

生物を用いた代表的な甲状腺ホルモンかく乱物質のスクリーニング試験法

茂野 誠一, 橋本 博之, 眞壁 祐樹
(衛生研究所環境ホルモンプロジェクト)

Methods for screening of thyroid hormone disruptors using organisms

Seiichi SHIGENO, Hiroyuki HASHIMOTO, Yuuki MAKABE

I はじめに

甲状腺ホルモンは成長・脳神経系の発育について重要であり、新生児期の甲状腺ホルモンの異常がクレチン症等の疾病を引き起こすことが知られている。性ホルモンのかく乱に端を発しクローズアップされてきた化学物質の内分泌かく乱作用は、ある種のPCBsが甲状腺ホルモンに拮抗的に働くことが明らかになり、甲状腺ホルモンが関与するヒトの病気との関係も疑われるようになってきている。¹⁾このような化学物質の甲状腺ホルモン作用に対する遺伝子レベルでの影響は、レセプターバインディングアッセイやレポータージーンアッセイなどの簡便な方法により少しずつ明らかになりつつある。しかしながら、遺伝子レベルから細胞レベル、細胞レベルから個体レベルの化学物質と疾病との関係を明らかにする研究が、これからの課題として残されている(図-1)。in vivoでの遺伝子レベルの実験とヒトの疾病の関係を明らかにする研究を行う上で数多く存在する既存の方法の長所ならびに問題点を把握整理し、さらに、ヒトへの外挿が可能な新たな方法を考案することも必要である。本報では、近年用いられている生物を用いた甲状腺かく乱作用の試験方法(in vitro, in vivo)について解説する。

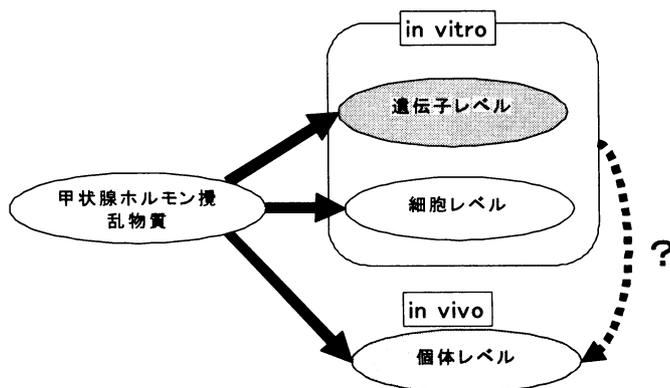


図-1 甲状腺ホルモンかく乱作用の確認方法

II 遺伝子レベルでの試験系

1. 遺伝子ならびにタンパク質レベルの試験法

細胞中での環境ホルモン(内分泌かく乱化学物質)の挙動はエストロゲンレセプターなどに代表されるホルモンレセプターとの応答を中心に研究が進められてきた。核内外のホルモンレセプターはリガンドと結合すると核内で様々な転写制御因子と複合体を形成し、その複合体は特異的な応答配列を持つDNAに結合してそのDNAの転写活性を制御する。ここでは転写活性の測定法とレセプターとの結合能についての実験方法について述べる。

1) レポータージーンアッセイ

遺伝子の転写制御にかかわるプロモーター・シス配列・転写因子およびそれらの相互作用を細胞や個体レベルで解析する方法として広く用いられている。

研究対象とするプロモーター配列(甲状腺ホルモンの場合、Thyroid Hormone-response element (TRE)などのホルモンレセプターと結合する配列)の下流にルシフェラーゼやβ-ガラクトシダーゼ遺伝子などを結合させたレポータージーンを細胞にトランスフェクションする。この細胞にホルモンレセプターのリガンドを投与すると、ホルモンレセプターがプロモーター配列に結合することにより転写応答が活性化されて細胞内でレポータージーン由来タンパク質が合成される。この合成されたタンパク質の活性(ルシフェラーゼの場合は蛍光)を測定することで試料による転写制御への影響を見ることができる。

2) ツーハイブリットシステム

本来タンパク質XとYが相互作用を起こすかどうか調べる方法であるが、内分泌かく乱作用に関する研究で応用する場合はタンパク質Xをホルモンレセプターに、Yを核内の転写調節因子として、内分泌かく乱の候補物質を投与した場合にXとYが相互作用を起こすかどうかを調べるのに使われている。

ホルモンレセプターとGAL4活性化ドメインの融合タンパク質(GAL4-X)及び転写調節因子とVP16活性化ドメインの融合タンパク質(VP16-Y)の2種類をそれぞれベクターに組み込み培養細胞または酵母へトランスフェクション(DNAあるいはRNAの真核細胞への導入)する。細胞(酵母)には、あらかじめGAL4配列をプロモーターとして組み込んだルシフェラーゼ遺伝子が導入されている。トランスフェクション後に環境ホルモンを投与することによりGAL4-XとVP16-Yが相互作用を起こせば、転写活性化ドメインとDNA結合ドメインが会合してルシフェラーゼ遺

伝子転写活性が促進される。後は細胞内で発現したルシフェラーゼ活性を測定すれば相互作用の強さを検出できる。

欠点としては、融合タンパク質として発現させるために本来の立体構造が損なわれることもあり、必ずしも実際の現象と一致しない(疑陽性となる)ことが挙げられる。

3) レセプターバインディングアッセイ

ビスフェノールAをはじめとする内分泌かく乱物質はエストロゲンや甲状腺ホルモンなどのレセプターに結合することが知られている。

レセプターバインディングアッセイはこれらの物質と受容体との結合能力を定量的に評価する方法である。

精製したレセプターに化学物質と一定量のリガンドを加えて反応させた後、検体と競合して受容体に結合できなかつた遊離リガンドの量を測定する。検体の濃度を変えて測定することにより検体とレセプターとの結合定数を求めることが出来る。

欠点として、従来はリガンドをRIで標識して測定していたために特別な施設や設備を必要とすることであるが、最近ELISAによって非RI環境で測定することも可能となってきた。

2. 環境ホルモン投与による生物での遺伝子発現変化の解析法

環境ホルモンを動物や細胞に投与すると、ホルモン応答配列を有する遺伝子を始めとして各種遺伝子の発現量に変化が現れる。これら発現量の変化した遺伝子を単離・同定する方法としては、下記の方法が用いられる。

1) 蛍光ディファレンシャル・ディスプレイ (FDD) 法

ディファレンシャル・ディスプレイ (DD) 法は、1992年にLiangとPardeeによって開発され、発現量の変化した遺伝子を単離する簡便な方法として知られている。

DD法は研究対象の組織や細胞、例えば環境ホルモン投与前後の細胞からそれぞれ抽出したmRNAをアンカープライマー(5'-T₁₁MN (M,N=A,C,G))で逆転写してcDNAを合成した後、任意の10merプライマーと組み合わせPCRを行い、ポリアクリドアミドゲル電気泳動のパターンを検体間で比較する。アンカープライマーは12種類、10merプライマーは20種類以上市販されているので、組み合わせにより検体間の差異を細かくスクリーニングすることが可能となる。

原報では電気泳動のパターン比較のためPCR産物をRIで標識していたが、その後蛍光標識されたプライマーを用いて蛍光イメージアナライザーで解析するFDD法が開発され、RIを使用せずに実験できるようになった。また、感度は落ちるがより簡便に核酸染色液を用いて電気泳動ゲルを染色する方法もある。

このように実験手法としては非常に簡単で結果を視覚的に判断できるという長所をもつDD法だが、欠点としてアニーリング温度を下げて特異性を減少させているために疑陽性が出やすいこと、真に発現量に差のあることを定量PCRなどで確認する必要があること、mRNAの存在比や配列に由来するPCR再現性の問題から、発現量に差のある遺伝子全てを検出することが困難であることなどが挙げられる。

2) DNAチップ (マイクロアレイ) 法

DNAチップはガラスや半導体の基板の上に特定のDNA (例えば研究対象の細胞から調製したcDNA) を高密度に貼り付けた

もので、研究対象の遺伝子群がどのように発現しているかを一度に調べることができる。

DNAチップに貼り付けるcDNAは、通常は正常な組織(例えば環境ホルモン投与前の細胞など)から抽出したmRNAから作製し、チップ上の位置(スポット)とその配列までを決定しておく。研究対象と対照から抽出したmRNAを蛍光標識した核酸を用いて逆転写を行い、それぞれ異なる蛍光を発する標識cDNAを作製する。この標識cDNAを等量混合してDNAチップにハイブリダイゼーションさせると、遺伝子の発現量の差に応じてスポットごとに異なる蛍光を発する。この蛍光を検出装置で読み取れば、どの遺伝子の発現量が増減しているかを解析することができる。

一度DNAチップを作製してしまえば、後はmRNA抽出、逆転写、ハイブリダイゼーション、蛍光検出の4段階のみで1サイクルが完結するので、大量の検体を迅速に処理する(ハイスループット)のに向いている手法である。

欠点としては、チップの作製や検出装置が高額であること、実験結果がチップの出来具合に左右されること、DD法と同じく疑陽性が出やすいため、真に陽性であるか確認する必要があることなどである。

III 細胞レベルでの試験系

1 甲状腺ホルモンかく乱作用試験に用いられる細胞

甲状腺ホルモンは脳の発達において、中枢神経系における細胞増殖、細胞の生存、神経突起の変化、シナプス形成、再分化、細胞骨格の作用を有する等、多岐にわたる重要な役割を担っている。そのため、甲状腺ホルモンの培養細胞試験では表-1に示したような神経細胞が用いられ、主としてその細胞数や細胞中の物質の測定が行われる。

表-1 甲状腺ホルモンの培養細胞試験で用いられる神経細胞

株化培養細胞	GH3細胞、GT1-7細胞、Neuro2a細胞
初代培養細胞	ラット大脳皮質神経細胞、マウス小脳プルキンエ細胞

1) 株化細胞系

a) GH3細胞

ラット下垂体前葉由来の株化細胞であるGH3細胞は甲状腺ホルモン応答性の細胞増殖及び成長ホルモン(GH)産生を起すことから細胞増殖量、GH産生量を求めることにより、神経毒性評価が可能となる。

b) GT1-7細胞、Neuro2a細胞

GT1-7細胞は視床下部神経細胞由来、Neuro2aは神経芽細胞種の株化細胞である。両細胞共に甲状腺ホルモン応答性を有しているため、細胞増殖試験などに用いられている。

2) 初代培養細胞系 (ラット大脳皮質神経細胞、マウス小脳プルキンエ細胞)

ラット・マウス胎児大脳皮質神経細胞は株化細胞に比べ一般的には薬物等に対する応答能が高いといわれ、広く薬物活性、細胞毒性の評価に使用されている。しかし株化細胞に比べ、調製や取り扱いが難しい。長期培養可能な細胞を構築したグループもいる

が、現在では凍結された初代神経細胞が販売されており、同一ロットでの再現性のある試験が可能となっている。細胞増殖試験などに用いられている。

2 細胞を用いた甲状腺ホルモンかく乱作用の試験法

1) 細胞増殖試験 (Wst-1法)

生細胞中のミトコンドリア脱水素酵素によるWst-1 (テトラゾリウム塩) からホルマゼンへの変換作用を用い、細胞増殖能力や細胞生存能力を発色測定により定量する方法である。生存細胞数が増加すれば、細胞溶液中のミトコンドリア脱水素酵素の全体の活性が増加することになり、この酵素活性の増加が、ホルマゼンの生成増加を導くため、ホルマゼンと培地中の代謝活性のある細胞の数とが吸光度において直線的な相関を示す。この相関関係を用い、吸光度の増減による被検物質の細胞数の測定を行う。この試験法は細胞培養技術及びプレートリーダーなどの分光光度計があれば実施できる試験であるため、環境ホルモンのみならず、癌細胞に対する薬剤の殺細胞効果の測定、化粧品の細胞毒性の測定など様々な分野で用いられている。

2) 成長ホルモン (GH) 産生試験

細胞増殖試験同様の細胞培養条件等を用い、被検物質を添加後48時間程度の培養を行う。培養液を回収後、遠心分離を行った後、上清に含まれるGH含量をEIAやRIA等の市販のラットGH測定キットを用い測定する。測定されたGH含量により、被検物質の甲状腺ホルモン様作用の指標となる。

3) 免疫組織化学分析 (多重免疫染色)

この方法ならびに4) 5) はシナプスの数を測定する方法である。MAP2 (微小管結合蛋白質 2; ニューロンマーカー蛋白質) の抗体 (赤色) とシナプシン I (シナプス前蛋白質: シナプスマーカー蛋白質) の抗体 (緑色) で多重免疫染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡で観察する。観察された緑色の点状の免疫活性の変化はシナプスを示すもので、被検液の処理によるシナプスの増減を確認できる。

4) 細胞内カルシウム濃度同時多点観察システム (カルシウムイメージング法)²⁾

カルシウムに感受性を示す蛍光色素Fura2で神経細胞を染色し、高感度ビデオカメラを装備した蛍光顕微鏡から神経細胞内のカルシウム濃度の疑似カラー画像を得て、同時に多数の神経細胞内カルシウム濃度の時空的变化を観察する事ができるシステムである。自然発生的に細胞内カルシウム濃度は周期変化を起こすが、培養7日目ではほぼ全ての神経細胞が同期したカルシウム振動を発現する。カルシウム振動の周波数と電子顕微鏡で観察したシナプスの数は強力な相関がある事が分かっている為、培養8日後に、この周波数を観察することによりシナプス数を簡便に求めることが出来る。

5) 電子顕微鏡によるシナプス数のカウント

IV 個体レベルでの試験系

1 生物を用いた試験法

生物を用いた甲状腺ホルモンかく乱物質試験方法は、幼生から

成体への変態に甲状腺ホルモンが関与する無尾両生類の試験系とは乳類 (齧歯類と霊長類) の試験系に分けることができる。

1) 無尾両生類変態アッセイ

無尾両生類の幼生の変態過程において化学物質に2~3週間曝露することにより、甲状腺ホルモン様作用を検出する試験である。後肢長の短縮の程度などをエンドポイントとする。また、アフリカツメガエルを試験動物として陽性対照物質 (T4, PTU) による試験が、ドイツ、日本、イギリス及びスイスが共同して行われた³⁾。さらに、OECDにおいてプロトコル案が作成されている。また、在来種であるツチガエルを試験動物とした予備実験を行い、陽性対照物質 (T4) の濃度、温度及び飼育密度について適切な試験条件が確認されている¹⁾。アフリカツメガエルの標準データベースが (独) 国立環境研究所ホームページで公開されている。

2) 28日間反復投与試験²⁾

試験開始時点で7週齢の雌雄の健康な若齢成熟ラットに比較物質を28日間反復投与する試験系である。一般状態、感覚機能および神経症状への影響、血液学的および血液生化学的影響、主要臓器と器官の重さや病理組織学的影響を調べる試験である。第4週に感覚機能や握力、自発運動量などの検査が行われる。現在、改訂作業が進行中で、改良TG407で甲状腺ホルモン濃度の測定が追加されている¹⁾。

3) 思春期投与試験²⁾

思春期の発達と甲状腺機能に対する環境化学物質の影響を定量化するために開発された。離乳したばかりの雄ラットに投与する試験系で、生後23日齢から52-53日齢に対して連続した31-32日間の曝露を行う。

4) サル類を用いた曝露系¹⁾

サル類に経口投与と実験を行うことは容易ではない。マカカ属のサル類は、平均妊娠期間155日、哺乳期間は半年に及ぶ。母親に対して強制的に毎日経口投与を行うと、ストレスのために有効な実験結果を得ることができなくなる。そのため、残留性の短い物質の試験を行う場合、1箇月に1度程度の交換ですむオスモティック・プレッシャーポンプを用いた皮下投与を行う。残留性の長い物質 (TCDD等) の場合は、週に1度あるいは2週に1度の経口投与を行う。

2 動物実験に用いられる甲状腺ホルモンかく乱作用の確認法

1) 甲状腺ホルモン (T4, T3) と甲状腺刺激ホルモン (TSH) の測定

甲状腺機能への影響は、甲状腺ホルモン濃度 (T4, T3) と甲状腺刺激ホルモン (TSH) を測定することにより明らかになる。また、血清中の甲状腺ホルモン濃度の変化は、甲状腺ホルモンの合成、放出、輸送を阻害する化学物質によって、また、甲状腺ホルモンの代謝を増加させる化学物質によっても起こるので、それぞれの段階の変化を追うことで化学物質の作用点を探ることができる。

2) 甲状腺ホルモン合成・分解系

(1) ベルオキシダーゼアッセイ

甲状腺ホルモン合成の鍵となる酵素で、二つの働きがあり、第一は、サイログロブリン上のチロシン残基のヨード化である。第

二は、サイログロブリン上のダイ-, または、トリヨードチロシル残基の結合である。ヨード化と酵素活性、また、結合反応の測定により評価を行う。

(2) グルクロン酸抱合アッセイ

胆嚢へ排出されたT4のグルクロン酸抱合化は、T4不活化の主要な道筋の一つである。化学物質試験の対象となった動物の肝ミクロソームでは、T4グルクロン酸抱合が観測される。検査化学物質投与に数日必要となるが、暴露が生体内で起こるので代謝活性や代謝物の影響も評価することができる。

3) 行動試験

行動毒性は感覚、思考(学習や記憶)、感情、運動等の中枢神経系の障害により引き起こされる。甲状腺ホルモンかく乱化学物質に関連して、自発運動量、社会行動、母性行動と学習障害について試験が行われている⁹⁾。

自発運動量は、ある場面において動物が示す自発的な情動性や探索行動を反映する行動をいい、行動量を測度とする。測定時間により、短期、長期、日周と区別される。オープンフィールドテストは短期試験であり、ホームケージをそのまま測定に用いる場合、概日リズムが測定される。

社会行動は、2個体間以上で成立する行動のことでサル類の出会い行動実験が実施されている。母性行動は、母動物が子に対して示す各種の養育活動で、母子行動観察実験が実施されている。

学習については、学習が正常より低下しているかを測定する。正常動物では、迷路学習で正常な動物は、試行とともにエラー数の減少、学習基準までの試行回数の短縮が見られる。回避学習であれば、試行とともに回避率の上昇、逃避率の減少が見られる。しかし、中枢神経に障害を持つ動物では、学習(試行にともなう正の効果)が見られない。

以下には、マウス・ラットとサルについての行動試験法を述べる。

(1) マウス・ラット行動試験

a) オープンフィールドテスト¹⁰⁾

マウスやラットなどの新しい環境に対する反応(自発運動活性)を測定する試験である。円形あるいは四角形に囲った広場(open-field)に動物を置き、一定時間内の動物の行動を観察記録する。一定時間内のフィールド内の区画移動数、立ち上がり回数(探索行動の指標)、洗顔回数、身繕い回数、排尿回数、糞数を数える。フィールドでの移動を光学的センサーや画像処理により測定する機器も使用される。試験期間中動物は、個体ごと別々に飼育する。

また、自発運動活性の測定はSupermex(室町器械、東京)を用いる方法も報告されている。この場合、21時から12時間、動物の体温を一对の赤外線センサーで観察し位置の変化を2分間隔で観測する。2分間移動の信号が現れない場合を移動しない時間と定義をし、この結果を解析する。

b) 高架式十字迷路試験¹²⁾

マウスやラットが、通常高所に恐怖を感じることを利用した試験である。高架式十字迷路は、中央の正方形からのびる二本の壁のないアームと二本の壁のあるアームから構成される。アームはそれぞれ同じタイプのものが反対の位置になるように配置されている。壁のないアームと壁のあるアームに入った頻度を記録し、

壁のないアームに向かって進んだ場合をアームに入ったと定義する。

c) 受動回避試験¹⁰⁾

実験箱が、明および暗室の2部屋から構成される。中央に動物が通過できる隔壁があり、暗室側の床グリッドから通電刺激が与えられる。明室から暗室に入るまでの時間(反応潜時)を測定する。暗室に入ると通電刺激が与えられる(獲得試行)。獲得試行から一定時間経過後に、再生試行を行うが、通電刺激を与えず、反応潜時を測定する。記憶障害があれば暗室にすぐ入る。このことにより、化学物質の影響を評価する。

d) 能動回避試験¹⁰⁾

通常無条件刺激として電撃を用い、電撃予告刺激を一定時間提示した後、電撃を与える条件付け手続きをとる。電撃予告刺激-電撃間隔中にあらかじめ定められた行動・反応を動物が行えば、電撃予告刺激が終結し電撃が与えられない。回避反応率を測度とする。電撃回避のために、一方の部屋から他方の部屋に移動することを要求するシャトルボックスが用いられている。

e) 水迷路試験

1981年にモリスらによりラットの空間認識の記憶学習を測定する方法として考案された。大型の円形プールに透明な水を満たし、避難場所として水面下に隠れた台を置いてある。ラットは初めてたために泳ぎまわりますが、浅いところに到達するとそこで泳ぎを止めることができまる。どこに浅瀬があるのかは、周りの景色から判断することになる。同じテストを何度も繰り返すと、ラットは回りの景色から浅瀬の位置を覚え、浅瀬に到達する時間がだんだん短くなる¹¹⁾。

(2) サル類を使った行動試験¹³⁾

a) 四段指迷路試験¹³⁾

汎用知能検査である。リンゴ片を得るための指迷路実験、四段指迷路は各段とも正解方向は反対向きになっている。1日2セッション、1セッション15回行い、14/15回以上連続して正解すると、上の段に進む。4段クリアまでの過程を評価する。

b) 出合わせ行動試験¹³⁾

相互認知、社会性を評価する試験である。2匹のサルに新規出合わせ実験を行い、行動を分類する。社会性行動、自己向性運動など、正準判別分析を行いグループ化する。

c) 目合わせ試験

サルの特性(内向性、警戒心)の評価:サルが人を見るとき目を合わせる性質を利用して、視覚機能やサルの性格特性(警戒心、内向性)を評価する。3名の観察者が各サルについて1分間、アイコンタクト(目合わせ)実験を行う。

d) 母子行動観察試験¹³⁾

サルの母子相互行動の評価:観察用ゲージにサルの母子を入れ、子供の成長に伴って互いに何をするかという母子相互行動の変化を観察する。

V まとめ

甲状腺ホルモンをかく乱する物質についての試験方法をまとめると表-2に示すようになる。OECDにより遺伝子レベル、細胞レベル、個体レベルで提起されており(表-2)、それぞれのレ

表-2 甲状腺ホルモンかく乱物質に対する代表的試験方法

in vitro	遺伝子に対する作用 レポータージーンアッセイ } ……甲状腺ホルモンと拮抗してホルモン作用をかく乱する可能性の確認 レセプターバインディングアッセイ }
	遺伝子発現に対する作用 蛍光ディフレンシャル・ディスプレイ(FDD)法 } ……遺伝子発現に異常が起きている可能性の確認 DNAチップ }
	細胞レベルに対する作用 細胞増殖試験……………成長異常等の発生の可能性 成長ホルモン産生試験……………成長異常等の発生の可能性 免疫組織化学分析……………脳神経系の発達への影響の可能性の確認 細胞内カルシウム濃度同時多点観察 ……脳神経系の発達への影響の可能性の確認 電子顕微鏡によるシナプス数カウント ……脳神経系の発達への影響の可能性の確認
in vivo	固体での影響評価 無尾両生類変態試験……………甲状腺ホルモンとして影響する可能性の確認 甲状腺ホルモン濃度測定……………甲状腺機能に対する影響する可能性の確認 マウス・ラット行動試験……………脳神経系への影響、行動異常等の可能性の確認 サル類行動試験……………脳神経系への影響、行動異常等の可能性の確認

ベルで影響を与える化学物質も明らかになりつつある。しかし、それぞれの方法に長所、短所があり、また、それぞれの試験法でポジティブの結果が得られたとしても、ヒトの疾病に結びつけることは出来ない。今後、各レベルを統合し、ヒトの疾病との因果関係を明らかにする作業が求められている。特に子供で問題にされつつある、学習障害 (LD) や多動性障害 (ADHD) のような疾患と環境ホルモンの引き起こす甲状腺ホルモンかく乱作用との関連性の有無の解明は急務である。

V 参考文献

- Screening Methods for Thyroid Hormone Disruptors (EHP. Vol.107, p407-415)
<http://ehp.niehs.nih.gov/docs/1999/107p407-415devito/abstract.html>
- 川原正博 他. (2004)培養神経細胞のシナプスを数える－細胞内カルシウム濃度同時多点観察システムを用いるシナプス形成のアッセイシステム 日薬理誌124, 11～17
http://www.jstage.jst.go.jp/article/fpj/124/1/11/_pdf/-char/ja/
- 東和科学ホームページ
http://www.towakagaku.co.jp/gakkai/gakkai_ronbun.htm
- 環境省化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について—ExTEND2005—
<http://www.env.go.jp/chemi/end/extend2005/>
- OECD TG 407
<http://www.oecd.org/dataoecd/17/52/1948386.pdf>
- 拡張TG407
<http://www.meti.go.jp/committee/downloadfiles/g40722a36j.pdf>
- EPA EDSTAC
<http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/edmvs/malearrayprotocol83led03.pdf>
- 内分泌かく乱化学物質の高等動物における影響評価
http://vetweb.agri.kagoshima-u.ac.jp/vetpub/Dr_Okamoto/DrYosikawa/EDCs/EDCs.htm
http://vetweb.agri.kagoshima-u.ac.jp/vetpub/Dr_Okamoto/DrYosikawa/Edc.doc
- 国立医薬品食品衛生研究所 毒性試験用語集
<http://www.nihs.go.jp/center/yougo/>
- Takayuki Negishi, et. al. Behavioral Alterations in Response to Fear-Provoking Stimuli and Tranylcpromine Induced by Perinatal Exposure to Bisphenol A and Nonylphenol in Male Rats (EHP Vol. 112, 2004, p1159-1164)
<http://ehp.niehs.nih.gov/members/2004/6961/6961.pdf>
- モリスの水迷路について <http://obox.jp/nou/morris/>
- 吉川泰弘(2004)サル類を使った新しい行動毒性試験.科学. 74 : 43-49
- J Tsuchida, K Kawasaki, T Sankai, N Kubo, K Terao, T Koyama, J Makino, Y Yoshikawa (2003) :New Type of Puzzle-Task Finger Maze Learning in Macaca fascicularis. International Journal of Primatology 261-270