

〔原著〕 植物エストロゲンおよび内分泌攪乱物質の
精子形成への影響評価に対する DNA
マイクロアレイを用いた判定法の開発

足 達 哲 也^{1,2)} 櫻 井 健 一²⁾ 深 田 秀 樹³⁾
小宮山 政 敏²⁾ 芝 山 孝 子^{1,2)} 井 口 泰 泉^{1,4)}
森 千 里^{1,2)}

(2001年2月1日受付, 2001年2月15日受理)

要 旨

植物エストロゲンであるゲニステイン (Gen), 合成女性ホルモンであるジェチルスチルベステロール (DES), または容器コーティング剤として用いられる Bisphenol A (BPA) をマウス新生仔期に投与することによって, 生殖能を有する時期での精巣において発現が変化する遺伝子を cDNA マイクロアレイ法を用いて検索した。また同時に従来の精巣機能および精子形成評価を合わせて行った。

DES を 50 μ g/mouse/day, Gen を 1mg/mouse/day, または BPA を 0.2mg/mouse/day を, 生後すぐから ICR 雄性マウスに 5 日間皮下投与を行った。3 か月後に体重, 精子数, 精子運動能, 精巣重量を測定した。また精巣から RNA を調製し, cDNA マイクロアレイ法にて非投与群に対して発現に差のあるものを検索した。

DES 投与群において精子数, 精子運動能, 精巣相対重量は対照群に比して有意に低値を示した。また BPA 投与群では精子数, 精子運動能が有意に低値を示した。しかしながら, Gen 投与群では精子数, 精子運動能, 精巣相対重量に対照群に比して有意な差は認めなかった。各化学物質曝露によって精巣で発現に差の生じた遺伝子は, マウス cDNA クローン約 8800 種のうち, DES では 34 種, Gen では 38 種, BPA では 12 種が見い出された。

これら結果から, 内分泌攪乱物質曝露によって発現変化を引き起こす遺伝子を cDNA マイクロアレイ法を用い多数の遺伝子について一挙に解析することができた。Gen では従来の判定法で変化を認めないにも関わらず, 発現変化する遺伝子が存在することが明らかとなった。このことからこれらの遺伝子を内分泌攪乱物質曝露のマーカーとして利用できると考えている。

Key words: 植物エストロゲン, 内分泌攪乱物質, 精子形成, バイオマーカー, DNA マイクロアレイ

略語一覧: DES: ジェチルスチルベステロール,
Gen: ゲニステイン,
BPA: ビスフェノール A

¹⁾ 科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業 (内分泌かく乱物質研究グループ), ²⁾ 千葉大学医学部解剖学第一講座, ³⁾ 深田生命科学研究所, ⁴⁾ 岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所統合バイオサイエンスセンター
Tetsuya Adachi^{1,2)}, Kenichi Sakurai²⁾, Hideki Fukata³⁾, Masatoshi Komiyama²⁾, Takako Shibayama^{1,2)}, Taisen Iguchi^{1,4)} and Chisato Mori^{1,2)}: A DNA microarray analysis for the effect of spermatogenesis to phytoestrogen and endocrine disruptors in mice.

¹⁾ Core Research for Evolutional Science of Technology (CREST), Japan Science and Technology Corporation (JST), Kawaguchi 332-0012, ²⁾ Department of Anatomy and Cell Biology, School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670, ³⁾ Fukata Institute of Life Science, Himeji 670-0082, ⁴⁾ Department of Bioenvironmental Research, Center for Integrative Bioscience, Okazaki National Research Institute, Okazaki 444-8585.

Received February 1, 2001, Accepted February 15, 2001.

I. 緒 言

近年体内のホルモン作用を乱す化学物質が多数報告されてきており、それらを内分泌攪乱物質と呼ぶ。これらの化学物質は性ホルモン特にエストロゲン作用や抗アンドロゲン作用を有することが多い。

植物エストロゲン (Phytoestrogen) はマメ科の植物に多く含まれるイソフラボン類[1]で、成人では前立腺癌の抑制などの効果が認められている[2]。一方で、マメ科の植物であるクローバーを餌としていたオーストラリアの家畜の産仔数が激減したり、胎仔奇形などが起こるクローバー病が報告されている[3]。合成エストロゲンであるジェチルスチルベステロール (Diethylstilbestrol ; DES) は流産抑制薬の目的で1960~70年代に多用された結果、胎児に影響を及ぼしたという報告がある[4-6]。ビスフェノール A (Bisphenol A) は容器等のコーティング剤として用いられてきた物質であり、低いながらエストロゲン活性を有することが知られている[7]。Iguchi は妊娠サルへのビスフェノール A の投与を行うと胎児へ移行することを示している[8]。これらの報告から、内分泌攪乱物質は母体から胎児へ移行し、動物の発生期にエストロゲン様物質の曝露を受けることによって、その後の成長に悪影響を及ぼす可能性がある。

エストロゲン受容体に関するレポーター解析が様々な化学物質で行われ、化学物質のエストラジオールに対する活性比が報告されている[9]。植

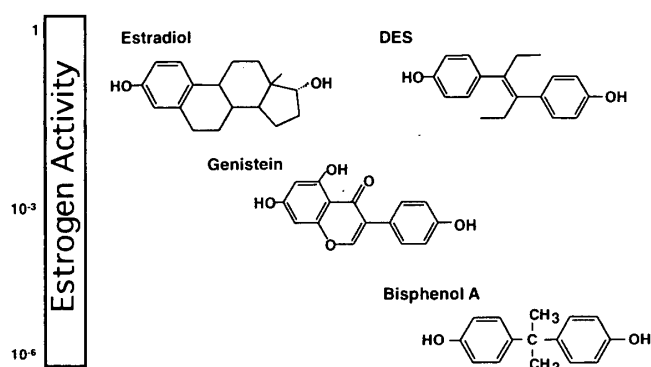


図1 エストロゲン受容体のレポーター解析によるエストロゲン活性の評価
Nishihara の報告 [9] より引用

物エストロゲンのひとつであるゲニステインは図1に示すように、合成女性ホルモンのDESの1/100であるが、容器のコーティング剤として用いられてきていたビスフェノール A の10倍のエストロゲン活性を有することから、ゲニステインは比較的高いエストロゲン作用を有する物質である。

男性生殖系の中心である精巣は化学物質の影響を受けやすい器官のひとつであることが知られており、特に化学物質曝露が胎生期あるいは新生期に起こると精巣成熟の遅延や精子形成不全を引き起こすことが認められてきた。精巣および精子に対して、内分泌攪乱物質を含めた各種毒性を判定する方法として精巣重量、副生殖器重量および精巣組織像などが、また精子に関しては数、運動率や奇形率、さらには出生子数などの妊孕性が評価の基準となっている。しかしながら、この判定法では評価結果を得るのに時間を要するとともに、化学物質曝露での多岐にわたる影響に関して見出すことは不可能である。このようなことから、これら従来の評価方法に加えて化学物質曝露によって起こる生体反応 (バイオマーカー) 検索も必要となってきた。特にこれら内分泌攪乱物質曝露において、新生期の急性毒性的な影響以外に、生殖能を有する時期における影響の指標検索が必要であるため、本研究では生後3ヶ月のマウスを用いた。

近年、このような内分泌攪乱物質曝露など各種毒性のセントラルドグマにおける上流をとらえる手段として、ゲノム機能研究が盛んに行われるようになってきた (図2) [10]。この中でトランスクリプトーム (Transcriptome) に注目することによって毒性を評価することが重要と考えられて

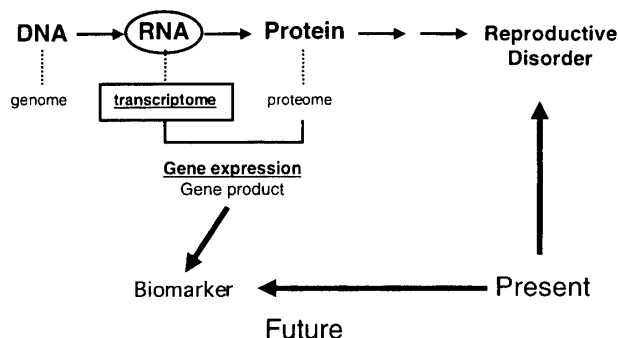


図2 ゲノム機能研究の流れ
田中の報告 [10] より引用

きている [10]。トランスクリプトームはゲノムの配列から mRNA 発現プロファイルとして機能し、その後プロテオーム（タンパク質発現プロファイル）に情報が伝達されることから、トランスクリプトームがゲノム機能研究の中心に位置し、ゲノムネットワーク機能解析に適していると考えられている（図2）。このトランスクリプトームの視点から多数の遺伝子について検索する技術として最近 cDNA マイクロアレイ法が近年用いられてきている [11, 12]。

cDNA マイクロアレイ法とは、固相基盤（スライドガラスなど）上に多数の異なる cDNA プローブを高密度に固定（8000～10000 種類の cDNA を固定）した後、標識したターゲットとなる核酸をハイブリダイズさせ、各々のプローブからのシグナルを自動検出器で検出して、そのデータをコンピュータで大量解析する方法である。mRNA 発現を評価する場合、この mRNA から逆転写反応により蛍光標識を取り込ませたターゲット cDNA をハイブリダイズさせて蛍光イメージアナライザーにて 2 種類の蛍光の有無あるいは強度の違いから発現量を評価するものである（図3） [13]。cDNA マイクロアレイ法はこのような原理であることから、数多くの遺伝子を同時にかつ迅速に解析できるシステムとして注目されている。近年では癌などの疾病の研究において、遺伝子のプロファイリングがなされてきており、各種診断にも用いられつつある。

本研究では、植物エストロゲンおよび内分泌攪乱物質の影響のうち、新生期における曝露の生殖能を有する時期（生後3ヶ月）での精子形成への影響を、トランスクリプトームの視点から判定する方法を開発していくことを目標とした。この開発技術として cDNA マイクロアレイ法を用いた解析について報告する。

II. 対象および方法

実験モデル動物

実験モデル動物として ICR 雄性マウス（Japan SLC, Hamamatsu, Japan）を用いた。ゲニステイン（Genistein; Wako, Osaka, Japan）、ジェチルスチルベストロール（Diethylstilbestrol; DES, Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan）、ビスフェノール A（Bisphenol A; Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan）の3種について、生後すぐのマウスに5日間皮下投与し（ゲニステイン; 1mg/mouse/day, DES; 50 μ g/mouse/day, ビスフェノール A; 0.2mg/mouse/day）、各対照群にはそれぞれ溶媒だけを5日間皮下投与した（各 $n=8$ ） [14, 15]。本研究での各化学物質投与量は、ゲニステインは我々の以前の調査（未発表）で1日に摂取される量を、DES およびビスフェノール A は我々の以前の調査（未発表）で、精子数減少、精子運動能の低下を認めた量をもとに設定した。また投与期間に関しては、マウスに

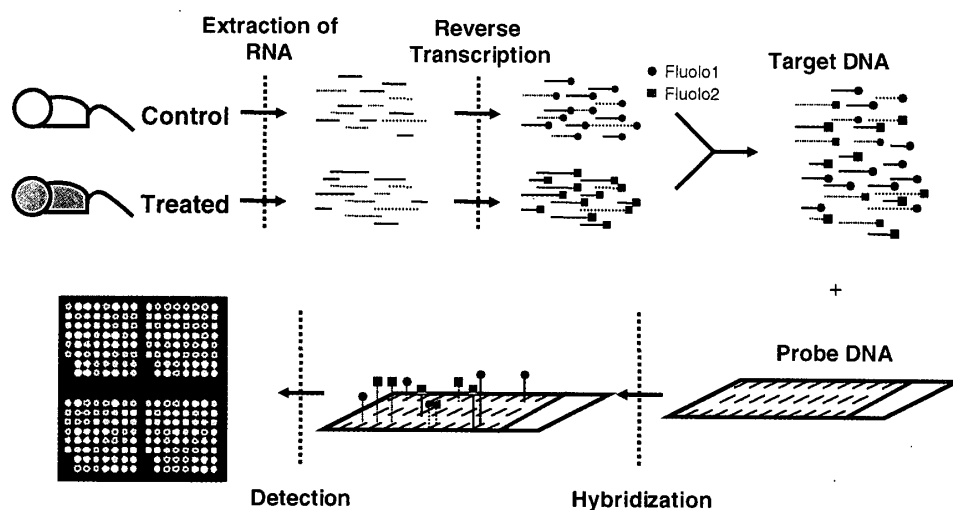


図3 DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の解析の流れ
関らの報告 [13] より引用

おける生後から5日間はヒトにおける胎児期終期にあたるのが我々の以前の検討(未発表)で得られているので、ヒトにおける胎児曝露のモデルとして今回の系を設定した。溶媒は、ゲニステインにはオリーブオイル(Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan), DESにはセサミオイル(Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan)を用いた。ビスフェノールAはまず99.9%エタノールに溶解後、溶解液:蒸留水:オリーブオイル=1:1:3の割合で乳化したものを投与した。餌はDESおよびビスフェノールA投与マウスはCE-2(Crea Japan, Osaka, Japan)を、ゲニステイン投与マウスは表1の組成のものを与えた。温度23~25℃, 湿度45~55%, 昼夜サイクルを昼8:00~20:00, 夜を20:00~8:00, 先に示した餌を自由摂食, 水は水道水を自由摂水の環境で飼育した。

表1 ゲニステイン投与マウスの餌の組成

	組成(% wt/wt)
コーンスターチ	45.5
カゼイン	24.5
グラニュー糖	10.0
コーンオイル	6.0
セルロースパウダー	5.0
アルファ化デンプン	1.0
ビタミンミクスチャー	1.0
ミネラルミクスチャー	7.0

体重あたりの精巣重量, 精子数および精子運動能の測定

飼育後3か月に上述マウスの体重, 精巣重量, 精子数および精子運動能を測定した。マウスの体重を測定後, 精巣を摘出し, 精巣重量を測定し, 精巣相対重量は体重に対する百分率(%)で表した。精子数はIkegawaらの方法[16]を一部変法して測定した。精巣上体尾部を37℃に保温した0.5mlのMedium199(Gibco BRL, New York, US)(4mg/ml BSA, 1mg/ml Glucose, 55μg/ml Sodium pyruvate, 2.5mg/ml Sodium lactate, 50μg/ml Streptomycin, 50units/ml Penicillin)中で細切し, ナイロンメッシュにて濾過後, その濾液を精子原液とした。この精子原液を精液測定チャンバー(Sp*ace-P; Kitazato Supply, Fujinomiya, Japan)に入れ, 顕微鏡下で観察した。

Ozakiらの報告[17]を参考に1mlあたりの精子数として示した。精子運動能はMitsukawaらの方法[18]に準じ, 顕微鏡下で接岸マイクロメータの0.1mmを1分間に横切った精子数を測定した。単位はME/min(ME; motile efficiency)として表した。

cDNA マイクロアレイ

摘出した精巣よりRNAを調製し, cDNAを合成した。cDNA合成の際にRNAを3匹分を混ぜ合わせて作製した。対照群にCy3, 投与群にCy5の蛍光ラベルしcDNAマイクロアレイ(マウスcDNA 約8800種 Mouse GEM I; Incyte, California, US)にハイブリダイゼーションさせた。内部標準で標準化を行ったのち, データ処理を行った。

データ解析

投与群-対照群間の体重, 精巣相対重量, 精子数および精子運動能の比較はStudents' t-testを行い, 5%以下をもって有意差とした。

III. 結 果

化学物質投与における精子数, 精子運動能, 体重当たりの精巣相対重量

各化学物質曝露において従来の精巣機能および精子形成の評価法として用いられている, 精子数, 精子運動能, 体重当たりの精巣相対重量を測定した。その結果を示したのが表2である。DES投与においては3ヶ月後で有意に精子数の減少, 精子運動能の低下および精巣相対重量の低下した。またビスフェノールA投与群でも有意に精子数の減少および精子運動能の低下した。しかしながら, ゲニステイン投与群では精子数, 精子運動能, 精巣相対重量に対照群に比して有意な差は認めなかった(表2)。

cDNA マイクロアレイを用いた化学物質投与における発現遺伝子のプロットおよび発現変化した遺伝子数について

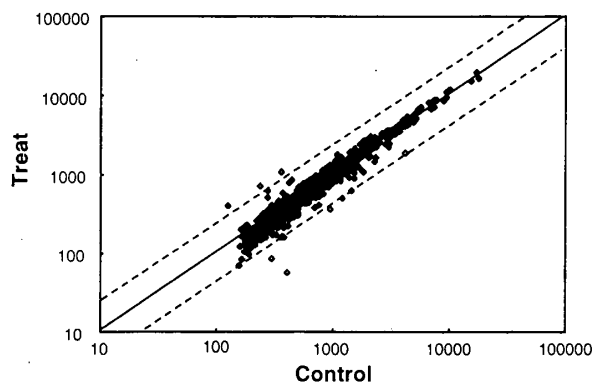
マイクロアレイにハイブリダイズさせた後の蛍光強度について, 縦軸をゲニステイン, DESお

表2 精子数, 精子運動能および精巣相対重量

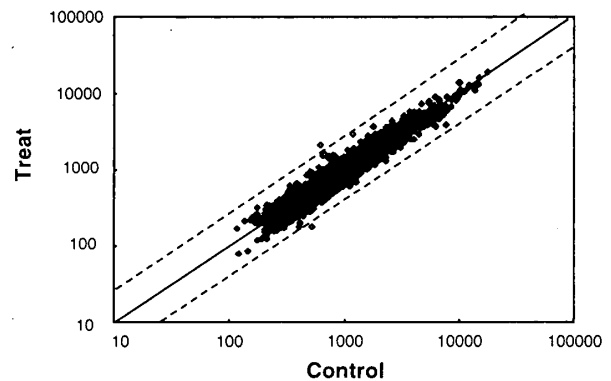
	精子数 ($\times 10^6/\text{ml}$)	精子運動能 (ME/min)	精巣相対重量 (% Body Weight)
ゲニステイン			
対照群	106 $\pm$ 6	39 $\pm$ 6	0.51 $\pm$ 0.03
投与群 (1mg/mouse/day)	93 $\pm$ 10	40 $\pm$ 3	0.59 $\pm$ 0.06
DES			
対照群	48 $\pm$ 3	245 $\pm$ 20	0.62 $\pm$ 0.02
投与群 (50 μg /mouse/day)	24 $\pm$ 8**	46 $\pm$ 20**	0.44 $\pm$ 0.02**
ビスフェノール A			
対照群	61 $\pm$ 3	89 $\pm$ 6	0.59 $\pm$ 0.03
投与群 (200 μg /mouse/day)	45 $\pm$ 4*	66 $\pm$ 4*	0.61 $\pm$ 0.03

それぞれの対照に対する有意差, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

(1) Genistein



(3) Bisphenol A



(2) DES

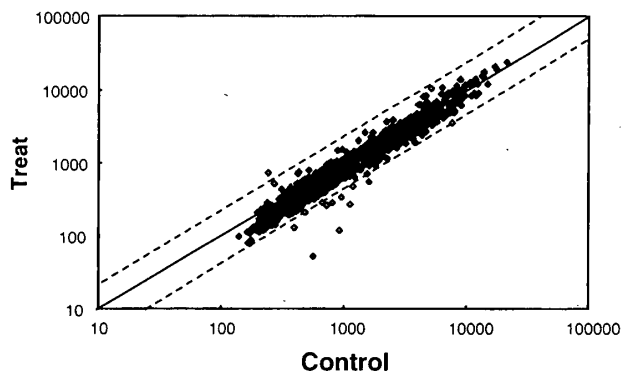


図4 マイクロアレイにハイブリダイズさせた後の蛍光強度のプロット

縦軸を(1)ゲニステイン, (2)DESおよび(3)ビスフェノールA投与群, 横軸をそれぞれの対照群として対数プロットで表した。対角線は発現比が投与群:対照群=1:1である。対角線から左上および右下の破線はそれぞれ発現比が投与群:対照群=2:1および1:2であり, この直線から左上あるいは右下にある遺伝子に関して発現に変化を認めたものとした。

およびビスフェノール A 投与群, 横軸をそれぞれの対照群として対数プロットしたものが図4である。対角線は発現比が投与群:対照群=1:1である。対角線から左上および右下の直線はそれぞれ発現比が投与群:対照群=2:1および1:2であり, この直線から左上あるいは右下にある遺伝子に関して発現に変化を認めたものとした。

この結果から, 投与群の対照群に対する発現比が2以上の遺伝子の数はゲニステイン曝露で3種, DES曝露で2種, ビスフェノール A 曝露で9種が認められた。また投与群の対照群に対する発現比が0.5以下の遺伝子の数はゲニステイン曝露で35種, DES曝露で32種, ビスフェノール A 曝露で3種が認められた(表3)。

表3 発現変化した遺伝子数

	ゲニステイン	DES	ビスフェノール A
解析遺伝子数	8,738	8,934	8,738
投与群 / 対照群 ≥ 2.0	3	2	9
投与群 / 対照群 ≤ 0.5	35	32	3
発現差を認めなかったもの	7,129	8,133	8,622
発現感度以下のもの	1,571	767	104

ハイブリダイズの蛍光強度値200以上のものについて、「投与群 / 対照群 ≥ 2.0 」は対照群の発現に対する投与群の発現比が2以上の遺伝子の数を、「投与群 / 対照群 ≥ 0.5 」は対照群の発現に対する投与群の発現比が0.5以下の遺伝子の数を示した。「発現差を認めなかったもの」は対照群の発現に対する投与群の発現比が0.5以上2以下のものを示した。「発現感度以下のもの」はハイブリダイズの蛍光強度値200未満のものを示した。

IV. 考 察

本研究では新生仔期マウスにゲニステイン、DES あるいはビスフェノールAを曝露して精巣への影響を検討した。精巣の機能を検討するために本研究では、精子数、精子運動能および精巣相対重量を測定した。DES 投与では体重あたりの精子数の減少、精子運動能の低下および精巣相対重量の低下が有意に認められた。またビスフェノールAでも精子数の減少および精子運動能の低下が有意に認められた。しかしながら、ゲニステイン投与では精子数、精子運動能および精巣相対重量に有意な差を認めなかった。このことから、新生仔期1mg/mouse/dayのゲニステイン曝露は精子数、精子運動能および精巣相対重量に影響を及ぼさないことが示唆された。

一方で、cDNA マイクロアレイの検討から、投与群の対照群に対する発現比が2以上の遺伝子の数はゲニステイン曝露群で3種、DES 曝露群で2種、ビスフェノールA曝露群で9種が認められ、また投与群の対照群に対する発現比が0.5以下の遺伝子の数はゲニステイン曝露群で35種、DES 曝露群で32種、ビスフェノールA 曝露群で3種が認められた。またこれら発現変化した遺伝子に関して、ゲニステイン曝露群とDES 曝露群の両方で発現が減少した遺伝子は7種認められた (Gene Bank Accession No. AA172346, AA174521, AA174789, AA204588, AA426942, AI594957, AI604485)。これら遺伝子は EST

(Expression Sequence Tag) として登録されているものであるので、遺伝子産物およびその機能に関しては今後の検討が必要であるが、ゲニステイン曝露群ではDES 曝露群と比較的類似した遺伝子発現変化を引き起こすことが示唆された。しかしながら、ビスフェノールA 曝露群にゲニステインおよびDES 曝露群と発現変化した遺伝子に共通するものは認められなかった。この結果から、今回用いた cDNA マイクロアレイでは、ビスフェノールA 曝露においてはゲニステインおよびDES 曝露とは発現変化を引き起こす遺伝子群が異なることが示唆された。

以上の結果から、植物エストロゲンであるゲニステインを新生仔期に化学物質を曝露することによって、生殖能を有する時期で従来の精巣機能および精子形成の評価法では影響を認めなかったが、今回 cDNA マイクロアレイ法を用いた検討によって発現が変化する遺伝子の存在が認められ、これら変化した遺伝子群はDES 曝露群のものと共通するものも認められた。この発現変化による具体的な影響に関しては今後の検討課題であるが、発現変化が認められる遺伝子が精巣機能や精子形成に何らかの影響を及ぼす場合には、従来の方法で見落としていた影響に関しても遺伝子発現レベルで見つけられる可能性が考えられる。このような新しい先行指標を見つけることができれば、化学物質曝露の診断も可能となり、曝露に対しての早期発見に役立つものと考えている。

また一方で、ビスフェノールA 曝露では精子

数および精子運動能の低下を引き起こすにも関わらず、発現変化した遺伝子に関してはDES曝露群と共通したものは認められなかった。このことから、従来の方法で見い出される影響は化学物質により遺伝子発現のプロファイルが異なることが示唆され、曝露される化学物質によって遺伝子発現のプロファイルのパターンニングをすることが可能であると考えられる。

DNAマイクロアレイは一挙に多数の遺伝子を解析することのできるツールである。細胞内情報伝達経路での遺伝子発現解析[19]や、医薬品の作用[20]、癌などの患者の予後[21]に用いられている。また近年遺伝子多型(SNP)の解析にも多用されている[22, 23]。今回、cDNAマイクロアレイ法を用いることにより、植物エストロゲンや内分泌攪乱物質曝露によって遺伝子発現変化について一度に多数検討することができた。現在これら見い出された遺伝子に関してすべてが精巣機能および精子形成に影響しているかどうかは今後の研究を待たないといけないが、これら遺伝子が同定されることによって、内分泌攪乱物質曝露で発現変化の先行指標(マーカー)として将来利用することができる。これら遺伝子を固定化しcDNAマイクロアレイとして用いることにより、内分泌攪乱物質曝露の有無あるいは程度について一挙に解析することが可能となる。また人工合成を含めた生体内の生理作用が未知の化学物質が氾濫している現在において、このcDNAマイクロアレイ法を応用することで曝露のパターンニングが可能となり、将来実際の化学物質曝露に対しての診断材料として有効であると考えている。

謝 辞

本研究の一部は、厚生科学研究費、文部省科学研究費、科学技術庁振興調整費、クリタ水・環境科学振興財団、上原記念生命科学財団の助成にて行われたものである。

また、株式会社湧永製薬創薬研究所、牛島光保氏に多大な協力を得たことに感謝する。

SUMMARY

In this study, we examined the effect of neonatal exposure of genistein (Gen), diethylstilbestrol (DES) or bisphenol A (BPA), known as endocrine disruptors on testicular gene expression, using DNA microarray analysis. Male ICR mice, 1 day after birth, were used, and the mice were exposed to Gen (1mg/mouse/day), DES (50 µg/mouse/day) or BPA (0.2mg/mouse/day) for 5 days. The testicular RNA of 3-month-old mice was prepared, and the difference between the exposed and the nonexposed group of endocrine disruptors was determined using the DNA microarray method. The genes whose expression was changed with administration of Gen, DES or BPA are number 38, 34 and 12, respectively, in 8800 genes. Our results suggest that DNA microarray analysis is useful method by which a large number of the gene expression changes are simultaneously detected, and that neonatal exposure of endocrine disruptors causes a number of changes in gene expression in the testes of adult mice.

文 献

- 1) Price KR, Fenwick GR. Naturally occurring oestrogens in foods - A review. Food Addit Contam 1985; 2: 73-106.
- 2) Bingham SA, Atkinson C, Liggins J, Bluck L, Coward A. Phyto-oestrogens: where are we now? Br J Nutr 1998; 79: 393-406.
- 3) Bennett HW, Underwood ET, Shier FL. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. Aust Vet J 1945; 22: 2-12.
- 4) Herbst AL, Robber SJ, Scully RE, Postanzer DC. Clear-cell adenocarcinoma of the vagina and cervix. Am J Obstet Gynecol 1974; 128: 43-50.
- 5) Newbold RR, Suzuki Y, McLachlan JA. Müllerian duct maintenance in heterotypic organ culture after in vivo exposure to diethylstilbestrol. Endocrinology 1984; 115: 1863-8.
- 6) Newbold RR, Suzuki Y, McLachlan JA. Müllerian remnants of male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. Teratog Carcinog Mutagen 1987; 7: 337-89.
- 7) Brontons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coating in food cans. Environ Health Perspect 1995; 103: 608-12.
- 8) Iguchi T. Personal communication 2000
- 9) Nishihara T. In vitro screening assay for endocrine disrupting chemicals. The 4th Princess Chulachorn International Congress

- 1999; 165-70.
- 10) 田中利男. トランスクリプトーム研究の現状と展望. 別冊ポストゲノム時代の実験講座 1. 細胞工学 2000; 22-4.
 - 11) Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-70.
 - 12) Fodor SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP, Adams CL. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 1993; 364: 555-6.
 - 13) 関直彦, 天野雅彦, 村松正明. DNA マイクロアレイの原理と種類. 別冊ゲノムサイエンスシリーズ 1. 細胞工学 2000; 13-25.
 - 14) Iguchi T, Takase M, Takasugi N. Development of vaginal adenosis-like lesions and uterine epithelial stratification in mice exposed perinatally to diethylstilbestrol. *Proc Soc Exp Biol Med* 1986; 181: 59-65.
 - 15) Welshons WV, Nagel SC, Thayer KA, Judy BM, Vom Saal FS. Low-dose bioactivity of xenoestrogens in animals: fetal exposure to low doses of methoxychlor and other xenoestrogens increases adult prostate size in mice. *Toxicol Ind Health* 1999; 15: 12-25.
 - 16) Ikegawa S, Hata J, Nakatomi K, Asaga H, Kaji M, Sugawara S, Uno H, Izawa Y. Collaborative work to determine the optimal administration period and parameters to detect drug effects on male rat fertility: study on estradiol benzoate effects. *J Toxicol Sci* 1995; 20: 251-63.
 - 17) Ozaki S, Ohkawa I, Katoh Y, Tajima T, Kimura M, Orikasa S. Study on producing rats with experimental testicular dysfunction and effects of mecobalamin. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1988; 91: 197-207.
 - 18) Mitsukawa S. A new method for determining sperm motility: the clinical application of sperm motile efficiency. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1979; 70: 1221-31.
 - 19) Fambrough D, McClure K, Kazlauskas A, Lander ES. Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of gene. *Cell* 1999; 97: 727-41.
 - 20) Marton MJ, DeRisi JL, Bennett HA, Iyer VR, Meyer MR, Roberts CJ, Stoughton R, Burchard J, Slade D, Dai H, Bassett DE Jr, Hartwell LH, Brown PO, Friend SH. Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nat Med* 1999; 4: 1293-301.
 - 21) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503-11.
 - 22) Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 1999; 22: 231-8.
 - 23) Halushka MK, Fan JB, Bentley K, Hsie L, Shen N, Weder A, Cooper R, Lipshutz R, Chakravarti A. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet* 1999; 22: 239-47.
-