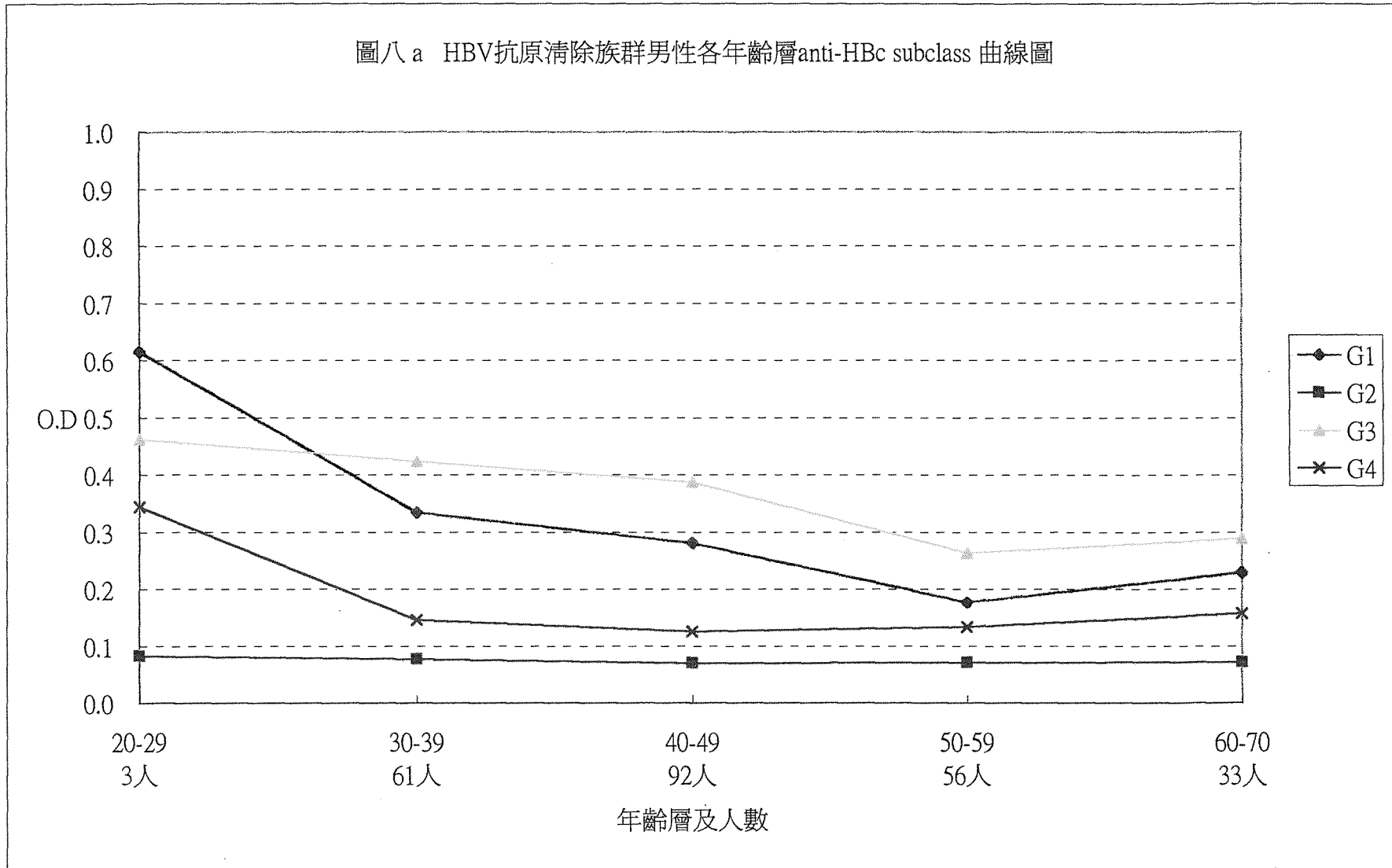
圖七 a HBV抗原清除族群各年齡層anti-HBc subclasses 比較圖



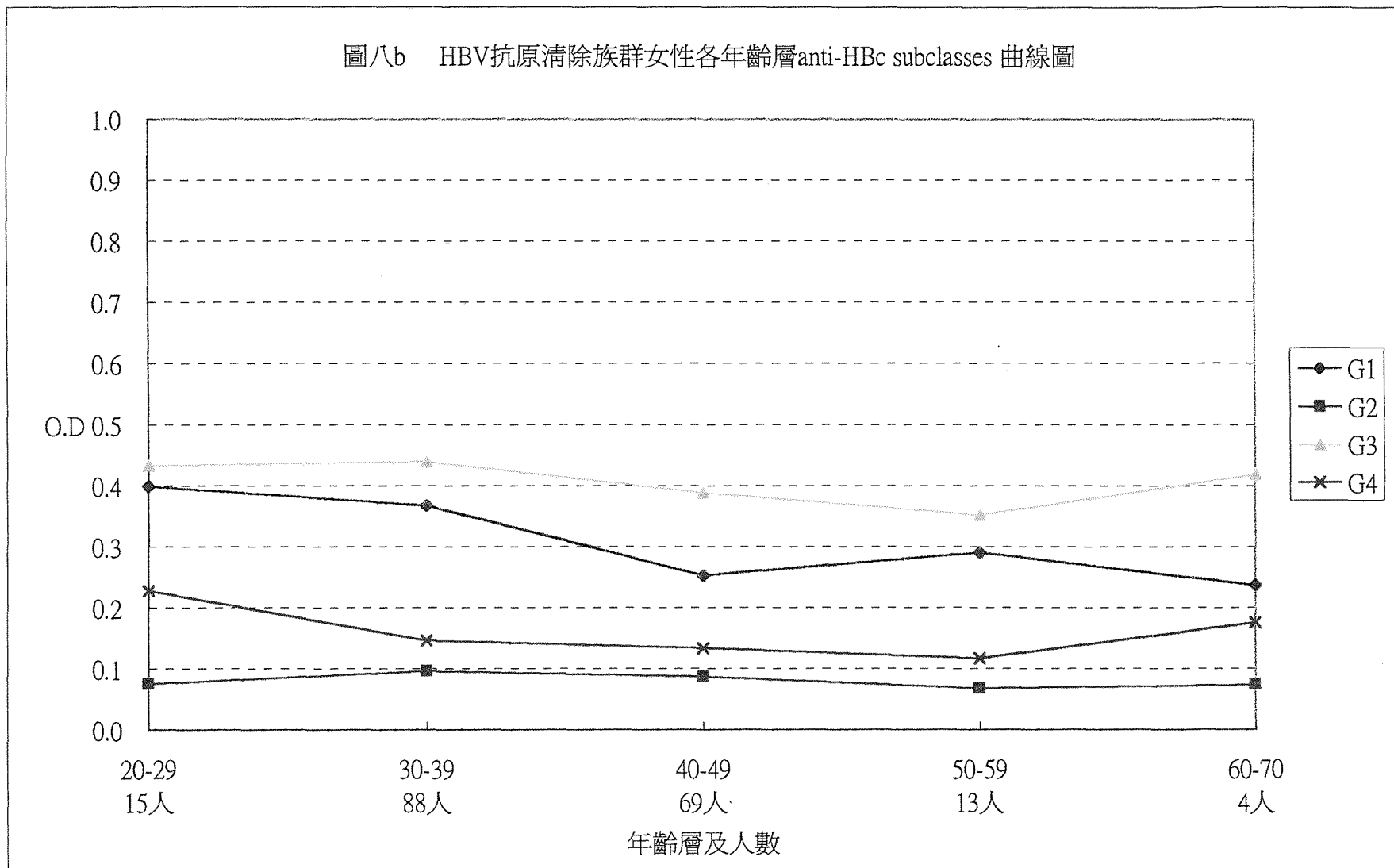
圖七 b HBV帶原族群各年齡層anti-HBc subclasses 比較圖



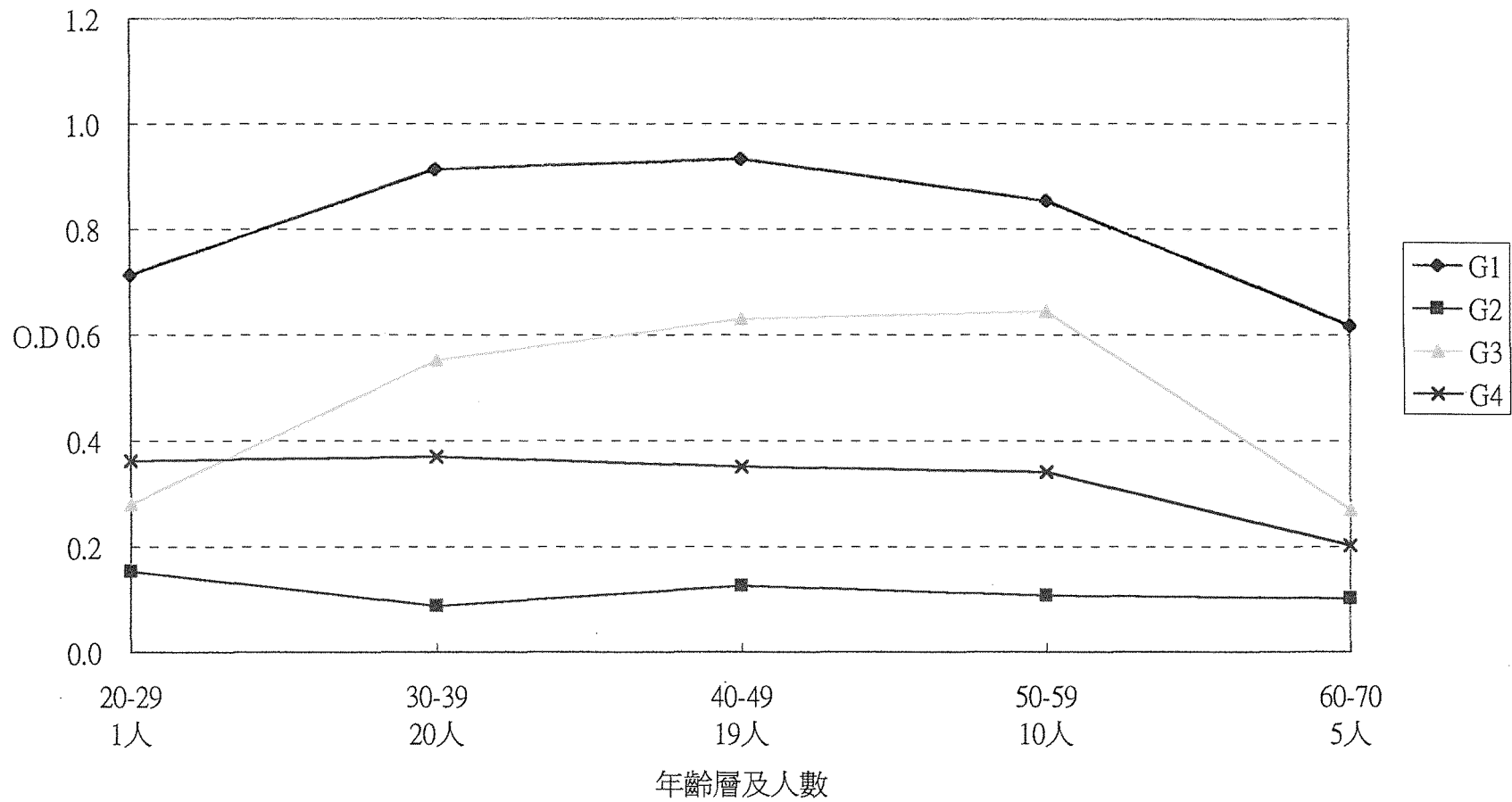
圖八 a HBV抗原清除族群男性各年齡層anti-HBc subclass 曲線圖



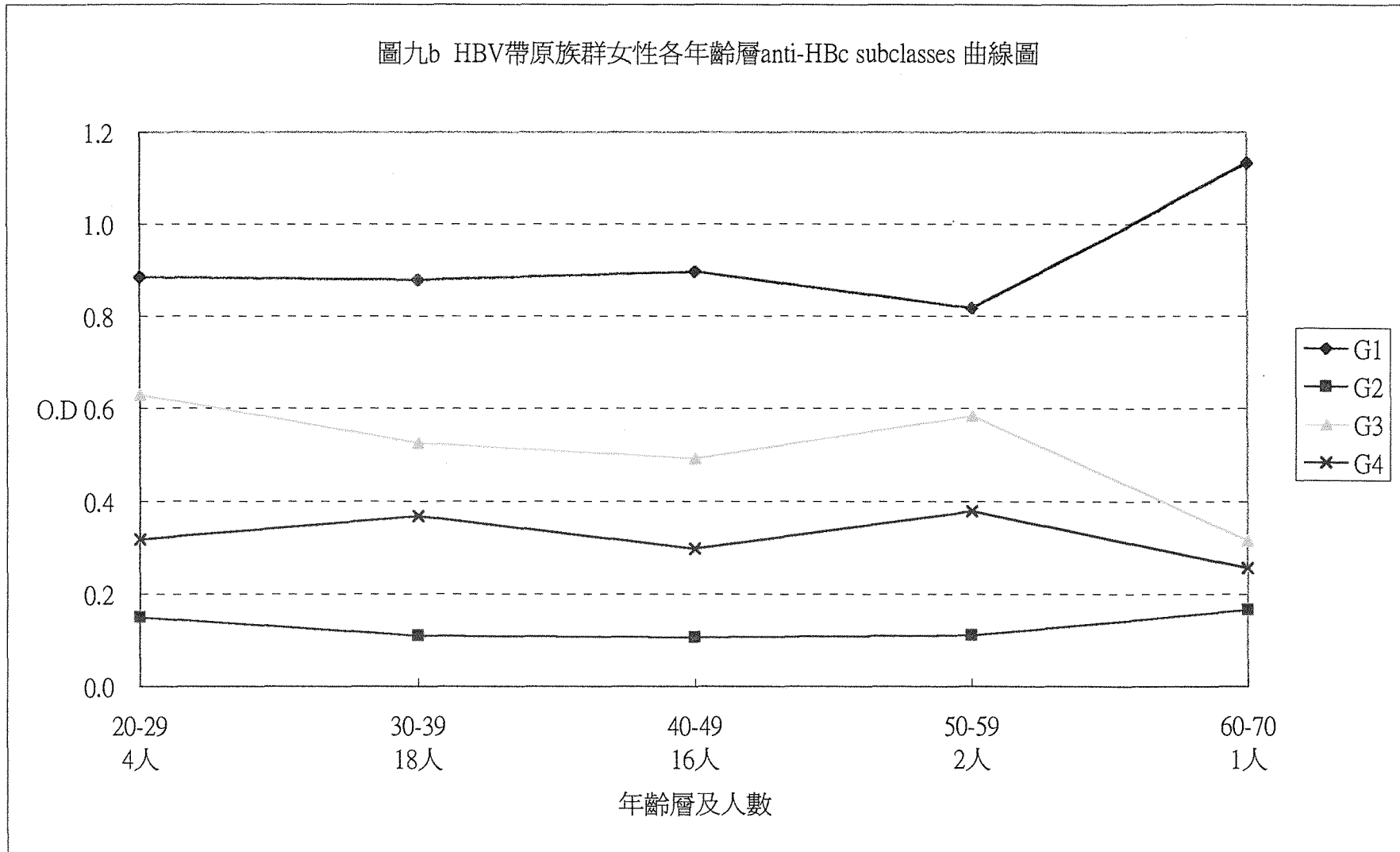
圖八b HBV抗原清除族群女性各年齡層anti-HBc subclasses 曲線圖



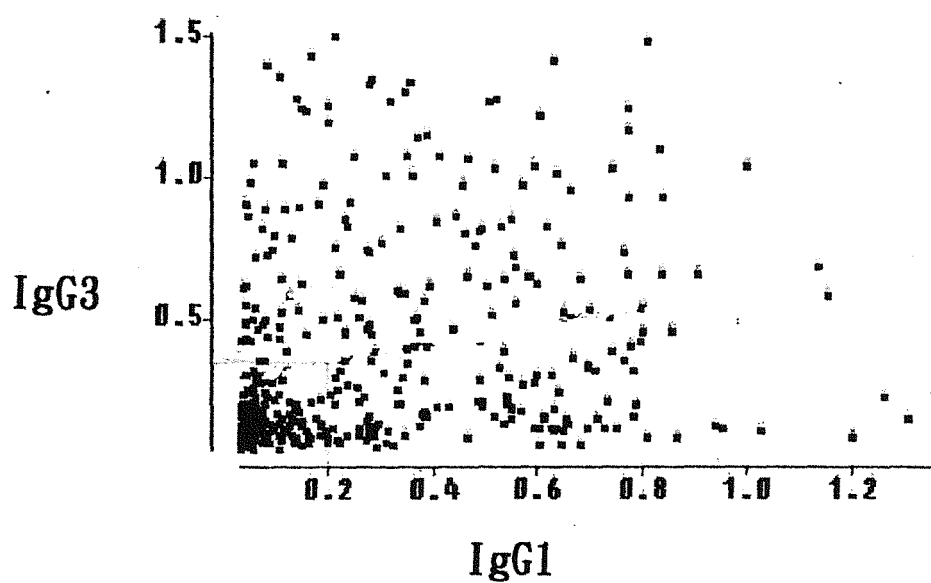
圖九a HBV帶原族群男性各年齡層anti-HBc subclasses 曲線圖



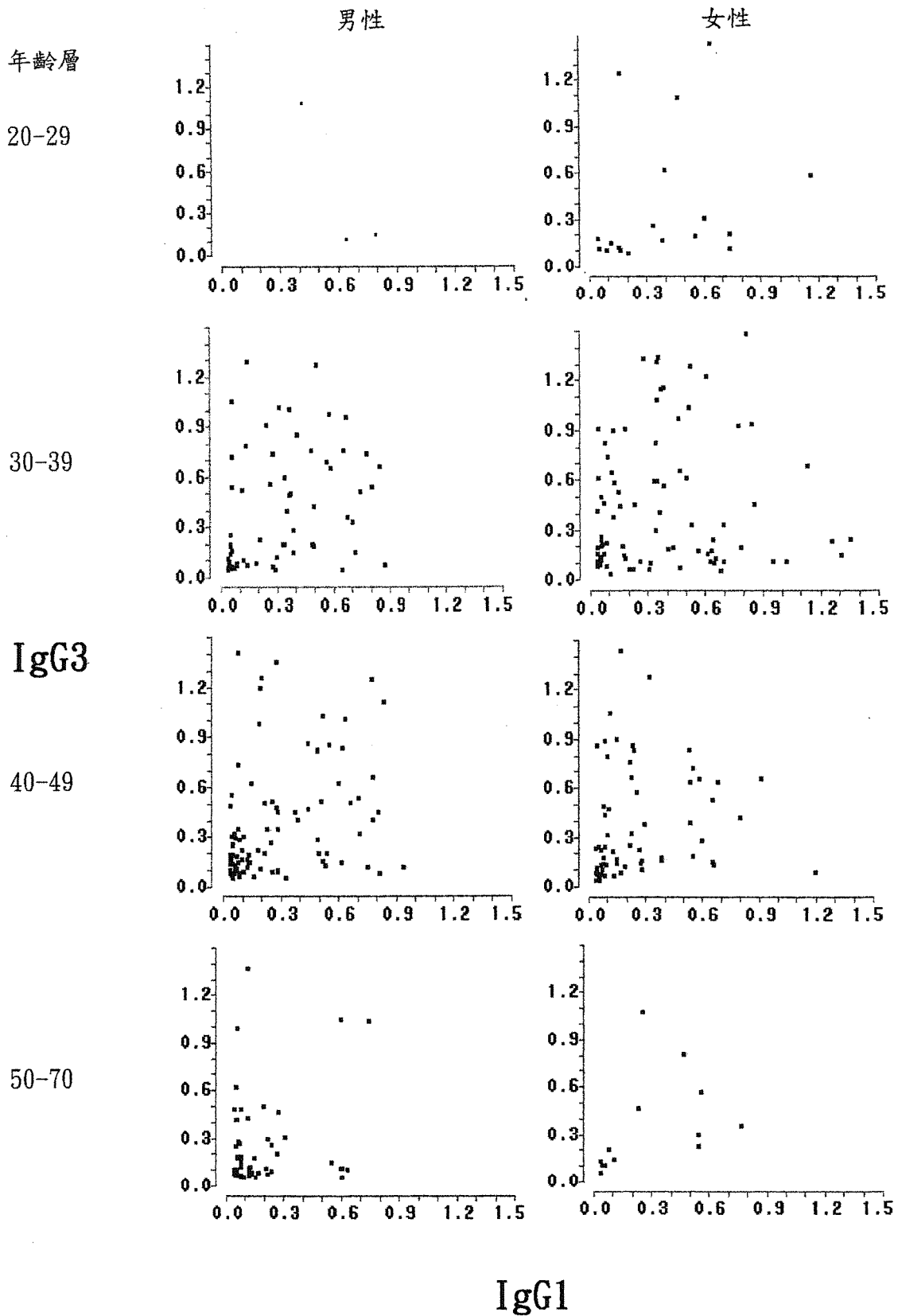
圖九b HBV帶原族群女性各年齡層anti-HBc subclasses 曲線圖



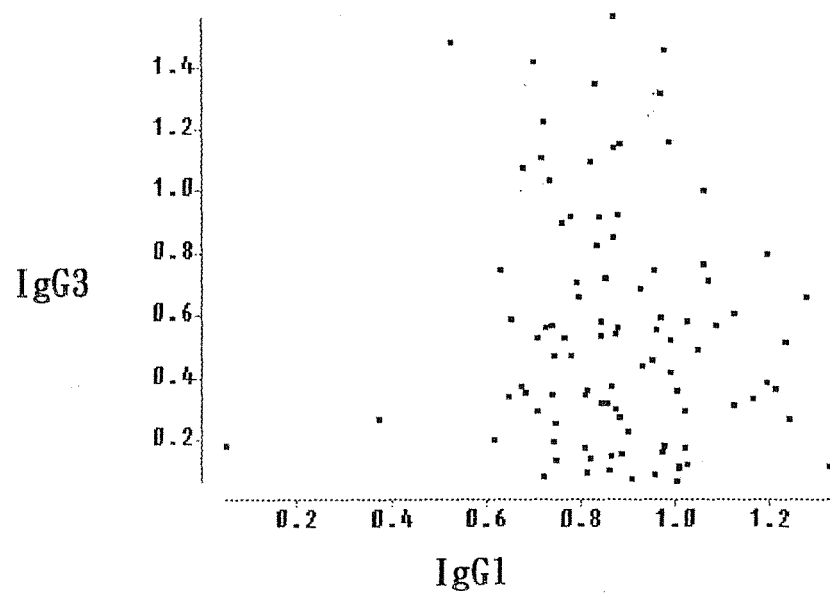
圖十 抗原清除族群 anti-HBc IgG1 和 IgG3
個別吸光值之相對分佈圖



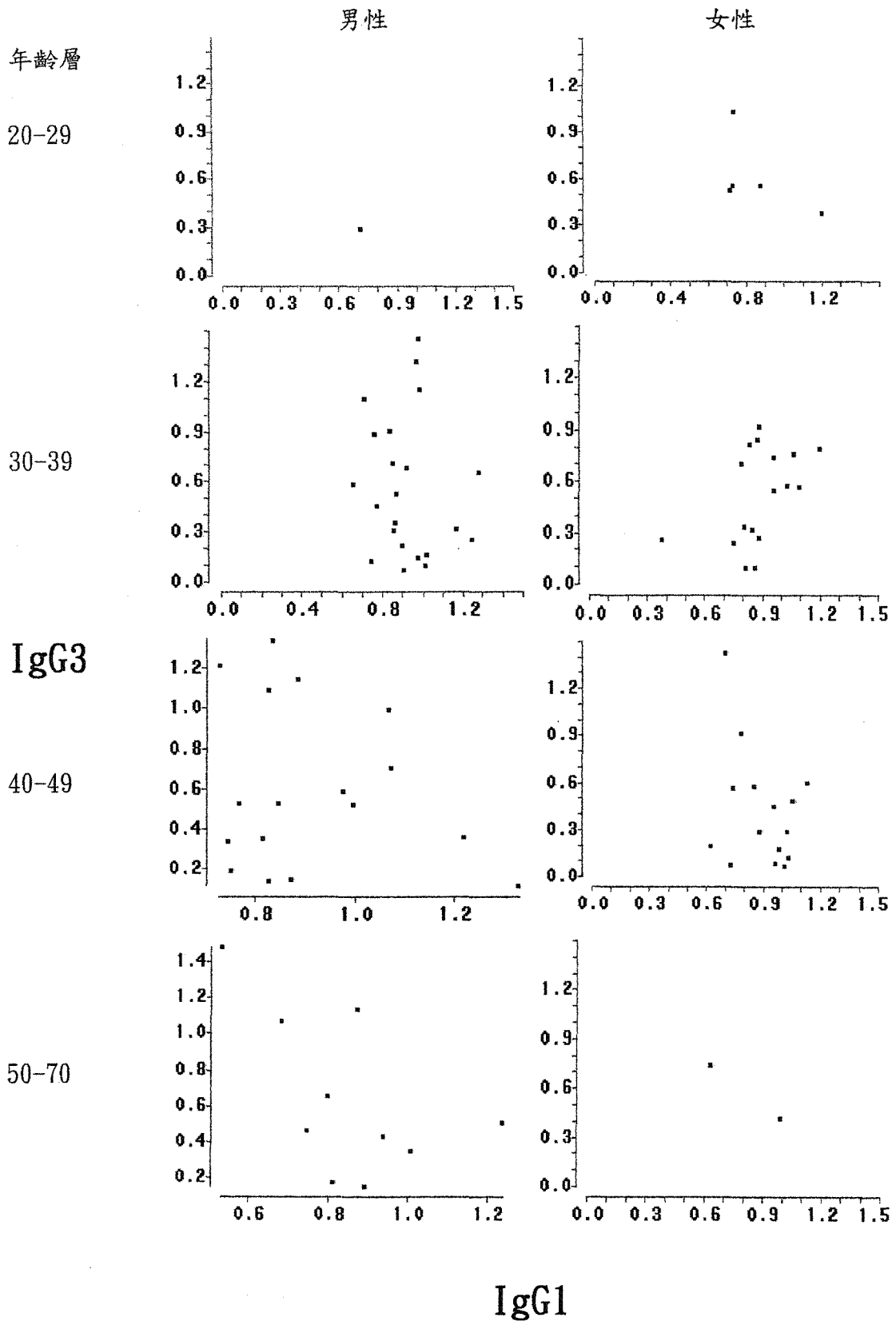
圖十一 HBV 抗原清除族群各年齡層 anti-HBc IgG1 和 IgG3 個別吸光值之相對分佈圖



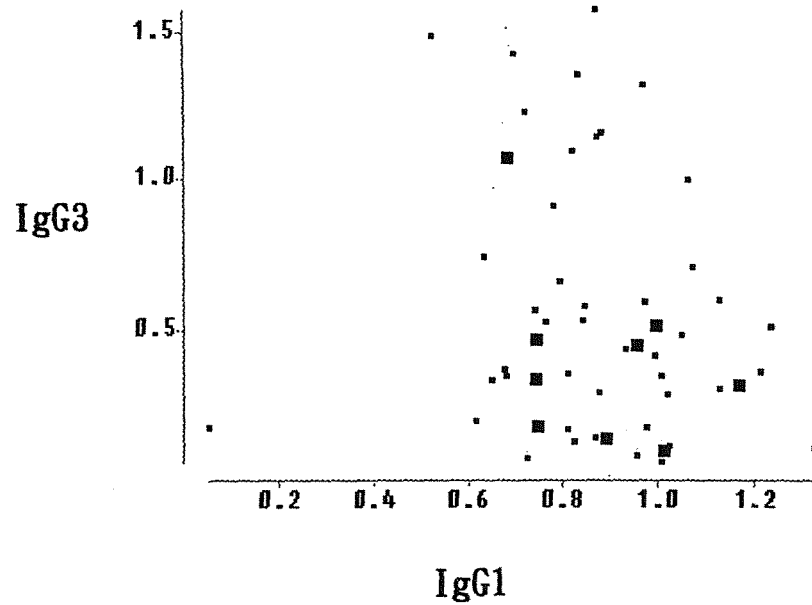
圖十二 HBV 帶原族群 anti-HBc IgG1 和 IgG3 個別吸光值之相對分佈圖



圖十三 HBV 帶原族群各年齡層 anti-HBc IgG1 和 IgG3 個別吸光值之相對分佈圖

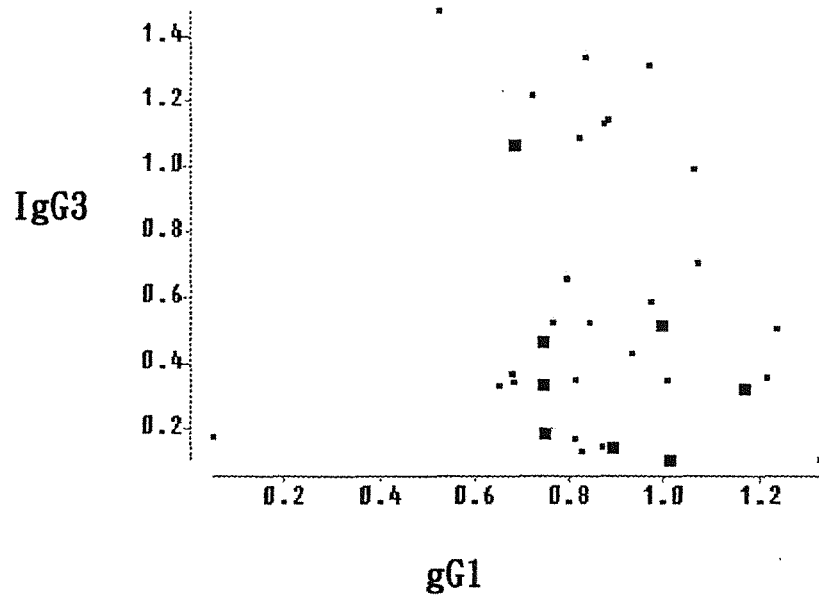


圖十四 a HBV 帶原族群 anti-HBc IgG1 和 IgG3
個別吸光值對肝功能指數異常者之關係圖



■ 黑色粗點記號代表肝功能異常者

圖十四 b HBV 帶原族群 anti-HBc IgG1 和 IgG3
吸光值對男性肝功能指數異常者之關係圖

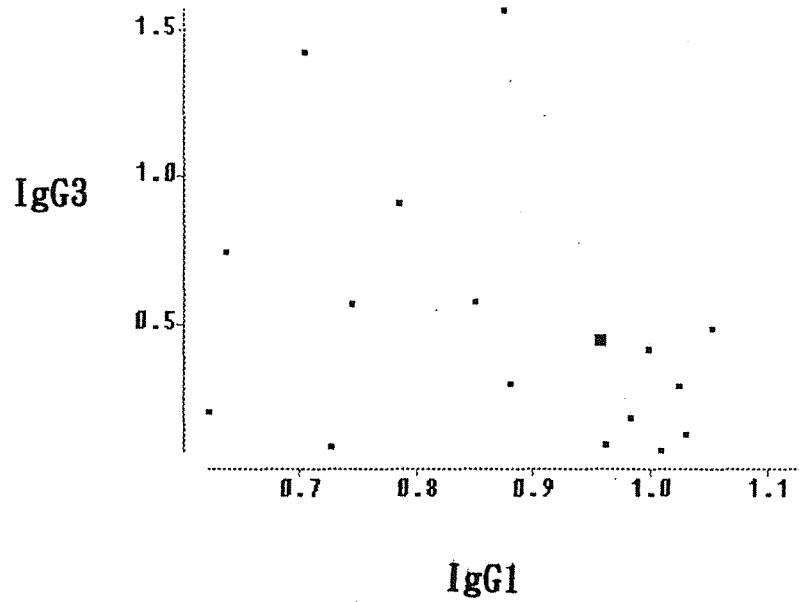


■ 黑色粗點記號代表肝功能異常者

圖十四 c HBV 帶原族群 anti-HBc IgG1 和 IgG3

吸光值對女性肝功能指數異常者之關係圖

係圖



■ 黑色粗點記號代表肝功能異常者