

トキシコゲノミクス
—転写プロファイルからの化学物質影響解析—

渡 邊 肇

Toxicogenomics as a Tool for Evaluation of Chemical Effects

Hajime WATANABE

*National Institutes of Natural Sciences, Okazaki Institute for Integrative Bioscience,
5-1 Higashiyama, Myodaiji-cho, Okazaki City 444-8787, Japan*

(Received August 3, 2007)

Concern about the toxicity of chemicals released into the environment has been increasing recently. Many chemicals are suspected to have hazardous effects, but evaluation of their toxicity is still difficult and challenging. One of these difficulties is the presence of chemicals that are reported to have an adverse effect on organisms despite negative results in conventional toxicity tests. Thus, a new technique has been desired in order to evaluate the effects of chemicals. Recent advances in molecular biology have provided a technique for better understanding the responses of organisms to chemicals; this emerging field is known as toxicogenomics. Toxicogenomics is defined as an integration of genomics (transcriptomics, proteomics, metabolomics) and toxicology. For example, the DNA microarray can be used to explore the gene expression profiles (transcriptomics) of organisms in response to chemicals. Exposure to chemicals results in characteristic gene expression profiles, suggesting that the DNA microarray can be used to evaluate chemical effects. Toxicogenomics is also expected to be useful in gaining a mechanistic understanding of these effects. Although it still has some limitations, this technique can be developed to assess chemicals.

Key words—toxicogenomics; DNA microarray; chemical safety

1. はじめに

人類は長年に渡り化学物質の恩恵にあずかってきたが、一方で化学物質の生物に対する影響が懸念されるようになってきた。こうした化学物質の負の影響については、毒性学として長年研究が進められてきたが、この10年でその毒性に対する概念が大きく変化してきている。

従来の化学物質影響は、ヒ素、カドミウム、水銀などに代表されるような比較的均一な化学物質の大量曝露によって引き起こされる影響が懸念されていた。したがって化学物質影響に関する試験・評価も急性毒性試験を中心として、発がん性、生殖発生毒性など種々の毒性試験が確立されてきた。しかし、およそ10年前に提示された内分泌かく乱化学物質

問題に代表されるように、近年の化学物質に対する懸念はむしろ低用量で多種類の化学物質の影響に対する懸念が大きくなっている。またその影響についても、従来の毒性試験法では明確化し難く、生体システムのかく乱といった概念が生じてきた。これは、エンドポイントとしても従来の毒性とは異なるもので、種々の解析法や評価法が模索されるようになり、より鋭敏で的確な毒性影響評価が求められるようになってきている。

一方で、化学物質影響が懸念される生物種に対しても、その考え方が大きく変化しつつある。従来は、ヒトに対する化学物質影響の評価が中心であり、ラットを始めとする実験動物は単にヒトへの毒性評価のためのモデル動物として評価され、ヒトへの外挿が問題となっていた。しかし、近年になり地球環境の保護、生態系の保全などが重要な課題となり、化学物質影響についても単にヒトへの影響だけでなく、環境中の生物に対する影響を考慮する必要が生じてきた。日本においても遅ればせながら、新

自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター
(〒444-8787 岡崎市明大寺町東山 5-1)

e-mail: watanabe@nibb.ac.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウム S17 で発表したものを中心に記述したものである。

たな化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）が平成 16 年度から施行され、環境指標となる動植物への影響に着目した審査・規制制度や環境中への放出可能性を考慮した審査制度が導入された。しかし、環境中の動植物に対しては毒性試験法のみならず生物学的な理解もいまだ限られていることから、毒性の発現機序を明らかにしその毒性を予測するには、種々の知見の蓄積が必要となってきた。

こうした化学物質の種類や量、対象の生物種などに対してパラダイムシフトともいべき大きな変化が毒性評価において生じている中で、時期を同じくしてモデル生物を中心としてゲノム情報が急速に蓄積されてきた。¹⁾そして、このゲノム情報を効率的に生物学に応用する手法として DNA マイクロアレイが 1995 年に報告され、²⁾ゲノムを包括的に解析する分野としてゲノミクスが生じてきた。このゲノミクスは、生命科学の多くの分野に影響を及ぼしてきたが、毒性学の分野においても例外ではなく、毒性学（トキシコロジー）とゲノミクスを融合したトキシコゲノミクスという概念が形成された。

毒性のエンドポイントが発現する以前に遺伝子の発現レベルは変化しているために、トキシコゲノミクスを導入することにより網羅的に遺伝子発現を解析すれば、毒性発現に至る以前の兆候を遺伝子の発現レベルの変化として早期に鋭敏に捉えられるのではないかという期待がある。またこうした発現変化する遺伝子の機能を解析することにより、毒性の発現機序を明らかにし毒性の予見に役立てることが期待できる。

これは当初、ゲノミクス技術の中核をなしていた DNA マイクロアレイを用いた毒性評価として National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) が 1999 年に最初に提唱した。³⁾その後、ゲノミクスは DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトミクスのみならず、プロテオミクス、メタボノミクスなどを包括して定義されるようになったため、トキシコゲノミクスといった場合にも、プロテオミクス、メタボロミクスに基づく毒性学も含まれるようになってきている。

2. トランスクリプトミクス

トランスクリプトームの中核となる DNA マイクロアレイには様々なプラットフォームが開発されて

いるが、基本的には基板上の DNA にハイブリダイズした標識 RNA の蛍光強度を高性能スキャナを用いて読み取ることにより、個々の遺伝子の発現量を推定する。データ間のばらつきを補正するための標準化など^{4,5)}一連の操作を経たのちにデータの比較を行う。実験条件との相関、相違点を明確にするためには多変量解析⁶⁻⁸⁾が有用になるが、これらの手法についてはバイオインフォマティクスの対象としても様々な手法が開発されつつある。⁹⁾これらは単に統計的なアプローチだけでなく、遺伝子機能やゲノム情報を基に解析する手法なども考案されている。¹⁰⁾これらの手法を用いることにより、一定の現象に関連した遺伝子セットの抽出が可能となり (Fig. 1), これらの遺伝子の機能、制御機構などを明らかにすることにより、全体像を遺伝子レベルから明らかにすることが期待できる。

トランスクリプトーム解析においては、その検出に当たって相補的な核酸同士の水素結合を利用するという点で、物理化学的に他のオミクステクノロジーよりもはるかに均質な物質を対象としている。初期にはそれぞれの研究室が PCR により増幅した

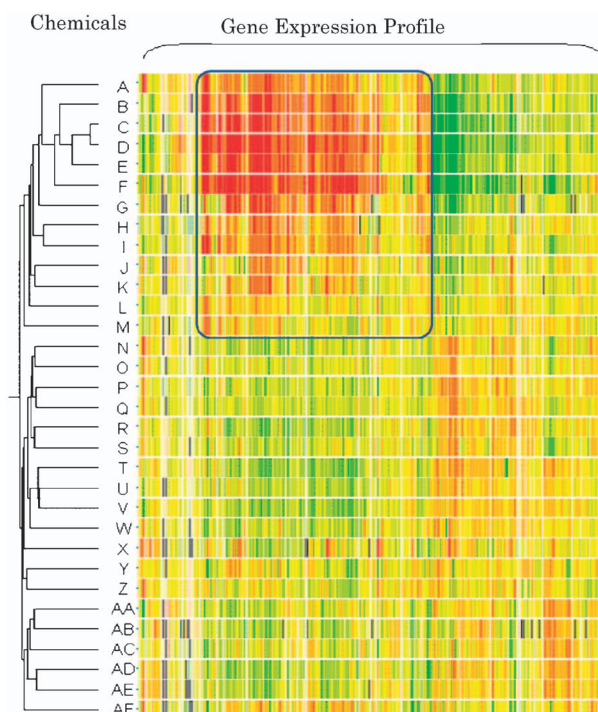


Fig. 1. Heat Map Generated from DNA Microarray Data Reflecting Gene Expression Changes after Chemical Exposure

Chemicals that have similar effect can be clustered based on the gene expression profile.

cDNA をスライドグラスにスポットするタイプも多く、その感度、信頼性などにも問題がみられたが、最近では DNA マイクロアレイの価格も下落し、モデル動物においては数万遺伝子を搭載した DNA マイクロアレイを比較的安価に入手できるようになりつつある。このために当初に比して比較的信頼性、再現性の高いデータの取得が可能となってきている。

トキシコゲノミクスにおけるトランスクリプトミクスは、主として2つの方向性を有している。1つはトキシコロジーに特徴的なもので、毒性影響を示す際のバイオマーカーの取得である。これは、個々の遺伝子そのものを遺伝子マーカーとして探索する場合と、遺伝子発現プロファイル全体を化学物質のフィンガープリントとして捉える場合がある。いずれの場合にも、生体からみた化学物質の影響をゲノミクスに基づいて高感度に検出・評価することを目指しており、リスク評価につなげようとする動きである。

もう1つはトランスクリプトミクスをベースとした毒性影響の発現に至るまでの分子メカニズムの解明である。これは遺伝子レベルでの変化に着目して解析することにより、化学物質影響を遺伝子レベルから解明を目指すものであり、他のオミクステクノロジーを取り込んだアプローチが進みつつある。

DNA マイクロアレイデータに関しては、プラットフォームが多岐に渡ることから、データの共有化のために Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) が提唱されているが、¹¹⁾ トキシコゲノミクスに関しては、さらに化学物質の曝露条件などが重要なパラメーターとなることから MIAME/Tox と呼ばれ、毒性評価のためのパラメーターなどを記載するドメインが加えられている。¹²⁾ また肝毒性を中心とした研究室間でのバリデーションなども行われており^{13,14)} データの標準化、共有が進みつつある。

3. プロテオミクス

実際に生体内での機能を担っているのはタンパク質であり、このタンパク質の発現・修飾状態を直接解析するプロテオミクス^{15,16)} も技術的に進展してきており、トキシコゲノミクスにおいてもアプローチが進みつつある。¹⁷⁾ トランスクリプトミクスで評価された mRNA 量と、実際に機能しているタンパク

質量とはかならずしも一致しないことも報告されており、¹⁸⁾ 直接細胞や組織の状態を知るために、タンパク質の状態を定量的に解析し、タンパク質の修飾を介したシグナル伝達などに関する情報も取得することが望まれる。プロテオミクスは、こうした実際に機能しているタンパク質の状態を解析できるという点でメリットがある。また直接タンパク質を解析することから、バイオマーカーを同定できる可能性を有している。¹⁷⁾

しかしプロテオミクスの場合、タンパク質の分離、同定においてトランスクリプトームよりもはるかに困難となっている。例えばタンパク質の分離において主要な手法の1つである二次元電気泳動法では可溶化剤(法)、分子量により解析できるタンパク質が制限されるだけでなく、検出できるダイナミックレンジの幅が狭いなど克服すべき問題も多く残っている。一方で二次元電気泳動法を利用せずに HPLC で分離・同定する方法¹⁹⁾ も進められており、MALDI-MS²⁰⁾ LC-MS²¹⁾ なども用いられているが、MS 解析のためのイオン化効率の問題もあり、どの程度網羅的に解析ができるのかについては注意が必要である。タンパク質のアノテーションについてはゲノム情報が十分得られる場合は、フィンガープリンティングパターンでの同定^{22,23)} が可能となるが、ゲノム情報が不十分な場合にはタンパク質の同定自体が困難になる場合もあり、特に後述のエコトキシコゲノミクスなど限られたゲノム情報しか持たない生物種への適用は困難を伴う。

4. メタボロミクス

上記のゲノム情報に依存したゲノミクスとは別に生体内の代謝産物をターゲットとした低分子化合物を対象としているのがメタボロミクスである。Nicholson (ロンドン大学インペリアルカレッジ) によって最初に提唱されたメタボロミクス (Metabolomics)²⁴⁾ は、NMR による分析^{25,26)} として報告されたが、その後さらに GC-MS²⁷⁾ や LC-MS²⁸⁾、CE-MS^{29,30)} を利用したプロファイリングなども利用されるようになってきている。

メタボロミクスは、トランスクリプトームやプロテオームと異なり直接的にゲノム情報に依存していないことを特徴としている。生体内の代謝産物は共通している分子も非常に多いことから、種を超えたデータの取得が可能である。これはメタボロミクス

の大きなアドバンテージであり、ゲノム情報の取得が不十分な生物種に対しても対応可能であり、異種間での比較が容易であることも大きな特徴となっている。したがって、目的とする分子、マーカーとなる分子を同定できればそのシグナルについて複数の生物種に渡って解析することも可能である。

またメタボロミクスはその時点の生体内の状態を反映しているという点で、トランスクリプトームよりも、より直接的な情報を得られる解析法といえる。しかし、これらの方法も分離方法、感度などに問題点を残しており、従来の報告はエネルギー代謝関連分子など比較的同定が容易で多量に存在する生体低分子についての解析が中心となっている。

5. エコトキシコゲノミクス

近年、環境への関心の高まりに伴い、環境中の生物への化学物質影響についても考慮されるようになってきている。改定された「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）」においては、生活環境動植物への影響評価が必要になっているが、こうした影響評価は、単純に増殖阻害濃度、半数致死濃度を重要なパラメーターとしている。こうした数値は、対象となる生物種が異なるとその関連性を見出すことが困難であり、その作用機序についても情報を得ることができない。こうした中で、トキシコゲノミクスと同様、バイオマーカーの探索、作用メカニズムの解析を目的として、環境毒理学（エコトキシコロジー）にゲノミクスを導入したエコトキシコゲノミクスが生じた。³¹⁻³³⁾ (Fig. 2) エコトキシコゲノミクスもトキシコゲノミクス同様に、トランスクリプトミクスのみならず、プロテオミクス、メタボノミクスを包括しているが、これら環境中の生物においてゲノミクスのアプローチを行う際に最も障害となるのは、ゲノム情報の欠如である。モデル生物のゲノム情報は急速に明らかにされてきているのに対して、その他の生物のゲノム情報はまだまだ限りがある。ナショナルプロジェクトのレベルでのゲノム情報の収集に関しては、サンガーセンター (<http://www.sanger.ac.uk/>) や The Institute for Genomic Research (TIGR) (<http://www.tigr.org/index.shtml>) などのゲノムセンターがモデル生物や病原菌などを中心に配列解析を進めデータベース化してきたが、米国においては、Department of Energy の Joint Genome Institute が中心と

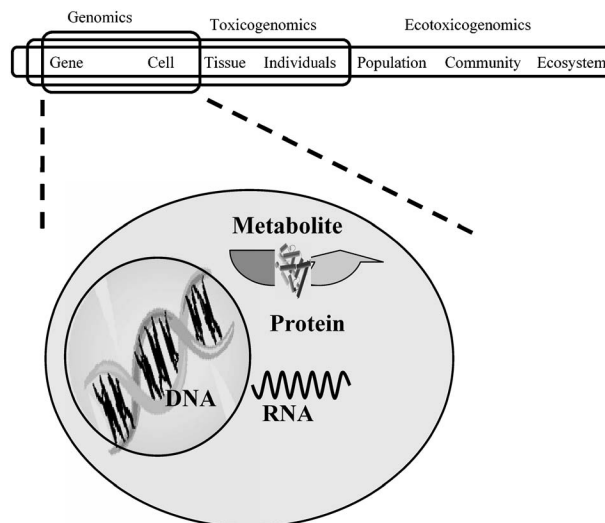


Fig. 2. Conceptual Frame Work of Ecotoxicogenomics

なって非常に多岐に渡る生物種のゲノム配列、EST配列の取得を行っている。これは、系統樹を構成する広範な生物種を対象としており、これらの情報が充実することで、より多様な生物種に対してゲノミクスのアプローチが可能になると思われる (http://genome.jgi-psf.org/tre_home.html)。

非モデル生物を対象としたトランスクリプトミクスについては、ゲノム情報の取得というボトルネックが存在するものの、技術的には確立されてきていることから、信頼性の高いデータを取得することが期待できる。環境中の化学物質影響などをゲノミクスで実際に評価できるかという問題に関しては、Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) や Environmental Protection Agency (EPA) を始めとして多くの国や機関で関心が持たれ、対象となる生物種や手法について討議されている。化学物質の環境への影響や生態系への影響を評価しようとする場合、対象となる生物種は非常に多岐に渡る。ゲノミクスのアプローチを展開するには、ランドマークとなるような適切な生物種を選択しアプローチを行うことが必要であろう。また種々の生物を用いたトランスクリプトミクスは、生態系全体に対する化学物質の負荷を評価する上でも重要であるのみならず、異種生物間で共通に存在している遺伝子ネットワークの発見など³⁴⁾ 基礎生物学的な貢献も大きい。さらには生物種間の共通性、相違点などを明らかにすることにより、ヒトを始めとする他種への生物への外挿も可能となり、リ

スク評価などにも利用できる可能性がある。

メタボロミクスについては、他のオミクスと異なり、ゲノム情報が直接は必要としない。一方で、主要な代謝産物などは、生物種を通してその多くが共通であることから、多くの生物種に対して、そのプロファイルを取得することが可能となる。この点で、メタボロミクスはゲノム情報が不足している環境中の生物に対しても今後適用範囲が広く期待できる技術の1つである。

一方、プロテオミクスについては、ゲノム情報が欠損している場合、アミノ酸配列を LC-MS/MS など新規に決定する必要がある上に、アミノ酸配列から遺伝子を同定することが必要になってくる。バイオマーカーとしてのなんらかの抗原の探索など目的を絞った利用方法以外は、克服すべき問題点が多く残されている。

エコトキシコゲノミクスでは、フィールドを含め多くの生物種が対象となり得るが、対象とする生物種については十分な注意が必要であろう。ラットなどにおいても遺伝的背景により化学物質に対する応答性が大きく異なることが知られているが、³⁴⁾ 遺伝的背景が明確でない非モデル生物については、遺伝子発現の差が特定の遺伝的集団によるものなのか、実際の曝露に起因するものなのかを明確にする必要があり、取得したデータの十分な解釈が必要となる。

6. データベース化とインフォマティクス

化学物質の多様性、対象となる生物の多様性（生物種のみならず、組織、発生発達段階などの差）を含めるとこうしたプロジェクトは非常に大規模となり、個々の研究室ですべてを行うことは不可能となっている。アメリカでは、National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) が中心となった National Center for Toxicogenomics が 2000 年に設立され、トランスクリプトミクスだけでなくプロテオミクスからのプロジェクトを進め Chemical Effects in Biological Systems (CEBS) の確立を目指している。^{36,37)} 国内では 2002 年から 2007 年まで国立医薬品食品生成研究所、医薬基盤研究所と製薬企業が参加しトキシコゲノムプロジェクトが実施されデータが蓄積された。

こうしたデータはいまだ非公開のものも多いが、トランスクリプトミクスの個々のデータについては、The National Center for Biotechnology Information

(NCBI)³⁷⁾ や The European Molecular Biology Laboratory (EMBL)³⁸⁾ などがそれぞれデータベースなどに加えて公開している (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>, <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>)。さらに、プロテオミクスでは、ジュネーブ大学などが中心となっている Swiss-Prot³⁹⁾ (<http://tw.expasy.org/>) が、メタボロミクスでは、ロンドン大学が Consortium for Metabonomic Toxicology (COMET) project を推進しておりデータの収集を行っている。⁴⁰⁾

一方、従来のトキシコロジーでは、通常のアレイデータに加え、毒性試験固有のデータセットが生じる。これには、化学物質の致死量を始め体重や組織重量、血圧や血液成分、病理組織学的な知見などが相当する。これはいわゆるフェノミクスともいうべきパラメーターの1つでもあるが、現在急速に増加しつつあるトキシコゲノミクスからのデータをこれら従来のトキシコロジーからのエンドポイントと有機的に結合させ理解することも重要な課題となっている (phenotype anchoring)。これにより、従来のトキシコロジーとゲノミクスの関連付けが期待されている。これは、トキシコロジーの観点から遺伝子機能の意味付けをするという点で、単なるバイオマーカーの探索よりもさらに進んだ毒性の評価と理解が可能になると思われる。

7. システムバイオロジーとしてのトキシコゲノミクス

化学物質曝露により生じたトランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスの莫大なデータを解析し意味付けをする (データマイニング) ためにバイオインフォマティクスの比重は非常に大きなものとなってきている。化学物質影響を解析する場合、その化学物質自体の物理化学的特性や吸収 (Absorption)、分布 (Distribution)、代謝 (Metabolism) 排泄 (Excretion) (ADMEs) の情報や誘起される悪影響や疾患との関連など、従来のトキシコロジーからの知見を有機的に結合させたデータベース化が必要であり、システムバイオロジーを包括したアプローチが重要となる。³⁵⁾ (Fig. 3)

一方、従来は、*in silico* の毒性評価といった場合に、純粋に定量構造活性相関 (quantitative structure-activity relationship; QSAR) を指していた。しかし、ゲノミクスに基づく影響評価では、種々の情

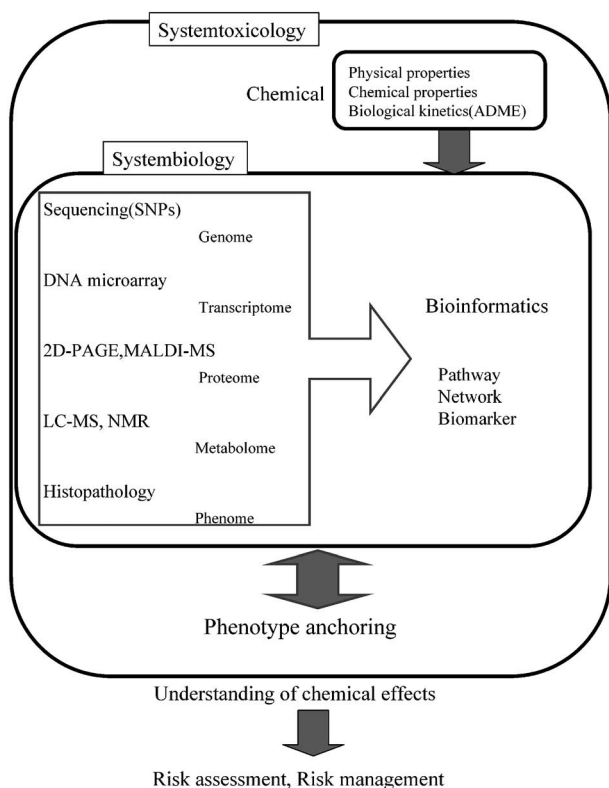


Fig. 3. Conceptual Frame Work of System Toxicology

報を統合したバーチャル組織を究極的には目指しており、新たな評価系の構築を目指している。⁴²⁾これは毒性影響評価の迅速化、実験動物の保護の観点などからも重要な課題である。

8. 今後の課題

予防的な観点からはトキシコゲノミクスの利用により、より早期に鋭敏な悪影響の評価が期待される。しかし一方で、曝露する化学物質が低濃度になれば、バックグラウンドの変動との差の検出が困難になり、より早期になればエンドポイントとの関連性が不明確になる。こうした問題を解決するためには、より高精度の手法の開発のみならず、対象の組織や細胞を的確に取得し解析するための技術も必要となる。レーザーダイセクション法による局所的な細胞の単離や極微量 RNA の増幅法などが開発されてきており、これらの信頼性・再現性を高めていくことも今後重要な課題である。

しかし DNA マイクロアレイで生命現象のすべてが分からないのと同様に、トキシコゲノミクスで毒性のすべてを理解し、説明することはできない。こうしたデータの蓄積と解釈に加えて、実際に生じている変化の実質的な理解が必須であろう。多数の化

学物質を曝露してゲノミクスのデータを多数取得するのみならず、変化したプロファイルの実体の解明が必要である。すなわちトランスクリプトームが変化した場合、その変化を担っている遺伝子発現制御因子の理解と化学物質から制御因子までのパスウェイの解明などが重要となる。酵母の場合、様々な遺伝子欠損変異株を用いて化学物質影響のプロファイルと比較することにより責任遺伝子の探索を行い、一定の成績を得ている。⁴³⁾ マウスなどにおいては、こうした欠損変異体の利用は通常困難であるが、化学物質の受け手となる生体分子の同定と解析はゲノミクスに限らず優先すべき課題である。

さらに重要な問題として、時間軸の問題がある。近年問題になってきているものの1つに胎児期や小児期の曝露影響が挙げられる。これは、胎児期、小児期における曝露影響が成熟したときに現れるのではないかという懸念である。こうした問題は、単に曝露した時点のゲノミクスのプロファイルを取得しているだけでは不十分であろう。後生的なゲノムの変化が化学物質によりどのように誘起されるかといったエピゲノミクスからのアプローチも必要になる。

9. おわりに

トキシコゲノミクスは非常にパワフルな毒性影響評価ツールとして期待できるが、毒性影響のどこまでを解析・評価できるかは未知の部分も多い。問題点を解決しながら、データを蓄積、解釈することによって、新たな知見が得られるものと思われる。

トランスジェニックマウスやノックアウトマウスは、遺伝子レベルで変調をかけることにより、遺伝子の機能を探ることができた。一方で、化学物質曝露の場合は、生体内の標的に関連した遺伝子の発現に変動を来す。トキシコゲノミクスを体系的に発展させることにより、単に化学物質影響評価のための新しい切り口となるのみならず、生体システムの解明などにも大きく寄与できると思われる。

REFERENCES

- 1) Lander E. S., Linton L. M., Birren B. *et al.*, *Nature*, **409**, 860–921 (2001).
- 2) Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O., *Science*, **270**, 467–470 (1995).
- 3) Nuwaysir E. F., Bittner M., Trent J., Barrett J. C., Afshari C. A., *Mol. Carcinog.*, **24**, 153–

- 159 (1999).
- 4) Irizarry R. A., Hobbs B., Collin F., Beazer-Barclay Y. D., Antonellis K. J., Scherf U., Speed T. P., *Biostatistics*, **4**, 249–264 (2003).
 - 5) Kim S. Y., Lee J. W., Bae J. S., *BMC Bioinformatics*, **7**, 134 (2006).
 - 6) Eisen M. B., Spellman P. T., Brown P. O., Botstein D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 14863–14868 (1998).
 - 7) Tamayo P., Slonim D., Mesirov J., Zhu Q., Kitareewan S., Dmitrovsky E., Lander E. S., Golub T. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 2907–2912 (1999).
 - 8) Kim D. W., Lee K. H., Lee D., *Bioinformatics*, **21**, 1927–1934 (2005).
 - 9) Draghici S., “Data analysis tools for DNA microarrays. Mathematical Biology and Medicine Series,” Chapman & Hall/CRC, London, 2003.
 - 10) Subramanian A., Tamayo P., Mootha V. K., Mukherjee S., Ebert B. L., Gillette M. A., Paulovich A., Pomeroy S. L., Golub T. R., Lander E. S., Mesirov J. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 15545–15550 (2005).
 - 11) Brazma A., Hingamp P., Quackenbush J., Sherlock G., Spellman P., Stoeckert C., Aach J., Ansorge W., Ball C. A., Causton H. C., Gaasterland T., Glenisson P., Holstege F. C., Kim I. F., Markowitz V., Matese J. C., Parkinson H., Robinson A., Sarkans U., Schulze-Kremer S., Stewart J., Taylor R., Vilo J., Vingron M., *Nat. Genet.*, **29**, 365–371 (2001).
 - 12) Bao W., Schmid J. E., Goetz A. K., Ren H., Dix D. J., *Reprod. Toxicol.*, **19**, 411–419 (2005).
 - 13) Ulrich R. G., Rockett J. C., Gibson G. G., Pettit S. D., *Environ. Health Perspect.*, **112**, 423–427 (2004).
 - 14) Waring J. F., Ulrich R. G., Flint N., Morfitt D., Kalkuhl A., Staedtler F., Lawton M., Beekman J. M., Suter L., *Environ. Health Perspect.*, **112**, 439–448 (2004).
 - 15) Wasinger V. C., Cordwell S. J., Cerpa-Poljak A., Yan J. X., Gooley A. A., Wilkins M. R., Duncan M. W., Harris R., Williams K. L., Humphery-Smith I., *Electrophoresis*, **16**, 1090–1094 (1995).
 - 16) Wilkins M. R., Pasquali C., Appel R. D., Ou K., Golaz O., Sanchez J. C., Yan J. X., Gooley A. A., Hughes G., Humphery-Smith I., Williams K. L., Hochstrasser D. F., *Biotechnology (N. Y.)*, **14**, 61–65 (1996).
 - 17) Merrick B. A., Tomer K. B., *Environ. Health Perspect.*, **111**, A578–579 (2003).
 - 18) Hegde P. S., White I. R., Debouck C., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 647–651 (2003).
 - 19) Opiteck G. J., Ramirez S. M., Jorgenson J. W., Moseley 3rd. M. A., *Anal. Biochem.*, **258**, 349–361 (1998).
 - 20) Karas M., Hillenkamp F., *Anal. Chem.*, **60**, 2299–2301 (1988).
 - 21) Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M., *Science*, **246**, 64–71 (1989).
 - 22) Henzel W. J., Billeci T. M., Stults J. T., Wong S. C., Grimley C., Watanabe C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 5011–5015 (1993).
 - 23) Burlingame A. L., Boyd R. K., Gaskell S. J., *Anal. Chem.*, **70**, 647R–716R (1998).
 - 24) Nicholson J. K., Lindon J. C., Holmes E., *Xenobiotica*, **29**, 1181–1189 (1999).
 - 25) Reo N. V., *Drug Chem. Toxicol.*, **25**, 375–382 (2002).
 - 26) Viant M. R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **310**, 943–948 (2003).
 - 27) Halket J. M., Przyborowska A., Stein S. E., Mallard W. G., Down S., Chalmers R. A., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 279–284 (1999).
 - 28) Ito T., van Kuilenburg A. B., Bootsma A. H., Haasnoot A. J., van Cruchten A., Wada Y., van Gennip A. H., *Clin. Chem.*, **46**, 445–452 (2000).
 - 29) Soga T., Ohashi Y., Ueno Y., Naraoka H., Tomita M., Nishioka T., *J. Proteome Res.*, **2**, 488–494 (2003).
 - 30) Tolstikov V. V., Lommen A., Nakanishi K., Tanaka N., Fiehn O., *Anal. Chem.*, **75**, 6737–6740 (2003).
 - 31) Snape J. R., Maund S. J., Pickford D. B., Hutchinson T. H., *Aquat. Toxicol.*, **67**, 143–154 (2004).
 - 32) Miracle A. L., Ankley G. T., *Reprod. Toxicol.*, **19**, 321–326 (2005).
 - 33) Iguchi T., Watanabe H., Katsu Y., *Environ. Health Perspect.*, **114** (Suppl 1), 101–105 (2006).
 - 34) Stuart J. M., Segal E., Koller D., Kim S. K.,

- Science*, **302**, 249–255 (2003).
- 35) Waters M., Boorman G., Bushel P., Cunningham M., Irwin R., Merrick A., Olden K., Paules R., Selkirk J., Stasiewicz S., Weis B., Van Houten B., Walker N., Tennant R., *EHP Toxicogenomics*, **111**, 15–28 (811–824) (2003).
- 36) Xirasagar S., Gustafson S. F., Huang C. C., Pan Q., Fostel J., Boyer P., Merrick B. A., Tomer K. B., Chan D. D., Yost 3rd. K. J., Choi D., Xiao N., Stasiewicz S., Bushel P., Waters M. D., *Bioinformatics*, **22**, 874–882 (2006).
- 37) Edgar R., Domrachev M., Lash A. E., *Nucleic Acids Res.*, **30**, 207–210 (2002).
- 38) Brazma A., Parkinson H., Sarkans U., Shojatalab M., Vilo J., Abeygunawardena N., Holloway E., Kapushesky M., Kemmeren P., Lara G. G., Oezcimen A., Rocca-Serra P., Sansone S. A., *Nucleic Acids Res.*, **31**, 68–71 (2003).
- 39) Bairoch A., Apweiler R., *Nucleic Acids Res.*, **28**, 45–48 (2000).
- 40) Lindon J. C., Nicholson J. K., Holmes E., Antti H., Bollard M. E., Keun H., Beckonert O., Ebbels T. M., Reily M. D., Robertson D., Stevens G. J., Luke P., Breau A. P., Cantor G. H., Bible R. H., Niederhauser U., Senn H., Schlotterbeck G., Sidemann U. G., Laursen S. M., Tymiak A., Car B. D., Lehman-McKeeman L., Colet J. M., Loukaci A., Thomas C., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **187**, 137–146 (2003).
- 41) Waters M. D., Fostel J. M., *Nat. Rev. Genet.*, **5**, 936–948 (2004).
- 42) Simon-Hettich B., Rothfuss A., Steger-Hartmann T., *Toxicology*, **224**, 156–162 (2006).
- 43) Hughes T. R., Marton M. J., Jones A. R., Roberts C. J., Stoughton R., Armour C. D., Bennett H. A., Coffey E., Dai H., He Y. D., Kidd M. J., King A. M., Meyer M. R., Slade D., Lum P. Y., Stepaniants S. B., Shoemaker D. D., Gachotte D., Chakraburttty K., Simon J., Bard M., Friend S. H., *Cell*, **102**, 109–126 (2000).