

図1 年齢階層別の HCV 抗体陽性率

表1 A 地区における感染リスク要因

単変量解析	HCV 抗体(%)		p 値
	陽性者 (n=339)	陰性者 (n=957)	
手術歴	140 (41.3)	215 (22.5)	<0.001
輸血歴	49 (14.5)	47 (4.9)	<0.001
鍼治療歴	89 (26.3)	139 (14.5)	<0.001
民間療法歴	12 (3.5)	14 (1.5)	<0.05
家族歴	75 (22.1)	168 (17.6)	NS

 χ^2 検定

多変量解析	オッズ比(95%CI)	p 値
手術歴	1.89 (1.41~2.54)	<0.0001
輸血歴	2.05 (1.29~3.26)	<0.01
鍼治療歴	1.75 (1.27~2.40)	<0.001
民間療法歴	1.82 (0.79~4.12)	NS

多重ロジスティック解析

NS : not significant (有意差なし)

II 分子系統樹解析

コホート研究を始めて間のないころ、この多発地域における約 2,500 組の夫婦の HCV 感染実態について溝上雅史先生(現 独立行政法人国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター)と共同研究を行った。共に HCV 抗体が陽性の 11 組の夫婦において感染 HCV の genotype を系統樹解析したところ、夫婦間で系統樹上の同一ウイルス株は認められず、HCV の夫婦間感染リスクはきわめて低いものと考えられた。

一方、N市U地区コホートにおける検討では、HCV抗体陽性者の各HCV遺伝子配列はきわめて近いクラスターに分類されたことから、この地域のHCV感染がほぼ30年以上前に地域発生したことが明らかにされた⁵⁾。

Ⅲ HCV持続感染者のALT値と肝組織像

N市U地区コホートでは、HCV RNA陽性者のALT値異常率と肝組織所見についての知見が得られた⁶⁾。ALT値異常率は男性が72.3% (99人/137人)、女性が56.9% (112人/197人)であり、有意に女性においてALT値異常率が低かった。また、当時の犬山分類を用いた肝組織の検討では、ALT値正常43例の83.7% (36例)は慢性持続性肝炎(chronic persistent hepatitis; CPH)の所見であったが、ALT値が異常を示す105例ではその42.9% (45例)が慢性活動性肝炎(chronic active hepatitis; CAH)2Bあるいは肝硬変(liver cirrhosis; LC)であった(表2)。また50歳未満の男女を比較すると、男性のほうが肝組織像の進展が早いことが示された。

Ⅳ 10年間のHCV感染実態の変化

現在でもHCVには有効な感染予防手段がない。一方で、通常の日常生活ではC型肝炎の新規感染が起こりうるのかどうかについては不明であった。そこで、調査開始から10年経った2001年に同一地域の10年間に及ぶHCV感染実態の変遷を検討したところ、HCV抗体陽性率は1991年の33.1%から2001年には24.0%に低下していた⁷⁾。とくにこの10年間で50歳代以下のHCV抗体陽性率の低下が顕著であったことから、この地域では新たな感染者は出現していないものと考えられた。

また、1991～2001年までの10年間にわたり161組の夫婦を追跡調査したところ、夫婦どちらかがHCV抗体陽性である27組の夫婦においては、10年間でその配偶者に新規HCV抗体陽性者は認められなかったことから、一般の日常生活においては、C型肝炎感染の危険性はき

表2 HCV RNAとALT値からみた肝組織所見

肝組織像	HCV RNA(-) (n=9)	HCV RNA(+) (n=148)	
		ALT値正常 (n=43)	ALT値異常 (n=105)
正常	8 (88.9%)	3 (7.0%)	0 (0.0%)
CPH	1 (11.1%)	36 (83.7%)	15 (14.3%)
CAH2A	0 (0.0%)	4 (9.3%)	45 (42.9%)
CAH2B	0 (0.0%)	0 (0.0%)	30 (28.6%)
LC	0 (0.0%)	0 (0.0%)	15 (14.3%)

わめて低いことが明らかとなった。

V C型肝炎の経過と一塩基多型(SNPs)

われわれは、本コホート研究が当時の21世紀COE(center of excellence)プログラムに採択されたことを機に(拠点リーダー：河田純男先生)、C型肝炎の臨床経過に影響する遺伝子多型について探索することとした。現在行われているゲノムワイド関連解析(genome-wide association study；GWAS)ではなかったが⁸、HCV感染後の宿主応答に関与する候補遺伝子の一塩基多型(single nucleotide polymorphisms；SNPs)を抽出したところ、HCV RNA持続陽性と関係する20 SNPs、およびHCVキャリアのALT値異常と関係する15 SNPsを2001年に見出し、HCV感染の経過にはさまざまな宿主因子が関与する可能性を報告した⁸。そのなかの1つに、形質転換増殖因子(transforming growth factor；TGF)- β のプロモーターSNP(-509T/C)があったが、このSNPは、TGF- β 遺伝子多型で最もよく解析されているシグナルペプチド内のPro10Leu多型とほぼ完全に連鎖不均衡であり、-509Cアレルのホモはそれ以外のgenotypeに比べて自然緩解例が有意に多いことが判明した。Pro10/-509CはTGF- β の低発現のハプロタイプと考えられ、これらの結果からTGF- β 低発現の宿主ではHCVの排除が起きやすいことが示唆された⁹。その後2009年に、C型慢性肝炎の抗ウイルス治療効果に関係すると報告された宿主因子インターロイキン(interleukin；IL)-28BのSNPが、本コホートにおいても自然治癒に強く関連していることがわかっている¹⁰⁾¹¹⁾。

VI ALT値正常HCVキャリアのALT値異常率

病院コホートを用いた研究では、HCV感染者ではたとえALT値が正常でも肝線維化が進んでいることは広く受け入れられているエビデンスであるが、われわれは2006年までの追跡調査をもとに、果たして肝機能正常(ALT値30 IU/L以下)のHCVキャリアではどの程度の頻度でALT値が持続的に正常であるかについて検討した。その結果、239人の肝機能正常例における肝機能異常(ALT値31 IU/L以上)出現率は42.3%に上がることが明らかとされ、とくに65歳未満および肥満者では、コホート追跡中に有意に肝機能異常率が高いことを報告した¹²⁾。

地域コホートは病院コホートとは異なり肝機能検診受診者を対象としている性質上、採血間隔に限りはあるものの、2011年にはコホート開始から20年間のALT値の変動についてretrospectiveに解析した。1991~1995年までのスクリーニング期においてHCV RNA陽性であった600人のALT値をみても、20年間のうちにその53%がALT値31 IU/L以上の異常値となっていた¹³⁾。このことから、HCVキャリアでは経時的な肝機能のフォローアップが

表 3 自然陰性化に寄与する因子：多変量解析

因子	調整 HR	95%CI	p 値
AST 値正常 (<30 IU/L)	1.97	0.96~4.06	0.07
ZTT 値正常 (<11 Kunkel)	10.26	3.10~33.96	p<0.01
HBs 抗体陽性	2.22	1.19~4.13	0.01
HCV 抗体 (C.O.I.)	0.60	0.47~0.76	p<0.01

Cox 比例ハザードモデル

HR：ハザード比，95%CI：95%信頼区間，C.O.I：cut-off-index

必要であることが改めて示唆された。

VII ウイルス自然排除

これまで慢性持続感染が成立した後の HCV の生体からの自然排除の有無については不明であった。HCV 持続感染者のなかでウイルスの自然排除の有無とその頻度を解明することは感染自然史を理解するうえで重要である。そこで山形 HCV コホートの対象である 20 歳以上の 7,925 人中、HCV RNA 持続陽性であった 846 人において、HCV 感染の自然経過を探ることを目的に、コホート住民からのウイルス自然排除について解析した¹⁴⁾。

逐年検診を 1 回以上受診し、抗ウイルス治療未治療例 475 人(平均 61.2±9.9 歳，平均観察期間 16.8±0.2 年)を対象に，経年的に TaqMan[®] HCV(ロシュ社)にて血中ウイルス量を測定したところ，Kaplan-Meier 法による血中 HCV RNA 累積自然陰性化率は 5 年で 4.3%，10 年で 5.1%，15 年で 7.1%であった。このデータをもとに人年法による解析を行ったところ，HCV キャリアはその自然経過の 0.6%/year person 程度の頻度で自然排除されている可能性があることが明らかとなった。さらに Cox 比例ハザードモデルを用いて HCV RNA 陰性化に関与する因子を分析したところ，ZTT が低値であることと HCV 抗体の cut-off-index が低力価であることが，HCV 自然排除と強く関係していた(表 3)。また松浦善治先生(大阪大学微生物病研究所)との共同研究にて，ウイルス自然排除例では HCV 中和結合(neutralization of binding；NOB)抗体が産生されていることを示した。これらの研究から，従来ウイルスが自然排除されることがほとんどないと考えられていた HCV 持続感染者においても，経過中に稀に自然排除される例があることが判明した。

VIII HCV 感染に伴う肝発癌・生命予後

HCV 感染者の予後の一端を明らかにする目的で，逐年検診受診者を対象に毎年腹部超音波検査を行っており，これまで 58 人の肝発癌が確認されている。内訳は genotype 1b が 69%，2b

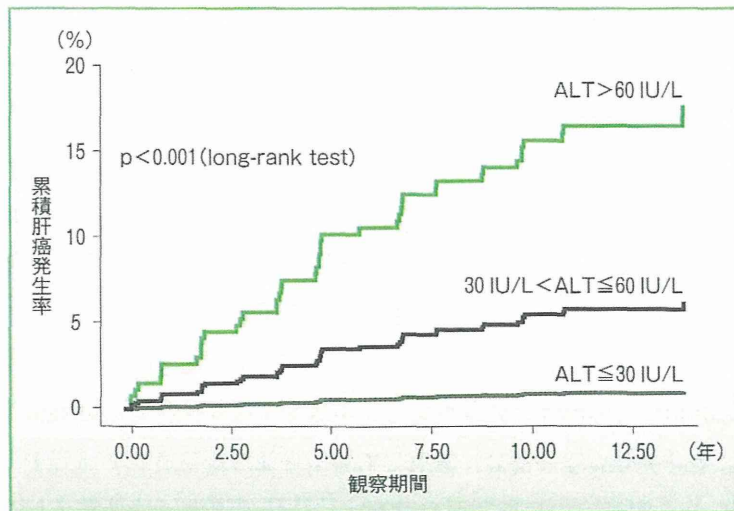


図2 初診時 ALT 値と肝発癌

Kaplan-Meier 法

表4 本コホートにおける肝発癌に寄与する因子

変量	HR (95%CI) *	p 値
男性	1.7 (0.9~3.2)	0.077
ALT > 60 IU/L	19.0 (4.5~80.1)	< 0.001
30 IU/L < ALT ≤ 60 IU/L	6.3 (1.4~28.2)	0.016
genotype 1b	2.4 (1.2~4.8)	0.012

Cox 比例ハザードモデル

*: 年齢, 手術歴, 輸血歴などで調整

(文献 15) より引用)

が26%であり、2aからの発癌は認めなかった。発癌率を人年法でみると、1,000人年あたり平均5.1人(男性8.5人、女性3.5人)と高い確率で発癌がみられることがわかった。また初診時ALT値で発癌率をみると、ALT値60IU/L以上および30~60IU/Lの群で有意に肝発癌がみられ(図2)、肝発癌に寄与する因子は男性、genotype 1bおよびALT値であった(表4)¹⁵⁾。

さらに、HCV感染が最終転帰に及ぼす影響について、HCV抗体陽性者1,078人全員を対象に、関連自治体の協力を得て、死亡診断書をもとにこの肝炎コホートにおける生命予後調査と死因調査を行った¹³⁾。その結果、観察開始から平均17.8年の追跡では、HCV RNA陽性者が陰性者に比べ肝疾患関連死の頻度が有意に高かった(13.4% vs. 4.5%; p < 0.01)。

おわりに

これまで、住民検診をベースにした肝炎コホート設定とその追跡検診を行い、HCV感染に

限らず、G型肝炎ウイルス¹⁶⁾¹⁷⁾やTTウイルス¹⁸⁾に関する分子疫学研究や臨床的意義について報告してきたが、そのいずれもがhospital-based studyでは得られないデータであった。20年にわたるわれわれのコホート研究からは、HCV感染の疫学、HCV感染経過と宿主因子の関係、キャリアにおけるウイルス自然排除と肝発癌など、わが国におけるHCV感染の未解決の問題点の一端が解明できたものとする。同時にこれらの研究からは、病院コホート同様、慢性肝臓病予防のための感染住民への治療介入の必要性が改めて示唆された。わが国では欧米に比しHCV感染例の高齢化が指摘されており、その肝発癌率は高いものであることから、このような地域におけるHCVキャリアの病診連携の構築が一層望まれる。

一方では、ここ数年のGWASにより、信頼度の高いHCV感染関連遺伝子が複数みつかるようになった。これらの遺伝子多型は、報告されているような抗ウイルス治療効果予測因子であるばかりでなく、C型肝炎の病態に密接に関連している可能性がコホート研究からも明らかとなりつつある。近年のC型肝炎の病態解明や診断・治療法の進歩には目覚ましいものがあるが、これら地域コホート研究を通じて、HCV感染克服のための質の高いキーインフォメーションがさらに発信されることを期待したい。

謝辞

本稿を終えるにあたり、山形地域コホート研究の黎明期から現在に至るまでご尽力、ご指導いただいた以下の方々に深謝します(敬称略、順不同、かっこ内は現職)。

高橋恒男(山形健康管理センター)、上野義之(山形大学医学部消化器内科学)、青木政則(日本海総合病院)、青山一郎(青山医院)、阿藪里佳(鶴岡市立荘内病院)、安達 徹(山形県立河北病院)、伊藤純一(山形大学医学部生化学)、伊藤麻衣(東北中央病院)、宇賀神 智(山形県立河北病院)、奥本和夫(山形大学医学部消化器内科学)、小野寺 滋(小野寺医院)、勝見智大(山形大学医学部消化器内科学)、柄澤 哲(柄沢医院)、久保木 真(倉敷成人病センター)、齋藤孝治(公立置賜総合病院)、佐藤智佳子(山形大学医学部消化器内科学)、邵 力(山形大学医学部公衆衛生学)、菅原一彦(菅原内科胃腸科医院)、鈴木明彦(三友堂病院)、鈴木克典(山形県立中央病院)、鈴木義広(日本海総合病院)、武田 忠(公立置賜総合病院)、武田陽子(兵庫医科大学消化器内科)、土田秀也(土田医院)、富田恭子(山形大学医学部消化器内科学)、中村由紀子(済生会山形済生病院)、西瀬雄子(山形大学医学部消化器内科学)、芳賀弘明(山形大学医学部消化器内科学)、服部悦子(寒河江市立病院)、松尾 拓(済生会山形済生病院)、松橋孝明(まっはし内科胃腸科クリニック)、三沢慶子(みゆき会病院)、三井浩子(山形健康管理センター)、吉井英一(吉井内科胃腸科クリニック)、河野弥生(山形大学医学部消化器内科学実験補助員)、阿部 茜(山形大学医学部消化器内科学実験補助員)、佐藤広美(山形大学医学部消化器内科学実験補助員)、関連自治体の健康福祉課の皆さん

文 献

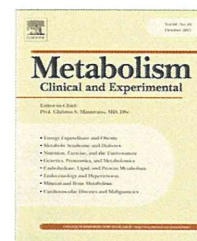
- 1) 新澤陽英, 久保木真, 富樫 整, 他: 地域住民健診でみられる肝機能異常に影響する要因の検討. 臨病理 39 : 346-351, 1991
- 2) 新澤陽英, 石橋正道, 久保木真, 他: C型肝炎多発地域における HBV, HCV 感染状況の比較検討. 日臨 53 : 337-341, 1995
- 3) Ishibashi M, Shinzawa H, Kuboki M, et al : Prevalence of inhabitants with anti-hepatitis C virus antibody in an area following an acute hepatitis C epidemic ; age-and area-related features. J Epidemiol 6 : 1-7, 1996
- 4) 渡辺久剛, 斎藤貴史, 西瀬雄子, 他: HCV コホート研究による持続感染者の自然経過. 河田純男 監, 佐田通夫, 新澤陽英, 斎藤貴史 編, HCV 感染の natural course を探る: わが国におけるコホート研究. 山形, 山形大学出版会, 45-50, 2011
- 5) Yoshii E, Shinzawa H, Saito T, et al : Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection in an area endemic for community-acquired acute hepatitis C. Tohoku J Exp Med 188 : 311-316, 1999
- 6) Kuboki M, Shinzawa H, Shao L, et al : A cohort study of hepatitis C virus (HCV) infection in a HCV epidemic area of Japan ; age and sex-related seroprevalence of anti-HCV antibody, frequency of viremia, biochemical abnormality and histological changes. Liver 19 : 88-96, 1999
- 7) 小野寺滋, 鶴岡克明, 鈴木義広, 他: C型肝炎多発地区での HCV 感染率の 10 年後の変化. 日臨 62 : 264-266, 2004
- 8) Saito T, Ji G, Shinzawa H, et al : Genetic variations in humans associated with differences in the course of hepatitis C. Biochem Biophys Res Commun 317 : 335-341, 2004
- 9) Kimura T, Saito T, Yoshimura M, et al : Association of transforming growth factor- β 1 functional polymorphisms with natural clearance of hepatitis C virus. J Infect Dis 193 : 1371-1374, 2006
- 10) 渡辺久剛: 肝炎コホートにおける自然治癒関連因子の解析. 厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策事業)平成 22 年度総括・分担研究報告書「ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子を含めた情報のデータベース構築・治療応用に関する研究」, 32-34, 2011
- 11) 渡辺久剛: 肝炎コホートにおける自然治癒・肝発癌関連因子の解析. 厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策事業)平成 23 年度総括・分担研究報告書「ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子を含めた情報のデータベース構築・治療応用に関する研究」, 35-38, 2012
- 12) 青木政則, 鈴木義広, 三沢慶子, 他: 肝機能正常 C型肝炎ウイルス感染者における肝機能異常出現の検討: C型肝炎ウイルス感染多発地区住民を対象とした逐年検診による. 日高齢消会誌 10 : 65-69, 2008
- 13) 渡辺久剛: 地域コホート研究からみた HCV 感染者の自然史. 厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策事業)平成 24 年度総括・分担研究報告書「ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子を含めた情報のデータベース構築・治療応用に関する研究」, 34-36, 2013
- 14) Watanabe H, Saito T, Shinzawa H, et al : Spontaneous elimination of serum hepatitis C virus (HCV) RNA in chronic HCV carriers ; a population-based cohort study. J Med Virol 71 : 56-61, 2003
- 15) 新澤陽英, 河田純男: C型肝炎多発地域における疫学調査. 厚生労働省科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策事業)平成 18 年度総括・分担研究報告書「B型及びC型肝炎ウイルスの新たな感染予防法の確立のための感染病態解明に関する研究」, 32-37, 2006
- 16) 新澤陽英, 石橋正道, 邵 力, 他: HCV 感染多発地区における HGV 感染の疫学的研究. 日臨 55 : 609-612, 1997
- 17) Zhang X, Shinzawa H, Shao L, et al : Epidemiological study and genetic analysis of GB virus C infection in general population from an area endemic for hepatitis C. J Med Virol 54 : 237-242, 1998
- 18) Watanabe H, Shinzawa H, Shao L, et al : Relationship of TT virus infection with prevalence of hepatitis C virus infection and elevated alanine aminotransferase levels. J Med Virol 58 : 235-238, 1999



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Metabolism

www.metabolismjournal.com

Dynamics of serum metabolites in patients with chronic hepatitis C receiving pegylated interferon plus ribavirin: A metabolomics analysis

Takafumi Saito^{a,*}, Masahiro Sugimoto^c, Kaori Igarashi^c, Kaori Saito^c, Li Shao^b, Tomohiro Katsumi^a, Kyoko Tomita^a, Chikako Sato^a, Kazuo Okumoto^a, Yuko Nishise^a, Hisayoshi Watanabe^a, Masaru Tomita^c, Yoshiyuki Ueno^a, Tomoyoshi Soga^c

^a Department of Gastroenterology, Yamagata University School of Medicine, Yamagata 990-9585, Japan

^b Department of Public Health, Yamagata University School of Medicine, Yamagata 990-9585, Japan

^c Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka, Yamagata 997-0052, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 March 2013

Accepted 16 July 2013

Keywords:

Metabolome

HCV

Oxidative stress

CE-TOFMS

Glutathione

ABSTRACT

Objectives. Serum samples from patients with chronic hepatitis C were subjected to metabolomics analysis to clarify the pretreatment characteristics of their metabolites and also changes in specific metabolites resulting from antiviral therapy with pegylated interferon plus ribavirin (PegIFN/RBV).

Materials/Methods. The serum levels of low-molecular-weight metabolites in the twenty patients before and 24 weeks after completion of PegIFN/RBV therapy were analyzed using capillary electrophoresis and liquid chromatography–mass spectrometry.

Results. Ten patients showed a non-virological response (NVR) and 10 achieved a sustained virological response (SVR) with eradication of viremia. The pretreatment levels of tryptophan were significantly higher in the patients of SVR than in those of NVR ($p = 0.010$). The area under the curve (AUC) value of tryptophan calculated from the receiver operating characteristic (ROC) curve for discriminating SVR from NVR was 0.84 (95% confidential interval, 0.66–1.02, $p = 0.010$). The ROC curve of multiple logistic regression model incorporating the pretreatment levels of tryptophan and γ -glutamate-arginine showed that the AUC value was highly significant (AUC = 0.92, 95% confidential interval, 0.79–1.05, $p = 0.002$). Twenty four weeks after completion of treatment, the levels of γ -glutamyl dipeptides, glutamic acid, 5-oxoproline, glucosamine and methionine sulfoxide were decreased, whereas those of 5-methoxy-3-indoleacetate, glutamine, kynurenine and lysine were increased significantly ($p < 0.05$) in both the NVR and SVR patients.

Conclusions. The pretreatment serum levels of certain metabolites including tryptophan are associated with the response to PegIFN/RBV therapy. PegIFN/RBV therapy can ameliorate the oxidative stress responsible for glutathione metabolism.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; HCC, hepatocellular carcinoma; IFN, interferon; PegIFN/RBV, pegylated interferon plus ribavirin; SVR, sustained virological response; NVR, non-virological response; ALT, alanine aminotransferase; ROS, reactive oxygen species; CE-TOFMS, capillary electrophoresis–time-of-flight mass spectrometry; IL, interleukin; MRM, multiple reaction monitoring; PC, principal component; ROC, receiver operating characteristic; MLR, multiple logistic regression; AUC, area under the curve; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase.

* Corresponding author. Department of Gastroenterology, Yamagata University School of Medicine, Yamagata 990-9585, Japan. Tel.: +81 23 628 5309; fax: +81 23 628 5311.

E-mail address: tasaitoh@med.id.yamagata-u.ac.jp (T. Saito).

0026-0495/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2013.07.002>

1. Introduction

Chronic hepatitis C virus (HCV) infection causes progressive liver inflammation, which predisposes patients to possible liver cirrhosis and, finally hepatocellular carcinoma (HCC) [1,2]. Antiviral therapy for chronic HCV infection comprises interferon (IFN), pegylated interferon plus ribavirin (PegIFN/RBV), or a combination of PegIFN/RBV and a HCV-related protease inhibitor. Patients who achieve a sustained virological response (SVR) with successful eradication of HCV, or even those with a non-virological response (NVR) but showing improvement of liver inflammation or the serum alanine aminotransferase (ALT) level have a reduced risk of progression to HCC [3–6]. A meta-analysis of randomized controlled trials suggests that IFN therapy can efficiently reduce HCC development in patients with HCV-related cirrhosis [7].

The oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS) has a close association with the inflammatory process in hepatitis [8,9]. Healthy individuals have protective mechanisms against oxidative stress, i.e., induction of anti-oxidative substrates such as glutathione, thioredoxin, vitamin A and vitamin E, or enzymes for removing ROS such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. However, in patients of chronic hepatitis C, these protective mechanisms are impaired, and the resulting long-term exposure to oxidative stress during viral infection leads to progressive hepatitis accompanied by a risk of HCC [10–12].

Metabolome analysis has emerged as a powerful technique for detecting low-molecular-weight metabolites in cells. Metabolome profiling approaches based on capillary electrophoresis–time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS) have led to the discovery of ophthalmate (γ -glutamyl-2-aminobutyrylglycine) as a biomarker of reduced glutathione depletion in mice with acetaminophen-induced hepatotoxicity [13,14]. Recently, the serum metabolites in a total of 248 samples from patients with nine types of liver disease were analyzed comprehensively using this approach, and increased levels of γ -glutamyl dipeptides in the majority were reported [15]. That study demonstrated that γ -glutamyl dipeptides are synthesized via ligation of glutamine with various amino acids and amines by γ -glutamylcysteine synthetase, which is under feedback inhibition by glutathione, and that the level of γ -glutamyl dipeptides represents the degree of glutathione production. Therefore, γ -glutamyl dipeptides are likely to be key metabolites reflecting the extent of liver tissue injury due to oxidative stress, suggesting that monitoring of their levels in serum may be useful for predicting the course of liver disease in patients with HCV infection. In addition, γ -glutamyl transferase (GGT) is the enzyme responsible for the extracellular catabolism of glutathione, and a recognized source of γ -glutamyl dipeptides. Thus GGT can be used as a marker to indicate the amelioration of oxidative stress [16].

The metabolism of human liver cells under conditions of HCV-related hepatitis has not been extensively investigated. In addition, the changes in serum metabolite levels in patients with chronic hepatitis C treated with PegIFN/RBV remain unknown. Such analysis would yield a considerable amount of useful information on the metabolism of these patients, and might lead to the discovery of new biomarkers of chronic

hepatitis C that could be useful in clinical practice. In the present study, we used CE-TOFMS to analyze serum samples collected from patients with chronic HCV infection before and after PegIFN/RBV therapy.

2. Materials and methods

2.1. Patients and details of PegIFN/RBV therapy

Twenty patients who received PegIFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis C were enrolled. These patients comprised 6 men and 14 women, with an age range of 38 to 70 years (52.8 ± 9.6 years, mean \pm standard deviation). All of the patients had HCV genotype 1b infection with a high viral load exceeding 5 logIU/ml. Patients with alcoholic liver injury, autoimmune liver disease, and those positive for hepatitis B surface antigen were excluded. All patients were treated with a combination of PegIFN- α 2b (Pegintron; MSD K.K., Tokyo, Japan) and RBV (Rebetol; MSD K.K.) in accordance with the Japanese standard prescription information supplied by the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. Briefly, PegIFN was administered subcutaneously once a week and RBV was given orally twice a day to achieve the total dose. The dosages of pegIFN and RBV were determined on the basis of body weight. Patients with body weights of 35–45, 46–60, 61–75, and 76–90 kg were given PegIFN at doses of 60, 80, 100, and 120 μ g, respectively, and those with body weights of <60, 60–80, and >80 kg were given RBV at doses of 600, 800, and 1000 mg, respectively. Virological responses were evaluated at 24 weeks after completion of treatment, and the clinical outcome was classified as either an SVR with HCV eradication, or an NVR without HCV eradication. Patients were considered to have achieved an SVR if monitoring at four-week intervals confirmed negativity for HCV RNA for 24 weeks after completion of the therapy. Virological responses were assayed on the basis of serum HCV RNA using a real-time PCR assay kit (COBAS TaqMan HCV Auto, Roche Diagnostics). Single nucleotide polymorphism of interleukin (IL) 28B (rs8099917) was determined by direct sequencing of genomic DNA from patients, and classified into two types: the major homozygote (T/T: homozygosity for the major allele), and the minor heterozygote or homozygote (T/G or G/G: heterozygosity or homozygosity for the minor allele).

2.2. CE-TOFMS technique for profiling of serum metabolites

In all CE-TOFMS experiments, we used an Agilent CE capillary electrophoresis system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), an Agilent G3250AA LC/MSD TOF system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), an Agilent 1100 series binary HPLC pump, a G1603A Agilent CE-MS adapter and a G1607A Agilent CE-ESI-MS sprayer kit. Data were acquired with the G2201AA Agilent ChemStation software for CE and Analyst QS in the Agilent TOFMS software.

The metabolites were separated in a fused silica capillary (50 μ m i.d. \times 100 cm) filled with 1 mol/L formic acid as the electrolyte [13]. A sample solution was injected at 50 mbar for

3 s (3 nL) and a voltage of 30 kV was applied. The capillary temperature and sample tray were set at 20 °C and below 5 °C, respectively. Methanol/water (50% v/v) containing 0.1 µmol/L hexakis(2,2-difluoroethoxy)phosphazene was delivered as the sheath liquid at 10 µl/min. ESI-TOFMS was performed in the positive ion mode, and the capillary voltage was set at 4 kV. The flow rate of heated dry nitrogen gas (heater temperature, 300 °C) was maintained at 10 psig. For TOFMS, the fragmenter, skimmer and Oct RFV voltages were set at 75, 50 and 125 V, respectively. Automatic recalibration of each acquired spectrum was achieved using the masses of reference standards ($[^{13}\text{C}$ isotopic ion of a protonated methanol dimer (2MeOH + H) $^+$, m/z 66.0632 and [hexakis(2,2-difluoroethoxy)phosphazene + H] $^+$, m/z 622.0290). Exact mass data were acquired at a rate of 1.5 spectra/s over a 50–1000 m/z range. To facilitate peak identification and quantification, we analyzed 162 commercially available metabolic standards before analyzing the samples. The raw data were processed using our proprietary software (MasterHands) [17].

2.3. Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) technique for analysis of serum γ -glutamyl peptide

LC–MS/MS was carried out using an Agilent 1100 series HPLC system (Agilent Technologies) and an API 3000 triple-quadrupole tandem mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA). System control and data acquisition and analyses were performed with the Applied Biosystems Analyst QS software.

The targeted γ -glutamyl peptides were separated on a Develosil RPAQUEOUS-AR-3 column (2 mm i.d. \times 100 mm, 3 µm; Nomura Chemical, Seto, Japan) that was maintained at 30 °C. The mobile phase consisted of 0.5% formic acid/water as solution A and acetonitrile as solution B. The gradient was increased from 0% B at 0 min to 1% at 5 min, 10% at 15 min and 99% at 17 min and then retained at 99% until 19 min. The flow rate was 0.2 ml/min and the injection volume was 1 µl. The MS conditions for positive ions were: mode, multiple reaction monitoring (MRM); ion spray voltage, 5.5 kV; nebulizer gas, 12 psi; curtain gas, 8 psi; collision gas, 8 U; nitrogen gas temperature, 550 °C. The MRM parameters, i.e. Q1 (protonated precursor ion), Q3 (production), declustering potential, focusing potential, collision energy and collision cell exit potential for γ -glutamyl peptides, were optimized using the Analyst software.

2.4. Principal component analysis and heat map visualization

Principal component analysis, which is a type of unsupervised statistical analysis used widely as a statistical tool in metabolomics studies, was applied prior to the detailed data analysis [18]. This facilitates visual inspection of the distributed samples in principal component (PC) space using score plots [19], and the distance between individual samples in score plots reflects the degree of systematic variation in metabolite profiles among samples. Principal component analysis converts high-dimensional data into fewer dimen-

Table 1 – Patient characteristics according to the virological response.

	Virological response		
	non-virological responder	sustained virological responder	<i>p</i> value
Number of patient	10	10	
Sex (Male/Female)	2/8	4/6	NS ^a
Age	55.3 \pm 9.0	50.2 \pm 9.9	NS ^b
Height	158.5 \pm 9.1	160.5 \pm 9.8	NS ^b
Weight	52.0 \pm 11.8	58.7 \pm 11.3	NS ^b
HCV genotype 1b	10	10	
HCV-RNA > 5 logU/ml	10	10	
AST	51.9 \pm 18.7	51.8 \pm 27.5	NS ^b
ALT	64.3 \pm 34.2	79.0 \pm 52.9	NS ^b
GGT	66.3 \pm 42.7	43.1 \pm 36.6	NS ^b
IL28B SNP (Ma/Mi)	4/6	10/0	0.011 ^a

IL28B SNP: Ma, major homozygote (T/T), Mi, heterozygote or minor homozygote (T/G or G/G).

Data were expressed as mean \pm standard deviation. NS, not significant.

^a Fisher exact test.

^b Mann-Whitney *U*-test.

sions, by projecting the data into a reduced dimensional subspace, while maintaining as much variance from the original data as possible [20]. In this study, the procedure was repeated until the datasets were presented within three dimensions. We also visualized the observed metabolomic profile as a heat map representation, and performed hierarchical clustering analysis. The metabolite concentrations were averaged in each group, and the colors on the heat map were determined by subtracting the mean over four groups after log₂ transformation. Euclidean distance was used for clustering metabolites.

2.5. Statistical analyses

The Mann-Whitney *U*-test, Wilcoxon matched-pairs signed rank test, and Fisher exact test were used to assess the statistical significance of differences at a significance level of $p < 0.05$. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used for assessing the discrimination ability of individual metabolites. To assess the ability to discriminate SVR from NVR using multiple metabolites determined before treatment, we developed a multiple logistic regression (MLR) model. Metabolites for the MLR model were selected by the forward and backward feature selection method using a threshold of $p < 0.2$ for adding and one of $p > 0.2$ for elimination of metabolites. Bootstrap analysis was conducted to obtain unbiased estimates of the developed model. We used the bootstrapping technique to obtain relatively unbiased estimates; 200 repetitions were generated by random selection of individuals allowing redundancy. We used JMP version 9.0.2 (SAS Institute, Cary, NC) for principal component analysis and development of MLR, Weka version 3.6.4 (The University of Waikato, Hamilton, New Zealand) for bootstrap analysis, Mev TM4 software version 4.8.1 (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA) for