

X. フォルムアルデヒドの気道上皮

イオントランスポートに及ぼす影響

日本大学医学部第一内科学

馬島 徹

フォルムアルデヒドの気道上皮イオントランスポートに及ぼす影響

分担研究者 馬島 徹 日本大学医学部第一内科講師

研究要旨

シックハウス症候群の発症に関わる有機溶剤としてフォルムアルデヒド（FA）があり、気管支喘息の発作因子である非特異的刺激性物質の一つとして考えられている。気道上皮細胞は気道系における吸入ガスの第一作用部位であり、病態解明のために FA による気道上皮イオントランスポートに対する影響を検討した。ハートレイ系モルモットの気管を摘出し Ussing Chamber に装着し、Voltage clamp 法を用いて Short Circuit Current (Isc), Potential Difference (PD), Conductance (G) を測定した。粘膜側に FA を 0.1ppm, 1ppm, 10ppm 濃度を添加し、Isc の変化を測定した。Na⁺ channel blocker の Amiloride, Cl⁻ channel blocker の DIDS, DPC を粘膜側に投与、10 分間後に FA 10ppm を投与し Isc の変化を測定した。FA 1ppm では Isc の変化はみられず、10ppm では投与後 4 分をピークとする Isc の増加がみられた。Amiloride は Isc の増加に影響を与えなかった。DPC, DIDS は Isc の増加を抑制した。以上より FA は cAMP の産生あるいは細胞内 PKA を活性化し、また細胞内 Ca²⁺ 増加による Cl⁻ 分泌の亢進に関与する可能性が考えられた。

A. 研究目的

シックハウス症候群 (Sick House Syndrome; 以下 SHS) の発症に関わる有機溶剤としてフォルムアルデヒド (Formaldehyde; 以下 FA) があり、気管支喘息の発作因子である非特異的刺激性物質の一つとして考えられている。また、それ自体が気管支喘息の発症に関与することも示唆されている。気管支喘息は気道過敏性亢進、可逆性気道閉塞、好酸球性気道炎症を主徴とする疾患であり、FA の気道過敏性に対する影響についての報告は少ない。Swiecichowski ら [1] はモルモットに 3ppm の FA を 2 時間吸入させると気道収縮が起き、1ppm 以下の FA を数時間吸入させると気道収縮が惹起されることを報告している。また Ito ら [2] は人工換気下のラット FA を吸入させると気道知覚神経末端から神経ペプチド (サブスタンス P、ニューロキニン A など) が遊離され、SP, NKA が血管内皮細胞に分布するタキキニン NK1 受容体を

刺激して血管透過性亢進を来すことを報告している。また、FA による気道内腔への好中球浸潤と血漿漏出も知覚神経刺激を介して惹起されることや、FA が非特異的に気道上皮を剥離、傷害することを報告した。加えて、FA の反復暴露は FA による気道反応を有意に亢進させ、反復暴露の危険性を指摘している。気道上皮細胞は気道系における吸入ガスの第一作用部位であり、気管支喘息の発症や発作における重要な役割を果たしている。気道上皮細胞の機能にイオントランスポートがあり、気道水分分泌や電気生理学的変化に伴う神経原性炎症に関与すると考えられている。今回、SHS の病態解明のために FA による気道上皮イオントランスポートに対する影響を検討した。

B. 研究方法

1. 実験装置

1.1. Ussing Chamber

イオントランスポートの測定には Ussing Chamber を用いた Voltage Clamp 方法が用いられる。図 1 に Ussing chamber の構成図を示す。組織を 2 つの chamber の間にはさみ、それぞれの chamber は 95%O₂, 5%CO₂ を吹送平衡した Krebs-Henseleit 液 (Na⁺ 143.9, K⁺ 5.6, Ca²⁺ 1.9, Mg²⁺ 1.2, Cl⁻ 117.6, HCO₃⁻ 25.0, acetate⁻ 5.6, gluconate⁻ 3.8, H₂PO₄⁻ 1.3, SO₄²⁻ 1.3, glucose 5.6 (mM), 37°C, pH7.4; 以下 K-H 液) が粘膜側と漿膜側それぞれ別々に灌流している。

1.2. 短絡電流測定装置

日本光電社製短絡電流測定装置 (CEZ-9100) を用いた。chamber に 3M の KCl agar bridge を挿入し組織間の電位差 (PD) を測定する。また、0.9%NaCl agar bridge を用いて両 chamber 間に 10, 20 μ A の puls current を 1 秒間流し、その電位変化からオームの法則により組織の抵抗 (resistance) を求めた。膜電位固定法 (Voltage clamp 法) により短絡電流 (short-circuit current, Isc) を求めた。Isc とは PD を 0mV、すなわち電氣的に電気化学的濃度勾配 electro-chemical potential gradient を 0 にすることでイオンの受動輸送を除去した際に流れる電流量を意味し、これは net のイオン能動輸送の量を反映するものとされている。

2. 動物

ハートレイ系雄モルモット (300-400g) を用いた。

2.1. 麻酔

ネブタール腹腔内投与により麻酔した。

3. イオントランスポートの測定

麻酔後、モルモットを固定し、頸部を縦切開して気管を露出させた。甲状軟骨直下から気管分岐部直上までの気管を摘出した。気管を直ちに膜様部で縦切開し、氷冷した K-H 液で血液成分その他を除去した後に Ussing chamber にマウントした。95%O₂, 5%CO₂ で飽和した 37°C K-H 液を環流させ、voltage clamp 法を用いて Short Circuit Current (以下 Isc), Potential Difference (以下

PD), Conductance (以下 G) を経時的に測定した。Isc 測定には気管を chamber 装着後 30 分間静置し、base line の Isc が安定した後に、Isc が 5-15 μ A/cm² の気管を実験に使用した。

4. 各種薬剤に対する Isc の影響

4.1. FA のイオントランスポートに対する影響

粘膜側に FA を 0.1ppm, 1ppm, 10ppm 濃度を添加し、Isc の変化を測定した。

4.2. イオンチャンネルブロッカーの FA のイオントランスポートに対する作用

4.2.1. Na⁺チャンネルブロッカーの FA のイオントランスポートに対する作用

Isc が安定した後に Na⁺ channel blocker の Amiloride (10⁻⁴M),

4.2.2. Cl⁻チャンネルブロッカーの FA のイオントランスポートに対する作用

Isc が安定した後に Ca²⁺ dependent Cl⁻ channel blocker の 4,4'-diisothiocyanatostilbe-2,2'-disulfonic acid (DIDS) 10⁻⁴M, cAMP dependent Cl⁻ channel blocker の diphenylamine-2-carboxylate (DPC) 10⁻³M を粘膜側に投与、10 分間後に FA10ppm を粘膜側に投与し、Isc の変化を測定した。

C. 結果

1. FA のイオントランスポートに対する影響

FA 投与前の Isc はそれぞれ 0.1ppm 投与群は 10.35 \pm 7.17 μ A/cm², 1ppm 投与群は 10.46 \pm 2.30 μ A/cm², 10ppm 投与群は 10.95 \pm 2.63 μ A/cm² であり各群に差はみられなかった。FA0.1ppm 投与では緩徐な Isc の増加がみられた。FA 投与 20 分後、30 分後では 11.15 \pm 7.96 μ A/cm² であった。FA1ppm では Isc の変化はみられなかった。FA10ppm 投与では Isc は直後から増加し 4 分に最高値 13.14 \pm 3.80 μ A/cm² を示し、その後前値まで低下した。(図 2) FA による Isc に対する増加は 10ppm > 0.1ppm > 1ppm の順であった。

2. イオンチャンネルブロッカーの FA (10ppm) の

イオントランスポートに対する作用

図3にFA10ppm投与群、Amiloride前処置群、DPC前処置群、DIDS前処置群の結果を示す。

2.1. Na⁺チャンネルブロッカーのFAのイオントランスポートに対する作用

Na⁺ channel blockerであるAmiloride前投与によりIscは $13.7 \pm 5.60 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ から $10.1 \pm 4.10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ に低下した。Iscが安定した後にFA10ppmを粘膜側に投与し、2分後にIscは $13.4 \pm 5.50 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ に増加した。F10ppmA投与のIscと比較し有意な変化はみられず、直後のIscの増加に影響を与えなかった。

2.2 Cl⁻チャンネルブロッカーのFA(10ppm)のイオントランスポートに対する作用

Cl⁻ channel blockerであるDPC前投与によりIscは $11.6 \pm 3.670 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ から $8.20 \pm 3.20 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ に低下した。Iscが安定した後にFA10ppmを粘膜側に投与し、投与1分後に $8.20 \pm 3.20 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ まで低下し、その後増加し10分後には $7.10 \pm 3.30 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ と前値にまで回復した。DPC前投与によりIscは $14.3 \pm 4.10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ から $15.3 \pm 4.30 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ と変化はみられなかった。Iscが安定した後にFA10ppmを粘膜側に投与し、投与3分後には $10.7 \pm 4.30 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ と低下した。10分後では $11.0 \pm 4.20 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ であった。15分後では $8.3 \pm 5.00 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ と低下した。Iscは低下し抑制効果はDPCよりDIDSの方が強かった。

FA10ppm投与およびAmiloride前処置、DPC前処置、DIDS前処置後のFA10ppm投与によるIscの変化量(ΔIsc)を図4に示す。FA10ppm投与による ΔIsc は $3.80 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ であり、Amiloride前投与は $3.32 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ であった。DPC前投与では ΔIsc は $-0.20 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ であり、DIDS前投与では ΔIsc は $-2.20 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ であった。

D. 考察

SHSは住居が原因となって現れる愁訴や疾病の総称である。1970年代より欧米各地のいわゆる省エネビルで、ビルの所有者のみならず居住者から眩暈、吐気、頭痛、平衡感覚の失調、眼、鼻、咽

喉頭痛、粘膜や皮膚の乾燥感、咳、喘鳴などの呼吸器系の諸症状を訴える苦情がみられるようになり、州や国レベルでも問題となり、これらがSick Building Syndromeと提唱されるようになった。Sick House Syndromeはこれから派生した和製英語と思われる。近年、我が国においてもSHSが社会的にも問題となり注目をあびている。住宅の室内環境汚染によって生じる不快感や健康障害を指す。人体に影響のある化学物質の使用が直接の原因だが、背景には住宅の高気密化があると指摘されている。眼・鼻・咽頭粘膜の刺激症状、口唇などの粘膜乾燥、皮膚の紅斑、蕁麻疹、湿疹、易疲労感、頭痛、呼吸困難感・喘鳴などの呼吸器症状、めまい、悪心・嘔吐など多彩な症状を呈する。

室内空気を汚染する化学物質としては、合板の糊の防腐剤として使われるFAが有名だが、その外にも塗料や接着剤から出る有機溶媒、殺虫・防虫剤、防災加工剤等がある。人によって感受性が異なり、従来は安全とされた濃度で症状が出る「化学物質過敏症」も問題になっている。臭いとして人に感知できない物質も多数あるが、新築の室内に入ったときに感じる「臭い」はその端的な例である。こうした揮発性物質を総称して揮発性有機化合物(Volatile Organic Compound;以下VOC)と呼んでおり、室内のVOC濃度は換気の度合いにより大きく変わるが、気密性の高められた住宅やビルなどでは、こうしたVOCによる目や鼻、喉の痛み、喘息などのアレルギーが引き起こされ、これが「シックハウス(シックビル)症候群」として問題になっている。

VOCには多数種類があり、明確な定義がないが、一般にWHOによる沸点に基づく分類で、沸点50度から260度の有機物質をさす。FAは刺激臭を有し、低濃度においても検知され、その蒸気と溶液はヒトの皮膚および眼の刺激剤として知られている。FA暴露の一般的影響は、眼および上部気道の粘膜刺激により生ずる各種の症状である。FA0.05-0.06ppmが臭気閾値とされている。0.1ppmでは目への刺激、催涙性、上部気道への刺激で感じられる。1.0ppmでは臭いを感じ、10-

20ppm では咳や呼吸苦、頭重、心悸亢進がみられ、呼吸数の減少、気道抵抗の増加、コンプライアンスの減少が認められる。喘息患者では0.25~5ppmで発作が誘発されることが知られている。短期間の反復暴露(7-25mg/m³)は、細胞変性、炎症、壊死、扁平上皮化生、細胞増殖などの鼻腔上皮内組織の変化をもたらす。喘息患者では0.25-5ppmの濃度で発作を起こし得るといわれている。50ppm以上の濃度では肺の組織障害として肺胞隔炎、肺水腫を招来し死亡することもある。極めて高濃度のFA(120 mg/m³)では、ラットおよびマウスへの急性吸入暴露は流涎、呼吸困難、嘔吐、痙攣をきたし、死亡する。

FAの生体に及ぼす影響についてFA吸入は健康人の肺機能にも影響を及ぼすことが知られている。Flanklinら[3]は6歳から13歳の小児を対象にFA暴露と呼気中NO濃度を測定し、家庭でのFA濃度と相関し気道炎症をおこすことを報告している。Alexanderssonら[4]は職場でFAに被爆しても喘息症状を示さない労働者にFA0.36ppmを数時間吸入させたところ、1秒量が有意に2%の減少を示し、FA暴露を回避すると速やかに回復したことを報告している。また、Kriebelら[5]は10週間の解剖実習期間の医学部学生24名を対象に実習前後でPEFを測定している。解剖実習ではFA濃度は0.49-0.93ppmであり、週に3時間の実習を行い、PEFは2%の有意な低下を認め、FA暴露を回避するとPEFは速やかに回復したことを報告している。医療関係でもFAを取り扱う機会は多く、Kilburnら[6]は病理部門でFAを扱う技官の肺機能検査を調査し、緩徐であるが経年的に低下し、FAを扱わない対照群と比べ有意に肺機能検査所見が低下したことを報告している。これらの報告以外にもGreenら[7]やSauderら[8]はFA吸入により肺機能が低下したことを報告している。一方、Schachterら[9]は健康人に対するFA2ppmの40分間の吸入では上気道症状は認められたものの肺機能には影響を及ぼさなかったことを報告している。

FAの気管支喘息に及ぼす影響についての少数のケースリポートがあるが、これらがアレルギーに

よるものであるとは立証されず、その症状は刺激によるものと見なされた。健康人の肺機能の低下をもたらすと同時に、気管支喘息発作の誘発や悪化についても報告が見られている。Kryzanowskiら[10]は613名の成人と298名の小児を対象に、家庭内のFA濃度とPEFの相関を調査したところ、小児喘息群でPEFの有意な低下がみられたことを報告している。FA喘息と診断された看護婦にFA吸入誘発試験を実施したところ吸入2時間後から数時間以上に及ぶ遷延性の1秒量の低下を示した報告もある[11]。Nordmanら[12]は職業的にFAに暴露されている230名の喘息患者を対象にFA吸入誘発試験を実施したところ12名(5.2%)が陽性であり、そのうち8名に即時型の気道収縮を認めたと報告している。一方、Harvingら[13]はFA吸入により下気道症状を呈する気管支喘息患者15名に対しFA吸入による肺機能検査、気道過敏性試験を行ったが、いずれも有意な変化は見られなかったことを報告している。また、Frigasら[14]はFA喘息と診断された13名の患者にFA0.1-0.3ppmの20分間吸入吸入誘発試験を行ったが、陽性例はみられなかったと報告している。Krakowiak[15]は健康者と職場でFA暴露を受けている喘息患者に0.4ppmのFAを2時間吸入させたが、両群ともに気道収縮は惹起されなかったと報告している。FA喘息患者を対象にFA吸入誘発試験を実施した報告は散見されるが、喘息症状の発症、増悪にFA暴露が密接に関与していると考えられる症例であっても、結果としてFA吸入誘発試験の陽性率は低い。FA吸入誘発試験の実施方法が未だに標準化されていないことが要因として大きいと考えられる。結論は未だ確定的でないが、FAが気道刺激物質、またはアレルギーのいずれの作用を有するにしても、FAの直接的な気道収縮作用は微弱であり、むしろ強力な気道傷害、炎症惹起作用を有する可能性があることが考えられる。FAは気体としてだけでなく、水滴や微粒子に含まれて気道に侵入する場合があります。こうした形態で気道に侵入したFAは気道反応を引き起こしやすい可能性もある。Frigasら[14]は、FAガス吸入では気道収縮を認めないが、

FA を発生する微粒子の吸入で気道収縮が誘発された症例を報告している。FA の気道傷害に関する動物実験について、Ito ら[2]は全身麻酔、人工換気下のラット下気道に FA ガスを直接吸入させると、FA が強力に気道壁の血管透過性を亢進させることを報告している。機序として、FA が気道知覚神経末端から神経ペプチド（サブスタンス P、ニューロキニン A など）を遊離し、これらの物質が血管内皮細胞に分布するタキキニン NK1 受容体を刺激して血漿漏出が惹起されたと考察、また、FA による気道内腔への好中球浸潤と血漿漏出も知覚神経刺激を介して惹起されること、及び FA は非特異的に気道上皮を剥離、傷害することを報告した。加えて、FA の反復暴露は FA による気道反応を有意に亢進させたことも実験の上確認し、FA の反復暴露の危険性を指摘している。Swiecichowski ら[1]はモルモットに 3ppm の FA を 2 時間吸入させると気道収縮が起き、また、1ppm 以下の FA を数時間吸入させると気道収縮が惹起されると述べている。

気道上皮細胞の機能にはサイトカイン産生のほかに、イオントランスポートによる電気生理学的変化をもたらし、水分移動や気道炎症、気道収縮に関与している。さまざまな呼吸器疾患の病態において気道分泌が亢進することはよく知られている。気道粘液の成分は重量比で 95%以上が水分で、残りの 3%の蛋白、1%の脂質、1%のミネラルから構成されている[16]。気道における水分移動は気道上皮細胞によるイオントランスポートを介して行われている。図 5 に気道上皮細胞のイオントランスポートを示す。管腔側粘膜面には Na^+ チャンネル、 Cl^- チャンネルがあり、漿膜面には Na^+ - Cl^- ATPase、 Na^+ - K^+ - 2Cl^- 共輸送体、 K^+ チャンネルがあり、これらの働きによって Cl^- , Na^+ , K^+ が移動し、電気化学的勾配 (electrochemical potential gradient) が生じ、水分の移動が生じる[17]。1990 年に入ってから呼吸器領域でのイオンチャンネルの研究は嚢胞性線維症 (Cystic fibrosis; 以下 CF) の病態解明についての報告が多くみられている。1989 年に positional cloning によって CF の原因

となる遺伝子と、その産物の cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) が同定された[18]。イオントランスポートはさまざまなメディエーターなどによって変化し、気道炎症における気道内水分分泌に影響を与えている。ヒトやイヌの培養気道上皮細胞を用いた実験報告もみられ、細胞内伝達機構の解明も盛んに行われている[19]。

図 6 にイオンチャンネルを活性化する調節機構を示す。細胞外からのシグナルはその受容体と結合することにより、cAMP、 Ca^{2+} やジアシルグリセロール (DAG) などのセカンドメッセンジャーを産生、遊離している。これらのセカンドメッセンジャーは、cAMP 依存性プロテインキナーゼ A (PKA)、プロテインキナーゼ C (PKC) を活性化することにより、あるいはそれ自身によってチャンネルを活性化し、イオントランスポートを制御している[20]。ligand-receptor 結合により GTP 結合蛋白 (G 蛋白) が活性化される。effector enzyme が adenylyl cyclase 系のときは、アデノシン三リン酸 (ATP) から産生された cAMP が直接チャンネルを活性化する場合と、cAMP が cAMP 依存性 protein kinase A (PKA) を活性化し、チャンネルを活性化する場合がある。細胞内 cAMP を上昇させる物質の多くは管腔粘膜面からの Cl^- 分泌を亢進させており、また Na^+ の吸収も亢進させている[21] [22]。Welsh らは、 β 受容体に刺激が加わると G 蛋白が活性化され、アデニールサイクラーゼを刺激し、その結果細胞内の cAMP が増加し、 Cl^- 分泌が亢進することを明らかにした[23]。また、Vasoactive intestinal peptide (VIP) やアデノシンも受容体を介して cAMP を上昇させ、 Cl^- 分泌が亢進することが明らかとなっている[24] [25]。G 蛋白により活性化される effector enzyme が phospholipase C (PLC) である場合 (イノシトールリン脂質系) は、産生されたイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP3) によって細胞内小胞体から Ca^{2+} イオンが遊離され、それによって活性化されるチャンネルがある。またイノシトールリン脂質系では、DAG によって活性化される PKC がチャンネルをリン酸化し活性化することも明らかとな

っている。気道上皮細胞において、ブラディキニン(BK)はBK受容体と結合することによってG蛋白を介してIP₃が産生され、細胞内小胞体からのCa²⁺イオン遊離により、またDAGを介してPKCが活性化されCl⁻分泌が亢進することが報告されている[26]-[29]。Masonらは細胞外からのATP投与により細胞内Ca²⁺の上昇がみられ、Cl⁻チャンネルが活性化されると報告している[30]。気道上皮細胞が産生するプロスタグランدين(PG)もイオン輸送の重要な因子であり、TamaokiらはPG受容体を介してcAMPが上昇し、Cl⁻分泌亢進が生じることを報告している[31]。気管支喘息における気道炎症の重要な役割をはたしている血小板活性化因子(PAF)もCl⁻の分泌を亢進させている[32]。また、イオンチャンネルを活性化させる機序として、細胞内のpHの変化もイオントランスポートに影響を与えている[33]。そのほか膜電位や化学物質とは異なり、細胞膜の張力の変化や細胞の膨化などの機械的な刺激によって活性化されるチャンネルの存在や、Ca²⁺依存性漿膜側K⁺チャンネルの活性化による管腔側Cl⁻チャンネルの活性化が報告されている[34]。これに対し各種の非ステロイド系消炎鎮痛薬はCl⁻分泌を抑制することも報告されている[35]。

中枢気道における細胞内のNa⁺濃度は気道液のそれに比べ低いため、管腔側粘膜面のNa⁺チャンネルを通じて受動的に吸収される。細胞内に入ったNa⁺イオンは漿膜面のNaポンプ(Na⁺-K⁺ATPase)から漿膜側へ排出される。この時同時にK⁺イオンは細胞内に流入する。ここで生じた電気化学勾配により、漿膜面のNa⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体(cotransport)を介してNa⁺、K⁺、Cl⁻各イオンは細胞内に流入する。細胞内に入ったNa⁺イオンはNaポンプによって、K⁺イオンは漿膜面のK⁺チャンネルから排出される。一方、細胞内のCl⁻イオンは管腔側粘膜面のCl⁻チャンネルによって粘膜側に排出される。Na⁺とCl⁻によって作りだされる電気化学勾配によって水分移動が生じる。

Na⁺チャンネルは管腔側粘膜面に存在し、細胞内のNa⁺イオンの流入を調節している。Na⁺チャンネルは分子量約700KDの蛋白で、コンダクタ

ンスは5-10pSである。最近、Chinetらはコンダクタンス20pSのアミロライド感受性Na⁺チャンネルの存在も報告している[36]。Na⁺チャンネルはアミロライドによって障害される。Grahamらは、アミロライドの最大濃度を加えた後にもNa⁺イオンの流入が起こることを報告し、アミロライド感受性Na⁺チャンネルとアミロライド非感受性Na⁺チャンネルが存在し、これはcAMPやカルシウムイオノフォアで開口することを報告している[37]。Duszykらは、パッチクランプ法による実験でアミロライドによってブロックされるNa⁺チャンネルは低抵抗Na⁺チャンネルであることを報告している[38]。CFにおいてNa⁺の吸収亢進がみられている報告が多い[39][40]。しかし、Na⁺チャンネルの制御機構は未だ不明な点も多く、今後の研究が期待されている。また、他の蛋白によるチャンネル機能について、気道のインフルエンザウイルス感染時に上皮細胞に挿入されるM2蛋白がNa⁺チャンネル機能を有することも報告されている[41][42]。臨床ではCF患者にアミロライドの吸入が行われているが、Grahamらは5-hydroxytryptamineがアミロライド感受性Na⁺チャンネルからの流入を抑制し、今後臨床に応用される可能性を示唆している[43]。

Na⁺-K⁺ATPaseは漿膜面に存在し、ATPの加水分解を利用し、Na⁺イオンを漿膜側へ排出し、細胞内のNa⁺濃度を低く保ち、K⁺イオンを細胞内に流入させ、蓄積するポンプ作用を持っている。細胞内Na⁺濃度を低く維持することにより細胞内は外に対して負電位となる[44][45]。これらの変化がイオントランスポートの動力として準備されているわけである。Na⁺-K⁺ATPaseはウワバイン感受性であり、漿膜側へのウワバイン投与によりNa⁺吸収やCl⁻分泌は抑制される。Blandは、生後直ちに肺内の水分が吸収されるのはNa⁺-K⁺ATPaseの活性化が起きるためであると報告している[46][47]。

Na⁺-K⁺ATPaseが活性化されて生じた電気化学勾配によってNa⁺-K⁺-2Cl⁻cotransportを通じてNa⁺、K⁺、Cl⁻各イオンが細胞内に流入することが知られている[48]。また、Liedtkeらは、メデイ

エータの刺激に細胞内の cAMP は増加すると共に細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加により $Na^+-K^+-2Cl^-$ cotransport が活性化されることを報告している[49]。 $Na^+-K^+-2Cl^-$ cotransport はループ利尿剤のフロセミドやブメタナイドによって阻害される[50]。

Cl^- チャンネルは管腔側粘膜面に存在し、イオントランスポートや水分分泌の中心となる働きを持っている。現在までに2つのタイプの Cl^- チャンネルの存在が明らかとなっている。cAMP 依存性プロテインキナーゼによりチャンネル蛋白のリン酸化によって開口するチャンネルと、細胞内 Ca^{2+} 濃度によって制御されているチャンネルである。これ以外にも細胞容積の変化によって開口するチャンネル[51][52]、脱分極により活性化される outward rectifier Cl^- チャンネル[53]-[55]、G蛋白により活性化される Cl^- チャンネル[56]、細胞外ヌクレオチドにより直接制御される Cl^- チャンネル[57]、などの存在が報告されているが、まだ不明な点が多い。

cAMP 依存性プロテインキナーゼにより活性化される Cl^- チャンネルは細胞内 cAMP 濃度の上昇に伴って開くチャンネルである。CF の遺伝子と Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) Cl^- チャンネルが同定され、膜貫通型蛋白質であることが証明されている[58]。この蛋白質は種々の細胞に発現し、分子量は約 16800KD、コンダクタンスは 7-10pS の線形の電流電圧関係を示す Cl^- チャンネル機能を持つことが明らかとなっている[59][60]。CFTR は2つの細胞膜貫通構造(membrane spanning domain, MSD)、Rドメイン(regulatory domain)、2つの ATP 結合ドメイン(nucleotide binding domain, NBD1,2)の5つの機能ドメインから構成されている。Anderson らはイオントランスポートに参与しているのはこのうち MSD, NBD1 と Rドメインであることを報告している[61]。CFTR の構造は ATP 依存性膜輸送蛋白(ATP binding cassette superfamily, ABC スーパーファミリー)の構造に類似していることが明らかとなった[62]。この蛋白は ATP のエネルギーを利用して、細胞内外へ一方向性にイオンを輸

送する機能がある。Mcintosh らは CFTR は上皮細胞だけでなく線維芽細胞、マクロファージなどにも発現することを報告している[63]。Anderson らは、正常で CFTR を発現させた上皮細胞における cAMP 依存性チャンネルの陰イオンの透過性は $Br^- > Cl^- > I^- > F^-$ であるが、膜貫通部分のリジンを酸性アミノ酸に変化させると透過性順位は $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$ と変わることを報告し[64]、Rich らが Rドメインに相当する部分を取り除くと Cl^- チャンネルが開放されることを明らかにしたこと[65]、などから CFTR は Cl^- チャンネルそのものであると結論された。CFTR が Cl^- チャンネルとして機能する機序について、cAMP の刺激でプロテインキナーゼ A の活性化により、チャンネルの gate の役割を果たす Rドメインがリン酸化され、この状態で NBD に ATP が結合できるようになる。結合した ATP が加水分解されることによるエネルギーによって gate が開き、 Cl^- の受動的な動きが生じると考えられている[66]。このチャンネルは diphenylamine-2-carboxylate (DPC) により阻害される。

カルシウムイオノフォアや炎症性メディエーターによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により Cl^- チャンネルは活性化される。細胞内 Ca^{2+} の上昇は、管腔側粘膜面の Cl^- チャンネルを活性化すると同時に、漿膜面の K^+ チャンネルも活性化することが報告されている[67][68]。CFTR Cl^- チャンネルとは異なり、 Ca^{2+} によって活性化される Cl^- チャンネルが存在し、CF の気道上皮細胞にも存在することが証明されている[69][70]。このチャンネルは 4,4'-diisothiocyanatostilbe-2,2'-disulfonic acid (DIDS) によって選択的に阻害される。どのような機序によって細胞内 Ca^{2+} を介して Cl^- チャンネルが開くかは明らかとなっていないが、 Ca^{2+} 濃度の上昇により Ca-カルモジュリン依存性キナーゼ (CaM-キナーゼ) が活性化され Cl^- チャンネルが開くことが考えられている[71][72]が、まだ論議のあるところである[61]。

漿膜面の存在する K^+ チャンネルはイオントランスポートにおける Cl^- 分泌と Na^+ 吸収に重要な働きをしている。 K^+ チャンネルの活性化と管腔側

粘膜面の Cl⁻チャンネルの活性化は連動していることが証明されてきた。K⁺イオンは、Na⁺-K⁺ ATPase と Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter を通じて細胞内に入り、活性化された K⁺チャンネルから漿膜側に排出し、細胞内濃度の変化を防いでいる。K⁺チャンネルの活性化は細胞を過分極し、それにより粘膜側への Cl⁻イオン排出の駆動力を維持している。2つのタイプの K⁺チャンネルがある。一つは低コンダクタンス (約 20pS) の内向き整流型 (inward rectifier) の K⁺チャンネルで、K⁺の選択性が非常に高く、サソリ毒のカリブドトキシンにより障害される[73][74]。また Ba²⁺によっても障害される。またこのチャンネルは細胞内 Ca²⁺濃度により制御されており、非電位依存性 K⁺チャンネルである。もう一つは Kunzelmann らが報告した電位依存性の Ca²⁺依存性高コンダクタンス (約 150 pS) K⁺チャンネルである[75] [76]。1つの K⁺チャンネルは2種類以上の制御を受けていることが考えられ、細胞の膨化によりも活性化される K⁺チャンネルがある[77]。cAMP 上昇による短絡電流の変化は2相に分けられ、第1相の反応は K⁺チャンネルが活性化されて生じ、第2相の反応は Cl⁻チャンネルが PKA により活性化されることによる反応であると考えられている[78]。また、cAMP 依存性プロテインキナーゼにより制御される Ca²⁺非感受性でカリブドトキシン感受性 K⁺チャンネルの存在もみられる。

これらのイオンチャンネル、ポンプ、共輸送体の働きによって気道上皮細胞の水分輸送が機能している。呼吸器疾患においてもこれらの機能が異常を来すことが知られている。しかし、気管支喘息における気道上皮細胞のイオントランスポートについての報告はみられていない。また、シックハウス症候群における FA の今までの報告では気道上皮細胞への直接の作用についての報告はみられていない。今回の検討は、気道粘膜への FA の影響を検討するための実験であり、同様の検討を行った文献はみられない。

FA の気道上皮イオントランスポートに対する影響は高濃度(10ppm)で5分以内にみられる急激

な Isc の増加がみられた。これに対し 1ppm では Isc の変化はほとんど見られなかったが、0.1ppm では緩徐な Isc の増加がみられた。Ion channel blocker の FA10ppm によるイオントランスポートへの影響では、Na⁺ channel blocker 投与では FA 負荷後の Isc の急峻な増加に対して影響は与えなかった。Cl⁻ channel blocker である DPC, DIDS は FA 負荷による Isc の増加を抑制した。これは FA による Isc の増加は Cl⁻分泌亢進によるものと示唆された。

Cl⁻ channel には cAMP により活性化される channel と Ca²⁺により活性化される channel が代表的である。DPC は主に前者、DIDS は主に後者の channel の blocker であるとされている。これ以外にも、Cl⁻ channel には volume sensitive な channel や細胞浮腫などにより活性化される channel も存在する。Cl⁻ channel は cAMP や Ca²⁺により活性化されるが、cAMP の産生には adenylyl cyclase の活性化、また cAMP による protein kinase A(PKA)活性化などが関与している。Flanklin ら[3]は6歳から13歳の小児を対象に FA 暴露と呼気中 NO 濃度を測定し、家庭での FA 濃度と呼気中 NO 濃度は相関し、FA が気道炎症に関与していることを報告している。PKA の活性化が NOS をリン酸化し、気道上皮からの NO 産生を高めることが報告されている[79]。これらのことから、PKA は気道上皮における NO 産生・Cl⁻分泌作用両者への関与が示唆されている。今回の結果は FA は細胞内伝達機構のうち adenylyl cyclase の活性化、cAMP 産生亢進あるいは protein kinase A(PKA)活性化などに関与していることが示唆された。

E. 結語

今回の FA の気道上皮細胞イオントランスポートについての検討では、FA は気道上皮細胞上の Cl⁻ channel を活性化することが示唆された。また、FA は cAMP の産生あるいは細胞内 PKA を活性化に関与し、Cl⁻分泌の亢進に関与する可能性が考えられた。

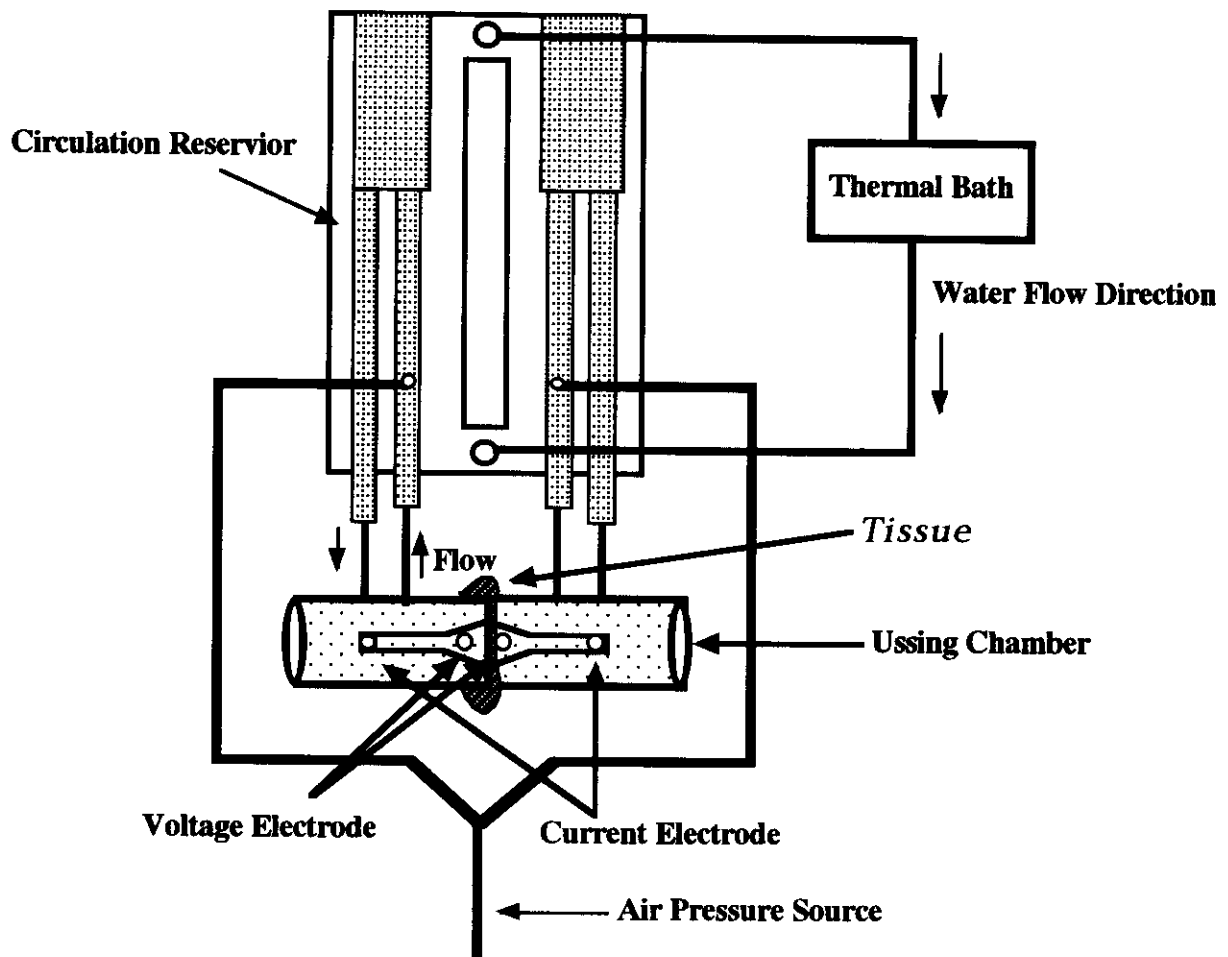


図 1 Ussing Chamber の構成図

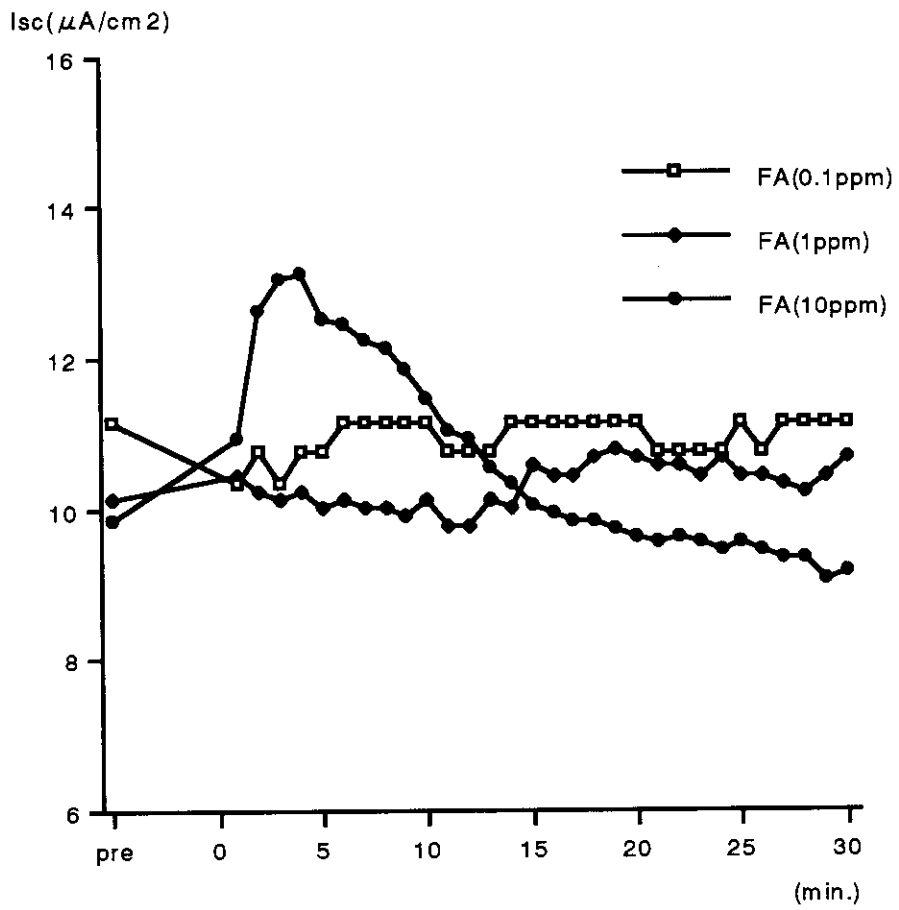


図2 フォルムアルデヒドのイオントランスポートに及ぼす影響

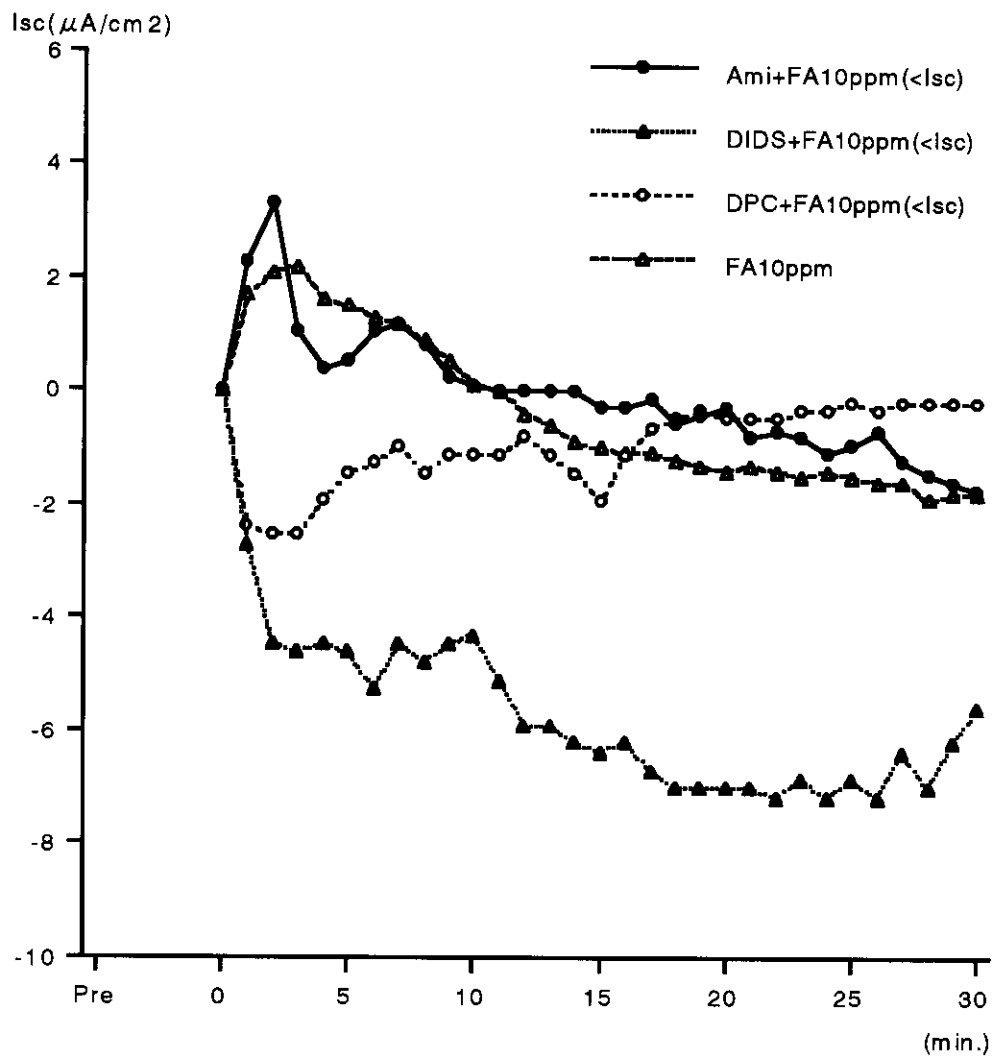


図3 Amiloride, DPC, DIDS の FA によるイオントランスポートへの影響

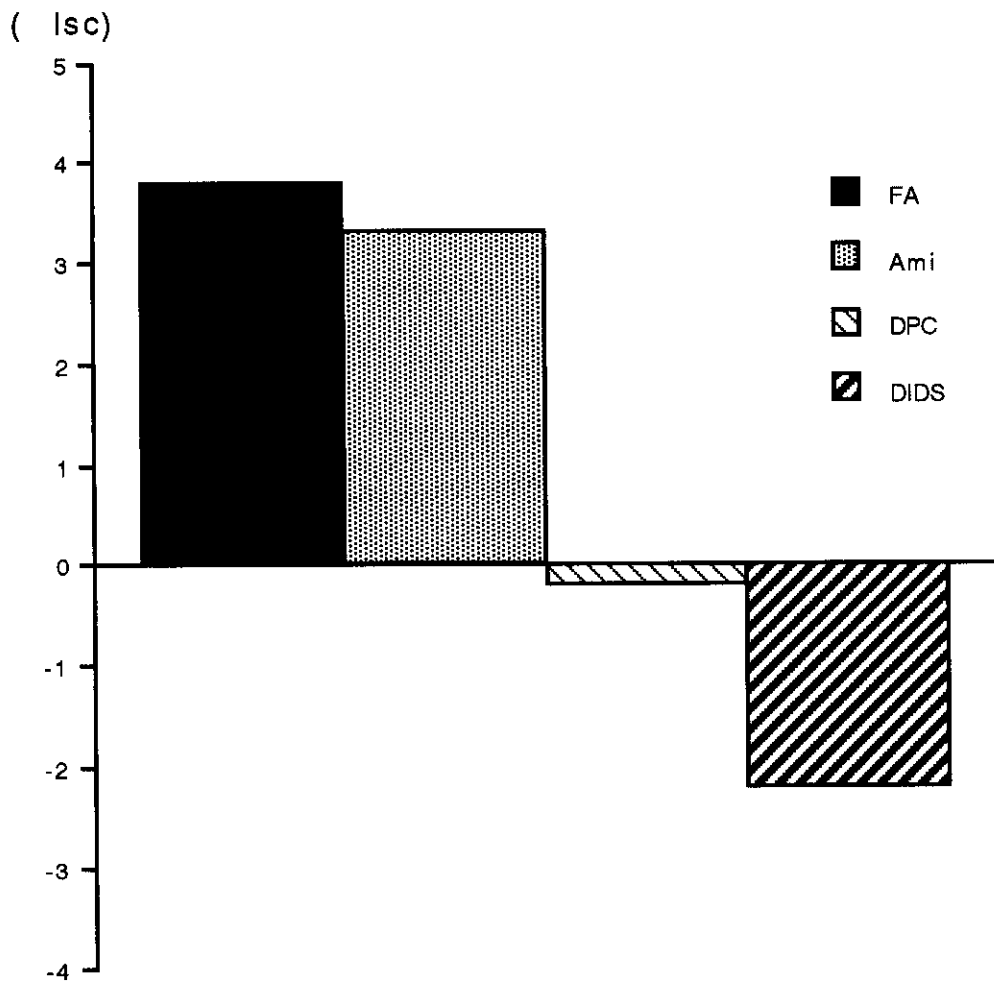


図4 Amiloride, DPC, DIDS 前処置の FA による Isc の変化量

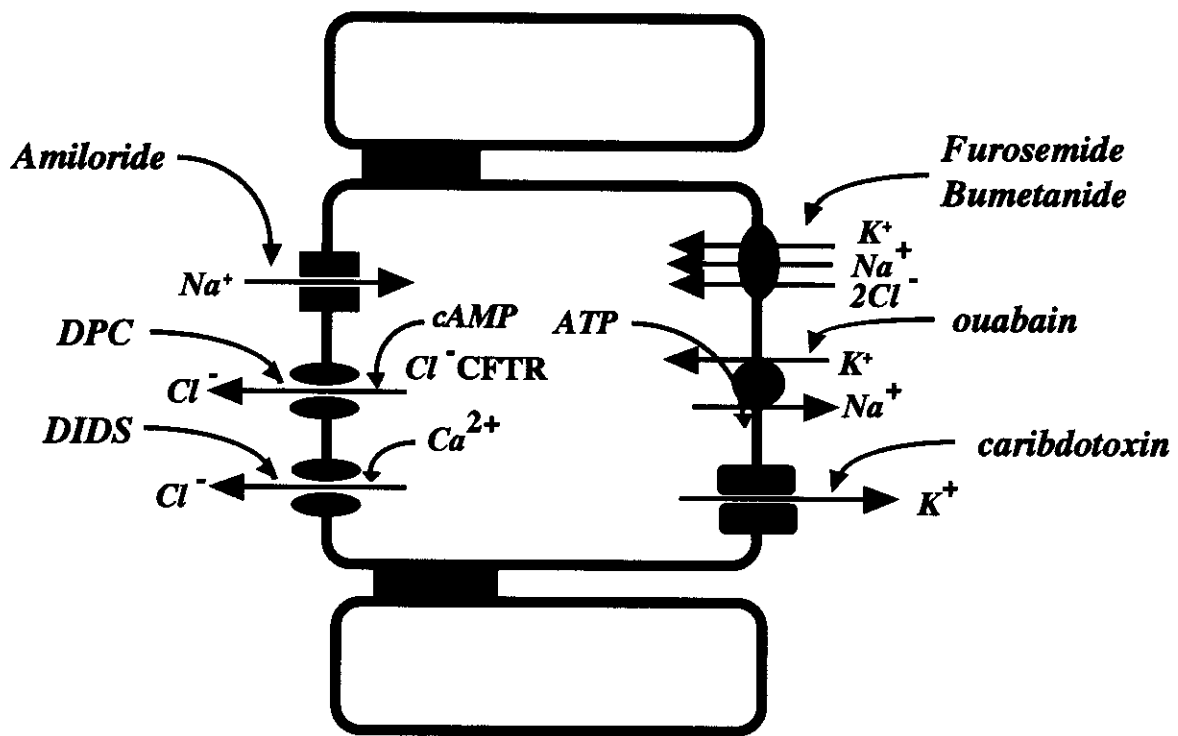


図5 気道上皮細胞におけるイオンランスポート

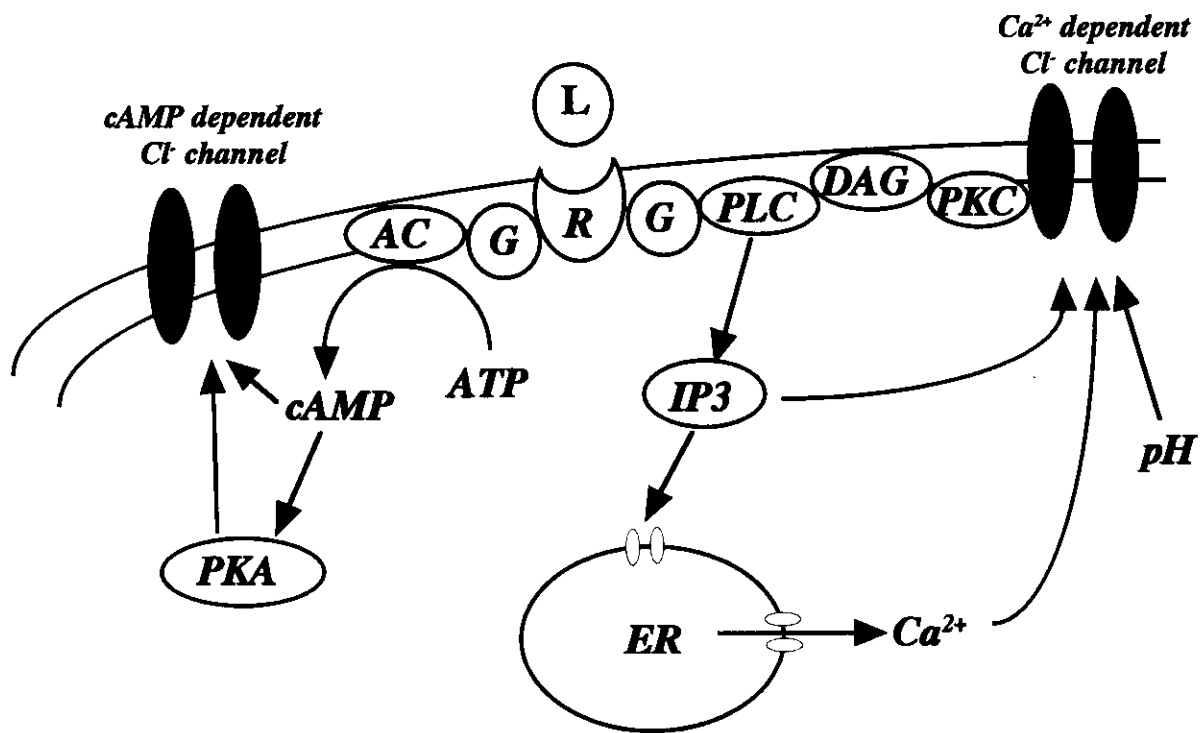


図6 Cl⁻チャンネルにおける細胞内伝達機構

R: receptor, L: ligand, G:G 蛋白, PKA: protein kinase A,

AC: adenylyl cyclase, PLC: phospholipase C, IP₃: イノシトール三リン酸,

ER: endoplasmic reticulum, DAG; diacylglycerol, PKC: protein kinase C

文献

- [1] Swiecichowski AL, Long KJ, Miller ML, et al. : Formaldehyde-induced airway hyperreactivity in vivo and ex vivo in guinea pigs. *Environ. Res.* 61:185-199,1993.
- [2] Ito K, Sakamoto T, Hayashi Y, et al. : Role of tachykinin and bradykinin receptors and mast cells in gaseous formaldehyde-induced airway microvascular leakage in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 307:291-298,1996.
- [3] Franklin P, Dingle P, Stick S : Raised exhaled nitric oxide in healthy children is associated with domestic formaldehyde levels. *Am.J.Res.Crit.Care Med.*161:1757-1759,2000.
- [4] Alexandersson R, Hedenstierna G, Kolmodin-Hedman B: Exposure to formaldehyde: effects on pulmonary function. *Arch. Environ. Health* 37:279-283,1982.
- [5] Kriebel D, Sama SR, Cocanour B : Reversible pulmonary responses to formaldehyde. A study of clinical anatomy students. *Am. Rev. Respir Dis.* 148:1509-1515,1993.
- [6] Kilburn KH, Warshaw R, Thornton JC : Pulmonary function in histology technicians compared with women from Michigan: effects of chronic low dose formaldehyde on a national sample of women. *Br. J. Ind. Med.* 46:468-472, 1989.
- [7] Green DJ, Sauder LR, Kulle TJ, et al.: Acute response to 3.0ppm formaldehyde in exercising healthy nonsmokers and asthmatics. *Am.Rev.Respir.Dis.*135 : 1261-1266,1987.
- [8] Sauder LR, Chatham MD, Green DJ, et al.: Acute pulmonary response to formaldehyde exposure in healthy nonsmokers. *J.Occup.Med.* 28:420-424, 1986.
- [9] Schachter EN, Witek TJJ, Tosun T, et al.: A Study of respiratory effects from exposure to 2ppm formaldehyde in healthy subjects. *Arch.Environ.Health* 41:229-239,1986.
- [10] Krzyzanowski M, Quackenboss JJ, Lebowitz MD : Chronic respiratory effects of indoor formaldehyde exposure. *Environ. Res.* 152:117-125,1990.
- [11] Hendrick DJ, Lane DJ : Formalin asthma in hospital staff. *Br. Med. J.*15:607-608,1975.
- [12] Nordman H, Keskinen H, Tuppurainen M: Formaldehyde asthma-rare or overlooked? *J. Allergy Clin. Immunol.* 75 : 91-99,1985.
- [13] Harving H, Korsgaard J, Pedersen OF, et al.: Pulmonary function and bronchial reactivity in asthmatic during low-level formaldehyde exposure. *Lung* 168:15-21,1990.
- [14] Frigas E, Filley WV, Reed CE : Bronchial challenge with formaldehyde gas: lack of bronchoconstriction in 13 patients suspected of having formaldehyde-induced asthma. *Mayo Clin. Proc.*59:295-299,1984.
- [15] Krakowiak A, Gorski P, Pazdrak K, et al. : Airway response to formaldehyde inhalation in asthmatic subjects with suspected respiratory formaldehyde sensitization. *Am. J. Ind. Med.* 33:274-281,1998.
- [16] Robinson NP, Kyle H, Webber SE, et al.: Electrolyte and other chemical concentration in the airway surface liquid and mucus secretion of the ferret trachea. *J.Appl.Physiol.* 66:2129-2135,1989.
- [17] Welsh MJ: Electrolyte transport by airway epithelia. *Physiol.Rev.* 67:1143-1184,

- 1987.
- [18] Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, et al.: Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073, 1989.
- [19] Widdicombe JH: Use of cultured airway epithelial cell in studies of ion transport. *Am.J.Physiol.* 258:L13-L14,1990.
- [20] Levitan IB: Phosphorylation of ion channels. *J.Membr.Biol.* 87:117-190, 1985.
- [21] Cullen JJ, Welsh MJ: Regulation of sodium absorption by canine tracheal epithelium. *J.Clin.Invest.* 79:73-79,1987.
- [22] Widdicombe JH, Kondo M, Mochizuki H: Regulation of airway mucosal ion transport. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* 94:51-61, 1991.
- [23] Welsh MJ: Adrenergic regulation of ion transport by primary cultures of canine tracheal epithelium: cellular electrophysiology. *J.Membr.Biol.* 91: 121-128,1986.
- [24] Nathanson I, Widdicombe JH, Barns PJ: Effect of vasoactive intestinal peptide on ion transport across dog tracheal epithelium. *J.Appl.Physiol.* 55:1844-1848, 1983.
- [25] Pratt AD, Clancy G, Welsh MJ: Mucosal adenosine stimulates chloride secretion in canine tracheal epithelium. *Am.J. Physiol.* 251:C167-C174,1986.
- [26] Smith JJ, McCann JD, Welsh MJ : Bradykinin stimulates airway epithelial Cl⁻ secretion via two second messenger pathways. *Am.J.Physiol.* 258:L369-L377, 1990.
- [27] Anderson MP, Welsh MJ: Isoproterenol, cAMP and bradykinin stimulate diacylglycerol production in airway epithelium. *Am.J.Physiol.* 258: L294-L300, 1990.
- [28] Clarke LL, Paradiso AM, Mason SJ, et al.: Effects of bradykinin on Na⁺ and Cl⁻ transport in human nasal epithelium. *Am.J. Physiol.* 262,C644-C655,1992.
- [29] Denning GM, Welsh MJ: Polarized distribution of bradykinin receptors on airway epithelial cells and independent coupling to second messenger pathways. *J.Biol.Chem.* 266:12932-12938,1991.
- [30] Mason SJ, Paradiso AM, Boucher RC: Regulation of transepithelial ion transport and intracellular calcium by extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Br.J.Pharmacol.* 103: 1649-1656,1991.
- [31] Tamaoki J, Kanemura T, Sakai N, et al.: Prostaglandin D₂ increases Cl⁻ secretion across canine tracheal epithelium through cyclo-oxygenase stimulation and cAMP production. *Acta Physiol. Scand.* 145:1-6, 1992.
- [32] Tamaoki J, Sakai N, Isono K, et al.: Effects of platelet-activating factor on bioelectric properties of cultured tracheal and bronchial epithelia. *J.Allergy Clin. Immunol.* 87:1042-1049, 1991.
- [33] Willumusen NJ, Boucher RC: Intracellular pH and its relationship to regulation of ion transport in normal and cystic fibrosis human nasal epithelia. *J.Physiol.(Lond.)* 455:247-269,1992.
- [34] Yamaya M, Ohrui T, Finkbeiner WE, et al.: Calcium-dependent chloride secretion across cultures of human tracheal surface epithelium and glands. *Am.J.Physiol.* 265:L170-L177,1993.
- [35] Mochizuki H, Morikawa A, Tokuyama K, et al.: The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the electrical properties of cultured dog tracheal

- epithelial cells. *Eur.J.Pharmacol.* 252:183-188,1994.
- [36] Chinet T, Fullton J, Yankaskas J, et al.: Characterization of sodium channels in the apical membrane of nasal epithelial cells (abstract). *Am.Rev.Respir.Dis.* 141: A164, 1990.
- [37] Graham A, Steel DM, Alton EW, et al.: Second-messenger regulation of sodium transport in mammalian airway epithelia. *J.Physiol. (Lond.)* 453:475-491,1992.
- [38] Duszyk M, French AS, Man SFP: Cation channels in normal and cystic fibrosis human airway epithelial cells. *Biomed.Res.* 12:17-23,1991.
- [39] Jiang C, Finkbeiner NE, Widdcombe JH, et al.: Altered fluid transport across airway epithelium in cystic fibrosis. *Science* 262: 424-427,1993.
- [40] Smith JJ, Karp AM, Welsh MJ: Defective fluid transport by cystic fibrosis airway epithelia. *J.Clin.Invest.* 93:1307-1311, 1994.
- [41] Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA: Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69:517-528,1992.
- [42] Majima T, Jacoby DB: Epithelial ion transport in virus-infected airways. - Responses to isoproterenol and amantadine. *Am.Rev.Respir.Dis.* 147: A431, 1993.
- [43] Graham A, Alton EW, Geddes DM: Effects of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptamine receptor agonists on ion transport across mammalian airway epithelia. *Clin.Sci.Colch.* 83:331-336,1992.
- [44] Willumsen NJ, Boucher RC: Sodium transport and intracellular sodium activity in cultured human nasal epithelium. *Am.J. Physiol.* 261:C319-C331,1991.
- [45] Duszyk M, French AS: An analytical model of ionic movements in airway epithelial cells. *J.Theor.Biol.* 151:231-247,1991.
- [46] Bland RD: Lung epithelial ion transport and fluid movement during the perinatal period. *Am.J.Physiol.* 259:L30-L37,1990.
- [47] Bland RD, Nielson DW: Developmental changes in lung epithelial ion transport and liquid movement. *Annu.Rev.Physiol.* 54:373-394, 1992.
- [48] Fong P, Chao AC, Widdicombe JH: Potassium dependence of Na-Cl cotransport in dog tracheal epithelium. *Am.J.Physiol.* 261:L290-L295, 1991.
- [49] Liedtke CM: Regulation of chloride transport in epithelia. *Annu.Rev. Physiol.* 51:143-160,1989.
- [50] Chao AC, Widdicombe JH, Verkman AS : Chloride conductive and cotransport mechanisms in cultures of canine tracheal epithelial cells measured by an entrapped fluorescent indicator. *J.Membr.Biol.* 113: 193-202, 1990.
- [51] Solc CK, Wine JJ : Swelling-induced and depolarization-induced Cl⁻ channels in normal and cystic fibrosis epithelial cells. *Am.J.Physiol.* 261, C658-C674,1991.
- [52] Chan HC, Goldstein J, Nelson DJ : Alternate pathways for chloride conductance activation in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am.J. Physiol.* 262:C1273-C1283,1992.
- [53] Egan M, Flotte T, Afione S, et al. : Defective regulation of outwardly rectifying Cl⁻ channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature* 358:581-584,1992.
- [54] Krick W, Disser J, Hazama A, et al. : Evidence for a cytosolic inhibitor of epithelial chloride channels. *Pflugers Arch.* 418,491-499,1991.

- [55] Tabcharani JA, Hanrahan JW : On the activation of outwardly rectifying anion channels in excised patches. *Am.J.Physiol.* 261:G992-G999, 1991.
- [56] Tilly BC, Kansen M, Van-Gageldonk PG, et al. : G-proteins mediate intestinal chloride channel activation. *J.Biol.Chem.* 266:2036-2040,1991.
- [57] Stutis MJ, Chinet TC, Mason SJ, et al. : Regulation of Cl⁻ channels in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells by extracellular ATP. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:1621-1625, 1992.
- [58] Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem et al. : Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245:1059-1065,1989.
- [56] Tilly BC, Kansen M, Van-Gageldonk PG, et al. : G-proteins mediate intestinal chloride channel activation. *J.Biol.Chem.* 266:2036-2040,1991.
- [57] Stutts MJ, Chinet TC, Mason SJ, et al. : Regulation of Cl⁻ channels in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells by extracellular ATP. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:1621-1625, 1992.
- [58] Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem et al. : Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245:1059-1065,1989.
- [59] Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, et al. : Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 347:358-363,1990.
- [60] Bear CE, Li CH, Kartner N, et al. : Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* 68: 809-818,1992.
- [61] Anderson MP, Sheppard DN, Berger HA, et al. : Chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis airway and intestinal epithelia. *Am.J. Physiol.* 263:L1-L14, 1992.
- [62] Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, et al. : Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346: 362-365,1990.
- [63] Macintosh I, Cutting GR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and the etiology and pathogenesis of cystic fibrosis. *FASEB J.* 6:2775-2782, 1992.
- [64] Anderson MP, Gregory RJ, Thompson DW, et al. : Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253:202-205,1991.
- [65] Rich DP, Gregory RJ, Anderson MP, et al. : Effect of deleting the R domain on CFTR-generated chloride channels. *Science* 253:205-207,1991.
- [66] Anderson MP, Welsh MJ : Regulation by ATP and ADP of CFTR Cl⁻ channels that contain mutant nucleotide binding domains. *Science* 257:1701-1704,1992.
- [67] Paradiso AM, Cheng EH, Boucher RC : Effects of bradykinin on intracellular calcium regulation in human ciliated airway epithelium. *Am.J.Physiol.* 261:L63-L69,1991.
- [68] CLANCY,J.P., McCANN,J.D., LI,M., et al.: Calcium-dependent regulation of airway epithelial chloride channels. *Am.J.Physiol.* 258:L25-L32,1990.
- [69] Cliff WH, Frizzell RA : Separate Cl⁻ conductances activated by cAMP and Ca²⁺ in Cl⁻ secreting epithelial cells. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* 87:4956-4960, 1990.

- [70] Anderson MP, Welsh MJ : Calcium and cAMP activate different chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis epithelia. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA* 87:6003-6007,1991.
- [71] Worrel RT, Frizzell RA : CaMKII mediates stimulation of chloride conductance by calcium in T84 cells. *Am.J.Physiol.* 260:C877-C882,1991.
- [72] Wagner JA, Cozens AL, Schulman H, et al. : Activation of chloride channels in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells by multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Nature* 349: 793-796,1991.
- [73] McCann JD, Matsuda J, Garcia M, et al. : Basolateral K⁺ channels in airway epithelia. I. Regulation by Ca²⁺ and block by charybdotoxin. *Am.J.Physiol.* 258: L334-L342,1990.
- [74] McCann JD, Welsh MJ : Basolateral K⁺ channels in airway epithelia. II. Role in Cl⁻ secretion and evidence for two types of K⁺ channel. *Am.J.Physiol.* 258:L343-L348, 1990.
- [75] Kunzelman K, Pavenstadt H, Greger R : Characterization of potassium channels in respiratory cells. I. General properties. *Pflugers Arch.* 414:291-296,1989.
- [76] Kunzelman K, Pavenstadt H, Greger R : Characterization of potassium channels in respiratory cells. II. Inhibitors and regulation. *Pflugers Arch.* 414:297-303, 1989.
- [77] Butt AG, Clapp WL, Frizzell RA : Potassium conductances in tracheal epithelium activated by secretion and cell swelling. *Am.J.Physiol.* 258:C630-C638,1990.
- [78] Hartman T, Kondo M, Mochizuki H, et al. : Calcium-dependent regulation of Cl⁻ secretion in tracheal epithelium. *Am.J. Physiol.* 262:L163-L168,1992.
- [79] Tamaoki J, Kondo M, Takemura H, et al: Cyclic adenosine monophosphate-mediated release of nitric oxide from canine cultured tracheal epithelium *Am.J.Res.Crit.Care Med.* 152:1325-1330, 1995.