

infection who received rituximab plus steroids containing chemotherapy.¹⁵ The kinetics of HBV reactivation in this case strongly suggested that monthly monitoring of HBV DNA could prevent hepatitis even in such a highly replicative clone with a precore mutation.

In summary, we first reported HBV reactivation following treatment with the anti-CCR4 antibody mogamulizumab and revealed the detailed kinetics of HBV replication during reactivation. Further well-designed studies are warranted to address the mechanisms of HBV reactivation and to establish standard management for reactivation in patients with previously resolved HBV infection, following anticancer chemotherapy and immunosuppressive therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

THIS STUDY WAS supported in part by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (Grant-in-Aid H24-kanen-004 to M. M.) and the Ministry of Education, Culture, Sports Science and Technology of Japan (Grant-in-Aid for Scientific Research (C) no. 90423855 to S. K.) and Grant-in-Aid for National Cancer Center Research and Development Fund (no. 23-A-17 to T. I.).

REFERENCES

- 1 Lok AS, Liang RH, Chiu EK *et al.* Reactivation of hepatitis B virus replication in patients receiving cytotoxic therapy. Report of a prospective study. *Gastroenterology* 1991; **100**: 182–8.
- 2 Dervite I, Hober D, Morel P. Acute hepatitis B in a patient with antibodies to hepatitis B surface antigen who was receiving rituximab. *N Engl J Med* 2001; **344**: 68–9.
- 3 Hui CK, Cheung WW, Zhang HY *et al.* Kinetics and risk of de novo hepatitis B infection in HBsAg-negative patients undergoing cytotoxic chemotherapy. *Gastroenterology* 2006; **131**: 59–68.
- 4 Yeo W, Chan TC, Leung NW *et al.* Hepatitis B virus reactivation in lymphoma patients with prior resolved hepatitis B undergoing anticancer therapy with or without rituximab. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 605–11.
- 5 Kusumoto S, Tanaka Y, Mizokami M *et al.* Reactivation of hepatitis B virus following systemic chemotherapy for malignant lymphoma. *Int J Hematol* 2009; **90**: 13–23.
- 6 Matsue K, Kimura S, Takanashi Y *et al.* Reactivation of hepatitis B virus after rituximab-containing treatment in patients with CD20-positive B-cell lymphoma. *Cancer* 2010; **116**: 4769–76.
- 7 Ishida T, Ueda R. Antibody therapy for Adult T-cell leukemia-lymphoma. *Int J Hematol* 2011; **94**: 443–52.
- 8 Ishii T, Ishida T, Utsunomiya A *et al.* Defucosylated humanized anti-CCR4 monoclonal antibody KW-0761 as a novel immunotherapeutic agent for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 1520–31.
- 9 Yamamoto K, Utsunomiya A, Tobinai K *et al.* Phase I study of KW-0761, a defucosylated humanized anti-CCR4 antibody, in relapsed patients with adult T-cell leukemia-lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 1591–8.
- 10 Ishida T, Joh T, Uike N *et al.* Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (KW-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: a multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 2012; **30**: 837–42.
- 11 Sugawara K, Nakayama N, Mochida S. Acute liver failure in Japan: definition, classification, and prediction of the outcome. *J Gastroenterol* 2012; **47**: 849–61.
- 12 Oketani M, Ido A, Nakayama N *et al.* Etiology and prognosis of fulminant hepatitis and late-onset hepatic failure in Japan: summary of the annual nationwide survey between 2004 and 2009. *Hepatol Res* 2013; **43**: 97–105.
- 13 Oketani M, Ido A, Uto H *et al.* Prevention of hepatitis B virus reactivation in patients receiving immunosuppressive therapy or chemotherapy. *Hepatol Res* 2012; **42**: 627–36.
- 14 European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012; **57**: 167–85.
- 15 Kusumoto S, Tanaka Y, Suzuki R *et al.* Prospective nationwide observational study of hepatitis B virus (HBV) DNA monitoring and preemptive antiviral therapy for HBV reactivation in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma following rituximab containing chemotherapy: results of interim analysis. *Blood* 2012; **120**: abstract 2641.

固形がん領域におけるB型肝炎再活性化の現状

池田 公史*

要 旨

固形がんでのB型肝炎の再活性化は、HBs抗原陽性例ではあらゆるがん腫で報告があり、その割合は10～40%前後である。HBs抗原陰性でHBs抗体またはHBc抗体陽性例からはまとまった報告は限られており、症例報告が散見される程度である。今後しっかりした前向き研究を行い、固形がんにおける再活性化の現状を明らかにし、再活性化の対策を確立することが必要である。

はじめに

化学療法施行時におけるB型肝炎ウイルス(HBV)の再活性化は、近年注目されている。特に、2001年にDerviteら¹⁾がリツキシマブ併用化学療法例において、B型肝炎表面抗原(HBs抗原)が陰性の患者からHBV再活性化を初めて報告¹⁾して以来、HBVの再活性化は血液腫瘍では軽視できない合併症の1つとなっている。しかし固形がんにおいては、頻度が少ないことも相まって血液腫瘍ほど注目されておらず、「免疫抑制・化学療法により発症するB型肝炎対策のガイドライン」²⁾を遵守した対応も浸透していないのが現状である。

本稿では、化学療法に伴うHBVの再活性化、特に固形がん領域における現状について概説する。

固形がんにおけるHBVの再活性化の報告

HBVの感染は、無症候性キャリアや慢性肝炎/肝硬変といったHBs抗原陽性の状態と、HBVに一過性感染し慢性化せずに改善したHBs抗原陰性でB型肝炎表面抗体(HBs抗体)またはB型肝炎コア抗体(HBc抗体)陽性の状態の2つに大別される。

1. HBs抗原陽性例

これまでに固形がんにおいて、HBs抗原陽性例からのHBVの再活性化は、表1に示すようにあらゆるがん腫で報告されている。また、再活性化の症例報告のある抗がん剤もあらゆるレジメンにて報告(表1)があり、その割合もおおよそ10～40%程度である。また、前向きコホート研究や後ろ向きのケースシリーズとしても幾つか報告されている(表2)。Yeoらは、HBs抗原陽性の切除不能の肝細胞がん患者にPIAF(シスプラチン+インターフェロン+ドキソルビシン+5-フルオロウラシル)療法を施行した患者102例中59

* 国立がん研究センター東病院 肝胆膵内科 科長

キーワード：B型肝炎、再活性化、化学療法、固形がん、エンテカビル

表1 固形がんにおける HBs 抗原陽性例からの B 型肝炎の再活性化の報告のあるがん腫, 抗がん剤

がん腫	抗がん剤 (単剤)	抗がん剤 (多剤併用)
乳がん	テモゾロミド	EPI + CDDP
肝細胞がん	イマチニブ	DTX + EPI
肺がん	DOX	DOX + CPA (AC)
脳腫瘍	EPI	CPA + MTX + 5FU (CMF)
胚細胞腫	CDDP	CPA + DOX + 5FU (CAF)
大腸がん	エベロリムス	CDDP + IFN + DOX + 5FU (PIAF)
咽頭・喉頭がん	GEM など	CDDP + 5FU (Low dose FP)
胃がん		CDDP + VP16 + DOX
膵がん		CBDCA + PTX
膀胱がん		MTX + ACT-D + VP16 + CPA + VCR
絨毛がん		CDDP + EPI + BLM
胸膜がん		CPA + MTX + 5FU
神経内分泌がんなど		BLM + VP16 + CDDP (BEP)
		CPA + DOX + VCR (CAV)
		GEM + CDDP
		5FU + CDDP (FP)
		MTX + VLB + DOX + CPA
		CPA + DOX + CDDP + MTX + BLM
		DTX + EPI
		VP16 + 5FU + FA
		5FU + FA
		GEM + VP16
		MMC + VLB + DOX + CPA
		CBDCA + VP16 + CPA
		MTX + ACT-D + DOX + CPA + VCR
		PTX + CDDP など

5FU: 5-フルオロウラシル, ACT-D: アクチノマイシンD, CPA: シクロホスファミド, BLM: プレオマイシン, EPI: エピルビシン, CBDCA: カルボプラチン, CDDP: シスプラチン, DTX: ドセタキセル, DOX: ドキソルビシン, GEM: ゲムシタビン, FA: フォリン酸, IFN: インターフェロン, MTX: メトトレキサート, PTX: パクリタキセル, VCR: ビンクリスチン, VLB: ビンブラスチン, VP16: エトポシド

例 (58%) に肝機能障害を認め, HBV の再活性化によるものが 37 例 (36%) であり, そのうち再活性化による死亡が 12 例 (30%) と高率であったと報告した³⁾. また Jang らは, HBs 抗原陽性の切除不能肝細胞がんに対してエピルビシンまたはシスプラチンによる chemolipiodolization を施行した 83 例のうち, HBV の再活性化を 28 例 (33.7%) に認め, そのうち再活性化による死亡を 3 例

(10.7%) に認めたと報告した⁴⁾. このように, 固形がんにおいても HBs 抗原陽性例からの HBV の再活性化は比較的高頻度に認めており, しっかり注意を払うことが必要である.

2. HBs 抗原陰性で, HBs 抗体または HBe 抗体陽性例

悪性リンパ腫に対するリツキシマブなどでよく報告されている HBs 抗原陰性で, HBs

表2 HBs 抗原陽性からの再活性化の報告

レジメン	がん腫	再活性化 例数	全症例数	再活性化 の割合	著者	報告年
DOX + CPA (AC) → CPA + MTX + 5FU など	乳がん	17	41	41	Yeo W	2003
5FU + CPA など	乳がん	19	61	31.1	Yeo W	2004
DOX + CPA (AC) or 5FU + DOX + CPA (FAC)	乳がん	16	76	21	Yun J	2011
CPA + DOX + 5FU (CAF), DOX + CPA (AC) → DTX	乳がん	23	111	20.7	Kim MK	2007
DOX + CPA (AC) → PTX or DTX	乳がん	18	128	14.1	Sohn BS	2011
エベロリムス	肝細胞がん	13	22	59.1	Dai CY	2011
5FU + CDDP-HAI, 5FU + EPI + MMC-HAI	肝細胞がん	8	33	24.2	Nagamatsu H	2003
EPI + CDDP-TACE, CDDP-TACE	肝細胞がん	15	37	40.5	Jang JW	2006
EPI + CDDP-chemolipiodolization	肝細胞がん	28	86	33.7	Jang JW	2004
CDDP + DOX + 5FU + IFN (PIAF) or DOX	肝細胞がん	37	102	36	Yeo W	2004
さまざまなレジメン	固形がん (血液腫瘍を含む)	1	46	2.2	Nishida T	2012
さまざまなレジメン	固形がん (血液腫瘍を含む)	9	59	15.3	Eren OO	2009
さまざまなレジメン	固形がん (血液腫瘍を含む)	15	78	19.2	Yeo W	2000

DOX：ドキソルビシン，CPA：シクロホスファミド，MTX：メトトレキサート，5FU：5-フルオロウラシル，DTX：ドセタキセル，PTX：パクリタキセル，CDDP：シスプラチン，EPI：エビルビシン，MMC：マイトマイシンC，IFN：インターフェロン，HAI：hepatic arterial infusion chemotherapy，TACE：transcatheter arterial chemoembolization

抗体または HBc 抗体陽性例，いわゆる一過性感染例からの報告は，固形がんに関してはまだ頻度は少なく，レジメンも限られており，症例報告レベルである（表3）。また，前向きコホート研究での報告はなく，後ろ向きのケースシリーズとしても限られている。しかし最近 Peng らが，マイトマイシンCとヒドロカンプトテシンによる肝動脈化学塞栓術を施行した43例中，4例（9.3%）にHBVの再活性化による肝障害を認めたことを報告しており⁹⁾，やはりHBs抗原陰性で，HBs抗体またはHBc抗体陽性例でも注意が必要である。

固形がんにおけるHBVの感染率 －東病院の結果－

HBVの再活性化のリスクとなるHBs抗原の陽性率と，HBs抗原陰性でHBc抗体またはHBs抗体の陽性率を，2010年8月から2012年5月までに，国立がん研究センター東病院で固形がんに対する初回化学療法を施行した1,129例を対象として検討した。HBs抗原の陽性率，HBs抗原は陰性でHBc抗体またはHBs抗体の陽性率は，それぞれ3.3%，25.2%であった。また，HBs抗原の陽性率を年齢別に検討したところ一定の傾向は認めなかったが，HBs抗原は陰性でHBc抗体また

表3 固形がんにおける HBs 抗原陰性, HBs 抗体または HBc 抗体陽性からの B 型肝炎の再活性化の報告のあるがん腫, 抗がん剤

がん腫	抗がん剤
乳がん	テモゾロミド
肝細胞がん	TSU-68
脳腫瘍	CPA + DOX + 5FU (CAF)
肺がん	CBDCA + PTX
膵がんなど	MMC + ヒドロカンプトテシンなど

CPA: シクロホスファミド, DOX: ドキソルビシン, 5FU: 5-フルオロウラシル, CBDCA: カルボプラチン, PTX: パクリタキセル, MMC: マイトマイシン C

は HBs 抗体の陽性率は高齢者で増加する傾向が示された (表4)。このように, 固形がんに対する化学療法を施行する際には, 4人に1人, 高齢者になれば3人に1人の割合で HBV の再活性化のリスクを有することとなり, これらの患者では HBV の再活性化の対策をとる必要がある。

固形がんにおける HBV の再活性化対策

1. HBs 抗原陽性例

HBs 抗原陽性例では, 固形がんにおいてもラミブジンなどの抗ウイルス薬の予防投与の比較試験が行われており, 予防投与群で再活性化の抑制効果が示されている。

化学療法予定の HBV 関連の乳がん患者 92 人を対象として, ラミブジンの予防投与を行った 31 例と, コントロールとしてラミブジンの予防投与を行わなかった 61 例を比較する検討が報告されている⁹⁾。HBV の再活性化の頻度 (予防投与群 6.5%, 非投与群 31.1%, $p=0.008$), 肝障害の発生頻度 (予防投与群 12.9%, 非投与群 59%, $p<0.001$), 化学療法の中絶割合 (予防投与群 16.1%, 非投与群 45.9%, $p=0.006$) において, ラミブジンの予防投与群で良好な結果であった。また, 肝動脈化学塞栓術予定の HBV 関連の切除不能肝細胞がん患者 73 例を対象に, エピルビシ

ン 50mg/m² とシスプラチン 60mg/m² で肝動脈化学塞栓術を施行する際に, ラミブジンの予防投与群と非投与群の 2 群にランダムに割り付け, HBV の再活性化の頻度を評価する比較試験が行われた⁷⁾。その結果も同様に, 再活性化の頻度 (予防投与群 2.8%, 非投与群 40.5%, $p<0.001$), 再活性化による肝障害の頻度 (予防投与群 2.8%, 非投与群 29.7%, $p=0.002$) は, ラミブジンの予防投与群で良好な結果であった。このように HBs 抗原陽性例には, ラミブジンをはじめとする抗ウイルス薬を予防投与することによる有用性が示されている。ただし, ラミブジンは治療効果, 薬剤耐性の観点より, 現在ではエンテカビルが主流であり, 「免疫抑制・化学療法により発症する B 型肝炎対策のガイドライン」²⁾ でも, 予防投与のための抗ウイルス薬としてエンテカビルが推奨されている。

2. HBs 抗原陰性で, HBs 抗体または HBc 抗体陽性例

HBs 抗原陰性で, HBs 抗体または HBc 抗体陽性例に対しては, HBV の再活性化の予防投与に関してこれまでに十分に検討が行われていない。現状では, 「免疫抑制・化学療法により発症する B 型肝炎対策のガイドライン」²⁾ に従い, 全身化学療法を行う場合, HBV DNA を 1 ヶ月に 1 回モニタリングし, HBV DNA が陽性化した時点で抗ウイルス薬を投与する方法が推奨される。しかし, この HBV DNA モニタリングの有用性, 安全性は明らかにされておらず, よくデザインされた前向き研究での検証が必要である。

このように, ガイドライン²⁾ で HBV の再活性化の対策の指針が示されているが, 固形がんではまだ HBV の再活性化のスクリーニングや HBV DNA のモニタリングの重要性が浸透していないのが現状である。Hwang らによる報告⁸⁾ では, 血液腫瘍 1,970 例と固

表4 固形がんの初回化学療法例における年齢別の HBs 抗原, HBs 抗体または HBc 抗体の陽性率

年齢	症例数	HBs 抗原陽性例	HBs 抗原の陽性率	HBc 抗体または HBs 抗体陽性例	HBc 抗体または HBs 抗体の陽性率
20~39	30	1	3.3%	2	6.7%
40~49	83	3	3.6%	3	3.7%
50~59	192	6	3.1%	37	19.3%
60~69	449	20	4.5%	125	27.8%
70~79	324	6	1.9%	99	30.6%
80~89	51	1	2.0%	18	35.3%
総数	1,129	37	3.3%	284	25.2%

形がん 4,028 例における HBV スクリーニング率を比較したところ, 固形がんでの HBs 抗原のスクリーニング率 (血液腫瘍 51%, 固形がん 3%, $p < 0.01$) と HBc 抗体のスクリーニング率 (血液腫瘍 53%, 固形がん 3%, $p < 0.01$) は有意に低く, 固形がんの化学療法の担当医の HBV 再活性化に対する意識が薄いことが示された。

固形がんにおける HBV 再活性化に関する問題点

固形がんにおける HBV 再活性化には, 下記のような問題点が指摘される。

(1) HBV 再活性化は血液腫瘍に対する化学療法や骨髄移植時に報告が多いが, 固形がんに対する化学療法時における HBV 再活性化の頻度, 再活性化を起こしやすい化学療法の種類, 再活性化の特徴などは十分に明らかにされていない。

(2) HBs 抗原陰性で, HBs 抗体または HBc 抗体陽性例は高リスク群と位置づけられているが, 固形がんにおける化学療法での報告はまれであり, 高リスク群となるかどうかは疑問視されている。

(3) HBs 抗原陰性で, HBs 抗体または HBc 抗体陽性の固形がんに対して化学療法を施行するときにも, 月に 1 回の定期的な HBV DNA の測定が推奨されているが, その

有用性は明らかにされていない。

HBV の再活性化は, 特に固形がんにおいて, エビデンスよりガイドラインが先行している現状である。このような背景から, 米国臨床腫瘍学会 (ASCO) より, 細胞障害性あるいは免疫抑制性の化学療法を施行予定の患者に対する HBV スクリーニング臨床指針の Provisional Clinical Opinion が報告された⁹⁾。この Provisional Clinical Opinion には, HBV のルーチン・スクリーニングのベネフィットとリスクを判断するのに十分なものではなく, スクリーニングには臨床的な判断を要すると記載されている。また, スクリーニングを実施する場合は HBs 抗原検査を, そしてある患者層では HBc 抗体検査も考慮されるべきであるが, HBs 抗体検査に関しては確固たるエビデンスがないと記載されている。この Provisional Clinical Opinion はこれまでのエビデンスに基づいたものであり, HBV の再活性化のリスクを回避するために作成されたガイドラインとはやや異なる内容となっている。

おわりに

固形がんでは, 血液腫瘍ほど HBV の再活性化は検討されておらず, 化学療法担当医の HBV の再活性化に対する意識も低い。また, 実際にどのくらいの頻度で再活性化が起こる

のか、再活性化のリスクが高いレジメンは何か、どのような頻度でモニタリングをすべきかなど、明らかにされていないことが多い。今後しっかり計画された前向き試験を行い、固形がんにおける HBV の再活性化の現状を明らかにすることが必要である。現在、本邦では筆者らが中心となり、固形がんに対する化学療法施行時の HBV 再活性化に関する多施設共同研究 (UMIN000005369) を行っており、また海外でもさまざまな前向き研究が行われている。今後、固形がんに対する HBV の再活性化のエビデンスがきちんと示されることを期待したい。

文 献

- 1) Dervite I, et al: Acute hepatitis B in a patient with antibodies to hepatitis B surface antigen who was receiving rituximab. *N Engl J Med* 344: 68-69, 2001.
- 2) 坪内博仁, 他: 免疫抑制・化学療法により発症する B 型肝炎対策 - 厚生労働省「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班劇症肝炎分科会および「肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究」班合同報告 - . *肝臓* 50: 38-42, 2009.
- 3) Yeo W, et al: Hepatitis B reactivation in patients with hepatocellular carcinoma undergoing systemic chemotherapy. *Ann Oncol* 15: 1661-1666, 2004.
- 4) Jang J W, et al: Transarterial chemo-lipiodolization can reactivate hepatitis B virus replication in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 41: 427-435, 2004.
- 5) Peng J W, et al: Hepatitis B virus reactivation in hepatocellular carcinoma patients undergoing transcatheter arterial chemoembolization therapy. *Asia Pac J Clin Oncol* 8: 356-361, 2012.
- 6) Yeo W, et al: Use of lamivudine to prevent hepatitis B virus reactivation during chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 88: 209-215, 2004.
- 7) Jang J W, et al: A randomized controlled study of preemptive lamivudine in patients receiving transarterial chemo-lipiodolization. *Hepatology* 43: 233-240, 2006.
- 8) Hwang J, et al: Hepatitis B screening and positivity prior to chemotherapy. *J Clin Oncol* 28: 15s (suppl; abstr 9008), 2010.
- 9) Artz A S, et al: American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: chronic hepatitis B virus infection screening in patients receiving cytotoxic chemotherapy for treatment of malignant diseases. *J Clin Oncol* 28: 3199-3202, 2010.

Current Status of Reactivation of Hepatitis B Virus Induced by Chemotherapy in Solid Tumors

Masafumi Ikeda

Division of Hepatobiliary & Pancreatic Oncology, National Cancer Center Hospital East

II. *de novo* B型肝炎を知る・診る・防ぐ

5. 既往感染例における HBV 再活性化の実態と対策

⑤ 固形がん

【池田 公史】

はじめに

固形がんでの B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus : HBV) の再活性化は、HBs 抗原陽性例ではあらゆる癌腫で報告があり、その割合は 10 ~ 40 %前後であるが、HBs 抗原陰性で HBs 抗体または HBc 抗体陽性例からは、まとまった報告は限られている。ここでは、固形がんに対する化学療法において、HBs 抗原陰性で、HBc 抗体または HBs 抗体陽性である既往感染例からの、HBV の再活性化の実態と対策について概説する。

① 固形がんにおける既往感染例の割合

既往感染例である HBs 抗原陰性で HBc 抗体または HBs 抗体陽性の割合を、2010 年 8 月から 2012 年 5 月までに、国立がん研究センター東病院で固形がんに対する初回化学療法を施行した 1,129 例を対象として検討した (表 1)。HBs 抗原が陰性で、HBc 抗体または HBs 抗体陽性の割合は、全体で 25.2 %であった。また、年齢別にみると、高齢者で増加する傾向が示された。このように、固形がんに対する化学療法を施行する際には、4 人に 1 人、高齢者になれば 3 人に 1 人の割合で HBV の既往感染例があり、再活性化のリスクを有することとなる。

表1 固形がんの初回化学療法例 1,129 例における年齢別の HBs 抗原, HBs 抗体または HBc 抗体の陽性率 (国立がん研究センター東病院)

年齢	症例数	HBs 抗原 陽性例	HBs 抗原の 陽性率	HBc 抗体または HBs 抗体陽性例	HBc 抗体または HBs 抗体の陽性率
20～39	30	1	3.3 %	2	6.7 %
40～49	83	3	3.6 %	3	3.6 %
50～59	192	6	3.1 %	37	19.3 %
60～69	449	20	4.5 %	125	27.8 %
70～79	324	6	1.9 %	99	30.6 %
80～89	51	1	2.0 %	18	35.3 %
総数	1,129	37	3.3 %	284	25.2 %

国立がん研究センター東病院における 2010 年 8 月～2012 年 5 月の固形がん化学療法での B 型肝炎ウイルスマーカーの陽性率を示す。HBs 抗原陰性で HBc 抗体・HBs 抗体陽性は全体で 25.2 % と 4 人に 1 人が既往感染例で、高齢者では 30.6 %、35.3 % と増加する傾向を示し 3 人に 1 人が再活性化のリスクを有する。

(筆者ら作成)

② 固形がんにおける HBV の再活性化の報告

化学療法施行時における HBV の再活性化は、2001 年に Dervite らがリツキシマブ併用化学療法例において、HBs 抗原が陰性の患者から HBV 再活性化を初めて報告²⁾して以来、HBV の再活性化は血液腫瘍では軽視できない合併症の一つとなっている。しかし、固形がんに関しては、既往感染例からの報告は症例報告が散見される程度と少なく、レジメンも限られている(表 2)。また、前向きコホート研究での報告はなく、後ろ向きのケースシリーズとしても限られている。

これまでに報告のある癌腫としては、乳癌、肝細胞癌、脳腫瘍、肺癌、膵癌などで、レジメンでは、テモゾロミド、TSU-68(Orantimib)、シクロホスファミド+ドキシソルピシン+フルオロウラシル、カルボプラチン+パクリタキセルなどが報告されている。ただし最近、Peng らがマイトマイシン C + ヒドロカンプトテシン (Hydrocamptothecin) による肝動脈化学塞栓術を施行した 43 例

II. *de novo* B 型肝炎を知る・診る・防ぐ

表2 固形がんにおける HBs 抗原陰性、HBs 抗体または HBc 抗体陽性からの B 型肝炎の再活性化の報告のある癌腫、抗がん薬

癌腫	抗がん薬 (レジメン)
乳癌	テモゾロミド
肝細胞癌	TSU-68
脳腫瘍	CPA + DOX + 5-FU (CAF)
肺癌	CBDCA + PTX
膀胱癌など	MMC + Hydrocamptothecin など

既往感染例における固形がん化学療法からの HBV 再活性化の報告は少なく、限られたものとなっている。

CPA: シクロホスファミド, DOX: ドキソルピシン, 5-FU: フルオロウラシル, CBDCA: カルボプラチン, PTX: パクリタキセル, MMC: マイトマイシン C

(著者ら作成)

中、4 例 (9.3 %) に HBV の再活性化による肝障害を認めたことを報告しており³⁾、既往感染例からの再活性化としては比較的高率な報告もある。

③ 固形がんの既往感染例に対する HBV の再活性化対策

固形がん患者で、HBs 抗原陰性で、HBs 抗体または HBc 抗体陽性例の既往感染例に対する HBV の再活性化の対策に関しては、これまでに十分に検討されていない。現状では、「免疫抑制・化学療法により発症する B 型肝炎対策ガイドライン」⁴⁾に従い、治療開始から治療終了後 12 カ月までの間、HBV DNA を 1 カ月に 1 回、モニタリングすることが推奨される。

また、モニタリングの結果、HBV DNA が陽性化した時点で核酸アナログを投与することで、HBV の再活性化による肝障害を起こさせずに管理することができると考えられている。これは、HBV DNA が陽性化して肝炎が発症するまでに 12 ~ 28 週 (平均: 18.5 週) を要するという Hui らの報告⁵⁾に基づき、HBV DNA が陽性化してから核酸アナログの投与を行っても、肝炎の重症化は

予防可能と推察されている。

このようなわが国のガイドラインでの対策は、NIH Consensus Development Conference Statement on Management of Hepatitis B⁶⁾、EASL Clinical Practice Guidelines⁷⁾でも同様の対処法となっている。しかし、この HBV DNA モニタリングの有用性、安全性は明らかにされておらず、よくデザインされた前向き研究での検証が必要である。

④ 固形がん例における化学療法施行時の HBV のスクリーニング率

以上のように、ガイドライン⁴⁾で HBV の再活性化の対策の指針が示されているが、固形がんではまだ HBV の再活性化のスクリーニングや HBV DNA のモニタリングの重要性が浸透していないのが現状である。

Hwang らによる報告⁸⁾では、血液腫瘍 1,970 例と固形がん 4,028 例における HBV スクリーニング率を比較したところ、固形がんでの HBs 抗原のスクリーニング率(血液腫瘍 vs. 固形がん : 51 % vs. 3 % ; $p < 0.01$)と HBc 抗体のスクリーニング率(血液腫瘍 vs. 固形がん : 53 % vs. 3 % ; $p < 0.01$)は有意に低く、固形がんの化学療法担当医の HBV 再活性化に対する意識が薄いことが示された。

⑤ 固形がんにおける HBV 再活性化に関する問題点

固形がんにおける HBV 再活性化には、次のような問題点が指摘される。

① HBV 再活性化は、血液腫瘍に対する化学療法や骨髄移植時に報告が多いが、固形がんに対する化学療法時における HBV 再活性化の頻度、再活性化を起ししやすい化学療法の種類、再活性化の特徴などはまだ十分に明らかにされていない。

② HBs 抗原陰性で、HBs 抗体または HBc 抗体陽性例は高リスク群と位置付けられているが、固形がんにおける化学療法での報告は稀であり、どこまで高リスク群としてスクリーニングすべきかは疑問視されている。

③ HBs 抗原陰性で、HBs 抗体または HBc 抗体陽性の固形がんに対して化学療法を施行する時にも、月に 1 回の定期的な HBV DNA の測定が推奨されているが、その有用性や費用対効果などは明らかにされていない。

以上のように、固形がんに対する HBV の再活性化対策は、再活性化の頻度の高い血液腫瘍などを見習って、同様の再活性化の対策となっており、確固たるエビデンスを基に作成されたものではない。再活性化のリスクを最大限回避するためにガイドラインが作成されている。このような背景により米国臨床腫瘍学会 (ASCO) から、細胞障害性あるいは免疫抑制性の化学療法を施行予定の患者に対する、HBV スクリーニング臨床指針の Provisional Clinical Opinion が報告された⁹⁾。

この Provisional Clinical Opinion には、HBV のルーチン・スクリーニングのベネフィットとリスクを判断するのに十分なものはなく、スクリーニングには臨床的な判断を要すると記載されている。また、スクリーニングを実施する場合は HBs 抗原検査を、そしてある患者層では HBc 抗体検査も考慮されるべきだが、HBs 抗体検査に関しては確固たるエビデンスがないと記載されている。Provisional Clinical Opinion はこれまでのエビデンスに基づいたものであり、HBV の再活性化のリスクを回避するために作成されたガイドライン^{4, 6, 7)}とはやや異なる内容となっている。☞ サイドメモ 16

サイドメモ 16

ASCO Provisional Opinion は実臨床、エビデンスに基づいた見解

ASCO Provisional Opinion は、化学療法開始前の HBs 抗体、HBc 抗体の測定や既往感染例に対する HBV DNA の月に 1 回のモニタリングなどが推奨されているが、エビデンスが十分に示されないまま HBV 再活性化のガイドラインとして提案されたことに対して、一石を投じたものである。ASCO Provisional Opinion では、実臨床とガイドラインの乖離を明確に記載しており、今後、さらなる研究成果に基づき、その溝を埋めていくことが重要である。

おわりに

固形がんでは、血液腫瘍ほど HBV の再活性化は検討されておらず、化学療法担当医の HBV の再活性化に対する意識も低い。また、実際にどのくらいの頻度で再活性化が起こるのか、再活性化のリスクが高いレジメンは何か、どのような頻度でモニタリングをすべきなのかなど、明らかにされていないことが多い。今後しっかり計画された前向き試験を行い、固形がんにおける HBV の再活性化の現状を明らかにすることが必要である。

現在、わが国では筆者らが中心となり、固形がんに対する化学療法施行時の HBV 再活性化に関する多施設共同研究(UMIN000005369)を行い、登録も終了し、経過観察中の段階である。今年中に最終結果が報告される予定であり、どのような結果になるか注目したい。また、海外でも様々な前向き研究が行われており、今後、固形がんに対する HBV の再活性化のエビデンスがきちんと示され、既往感染例においても HBV 再活性化の対策が確立することを期待したい。

▶ ここがポイント!

- ・日本人の既往感染例は 20 ~ 30%
これまでの報告でも、日本人の既往感染例の頻度は 50 歳以上の年齢層ではおおよそ 20 ~ 30% と報告されており、これらの患者は化学療法施行時に HBV の再活性化に配慮しなければならない。
- ・固形がんの既往感染例からも HBV の再活性化は起こり得る
これまでに症例報告ばかりで、頻度は少ないが、既往感染例の固形がんに対する化学療法施行時に HBV の再活性化は起こり得る。やはり HBV の再活性化に対する注意は必要である。
- ・固形がんの既往感染例の HBV 再活性化の対策は、HBV DNA のモニタリングである
既往感染例からの HBV 再活性化の対策は、ガイドラインに従って、化学療法期間中、終了後 12 カ月間は、月に 1 回の HBV DNA をモニタリングすることである。

文 献

- 1) Ikeda M : Reactivation of hepatitis B virus in patients receiving chemotherapy. *Jpn J Clin Oncol* 43 : 8-16, 2013.
- 2) Dervite I, Hober D, Morel P : Acute hepatitis B in a patient with antibodies to hepatitis B surface antigen who was receiving rituximab. *N Engl J Med* 344 : 68-69, 2001.
- 3) Peng JW, Lin GN, Xiao JJ, *et al* : Hepatitis B virus reactivation in hepatocellular carcinoma patients undergoing transcatheter arterial chemoembolization therapy. *Asia Pac J Clin Oncol* 8 : 356-361, 2012.
- 4) 坪内博仁, 熊田博光, 清澤研道ほか : 免疫抑制・化学療法により発症するB型肝炎対策—厚生労働省「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班 劇症肝炎分科会および「肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究」班合同報告—.
肝臓 50 : 38-42, 2009.
- 5) Hui CK, Cheung WW, Zhang HY, *et al* : Kinetics and risk of *de novo* hepatitis B infection in HBsAg-negative patients undergoing cytotoxic chemotherapy. *Gastroenterology* 131 : 59-68, 2006.
- 6) Belongia EA, Costa J, Gareen IF, *et al* : NIH Consensus Development Conference Statement on Management of Hepatitis B. *NIH Consensus State Sci Statements* 25 (2) : 1-29, 2008.
- 7) European Association for the Study of the Liver : EASL Clinical Practice Guidelines : Management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 50 : 227-242, 2009.
- 8) Hwang J, Fisch M, Zhang H, *et al* : Hepatitis B screening and positivity prior to chemotherapy. *J Clin Oncol* 28 : 15s (Suppl ; Abstr 9008), 2010.
- 9) Artz AS, Somerfield MR, Feld JJ, *et al* : American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion : chronic hepatitis B virus infection screening in patients receiving cytotoxic chemotherapy for treatment of malignant diseases. *J Clin Oncol* 28 : 3199-3202, 2010.

Kinetics of peripheral hepatitis B virus-specific CD8⁺ T cells in patients with onset of viral reactivation

Jun Aoki · Yuka Kowazaki · Takahiro Ohtsuki ·
Rumiko Okamoto · Kazuteru Ohashi · Seishu Hayashi ·
Hisashi Sakamaki · Michinori Kohara · Kiminori Kimura

Received: 16 May 2012 / Accepted: 21 August 2012
© Springer 2012

Abstract

Background Patients with resolved hepatitis B virus (HBV) infection undergoing chemotherapy or immunosuppressive therapy are potentially at risk of HBV reactivation. However, it remains unclear how liver disease develops after HBV reactivation. To compare the host immune response against HBV, we performed immunological analyses of six HBV reactivation patients.

Methods The numbers of peripheral HBV-specific CD8⁺ T cells were investigated longitudinally in six HLA-A2- and/or A24-positive patients with HBV reactivation. In

addition, 34 patients with resolved HBV, 17 patients with inactive chronic hepatitis B (ICHB), 17 patients with chronic hepatitis B (CHB) and 12 healthy controls were analyzed. The number and function of HBV-specific CD8⁺ T cells were assessed by flow cytometry using tetramer staining and intracellular IFN- γ production. Furthermore, the numbers of CD4⁺CD25⁺ or CD4⁺Foxp3⁺ T cells and serum inflammatory cytokine levels were analyzed.

Results The frequency of HBV-specific CD8⁺ T cells was significantly increased in HBV reactivation patients compared with ICHB and CHB patients. In addition, the number of HBV-specific CD8⁺ T cells was increased in resolved HBV patients compared with ICHB patients. PD-1 expression was decreased in HBV reactivation patients compared with ICHB and CHB patients. The numbers of HBV-specific CD8⁺ T cells and CD4⁺CD25⁺ or CD4⁺Foxp3⁺ T cells were negatively correlated following onset of HBV reactivation.

Conclusions During HBV reactivation, the frequency of HBV-specific CD8⁺ T cells increased even though the administration of immunosuppressive drugs and interactions with CD4⁺ regulatory T cells may be important for the onset of liver disease.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00535-012-0676-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. Aoki · K. Ohashi · H. Sakamaki
Division of Hematology, Tokyo Metropolitan Cancer
and Infectious Diseases Center, Komagome Hospital,
18-22-3 Honkomagome, Bunkyo-ku,
Tokyo 113-8677, Japan

Y. Kowazaki · S. Hayashi · K. Kimura (✉)
Division of Hepatology, Tokyo Metropolitan Cancer
and Infectious Diseases Center, Komagome Hospital,
18-22-3 Honkomagome, Bunkyo-ku,
Tokyo 113-8677, Japan
e-mail: kkimura@cick.jp

T. Ohtsuki · M. Kohara · K. Kimura
Department of Microbiology and Cell Biology,
Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science,
2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan

R. Okamoto
Division of Chemotherapy, Tokyo Metropolitan Cancer
and Infectious Diseases Center, Komagome Hospital,
18-22-3 Honkomagome, Bunkyo-ku,
Tokyo 113-8677, Japan

Keywords Hepatitis B virus reactivation · Cytotoxic T lymphocyte · Regulatory T cell · PD-1

Abbreviations

HBV Hepatitis B virus
CTL Cytotoxic T lymphocyte
sALT Serum alanine aminotransferase
TNF Tumor necrosis factor
IFN Interferon
MIP Macrophage inflammatory protein
MCP Monocyte chemotactic protein

Introduction

More than 300 million people worldwide suffer from persistent hepatitis B virus (HBV) infection, making the virus a common cause of morbidity and mortality [1, 2]. Each year, an estimated one million people die of complications associated with chronic HBV infection, including cirrhosis, end-stage liver disease and hepatocellular carcinoma [3, 4]. Viral reactivation in hepatitis B surface antigen (HBsAg) carriers undergoing immunosuppressive therapy is well documented, as some immunosuppressive therapies can enhance HBV replication in hepatocytes at the same time as they curb host immune responses, resulting in detectable viremia followed by clinical hepatitis [1]. In general, although the development of surface and core antibodies and loss of surface antigen following HBV infection are thought to represent clearance of the virus, evidence exists to support the possibility that the virus may remain latent within the liver [5, 6]. The course and outcome of HBV infection are modulated by the host immune response [7, 8], and the loss of immune surveillance can cause reactivation of viral replication and exacerbation of disease activity. HBV reactivation is a well-characterized syndrome marked by the abrupt reappearance or elevation of HBV DNA in the serum of a patient with previously inactive or resolved HBV infection [1, 9]. Although the mechanisms of reactivation and associated liver damage remain unclear, they may include a rebound increase in the lymphocyte number following cessation of immunosuppressive and myelosuppressive chemotherapy, leading to a rapid destruction of infected hepatocytes with subsequent severe hepatitis. As one of the viral factors, it has been reported that the fulminant outcome of HBV reactivation can be associated with genotype Bj, which exhibits high replication owing to the A1896 mutation [10]. Therefore, although there are increasing reports regarding viral factors for the mechanism of HBV reactivation, it is still premature to conclude how the host immune response affects the liver injury and viral load.

It has been demonstrated that chronic persistent HBV infection is manifested by cytotoxic T lymphocytes (CTLs) that are functionally impaired or exhausted [7]. Recent reports have indicated that PD-1 is markedly upregulated on the surface of exhausted virus-specific CD8⁺ T cells in mice with lymphocytic choriomeningitis virus infection [11] and humans with human immunodeficiency virus (HIV) infection [12, 13] or hepatitis C virus (HCV) infection [14]. Based on these observations, we evaluated the hypothesis that HBV-specific CD8⁺ T cells can restore their function during HBV reactivation, by analyzing PD-1 expression on HBV-specific CD8⁺ T cells. In a previous report, we demonstrated that fulminant hepatitis in HBV patients was responsible for high amounts of interferon

(IFN)- γ production by CD8⁺ T cells from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [15]. Thus, HBV-specific CD8⁺ T cells may be responsible for the liver disease at the onset of HBV reactivation, although a causal relationship among these events has not been defined.

In this study, we found that the frequency of HBV-specific CD8⁺ T cells was increased and the interactions between these CD8⁺ T cells and CD4⁺ regulatory T cells (Tregs) showed a negative correlation at the onset of HBV reactivation.

Patients and methods

Patients

Six patients with HBV reactivation from resolved HBV infection before chemotherapy or immunosuppressive therapy, 34 patients with resolved HBV, 17 patients with inactive chronic hepatitis B (ICHB), 17 patients with chronic hepatitis B (CHB) and 12 healthy controls gave informed consent to participate in the study. The study was performed at Tokyo Metropolitan Komagome Hospital after receiving institutional review board approval (approved ID number: 714). We defined resolved HBV infection as serum HBsAg (–), anti-HBcAb (+) and/or anti-HBsAb (+), ICHB as serum HBsAg (+), HBV DNA (+) and normal serum alanine aminotransferase (sALT; 5–40 IU/mL), and CHB as serum HBsAg (+), HBV DNA (+) and continuous serum ALT elevation (>2 \times normal level). The study protocol and procedures were conducted in accordance with the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki. The patient characteristics are summarized in Table 1. The healthy controls comprised six males and six females, who ranged in age from 32 to 63 years. There were no significant differences in age between the HBV reactivation patients and the other groups. The patients were human leukocyte antigen (HLA)-A2- or A24-positive and negative for HCV and HIV-1/2.

Sample preparation

PBMCs were isolated from whole blood using LymphoprepTM (Axis-Shield, Oslo, Norway). The isolated cells were washed twice in phosphate-buffered saline (Gibco, Auckland, NZ) and used immediately. The cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % heat-inactivated fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 50 μ g/mL gentamicin and 2 mM L-glutamine (all from Invitrogen, Carlsbad, CA) at 37 °C in a humidified 5 % CO₂ incubator, as previously described [15]. Plasma preparation tubes (BD Biosciences, San Jose, CA) were used to isolate plasma from whole

Table 1 Characteristics of the respective patient groups

	Number	Sex (M/F)	Age	ALT (U/L)	HBV DNA (log/mL)
Healthy volunteer	12	6/6	57 ± 11	25 ± 11	–
Resolved HBV	34	18/16	59 ± 15	33 ± 20	–
ICHB	17	8/9	55 ± 14	33 ± 14	3.9 ± 1.8
CHB	17	8/9	53 ± 11	75 ± 19	5.5 ± 1.9
Reactivation	6	3/3	66 ± 12	82 ± 66	5.8 ± 3.3

Results are shown as mean ± SD

ALT alanine transaminase, ICHB inactive chronic hepatitis B, CHB chronic hepatitis B, HBV hepatitis B virus, M male, F female

blood. The plasma samples were frozen and subsequently thawed for viral load and genotype testing.

Synthetic peptides

Three HBV peptides; HLA-A*0201 core 18–27 (FLPSDFFPSV), envelope 183–191 (FLLTRILTI), polymerase 575–583 (FLLSLGIHL), HLA-A*2402 core 117–125 (EYLVSFQVW), polymerase 756–764 (KYTSFPWLL) and were synthesized by Sigma Aldrich (Hokkaido, Japan).

Major histocompatibility complex (MHC) class I tetramer staining

Patients expressing HLA-A2 or A24 were assessed for antigen-specific responses to HBV by tetramer staining. For the staining, phycoerythrin (PE)-conjugated HLA-A*0201-restricted HBV core (FLPSDFFPSV) and HLA-A*2402 HBV core (EYLVSFQVW) HBV polymerase (KYTSFPWLL) were purchased from MBL (Nagoya, Japan).

FACS analysis

HLA typing was performed by staining PBMCs with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-HLA-A2 and PE-conjugated anti-HLA-A24 antibodies (MBL) according to the manufacturer's instructions. PBMCs were surface-stained on ice for 20 min with the following monoclonal antibodies: FITC-conjugated anti-human CD62L, anti-PD-1 and anti-CD25 (BD Biosciences); PE-conjugated anti-human Foxp3 (eBioscience, San Diego, CA); and PE-Cy5-conjugated anti-human CD4 and anti-human CD8 (BD Biosciences). For intracellular staining, isolated PBMCs were incubated with peptides (10 µl/mL) in the presence of human recombinant IL-2 (50 U/mL) and 1 µl/mL of BD GolgiPlug protein transport inhibitor (BD Bioscience) for 4 h. After incubation (37 °C, 5 % CO₂), cells from each well were stained with PE-Cy5-conjugated anti-human CD8 (BD Biosciences). Prior to staining with

intracellular antibodies against PE-conjugated anti-human IFN-γ, cells were fixed and permeabilized by adding Cytofix-Cytoperm (BD Pharmingen). Cells were acquired by FACS scan (BD Biosciences), and the data was analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Cytokine and chemokine profiles

Bio-Plex Cytokine Assay Kits (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) were used to measure the amounts of cytokines and chemokines in sera in accordance with the manufacturer's instructions. Specifically, we used the Bio-Plex Human Cytokine 17-Plex Panel. The resulting samples were analyzed in a 96-well plate reader using a Bio-Plex Suspension Array System and Bio-Plex Manager software (all from Bio-Rad Laboratories).

Serum HBV assay

The serum HBV DNA concentrations were quantified using the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The four major HBV genotypes (A–D) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies directed against distinct epitopes on the preS2-region products using commercial kits (HBV GENOTYPE EIA; Institute of Immunology Co. Ltd., Tokyo, Japan). HBV DNA sequences bearing the core promoter and precore or core regions were amplified by PCR with hemi-nested primers. The PCR products were directly sequenced by the di-deoxy-chain termination method using a Big Dye Terminator Kit and an ABI PRISM 3100-Avant Analyzer (both from Applied Biosystems, Foster City, CA).

Statistical analysis

Data are shown as mean ± SD. The data were analyzed by the nonparametric Mann–Whitney or Kruskal–Wallis tests or ANOVA using Prism 5 for Macintosh software (GraphPad, San Diego, CA). Values of $P < 0.05$ were considered to indicate statistical significance.

Table 2 Characteristics of HBV reactivation patients

Patient	Sex	Disease	HBsAg	HBsAb	HBcAb	Chemotherapy/ Immunosuppressant	HBV genotype	HBVcore/precore mutation
#1	Female	ALL, BMT	–	+	+	PSL, FK	C	–
#2	Male	AML, BMT	–	+	+	PSL, CsA	C	–
#3	Male	Eso.ca	–	+	+	5FU + CDDP	C	–
#4	Male	B cell lymphoma	–	+	+	R-CHOP	B	–
#5	Male	B cell lymphoma	–	+	+	CHOP	B	–
#6	Female	T-LBL, BMT	–	+	+	Anthracycline + AraC	B	–

ALL acute lymphoblastic leukemia, BMT bone marrow transplantation, PSL prednisolone, FK tacrolimus, CsA ciclosporin A, CDDP cisplatin, 5FU 5-fluorouracil, R-CHOP rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin hydrochloride (hydroxydaunorubicin), vincristine (oncovin), and prednisone, AraC cytarabine

Results

HBV reactivation patient profiles

We identified six patients with HBV reactivation (Table 2). Patients with malignant lymphoma and bone marrow transplantation for leukemia were observed, and treatment with rituximab, which is a well-known inducer of HBV reactivation, was encountered in the case of one patient (patient #4). There was no sex difference regarding the incidence of HBV reactivation. All patients were negative for HBsAg and positive for anti-HBc and anti-HBs antibodies as HBV-related markers. In addition, three patients were HBV genotype C and one patient was genotype B. No core and precore promoter mutations were detected in the patients. All patients received entecavir (0.5 mg/day) when serum HBV DNA was initially detected or sALT elevation was observed.

Serum inflammatory cytokine and chemokine levels

To determine whether the serum cytokine and chemokine levels correlated with the development of HBV reactivation, we examined the concentrations of various cytokines and chemokines. We measured serum cytokine/chemokine levels at the time of diagnosis of HBV reactivation. In the groups, serum was isolated prior to chemotherapy or antiviral therapy.

The data for the serum cytokine and chemokine levels are shown in Fig. 1. Serum IL-1 β was significantly higher in resolved HBV patients (median, 0.32 pg/mL; range 0.10–0.75 pg/mL) than in healthy controls (median, 0.17 pg/mL; range 0.04–0.43 pg/mL) or ICHB patients (median, 0.17 pg/mL; range 0.09–0.24 pg/mL). Serum IL-7 was elevated in resolved HBV patients (median, 6.4 pg/mL; range 0.54–28.12 pg/mL) compared with ICHB patients (median, 3.2 pg/mL; range 0.54–12.6 pg/mL) or CHB patients (median, 3.13 pg/mL; range 0.29–5.16 pg/mL).

There were no significant differences in serum IL-6 among resolved HBV, ICHB, CHB and HBV reactivation patients. Serum IL-8 and MCP-1 were significantly increased in resolved HBV patients (IL-8: median, 12.5 pg/mL; range 5.15–34.2 pg/mL; MCP-1: median, 75.2 pg/mL; range 0.7–300.23 pg/mL) compared with healthy controls (IL-8: median, 5.24 pg/mL; range not detected–17.46 pg/mL; MCP-1: median, 23.3 pg/mL; range not detected–48.51 pg/mL) and CHB patients (IL-8: median, 7.25 pg/mL; range 1.13–23.84 pg/mL; MCP-1: median, 21.8 pg/mL; range 3.49–58.66 pg/mL). Although circulating IFN- γ was detected at very low levels in all samples, ICHB patients exhibited significant suppression of serum IFN- γ . Regarding HBV reactivation, serum G-CSF was slightly increased compared with healthy controls.

Comparison of HBV-specific CD8⁺ T cell frequencies

The development of hepatitis with HBV infection is mediated by antigen-specific CTLs [7]. To compare the frequencies and phenotypes of HBV-specific CD8⁺ T cells from PBMCs, 16 HLA-A2- and 19 HLA-A24-positive resolved HBV patients, 9 HLA-A2- and 11 HLA-A24-positive ICHB patients, 11 HLA-A2- and 13 HLA-A24-positive CHB patients, and four HLA-A2- and four HLA-A24-positive HBV reactivation patients were examined using a panel of three MHC class I tetramers containing frequently detected HBV epitopes (A2 core, amino acids 18–27; A24 core, amino acids 117–125; and A24 polymerase, amino acids 756–764) (Fig. 2a). The frequency of peripheral HLA-A2 core-specific CD8⁺ T cells was significantly higher in HBV reactivation patients than in ICHB and CHB patients (Fig. 2b, upper panels). Interestingly, the frequencies of HLA-A2 core-specific CD8⁺ cells were also significantly higher in resolved HBV patients than in ICHB patients, indicating that HBV-specific CD8⁺ T cells are circulating even though serum HBV DNA was not detected. Consistent with these data,

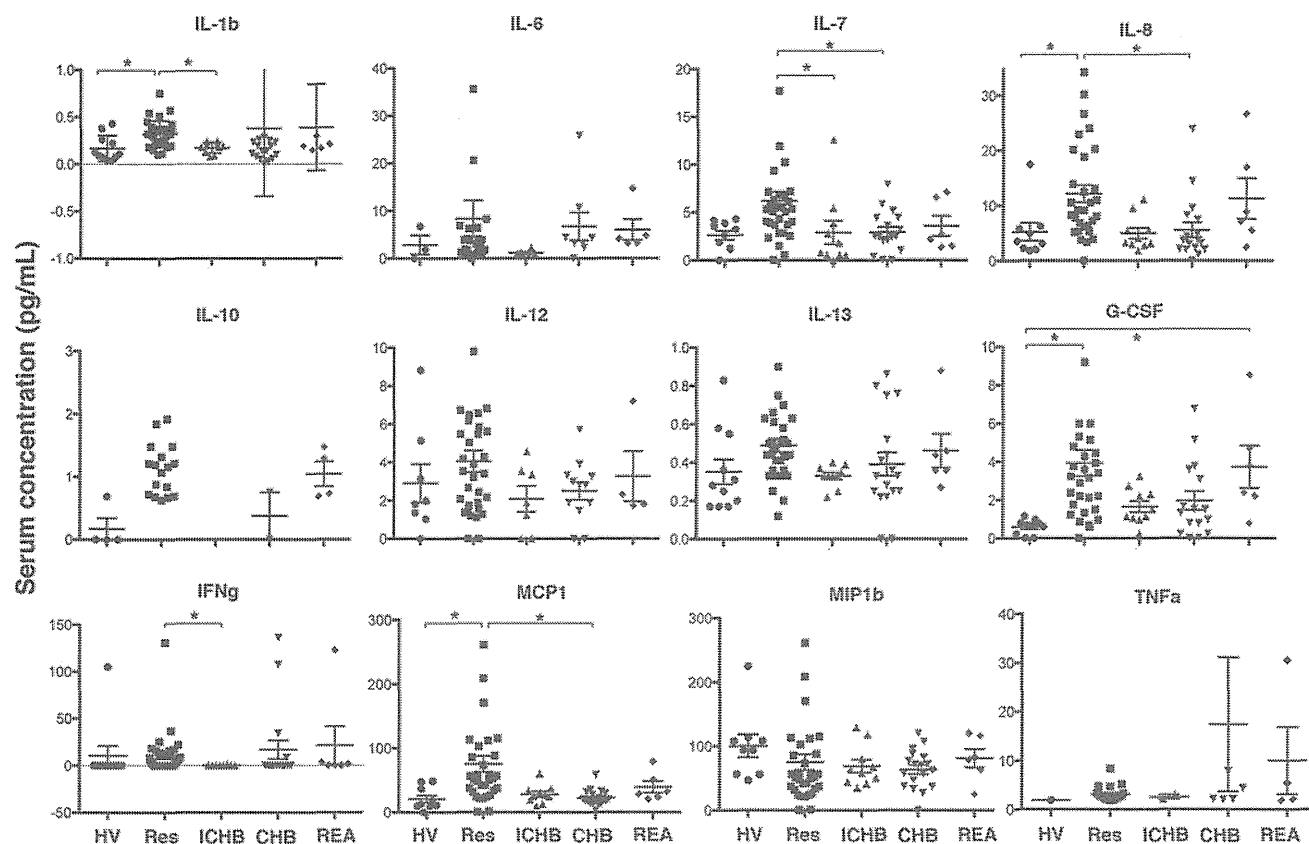


Fig. 1 Serum concentrations of cytokines and chemokines. Serum cytokines and chemokines were measured at the time of diagnosis in HBV reactivation patients and prior to chemotherapy or antiviral therapy in the other groups. The serum concentrations were compared

among healthy controls, resolved HBV patients, ICHB patients, CHB patients and HBV reactivation patients. **P* < 0.05, significant difference between the linked items

the frequencies of HLA-A24 core- and polymerase-specific CD8⁺ T cells were significantly higher in HBV reactivation patients than in ICHB and CHB patients.

In addition, to evaluate the functional profile of HBV-specific CD8⁺ T cells we analyzed intracellular IFN- γ production following stimulation with five peptides. Although we did not observe a significant difference in the numbers of IFN- γ producing cells in HBV reactivation patients by HLA-A24 core peptide stimulation, similar results were obtained by tetramer staining following HLA-A24 core and polymerase stimulation (Fig. 2b). We also observed that the number of IFN- γ producing cells in HBV reactivation patients increased by HLA-A24 envelope peptide stimulation (supplementary Fig. 1). These results demonstrated that the frequency of functional HBV-specific CD8⁺ T cells increased in HBV reactivation patients compared with ICHB and CHB patients.

It was demonstrated that the frequency of circulating CD4⁺CD25⁺ Tregs significantly correlated with the serum viral load in severe CHB patients [16]. To determine whether CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺Foxp3⁺ Tregs contribute to liver injury during HBV reactivation, we monitored their

numbers in PBMCs. The numbers of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺Foxp3⁺ Tregs had a tendency to be low in HBV reactivation patients compared with the other groups, although the differences were not significant (Fig. 2b, lower panels).

To confirm the inverse correlation between the percentages of HBV-specific CD8⁺ T cells and the percentages of CD4⁺Foxp3⁺ T cells, we assessed these cells in all patients. As shown in Fig. 2c, a significant inverse correlation was not detected in all patients (white circles), whereas an inverse correlation was noted in HBV reactivation patients (black dots).

PD-1 and CD62L expression on HBV-specific and total CD8⁺ T cells

The function of antigen-specific CD8⁺ T cells is impaired, termed “exhaustion,” during persistent chronic infection diseases like HBV [17], and exhausted antigen-specific CD8⁺ T cells express high levels of PD-1 and low levels of CD62L [18]. Based on these findings, we evaluated the expression of PD-1 and CD62L on total CD8⁺ T cells and

