

4) *in vivo*反復投与毒性の構造活性相関による予測評価の展望

小野 敦

Perspective of predictive toxicity assessment of *in vivo* repeated dose toxicity using structural activity relationship

Atsushi Ono

Tens of thousands of existing chemicals have been widely used for manufacture, agriculture, household and other purposes in worldwide. Only approximately 10% of chemicals have been assessed for human health hazard. The health hazard assessment of residual large number of chemicals for which little or no information of their toxicity is available is urgently needed for public health. However, the conduct of traditional toxicity tests which involves using animals for all of these chemicals would be economically impractical and ethically unacceptable. (Quantitative) Structure-Activity Relationships [(Q)SARs] are expected as method to have the potential to estimate hazards of chemicals from their structure, while reducing time, cost and animal testing currently needed. Therefore, our studies have been focused on evaluation of available (Q)SAR systems for estimating *in vivo* repeated toxicity on the liver. The results from our preliminary analysis showed the distribution for LogP of the chemicals which have potential to induce liver toxicity was bell-shape and indicating the possibility to estimate liver toxicity of chemicals from their physicochemical property. We have developed (Q)SAR models to *in vivo* liver toxicity using three commercially available systems (DEREK, ADMEWorks and MultiCASE) as well as combinatorial use of publically available chemoinformatic tools (CDK, MOSS and WEKA). Distinct data-sets of the 28-day repeated dose toxicity test of new and existing chemicals evaluated in Japan were used for model development and performance test. The results that concordances of commercial systems and public tools were almost same which below 70% may suggest currently attainable knowledge of *in silico* estimation of complex biological process, though it possible to obtain complementary and enhanced performance by combining predictions from different programs. In future, the combinatorial application of *in silico* and *in vitro* tests might provide more accurate information which support regulatory decisions. At the same time, an appropriate strategy to use (Q)SAR for of the efficiency and accuracy in chemical management is necessary.

Keywords; Quantitative Structure-Activity Relationships, repeated dose toxicity, liver, existing chemicals, risk assessment

1. はじめに

現在、日本国内では約10万種もの化学物質が様々な用途で流通していると言われている。そのうち、医薬品や農薬など用途ごとに規制されている物質以外の一般化学

物質については、主に「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（以下「化審法」）により規制される。化審法では、新規の化学物質が製造・輸入される際には、物性（分解性・蓄積性）、人への毒性及び生態毒性について、それぞれ定められた試験による審査が行われており、人への毒性に関しては「細菌を用いる復帰突然変異試験」、「ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験またはマウスリンフォーマTK試験」及び「28日間反復毒性試験」の3種のスクリーニング毒性試験による安全性

To whom correspondence should be addressed:

Atsushi Ono: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1429; Fax: +81-3-3700-1408; E-mail: atsushi@nihs.go.jp

評価が実施されている。一方、昭和48年の化審法制定以前から流通していた化学物質（既存化学物質）については、国で必要な試験を実施して安全性評価を進めているが、我が国だけでも数万種の既存化学物質が流通しており、これまでに安全性評価が終了した化学物質はごく一部に過ぎず、残された既存化学物質は人への安全性について不明のまま流通している。それらの化学物質が直ちに問題を起すことはないとしても潜在的なリスクとなっており、国民の健康を守るためには早急な安全性の評価が望まれるが、数万種の化学物質について従来実施されている毒性試験を実施するのは必要となる費用や期間の面から現実的ではなく、特に動物試験については動物愛護の観点からもなるべく最小限に留める事が求められており、効率的で信頼性の高い新たな安全性評価手法の確立が望まれている。近年、既に毒性試験が実施されている構造類似物質の毒性情報から評価物質の毒性を類推するカテゴリーアプローチ、さらには、化学物質構造と毒性発現との相関から化学物質の毒性を予測する（定量的）構造活性相関（(Quantitative) Structure Activity Relationship）手法が解決策の一つとして期待されており、世界各国で検討が進められている¹⁾。化学物質の構造から毒性を予測することが出来れば、毒性試験未実施の化学物質についても安全管理が可能となり、毒性試験を必要とする化学物質の優先順位付けや絞り込みを行うことで効率的な安全性評価が可能となる。さらに将来的には、予測精度の向上により試験そのものがなくなる日も来るかもしれない。

2. 構造が類似する化学物質からの毒性予測

(Q)SARの基礎は「類似の構造をもつ化学物質は類似の生理活性を生じる」という概念である。医薬品開発のエキスパートは、化学構造から「既知の」薬効や物性をある程度推測出来るという話もあるが、毒性に関してはどうか？ Fig. 1に示す9種のクロロニトロベンゼンの同族体は、いずれも既存化学物質である。これらのうち物質4（2,4-ジクロロニトロベンゼン（CAS No. 611-06-3））については、既存点検による「ラットを用いた反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験」が実施されており、その結果、血液、腎臓、肝臓への障害が認められ、NOEL 8mg/kg/day未満と報告されている。また、物質2（1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン（CAS No. 89-61-2））については、既存点検による「ラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験」結果から雌の生殖に関するNOEL 20 mg/kg/dayと報告がある。物質1と3については、毒性試験は実施されていないが、物質1～4は化審法では区別されておらず、ジクロロニトロベンゼンとしていずれも第2種監視物質に指定されている。一

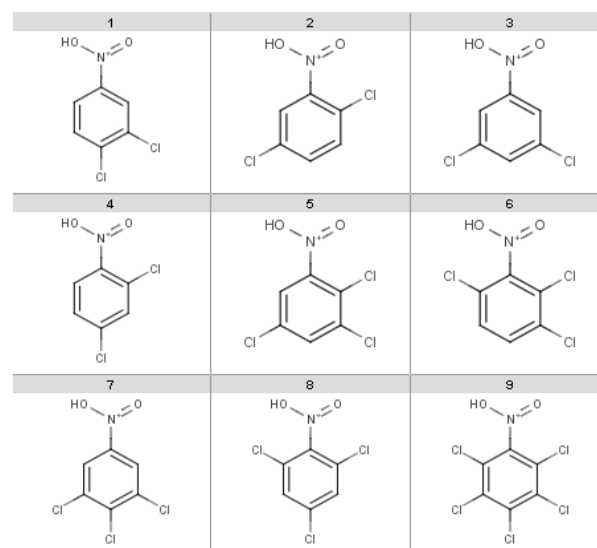


Fig. 1 Structurally similar nine chloronitrobenzene homologs

方、物質9（ペンタクロロニトロベンゼン（CAS No. 82-68-8））は、過去に土壤殺菌剤、防かび剤、防汚剤に使用されていた農薬で、ビーグル犬を用いた混餌投与による2年間慢性毒性試験により胆汁うっ滞性肝障害などからNOEL 0.75 mg/kg/dayと報告されている。この物質は、農薬としては販売禁止となっており厳しい残留基準が定められている。では、物質5～8はどうであろう。これらの物質について毒性試験は実施されていない。しかし、物質構造から物質1～4及び9と同程度の毒性が懸念されないだろうか。もちろん、予想外に毒性が低い可能性も否定出来ない。ここで問題なのは、これらの物質のように安全性未評価の既存化学物質は毒性試験が実施されない限り、特に規制も受けずに流通可能なことである。環境中に一度大量に排出されてしまった化学物質を除去するのは非常に困難であるが、安全性未評価の化合物について一律に厳しい規制を実施するのは現実的ではない。カテゴリーアプローチや(Q)SAR手法による安全性評価スキームが実用化されれば、毒性試験が実施されていない化学物質についても適切な管理を行うことが可能である。Fig. 1の物質群については、化学物質の毒性評価についてある程度の経験があれば、その毒性を疑うであろう。しかし、経験に基づく評価は、評価者によって判断が違ってしまう可能性があるため安全性評価に用いるためには、評価基準が明示的に示されている必要がある。化学構造と毒性との関係については、1970年代から研究されている。1972年にCramerらは、82化合物の構造とNOELデータの解析結果から化学物質の毒性を3クラスに分類する33の構造ルールからなるYes/No型の決定樹を発表している²⁾。さらに、1996年Munroらは600以上の化学物質のNOELによるCramer

ruleの検証を行い新たに5つのルールを追加した³⁾。JECFAでは毒性情報が無い既存食品香料の安全性評価におけるMunroらの修正Cramer ruleの適用を検討している⁴⁾。Cramer ruleでは、Fig. 1の物質は全てクラス3 (強い毒性が懸念される物質) と判定される。

3. 化学物質の物理化学的性質と毒性

(Q)SARでは、化学物質の構造そのものだけでなく化学構造から計算可能な様々な物理化学的性質や化学構造の情報を数値化して記述子として予測に用いる。化学物質が生理活性を生じるためには、生体に吸収され、作用部位に到達する必要がある。化学物質の腸管吸収性や細胞膜透過性は、医薬品開発においてバイオアベイラビリティの向上に重要であり、数多くの研究から化学物質の脂溶性すなわち水/オクタノール分配係数 (LogP) との関係が示されている^{5,6)}。逆に一般化学物質では、吸収率が高ければ経口投与による毒性が発現する可能性が高い。Fig. 2に化審法で実施された28日間反復投与動物試験により肝毒性が認められた物質のLogPの区間分布を示す。上側パネルは、新規化学物質として申請された物質、下側パネルは既存化学物質点検により試験が実施された物質であり、いずれの物質群においても明らかにLogP=3付近を中心に肝毒性を有する物質の割合が多いことがわかる。しかも、その分布は2つのデータセットでほぼ共通していることから化学物質構造によらない共通ルールであり、化学物質の物理化学的性質からの毒性予測の可能性を示唆している。本来、LogPは実験

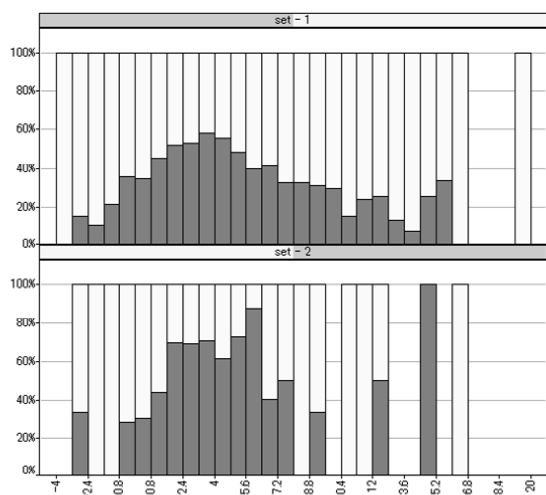


Fig. 2 LogP distribution of liver toxic chemicals X axis showing calculated LogP values (XLogP) and Y axis showing relative percentage of chemicals with (gray) and without (white) the liver toxicity in 28-day repeated dose toxicity test using Rat: Upper panel (Set-1): Data of newly registered 1227 chemicals for Japanese Chemical Substances Control Law, Lower panel (Set-2): Data of Japanese existing 251 chemicals tested by Ministry of Health, Labour and Welfare.

的に求められる物性値であるが、化学物質の生体内での様々な挙動と関連することから様々な予測計算法が報告されており、今日では、かなりの精度で予測計算が可能である。すなわち、LogP計算こそが構造活性相関の最大の成功例ともいえる。今日では、LogPは多くの構造活性相関モデルでパラメータとして用いられており、経済産業省で検討されている蓄積性予測モデル⁷⁾や環境省で検討されている生態影響予測モデル⁸⁾は、いずれも化学物質を幾つかの構造群に分類し、構造群ごとにLogPとの回帰式をもとに予測を行うものである。しかし、計算により求められるLogPはあくまで予測値であり、化学構造によってアルゴリズム間で異なる値となることに注意が必要である⁹⁾。なお、図2の解析にはLogP予測計算値としてXLogPを用いている¹⁰⁾。

4. 代表的な構造活性相関手法による*in vivo*毒性予測精度の検証

上述の例は、*in vivo*反復毒性についても化学構造や構造から計算可能な性質から予測出来る可能性を示しているが、これまでのところ多岐に渡る化学物質に適用可能な*in vivo*反復毒性について精度の良い(Q)SARモデルは報告されていない。我々の研究室では、これまで化審法における新規化学物質審査や既存化学物質点検における安全性評価を実施するとともに試験データのデータベース化を進めてきており、蓄積されたデータ(化審法データ)をもとに、平成15年度より人健康影響に関する3種のスクリーニング毒性試験についての(Q)SAR評価法の開発を変異遺伝部等との共同により進めており、これまでにAmes試験については国際的評価が高い3種のアプローチの異なるソフトウェアを組み合わせることで実用可能なレベルの予測が可能であることが示された¹¹⁾。現在、引き続き染色体異常試験及び28日反復投与毒性試験について検討を進めており、以下にAmes試験予測に用いた3種のソフトウェアを用いて28日反復投与毒性予測の検討を行った結果をそれぞれの手法の特徴とともに示す。

4.1 DEREKによる肝毒性アラートの構築

毒性予測の分野における(Q)SARは、Cramer ruleのように専門家による知見をもとに判断を行うエキスパートシステムと化合構造もしくはその部分構造から計算される物性値などの特徴量を記述子として統計的・情報数理的に解析する手法に分類される。DEREKは、文献情報や有識者により経験的に得られている毒性部位の部分構造(アラート)と経験則をルール化した知識ベースにより、定性的な毒性予測を行うエキスパートシステムである¹²⁾。エキスパートシステムでは、高度な定量予測を

行うのは難しいが、予測の根拠（知識ベース）が容易に確認出来ることやモデル全体の構造を変えることなく知識ベースの追加拡張を行うことが出来る等の利点がある。DEREKを開発したLhasa社は、様々な機関や企業等との共同研究により構築された有害性アラート（部分構造）を知識ベース化してDEREKのアラートとして提供しており、我々はLhasa社と共同で化審法データを基に新規肝毒性アラートの構築を行っている。これまでの研究では、約800化合物の構造情報と毒性試験成績をもとに、(i)化合物構造クラスタリング、(ii)視覚的解析、(iii)関連する毒性に対してのDEREKの既存アラートとの比較により、新たに34個の新規肝毒性Rapid Prototypeアラートの構築に成功している。共同研究を始めた当初、DEREKには40種の肝毒性アラートが搭載されていたが、新規アラートの追加により、アラート構築に用いた学習セット（化審法データ）に対する予測精度は、感度（陽性物質のうち陽性判定された割合）が23%から61%に上昇し、全体の一致率（的中率）も61%から80%に上昇した。しかし、独立した外部データセットによる検証の結果は、感度31%、一致率58%であった。DEREKやCramer ruleのようなエキスパートシステムでは、有害性アラートとの部分構造マッチングにより判定を行うため、有害性アラートがカバーしていない毒性物質は偽陰性判定されてしまう。また、新たに抽出した肝毒性Rapid Prototypeアラートについて解析したところ、幾つかのアラートは非常に少ない物質に由来しており、それらの一部が検証データにおいて非常に多くの物質で偽陽性判定をしていることが一致率の低さの一因であると判断された。現在、構造アラートとのマッチングと分子量やLogPを組み合わせた予測精度向上の検討を進めている。

4.2 ADMEWorksによる肝毒性判別モデルの構築

ADMEWorksは、2次元分子構造及びクラス特異的部分構造から計算された記述子を使って構築された判別式をもとに毒性評価を行うシステムで、構築済みモジュールにより予測を行うAdmeworksと予測モデル構築

を行うモデルビルダーから構成される。モデルビルダーには400種類以上の化合物パラメータ計算モジュールが組み込まれており、部分構造パラメータを含めると数千種のパラメータを発生させることが可能である。P.C.Jursらのグループが開発したADAPT (Automated Data Analysis and Pattern recognition Toolkit) によりSupport Vector Machine (SVM) やAdaBoost (ADA) 等の線形判別関数及び線形重回帰モデルを用いた予測を行う¹³⁾。化審法で実施された28日間試験報告書等からモデル構築用にデータ整理が終了した794物質から構造の重複や不正な168物質を除外した626物質をランダムに学習セット：検証セット=8：2に分割し、モデルビルダーを用いて肝毒性予測モデルを構築し検証を行った。それぞれについて量子力学的パラメータを含む401化学的パラメータと124部分構造パラメータ及び、1000以上の数値変換関数パラメータを利用して、計1631パラメータを発生させ、ADA等によりモデル作成に最適なパラメータの組み合わせを検証して、肝毒性予測に有効な40パラメータを選定した後、SVM, KNN (K Nearest Neighbor) 及びADAの3つの判別手法によりモデル構築を行った。学習セット及び検証セットについてのそれぞれの予測手法による予測成績をTable. 1に示した。学習セットではいずれの手法でも80%以上の予測精度が得られたが、検証セットに対する予測では、ADAモデルが一致率70.3%で最も精度が高く、SVM, KNNモデルは、ADAモデルに比べて感度が低い結果であった。

4.3 MultiCASEによる肝毒性予測モデルの構築

Multiple Computer Automated Structure Evaluation (MultiCASE) は、Klopmanらによって開発された独自のCASE理論に基づくシステム¹⁴⁾であり、入力分子を2～10原子(水素原子を含まない)のフラグメントに分解し、統計処理により有意に活性と相関している部分構造(BIOPHORE)を検出し、同じBIOPHOREを持つ化合物セット内における活性の違いを記述子(MODULATOR)により数値化して活性予測を行う。新規化学物質1231個のデータを学習セットとして28日間試験におけ

Table 1 Comparison of different discriminative methods on the predictive performance of liver toxicity SAR models using ADMEworks

	Training set			Test set		
	244/254			53/75		
No. of chemicals*						
Discriminator type	SVM	KNN	ADA	SVM	KNN	ADA
Concordance	99.2	83.9	82.9	66.4	62.5	70.3
Sensitivity	100.0	85.7	80.7	24.5	34.0	69.8
Specificity	98.4	82.3	85.0	96.0	82.7	70.7

*Positive for liver toxicity/Negative for liver toxicity

る肝毒性LOAEL値をターゲットとしてモデル構築を行い、既存化学物質251個のデータを検証セットとして予測を行った結果、感度8.7%、特異度89.2%と、ほとんどの化合物が陰性判定される結果となった。MultiCASEでは、ある程度のトレーニングデータが与えられた場合、偽陽性は少ないと考えられるが、学習セット中に評価化合物中のactiveなBIOPHOREが含まれていない場合には、偽陰性となりやすい。そこで、新規化学物質1231個のみを分子量等を基準として学習セット、検証セットに分割し、さらに陰性陽性の判定基準数パターンについてモデル構築を試みた。しかし、あまり一致率の高い結果を得ることは出来ず、一致率は最大で62%、感度は70%に達しなかった。ADMEWorks やMultiCASEのように数学・統計学的手法を用いる手法では定量的なモデル構築が可能で、かつ人為的なバイアスは排除されるが、毒性専門家の経験的な知見を反映することは難しい。また、膨大な数の記述子を機械的に生成して選別を行うため学習の過程で偶然の相関によるモデルが構築される可能性がある。

5. オープンアクセスな構造活性相関ツールの必要性

上記検討に用いたソフトウェアは、いずれも市販のものである。市販ソフトウェアは、優れた機能を有しているが、その一方でモデル構築に用いたソフトウェアを用いずに同じモデルや予測結果を得ることはほとんど不可能であり、さらに継続的な利用のためには、毎年高額なライセンス料が必要となる。今日ではコンピュータの進歩とケモインフォマティクス研究の進展により、様々な化学計算ソフトウェアがオープンソースで開発もしくは無料公開されており、それらを組み合わせて(Q)SARモデルを構築することも可能である。そこで、パブリックで利用可能なツールを用いて行った検討結果を以下に示す。MultiCASEで用いたデータセットについて、構造記述子による予測モデルと部分構造による予測モデルの2種類のモデルを構築して予測精度の検討を行った。構造記述子モデルの構築には、The Chemistry Development Kit (CDK)¹⁵⁾により基本的な構造記述子20個及びXlogP値を計算し、新規物質データを学習セットとして

Weka¹⁶⁾を用いてRandomForest¹⁷⁾による予測モデル構築を行い、既存物質データによる検証を行った。RandomForestは、決定木と同じ分類機の一つで、集団学習法と呼ばれ複数の決定木を作成し、これら組み合わせることで精度と汎化力を両立するモデル構築手法である。構造記述子やLogP値は、同一スケールの値ではないため、そのままの値を判別分析や重回帰分析に適用することは出来ない。一方、決定木であればデータへの制約はないが、あまり高精度の分類は期待出来ないため、今回の検討ではRandomForestを用いた。部分構造モデルでは、Molecular Substructure Miner (MOSS)¹⁸⁾を用いて新規物質1231個を解析して肝毒性物質群に特徴的な部分構造フラグメント111個を抽出した。毒性予測はフラグメントに対する部分構造マッチングではなくフラグメントとの類似性距離 (Tanimoto係数) をパラメータとしてRandomForestによる予測モデルを構築して既存物質データによる検証を行った。Table. 2にそれぞれのモデルの学習セット、検証セットでの予測成績を示す。学習セットに対する予測では、いずれのアプローチによってもほぼ100%の一致率を示すモデルが得られたが、検証セットに対する予測一致率はいずれも70%以下であった。得られたモデルの予測精度は良いとは言えないが、前項に示した市販ソフトにより構築したモデルと比べ遜色ない。(Q)SARを広く受け入れられる安全性評価手法として活用していくためには、なるべく多くの人々が安価に利用可能であることが望ましい。我々の研究は、必ずしも独自ツールの開発を目的としてはいないが、パブリックに入手可能なツールを用いて実用可能なモデル構築が可能であるなら、誰でも再現が可能である。もちろん、高精度の予測を行うために特定の市販ソフトウェアが必要不可欠であれば用いるべきである。いずれにせよ、当面の課題は、現時点で実現可能な予測レベルを認識した上で、信頼性向上に向けた検討を進めるとともに、まずは限定的であっても社会的に受用可能な利用法を提案していく中で徐々に適用範囲を広げていくことである。OECDでは、(Q)SARの行政的利用と受け入れの促進に向けた活動を進めており、行政目的で利用される(Q)SARモデルについてアルゴリズムや学習データの公

Table 2 Predictive performance of two different type SAR models for liver toxicity using publically available tools

No. of chemicals*	Training set		Test set	
	515/745		137/117	
Modeltype	Discriptor	Structure	Discriptor	Structure
Concordance	99.9	98.9	66.1	63.4
Sensitivity	99.8	98.1	67.2	62.0
Specificity	100.0	99.5	65.0	65.0

*Positive for liver toxicity/Negative for liver toxicity

開等5項目からなるOECD原則¹⁹⁾を定めるとともに、加盟各国の提供により各国で蓄積されてきた毒性試験情報や(Q)SARモデル等を統合したOECD QSAR Toolboxの開発を進めている²⁰⁾。現在のバージョンのOECD QSAR Toolboxには、人に対する毒性評価モデルとして前述のCramer ruleが登録されている。

6. 課題と将来展望

これまでの検討では、いずれの手法により構築した予測モデルにおいても*in vivo*肝毒性について精度の高い予測結果は得られていない。この原因として、学習セットと検証セットに含まれる化学構造の偏りや手法によって適応出来ない化学構造が含まれている可能性が挙げられる。適応化合物の制限や適応性の異なる複数のモデルを組み合わせて利用することでより高精度の予測結果が得られる可能性^{11,21)}はあるが、別の原因として生体側の反応に関する情報の不足が挙げられる。毒性が化学物質と生体との複雑な相互作用により発現する現象であるのに対して、構造活性相関では化学物質側の特性からの評価しか出来ない。つまり、生体側の情報が不足しているのである。受容体作用のようなターゲット(メカニズム)が特定されている反応であれば、3次元ドッキングのように反応側の情報を加味したアプローチも可能である。しかし、メカニズムやターゲットが解明されている毒性は非常に限られており、そうしたアプローチは利用出来ない。近年、(Q)SARと共に安全性評価の効率化の手段として期待されているのが*in vitro*評価系である。米国EPAが中心となって開始したToxCast(Tox21)プログラムでは、多数の*in vitro*ハイスループットアッセイと(Q)SARを組み合わせた毒性評価手法の構築を進めている²²⁾。毒性分野における*in vitro*評価系の多くは動物試験の代替法として開発される系が多いが、ToxCastにおける*in vitro*アッセイの多くは、創薬分野で用いられるメカニズムアッセイであり、個々のアッセイ結果は必ずしも直接毒性と結びつくものではなく、むしろ、毒性予測におけるパラメータとしての化学物質と生体の様々な相互作用反応を示すものと捉えることが出来る。一つの化学物質の安全性評価のために、ToxCastにおける*in vitro*アッセイを全て実施するのはコストや効率の面から現実的ではないが、数種の*in vitro*系により、化学構造からは計算出来ない重要なパラメータについてデータギャップを埋めることが可能であれば、(Q)SARと*in vitro*系を個別に用いるよりも、効率的かつ信頼出来る安全性評価ストラテジーが確立可能であろう。今後はそうした方向からの検討も進めていきたいと考えている。

参考文献

- 1) Matthews, E. J., and Contrera, J. F.: *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 3, 125-34 (2007).
- 2) Cramer, G. M., Ford, R. A., and Hall, R. L.: *Food Cosmet Toxicol* 16, 255-76 (1978).
- 3) Munro, I. C., Ford, R. A., Kennepohl, E., and Sprenger, J. G.: *Food Chem. Toxicol.* 34, 829-67 (1996).
- 4) Renwick, A. G.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 585-91 (2005).
- 5) Abraham, M.: *Eur J Med Chem* 37, 595-605 (2002).
- 6) Zhu, C., Jiang, L., Chen, T., and Hwang, K.: *Eur J Med Chem* 37, 399-407 (2002).
- 7) <http://qsar.cerij.or.jp/degacc/cgi-bin/index.cgi>
- 8) <http://kate.nies.go.jp/>
- 9) Bennett, E. R., Clausen, J., Linkov, E., and Linkov, I.: *Chemosphere*, 77, 1412-8 (2009).
- 10) Wang, R., Fu, Y., and Lai, L.: *J Chem Inf Model*, American Chemical Society 37, 615-621 (1997).
- 11) Hayashi, M., Kamata, E., Hirose, A., Takahashi, M., Morita, T., and Ema, M.: *Mutat. Res.* 588, 129-35 (2005).
- 12) Greene, N., Judson, P. N., Langowski, J. J., and Marchant, C. A.: *SAR QSAR Environ Res* 10, 299-314 (1999).
- 13) Stuper, A. J., and Jurs, P. C.: *J Chem Inf Model* 16, 99-105 (1976).
- 14) Klopman, G.: *J Chem Inf Comput Sci* 38, 78-81 (1998).
- 15) Steinbeck, C., Hoppe, C., Kuhn, S., Floris, M., Guha, R., and Willighagen, E. L.: *Curr. Pharm. Des.* 12, 2111-20 (2006).
- 16) Frank, E., Hall, M., Trigg, L., Holmes, G., and Witten, I. H.: *Bioinformatics* 20, 2479-81 (2004).
- 17) Breiman, L.: *Mach Learn* 45, 5-32 (2001).
- 18) Hofer, H., Borgelt, C., and Berthold, M. R.: *Intelligent Data Analysis* 8, 495-504 (2004).
- 19) Zvinavashe, E., Murk, A. J., and Rietjens, I. M.: *Chem. Res. Toxicol.* 21, 2229-36 (2008).
- 20) van Leeuwen, K., Schultz, T. W., Henry, T., Diderich, B., and Veith, G. D.: *SAR QSAR Environ Res* 20, 207-20 (2009).
- 21) Matthews, E. J., Kruhlak, N. L., Benz, R. D., Contrera, J. F., Marchant, C. A., and Yang, C.: *Toxicol. Mech. Methods* 18, 189-206 (2008).
- 22) Dix, D. J., Houck, K. A., Martin, M. T., Richard, A. M., Setzer, R. W., and Kavlock, R. J.: *Toxicol. Sci.* 95, 5-12 (2007).