

LECTURES

実験技術講座

単一細胞レベルでの分泌量の解析

山梨大学大学院医学工学総合研究部生理学講座

有田 順

ホルモンや神経伝達物質といった分泌物の分泌量は従来、細胞集団レベルで定量されていた。この分泌量を特異的に単一細胞レベルで定量する技術が開発されたことによって、全く異なる新しい情報を得ることが可能になっている。これらの技術を解説するとともに、単一細胞レベルでの定量によってどのような情報が得られるのか、さらにその技術の適用の限界や将来の発展の可能性について述べる。

単一細胞レベルでの分泌量の定量方法として現在用いられているものに、細胞膜電気容量法 cell membrane capacitance method, キナクリン蛍光法 quinacrine fluorescence method, 逆転溶血斑法 reverse hemolytic plaque assay (RHPA), 細胞プロット法 cell immunoblot assay (CIBA) がある。後二者は抗体を利用した、特異性の高い定量方法であり、これらの方法を使うことによって表1に示すように、ホルモン、サイトカイン、神経ペプチド、成長因子、血清蛋白といった多彩な蛋白・ペプチド分子だけでなく、cyclic AMP といった分子までも測定されている。

細胞膜電気容量法は、細胞が分泌物を分泌する時の、細胞膜と分泌顆粒の融合によって生じる細胞表面積の増加に基づく [1]。細胞膜の電気容量は細胞膜表面積に依存するので、この細胞表面積の増加を電気容量の増加としてパッチクランプ法によって検出する。この方法を用いて、肥満細胞、好中球、膵腺房細胞、膵β細胞、副腎クロム親和性細胞、プロラクチン分泌細胞等からの分泌物の定量が行われてきた。この方法ではパッチ用ピペ

ットを通じて同時にセカンドメッセンジャーや調節蛋白を細胞内に投与することも可能である。一方、キナクリン蛍光法は、酸性細胞内小器官、主に分泌顆粒に集積される塩基性色素キナクリンの蛍光が分泌活動の増加とともに減少することに基づく [2]。このキナクリン蛍光法は細胞膜電気容量法と組み合わせて同時に行うことも可能であり、事実、細胞に負荷されたキナクリンの蛍光の減少率が細胞膜電気容量の増加と相関することが確認されている [3]。さらにパッチクランプによる細胞膜電気容量の測定と比較して、キナクリン蛍光の減少率の測定は技術的には遥かに容易であるのが利点として挙げられる。このキナクリン蛍光法は肥満細胞、膵β細胞、プロラクチン分泌細胞等に適用されている。細胞膜電気容量法とキナクリン蛍光法の両者は分泌活動の変化を秒単位のリアルタイムで測定できること、肥満細胞やクロム親和性細胞から分泌される非蛋白性分泌物を定量できることがRHPAやCIBAにはない長所として挙げられる。しかし、これらの方法の指標は分泌物特異的ではないため、異なる複数の分泌細胞によって構成される細胞集団において分泌量を定量するためには、あらかじめ何らかの方法で分泌細胞を同定する必要がある。

RHPAは、抗原抗体反応による、補体を介する赤血球の溶血に基づく [4]。その操作は以下の通りである。

- ①単一分散細胞と protein A 結合赤血球の混合懸濁液を小チャンパーに入れて1時間程度インキュベーションすることによって1層の細胞層を

表 1. RHPA および CIBA によって単一細胞レベルでの分泌量が定量されている分泌物

RHPA	
下垂体前葉細胞	prolactin growth hormone adrenocorticotropin luteinizing hormone thyroid-stimulating hormone angiotensinogen epidermal growth factor
膵β細胞	insulin
黄体細胞	relaxin
上皮小体細胞	parathyroid hormone chromogranin-A
乳腺細胞	casein
Seltori 細胞	transferrin
肝細胞	albumin
CIBA	
下垂体前葉細胞	prolactin growth hormone follicle-stimulating hormone substance P calcitonin vasoactive intestinal peptide
下垂体中葉細胞	melanocyte-stimulating hormone
上皮小体細胞	parathyroid hormone-related protein
骨芽細胞	bone Gla-protein type I collagen alkaline phosphatase cyclic AMP
リンパ球	interleukin-2
白血病細胞	interleukin-1 α

形成する。

- ②これらの細胞を、分泌蛋白分子に対する抗体および分泌刺激を含む培養液でインキュベーションする。この間、分泌物が、protein A を介して赤血球上に結合した抗体と反応する。
- ③次に補体を含む培養液とともにインキュベーションすることによって、分泌細胞周囲の、抗原抗体反応物が結合した赤血球が溶血を起こし、分泌細胞を中心に溶血斑が形成される。

この RHPA では、顕微鏡下に溶血斑の面積を測定することによって分泌量を推定し、同時に全細胞中の溶血斑形成細胞の割合も求める。例えば促進性分泌刺激が働いた場合、溶血斑の平均面積

あるいは溶血斑形成細胞の割合、あるいはこの両者が増加する。この RHPA の長所としては、分泌細胞の割合を容易に知ることができることである。特に蛋白分子を産生はするが分泌はしていないような silent cell が多い場合や、下垂体前葉のように5種類のホルモン分泌細胞が混在するような場合には分泌細胞の割合は重要な情報となる。さらに、RHPA に使われた細胞はまだ生きているので、RHPA 実験終了後、RHPA によって同定された細胞から電気活動を記録することが可能である [5]。一方、RHPA を行うためには通常、数十倍から200倍程度の低希釈の抗血清を使用する。我々の経験ではこの抗血清量は後述する

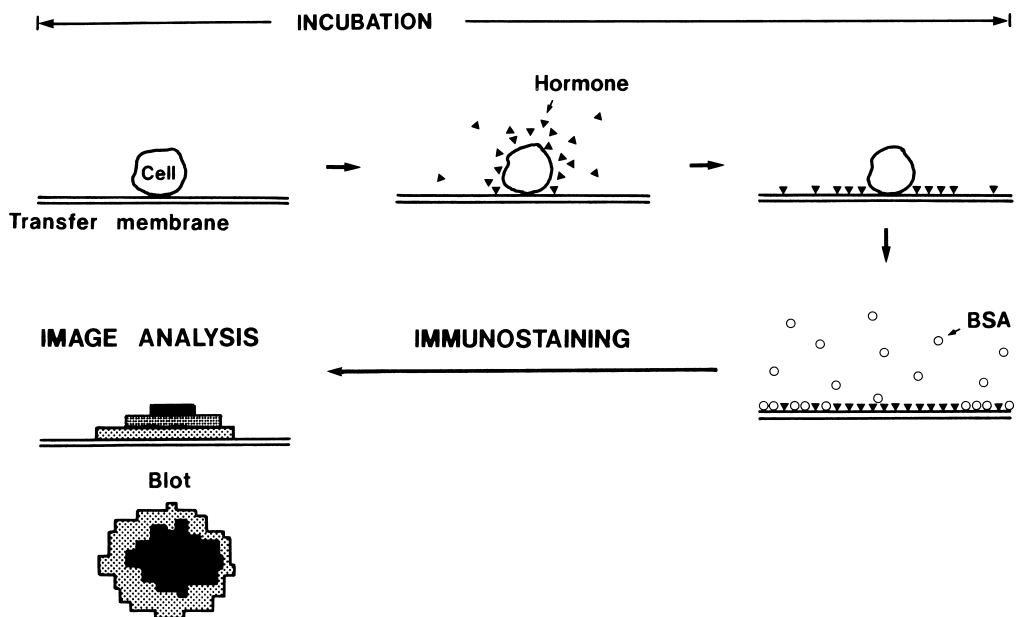


図1. CIBAの原理. 転写膜上にある分泌細胞から分泌された蛋白性ホルモンは転写膜に結合する. 転写膜にはまだ蛋白結合部位が残っているのを, これをBSAでブロックしてから, 免疫細胞化学法によって転写膜結合ホルモンを染色する. 文献8より引用.

CIBAに用いる抗血清量の数百倍に相当するものであり, このように多量の抗血清を使用するためには抗血清を自作する必要がある. 第2のRHPAの問題としては, 分泌量を同じ細胞から繰り返し定量することが困難であることが挙げられる. Frawleyら [6] は, RHPAを同じ細胞に対して2回連続して適用し, 成長ホルモンおよびプロラクチンの両者を分泌する細胞 (somatomammotroph) を同定することに成功しているが, このホルモン分泌の繰り返し測定も定性的なものに留まっている.

CIBAは1987年KendallとHymer [7]によって開発された測定方法であり, その特徴は, 高い蛋白結合能力を持ち, 機械的に強固で, 細胞に対して毒性を持たない, polyvinylidene difluoride製転写膜を使うことである. 分散細胞をこの転写膜の上に蒔くと, 分泌された蛋白分子が転写膜に吸着され, この吸着された分泌物を免疫染色によって高感度に検出する (図1). 転写膜上に現わ

れた顕微鏡的染色産物であるblotは画像解析システムを用いて解析し, そのblotの面積と平均濃淡レベルから単一細胞からの分泌物の量を定量する. この定量性と, 少量の抗血清しか必要としないことがCIBAがRHPAより優る点としてあげることができる. 一方, CIBAの短所としては, (1) 蛋白結合性転写膜を使用しているために蛋白性の分泌刺激因子が吸着されること, (2) 単一細胞にまで分散を心がけても一部複数個の細胞による細胞塊の混入が避けられず, この細胞塊の同定が困難であること, (3) 全細胞中の分泌細胞の割合が容易に知ることができないことが挙げられる. 我々はこの方法をいろいろな実験目的に応じて改良したものを使用している [8]. 具体的方法は引用文献 [9] に詳細に述べられている.

chamber CIBA

KendallとHymerによって開発されたCIBAでは, 湿潤化していない転写膜に細胞懸濁液をただ

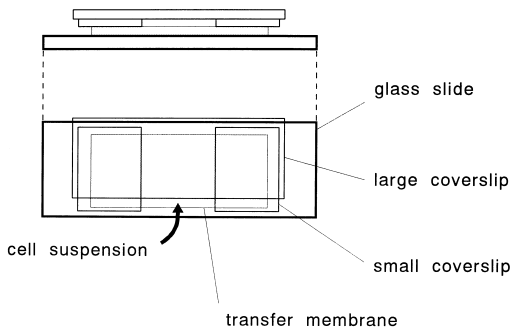


図2. chamber CIBAに使われるインキュベーションチャンバー。床は転写膜，天井は大型カバーガラスによってチャンバーが構成される。文献10より引用。

滴下していたので，懸濁液が球状化し，細胞が実際に転写膜上に付着するまでの時間に細胞間に大きな変動があった。この欠点を改善したのが，湿潤化転写膜上に大小3枚のカバーガラスを使って作成したインキュベーションチャンバーを使う chamber CIBA である (図2) [10]。この方法によって単一細胞からの分泌量を正確に定量することができる。以下に，下垂体前葉細胞からのプロラクチン分泌を測定する方法を示す。

【細胞分散】完全に単一細胞にまで分散することが必要であるが，逆に完全な分散を行うとしばしば細胞が障害を受けることがあるので，細胞分散方法の選択には注意を要する。下垂体前葉の場合，トリプシンと EDTA を併用する，Hopkins と Farquhar [11] の方法が適している。この方法は非常に高濃度のトリプシンを短時間作用させること，分散直前まで組織片の形を保ちながら，遠心を行わずに素早く溶液を交換することが特徴である。

- ① 摘出ラット下垂体前葉組織をかみそりの刃で細切する。
- ② 組織片を 0.5% trypsin (250U/ml protein, Worthington Biochemical) in DMEM containing 0.3% BSA で 37度 20分間インキュベーション。
- ③ 0.004% DNase で 1分間インキュベーション。

- ④ 0.1% trypsin inhibitor で 10分間インキュベーション。
- ⑤ 2 mM EDTA in Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free Hanks' balanced salt solution containing 0.3% BSA で 5分間インキュベーション。
- ⑥ 1 mM EDTA で 20分間インキュベーション。
- ⑦ 先端を丸くしたパスツールピペットで単一細胞になるまで，約 10分間分散。

【インキュベーションチャンバー作製】

- ① 5.2 × 2.2cm の大きさに切断した polyvinylidene difluoride 転写膜 (Immobilon, Millipore) をメタノールに 20秒間浸けて湿潤化した後，20 mM HEPES 含有 Earle's balanced salt solution で 60分間洗う。
- ② この転写膜を撥水面 (グリッドが見られる面) を上にしてスライドガラスの上に置く。これがチャンバーの床になる。
- ③ 小カバーガラス (18 × 24mm, 厚さ 0.14mm) 2枚を約 20mm 離して転写膜の上に置く。
- ④ 大カバーガラス (60 × 24mm) を小カバーガラスの上に置く。これがチャンバーの天井になる。この結果，面積約 360mm²，高さ 0.15mm，容積約 54 μl のインキュベーションチャンバーが作成される。

【インキュベーション】

- ① 6 × 10⁵ cells/ml の細胞懸濁液を 100 μl，毛細管現象を利用してインキュベーションチャンバーに流し込む。
- ② 乾燥を防ぐために水を張ったプラスチックボックスの中にこのチャンバーをいれ，さらにこのボックスを CO₂ インキュベーターに入れて適当時間インキュベーションする。
- ③ 定量用スタンダードとして，1枚の転写膜上に各種濃度のプロラクチン標準液 (0-500 pg in 50 nl TBS containing 0.8% Tween-20) を 1 μl マイクロシリンジ (MS-01, Itoh Manufactory) とプラスチック毛細管 (203G, Drummond Scientific) を使ってスポットし，細胞と同様にインキュベートする。
- ④ インキュベーション後，大型シャーレに満たした PBS 液中でスライドガラスを軽く揺りなが

らカバーガラスを除去する。

- ⑤転写膜を10% BSA in PBSに浸けた後、チャンバーの床に相当する転写膜の部分をハサミで切り取り、転写膜の4辺に小さな切り込みを入れて番号をふる。

【免疫染色】 ビオチン化2次抗体と streptavidin-alkaline phosphatase conjugate の組み合わせによって高感度にプロラクチンを検出する。免疫染色のバックグラウンドを抑えるために、抗体は10% normal donkey serum in solution containing 500 mM NaCl, 50 mM Tris, 0.5% Tween-20, 1% BSA, and 0.05% NaN₃ (Solution A) で希釈する。反応は全ての転写膜を一つのシャーレに入れて、室温でshakingしながら行う。各反応後は、TBS containing 0.1% Tween-20で20分間洗う。分泌量が多い場合や分解されにくい物質の場合は、①から④までの蛋白固定操作は省略することができる。

- ①転写膜を10% BSA in PBSで20分間インキュベーション。
- ②0.1 M phosphate bufferで3分間、3回洗う。
- ③4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate bufferで10分間転写膜を固定する。
- ④TBSで10分間、3回洗う。
- ⑤10% BSA in TBSで2時間、転写膜の蛋白未結合部位をブロッキングする。
- ⑥Solution Aで30分間インキュベーション。
- ⑦rabbit anti-rat prolactin (NIDDK IC-4, 1:60,000) in Solution Aで一晩インキュベーション。
- ⑧biotinylated anti-rabbit IgG (Amersham, 1:500) in Solution Aで40分間インキュベーション。
- ⑨streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (Amersham, 1:3,000) in Solution Aで40分間インキュベーション。
- ⑩酵素基質である nitro-blue tetrazolium (0.4 mg/ml, BRL), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (0.2 mg/ml, BRL) in diethanolamine buffer containing 5 mM MgCl₂ and 0.24 mg/ml levamisolで3-5分間インキュベーション。

- ①転写膜を蒸留水で水洗後、乾燥。

【画像解析】 顕微鏡の光源の明るさは不安定であるので、多数の染色転写膜の画像を入力する際には、時々補正用転写膜の画像の濃淡レベルが一定になるように光源を調節する必要がある。我々がCIBAを始めた1990年頃はカラービデオカメラ (KY-M280, Victor) と画像処理システム SPICCA (Olympus-Avionics) を使用していたが、現在は CCD デジタルカメラ (DP50, Olympus) と Adobe-Photoshop や NIH Imazing の廉価な機器によって画像解析が可能である。画像処理の手順を以下に示す。

- ①白黒入力画像の濃淡を反転する。光源の強さは背景画像の濃淡レベルが25-35になるようにする。
- ②顕微鏡およびカメラの光学系のムラによる入力画像の明暗変化をシェーディング補正する。実際には無染色の転写膜の画像を入力し、染色転写膜の画像からこれを減算する。
- ③各濃度のプロラクチン標準液をスポットした転写膜の画像を、①、②の操作の後、濃淡レベルを測定する。通常、15.6-500 pg/50 nlのスタンダードが約75-225の濃淡レベルを示す。これを基にスタンダード曲線を作成する。
- ④計測対象のプロット画像の濃淡レベルを、③で作成したスタンダード曲線のプロラクチン濃度に基づいた濃淡レベルに変換する。
- ⑤計測対象のプロット周辺のバックグラウンドの平均濃淡レベルを測定し、この平均濃淡レベルに一定値 (22-30) を加算した濃淡レベルを閾値とする。この閾値を使ってプロットの2値化像を作成する。
- ⑥この2値化像を使って、プロットの面積を求める。
- ⑦プロットの平均濃淡レベルから閾値を減算したものにプロット面積を乗算して、プロラクチン分泌量を求める。

この方法でラット下垂体前葉のプロラクチン分泌細胞からのプロラクチン分泌を定量すると、プロラクチン分泌細胞の大部分は0.4-0.9 pg/cell.hourのプロラクチンを分泌するが、最小

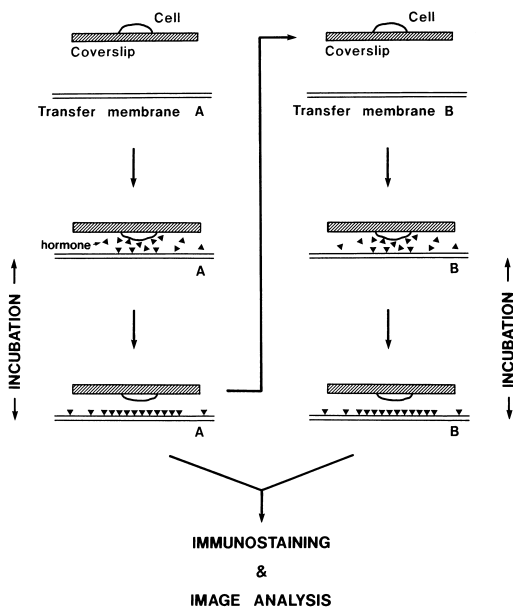


図3. sequential CIBAの概略。2回のインキュベーションで得られた転写膜A, Bを免疫染色, 画像解析に用いる。文献8より引用。

分泌細胞では0.03 pg, 最大分泌細胞では1.9 pgの分泌量を示し, 約60倍もの細胞間の分泌量の違いが見られる。プロラクチンはホルモンとして分泌されているため比較的分泌量が多いが, 下垂体で産生されている神経ペプチド substance Pは分泌量も非常に少ない。このようなペプチドの分泌も chamber CIBAで測定が可能であり, substance Pの平均分泌量は約30 fg/cellであった[10]。この下垂体前葉における substance Pの含量や mRNAは甲状腺摘出によって増加することが知られているが, 甲状腺摘出によって substance Pの分泌量も増加すること, この substance P分泌の増加は細胞当りの substance P分泌の増加によるものではなく, むしろ substance P分泌細胞の数の増加によることが chamber CIBAを使った実験によって明らかになった。

sequential CIBA

chamber CIBAを使うことによって単一細胞からの分泌量を定量することが可能になるが, 同じ

細胞の分泌量を繰り返し測定することはできない。この目的のために考案されたのが sequential CIBAである [12]。sequential CIBAでは分散後, 細胞をプラスチック製カバーガラスに約1週間程培養し, カバーガラスにしっかりと付着した細胞を準備する。この後, これらの細胞を転写膜上に重ねた状態でインキュベートし, 1回目のインキュベーション終了後, 新たな転写膜の上で2回目のインキュベーションを行う (図3)。インキュベーション時に使う培養液中の BSA濃度は重要で, 薄すぎると細胞がカバーガラスから剥離し, 濃すぎると分泌蛋白の転写膜への結合効率が低下することになる。この方法を使うことによって, 例えば分泌刺激を加える前後の分泌量を定量することが可能となり, ある細胞の分泌刺激に対する反応性を決定できる (図4)。以下に sequential CIBAの方法に関して chamber CIBAと異なる点を述べる。

- ①分散した下垂体細胞を 5×10^3 cells/mlの濃度で 2 ml, collagen-coated plastic coverslip (10 × 22mm, Celltight C1, Sumitomo Bakelite Medical)を入れた 35mm デイッシュに蒔き, 8-9日間 DMEM containing HEPES and 10% fetal bovine serumで培養する。
- ②1.8 × 3cmの転写膜に 20 μ lの DMEM containing HEPES and 0.04% BSAを滴下し, さらに細胞を培養した coverslipを細胞が転写膜の撥水面と接するように静かに置き, 適当時間インキュベーションする。
- ③インキュベーション後, 大型シャーレに満たした PBS液中で coverslipを軽く揺りながら転写膜から剥離する。
- ④②と③の操作を繰り返す。
- ⑤免疫染色後, 2回のインキュベーションで得られた転写膜上の, 同じ細胞に由来するプロットは, 転写膜上の位置, プロット分布パターンを比較することによって, また Giemsa染色した coverslipを転写膜に重ねることによって同定する。

我々はこの方法を使って視床下部由来の抑制性分泌刺激であるドーパミンに対するプロラクチン

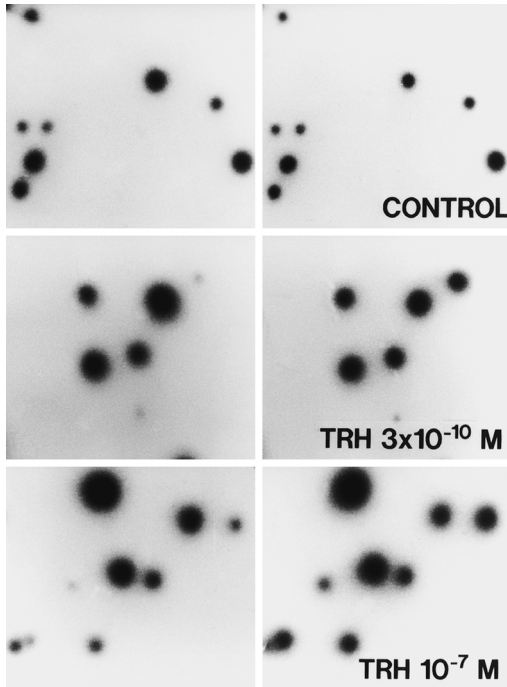


図4. 単一細胞レベルでのプロラクチン分泌に対するTRHの効果. 左側の3枚の転写膜は基礎分泌を, 右側の3枚の転写膜は0 (上段), 3×10^{-10} (中段), 10^{-7} M (下段) のTRHによる分泌を示す. 3×10^{-10} および 10^{-7} M のTRHによって, それぞれ1および4個の細胞からのプロラクチン分泌が増加する. 文献13より引用.

分泌細胞の分泌反応性を調べた [12]. その結果, プロラクチン分泌細胞のドーパミンに対する反応性に関して細胞間で数百倍の違いが存在すること, 約6%のプロラクチン分泌細胞はドーパミンに全く反応しないことがわかった. このような分泌刺激に対する反応性のheterogeneityは, 同じく視床下部由来の thyrotropin-releasing hormone (TRH) に対する反応性にも認められる [13]. TRHの最大刺激濃度においてもTRHに全く反応しないプロラクチン分泌細胞が約半数存在し, 基礎分泌レベルが低い細胞集団と比較して, 基礎分泌レベルが高い細胞集団にこのTRH無反応性プロラクチン分泌細胞が多く含まれていた (図5).

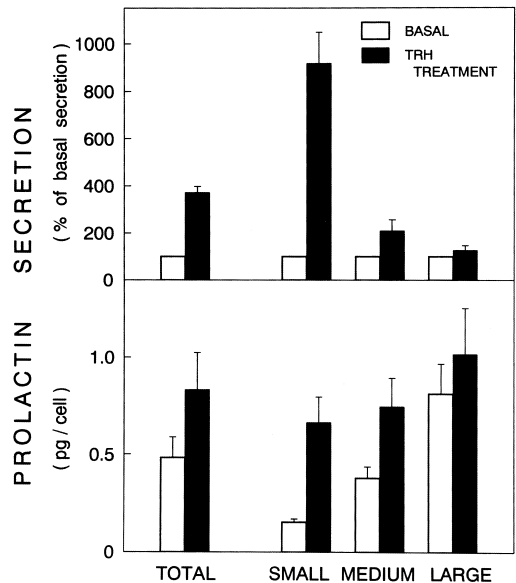


図5. プロラクチン分泌細胞のTRHに対する反応性. プロラクチン分泌細胞を基礎分泌量が少ない細胞群, 中程度の細胞群, 多い細胞群に分類した場合のTRHに対する反応性を示す. 少量分泌細胞群は相対的分泌量 (基礎分泌量を100%としたときのTRHによる分泌量) だけでなく (上段), 絶対的分泌量においてもTRHに著明に反応しているが (下段), 多量分泌細胞群はTRHに対してまったく反応していない. 文献13より引用.

sandwich CIBA

複数の分泌物を共分泌する細胞 (multiple secretor) が存在することが知られている. 事実, 下垂体前葉では成長ホルモンとプロラクチンを共分泌する somatomammotroph が sequential RHPA によって証明されている. このような multiple secretor の証明は, 上述した sequential CIBA において同じ細胞から得られた2枚の転写膜を異なる抗体で免疫染色することによっても可能であるが, 我々は, この multiple secretor を容易に, 同時に検出することが出来る CIBA を考案した (sandwich CIBA, 図6) [14]. 以下に sandwich CIBA の方法に関して chamber CIBA と異なる点を述べる.

- ①下層用の 40×28 mm と上層用の 30×18 mm の2種類の大きさの転写膜を用意する. 2枚の転

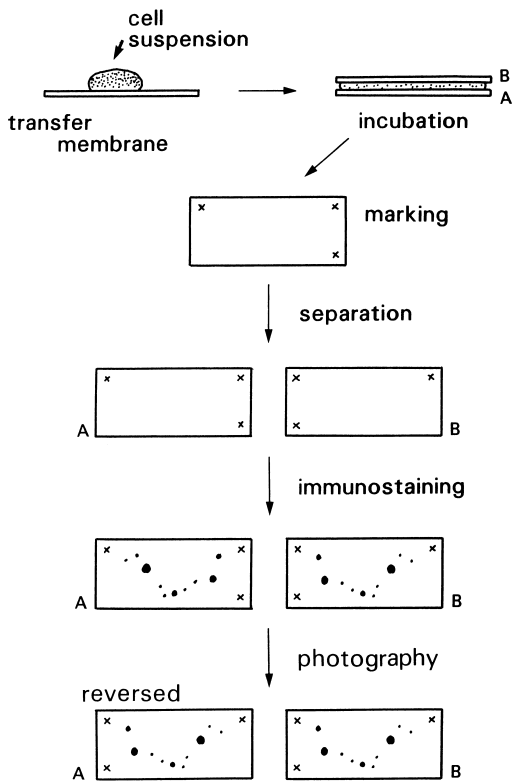


図6. sandwich CIBAの概略。2枚の転写膜を同じ抗体で免疫染色すると、プロットは2枚の転写膜上に鏡面像として位置する。これを撮影し、一方の転写膜の画像を左右逆転すると（写真撮影の場合、ネガフィルムを裏返しにして印画紙に焼く）、全く同じプロットの分布パターンが得られる。文献8より引用。

写膜の間で細胞懸濁液が均一に展開するように、使用直前にこれらの転写膜を Earle's balanced salt solution containing 0.0003% BSA に5秒間浸す。

- ②下層用転写膜を撥水面を上にしてスライドガラスの上に置いた後、30 μ lの細胞懸濁液をこの上に滴下する。次に上層用転写膜を撥水面を下してこの懸濁液の上に数センチの高さから落として、細胞懸濁液を2枚の転写膜で挟む。
- ③インキュベーション後、2本の縫い針を接するように保持してスライドガラス上の転写膜を刺

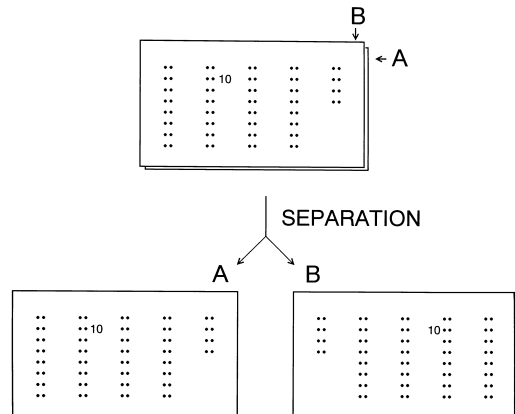


図7. sandwich CIBAにおける参照点の作成方法。2枚の転写膜に2本1組の針で36箇所に参照点を付ける。例えば10番目の参照点は2枚の転写膜上に鏡面像として位置する。文献14より引用。

すことによって、細胞の位置を同定するための参照点として2個一組の小穴（直径45 μ m）を36箇所に作る（図7）。

- ④上層転写膜と下層転写膜をPBS containing 10% BSA 中で静かに離し、その後それぞれの転写膜を異なる抗体で免疫染色する。
- ⑤染色した上層転写膜および下層転写膜の同じ参照点の周辺のプロットを撮影する。一方の転写膜の画像を左右逆転することによって、同じ細胞からの分泌物のプロットは上層および下層転写膜の画像において参照点を基準として同じ位置に観察されることになる。

我々はこの方法を利用して substance P を共分泌する下垂体前葉内分泌細胞を調べた結果、substance P を分泌する細胞は1種類ではなく、その約3/4は成長ホルモン分泌細胞で、残りの1/4はTSH分泌細胞であることことを明らかにした（図8）[14]。

本稿で情報伝達物質の分泌の単一細胞レベルでの解析方法を概説したが、産生の解析方法に関しては多くの手法が開発され、広く利用されている。例えば、免疫組織化学法によって細胞内に貯蔵された分泌物が、あるいは in situ hybridization 法によって mRNA が解析されている。特にこの二

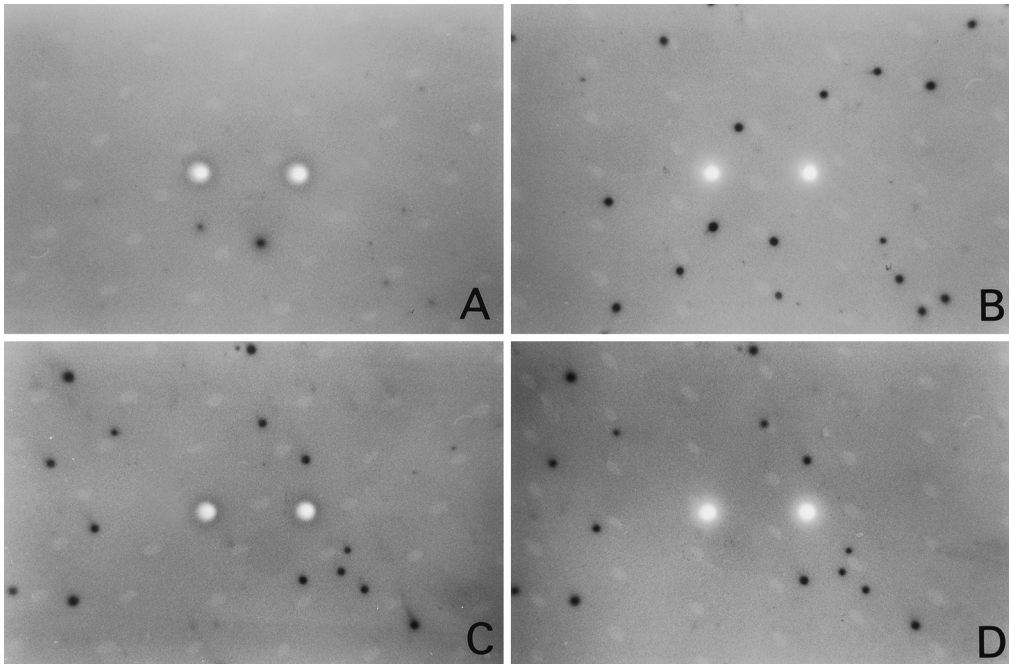


図8. sandwich CIBAによる substance P分泌細胞の同定. A, Bは同じ細胞から得られた2枚の転写膜で, Aは substance P抗体, Bは成長ホルモン抗体で免疫染色した. 2個の substance P分泌細胞は同時に成長ホルモン分泌細胞でもある. C, Dの2枚は positive controlとして両方とも成長ホルモン抗体で免疫染色したもので, プロットの位置が完全に一致していることがわかる. 2個の白点は参照点. 文献14より引用.

つの方法は、本稿で述べた単一細胞レベルでの分泌量の解析方法が細胞分散を必要としているのに対して、組織切片標本において可能であるという長所を持つ。また、電気生理学的実験に用いられた細胞を使って、その細胞が産生する物質を同定するために single cell PCR法が行われている。さらに、分泌物の遺伝子の転写活性をリアルタイムに、しかも単一細胞レベルで定量する方法として、luciferase reporter gene 活性を超高感度顕微鏡でモニターすることが報告されている [15]。このような単一細胞レベルでの分泌および産生の解析が今後も大いに必要とされるであろうし、この要求に応えるべく新しい方法が考案され、より簡便に単一細胞レベルでの解析が可能になることが期待される。例えば、現在、上述した luciferase reporter gene 活性は luciferin を基質とした発光反応を超高感度顕微鏡で観察することで検出してい

るが、luciferase の代わりに secreted alkaline phosphatase をリポーターとして用いれば、分泌された alkaline phosphatase を CIBA で用いた転写膜で捕捉した後、その酵素活性なり免疫活性を測定することによって、高価な超高感度顕微鏡を使用しなくても転写活性を単一細胞レベルで定量することが可能になるであろう。我々の夢は、同じような機能を持つ細胞として従来は十把一絡げにされていた細胞の集団の中で、それぞれの細胞の個性を認識し、これら個性を持つ細胞と細胞の間で交わされる cross-talk に耳を傾けることである。それは単なる眩きではなく、大きなうねりを招く叫びであるということを感じて。

文 献

1. Penner R & Neher E: The patch-clamp technique in the study of secretion. *Trends Neurosci* **12**: 159-163.

- 1989
2. Lundquist I, Ahren B, Hakanson R & Sundler F : Quinacrine accumulation in pancreatic islet cells of rat and mouse : Relationship to functional activity and effects on basal and stimulated insulin secretion. *Diabetologia* **28** : 161–166, 1985
 3. Breckenridge LJ & Almers W : Final steps in exocytosis observed in a cell with giant secretory granules. *Proc Natl Acad Sci USA* **84** : 1945–1949, 1987
 4. Neill JD & Frawley LS : Detection of hormone secretion from individual cells in mixed populations using a reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* **112** : 1135–1137, 1983
 5. Croxton TL, Ben-Jonathan N & Armstrong WM : Gonadotropin-releasing hormone induces oscillatory membrane currents in rat gonadotropes. *Endocrinology* **123** : 1783–1791, 1988
 6. Frawley LS, Boockfor FR & Hoefler JP : Identification by plaque assays of a pituitary cell type that secretes both growth hormone and prolactin. *Endocrinology* **116** : 734–737, 1985
 7. Kendall ME & Hymer WC : Cell blotting : a new approach to quantify hormone secretion from individual rat pituitary cells. *Endocrinology* **121** : 2260–2262, 1987
 8. Arita J : Analysis of the secretion from single anterior pituitary cells by cell immunoblot assay. *Endocrine J* **40** : 1–15, 1993
 9. Arita J : Protein and peptide secretion from individual cells : Measurement by cell immunoblot assay. *Neuroprotocols* **5** : 250–263, 1994
 10. Arita J, Kojima Y & Kimura F : Measurement of the secretion of a small peptide at the single cell level by the cell immunoblot assay : Thyroidectomy increases the number of substance P-secreting anterior pituitary cells. *Endocrinology* **132** : 2682–2688, 1993
 11. Hopkins CR & Farquhar MG : Hormone secretion by cells dissociated from rat anterior pituitaries. *J Cell Biol* **59** : 276–303, 1973
 12. Arita J, Kojima Y & Kimura F : Identification by the sequential cell immunoblot assay of a subpopulation of rat dopamine-unresponsive lactotrophs. *Endocrinology* **128** : 1887–1894, 1991
 13. Arita J, Kojima Y & Kimura F : Lactotrophs secreting small amounts of prolactin reveal great responsiveness to thyrotropin-releasing hormone : Analysis by the sequential cell immunoblot assay. *Endocrinology* **130** : 3167–3174, 1992
 14. Arita J, Kojima Y, Yamamoto I, Mazawa S & Kimura F : Somatotropes and thyrotropes in the rat anterior pituitary gland cosecrete substance P : Analysis by the sandwich cell immunoblot assay. *Neuroendocrinology* **60** : 567–574, 1994
 15. Castano JP, Kineman RD & Frawley LS : Dynamic monitoring and quantification of gene expression in single, living cells : A molecular basis for secretory cell heterogeneity. *Mol Endocrinol* **10** : 599–605, 1996