

## ウシおよびニワトリの初代培養肝細胞における 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(TCDD)による CYP1A 遺伝子の発現と ethoxyresorufin-*O*-deethylase(EROD)活性の変動

山中典子<sup>1</sup>、グルゲ・キールティ・シリ<sup>1</sup>、宮崎茂<sup>1</sup>、窪田宜之<sup>2</sup>、元井霞子<sup>3</sup>

1. 独立行政法人 農業技術研究機構 動物衛生研究所安全性研究部、2. 同研究所免疫研究部

3. 独立行政法人 農業生物資源研究所

広く環境を汚染しているダイオキシン類が家畜の体内に入れば、畜産物を通じて人の健康に直接影響するだけでなく、畜産廃棄物あるいは堆肥による環境の再汚染の可能性も考えられる。しかし、実験動物の場合と異なり、ダイオキシン類の家畜体内での代謝動態は不詳である。そこで、我々は牛および鶏の初代培養肝細胞系を用いて・TCDD によって誘導される Cytochrome P-4501A 群(CYP1A)について mRNA レベルおよび酵素活性レベルで解析した。生後 4 日から 14 日のホルスタイン雄子牛から肝細胞を分離、無血清培養を行った。鶏については生後約 2 か月の PDL-1 系雄性ニワトリから細胞を得、同じく無血清で、分離から培養開始 24 時間まで、誘導性一酸化窒素阻害剤である N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine methylester hydrochloride を添加して培養した。これらの培養系に培養開始 24 時間で 100fM から 100pM の TCDD を添加し、さらに 24 時間後に牛ではマウス、人、羊とのホモロジーをもとに RT-PCR 断片をクローニングし、部分的な配列を得た CYP1A1・鶏では CYP1A4(X99453)および CYP1A5(X99454)について RT-PCR で mRNA の変動を半定量するとともに、CYP1 群の酵素活性を表す EROD 活性をプレート内の反応で蛍光検出した。結果として、牛では TCDD 添加肝細胞において 100fM という極低用量においても CYP1A1 が誘導されることがわかった。EROD 活性測定の結果も同様に低用量から誘導が観察され、牛肝実質細胞の誘導能はラットなど他の哺乳類に匹敵するものであることが示唆された。鶏では CYP1A4 および CYP1A5 が TCDD 誘導性分子として知られており、mRNA、EROD 活性ともに低用量から誘導された。また、孵化後 2 ヶ月齢の鶏肝細胞では、これまでの鶏胚による結果に比べ、誘導能が約 2 倍高いことも明らかになった。

### Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on gene expression of CYP1As and ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in the primary cultured hepatocytes from cattle and chicken.

Noriko YAMANAKA<sup>1</sup>, Keerthi Sir GURUGE<sup>1</sup>, Shigeru MIYAZAKI<sup>1</sup>, Takayuki KUBOTA<sup>2</sup>, Yoshiko MOTO<sup>3</sup>

1. Department of Safety Research, National Institute of Animal Health, JAPAN, 2. Department of Immunology National Institute of Animal Health, JAPAN, 3. National Institute of Agrobiological Science, JAPAN

Dioxins can affect human health through farm products and environmental contamination by livestock industry waste. However, dioxin metabolism of domestic animals is still unclear. Therefore we investigated about effects on gene expression and enzyme activity of CYP1As by TCDD using bovine and chicken primary cultured hepatocytes.

Bovine and chicken hepatocytes were cultured by serum-free methods. Inducible nitrogen oxide inhibitor was employed in the early process of chicken hepatocytes culture. After 24 h culture hepatocytes were added TCDD (from 100 fM to 100 pM) and incubated for another 24 h. Then RT-PCR and fluorescent EROD activity assay were performed. The partial sequence of bovine CYP1A1 was obtained by cloning based on the homology among murine, human and sheep CYP1A1. RT-PCR analysis revealed that bovine CYP1A1 were responsible in the very low level of TCDD. EROD activities were also inducible and the induction ability was compared with that of rat. Chicken hepatocytes were induced CYP1A4 (X99453) and CYP1A5 (X99454) gene expressions and EROD activities with low level of TCDD. Induction level was approximately two times higher than that of chicken embryo hepatocytes.