

肺サーファクタントの機能に及ぼす血清と終末呼気 陽圧換気の影響

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4586

肺サーファクタントの機能におよぼす 血清と終末呼気陽圧換気の影響

金沢大学医学部医学科麻酔・蘇生学講座 (主任: 小林 勉教授)

加 畑 千 春

急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) では、蛋白質成分に富む水腫液が肺胞腔に浸出し、肺サーファクタントの性状が変化する。ARDS 患者の治療には、終末呼気陽圧 (positive end-expiratory pressure, PEEP) を付加して呼吸管理が行なわれている。しかし、水腫液と混合したサーファクタントの機能に対し、PEEPがどのような影響を与えるかは明らかになっていない。今回著者は、まず、加工天然サーファクタント (modified natural surfactant, MNS, ブタ肺から抽出したリン脂質と疎水性サーファクタント蛋白質を主成分とするもの) をウサギの血清または酢酸リンゲル液に分散したのにつき、物理化学的な表面活性の変化を見るため、気泡拍動法により最小表面張力 (minimum surface tension, γ_{\min}) を測定した。次いで、これらの分散液を自己のサーファクタントが欠如しているウサギ未熟胎仔の気道に注入し、圧制御式人工呼吸下での換気量を測定した。血清に分散した2mg/mlのMNSの γ_{\min} は、酢酸リンゲル液に分散したものより有意に ($P < 0.05$) 高値であった (40.4mN/m vs 2.7mN/m)。また、PEEPを付加しないで換気を行なった動物では、血清に分散した24mg/mlのMNSは、酢酸リンゲル液に分散したものに比べて有意に小さい換気量しか発現しなかった (7.5 ± 1.6 ml/kg vs 14.9 ± 2.3 ml/kg, $\bar{x} \pm$ SEM)。すなわち、血清はサーファクタントの表面活性を阻害するとともに、PEEPを付加しない場合には生体内でもサーファクタントの機能を障害すると結論された。しかし、2.5cmH₂OのPEEPを付加して換気を行なった場合には、血清に分散した2mg/mlのMNSが、酢酸リンゲル液に分散したものに比べて有意に大きい換気量を発現させた (14.1 ± 1.9 ml/kg vs 4.2 ± 1.7 ml/kg)。すなわち、血清はサーファクタントの表面活性を阻害するが、PEEPを付加した場合には生体内でのサーファクタントの機能を増強するという相反現象生じた。この相反現象は、MNSをアルブミン溶液 (40mg/ml) に分散した場合にも認められたが、グロブリン溶液 (20mg/ml) に分散した場合には認められなかった。以上の所見より、アルブミンは相反現象をもたらす主な物質の1つであると考えられた。また、PEEPを付加した換気を行なった場合の生体内でのサーファクタントの機能は、表面張力計による所見と異なる場合があると結論された。今後、ARDS患者の治療を進展させるためには、サーファクタント、アルブミンおよびPEEPの3者の相互作用をさらに解明する必要があると考えられる。

Key words albumin, globulin, positive end-expiratory pressure, pulmonary surfactant, serum

肺サーファクタントは、肺胞の気液界面に吸着膜を形成して表面張力を減弱させる作用 (表面活性作用) を有し、換気力学を正常に保っている物質である。急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) では、肺毛細血管の透過性が亢進し、血液中の様々な物質が水腫液として肺胞に浸出して肺サーファクタントを希釈する¹⁾²⁾。さらに、Wilhelmy型および気泡拍動型などの表面張力計を用いた物理化学的測定では、血液由来のアルブミン、グロブリン、フィブリノーゲン、ヘモグロビンなどの蛋白質は、サーファクタントの活性を阻害することが知られている^{3)~11)}。したがって、水腫液による肺サーファクタントの希釈と活性阻害は、ARDSにおける呼吸不全の一つの原因であると考えられている^{12)~14)}。

しかし、物理化学的所見のみから、生体内での肺サーファクタントの作用を判定できるという確証はない。とくに、ARDSの患者に用いられる呼気終末陽圧 (positive end-expiratory

pressure, PEEP) を併用した人工呼吸下で、肺サーファクタントの物理化学的所見と生理機能が一致するか否かについては、十分な検討が行なわれていない。今回著者は、加工天然サーファクタント (modified natural surfactant, MNS) を血清に混合した試験液の物理化学的特性 (動的表面張力) と、その試験液をサーファクタント欠如動物 (ウサギ未熟胎仔) の肺内に投与して人工呼吸を行った際の換気力学との関係につき、PEEPの有無に重点を置いて検討した。さらに、MNSをアルブミンおよびグロブリン溶液に混合したものについても、同様の検討を行なった。

材料および方法

I. 試料の調整

1. MNS

MNSは、ブタの肺胞洗浄液から抽出した。まず、洗浄液中

平成12年11月27日受付, 平成13年1月16日受理

Abbreviations : ARDS, adult respiratory distress syndrome; MNS, modified natural surfactant; PEEP, positive end-expiratory pressure; γ_{\max} , maximum surface tension; γ_{\min} , minimum surface tension

の細胞成分を遠心 (150 × g, 10分間) で除去し, 次いで上清を再び遠心 (2000 × g, 1時間, 4℃) して沈渣 (白濁層) を得た. 白濁層にクロロホルムとメタノール (体積比2:1) の混合液を加え, 脂質分画を抽出した¹⁵⁾. さらに0.5%の食塩水を用いた Folch 洗浄¹⁶⁾で精製したうえ, アセトン沈殿法により中性脂質やコレステロールを除去したものをMNSとし, 凍結乾燥して保存した. なおMNSは, 98.0%のリン脂質, 0.9%の脂肪酸と中性脂質, および1.1%の疎水性のサーファクタント蛋白BおよびC (surfactant protein BおよびC, SP-BおよびSP-C) より成り立っているものである¹⁷⁾. (表1)

2. 血清

成熟ウサギ (日本白色種) から抗凝固薬を用いずに採取した動脈血を自然凝固させた後, 遠心して血清成分を得た. 得られた血清は, 電解質濃度をABL 600 (Radiometer, Copenhagen,

Denmark) で, 蛋白質含有量をClinalyzer JCA-MS24 (日本電子, 東京) で, リン脂質含有量をPhospholipid-Test-Wako (和光純薬, 大阪) で測定し, -75℃で保存した.

3. アルブミンおよびグロブリン溶液

アルブミン溶液としては, ウサギ血清から採取された乾燥粉末状のアルブミンA-0764 (Sigma Chemical, St. Louis, USA) を酢酸リンゲル液 (日研化学, 東京) に溶解し40mg/mlの濃度にしたものを用意した. グロブリン溶液としては, 同じくウサギ血清から採取された乾燥粉末状の免疫グロブリンG (IgG) G-2018 (Sigma Chemical) を酢酸リンゲル液に溶解し40mg/mlの濃度にしたものを用意した. なお, これらのタンパク質溶液中のリン脂質の含有量を, 血清の場合と同様の方法で測定した.

4. 各種試験液

前述の血清, アルブミン溶液, グロブリン溶液および酢酸リンゲル液のそれぞれに MNSを2mg/mlまたは24mg/mlとなるように分散させた試験液を作成した. すなわち, 血清に2mg/mlの濃度でMNSを分散させた試験液をS/MNS-2とし, 24mg/mlの濃度で分散させた試験液をS/MNS-24とした. 同様に, アルブミン溶液, グロブリン溶液および酢酸リンゲル液のそれぞれにMNSを2mg/mlの濃度で分散させたものを, A/MNS-2, G/MNS-2およびR/MNS-2とした. また, 24mg/mlの濃度で分散させたものを, A/MNS-24, G/MNS-24およびR/MNS-24とした.

II. 動的表面張力の測定

上記の試験液を気泡拍動型表面張力計 (PBS, Electronics, New York, USA) の測定室 (容量 = 23μl) に入れて37℃に加温したうえ, 試験液中に気泡を作成した. 次いで, 気泡を半径0.40~0.55mmの間で40cpmの速度により拍動させた. 5分間拍動させた後, 気泡の大きさが最小と最大の時の表面張力, すなわち最小表面張力 (minimum surface tension, γ_{min}) と最大表面張力 (maximum surface tension, γ_{max}) を, 気泡内外の圧差 (ΔP) と半径 (R) からLaplaceの式 ($\Delta P = 2\gamma/R$) により算出した¹⁸⁾.

III. ウサギ未熟胎仔を用いた測定

1. 実験1 (MNS + 血清シリーズ)

1) 実験1-a (PEEPを付加しない換気実験)

交配後26日 (25日16時から23時間) の妊娠ウサギ (日本白色種, 満期妊娠日数=31日) をペントバルビタール20mg/kgの静注により麻酔し, 帝王切開で胎仔を娩出させた. これらの胎仔のうち, 体重が15~40gのものを実験の対象とし, 腹腔内にペントバルビタール0.5mgを投与した. 気管に18ゲージの金属カニューレを挿入した後, 同腹の胎仔 (3~10羽) をR/MNS-24群 (n=13), S/MNS-24群 (n=14), R/MNS-2群 (n=10) の3群に無作為に分け, 同名の試験液を, それぞれ10ml/kgあて気道を介して肺内に注入した. 上記の操作が終了した後, 胎仔を37℃に保ったプレストモグラフ装置¹⁷⁾¹⁹⁾ (図1) の気密室内に収容し, 同腹の全胎仔の準備が完了するまで5cmH₂Oの持続気道陽圧 (continuous positive airway pressure) 下に待機させた.

全胎仔の準備が完了したのち, 臭化パンクロニウム0.02mgを腹腔内に投与して胎仔を非動化し, 従圧式の間歇的陽圧換気 (intermittent positive pressure ventilation) を開始した. 人工呼吸器には, Servo 900B (Siemens-Elma, Solna, Sweden) を用い, 最大吸気圧 (peak inspiratory pressure) が22.5cmH₂Oとなるように, 作動圧を変えることによって調節した. なお, 本実験では, 換気開始後PEEPを付加しなかった. また, 呼吸回数

Table 1. Composition of modified natural surfactant (MNS)

Composition	Weight (%)
Phosphatidylcholine	66.2
Phosphatidylglycerol	7.7
Sphingomyelin	7.4
Phosphatidylethanolamine	6.2
Phosphatidylinositol	4.6
Phosphatidylserine	4.1
Other phospholipids	1.8
Fatty acids	0.4
Cholesterol	0.2
Cholesterol esters	0.2
Triglycerides	0.1
Hydrophobic proteins*	1.1

The lipids were assayed by thin-layer chromatography. Molecular weights and protein amounts were determined by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and amino acid analysis. * < 16 kDa.

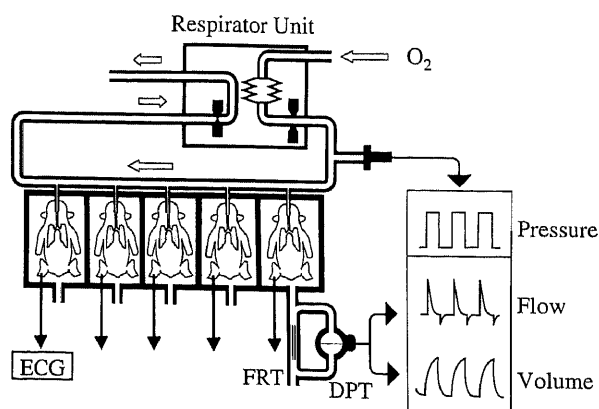


Fig. 1. System for the recording of tidal volumes in immature newborn rabbits. The animals were tracheotomized and treated with test liquids, and kept in plethysmographs (capacity=10 animals). They were connected in parallel to the respirator which was set at a pressure-controlled ventilation. The tidal volume was calculated by integration of pressure difference across the flow resistant tube attached to the plethysmograph. O₂, 100% oxygen; ECG, electrocardiograph; FRT, flow-resistant tube; DPT, differential pressure transducer.

1分間40回、吸気と呼気の時間の比は1:1に設定した。吸気ガスには純酸素を用い、人工呼吸器のガス駆出量の上限は、同時に測定する全被験胎仔の予測換気量の10倍以上(10 l/分)に設定した。実験中は人工呼吸器の回路内圧を常時監視し、設定した換気条件が保たれていることを確認した。

換気力学を示す指標として、各胎仔の換気量の推移を5分ごとに、換気開始から20分間測定した。換気量は各気密室に自家製の気流抵抗管を接続し、差圧計(TP-602T, 日本光電, 東京)で検出された圧差を積分器(AR-601G, 日本光電)に導いて求めた¹⁷⁾²⁰⁾。

換気量の測定が終了した直後、各胎仔の心電図を記録し、QRS波の頻度が1分間に120個以上のものを生存動物(ウサギ

未熟胎仔の正常な心拍数は240~320/分)とした。その後、過量のペントバルビタールを腹腔内に投与して胎仔を屠殺し、経横隔膜的に気胸の有無を確認した。なお、気胸を認めた動物は統計処理から除外した。

気胸の判定後、37℃の環境下で約1時間放置して肺を完全に虚脱させたうえ、各胎仔を自家製の肺圧量曲線記録装置¹⁷⁾に接続した。気道内圧を0cmH₂Oから30cmH₂Oまで60秒ごとに5cmH₂Oずつ段階的に上昇させ、次いで同様に0cmH₂Oまで低下させ、その際の肺気量の変化を記録した。

2) 実験1-b (PEEPを付加した換気実験)

実験1-aと同様の方法で準備されたウサギ未熟胎仔をR/MNS-2群(n=14)、S/MNS-2群(n=17)、血清単独群(n=6)お

Table 2. Constituents of electrolytes and organic substances in acetate Ringer's solution and rabbit serum

Constituents	Acetate Riger's solution	Rabbit serum
Electrolytes (mM)		
Na ⁺	130	140
K ⁺	4.0	4.1
Ca ⁺⁺	1.50	1.54
Cl ⁻	109	101
CH ₃ COO ⁻	28	0.05
Organic substances (mg/ml)		
Albumin	—	41
Globulin	—	13
Phospholipid	—	0.26

Table 3. Dynamic surface tension of test liquids

Test liquid	MNS (mg/ml)	Vehicle	γ min (mN/m)	γ max (mN/m)
R/MNS-24	24	R-solution	1.8±0.4	31.5±1.0
S/MNS-24	24	Serum	2.0±0.4	31.1±0.8
A/MNS-24	24	A-solution	3.0±0.2*	28.2±0.3*
G/MNS-24	24	G-solution	2.5±0.3	28.7±0.4
R/MNS-2	2	R-solution	2.7±0.2	35.0±0.6
S/MNS-2	2	Serum	40.4±1.9***	56.2±0.8***
A/MNS-2	2	A-solution	20.9±1.5***	40.6±3.0
G/MNS-2	2	G-solution	2.8±0.2	37.9±3.0

R-solution, acetate Ringer's solution; Serum, rabbit serum; A-solution, 40 mg/ml albumin in R-solution; G-solution, 20 mg/ml globulin in R-solution, γ min, minimum surface tension; γ max, maximum surface tension. Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (n=5). *P<0.05 vs R/MNS-24. ***P<0.05 vs R/MNS-2.

Table 4. Characteristics of immature newborn rabbits in Experiment 1

Experiment	Group	Number of rabbits examined	Number of death	Number of pneumothorax	Body weight ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, g)
1-a	R/MNS-24	13	0	0	27.8±1.2
	S/MNS-24	14	0	0	27.7±1.1
	R/MNS-2	10	1	0	24.1±2.1
1-b	R/MNS-2	14	0	0	27.1±1.2
	S/MNS-2	17	0	2	24.7±1.1
	Serum-only	6	2	0	26.0±2.4
	Control	5	1	0	25.4±0.8

よび対照群 (n=5) の4群に分けた。前2者には同名の試験液を、血清単独群には血清のみをそれぞれ10ml/kgあて気道を介して肺内に注入した。なお、対照群の肺には何も投与しなかった。その後、本実験では換気開始時より2.5cmH₂OのPEEPを付加して人工呼吸を行なったが、その他の換気条件は実験1-aと同じにした。また、換気量、生存率、気胸の有無および肺圧量曲線の測定も実験1-aと同様の方法で行なった。

2. 実験2 (MNS+血清蛋白シリーズ)

1) 実験2-a (PEEPを付加しない換気実験)

実験1と同様の方法で準備したウサギ未熟胎仔をR/MNS-24群 (n=13), A/MNS-24群 (n=14), G/MNS-24群 (n=14) の3群に分けた。それぞれに同名の試験液を10ml/kgあて気道を介して肺内に注入し、人工呼吸を開始した。本実験での換気条件は、実験1-aと全く同じであり、PEEPは付加しなかった。各種の測定は、実験1と同じ方法で行なった。

2) 実験2-b (PEEPを付加した換気実験)

上記の各実験と同様の方法で準備したウサギ未熟胎仔をR/MNS-2群 (n=10), A/MNS-2群 (n=12), G/MNS-2群 (n=9) の3群に分けた。それぞれに同名の試験液を10ml/kgあて気道を介して肺内に注入し、人工呼吸を開始した。本実験での換気条件は実験1-bと全く同じであり、換気開始と同時に2.5cmH₂OのPEEPを付加した。また、各種の測定は上記の各実験と同じ方法で行なった。

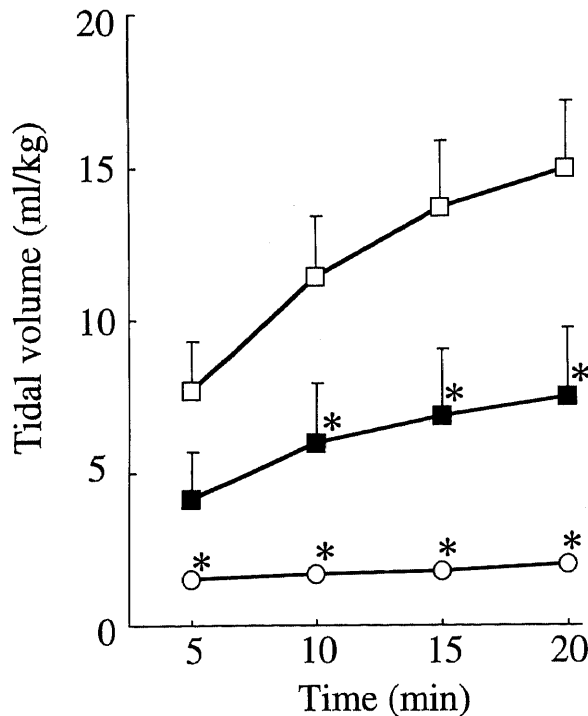


Fig. 2. Tidal volumes of animals ventilated without positive end-expiratory pressure in Experiment 1-a. The peak inspiratory pressure was set at 22.5 cmH₂O throughout the experiment. □, animals given 24 mg/ml modified natural surfactant (MNS) in acetate Ringer's solution (R/MNS-24 group, n=13); ■, animals given 24 mg/ml MNS in rabbit serum (S/MNS-24 group, n=14); ○, animals given 2 mg/ml MNS in acetate Ringer's solution (R/MNS-2 group, n=10). Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$ vs R/MNS-24 group.

IV. 統計処理

各群間の気胸発生率と生存率の有意差の判定には、Fisherの直接確率計算法を用いた。その他の測定結果については、平均値±標準誤差 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) で表し、分散分析を行ったうえ、Schefféの多重比較テストで有意差を判定した。いずれも、危険率 (P) が0.05以下を有意とした。

成 績

I. 試料の組成

実験に使用したウサギ血清の電解質濃度は、表2に示すように、ナトリウム、カリウムおよびカルシウムの各イオンに関しては、酢酸リンゲル液とほぼ等しい組成を有していた。また、血清中のアルブミンおよびグロブリンの含有量は、それぞれ41mg/mlおよび13mg/mlであった。なお、フィブリノーゲンは、事前に除去しており、検出されなかった。血清中のリン脂質の濃度は0.26mg/mlであった。一方、アルブミン溶液およびグロブリン溶液中のリン脂質濃度は、検出感度以下(0.01mg/ml以下)であった。

II. 動的表面張力

表3に示すように、MNSの濃度が24mg/mlの場合、全ての試験液 (R/MNS-24, S/MNS-24, A/MNS-24およびG/MNS-24) の γ_{\min} は3mN/m以下であり、 γ_{\max} も30mN/m前後であった。しかし、R/MNS-24に比べ、A/MNS-24の γ_{\min} は若干高く、 γ_{\max}

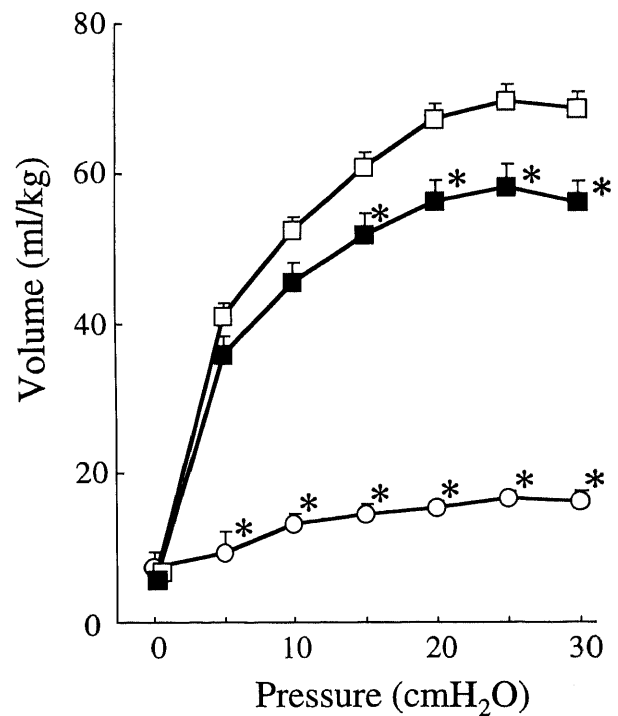


Fig. 3. Deflation limbs of static pressure-volume recordings of the lung-thorax system in animals ventilated without positive end-expiratory pressure in Experiment 1-a. □, animals given 24 mg/ml modified natural surfactant (MNS) in acetate Ringer's solution (R/MNS-24 group, n=13); ■, animals given 24 mg/ml MNS in rabbit serum (S/MNS-24 group, n=14); ○, animals given 2 mg/ml MNS in acetate Ringer's solution (R/MNS-2 group, n=10). Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$ vs R/MNS-24 group.

は若干低い値であった。

MNSの濃度が2mg/mlの場合、R/MNS-2に比べ、S/MNS-2の γ_{\min} は約38mN/m、 γ_{\max} は約21mN/m高い値であった($P < 0.05$)。また、A/MNS-2の γ_{\min} もR/MNS-2に比べ約18mN/m高い値であった($P < 0.05$)。これに対して、G/MNS-2の動的表面張力は、R/MNS-2の値に比べて有意な差がなかった。

Ⅲ. ウサギ未熟胎仔を用いた測定

1. 実験1-a

表4上段に示すように、R/MNS-24群の13羽およびS/MNS-24群の14羽は全例が生じた。しかし、R/MNS-2群では10羽のうち1羽が死亡した。なお、全群を通じ実験中に気胸を発生したものはなく、各群間で生存率、気胸の発生率および体重に有意差を認めなかった。

図2に実験1-aにおける換気量を示す。R/MNS-24群およびS/MNS-24群の換気量は、時間の経過とともに増加した($P < 0.05$)。しかし、両群間に明らかな差が認められた。すなわち、換気開始20分後の換気量は、R/MNS-24群で 14.9 ± 2.3 ml/kgに達したが、S/MNS-24群では約半分の 7.5 ± 1.6 ml/kgにすぎなかった($P < 0.05$)。なお、R/MNS-2群の換気量は、どの時点でも2ml/kg以下であった。

図3に実験1-aにおける減圧時の肺圧量曲線を示す。30cmH₂Oの加圧から15cmH₂Oに減圧するまで、S/MNS-24群の肺気量は、

R/MNS-24群の肺気量よりも有意に小さい値を示した。なお、R/MNS-2群の肺気量は、30cmH₂Oの加圧から5cmH₂Oに減圧するまで、他の2群と比べて有意に小さい値を示した。

2. 実験1-b

表4下段に示すように、R/MNS-2群の14羽およびS/MNS-2群の17羽は全例が生じた。血清単独群の6羽のうち2羽と、対照群の5羽のうち1羽が死亡した。また、S/MNS-2群の2羽が実験中に気胸を発生した。しかし、各群間で生存率、気胸の発生率および体重に有意差を認めなかった。

図4に実験1-bにおける換気量を示す。R/MNS-2群およびS/MNS-2群の換気量は、時間の経過とともに増加した($P < 0.05$)。しかし、全経過を通じて、S/MNS-2群がR/MNS-2群よりも大きい換気量を示した($P < 0.05$)。すなわち、換気開始20分後のR/MNS-2群の換気量は 4.2 ± 1.7 ml/kgにすぎなかったが、S/MNS-2群では3倍以上の 14.1 ± 1.9 ml/kgに達した。なお、血清単独群および対照群の換気量は、どの時点でも2ml/kg以下であった。

図5に実験1-bにおける減圧時の肺圧量曲線を示す。S/MNS-2群の肺気量は、30cmH₂Oの加圧時に60.4ml/kgであり、5cmH₂Oに減圧するまで、R/MNS-2群の肺気量よりも有意に大きい値を示した。一方、血清単独群および対照群では、30cmH₂Oの加圧時でも12ml/kg前後の肺気量しか得られな

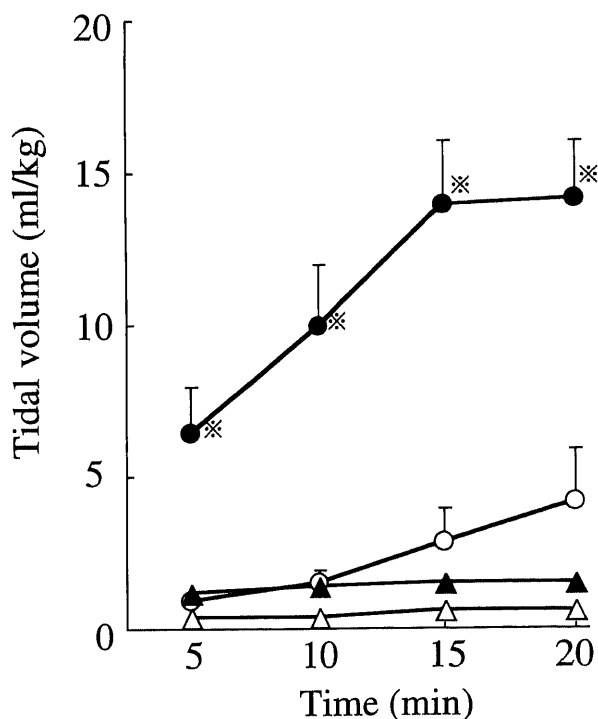


Fig. 4. Tidal volumes of animals ventilated with positive end-expiratory pressure of 2.5 cmH₂O in Experiment 1-b. The peak inspiratory pressure was set at 22.5 cmH₂O throughout the experiment. ○, animals given 2 mg/ml modified natural surfactant (MNS) in acetate Ringer's solution (R/MNS-2 group, n=14); ●, animals given 2 mg/ml MNS in rabbit serum (S/MNS-2 group, n=15); ▲, animals given rabbit serum only (Serum-only group, n=6); △, animals given no test liquid (Control group, n=5). Values are $\bar{x} \pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs R/MNS-2 group.

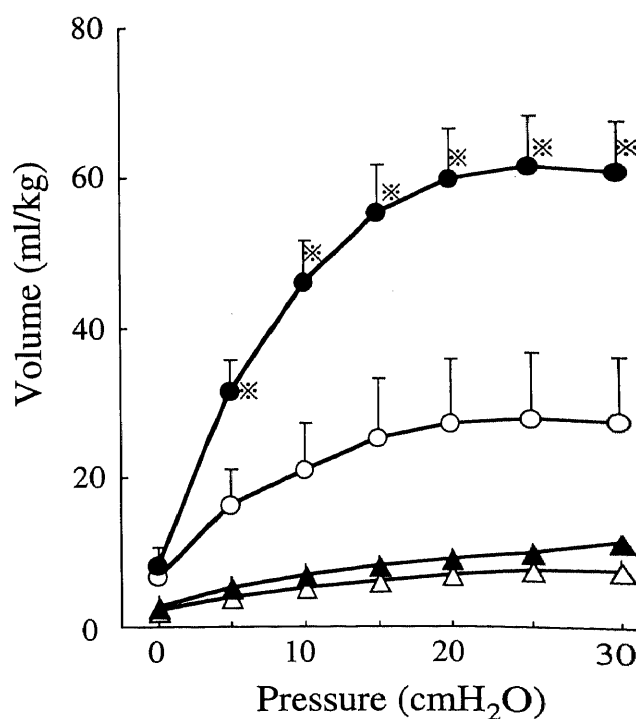


Fig. 5. Deflation limbs of static pressure-volume recordings of the lung-thorax system in animals ventilated with positive end-expiratory pressure of 2.5 cmH₂O in Experiment 1-b. ○, animals given 2 mg/ml modified natural surfactant (MNS) in acetate Ringer's solution (R/MNS-2 group, n=14); ●, animals given 2 mg/ml MNS in rabbit serum (S/MNS-2 group, n=15); ▲, animals given rabbit serum only (Serum-only group, n=6); △, animals given no test liquid (Control group, n=5). Values are $\bar{x} \pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs R/MNS-2 group.

った。なお、R/MNS-2群と血清単独群や対照群との間には有意差が認められなかった。

3. 実験2-a

表5上段に示すように、R/MNS-24群の13羽、A/MNS-24群の14羽、およびG/MNS-24群の14羽の全例が生存した。一方、R/MNS-24群の1羽、A/MNS-24群の1羽およびG/MNS-24群の2羽が実験中に気胸を発生した。しかし、各群間で生存率、気胸の発生率および体重に有意差は認めなかった。

図6に実験2-aにおける換気量を示す。R/MNS-24群、A/MNS-24群およびG/MNS-24群のいずれの群の換気量も、時間の経過とともに増加し ($P < 0.05$)、換気開始20分後には

12ml/kg以上を示した。A/MNS-24群の換気量は、他の2群に比べて大きいものであったが、有意差は認めなかった。

図7に実験2-aにおける減圧時の肺圧量曲線を示す。30cmH₂O加圧時のR/MNS-24群、A/MNS-24群およびG/MNS-24群の肺気量は、それぞれ56.8ml/kg、66.4ml/kg、および63.8ml/kgであった。これら3群の肺気量には、全ての圧で有意差を認めなかった。

4. 実験2-b

表5下段に示すように、R/MNS-2群の10羽、A/MNS-2群の12羽およびG/MNS-2群の9羽の全例が生存した。実験中、A/MNS-2群の3羽が気胸を発生した。しかし、各群間で生存率、

Table 5. Characteristics of immature newborn rabbits in Experiment 2

Experiment	Group	Number of rabbits examined	Number of death	Number of pneumothorax	Body weight ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, g)
2-a	R/MNS-24	13	0	1	28.1 \pm 0.9
	A/MNS-24	14	0	1	26.0 \pm 1.4
	G/MNS-24	14	0	2	26.1 \pm 2.5
2-b	R/MNS-2	10	0	0	27.4 \pm 1.4
	A/MNS-2	12	0	3	28.6 \pm 2.1
	G/MNS-2	9	0	0	27.7 \pm 1.5

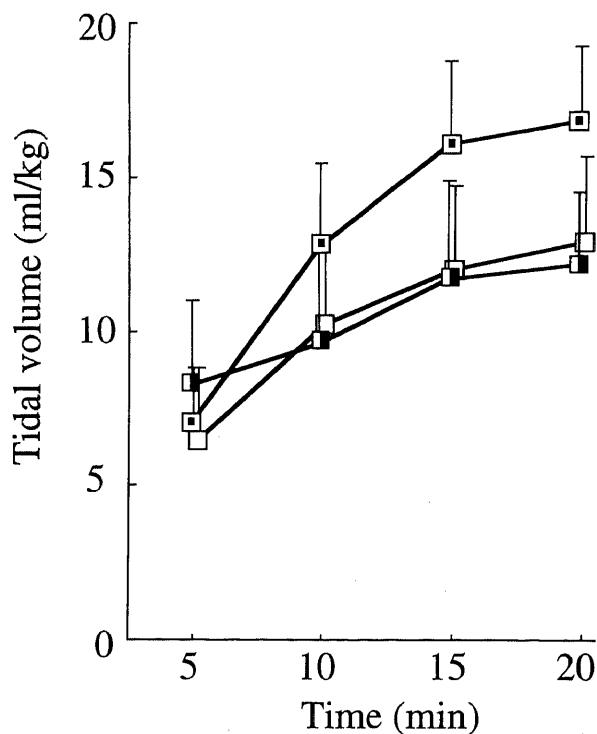


Fig. 6. Tidal volumes of animals ventilated without positive end-expiratory pressure in Experiment 2-a. The peak inspiratory pressure was set at 22.5 cmH₂O throughout the experiment. □, animals given 24 mg/ml modified natural surfactant (MNS) in acetate Ringer's solution (R/MNS-24 group, n=12); ◐, animals given 24 mg/ml MNS in 40 mg/ml albumin solution (A/MNS-24 group, n=13); ■, animals given 24 mg/ml MNS in 20 mg/ml globulin solution (G/MNS-24 group, n=12). Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

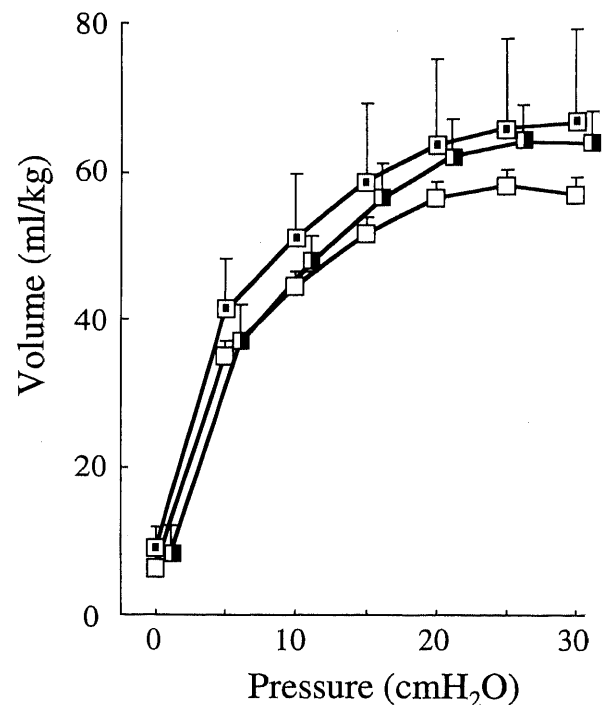


Fig. 7. Deflation limbs of static pressure-volume recordings of the lung-thorax system in animals ventilated without positive end-expiratory pressure in Experiment 2-a. □, animals given 24 mg/ml modified natural surfactant (MNS) in acetate Ringer's solution (R/MNS-24 group, n=12); ◐, animals given 24 mg/ml MNS in 40 mg/ml albumin solution (A/MNS-24 group, n=13); ■, animals given 24 mg/ml MNS in 20 mg/ml globulin solution (G/MNS-24 group, n=12). Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

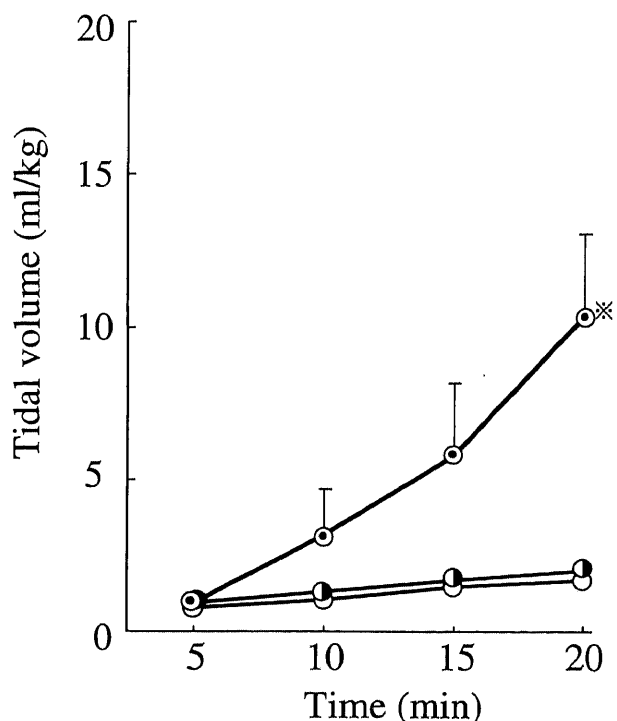


Fig. 8. Tidal volumes of animals ventilated with positive end-expiratory pressure of 2.5 cmH₂O in Experiment 2-b. The peak inspiratory pressure was set at 22.5 cmH₂O throughout the experiment. ○, animals given 2 mg/ml modified natural surfactant (MNS) in acetate Ringer's solution (R/MNS-2 group, n=10); ⊙, animals given 2 mg/ml MNS in 40 mg/ml albumin solution (A/MNS-2 group, n=9); ●, animals given 2 mg/ml MNS in 20 mg/ml globulin solution (G/MNS-2 group, n=9). Values are $\bar{x} \pm$ SEM. **P* < 0.05 vs R/MNS-2 group.

気胸の発生率および体重に有意差は認めなかった。

図8に実験2-bにおける換気量を示す。R/MNS-2群、A/MNS-2群およびG/MNS-2群のいずれの群の換気量も、時間の経過とともに増加した (*P* < 0.05)。しかし、換気開始20分後におけるR/MNS-2群およびG/MNS-2群の換気量は2ml/kg以下にすぎなかった。一方、A/MNS-2群の換気量は10.3 ± 2.7ml/kgと他の2群に比べて有意に大きい値を示した。

図9に実験2-bにおける減圧時の肺圧量曲線を示す。30cmH₂Oの加圧から5cmH₂Oに減圧するまで、A/MNS-2群の肺気量はR/MNS-2群に比べて大きい傾向を示した。一方、G/MNS-2群の肺気量はR/MNS-2群に比べて小さい傾向を示した。

考 察

ARDSでは、血液中の成分が水腫液として肺胞腔に浸出する¹⁾²⁾。今回の実験では、サーファクタントの活性に対し、水腫液中の蛋白質の作用に重点を置き、電解質に関しては可能な限り影響が生じないように配慮した。陽イオン、とくにカルシウム・イオンは、サーファクタントの活性に影響を与える^{21)~23)}。この点から、本研究では試験液の溶媒に酢酸リンゲル液を使用し、カルシウム・イオン濃度を各試験液間でほぼ同一にした。一方、酢酸イオンに関しては、試験液間に差が生じた。しかし、

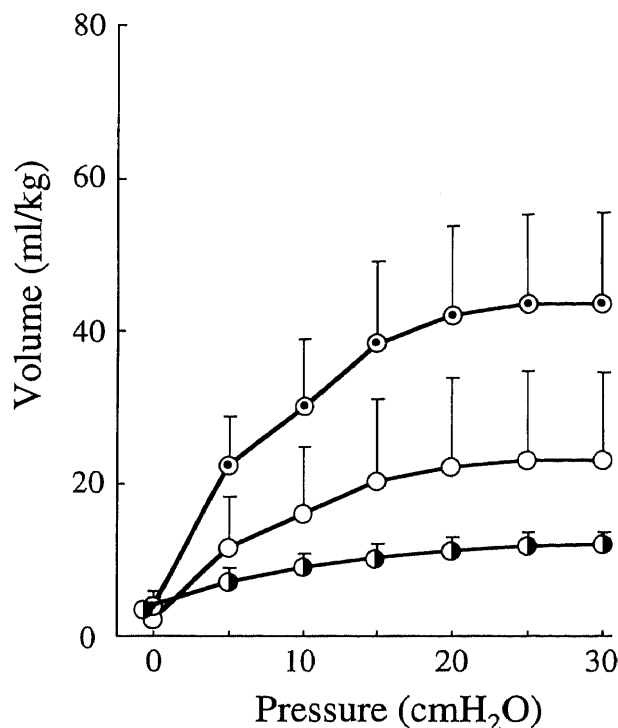


Fig. 9. Deflation limbs of static pressure-volume recordings of the lung-thorax system in animals ventilated with positive end-expiratory pressure of 2.5 cmH₂O in Experiment 2-b. ○, animals given 2 mg/ml modified natural surfactant (MNS) in acetate Ringer's solution (R/MNS-2 group, n=10); ⊙, animals given 2 mg/ml MNS in 40 mg/ml albumin solution (A/MNS-2 group, n=9); ●, animals given 2 mg/ml MNS in 20 mg/ml globulin solution (G/MNS-2 group, n=9). Values are $\bar{x} \pm$ SEM.

酢酸イオンは、MNSの表面活性やウサギ未熟胎仔の換気量発現作用にほとんど影響しないと報告されている²⁴⁾。したがって、今回の実験結果の解析には、電解質の問題を度外視してもよいと考えられる。

本研究に使用した気泡拍動型表面張力計では、被験液中に作成した気泡を肺胞に見立て、換気回数と同じ速度で拍動させて表面張力を測定する。このことから、 γ_{min} は呼吸終末時における肺胞の表面張力に相当し、その値が10mN/mを超える試験液は、肺胞の収縮力を弱めることができると言われている¹⁾²⁵⁾。今回の測定で、MNSの濃度が2mg/mlの場合は、血清やアルブミンにより γ_{min} が20mN/m以上に上昇した。すなわち、血清やアルブミンには、MNSの表面活性を阻害する作用があるという従来の報告^{3)~9)}と一致する所見が得られた。一方、MNSの濃度が24mg/mlの場合は、血清やアルブミンが存在していても、 γ_{min} は変化しなかった。しかし、この所見も、サーファクタントの濃度が高ければ、阻害作用は打ち消される²⁶⁾²⁷⁾という従来の報告に矛盾しないと考えられる。

在胎26日のウサギ未熟胎仔は、自己の肺サーファクタントが欠如しており、無処置では3ml/kg以上の換気量を示さないが、補充されたサーファクタントの活性に見合った換気量を示すと報告されている^{28)~30)}。今回の実験でも、何も投与しなかった対照群では、PEEPを付加しても2ml/kg以下の換気量しか

得ることができなかった(実験1-b)。一方、R/MNS-24を投与した胎仔の換気量は、PEEPを付加しなくても14ml/kg以上に達した(実験1-a)。したがって、今回の実験に使用した動物と方法は、各試験液の換気量増加作用を検索する目的に適したものと判断される。

PEEPを付加しない場合(実験1-a)、S/MNS-24やR/MNS-2は、 γ_{\min} がR/MNS-24と同じ値であるにもかかわらず、換気量を増加させる力が小さかった。この結果は、サーファクタントの物理化学的所見と生体内での効果が必ずしも一致しないことを示している。しかし、上記の不一致には、両測定法の感度の違いが関係しているであろう。さらに、出生直後の動物の肺内には、機能的残気量に相当する量(～30ml/kg)の肺内液が存在しており³¹⁾、投与されたMNSは必然的に希釈される。したがって、MNSの活性に対する血清の阻害作用が前面に現れた可能性も考えられる。いずれにしても、 γ_{\min} とPEEPを付加していない実験1-aでの換気量の不一致は、従来の報告と矛盾せず、基本的な問題を提起するものではないと考えられる。

PEEPは、ARDS患者の血液ガス所見を著明に好転させることが多い。また、ARDSのウサギの気道から採取した水腫液中のサーファクタントの濃度は、1mg/ml以下であったと報告されている³²⁾。実験1-bでは、ARDSの状態に近似させるため、胎仔に投与する試験液中のMNSの濃度を2mg/mlに減少させ、人工呼吸にはPEEPを付加した。R/MNS-2群の換気量は、PEEPを付加しない場合(実験1-a)2ml/kg以下であったが、PEEPの付加により(実験1-b)、若干ながら増加した(換気開始20分後で4.2ml/kg)。これは、サーファクタントの作用が弱くても、PEEPにより肺胞の虚脱が防止されたためと考えられる。

しかし、実験1-bでは、40mN/m以上の γ_{\min} を示したS/MNS-2が、3mN/m以下の γ_{\min} を示したR/MNS-2より、有意に大きく換気量を増加させた。すなわち、物理化学的測定所見と生体内での効力が全く逆の関係を示すという結果が得られた。同様に、減圧時の肺圧量曲線も γ_{\min} の所見と逆の関係を示した。なお、血清単独群の換気量の結果から分かるように、血清自身にはサーファクタントのような作用がない。したがって、PEEPを付加した実験1-bの所見は、 γ_{\min} と生体内でのサーファクタントの作用が相反する現象(相反現象)を示しており、これまでの見解とは全く異なったものと判定される。

この相反現象の原因として、まず各試験液の肺胞への到達度を考慮する必要がある。今回の実験では、肺胞に到達したMNSの量や分布状態を実測することが出来なかった。しかし、気道内に注入された液体の肺胞到達度は、粘性の低い方が良い³³⁾³⁴⁾と言われている。酢酸リンゲル液に比べ、血清の粘度は明らかに高い。したがって、粘性の高いS/MNS-2が粘性の低いR/MNS-2よりも多く肺胞に到達するとは考え難く、MNSの肺胞到達度の差で相反現象を説明するのは困難であると考えられる。

一般にサーファクタント補充療法では、肺胞への到達度を増加させるため、サーファクタントを注入した直後に気道内圧を高めた強制換気を行っている³⁵⁾。しかし、今回の実験では、この強制換気を省略した。このことから、換気量が経時的に増加した原因は、注入されたMNSが時間とともに末梢へ広がったためと考えられる。すなわち、換気量の経時的な増加は、試験液の肺胞到達度の変化を反映したものであろう。一方、換気量の経時的増加は、相反現象の有無に関係なく、実験1-aと1-bの

両方で認められた。したがって、換気量の推移から見て、試験液の肺胞到達度の差が相反現象の原因であるとは考え難い。

相反現象の機序の究明には、血清中のいかなる物質が関与していたのかを調査する必要がある。とくに、血清中に含まれているリン脂質が、サーファクタントとしての機能を発揮して相反現象をもたらした可能性も否定できない。このことを判別するため、今回は実験2として、血清と類似した濃度のアルブミン溶液(40mg/ml)およびグロブリン溶液(20mg/ml)を用いた同様の検討を行った。その結果、PEEPを付加しない場合(実験2-a)はアルブミンの作用が明確でなかったが、PEEPを付加した場合(実験2-b)は、アルブミンが血清と同様に換気量を増加させた。すなわち、相反現象をもたらした原因物質の1つは、アルブミンであると結論される所見を得た。なお、アルブミン溶液中にはリン脂質がほとんど存在していなかったことから、血清中に含まれていたリン脂質が相反現象の原因物質であるという可能性は否定された。

一方、MNSの γ_{\min} を変化させなかったグロブリンは、実験2-bでも換気量を増加させず、相反現象をもたらさなかった。すなわち、今回の濃度のグロブリンは、サーファクタントに対する作用が弱いものと考えられ、新多の報告³⁵⁾と同様の性状を示した。また、MNSの物理化学的性状や生体内での働きに対して、アルブミンとグロブリンは全く異なった作用を示すと結論される所見であった。

今回の実験では、アルブミンが相反現象をもたらす原因物質の1つであると判明したが、現象そのものの機序は解明できなかった。今後、アルブミンやグロブリンの濃度を変化させた検討や、各蛋白質の分子構造、溶液の粘性およびpHなどサーファクタントの活性に関する検討も必要であろう。また、PEEPの高低による相反現象の変化も調査する必要がある。このように、今後検討すべき点が多い。しかし、今回の実験から、PEEPを付加した換気は、血清やアルブミンが肺胞に出現した際に、サーファクタントの生理作用を増強する場合があると結論された。すなわち、PEEPを付加した場合は、肺サーファクタントの物理化学的所見と生理機能の所見が相反する場合もあると結論された。

現在のところ、本研究で見い出されたような相反現象の報告は他に見当たらない。ウサギ未熟胎仔の病態は、臨床的なARDSと同じではない。また、今回使用した血清にはフィブリノーゲンが含まれていない。しかし、本研究は、PEEPを付加した呼吸管理によりARDS患者の症状が好転するという臨床的な経験³⁶⁾を、肺サーファクタントの面から裏付けしたものと言い得る。ARDSの呼吸管理をさらに進歩させるためには、血液由来の蛋白質とPEEPの両者によるサーファクタントの機能の変化に関する検討、とくに相反現象の機序の解明が重要であると考えられる。

結 論

血清により肺サーファクタントが希釈された場合、サーファクタントの物理化学的な表面活性の変化と人工呼吸を行っている生体内での機能が一致するか否かにつき、PEEPの有無に重点をおいて検討した。すなわち、MNSを血清または酢酸リンゲル液に分散した試験液につき、表面活性と自己のサーファクタントが欠如しているウサギ未熟胎仔の肺内に注入して人工呼吸を行った際の換気量の変化を測定した。さらに、MNSをア

ルブミン溶液およびグロブリン溶液に分散した場合についても同様の検討を行い、以下の結論を得た。

1. 血清は肺サーファクタントの表面活性を阻害する。
2. PEEPを付加しない場合では、血清は換気量を減少させ、生体内でも肺サーファクタントの機能を障害する。
3. PEEPを付加した場合では、表面活性の所見に反し、血清は換気量を増加させるという相反現象をもたらす。
4. アルブミン溶液は、血清と同様に相反現象をもたらすが、グロブリン溶液はこの現象をもたらさない。

以上より、PEEPを付加した人工呼吸下では、サーファクタントの表面活性と生体内での作用は必ずしも一致しないと判断された。また、アルブミンが相反現象をもたらす原因物質の1つであると判定されたが、本現象の機序は解明できなかった。血清に類似した成分の水腫液が肺胞に浸出するARDSの呼吸管理法については、肺サーファクタント、アルブミンおよびPEEPの3者の相互作用をさらに解明する必要があると考えられた。

謝 辞

稿を終るにあたり、直接御指導と御校閲を賜りました小林勉教授に深く感謝いたします。また、本研究遂行にあたり、ご協力いただいた麻酔・蘇生学講座の諸先生方、実験助手の方々に対し、厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Jefferies AL, Coates G, O'Brodovich H. Pulmonary epithelial permeability in hyaline-membrane disease. *N Engl J Med* 311: 1075-1080, 1984
- 2) Holm B, Matalon S. Role of pulmonary surfactant in the development and treatment of adult respiratory distress syndrome. *Anesth Analg* 69: 805-818, 1989
- 3) Kobayashi T, Ohta K, Tashiro K, Nishizuka K, Chen WM, Ohmura S, Yamamoto K. Dextran restores albumin inhibited surface activity of pulmonary surfactant extract. *J Appl Physiol* 86: 1778-1784, 1999
- 4) Wang Z, Notter RH. Additivity of protein and nonprotein inhibitors of lung surfactant activity. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 28-35, 1998
- 5) Cockshutt A, Possmayer F. Lysophosphatidylcholine sensitizes lipid extracts of pulmonary surfactant to inhibition by serum proteins. *Biochim Biophys Acta* 1086: 63-71, 1991
- 6) Amirkhanian JD, Taeusch HW. Reversible and irreversible inactivation of preformed pulmonary surfactant surface films by changes in subphase constituents. *Biophys Acta* 1165: 321-326, 1993
- 7) Fuchimukai T, Fujiwara T, Takahashi A, Enhorning G. Artificial pulmonary surfactant inhibited by proteins. *J Appl Physiol* 62: 429-437, 1987
- 8) Ikegami M, Jobe A, Jacobs H, Lam R. A protein from airways of premature lambs that inhibits surfactant function. *J Appl Physiol* 57: 1134-1142, 1984
- 9) Kobayashi T, Nitta K, Ganzuka M, Inui S, Grossman G, Robertson B. Inactivation of exogenous surfactant by pulmonary edema fluid. *Pediatr Res* 29: 353-356, 1991
- 10) Holm B, Notter RH. Effects of hemoglobin and membrane lipids on pulmonary surfactant activity. *J Appl Physiol* 63: 1434-1442, 1987
- 11) Seeger W, Stöhr G, Wolf HR, Neuhof H. Alteration of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrin monomer. *J Appl Physiol* 58: 326-338, 1985
- 12) Spragg RG, Gillard N, Richman P, Smith RM, Hite D, Pappert D, Heldt GP, Merritt TA. The adult respiratory distress syndrome: clinical aspect relevant to surfactant supplementation. *In* B Robertson, LMG Van Golde, JJ Batenburg (eds), *Pulmonary Surfactant from Molecular Biology to Clinical Practice*, 1st ed, p685-703, Elsevier, Amsterdam, 1992
- 13) Seeger W, Günther HD, Walmrath HD, Gimminger F, Lasch HG. Alveolar surfactant and adult respiratory distress syndrome: pathogenic role and therapeutic prospects. *Clin Investig* 71: 177-190, 1993
- 14) Lewis JF, Jobe AH. Surfactant and adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 147: 218-233, 1993
- 15) Folch J, Lees M, Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509, 1957
- 16) Folch J, Ascoli I, Lees M, Meath JA, Lebarson FN. Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J Biol Chem* 191: 833-841, 1951
- 17) Kobayashi T, Tashiro K, Yamamoto K, Nitta S, Ohmura S, Suzuki Y. Effect of surfactant proteins SP-B and SP-C on dynamic and static mechanics of immature lungs. *J Appl Physiol* 83: 1849-1856, 1997
- 18) Enhornig G. Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. *J Appl Physiol* 43: 198-203, 1977
- 19) Lachmann B, Grossman G, Freyse J, Robertson B. Lung-thorax compliance in the artificially ventilated premature rabbit neonate in relation to variations in inspiration: expiration ratio. *Pediatr Res* 15: 833-838, 1981
- 20) Lachmann B, Grossman G, Nilsson R, Robertson B. Lung mechanics during spontaneous ventilation in premature and fullterm rabbit neonates. *Respir Physiol* 38: 283-302, 1979
- 21) Efrati H, Hawgood S, Williams MC, Hong K, Benson BJ. Divalent cation and hydrogen ion effects on the structure and surface activity of pulmonary surfactant. *Biochemistry* 26: 7986-7993, 1987
- 22) Holm BA, Notter RH, Finkelstein JN. Surface property changes from interactions of albumin with natural lung surfactant and extracted lung lipids. *Chem Phys Lipids* 38: 287-298, 1985
- 23) Kobayashi T, Robertson B. Surface adsorption of pulmonary surfactant in relation to bulk-phase concentration and presence of CaCl₂. *Respiration* 44: 63-70, 1983
- 24) 徐 咏梅, 加畑千春, 太田圭亮, 陳 衛民, 崔 晔光, 紺崎友晴, 田代勝巳, 小林 勉. 血清と終末呼吸陽圧による加工天然サーファクタントの機能の変化. *日界面医誌* 31: 57-65, 2000
- 25) Notter RH, Finkelstein JN. Pulmonary surfactant: An interdisciplinary approach. *J Appl Physiol* 57: 326-328, 1985
- 26) Holm BA, Enhorning, Notter RH. A biophysical mechanism by which plasma proteins inhibit lung surfactant activity. *Chem Phys Lipids* 49: 49-55, 1988

- 27) Lachmann B, Eijking EP, So KL, Gommers D. In vivo evaluation of inhibition capacity of human plasma on exogenous surfactant function. *Intensive Care Med* 20: 6-11, 1994
- 28) Robertson B, Lachmann B. Experimental evaluation of surfactants for replacement therapy. *Exp Lung Res* 14: 279-310, 1988
- 29) Robertson B, Curstedt T, Grossman G, Kobayashi T, Kokubo M, Suzuki Y. Prolonged ventilation of the premature newborn rabbit after treatment with natural or apoprotein-based artificial surfactant. *Eur J Pediatr* 147: 168-173, 1988
- 30) Kobayashi T, Grossman G, Robertson B, Ueda T. Effects of artificial and natural surfactant supplementation in immature newborn rabbits. *日界面医誌* 15: 53-59, 1984
- 31) Strang LB. Fetal lung liquid: secretion and reabsorption. *Physiol Rev* 71: 991-1016, 1991
- 32) Kobayashi T, Nitta K, Ganzuka M, Inui S, Grossman G, Robertson B. Inactivation of exogenous surfactant by pulmonary edema fluid. *Pediatr Res* 29: 353-356, 1991
- 33) Espinosa FF, Kamm RD. Bolus dispersal through the lungs in surfactant replacement therapy. *J Appl Physiol* 86: 391-410, 1999
- 34) Halpern D, Jensen OE, Grotberg JB. A theoretical study of surfactant and liquid delivery into the lung. *J Appl Physiol* 85: 333-352, 1998
- 35) Fujiwara T, Robertson B. Pharmacology of exogenous surfactant. In B Robertson, LMG Van Golde, JJ Batenburg (eds), *Pulmonary Surfactant from Molecular Biology to Clinical Practice*, 1st ed, p685-703, Elsevier, Amsterdam, 1992
- 36) 新多恵子. 肺水腫液がサーファクタント活性を介して換気能におよぼす影響. *十全医会誌* 100: 1070-1084, 1991
- 37) Bernard GR, Artigas A, Bringham KL, Carlet J, Falk K, Hadson L, Lamy M, Legall JR, Moris A, Spragg R. The American-European consensus conference on ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 818-824, 1994

Influence of Serum and Positive End-expiratory Pressure on Function of Pulmonary Surfactant Chiharu Kabata, Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, 110, 77 — 86 (2001)

Key Words albumin, globulin, positive end-expiratory pressure, pulmonary surfactant, serum

Abstract

In acute respiratory distress syndrome (ARDS), protein-rich edema fluid leaks into the alveolar space and changes character of pulmonary surfactant. Although positive end-expiratory pressure (PEEP) has commonly been used for treatment of ARDS, its influence on the *in-vivo* function of the surfactant has not been clearly known. To determine the *in-vitro* surface activity of pulmonary surfactant mixed with the edema fluid, the minimum surface tension (γ_{\min}) of a modified natural surfactant (MNS, porcine lung extract consisting of phospholipids and hydrophobic surfactant proteins) suspended in acetate Ringer's solution (R-solution) or in rabbit serum were measured with the pulsating bubble technique. To assess the *in-vivo* function of the surfactant, MNS suspended in the serum or R-solution was administered into the lungs of surfactant-deficient immature rabbits through the trachea, and their tidal volumes were measured under a pressure-controlled mechanical ventilation. The γ_{\min} value of 2 mg/ml MNS suspended in the serum was significantly ($P < 0.05$) higher than that suspended in R-solution (40.4 mN/m vs 2.7 mN/m). In addition, 24 mg/ml MNS suspended in the serum exhibited significantly smaller tidal volumes than that suspended in R-solution (7.5 ± 1.6 ml/kg vs 14.9 ± 2.3 ml/kg, $\bar{x} \pm \text{SEM}$) when the animals were ventilated without PEEP. From these results, it was concluded that serum inhibited the *in-vitro* activity of pulmonary surfactant, and also depressed the *in-vivo* function when PEEP was absent. On the other hand, in the animals ventilated with 2.5 cmH₂O PEEP, 2 mg/ml MNS suspended in the serum exhibited significantly larger tidal volumes than that suspended in R-solution (14.1 ± 1.9 ml/kg vs 4.2 ± 1.7 ml/kg). These results indicate a paradoxical phenomenon; serum inhibits the *in-vitro* activity of pulmonary surfactant, but improves the *in-vivo* function when PEEP is present. The paradoxical phenomenon was observed when MNS was suspended in 40 mg/ml albumin solution, but was not in 20 mg/ml globulin solution. These findings suggest that albumin is one of the main substances bringing about the paradoxical phenomenon. It was concluded that the *in-vitro* activity of surfactant does not always indicate the *in-vivo* function, especially under the ventilation with PEEP. Further studies are needed to elucidate the reciprocal functions between surfactant, albumin and PEEP to improve the therapeutic methods of ARDS patients.