

大腸癌の疫学と予防

古野純典

はじめに

大腸癌は、2000年にはわが国がん死亡の12%を占め、男性では肺がん、胃がん、肝がんに次いで4番目に多く、女性では胃がんに次いで2番目に多いがんである¹⁾。世界的にも多い癌であり、2000年の推定では癌り患全体の9%を占めている²⁾。家族性大腸ポリポーシスに発生する大腸癌や遺伝子修復異常を伴う非ポリポーシス遺伝性大腸癌など遺伝的素因の強い大腸がんが知られているが、わが国における大腸癌の動向や米国日系移民における大腸癌リスクの高まりは大腸発癌に環境要因がきわめて重要であることを示している。従来から、高脂肪・低繊維の食事が大腸癌の危険因子として重要視されているが、疫学研究の結果は脂肪と大腸癌の関係について否定的であり、食物繊維

との予防的関連も定かでない。むしろ、運動不足や肥満が危険因子として注目されている。

I. 大腸癌の記述疫学

大腸癌は、東南アジアやアフリカではほとんど見られず、経済的に裕福な先進国に多い癌である。オセアニア、北米、西欧が従来から大腸癌の高率地域である²⁾。わが国はかつて大腸癌の低率国であったが、最近では世界的な高率国になっている(図1)。

わが国の大腸癌死亡率は戦後に急増しているが、特に結腸癌の増加が著しい(図2)¹⁾³⁾。1970年代半ば以降はり患率の動向も見ることができ、り患率の増加が死亡率より顕著である。直腸癌死亡率は1970年代以降、男性では横ばい、女性では減少しているが、り患率では男女とも1990年代始

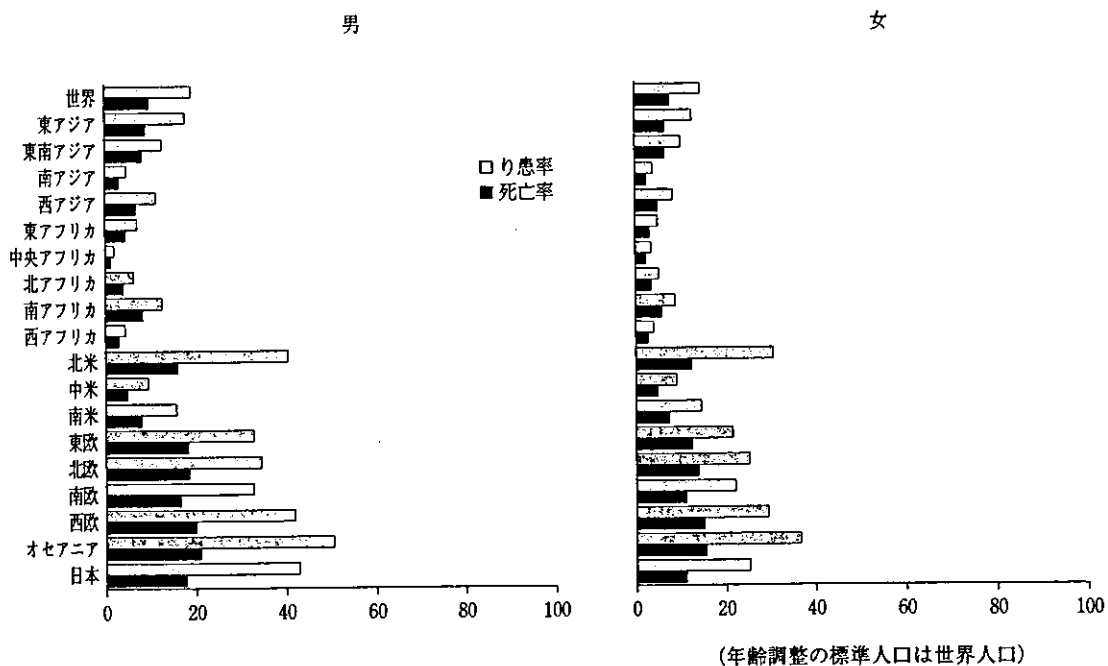
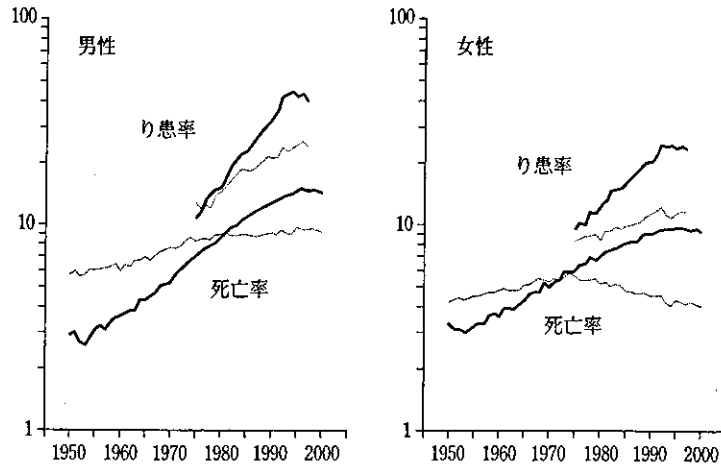


図1 世界の大腸癌年齢調整り患率と死亡率 (人口10万対)²⁾

九州大学大学院医学研究院予防医学分野 教授



(年齢調整の標準人口は1985年モデル人口)

図 2 わが国の結腸癌(太線)と直腸癌(細線)の年齢調整死亡率と
り患率(人口10万対)の動向¹³⁾

表 1 環境要因と大腸癌(文献4を改変)

評価	予防的要因	関連のない要因	危険因子
確実	運動(結腸癌), 野菜 NSAIDs ^{注)}		
ほぼ確実			赤身肉, 飲酒
可能性あり	食物繊維, 澱粉, カロテノイド	カルシウム, セレ ン, 魚	肥満, 高身長, 頻 回の食事, 砂糖, 総脂肪, 動物性・ 飽和脂肪, 卵, 加 工肉, 高熱調理肉 料理
証拠不十分	消化抵抗性澱粉 ビタミンC, D, E 葉酸, メチオニン, 穀類, コーヒー		

注) 非ステロイド系抗炎症剤

めまでは増加傾向にある。注目されるのは、1990年代には結腸癌のり患率・死亡率にはもはや増加が見られないことである。

大腸癌高率国である米国へ移住した日本人移民では大腸癌の死亡率あるいはり患率が米国白人の率とほとんど同じになることはよく知られている⁴⁾。米国日系移民にみられる大腸がんリスクの変化は、大腸がんリスクが環境要因によって大きく左右されることを端的に示すものである。

II. 危険因子と予防的要因

世界癌研究基金(WCRF)と米国癌研究財団(AICR)は、食物・栄養と癌に関する研究成果

を詳細に検討し、癌の危険因子および予防的要因に関する詳細な報告書を1997年に出版しているが、大腸癌の確実な予防的要因として運動と野菜が、ほぼ確実な危険因子として赤身肉(牛肉、豚肉および羊肉)と飲酒が挙げられている(表1)⁴⁾。

1. 脂肪と赤身肉

世界各地の13の症例対照研究をまとめたメタ・アナリシスでも、欧米の大規模コホート研究でも脂肪摂取と大腸癌については明確な関連は示されていない(表2)⁵⁾。一方、これらの大規模コホート研究では牛肉や豚肉などの赤身肉あるいは肉加工品の摂取が結腸癌リスクを高めることが示されている⁵⁾。最近のメタ・アナリシスでは、赤身肉

表 2 脂肪・肉と結腸癌に関する大規模コホート研究 (文献5を改変)

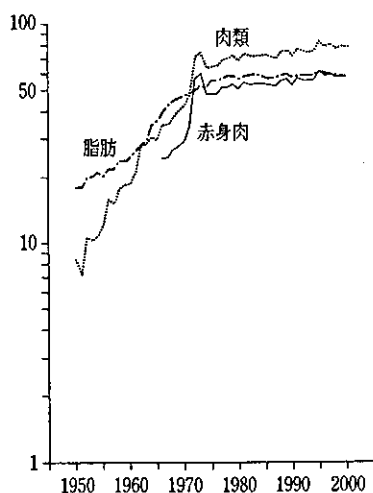
	米国看護婦	米国男性 保健職	アイオワ州 女性住民	オランダ 男女住民	ノルウェー ⁸⁾	
					男性	女性
総脂肪	2.00*	1.19	0.86	1.07	1.2	0.5
飽和脂肪	1.39	0.88	1.21	1.07	1.3	0.7
肉 ^{注1)}	2.49*	3.57*	1.21	0.84	0.8	1.9
加工肉 ^{注2)}	1.21	1.16	1.51	1.72*	2.0	3.5*

* P < 0.05

数値は5分類した場合の最低摂取群に対する最高摂取群の相対危険。オランダの加工肉は4分類。ノルウェーの研究ではすべて4分類。

注1) 米国の研究では主菜としての牛・豚・ラム肉。オランダとノルウェーの研究は鶏肉を含む。

注2) ノルウェーの研究ではソーセージの焼き物・炒め物



(資料は国民栄養調査, 文献7から転載)

図 3 わが国の栄養素・脂肪と肉の1人当たりの摂取量 (g/日) の年次推移

の摂取増加120 g/日に相当する相対危険は1.24 (95%信頼区間1.08~1.41), 加工肉の摂取増加30 g/日に対応する相対危険は1.36 (95%信頼区間1.15~1.61) と推定されている⁶⁾。肉や加工肉の高温調理によって産生されるヘテロサイクリックアミンの大腸発癌作用が注目される。わが国の脂肪あるいは肉の摂取量の変化は約20年後の大腸癌り患率の動向と強く相関しているが (図3), 脂肪の影響ではないとすれば, 肉の摂取が大腸発がんに関与していることを支持するデータであると思われる⁷⁾。

2. 食物繊維と野菜

食物繊維と一般に言われているものは消化吸収されない植物成分のことで, 野菜, 穀類および果物が主要な摂取源である。多くの症例対照研究では食物繊維高摂取群での結腸癌あるいは大腸癌リスクの低下が認められている⁹⁾。しかし, 米国の

看護婦および保健職男性の2つの大規模コホート研究をはじめとして多くのコホート研究では食物繊維と関連した大腸癌リスクの明らかな低下は見られておらず, WCRF/AICRの報告書でも「可能性あり」の判断にとどまっている。一方, 昨年報告された欧州10ヵ国52万人のEPICコホート研究では, 食物繊維との予防的関連が観察されている⁸⁾。平均摂取量が13 g/日の群に対して32 g/日 (女性) あるいは36 g/日 (男性) の群の大腸癌の相対危険は0.75 (95%信頼区間1.15~1.61) と推定されている。ただし, 摂取量が極端に違う地域のデータをまとめて解析しているので結果の解釈が難しい。

WCRF/AICRの報告書では, 野菜が大腸癌に予防的であることは確実であるとされている⁴⁾。予防的である野菜の成分としては, 食物繊維のほか抗酸化ビタミンに関心が持たれているが, 最近の研究では葉酸の重要性も指摘されている。葉酸はDNAメチル化およびDNA合成に重要な役割を果たしており, 葉酸摂取が予防的であることが最近の多くの疫学研究で一致して観察されている⁹⁾。さらに, 葉酸代謝酵素の遺伝子多型と大腸がんとの関連もいくつかの研究で指摘されており, 葉酸が大腸癌に予防的であることを間接的に支持するものと考えられる⁹⁾。葉酸が大腸癌に予防的であることについてWCRF/AICRの報告書では「証拠不十分」とされているが, 現在までの知見を総合的に判断すれば, 少なくとも「ほぼ確実」と考えて良さそうである。

3. 運動不足と肥満

予防的であることの機序は定かでないが, 運動が結腸癌に対して予防的であることは多くの疫学研究でほとんど例外なく観察されている⁴⁾。仕事での運動, 余暇の運動, 一日エネルギー消費量な

どさまざまな身体活動量の指標との間に予防的な関連性が一致して認められており、疫学的にはきわめて強い証拠と言える。直腸癌に予防的であるとする研究はほとんどなく、結腸癌と直腸癌では成因が異なることを示す一例でもある。肥満についてはWCRF/AICRの報告書では「可能性あり」の判断がされているが、その後の研究成果を考慮すれば、肥満が結腸癌リスクを高めることは「ほぼ確実」と考えられる⁵⁾。

4. 飲 酒

飲酒による大腸癌リスクの高まりはほぼ確実であるとされている⁴⁾。アルコール依存症患者のコホート研究では一般人に比べ結腸癌あるいは直腸癌リスクの高まりは観察されていないが、一部のコホート研究や多くの症例対照研究で飲酒による大腸癌リスクの軽度の高まりが観察されている。アルコール1日24g(ウイスキー・シングル2杯相当)当りの大腸癌の相対危険は1.10(95%信頼区間1.05~1.14)と推定しているメタ・アナリシスもある。アルコールは葉酸の腸管吸収を低下させ、代謝産物アセトアルデヒドが葉酸に阻害的であることも知られており、飲酒と関連した大腸癌リスクの高まりは葉酸不足が関与している可能性がある⁹⁾。

Ⅲ. 大腸腺腫の疫学的知見

大腸癌のどれくらいの割合が腺腫性大腸ポリープ(以下、腺腫)から発生しているか定かでないが、大腸腺腫が前がん病変の一つであることは間違いない。その根拠としては次のような事実がある。①大腸腺腫を切除した者では、非切除者に比べて大腸がん発生率が低い。②直径1cm以上の大きな腺腫では一部にがん病変が見られることが多い。③腺腫の細胞にはがん細胞で見られる遺伝子の変化と同じ変化が見られることが多い。

男性自衛官の研究では、肥満と運動不足が大腸腺腫の危険因子であることが明確にされ、糖尿病の人では腺腫発生の危険度が1.5~2倍高いことも明らかにされている。大腸がんとは異なる点は、喫煙が腺腫発生と強く関係していることである⁵⁾。喫煙と大腸癌との関係は定かでないが、喫煙は大腸発癌の初期段階にのみ関与しているとの指摘がある。

カルシウム摂取と大腸癌との関連は1980年代から検討されているが、カルシウムと大腸癌とはおそらく関係ないであろうと考えられている⁴⁾。し

かし、大腸腺腫の再発抑制が2つの無作為比較研究で観察されている¹⁰⁾¹¹⁾。これらの研究では、カルシウム1日1.2gの投与で腺腫再発の相対危険が0.81(95%信頼区間0.67~0.99)¹⁰⁾、1日2gの投与での腺腫再発の相対危険は0.66(95%信頼区間0.38~1.17)と報告されている¹¹⁾。カルシウムと大腸癌の間には関連がないとする考えを見直す必要がある。

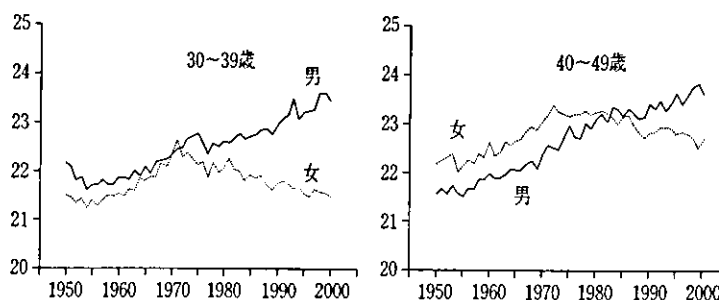
Ⅳ. 大腸癌の予防

WCRF/AICRの報告書では癌予防15箇条が提唱されているが、大腸癌に関係するのは野菜、赤身肉、飲酒、運動および肥満である。具体的内容は、①野菜・果物の1日摂取を400~800g、②赤身肉は多くても1日80g未満、③アルコールは1日ビール中ビン1本相当量(女性0.5本相当量)まで、④座位作業職の人は1日1時間歩き、週1時間以上の強度な運動をする、⑤成人での体重増加を5kg未満に抑える、となっている⁴⁾。日本人の1日あたりの野菜と牛・豚肉の平均摂取量はそれぞれ、約400gと60gで、指針をおおむね満たしている¹²⁾。しかし、飲酒と運動については大腸癌を予防するには不十分な状態と思われる。運動不足のまん延は肥満度指数の増加からも推測される(図4)⁷⁾。癌予防のための葉酸摂取の指針は定まっていないが、中高年日本人の葉酸摂取量は300~400 μ g/日であり、平均値としては比較的高いレベルにあると思われる¹²⁾。主要な摂取源は野菜(37%)、緑茶(12%)、穀類(9%)および果物(7%)である¹²⁾。

二次予防の大腸癌検診では便潜血検査が実施されている。米国、英国およびデンマークで実施された無作為比較研究によれば、便潜血検査スクリーニングにより大腸がん死亡の15~30%の低下が報告されている¹³⁾。これらの研究では便潜血検査にグアイヤック法が使われている。わが国のスクリーニングで使用されている免疫法検査の無作為比較研究の報告はないが、症例対照研究ではより大きな効果が見られている¹³⁾。便潜血検査は有効な大腸癌スクリーニングの方法である。

お わ り に

わが国における大腸癌の増加傾向は1990年代に終焉していると思われるが、日本は世界的に大腸癌高率国になっている。従来から大腸癌の危険因子であると指摘されている高脂肪の食事について



(平均身長と平均体重から求めた body mass index, 文献7から転載)

図 4 わが国中年男女の肥満度指数の年次推移

疫学研究の結果は否定的である。一方、運動と肥満防止が結腸癌に予防的であることはほとんど間違いないと考えられる。食物繊維が大腸がんに予防的であることについては否定的なコホート研究もあるが、野菜を中心とした食事は大腸癌に予防的であると考えられる。説明を省略したが、非ステロイド系抗炎症剤が大腸癌に予防的であることも確実であると思われる。大腸癌予防を目指す疫学研究では、これらの知見を考慮して大腸発がんの機序を明らかにするような研究も必要であろうと思われる。

文 献

- 1) 厚生労働省: 人口動態統計平成12年. 厚生統計協会, 2002.
- 2) Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., Parkin, D. M.: GLOBOCAN 2000. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Lyon, IARC Press, 2001.
- 3) The Research Group for Population-based Cancer Registration in Japan: Cancer incidence and incidence rates in Japan in 1997: estimates based on data from 12 population-based cancer registries. *Jpn J Clin Oncol*, 32: 318-322, 2002.
- 4) World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research (WCRF/AICR): Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC, American Institute for Cancer Research, pp216-251, 1997.
- 5) 古野純典: 大腸癌の社会疫学. *現代医療*, 35: 170-175, 2003.
- 6) Norat, T., Lukanova, A., Ferrari, P., Riboli, E.: Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int J*

- 7) Kono, S.: Secular trend of colon cancer incidence and mortality in relation to fat and meat intake in Japan. *Eur J Cancer Prev*, 13: 127-132, 2004.
- 8) Bingham, S. A., Day, N. E., Luben, R., Ferrari, P., Slimani, N., Norat, T., Clavel-Chapelon, F., Kesse, E., Nieters, A., Boeing, H., Tjøneland, A., Overvad, K., Martinez, C., Dorronsoro, M., Gonzalez, C. A., Key, T. J., Trichopoulou, A., Naska, A., Vineis, P., Tumino, R., Krogh, V., Bueno-de-Mesquita, H. B., Peeters, P. H. M., Berglund, G., Hallmans, G., Lund, E., Skeie, G., Kaaks, R., Riboli, E.: Dietary fiber in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*, 361: 1496-1501, 2003.
- 9) Bailey, L. B.: Folate, methyl-related nutrients, alcohol, and the MTHFR 677C→T polymorphism affect cancer risk: intake recommendations. *J Nutr*, 133: 3748S-3753S, 2003.
- 10) Baron, J. A., Beach, M., Mandel, J. S., van Stolk, R. U., Haile, R. W., Sandler, R. S., Rothstein, R., Summers, R. W., Snover, D. C., Beck, G. J., Bond, J. H., Greenberg, E. R., for the Calcium Polyp Prevention Study Group: Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. *N Engl J Med*, 340: 101-107, 1999.
- 11) Bonithon-Kopp, C., Kronborg, O., Giacosa, A., Räth, U., Faivre, J., for the European Cancer Prevention Organisation Study Group: Calcium and fiber supplementation in prevention of colorectal adenoma recurrence: a randomized intervention trial. *Lancet*, 356: 1300-1306, 2000.
- 12) 健康・栄養情報研究会(編集): 国民栄養の現状. 平成13年厚生労働省国民栄養調査結果. 東京, 第一出版, 2003.
- 13) 久道茂: 新たながん検診手法の有効性の評価. 平成12年度厚生労働省老人保健事業推進費等補助金報告書. 日本公衆衛生協会, pp305-324, 2001.

特集/ウイルス病新時代

ヒトからヒトへの感染症—血液由来感染症

C型肝炎ウイルス

林 純* 古庄 憲 浩**

はじめに

1989年にC型肝炎ウイルス(HCV)の抗体が測定可能になり、1992年にはこの抗体系が改良され、第二世代HCV抗体として、一般医療機関でも測定されるようになった。その結果、わが国は世界的にみてもHCVの感染率が高いことが判明した。さらに、一般医療機関で実際に診療する慢性肝疾患のうち60%はHCV感染によるもので、内訳としては慢性肝炎の50%、肝硬変の70%、肝癌の80%はHCV感染によるものであった¹⁾。衛生教育・環境の整ってきている現在では、新たなHCV感染はほとんど無くなってきているが、すでに感染している者が癌年齢になることから、わが国では肝癌の著明な増加が想像されていた。実際、1970年頃、肝癌による年間死亡者数は約10,000人であったが、この30年間に3倍に増加し、現在では34,000人に達しており、悪性新生物の中では胃癌、肺癌とはほぼ肩を並べている。

本稿では、著者らが長期に継続調査を行っている福岡県H村および長崎県I郡の疫学的研究の成績を中心に、HCVの感染経路、肝炎発症、肝癌発症およびインターフェロン(IFN)療法について述べる。

I. C型肝炎ウイルスについて

HCVのゲノムは約9.5kbの線状一本鎖RNAであることが判明しているが、HAVおよびHBVと異なりHCVのウイルス粒子は未だ分離されていないため、ウイルス由来の蛋白からおのこの遺伝子をゲノム上に求めることは出来ない。このため、推定アミノ酸配列の解析により、類似ウイルス(フラビウイルス、ペスチウイルス)のそれと比較することにより、構造蛋白・非構造蛋白遺伝子の位置が推定された。その結果、構造蛋白と

してコア蛋白、エンベロープ蛋白(糖蛋白)、非構造蛋白としてはNS1(糖蛋白)、NS2、NS3、NS4、NS5の蛋白が推定された。また、HCVのゲノムRNAの塩基配列をウイルス株間で比較すると、かなりの多様性がみられ、現在、主として1a型、1b型、2a型、2b型に分類されている。本邦では1a型は極めて少なく、HCV感染者の80%以上が1b型である²⁾。HCVのgenotypeはIFNの有効性の指標となり臨床的に重要である。

II. 感染経路

HCVの家族内感染については、多くの研究がなされている。母児間の感染率は約5%とされ、その際HCV RNA量の高い母親から感染するとされている。また、夫婦感染についても結婚期間に比例して、HCVの感染率が増加しており、その重要性を指摘する報告もあるが、HCVの遺伝子解析から約3%とされている。一方、感染機会の多い特殊浴場女性従業者では6.2%で、従業期間が長いほど陽性率は高くなっており、性行為によるHCVの感染が考えられた³⁾。

以上のことを踏まえて、本邦におけるHCVの主な感染経路を知るために、HCV抗体陽性率が高い福岡県H村(19.7%)⁴⁾および長崎県I郡(14.1%)⁵⁾において疫学的検討を行った。福岡県H村ではHCV RNA陽性母親の子供のHCV抗体陽性率は17.8%と高率であったが、彼らの平均年齢は 43.8 ± 3.3 歳であり、住民の40歳代の15.4%と比較して差はみられなかった。さらに、両地区とも、19歳以下の住民にはHCV抗体陽性例は1例も存在しておらず、母児間感染が主流とは考えられなかった。

夫婦間感染についてみると、福岡県H村ではHCV RNA陽性女性の夫のHCV抗体陽性率は34.8%で、HCV RNA陽性男性の妻のHCV抗体陽性率は22.2%であった。その平均年齢は、それ

九州大学大学院医学研究院・感染環境医学 *教授 **講師

ぞれ 62.7 ± 1.6 , 61.4 ± 1.1 であり, 住民の60歳代男性の36.2%および女性の26.6%と比較して差はみられなかった。HCVの genotype 1b型と2b型が混在している長崎県I郡で, 夫婦ともHCV RNA陽性の11組について genotype を検討した。このうち6組は同じ genotype であったが, 5組は異なっており, また, たとえ genotype が同一でも, 必ずしも夫婦間感染によるものとは考えられなかった。

福岡県H村のHCV感染者のうち輸血歴が認められたのは11.9%のみであった。当地区におけるHCVの感染経路を解明するため, 1950~60年代の住民の医療圏, すなわち掛かり付けであった医療機関について, 聴き取り調査を行った。その結果, ある医療機関に通院していた住民にHCV抗体陽性率が高いことが判明し, さらに, そこでは使用した注射器および針が十分に滅菌されずに, 繰り返し使用されていたことが判明した。台湾でも non-disposable の注射針がC型急性肝炎の感染経路であったことを報告している。本邦で disposable の注射器および針などが使用され始めたのは1963年頃であり, 地方まで普及したのは最近である。

以上のことから, 本邦におけるHCVの感染経路は母児間感染および夫婦間感染よりも, 輸血を含む医療行為が主であったと考えられた。

Ⅲ. 最近のHCVの感染状況

福岡県H村において, 1993年の調査でHCV抗体が陰性であった1,351例について追跡調査を2003年まで行った。新たなHCV抗体陽性例が70歳および74歳女性に認められ, いずれもHCV RNAも陽性であった。このうち1例は医療機関で下部消化管内視鏡検査(生検を含む)を受けていた。C型慢性肝炎患者の大腸ポリープ摘出術に用いた内視鏡で検査を受けた一組の夫婦が, HCVに感染し急性肝炎を発症した事例が米国で報告されている。著者らの症例も, 他に感染機会などがないことから, 同様な感染経路が考えられた。いずれにしても, 赤十字血液センターでのスクリーニング体制の改善, disposable 器材の普及などから新たなHCV感染は著明に減少していると思われる。しかし, 欧米では薬物乱用者での注射器の廻し打ちによる感染が多く報告されているが, わが国でもこのような感染経路による感染が散見されている。

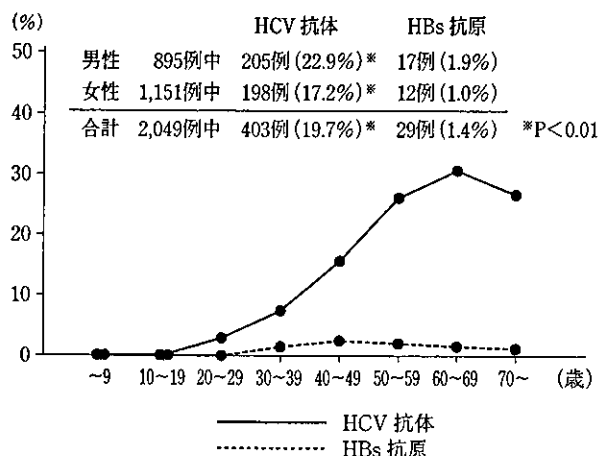


図1 福岡県H村におけるHCV抗体およびHBs抗原陽性率(1993年)

血液透析患者ではHCV感染例が高頻度にみられる事はすでに述べたが, その原因としてはHCV抗体陽性率が透析期間に比例して高率になっていたこと⁸⁾, HCV感染者の透析後の透析液にはHCV RNAが存在していること⁹⁾などから, 透析という行為の周辺に感染機会が多く存在していることが考えられた。また, 透析に必要なヘパリン生食を作製する際に, HCV感染者の血液が誤って混入した事例もあり⁸⁾, 血液透析施設では, リスクマネジメントも考慮した院内感染対策が必要と考えられた。

Ⅳ. 肝炎発症機序

1. HCV感染例における肝機能異常

福岡県H村でのHCV感染306例について, 年1回行われる肝機能検査の10年間の成績をまとめて検討すると, 39.5%が肝機能持続正常群, 41.5%が間欠異常群, 19.0%が持続異常群であった。また, 持続正常群には女性が多く, 持続異常群には男性が多かった⁸⁾。

2. 肝炎発症とウイルス側因子

HCV RNA量はC型慢性肝疾患では重症になるほど多くなるとの報告もあり, HCV RNA(ウイルス)量と肝障害の機序との関連が疑われていたが, その後の研究によりウイルス量と肝障害の程度との関連は認められないことが判明した²⁾⁸⁾。また, ウイルス量は2~3年では変化しないことも証明された⁹⁾。

欧米での研究では, C型の肝硬変患者の genotype は1a型および1b型が多いとされている。しかし, 本邦での成績は genotype と肝障害の程

度には関連がないとの報告が多く、1b型からも、2a型からも同程度の割合で肝癌の発症がみられている。

著者らは、HCVのコア領域では変異が少ないこと、細胞障害性Tリンパ球(CTL)が認識する領域であることに注目し、福岡県H村における肝機能持続正常群10例と持続異常群10例について、クローニング・シークエンスを行った。前者ではアミノ酸レベルでは変異がみられず、後者では変異が多くみられた⁸⁾。また、観察中、肝機能が正常から異常になった例では、今までなかったコア領域の変異が、出現するようになった⁹⁾。すなわち、HCV感染による肝障害と、HCVのコア領域でみたウイルスの多様性との関連性が示唆された。

3. 肝炎発症と宿主側因子

1) 免疫

近年、HCV感染による肝炎の発症機序として、CTLを含む細胞性免疫の関与が注目されている。著者らもC型慢性肝炎患者の末梢血単核球ではIL-1 β およびTNF- α の産生能が亢進していること¹⁰⁾、T細胞の活性化を示すとされる可溶性IL-2レセプターが血清中で高値を示していること¹¹⁾を報告してきた。さらに、彼らの末梢血のリンパ球は、HCV陰性の患者に比較して、CD4+細胞ではIFN- γ +細胞が有意に増加しており、CTLの前駆細胞とされるCD28+CD8+IFN- γ +細胞が増加していることも判明し¹²⁾、HCV感染例における肝炎にCTLが強くかかわっていることが考えられた。

2) 生活習慣

福岡県H村におけるHCV慢性感染者で肝機能異常に影響を及ぼす生活習慣因子として、喫煙数、喫煙歴、Brinkmann index、飲酒量、飲酒歴、飲酒指数、重労働を、その他に年齢、性別、輸血歴、HCV genotype、ウイルス量を変数として検討した。HCV慢性感染例では、重労働2時間以上(OR:20.60)、男性(OR:5.98)、飲酒歴(OR:1.04)が肝機能に影響を及ぼす因子として抽出されたが、HCV非感染者では飲酒指数(OR:1.06)のみが抽出された。HCV慢性感染者では、飲酒のみでなく、重労働も肝機能を増悪させる危険因子の一つと考えられた。

V. 肝癌発症機序

福岡県H村でのHCV持続感染411例において、

10年間、肝癌発症について経過観察した。肝癌発症例数は、64例、15.6%であった。肝機能持続正常群144例では、5年目までに0例、10年目までに80歳男性1例、0.7%であったが、肝機能間欠異常群137例では、5年目に7例、5.1%、10年目までに17例、12.4%で、肝機能持続異常群144例では、5年目までに23例、17.7%で、10年目までに46例、35.4%であった。肝機能異常群に有意に多くの肝癌発症がみられたことから、C型慢性肝炎における肝癌発症には、持続する炎症が重要な役割を果たしていると考えられた。

福岡県を含む九州では、成人T細胞白血病ウイルス(HTLV-1)の高浸淫地区である。HTLV-1は白血病を起こすだけでなく、免疫異常を起こすため種々の疾患に関連していることが明らかとなっている(脊髄症、ぶどう膜炎、関節症、皮膚筋炎)。HCVに関しては、HCV感染者にHTLV-1が重複感染すると、HCV単独感染に比較して、肝癌の発症頻度が高く、また、若年で発症する傾向がみられることが、著者らの調査で判明した。

VI. インターフェロン療法

1. 今までのインターフェロン療法

HCVは自然にウイルス血症が改善することがないため、わが国では1992年にC型慢性肝炎に対してIFNの投与が、保険適応となった。IFNには α と β があるが、当初IFN α は24週、 β は6~8週投与の単独療法であった。IFN投与終了後、肝機能が正常化する例は約50%で、肝機能が正常化するだけでなく、ウイルスが持続的に陰性化する(著効)例は約30%であった。著者らは311例のC型慢性肝炎あるいは肝硬変に天然型IFN α を投与し、多変量回帰分析を用いて、著効に関与する因子を検討した。その結果、高ウイルス量、genotype 1b型、40歳以上の女性がIFN療法に対する負の因子であった¹³⁾。その他に、肝硬変も重要な負の因子とされているが、肝硬変でもウイルス量が低い場合、IFNが有効な例もみられ¹⁴⁾、IFN療法の有効性の予測因子としては、ウイルス量が最も重要であると考えられる。以上のことから、genotype 1b型で、高ウイルス量の例は難治例と呼称されており、IFN単独療法での著効率は5%以下である¹⁵⁾。また、HTLV-1重複感染例では、著効率がHCV単独感染例に比較し有意に低く¹⁶⁾、HTLV-1の重複感染は、肝癌発症の促進だけでなく、IFNによるウイルス排除に

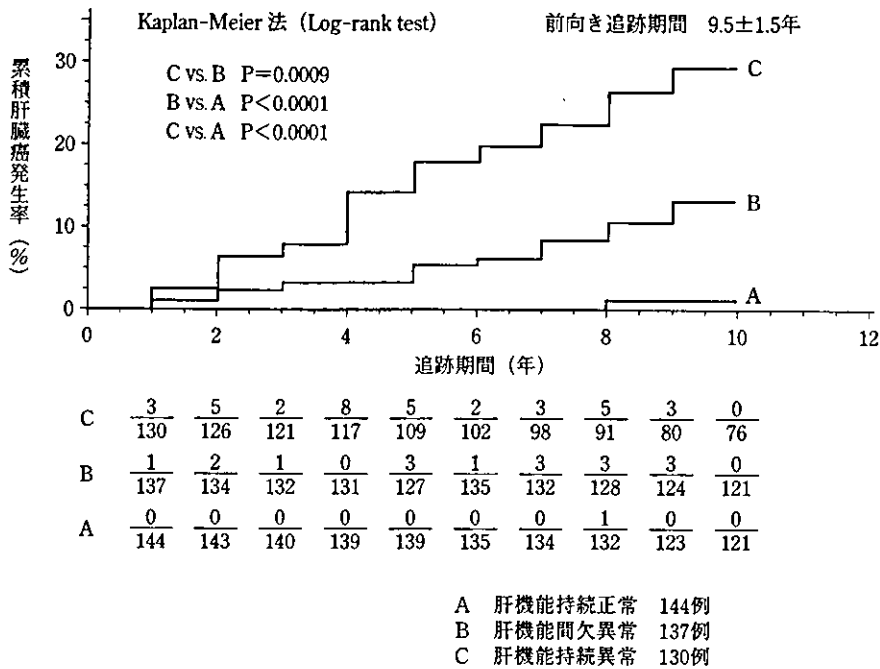


図 2 福岡県 H 村における HCV 感染例の累積肝癌発症率 (1993~2003年, Kaplan-Meier 法, Log-rank test)

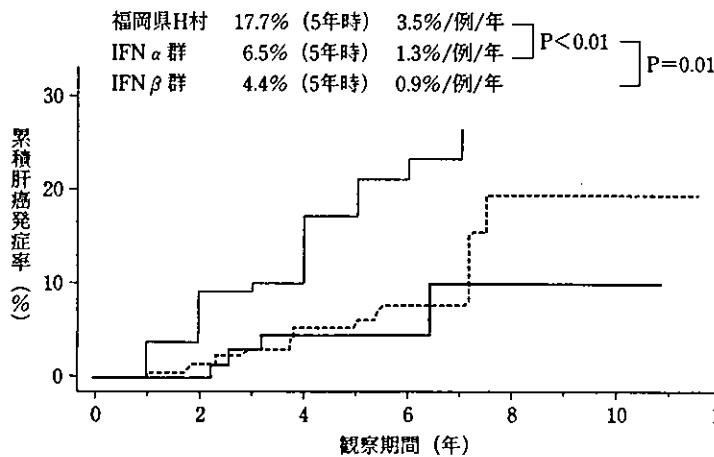


図 3 インターフェロン (IFN) α および β が投与された C 型慢性肝炎患者の累積肝癌発症率 (Kaplan-Meier 法, Log-rank test) -福岡県 H 村の肝機能持続異常例との比較-

対しても負の因子として作用していた。IFN は肝機能の改善だけでなく、ウイルスの排除、さらには肝臓癌発症の防止効果も報告されている。

著者らも IFN 投与患者の経過観察を行い、肝癌の発症について検討した。観察期間平均 5.7 年での肝癌発症は、IFN α 投与群では 260 例中 17 例、6.5%、β 投与群では 91 例中 4 例、4.4% で、福岡県 H 村の肝機能持続異常群における 5 年の肝癌発症率 17.7% に比較し低い値であった。特に、ウイルスが持続的に陰性化した著効例や、肝機能が正常化した例に肝癌発症が少ない傾向であった。

IFN β 投与群では IFN 無効例でも肝癌発症例が少ない傾向がみられた¹⁷⁾。肝癌細胞株 Huh7 および HepG2 を用いた in vitro の著者らの実験では、IFN β で処理した株のほうが、α 処理した株より発育が抑制されており、IFN β は C 型慢性肝炎に対する効果にかかわらず、抗腫瘍効果がみられているのかも知れない。

2. 現在と将来の IFN 療法

近年、新たな IFN の開発及び新たな IFN 療法が試みられているが、2001 年 12 月より、難治性 C 型慢性肝炎をターゲットとして、consensus IFN α

単独投与および IFN α 2b+リバビリン併用投与が保険適応となり、合わせて従来から使用されていた IFN の投与期間が6ヵ月から無期限となった。さらに、2003年12月には週1回の投与で効果が得られるとされる PegIFN α 2a の投与も可能となった。

著者らは、九州大学関連病院肝疾患研究会 (36施設) として、IFN α 2b+リバビリン併用療法の効果を検討した。761例の登録で、治療が完遂し効果判定が可能であった506例における著効率は209例、41.3%であった。いわゆる難治例は347例中78例、22.5%で、IFN 単独療法の成績よりかなり高率であった。

IFN 療法の副作用としては、発熱、全身倦怠感、うつ状態、甲状腺機能異常などが挙げられるが、リバビリンの併用療法では、これに貧血が加わる。

週1回の投与で効果が得られるとされる PegIFN α 2b+リバビリン併用の48週間投与が、2004年末より可能になるものと期待される。米国での研究によれば、いわゆる難治例に対しても、その著効率は約50%と報告されている¹⁸⁾。

わが国の HCV 感染者の80%は genotype 1b 型であることから、上述したように IFN 難治例が多く、また、多くの患者が高齢であることから、副作用が軽いとされる PegIFN α 2b に、リバビリンを併用した著効率の高い治療法に期待がかかっている。

お わ り に

わが国における HCV 感染例の感染経路は、輸血を含む、医療行為によるものが主流と考えられたが、現在新たな感染は激減している。肝炎の発症機序については、未だ不明な点が多いが、CTL を中心とした細胞性免疫とウイルスの変異との関与が考えられる。感染者に対する IFN 療法は肝機能の改善だけでなく、ウイルスの排除、さらには肝臓癌発症の防止効果もみられ有用と考えられる。さらに、著効率の高いとされる PegIFN α 2b+リバビリン併用療法も開始され、特に難治例に対しての効果に期待がもたれている。

わが国の大部分の C 型慢性肝炎患者は高齢化を迎えていることから、さらに肝臓癌の発症の危険性が高まっており、有効な IFN 療法を行うだけでなく、肝臓癌の早期発見に対するスクリーニング検査も重要性を増している。

文 献

- 1) Hayashi, J., Hirata, M., Nakashima, K. et al.: Hepatitis C virus is a more likely cause of chronic liver disease in Japanese population than hepatitis B virus. *Fukuoka Acta Med*, 82: 648-654, 1991.
- 2) Hayashi, J., Kishihara, Y., Yoshimura, E. et al.: Relationship of genotype to level of hepatitis C viraemia determined by competitive polymerase chain reaction. *J Infect*, 30: 235-239, 1995.
- 3) Nakashima, K., Kashiwagi, S., Hayashi, J. et al.: Sexual transmission of hepatitis C virus among female prostitutes and patients with sexually transmitted diseases in Fukuoka, Kyushu, Japan. *Am J Epidemiol*, 136: 1132-1137, 1992.
- 4) Hayashi, J., Kishihara, Y., Yamaji, K. et al.: Transmission of hepatitis C virus by health care workers in a rural area of Japan. *Am J Gastroenterol*, 89: 794-799, 1995.
- 5) Nakashima, K., Ikematsu, H., Hayashi, J. et al.: Intrafamilial transmission of hepatitis C virus among the population of an endemic area of Japan. *JAMA*, 274: 1459-1461, 1995.
- 6) Hayashi, J., Nakashima, K., Kajiyama, W. et al.: Prevalence of antibody to hepatitis C virus in hemodialysis patients. *Am J Epidemiol*, 134: 651-657, 1991.
- 7) Furusyo, N., Hayashi, J., Kakuda, K. et al.: Acute hepatitis C among Japanese hemodialysis patients: A prospective 9-year study. *Am J Gastroenterol*, 96: 1592-1600, 2001.
- 8) Hayashi, J., Kishihara, Y., Yamaji, K. et al.: Hepatitis C viral quasispecies and liver damage in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 25: 697-701, 1997.
- 9) Hayashi, J., Furusyo, N., Ariyama, I. et al.: A relationship between the evolution of hepatitis C virus variants, liver damage, and hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C viremia. *J Infect Dis*, 181: 1523-1527, 2000.
- 10) Kishihara, Y., Hayashi, J., Yoshimura, E. et al.: IL- β and TNF- α produced by peripheral blood mononuclear cells before and during interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*, 41: 315-321, 1996.
- 11) Hayashi, J., Kishihara, Y., Yamaji, K. et al.: Serum levels of soluble interleukin-2 receptors and effects of Interferon- α for patients with chronic hepatitis C virus. *Dig Dis Sci*, 40: 1837-1841, 1995.
- 12) Murata, M., Nabeshima, S., Maeda, N. et al.: Increased frequency of IFN-gamma-producing peripheral CD8+ T cells with memory-phenotype in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol*, 67: 162-170, 2002.
- 13) Hayashi, J., Ohmiya, M., Kishihara, Y. et al.: A statistical analysis of predictive factors of response to human lymphoblastoid interferon in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*, 89: 2151-2156, 1994.
- 14) Hayashi, J., Kishihara, Y., Ueno, K. et al.: Age-related response to interferon alfa treatment in women vs men with chronic hepatitis C virus infection. *Arch Intern Med*, 158: 177-181, 1998.
- 15) Furusyo, N., Hayashi, J., Ueno, K. et al.: Human lymphoblastoid interferon treatment for patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. *Clin Ther*, 19: 1352-

- 1367, 1997.
- 16) Furusyo, N., Hayashi, J., Kashiwagi, K. et al. : Hepatitis C virus (HCV) RNA level determined by second-generation branched-DNA probe assay as predictor of response to interferon treatment in patients with chronic HCV viremia. *Dig Dis Sci*, 47: 535-542, 2002.
- 17) Kishihara, Y., Furusyo, N., Kashiwagi, K. et al. : Human T lymphotropic virus type I infection influences hepatitis C virus clearance. *J Infect Dis*, 184: 1114-1119, 2001.
- 18) Kashiwagi, K., Furusyo, N., Kubo, N. et al. : A prospective comparison of the effect of interferon-alpha and interferon-beta treatment in patients with chronic hepatitis C on the incidence of hepatocellular carcinoma development. *J Infect Chemother*, 9: 333-340, 2003.
- 19) Manns, M. P., Mchutchinson, J. G., Gordon, S. C. et al. : Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*, 358: 958-965, 2001.
-

〈原 著〉

***Evaluation of a New Ozone Apparatus, the BOX-O₃, for the
Bacteriological Disinfection of Medical Waste.***

Masayuki MURATA^{1,2)}, Yasuhiro KISHIHARA²⁾, Shigeki NABESHIMA²⁾, Norihiro FURUSYO²⁾,
Makoto KUROKI³⁾ and Jun HAYASHI^{1),2)}

¹⁾*Environmental Medicine and Infectious Diseases, Internal Medicine, Faculty of
Medical Sciences Kyushu University, Fukuoka, Japan*

²⁾*Department of General Medicine, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan*

³⁾*Biochemical laboratory, SARAYA CO., LTD, Osaka, Japan.*

Summary

The BOX-O₃ is a new, alternative apparatus that uses ozone for the disinfection of biomedical waste. This study evaluated the ability of the apparatus to disinfect contaminated medical and laboratory waste that included a variety of bacterial strains. Microbiological measurement was done on laboratory waste contaminated with a variety of bacterial strains, medical waste alone, and medical waste contaminated with *Bacillus subtilis* collected from the infectious disease ward of Kyushu-university hospital. The strains tested for were *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, and *Candida albicans*. A 100 mL (5 test tubes containing 20 mL each) bacterial suspension consisting of 10⁸ to 10⁹ colony forming units (CFU)/mL was added to waste in a container. The mean bacterial load of the waste was measured immediately after shredding and ozone treatment. Three samples were recovered from three different places at random in the bulk ground. The samples were diluted to 1 : 10 and 1 : 100, then cultured at 37°C for 48 hr in a blood agar medium. For the measurement of primary bacterial load, shredding alone was done without the boost additive (hydrogen peroxide and acetic acid) and ozone treatment. All assays were done in triplicate. In the laboratory waste contaminated with a variety of bacterial strains, all bacterial populations were decreased by at least 4 log₁₀ immediately after ozone treatment. The primary mean bacterial load of the untreated medical waste alone was 3.8 log₁₀ CFU/g, and only normal flora was observed. The primary mean bacterial load of the untreated medical waste contaminated with *Bacillus subtilis* was lower than that of the untreated laboratory waste contaminated with *Bacillus subtilis*. In the medical waste contaminated with or without *Bacillus subtilis*, no bacterial populations were detectable immediately after ozone treatment. The BOX-O₃ safely and efficiently treated infectious medical waste collected from hospital ward, indicating that the BOX-O₃ is an effective alternative technology for the treatment of infectious waste and for controlling hospital infection.

Key words : medical waste, alternative technology, ozone treatment

Introduction

Concern is growing about the chemical pollution of soil, air and water as well as the infection risk inherent in the sorting, storing and transportation of medical waste before treatment^{1~6)}. Furthermore, regulation of incinerators has been tightened, causing the number of incinerators at medical facilities have rapidly decreased.

Under these circumstances, alternative technologies for the treatment of medical waste that can be substituted for incinerators have received considerable attention^{7,8)}.

The BOX-O₃ is a new, alternative apparatus that uses ozone to disinfect biomedical waste⁹⁾. It allows on-site shredding and decontamination of medical waste soon after it is produced.

This study evaluated the ability of the apparatus to disinfect contaminated medical and laboratory waste using a variety of bacterial strains.

村田 昌之^{1,2)}・岸原 康浩²⁾・鍋島 茂樹²⁾・古庄 憲浩²⁾・
黒木 信³⁾・林 純^{1,2)}

¹⁾九州大学大学院感染環境医学, ²⁾九州大学医学部附属病院総合診療部, ³⁾サラヤ株式会社バイオケミカル研究所

Material and Methods

Apparatus

The BOX-O₃ was developed by the BOX-O₃ International Company (Gümlingen, Switzerland). Figure 1 shows the general configuration of the BOX-O₃. The dimensions are 224 cm high, 60 cm wide, and 90 cm deep. The machine can be placed in any area equipped with electricity and compressed air. The BOX-O₃ consists of two parts, the center of the device contains a loading door and rotating lock, and a grinder and waste tank are in the lower part of the device. The ozone generator, accumulation tank, and the ozone neutralizer are in the upper part of the device. Gaseous ozone is produced continuously by an ozone generator supplied with the compressed air. The interior of the treatment unit is maintained at a constant partial vacuum with air expelled through a dry jacket, thereby eliminating the possible risk of ozone dispersal into the room in which the decontamination process is executed.

Treatment cycle

The BOX-O₃ treatment unit is controlled by a dual failsafe microprocessor with constant monitoring of the

device's basic functions and of the correct execution of the various phases of the cycle. Immediately after use, medical waste products are deposited in the BOX-O₃ container, a heavy-duty paper bag or a disposable carton, identified with a bar code. The rotating lock is opened and the container is introduced through the loading door after a personal bar code card has been validated. Next, the boost additive, consisting of 90 mL of 12% hydrogen peroxide and 80 mL of 80% acetic acid, is inserted. After this process, the container is automatically shredded together with its contents for 5 minutes. It is finely ground to a consistency at which the original parts are no longer recognizable or usable. Depending on the type of waste, the volume following shredding is reduced by 4 to 5 times the original volume. During the shredding, ozone is generated and accumulated up to a relative pressure of 1.2 bars and a maximum ozone concentration of 40 µg/L inside the ozone accumulation tank. The ground waste is then subjected to repeated cycles of vacuum/ozone injection for an amount of time necessary to complete the bacteriological decontamination process. At this point, the treated waste products can be unloaded into plastic bags and disposed as non-hazardous waste. The decontaminated end product can then follow the normal disposal path of urban waste, and is suitable for processing with any other standard waste product.

Microbiological studies

To evaluate the ability of the BOX-O₃ to disinfect infectious medical waste, microbiological test was done on laboratory waste contaminated with a variety of bacterial strains from culture collection, medical waste alone, and medical waste contaminated with *Bacillus subtilis* collected from the infectious disease ward of Kyushu-university hospital (Fukuoka, Japan). The strains used were *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Enterococcus faecium* ATCC6569, and *Candida albicans* JCM2085/ATCC2698. *Bacillus subtilis* is commonly used in Japan for evaluating the ability of an alternative technology to disinfect infectious medical waste⁷⁾. A 100 mL (5 test tubes containing 20 mL each) bacterial suspension consisting of 10⁸ to 10⁹ colony forming units (CFU)/mL was added to waste in a container. The mean bacterial load of the waste was measured immediately after shredding and ozone treatment. Three samples of 10~20 g were recovered at random from three different places in the bulk ground, then transferred to

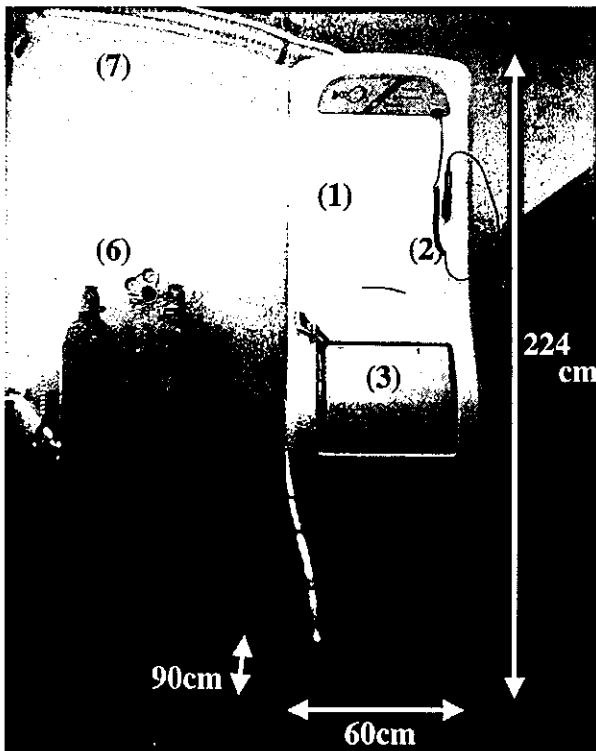


Fig. 1. General configuration of the BOX-O₃. (1) Ozone generator, accumulation tank and neutralizer, (2) Bar code reader, (3) Loading door and rotating lock, (4) Grinder, (5) Waste tank, (6) Compressed air, (7) Vacuum pump.

sterile beakers. A sample of 5 g from the sterile beaker was transferred to a sterile polypropylene container containing 100 mL phosphate-buffer saline and 20 g of glass beads, using an aseptic technique, then shaken intensively for 45 seconds. The sample were diluted to 1 : 10 and 1 : 100 by the addition of phosphate-buffer-saline, then 200 μ L of these diluted samples were cultured at 37°C for 48 hr in a blood agar medium. For the measurement of the primary bacterial load, shredding alone was done without the boost additive and ozone treatment. Assays were done in triplicate. To verify reproducibility, the same experiment was repeated once a week for three weeks.

Results

In the present study, an accident such as wounds and infection by needles and sharp objects was not happened as those were collected separately in special plastic safety boxes and the tested medical wastes including safety boxes were deposited in the BOX-O₃ container. At the end of the cycle, the remaining scrap in the waste tank was unrecognizable without danger, and the contents were safely unloaded into plastic bags and disposed of.

Microbiological studies

Table 1 shows the primary mean bacterial load of the untreated laboratory waste contaminated with a variety of bacterial strains. In the present study, the detection limit was <2.0 log₁₀. Immediately after ozone treatment, all bacterial populations were reduced below the detection limit and decreased by at least 4 log₁₀. In testing of the sporicidal effect of BOX-O₃, a minimum reduction of 4 log₁₀ was observed in all assays performed.

Table 2 shows a comparison of the primary mean bacterial load of the untreated medical waste with and without *Bacillus subtilis* contamination. The primary mean bacterial load of the untreated medical waste alone was 3.8 log₁₀ CFU/g, with only normal flora observed (*Bacillus sp.*, *Corynebacterium sp.*). The primary mean bacterial load of the untreated medical waste contaminated with *Bacillus subtilis* (mean \pm S.E.; 4.5 \pm 0.1 log₁₀ CFU/g) was lower than that of the untreated laboratory waste contaminated with *Bacillus subtilis* (mean \pm S.E.; 6.6 \pm 0.1 log₁₀ CFU/g) (Table 1, 2), although 100 mL of *Bacillus subtilis* suspension at 2.45 \times 10⁸ CFU/mL was added. No bacterial populations were detected immediately after ozone treatment in either test.

Table 1 BOX-O₃ disinfection of laboratory waste contaminated with a variety of bacterial strains

	Primary bacterial load (Log ₁₀ CFU/g)	Logarithmic reduction
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	6.6 \pm 0.1	>4.6 \pm 0.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27835	6.2 \pm 0.3	>4.2 \pm 0.3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	7.0 \pm 0.5	>5.0 \pm 0.5
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569	6.2 \pm 0.2	>4.2 \pm 0.2
<i>Candida albicans</i> JCM 2085/ATCC 2698	6.8 \pm 0.2	>4.8 \pm 0.2

Variables expressed as mean \pm SE.
 CFU; colony forming units.
 ATCC; American Type Culture Collection.
 JCM; Japan Collection of Microorganisms

Table 2 BOX-O₃ disinfection of medical waste contaminated with and without *Bacillus subtilis*

	Primary bacterial load (Log ₁₀ CFU/g)	Logarithmic reduction
Medical waste alone	3.8 \pm 0.0	>1.8 \pm 0.0
Cultured bacterias from medical waste alone	• <i>Bacillus sp.</i> • <i>Corynebacterium sp.</i>	
Medical waste contaminated with <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	4.5 \pm 0.1	>2.5 \pm 0.1

Variables expressed as mean \pm SE.
 CFU; colony forming units.
 ATCC; American Type Culture Collection.

Discussion

The BOX-O₃ is a new apparatus especially designed for on-site treatment of infectious medical waste⁹⁾. The BOX-O₃ requires only limited space and is designed to be placed within a hospital ward. This safe and easy to use process can be employed by the nursing staff for assuring the briefest delays in the decontamination of bio-hazardous wastes. The BOX-O₃ would appeal to medical, laboratory, and research and development institute personnel, as well as to public and private health service providers concerned about improved hygiene.

Ozone is a powerful oxidizing agent that assures the complete and total disinfection of waste. Ozone inactivates microorganisms through its oxidizing action, with any residual ozone spontaneously decomposing into non-toxic oxygen. Various applications for ozone have been documented in the field of hygiene, especially in the field of the microbiological disinfection^{10~13)}.

The BOX-O₃ is suitable for the treatment of infectious waste, in particular for the disposal of potentially infected waste products such as syringes, needles, non-woven fabrics, and drip sets. Body parts, toxic chemicals and radioactive substances can not be treated.

Microbiological inactivation is defined as a bacterial population reduction of 99.99% in the Japanese guidelines for evaluation of the ability of a new apparatus to be used for disinfecting infectious waste⁷⁾. In the present study, a reduction of 99.99% for *Bacillus subtilis* was achieved. The primary bacterial load of the untreated medical waste was low, and no pathogenic bacteria were observed. Furthermore, the primary bacterial load of the untreated medical waste contaminated with *Bacillus subtilis* was lower than that of the laboratory waste contaminated with *Bacillus subtilis* (Table 1, 2), although 100 mL of *Bacillus subtilis* suspension at 2.45 × 10⁸ CFU/mL was added.

Since there were many used antibiotics bottles with a small quantity of liquid residues, used cotton and gauze soaked in disinfectant in the medical waste from the infectious ward, these may have decreased the bacterial load of the tested medical waste.

The main advantage of the BOX-O₃ is the ability to treat contaminated medical waste inside a hospital ward soon after it is collected. With on-site treatment, infection and environmental pollution by medical waste can be avoided because there is no need to be stored and transported as the infectious waste. Most infectious waste must to be carefully handled and must be incinerated in special incinerators. However, after treatment with the BOX-O₃, waste can be eliminated as non-hazardous waste in conventional incinerators. The total cost of this treatment is much lower than the cost of incineration of infectious waste¹⁴⁾.

In conclusion, the BOX-O₃ safely and efficiently treated infectious medical waste collected from hospital ward, indicating that the BOX-O₃ is an effective alternative technology for the treatment of infectious waste and for controlling hospital infection.

References

- 1) Rutala WA, Weber DJ: Infectious waste-mismatch between science and policy. *N Engle J Med* 1991; 325: 578-82.
- 2) Daschner FD, Dettenkofer M: Protecting the patient and the environment- new aspects and challenges in hospital infection control. *J Hosp Infect* 1997; 36: 7-15.
- 3) Rutala WA, Mayhall CG: Medical waste. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992; 13: 38-48.
- 4) Liss GM, Crimi C, Jaczek KH, Anderson A, Slattery B, D'Cunha C: Improper office disposal of needle and other sharps: an occupational hazard outside of health care institutions. *Can J Public Health* 1990; 81: 417-20.
- 5) Duff LB: The future of medical waste regulation: simplicity and consistency as goals. *Hosp Mater Manage* 1993; 14: 62-7.
- 6) Confer RM: Management and disposal of medical waste. *NJ Med* 1996; 93: 43-4.
- 7) Haishima Y: Alternative technologies on infectious waste treatment, and guidelines for evaluation on safety and efficacy of the alternative technologies. *Rinsho Byori (Suppl)* 2000; 112: 64-75, in Japanese.
- 8) Phillips G: Microbiological aspects of clinical waste. *J Hosp Infect* 1999; 41: 1-6.
- 9) Coronel B, Duroselle P, Behr H, Moskovtchenko JF, Freney J: In situ decontamination of medical wastes using oxidative agents: a 16-month study in a polyvalent intensive care unit. *J Hosp Infect* 2002; 50: 207-12.
- 10) Dyas A, Boughton BJ, Das BC: Ozone killing action against bacterial and fungal species; microbiological testing of a domestic ozone generator. *J Clin Pathol* 1983; 36: 1102-4.
- 11) Masaoka T, Kubota Y, Namiuchi S, Takubo T, Ueda T, Shibata H, *et al.*: Ozone decontamination of bioclean rooms. *Appl Environ Microbiol* 1982; 43: 509-13.
- 12) Kim JG, Yousef AE, Dave S: Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *J Food Prot* 1999; 62: 1071-87.
- 13) Baker KH, Hegarty JP, Redmond B, Reed NA, Herson DS : Effect of oxidizing disinfection (chlorine, monochloramine, and ozone) on *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 981-4.
- 14) Almuneef M, Memish ZA: Effective medical waste management: It can be done. *Am J Infect Control* 2003; 31: 188-92.

[連絡先 : Masayuki MURATA, *Environmental Medicine and Infectious Disease, Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences Kyushu University, 3-1-1 Maide, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8582, Japan.*]

Tob proteins suppress steroid hormone receptor-mediated transcriptional activation

Hisaya Kawate^a, Yin Wu^a, Keizo Ohnaka^a, Hajime Nawata^b, Ryoichi Takayanagi^{a,*}

^a Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

^b Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

Received 17 May 2004; received in revised form 10 October 2004; accepted 21 October 2004

Abstract

Although sex steroid hormones have significant effects on bone metabolism, the molecular mechanisms of these actions have not been fully elucidated yet. We examined the functional relationship between steroid hormone receptors and Tob, a member of an anti-proliferative protein family and a negative regulator of osteoblast proliferation and differentiation. Luciferase assay using promoters carrying hormone-responsive elements revealed that both Tob1 and Tob2 proteins but not PC3 suppressed steroid hormone receptor-dependent transcriptional activation in MC3T3-E1 osteoblastic cells. Mutated Tob proteins carrying amino acid substitutions at an LXXLL motif also showed the same degree of inhibition of the transcriptional activation as the wild type. By observation of androgen receptor (AR)-tagged with green fluorescent protein under a confocal laser scanning microscope, we found that Tob1 inhibits the nuclear foci formation of dihydrotestosterone-bound AR. These results indicate that Tob family proteins may negatively regulate sex steroid hormone action in bone formation.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Steroid hormone receptor; Osteoblast; GFP; LXXLL motif; Androgen

1. Introduction

Sex steroid hormones play important roles not only in the reproductive system but also in bone metabolism. It is well known that estrogen deficiency after menopause is the most important factor in osteoporosis development among women. Estrogen replacement is one of the major therapies for female postmenopausal osteoporosis. On the other hand, loss of androgen function also causes various abnormalities in bone metabolism (Hofbauer and Khosla, 1999; Manolagas et al., 2002). As well as ovariectomy, orchidectomized mice exhibited marked bone loss due to excessive bone resorption (Onoe et al., 2000). More recently, androgen receptor-deficient mice were generated and showed decreased bone volume with increased bone resorption (Yeh et al., 2002; Kawano et al., 2003).

In the last few years, the mechanism of steroid hormone action in a cell has been extensively studied at molecular level. After steroid hormones enter their target cells, these hormones bind to their specific receptors. Ligand-bound receptors change their conformation and regulate transcription by binding to hormone responsive elements located in regulatory regions of target genes. The effects of nuclear receptors on transcription are modulated by coregulator proteins, which enhance (coactivators) or reduce (corepressors) transactivation of target genes. Many of these coactivators possess histone acetylase activity, whereas corepressor complexes often contain histone deacetylase activity. Reversible acetylation of core histones modulates chromatin structure and regulates transcription. These coactivators commonly possess an LXXLL motif in their amino acid sequences through which they can interact with steroid hormone receptors. Introducing mutations in this motif abolished the function of these coactivators (Leo and Chen, 2000; Aranda and Pascual, 2001; Cheng et al., 2002; Heinlein and Chang, 2002).

* Corresponding author. Tel.: +81 92 6426913; fax: +81 92 6426940.
E-mail address: takayana@geriat.med.kyushu-u.ac.jp (R. Takayanagi).

Tob, which was originally discovered as a protein interacting with a membrane receptor c-erbB2, is a member of a functionally and structurally related protein family involved in negative control of the cell cycle (Matsuda et al., 1996; Ikematsu et al., 1999; Matsuda et al., 2001; Tirone, 2001). This family comprises six proteins; Tob1, Tob2, BTG1, BTG2/PC3/TIS21, ANA/BTG3 and PC3B. These proteins share a homology at N-terminal 120 amino acid residues. Anti-proliferating activity of Tob protein is regulated by phosphorylation of three serine residues (Ser152, 154 and 164) that are modified by Erk MAP Kinase. In quiescent cells, Tob1 blocks their proliferation by suppression of cyclin D1 expression. Growth signals activate Erk that phosphorylates Tob protein to lose its anti-proliferating activity, resulting in continuous expression of cyclin D1 and cell cycle progression (Maekawa et al., 2002; Suzuki et al., 2002; Yoshida et al., 2003).

It has been indicated that Tob member proteins would mainly act on transcription. These proteins have been shown to physically interact with Caf1, whose yeast homologue is involved in a transcription complex (Rouault et al., 1998; Ikematsu et al., 1999; Prevot et al., 2001). Furthermore, four of the Tob family proteins carry an LXXLL motif being common in coactivators for nuclear receptors. In fact, BTG1 and BTG2 modulate the estrogen receptor (ER)-mediated transcriptional activation through this LXXLL motif (Prevot et al., 2001).

Mice carrying a targeted deletion of the *Tob* gene have a greater bone mass resulting from increased numbers of osteoblasts. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), a member of the transforming growth factor-beta (TGF- β) superfamily, has been shown to control osteoblast proliferation and differentiation. BMP signals are mainly mediated by Smad proteins. In these Tob-deficient mice, BMP-2-induced osteoblast proliferation and differentiation was enhanced. Tob was shown to associate with receptor-regulated Smads (Smad1, 5 and 8), which are the mediators of BMP signals, and inhibit the signal transduction. These results indicate that Tob protein negatively regulates bone formation in vivo by repressing BMP-2-induced, Smad-mediated transcriptional activation (Yoshida et al., 2000).

In the present study, we investigated whether Tob expression influences steroid hormone receptor-dependent transcriptional activation in osteoblasts. Tob proteins suppressed the ligand-dependent transcriptional activation of steroid hormone receptors such as androgen receptor (AR) and estrogen receptor (ER) in osteoblastic cells. These results indicate that Tob proteins could regulate the action of steroid hormone in bone formation.

2. Materials and methods

2.1. Cells

MC3T3-E1 osteoblastic cells were obtained from Riken Cell Bank (Tokyo, Japan). Cells were maintained in α -

MEM (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cansera International Inc., Canada). COS-7 monkey kidney cells were maintained in DMEM (Invitrogen) with 10% FBS and PC3 prostatic carcinoma cells were maintained in RPMI-160 medium (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO).

2.2. Plasmid constructs

The firefly luciferase reporter plasmid, pGL3-MMTV (Tomura et al., 2001) and the expression vector for AR (pCMV-hAR) were prepared as previously described (Nakao et al., 1992; Adachi et al., 2000). The expression plasmid for human ER α (pSG5-ER α) and a reporter plasmid (pERE2-tk109-luc) were kindly provided by Dr. Shigeaki Kato (University of Tokyo, Japan). Plasmid vector expressing AR-GFP fusion protein, named pAR-GFP, was constructed as described previously (Tomura et al., 2001). A 644-bp fragment of 5'-flanking region of the prostate specific antigen (PSA) gene was amplified by KOD DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan) using a set of primers: PSAP-N (5'-aggtaccgaattccacattgtttgctgc-3') and PSAP-C (5'-tccgggtgcagggtgtaagcttgg-3'). The PCR-amplified fragment was digested with *Kpn*I and *Hind*III and cloned into pGL3-Basic vector (Promega Co., Madison, WI) and the resulting construct was named pGL3-PSA. Mouse CREB binding protein (CBP) expression vector (pcDNA/mCBP) was prepared as previously described (Miyagishi et al., 2000). TIF2 expression plasmid, pYFP-TIF2, was constructed as previously described (Saitoh et al., 2002).

The expression vectors for Tob proteins were prepared using the RT-PCR technique. As previously described (Ohnaka et al., 2001), cDNA was prepared from human osteoblasts using Superscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen). Tob1, Tob2 and PC3 cDNAs were amplified by Pfx DNA polymerase (Invitrogen) using each set of primers: Tob1-5E (5'-caggaatccggggagttgaaacct-3') and Tob1-3B (5'-caggatcccgggttagccataacagg-3') for Tob1, Tob2-5E (5'-caggaattccaaggctgtacacgtgc-3') and Tob2-3B (5'-caggatcccgggttgccagcaccacg-3') for Tob2, and PC3-5E (5'-caggaattccaccgagacctca-3') and PC3-3B (5'-caggatcccgggttgagactgccatc-3') for PC3. The PCR-amplified fragments were digested with *Eco*RI and *Bam*HI and inserted into the cognate sites of pEYFP-C1 vector (BD Sciences Clontech, Palo Alto, CA). The resulting constructs were designated as pYFP-Tob1, pYFP-Tob2 and pYFP-PC3. To generate Tob1 LXXAA mutant, two leucine residues in the LXXLL motif of the Tob protein were replaced with alanines by using a Quikchange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). The validity of structure of the constructs was confirmed by DNA sequencing using an ABI PRISM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems Japan Ltd., Tokyo, Japan).

2.3. Immunoblotting

MC3T3-E1 cells were seeded in 60-mm plates and incubated for 24 h with 5% CO₂ at 37 °C. Plasmid DNAs carrying Tob family cDNAs were transfected into the cells. Twenty-four hours after transfection, cells were washed with PBS twice and 400 µl of NP-40 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl and 1% NP-40) was added to each dish, followed by rocking for 30 min at 4 °C. Lysates were collected and protein concentrations were measured using a BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). Forty micrograms of each lysate in 1× sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE sample buffer (2% SDS, 100 mM dithiothreitol, 60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.01% bromophenol blue) was loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel with wide range Color Marker (Sigma-Aldrich) and electrophoresis was performed at 20 mA for 4 h. Proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond ECL, Amersham Bioscience Corp., Piscataway, NJ) using a Hoefer miniVe unit (Amersham) at 250 V for 1 h at 25 °C. After the membrane was blocked in 1× Block-Ace (Dainippon Pharmaceutical Co., Osaka, Japan), anti-Tob1 mouse monoclonal antibody (IBL-Japan, Fujioka, Japan) or anti-GFP rabbit polyclonal antibody (sc-8334, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CL) was reacted with the membrane in 0.1× Block-Ace for 1 h at 25 °C. Following a brief wash with TBS-Tween 20 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.9% NaCl and 0.05% Tween 20), horseradish peroxidase-linked anti-mouse IgG (Amersham) or anti-rabbit IgG (Amersham) was added in 0.1× Block-Ace as a second antibody and then the membrane was incubated for 45 min at 25 °C. After being washed with TBS-Tween 20, the membrane was reacted with Western blotting detection reagents (Amersham) for 1 min in a dark room. The membrane was then exposed to a sheet of autoradiography film for 1 min and the film was developed and analyzed.

2.4. Functional reporter assay

MC3T3-E1 cells (7×10^4 cells/well), COS-7 cells (1×10^5 cells/well) or PC3 cells (1×10^5 cells/well) were seeded in 12-well plates 20 h before transfection. A reporter plasmid, pGL3-MMTV or pGL3-PSA (0.5 µg/well), and 3 ng/well of pRL-CMV (Promega) as an internal control were cotransfected with 0.1 µg/well of pCMV-hAR and 0.1 or 0.3 µg of the Tob expression plasmid using 2.7 µl/well of Superfect Transfection Reagent (Qiagen K. K., Tokyo, Japan). For ER transcription assay, 0.1 µg/well of pSG5-ERα and 0.1 or 0.3 µg of the Tob expression vector were cotransfected with 0.5 µg of pERE2-tk109-luc as a reporter and 3 ng of pRL-CMV as an internal control. For CBP or TIF2 transfection, 0.1 or 0.3 µg of pcDNA/mCBP or 0.5 µg of pYFP-TIF2 was used for each well. In all transfection experiments, the total amount of transfected DNA was fixed by adding empty vector into the transfection mixture. At 3 h post-transfection, 0.5 ml

of medium containing 10% charcoal-treated fetal bovine serum was added with or without steroid hormones. At 24 h post-transfection, cells were rinsed with PBS and lysed in the lysis buffer of a luciferase assay kit (Promega). The luciferase activity was assayed using a Dual-Luciferase Assay System (Promega Corp., Madison, WI) and Lumat LB 9507 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Data were presented as mean ± S.D. One-way analysis of variance followed by Scheffe's test was used for multigroup comparisons. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

2.5. Coimmunoprecipitation

COS-7 cells (7×10^5 cells/dish) were seeded in 60-mm plates 24 h before transfection. Cells were transfected with 2 µg of plasmids expressing Tob and/or AR and maintained with or without 10^{-8} M of DHT for 24 h with 5% CO₂ at 37 °C. The whole cell extracts were prepared by incubating the cells in 0.3 ml of the NP-40 lysis buffer for 30 min at 4 °C, followed by brief sonication and a centrifugation. Protein concentrations were measured using a BCA protein assay kit (Pierce) and each protein concentration was adjusted to 1 mg/ml. Each lysate (160 µg) was incubated with 3 µg of anti-Tob antibody (IBL-Japan) at 4 °C for 1 h in the NP-40 lysis buffer and further incubated with 25 µl of Protein G Magnetic Beads (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) for 1 h at 4 °C. Beads were collected by a magnet and then proteins were eluted in 1× SDS-PAGE sample buffer and subjected to 10% SDS-PAGE. Immunoblotting analysis was performed essentially as previously described (Ohnaka et al., 2001).

2.6. Confocal laser scanning microscopy

MC3T3-E1 cells (2×10^5 cells/dish) were cultured in 35-mm glass-bottom dishes (Asahi Techno Glass Corp., Tokyo, Japan) and transfected with 0.5 µg of pAR-GFP and 1.5–2.5 µg of pYFP-Tob1 using 10 µl/well of Superfect Transfection Reagent. The cells were maintained in α-MEM supplemented with 10% charcoal-treated FBS for 16–20 h and then various steroid hormones were added into the medium.

The cells were observed with an LSM 510 META invert confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss Co. Ltd., Jena, Germany) using a 100×, 1.4 numerical aperture oil immersion objective. Images were collected at a 12-bit depth resolution of intensities over 1024×1024 pixels. For excitation of GFP and YFP, 488 nm of argon laser was employed and these two emission signals were separated using the emission fingerprinting technique established by Carl Zeiss. Separation of individual emission signals was based on recording of a spectral signature of each emission signal and a digital unmixing procedure using the reference spectra.

3. Results

3.1. Suppression of steroid hormone receptor-mediated transcriptional activation by Tob protein

We investigated whether Tob family proteins modulate the function of steroid hormone receptors in osteoblasts because some of Tob family proteins have one or two copies of an LXXLL motif that is commonly found in interaction domains of coactivators for nuclear receptors (Fig. 1). To examine whether expression of the Tob family proteins influences the transcriptional activation mediated by steroid hormone receptors, cotransfection of AR and Tob expression plasmids was performed with the MMTV-luciferase reporter gene into MC3T3-E1 osteoblastic cells. Expression of Tob family proteins in the transfected cells was confirmed by immunoblotting using anti-Tob1 and anti-GFP antibodies (Fig. 2A). We first examined an effect of Tob1 expression on transactivation mediated by endogenous AR protein, however, ligand-induced increase of luciferase activity was not evident and no significant change of the transactivation was observed by expressing the Tob protein (Fig. 2B). In the wild type AR-transfected cells, remarkable transcriptional activation was observed in the presence of dihydrotestosterone (DHT). Tob1 and Tob2 proteins suppressed this DHT-induced transcriptional activation mediated by AR in MC3T3-E1 cells, whereas expression of PC3 had no effect on the transcriptional activation in spite of carrying two LXXLL motifs (Fig. 2B). As well as AR, transcriptional activation mediated by ER α was also repressed by Tob proteins (Fig. 2C). These Tob1-induced repressions for the steroid hormone receptor-mediated transactivation were also observed in case of different cells (PC3 and COS-7 cells) and a different promoter (PSA promoter) (Fig. 3).

3.2. An LXXLL motif of Tob1 protein is not critical for suppression of AR-mediated transactivation

To investigate whether the suppression of transcriptional activation was elicited through an LXXLL motif in the Tob1

protein, we constructed a Tob1 mutant carrying amino acid substitutions in this motif (LXXAA). As shown in Fig. 4, this Tob1 LXXAA mutant caused the same level of suppression of AR-mediated transactivation as the wild type. This result indicates that the LXXLL motif in the Tob1 protein is not crucial to the suppression of the AR-mediated transactivation. We also found an LXXII motif in the N-terminus of the Tob1 protein, which was known as an interaction domain of some nuclear receptor corepressors (Hu and Lazar, 1999). However, no significant effects were observed by introduction of mutations (LXXAA) at the LXXII motif (data not shown).

3.3. Suppression of the AR-mediated transactivation by Tob was not recovered by overexpression of CBP and TIF2

Several transcriptional coactivators were shown to be commonly involved in various transcriptional factor complexes, and the presence of a competition between these transcription complexes for limited amounts of the coactivators in a cell has been reported (Kamei et al., 1996). CBP/p300 is known to be such a common coactivator. If the Tob protein would extract CBP/p300 from the AR-mediated transactivation function complex, supplementation of the CBP protein might recover from the suppression by the Tob protein. To examine this possibility, CBP was coexpressed with Tob and AR in MC3T3-E1 cells. As shown in Fig. 5A, CBP promoted the AR-mediated transactivation dose-dependently. However, overexpression of the CBP protein had little effect on suppression of AR-mediated transcriptional activation by Tob. We also supplemented another common coactivator protein, TIF2, and no recovery from the suppression was observed (Fig. 5B).

3.4. Immunoprecipitation of Tob protein with AR

To test for a physical interaction between Tob1 and AR, immunoprecipitation was performed using anti-Tob1 antibody. In the cells expressing both AR and Tob1, AR protein

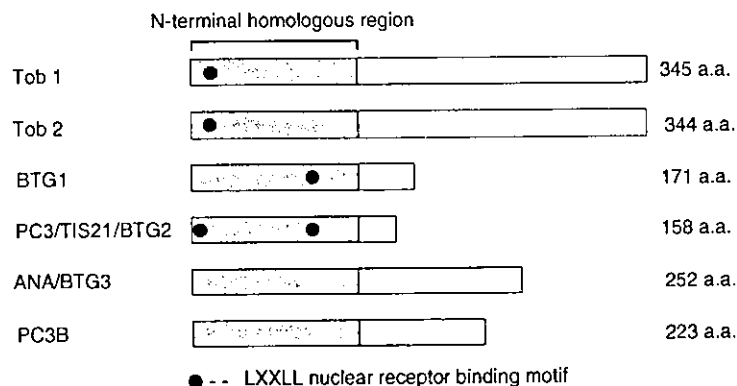


Fig. 1. Schematic representation of Tob family proteins. Six Tob family proteins share homology at the N-terminal region (gray). Filled circles represent LXXLL motifs that are noticed as interaction domains of nuclear receptor coregulators.

was clearly precipitated in the presence and absence of a ligand (Fig. 6, lanes 1–2). However, if Tob protein was not introduced into the cells, only a faint AR band was detected (Fig. 6, lane 3). The small amount of AR might be precipitated with endogenous Tob protein. These results indicate the direct interaction between Tob1 and AR and suggest that a

protein-protein interaction between Tob and AR contributes to the repression of AR-mediated transcriptional activation.

3.5. Effect of Tob1 expression on formation of subnuclear AR foci

We previously reported that ligand-bound AR was translocated from cytoplasm to nucleus and formed subnuclear foci. This foci formation of AR correlated with AR-mediated transcriptional activation (Tomura et al., 2001; Saitoh et al., 2002). To examine the effect of Tob on the AR foci formation, we observed intracellular localization of the Tob protein. In MC3T3-E1 cells, Tob1 and Tob2 proteins were localized in both nucleus and cytoplasm. Signal strength of Tob1 in the nucleus is higher than that in the cytoplasm, whereas the cytoplasmic signal is dominant in terms of Tob2 (Fig. 7). When the YFP vector, carrying only a YFP cDNA, and pAR-GFP were transfected into MC3T3-E1 cells, AR signal was detected in the cytoplasm before adding DHT (Fig. 8A and C). After the treatment with DHT, AR formed fine foci in the nucleus (Fig. 8D and F). On the other hand, a markedly reduced number of nuclear foci (Fig. 8G and I) or even no foci (Fig. 8J and L) were observed in the DHT-treated MC3T3-E1 cells when both AR-GFP and YFP-Tob1 were cotransfected. No significant change was observed in the intracellular distribution of YFP-Tob1 before and after the addition of DHT. The inhibition of the AR foci formation by Tob1 was well consistent with the suppression of the AR-mediated transactivation function by Tob1 assessed by the luciferase reporter assay.

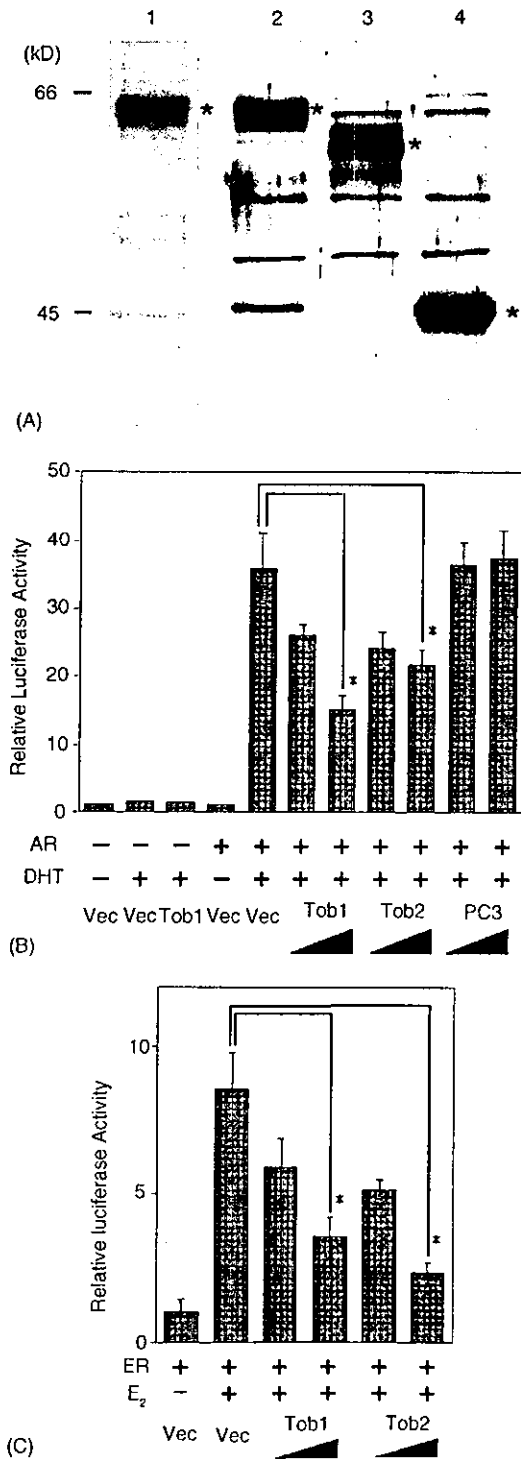


Fig. 2. Tob proteins suppress AR- and ER α -mediated transcriptional activation in osteoblastic cells. (A) Immunoblot analysis of human Tob family-YFP fusion proteins. Cell lysates were collected from MC3T3-E1 cells transfected with the expression vectors for Tob family proteins fused with YFP and were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (lanes 1 and 2, YFP-Tob1; lane 3, YFP-Tob2; lane 4, YFP-PC3). After proteins were transferred onto the nitrocellulose membrane, anti-Tob1 (lane 1) or anti-GFP (lanes 2–4) antibody was reacted with each membrane for detection of the fusion proteins. Asterisks (*) indicate the YFP fusion protein of each Tob family protein. Positions of protein size markers are shown on the left. (B) Suppression of AR-mediated transcriptional activation by Tob proteins. MC3T3-E1 osteoblastic cells were transfected with 0.1 μ g of the AR expression vector, 0.1 or 0.3 μ g of the Tob1, Tob2, PC3 expression vector, or the empty vector (Vec), 0.5 μ g of pGL3-MMTV and 3 ng of pRL-CMV. The cells were cultured in the absence (–) or presence (+) of 10^{-8} M DHT for 24 h and the luciferase activities were measured. Left three bars show the results of cells without being transfected with the AR expression vector. Bars show the fold change in the luciferase activity relative to the value by the wild type AR without DHT. The average of three independent experiments is shown with the standard deviation. * $P < 0.05$. (C) Suppression of ER α -mediated transcriptional activation by the Tob protein. MC3T3-E1 cells were cotransfected with 0.1 μ g of pSG5-ER α , 0.1 or 0.3 μ g of the pYFP-Tob1, pYFP-Tob2 or the empty vector (Vec), 0.5 μ g of pERE2-tk109-luc as a reporter plasmid and 3 ng of pRL-CMV as an internal control. Three hours after transfection, 10^{-6} M estradiol (E₂) was added. Luciferase activity was measured after 24 h incubation. Relative luciferase activity is shown. Bars show the fold change in the luciferase activity relative to the value without the ligand. The mean values and the standard deviation from three independent experiments are shown. * $P < 0.05$.