

## 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)による薬物代謝酵素の変動

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

昨年の本学会において、筆者らは牛および鶏の初代培養肝細胞系を用いて、Cytochrome P-450(CYP)1A群について mRNA レベルおよび酵素活性レベルで解析し、TCDD 曝露によりこれらの酵素にごく低用量から用量依存的な誘導が観察されることを発表した。齧歯類やヒトでは、他の CYP 分子種や Glutathione S-transferases (GSTs) などについても TCDD による誘導が起こることが報告されているので、今回はこれらについて解析した。ウシでは CYP2B についてウサギとのホモロジーをもとに RT-PCR 断片をクローニングし、部分的な配列を得てこれを用いるとともに、配列が既知である GST $\alpha$ 、 $\mu$ 、 $\pi$  について、ニワトリでは CYP2H1、GST $\alpha$ 、 $\mu$  について検討した。24 時間初代無血清培養したそれぞれの種の肝実質細胞に酵素誘導剤である sodium phenobarbital および 3-methylcholanthrene を添加し、さらに数日間培養して mRNA 量の変動と各種 CYP および GST に相当する酵素活性の変動を観察した。また、同様に 100fM から 100pM の TCDD を 7 日間作用させてこれに対する応答を検討した。結果として、5 日から 6 日間誘導剤を作用させると、ウシでは CYP2B および GST  $\alpha$ 、 $\mu$ 、 $\pi$  の誘導が、鶏では CYP2H および GST $\alpha$ 、 $\mu$  の誘導が観察され、この培養系がこれらの酵素に関しても誘導能を保持していることが証明された。一方どちらの動物種においても、TCDD を 7 日間曝露した場合には、24 時間の曝露で 100fM、1pM という低用量から誘導が観察された CYP1A 群と異なり、誘導がみられないか、高用量域でのみ誘導が観察されることが明らかになった。このような誘導能の違いは生体における TCDD に対するそれぞれの酵素の応答能とほぼ対応しているものと考えられる。

### Changes of gene expression and activity of several biotransformation enzymes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the primary cultured hepatocytes from cattle and chicken.

Noriko YAMANAKA<sup>1</sup>, Keerthi Siri GURUGE<sup>1</sup>, Takayuki KUBOTA<sup>2</sup>, Shigeru MIYAZAKI<sup>1</sup>

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

Authors previously reported that primary cultured hepatocytes from cattle and chicken were sensitive to response against TCDD exposure both in gene expression and enzyme activity levels in the dose dependent manner. It was reported that the other biotransformation enzymes such as CYP isozymes and/or Glutathione S-transferases (GST) isozymes were also induced by TCDD in rodents and human liver. We here demonstrated the changes of these enzymes in these primary culture systems by molecular biological and biochemical methods. Bovine and chicken hepatocytes were cultured primarily by serum-free methods. After 24 h culture hepatocytes were added with enzyme inducers, sodium phenobarbital and/or 3-methylcholanthrene, or TCDD (from 100 fM to 100 pM) and incubated for several days. Then RT-PCRs were performed for bovine GST $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$  and chicken CYP2H1, GST $\alpha$  and  $\mu$ . A novel bovine CYP2B, of which partial sequence was obtained by cloning based on the homology among rat, human and rabbit CYP2B, was also analysed. Moreover, the enzyme activities for CYPs and GSTs were measured. When the inducers were exposed for 5 or 6 days bovine and chicken CYPs and GSTs were significantly increased. These results indicated that primary cultured bovine and chicken hepatocytes maintains the inducibility of these biotransformation enzymes. While seven days exposure caused CYPs and GST induction only in the highest TCDD level. It might be reflected differences of inducibility among individual enzymes *in vivo*.