

表2 *S. suis* 感染症の臨床像

髄膜炎	264 例 (72.5%)
敗血症・敗血症性ショック*	88 例 (24.2%)
関節炎	4 例 (1.1%)
心内膜炎	4 例 (1.1%)
肺炎	3 例 (0.8%)
腹膜炎	1 例 (0.3%)
合計	364 例 (100%)

*: 敗血症性ショックの80%以上が死亡した
文献1)より抜粋

表3 敗血症性ショック例の臨床像 (合計81例)

高熱	81 例 (100%)
皮下出血	75 例 (93%)
DIC	75 例 (93%)
急性腎不全	66 例 (82%)
振戦	64 例 (79%)
低血圧	62 例 (77%)
嘔吐	54 例 (67%)
肝機能異常	51 例 (63%)
下痢	42 例 (52%)
頭痛	40 例 (49%)

文献1)より抜粋

表4 β 溶血を示すレンサ球菌の鑑別

菌種	Lancefield 分類	コロニーの大きさ	宿主	bacitracin	PYR	BGR
<i>S. pyogenes</i>	A	大	ヒト	+	+	-
<i>S. agalactiae</i>	B	大	ヒト, ウシ	-	-	一部+
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	C	大	動物	-	-	+
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	C, G, A, L	大	ヒト	-	-	+
<i>S. anginosus</i> group	A, C, G, F, なし	小	ヒト	-	-	-

PYR: ピロリドニルアミノペプチターゼ

BGR: β -D-グルクロニターゼ

S. dysgalactiae subsp. *dysgalactiae* はヒツジ血液寒天培地上で α 溶血を示す

S. anginosus group は *S. milleri* group と呼ばれ, α 溶血, β 溶血, 溶血なしのいずれも生じる

■ *S. dysgalactiae* 感染症

S. dysgalactiae には subsp. *equisimilis* と subsp. *dysgalactiae* があるが, 人に病原性のあるのはほとんど前者であるので, ここでは前者について述べる。

Lancefield の分類では主に G 群 (一部 A 群や C 群) に属するため, 実際上は G 群レンサ球菌 (GGS) や C 群レンサ球菌 (GCS) と呼ばれることが多い。

1. 臨床検査上の注意

呼吸器系検体, 血液, 婦人科検体からの分離が多い。血液寒天培地上で β 溶血を示す大型・白色のコロニーを形成する。A 群レンサ球菌 (GAS) と比較し, 溶血が強い。コロニーの性状により推定し, 抗血清を用いた凝集試験を行う。ただし上記の通り凝集試験は G 群以外にも凝集するので,

最終的な同定と鑑別には PYR 試験や β -D-グルクロニターゼの結果を参考にする (表4)。GGS や GCS は一般的に分離されてもほとんどは保菌であるが, 近年血液, 関節液などの無菌検体からの分離が増加している。

2. 臨床的特徴

咽頭炎, 敗血症, 壊死性筋膜炎, 蜂窩織炎, 感染性心内膜炎, トキシックショック症候群 (STSS), 関節炎などを生じる。これらは GAS においても生じるので, いわば GAS 類似の臨床像といえるが, GAS が小児から若年成人に好発するのに対し, GGS は中高年以降に多く (実際, 咽頭からの培養陽性例をみても両者では差がある), GAS の方が重症で進行が早い傾向がある。また基礎疾患として, 糖尿病や悪性腫瘍, 脳血管障害などを合併する頻度が高い。

敗血症においては, 皮膚や血管内カテーテルと

いった侵入門戸がはっきりしている場合もあるが、不明の場合もしばしばである (STSS で不明例が多い)。

3. 診断, 治療と予後

侵襲性感染症の診断は比較的容易であるが, 急速に進行する敗血症, STSS では血液培養の結果が判明する前に, 死亡する例もある。本来ならば選択すべき抗菌薬はペニシリン系 (特に PCG) であるが, 初期投与薬として実際に選択され, 投与が継続されているのはセフェム系が多いといわれている。PCG に比べセフェム系の抗菌力は劣っており, 迅速な検体採取とともに, 結果判明後の速やかな切り替えが望まれる。なお GAS の STSS と同様, PCG と clindamycin の併用を支持する意見がある。

4. 疫学的な変化と増加の背景

本邦での報告例は 90 年代後半から, 特に 2005 年以降に増加している。感染症法では GGS, GCS, GAS にかかわらず劇症型溶血性レンサ球菌感染症として全例届出が定められており, 2006 年には 106 件の報告があった。現在のところ, 侵襲性感染症を生じた *S. dysgalactiae* の M 蛋白 (*emm* 遺伝子) 型別では, stG6792 がやや多い。一般的に分離株は高頻度に GAS と共通の病原遺伝子 (*sto* 遺伝子: 血中 ASO が上昇するなど) を有しており⁶⁾, *S. dysgalactiae* の病原性の高さを予想させる。GAS と GGS, GCS の間で病原遺

伝子がトランスファーされている可能性が指摘されており, われわれの予想よりも頻繁に, レンサ球菌の病原遺伝子が増えているのかもしれない。現在菌側の変化と, 劇症型感染症をきたすメカニズムの両方から研究が行われている。

おわりに

本邦において, これら 2 菌の臨床的・疫学的解析はまだ十分に行われているとはいえない。病態・治療に関する基礎研究も端緒についたばかりである。今後サーベイランスシステムを強化し, 多施設間解析を継続的に行うとともに, 菌側・生体側両方から重点的に基礎研究を行う必要がある。

文 献

- 1) Lun ZR, Wang QP, Chen XG *et al.*: *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect Dis* 7: 201-209, 2007.
- 2) 松尾啓左, 阪元政三郎: 豚由来と思われる *Streptococcus suis* II による化膿性髄膜炎の 1 症例. *感染症学雑誌* 77: 340-342, 2003.
- 3) 茨木麻衣子, 藤田信也, 他田正義ほか: *Streptococcus suis* による腰椎硬膜外膿瘍を合併した細菌性髄膜炎の 1 例. *臨床神経* 43: 176-179, 2003.
- 4) Chang B, Wada A, Ikebe T *et al.*: Characteristics of *Streptococcus suis* isolated from patients in Japan. *Jpn J Infect Dis* 59: 397-399, 2006.
- 5) Wertheim HFL, Nghia HDT, Taylor W *et al.*: *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clin Infect Dis* 48: 617-625, 2009.
- 6) Davies MR, McMillan DJ, Beiko RG *et al.*: Virulence profiling of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* isolated from infected humans reveals 2 distinct genetic lineages that do not segregate with their phenotypes or propensity to cause diseases. *Clin Infect Dis* 44: 1442-1454, 2007.

* * *

□ 会長奨励賞(平成17年度) □

Bio-plex[®]を用いたALI/ARDS患者における 気管支肺胞洗浄液の各種サイトカインの測定

中野 泰¹⁾ 藤島 清太郎²⁾ 宮庄 拓⁴⁾ 北川 雄光³⁾ 須田 康一³⁾
 西村 知泰¹⁾ 小川 裕子¹⁾ 栗原 亜子¹⁾ 斎藤 史武¹⁾ 清水 三恵¹⁾
 山田 稚子¹⁾ 黄 英文¹⁾ 田坂 定智¹⁾ 中村 守男¹⁾
 長谷川 直樹¹⁾ 横田 博⁴⁾ 石坂 彰敏¹⁾

Abstract

Simultaneous measurement of multiple cytokines by a bead array method in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ALI/ARDS

Y. Nakano¹⁾, S. Fujishima²⁾, T. Miyasho⁴⁾, Y. Kitagawa³⁾, K. Suda³⁾, T. Nishimura¹⁾, Y. Ogawa¹⁾, A. Kurihara¹⁾, F. Saito¹⁾, M. Shimizu¹⁾, H. Koh¹⁾, W. Yamada¹⁾, M. Nakamura¹⁾, S. Tasaka¹⁾, N. Hasegawa¹⁾, H. Yokota⁴⁾, A. Ishizaka¹⁾

1) Department of Medicine,

2) Department of Emergency and Critical Care Medicine,

3) Division of general and gastrointestinal surgery, Keio University School of Medicine

4) Department of Veterinary Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University

【Background】 There have been many reports showing the increase in single or several lung cytokines of patients with ALI/ARDS. However, cytokines are composing complex networks by playing multiple unique or redundant roles, and it is not easy to clarify the pathophysiological roles just by measuring individual cytokine. Therefore, we preliminary determined a set of multiple cytokines by a novel technique in patients with ARDS. 【Methods】 Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was obtained from normal volunteers (controls) and patients with ARDS, after obtaining informed consent. Diagnosis of ARDS was determined, following the American-European consensus conference. Totally 17 cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-2, IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, G-CSF, MCP-1, MIP-1b, IL-7, IL-17) in the BAL fluid were measured by a Bio-plex[®] suspension array system. One way ANOVA was used for statistical analysis and significance was accepted at $p < 0.05$. 【Results】 We detected 16 cytokines, except GM-CSF, in ARDS patients and the levels were significantly higher than those in controls. 【Conclusion】 We could detect a significantly higher levels of 16 cytokines out of 17 in the BAL fluid of ARDS patients by a novel beads array method.

1. 序 文

急性肺損傷 (acute lung injury、ALI) / 急性呼吸促進症候群 (acute respiratory distress syndrome、ARDS) の本態は、肺微小血管透過性の亢進により発症する非心原

性肺水腫であるが、臨床診断には1994年のAmerican-European Consensus Conferenceによる簡便な定義が現在広く用いられており、それに伴ってALI/ARDS自身も広範かつ多様な病態を包括した概念へと変貌してきている¹⁾。ALI/ARDSの病態解明も進み、発症にはTNF α 、IL-1 β 、IL-8などの炎症性サイトカインが重要

慶応義塾大学医学部呼吸器内科¹⁾ 同救急医学²⁾ 同一般消化器外科³⁾
酪農学園大学 獣医化学教室⁴⁾

な役割を担っていることが明らかとなっている。しかしその他にも様々なサイトカインの関与が知られており、それらが複合的に病態に関与しているため、個別の測定では病態の全体像把握に限界があった。一方で近年、遺伝子発現や蛋白質の網羅的解析法が開発され、様々な分野において病態解析への応用がなされつつある。そこで今回我々は、ARDS 患者における気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage: BAL) 液中サイトカインの網羅的解析を行うことで、その病態解析を試みたので報告する。

2. 対象

健常ボランティア 8 名および診断確定を目的として BAL が施行された ARDS 症例 4 名を対象とした。また ARDS の診断は American-European Consensus Conference による定義に基づいて行った¹⁾。

3. 方法

健常ボランティア群、ARDS 患者群、両群ともに気管支鏡下で通常の手技により BAL を施行し、BAL 液を測定まで -80℃ で凍結保存した。BAL 液中の各種サイトカインを Bio-plex[®] suspension array 法により測定した。Bio-plex[®] suspension array 法とは、蛍光ビーズを用いてラベルした検体をフローサイトメトリーの技術を利用して試料の解析を行う方法であり、微量の検体から多数の蛋白質を、同時に短時間に測定することが可能である。本システムを利用し、今回測定したサイトカインの種類は TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-2、IL-12、IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、GM-CSF、G-CSF、MCP-1、MIP-1b、IL-7、IL-17 の 17 種類である。検出限界はいずれのサイトカインも 1.0pg/ml 以下であった。測定結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。統計解析は、one way ANOVA および Fisher PLSD により行い、 $p < 0.05$ をもって有意と判定した。

4. 結果

健常群 8 人はすべて非喫煙男性であり (20 歳 ~ 45 歳)、ARDS 患者は男性 3 人、女性 1 人 (55 歳 ~ 82 歳) であった。原因疾患は 4 例とも肺炎であった。BAL 施行時の ARDS 患者 4 名の P/F 比 (平均値 \pm 標準誤差) は 108.6 \pm 14.1 (範囲: 78.7 ~ 142.2)、Lung injury score (LIS) は 2.5 \pm 0.1 (2.3 ~ 2.7) であった。また BAL 液

の回収率は 39.5 \pm 9.3% (28 ~ 60)、BAL 液細胞分画中の好中球は 64.0 \pm 1.9% (59.8 ~ 68.5%) であった。

検討した 17 種のサイトカインを 5 群に分けて、健常群と検討した。炎症性サイトカインについては、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 のいずれも ARDS 群において著明な高値を示した (図 1)。

Th-1 細胞関連サイトカインについて見ると、IL-2、IL-12、IFN- γ いずれも ARDS 群において高値を示した (図 2)。

一方、Th-2 細胞関連サイトカインについても、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 のいずれも、ARDS 群において有意に高値を示した (図 3)。

次に、単球作用性サイトカインに関して比較すると、GM-CSF のみ他のサイトカインとは異なる挙動を示した (図 4)。すなわち、GM-CSF が ARDS 群 4 人の全てにおいて測定感度以下であった。他の G-CSF、MCP-1、MIP-1 β は、ARDS 群において有意に高値を示した。最後に、上記の何れの群にも分類されない IL-7、IL-17 についてであるが、両サイトカインとも、ARDS 群において有意に高値を示していた (図 5)。

以上をまとめると、健常群においては、IL-17 を除く 16 種が検出され、一方 ARDS 群では、GM-CSF を除く 16 種が検出された。GM-CSF を除く 16 種のサイトカインが、健常群に比し ARDS 群で有意に高値を示した。

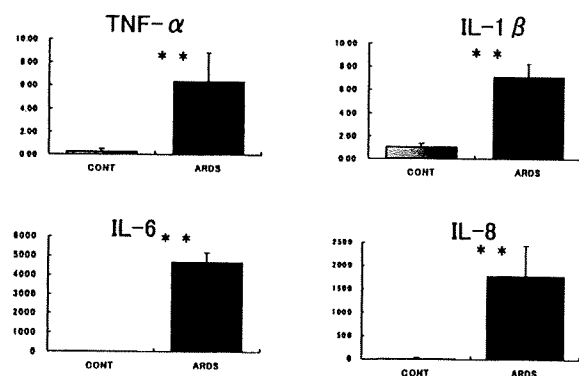


図 1 BAL 液中の炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 のいずれも ARDS 群において著明な高値を示した。単位は pg/ml、** $p < 0.01$

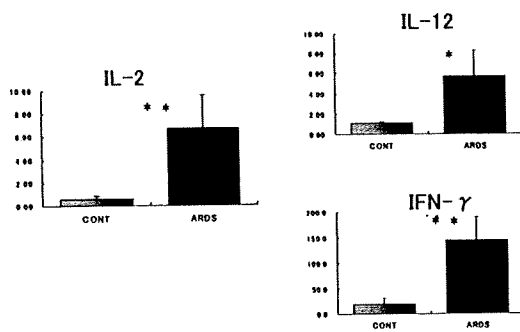


図2 BAL液中のTh-1細胞関連サイトカイン IL-2,IL-12、IFN-γいずれもARDS群において高値を示した。単位はpg/ml、* p < 0.05 ** p < 0.01

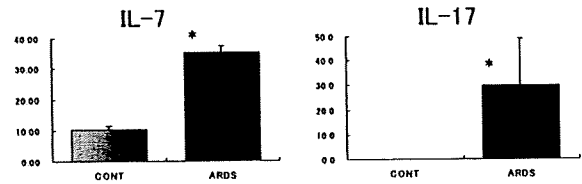


図5 BAL液中のIL-7、IL-17 両サイトカインとも、ARDS群において有意に高値を示した。単位はpg/ml、* p < 0.05

5. 考 案

ALI/ARDSは広範かつ多様な病態を包括しており、原因疾患、関与因子は多岐にわたるが、病理学的には好中球を主体とした炎症細胞の肺胞腔内、肺胞壁への集積と種々の程度の肺組織傷害を呈し、肺微小血管透過性の亢進が主病態となる。これらの病態形成に大きく関わるのがサイトカインと理解されている。今回、ARDS患者および健常人のBAL液を採取し、そのサイトカインについて網羅的解析を行った。その結果、ARDS群においてGM-CSFを除く16種のサイトカインが有意差をもって高値を示した。ALI/ARDSにおける肺局所サイトカインが高値を示した機序として、肺胞マクロファージなどによる肺局所産生の亢進、及び血管透過性亢進に続発する血中からの移行と二つの可能性が考えられた。今回はBAL液のみの検討で血液の採取・測定は行っておらず、また測定した全てのサイトカインについて肺局所濃度の情報がこれまでに得られているわけではないため、一部のサイトカインが血中から移行した可能性を否定できない。しかし一般的にALI/ARDS病態下では過剰炎症が認められることから、今回特に高値を示したIL-6、IL-8、MCP-1に関しては肺胞マクロファージ、血管内皮細胞、肺胞上皮細胞などにより肺局所で過剰に産生された可能性が高いと考えた。また今回測定したBAL液中の好中球とサイトカイン濃度の間には有意な相関関係は認められなかった。この一因としてARDS患者の検体数が少なかったことが考えられ、今後症例数を増やし再検討を行う予定である。

サイトカインの中には、炎症反応を惹起するもの(炎症性サイトカイン)と、抑制するもの(抗炎症性サイトカイン)があり、通常の生理的、病理的環境下においては両サイトカインの産生が合目的的に制御されている。しかし過度の侵襲によって両者のバランス

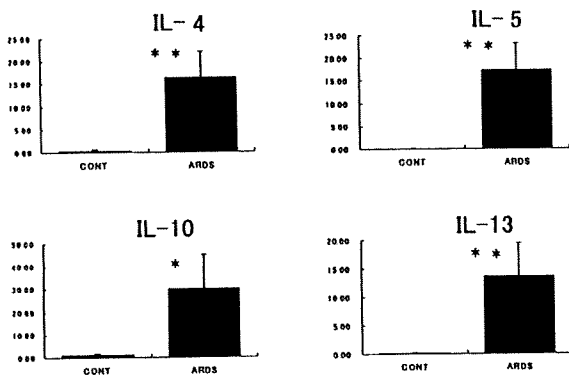


図3 BAL液中のTh-2細胞関連サイトカイン IL-4、IL-5、IL-10、IL-13のいずれも、ARDS群において高値を示した。単位はpg/ml、* p < 0.05 ** p < 0.01

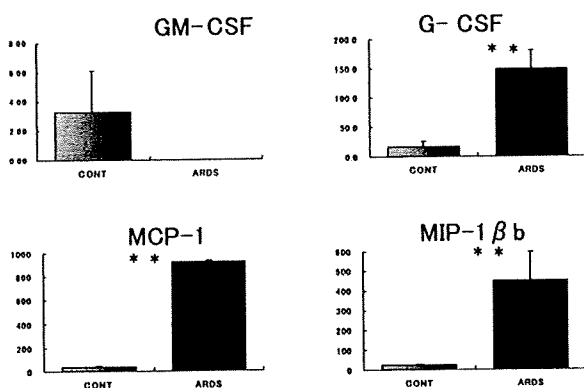


図4 BAL液中の単球作用性サイトカイン GM-CSFはARDS群で全て測定感度以下であった。G-CSF、MCP-1、MIP-1βは、ARDS群において有意に高値を示した。単位はpg/ml、** p < 0.01

が崩れる場合があり、炎症性サイトカインが過剰になることで引き起こされる状態が systemic inflammatory response syndrome(SIRS)、そして抗炎症性サイトカインが過剰になることで引き起こされる状態が compensatory anti-inflammatory response conference(CARS) と呼ばれている。炎症性サイトカインには IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8 などが含まれ、抗炎症性サイトカインには TGF- β 、IL-4、IL-10 などが含まれる。これらの中で今回測定したものは IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-4、IL-10 であるが、そのいずれも健常者検体に比べて有意に高値を示した。ARDS 患者の BAL 液で、これらのサイトカインが高値を示すことはこれまでに報告されており (IL-1 β ^{2,3)}、TNF- α ^{3,4)}、IL-6³⁾、IL-8^{3,5)}、IL-4³⁾、IL-10⁶⁾、今回の我々の結果からも、ARDS 病態下において炎症性、抗炎症性サイトカインのいずれもが産生亢進していることが確認された。

炎症性/抗炎症性サイトカインバランスの評価指標としては、TNF- α /IL-10 比などが試用されており^{7,8)}、今回の検討で同比を求めると、ARDS 群 0.018 \pm 0.002、健常群 0.00 \pm 0.00 と、ARDS 群で高い傾向を示しており、過剰炎症に傾いた病態であることが想像された。しかし TNF- α /IL-10 比は、標準的指標とまでは言い難く、また他の多くの炎症性、抗炎症性サイトカインを考慮していないため、その正確性は不明である。また今回は、BAL 液の採取が一回のみであることから、経時的变化を観察することができなかった。

次に、ヘルパー T 細胞は、そのサイトカイン産生パターンから Th-1 細胞と Th-2 細胞に二分され、Th-1 細胞は IL-2、IL-12、IFN- γ 、TGF- β を産生することにより、細胞傷害性 T 細胞、マクロファージを活性化する。今回測定した Th-1 サイトカインは IL-2、IL-12、IFN- γ であり、これらすべてが ARDS 群において高値を示した。IL-2 は ARDS 発症早期、中でも sepsis に伴う ARDS において上昇するとされており⁹⁾、今回の結果とも合致した。IFN- γ は高濃度酸素曝露下における肺損傷において重要な役割を果たしていることが示されており¹⁰⁾、また ARDS との関与も示されているが¹¹⁾、ARDS 患者の BAL 液中 IFN- γ についての報告はない。ARDS 患者の BAL 液好中球はアポトーシス抵抗性であり⁹⁾、その原因としてリポ多糖 (lipopolysaccharide)¹²⁻¹⁵⁾、補体 C5a¹²⁾、GM-CSF^{12, 16)}、G-CSF^{13, 15, 16)}、IFN^{13, 16)}、IL-2¹⁷⁾、IL-6^{18, 19)} などの炎症性メディエーターが好中球のアポトーシス

を阻害することが知られている。従って今回高値を示した IL-2 と IFN- γ が、好中球アポトーシスを阻害することで ARDS の発症や病態の遷延化に関与していた可能性も考えられた。同じく ARDS 患者 BAL 液の IL-12 に関する報告も認めないが、IL-12 は IFN- γ 産生を誘導し、細胞性免疫を賦活化することで炎症を遷延化させている可能性があった。

一方、Th-2 細胞は IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13 などを産生し、これらは抗炎症性作用をもつものが多い。IL-4 は sepsis 誘発 ARDS の早期において高値を示すとの報告があり³⁾、IL-13 については VEGF の産生を誘導し、ARDS に保護的に作用している可能性が示唆されている²⁰⁾。IL-5 については ARDS と関連を示す文献は認められなかった。今回の検討で、IL-4、IL-10、IL-13 などが高値を示していたことより、ARDS 病態下で Th2 細胞の活性化も示唆された。

Th-1/Th-2 バランスの指標として INF- γ /IL-4 比が用いられることがある。今回は健常群において IL-4 の濃度が測定感度以下のものが多いため当てはめることができなかった。そこで IL4/IFN- γ 比を測定した場合、ARDS 群 0.093 \pm 0.033、健常群 0.003 \pm 0.003 と、ARDS 群で高い傾向を認め、Th-2 細胞の活性化が示唆された。しかし、炎症性/抗炎症性バランスと同様、本比は標準的ではなく、今後より多数のサイトカインを考慮した指標が必要と考えられた。

次に、単球作用性のサイトカインとしては、今回 GM-CSF、G-CSF、MCP-1、MIP-1 β を測定し、GM-CSF を除くすべてが健常群と比べて有意に高値を示した。ALI/ARDS 患者の BAL 液において GM-CSF が検出されなかったことから、GM-CSF が ALI/ARDS の病態にあまり関与していない可能性があった。同可能性を示唆する他の根拠として、GM-CSF が好中球以外に好酸球に対してもコロニー刺激作用や抗アポトーシス作用を発揮するにもかかわらず²¹⁾、ALI/ARDS 患者の BAL 液の分画で好酸球の上昇が見られないことが挙げられる。一方、重症敗血症例に対する GM-CSF 療法により、肺酸素化能の改善を認めていることから²²⁾、GM-CSF 低値が ALI/ARDS 病態の発症・増悪に関連している可能性も考えられた。その他、健常人では GM-CSF 濃度が極めて高値を示した一人を除けば最高値が 1.53pg/ml と、他のサイトカインに比べて極端に低く、GM-CSF の血中から肺胞腔への移行率が低い可能性も

考えられた。

CCケモカインに属する MCP-1 や MIP も、ARDS 病態への関与が報告されている²³⁾。MIP-1 β は MCP-1 と比べて、より血管透過性を亢進させる点で ARDS の発症に強く関与していると報告される一方で²³⁾、MCP-1 は ARDS 患者 BAL 液中で高値を示し、その値と呼吸不全の重症度との間に相関関係があると報告されている²⁴⁾。今回 MCP-1、MIP-1 β を測定した結果、いずれも ARDS 群において高値を示しており、上述した以前の報告結果を裏付けるものであった。

最後に IL-7、IL-17 に関しては、今回の検討で他のサイトカインと同様 ARDS 群で高値を認めたが、ARDS 病態への関与を示すこれまでの報告は見あたらなかった。しかし IL-7 は末梢 T 細胞の数的平衡調節機構の中心的役割を果たし²⁵⁾、また IL-17 は気管支喘息などにおいて、気道炎症を惹起するなどの重要な役割を果たしていること²⁶⁾ から、両サイトカインの ARDS 病態への関与が疑われ、今後の検討が必要と思われた。

6. 結 語

今回、我々は preliminary な検討として、Bio-plex[®] suspension array 法を用いて ARDS 患者および健常者における BAL 液中のサイトカインを測定し、GM-CSF を除くサイトカインが ARDS 群で高値をとることを示した。同法による網羅的解析は、呼吸器疾患の病態解明に極めて有用であり、今後同法を臨床検体、動物実験に応用し、ALI/ARDS のより詳細な病態解明を行う予定である。

参考文献

- 1) Bernard, G.R., A. Artigas, K.L. Brigham, et al: The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med.* 149(3 Pt 1):818-824, 1994
- 2) Siler, T.M., J.E. Swierkosz, T.M. Hyers, et al: Immunoreactive interleukin-1 in bronchoalveolar lavage fluid of high-risk patients and patients with the adult respiratory distress syndrome. *Exp Lung Res.* 15(6):881-894, 1989
- 3) Meduri, G.U., G. Kohler, S. Headley, et al: Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest.* 108(5):1303-1314, 1995
- 4) Millar, A.B., N.M. Foley, M. Singer, et al: Tumour necrosis factor in bronchopulmonary secretions of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet.* 2(8665): 712-714, 1989
- 5) Jorens, P.G., J. Van Damme, W. De Backer, et al: Interleukin 8 (IL-8) in the bronchoalveolar lavage fluid from patients with the adult respiratory distress syndrome (ARDS) and patients at risk for ARDS. *Cytokine.* 4(6): 592-597, 1992
- 6) Matute-Bello, G., W.C. Liles, F. Radella, 2nd, et al: Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 156(6):1969-1977, 1997
- 7) Armstrong, L. and A.B. Millar: Relative production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome. *Thorax.* 52(5):442-446, 1997
- 8) Park, W.Y., R.B. Goodman, K.P. Steinberg, et al: Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 164(10 Pt1):1896-1903, 2001
- 9) Lesur, O., A. Kokis, C. Hermans, et al: Interleukin-2 involvement in early acute respiratory distress syndrome: relationship with polymorphonuclear neutrophil apoptosis and patient survival. *Crit Care Med.* 28(12):3814-3822, 2000
- 10) Yamada, M., H. Kubo, S. Kobayashi, et al: Interferon-gamma: a key contributor to hyperoxia-induced lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 287(5):L1042-1047, 2004
- 11) Jacobs, R.F., D.R. Tabor, A.W. Burks, et al: Elevated interleukin-1 release by human alveolar macrophages during the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 140(6):1686-1692, 1989
- 12) Lee, A., M.K. Whyte, and C. Haslett: Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol.* 54(4):283-288, 1993
- 13) Colotta, F., F. Re, N. Polentarutti, et al: Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood.* 80(8):2012-2020, 1992
- 14) Hachiya, O., Y. Takeda, H. Miyata, et al: Inhibition by bacterial lipopolysaccharide of spontaneous and TNF-alpha-

- induced human neutrophil apoptosis in vitro. *Microbiol Immunol.* 39(9):715-723, 1995
- 15) Yamamoto, C., S. Yoshida, H. Taniguchi, et al: Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by guinea pig macrophages. *Infect Immun.* 61(5):1972-1979, 1993
- 16) Liles, W.C., P.A. Kiener, J.A. Ledbetter, et al: Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med.* 184(2):429-440, 1996
- 17) Pericle, F., J.H. Liu, J.I. Diaz, et al: Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur J Immunol.* 24(2):440-444, 1994
- 18) Biffl, W.L., E.E. Moore, F.A. Moore, et al: Interleukin-6 suppression of neutrophil apoptosis is neutrophil concentration dependent. *J Leukoc Biol.* 58(5):582-584, 1995
- 19) Biffl, W.L., E.E. Moore, F.A. Moore, et al: Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis. *Arch Surg.* 131(1):24-29; discussion 29-30, 1996
- 20) Come, J., G. Chupp, C.G. Lee, et al: IL-13 stimulates vascular endothelial cell growth factor and protects against hyperoxic acute lung injury. *J Clin Invest.* 106(6):783-791, 2000
- 21) Lopez, A.F., D.J. Williamson, J.R. Gamble, et al: Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival. *J Clin Invest.* 78(5):1220-1228, 1986
- 22) Presneill, J.J., T. Harris, A.G. Stewart, et al: A randomized phase II trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy in severe sepsis with respiratory dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med.* 166(2):138-143, 2002
- 23) Bless, N.M., M. Huber-Lang, R.F. Guo, et al: Role of CC chemokines (macrophage inflammatory protein-1 beta, monocyte chemoattractant protein-1, RANTES) in acute lung injury in rats. *J Immunol.* 164(5):2650-2659, 2000
- 24) Rosseau, S., P. Hammerl, U. Maus, et al: Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279(1):L25-35, 2000
- 25) Fry, T.J., E. Connick, J. Falloon, et al: A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood.* 97(10):2983-2990, 2001
- 26) Linden, A. and M. Adachi: Neutrophilic airway inflammation and IL-17. *Allergy.* 57(9):769-775, 2002

特集

重症呼吸器疾患の救急管理

ARDS

池田 雄一郎 藤島 清太郎

要旨 ARDSは種々の病態に続発して急性に発症する非心原性肺水腫で、その致死率は約40%と高い。ARDSの治療に関して、これまで生存率の改善効果を確認し得た薬剤がない一方で、人工呼吸領域では最近幾つかの進歩がみられている。ventilator induced lung injury (VILI)を回避するための呼吸管理法は肺保護戦略と呼ばれており、低容量換気、open lung approach、およびrecruitment maneuverからなる。低容量換気は大規模RCTによって長期予後の改善効果が証明されており、open lung approachは病態を改善することが示唆されている。一方、recruitment maneuverは酸素化を一時的に改善するが、標準的な手技とはなっていない。本稿では、腹臥位換気、高頻度振動換気、NO吸入療法などを含めた最近の人工呼吸管理法について、エビデンスを基に概説する。

池田 雄一郎 藤島 清太郎：ARDS, 呼吸27(1)：43-48, 2008

キーワード：open lung approach recruitment maneuver 腹臥位換気 HFO NPPV

I. ARDSについて

急性呼吸促進症候群(acute respiratory distress syndrome：ARDS)は敗血症や重症肺炎、多発外傷など種々の病態に続発して急性に発症する非心原性肺水腫である。その概念は1967年にAshbaughらによってはじめて提唱¹⁾されて以降、様々な変遷をみた。1994年には米国・欧州合同委員会(the American-European Consensus Conference；AECC)によりARDSの診断基準を統一する試み²⁾がなされ、この定義に基づく診断基準が現在広く使われている(表1)²⁾。

ARDSは、急激進行性の低酸素血症、胸部X線上の両側性浸潤影、肺コンプライアンスの低下を呈し、左房圧の

上昇を伴わない病態である。病理上はdiffuse alveolar damage(DAD)の所見を呈し、肺毛細血管のうっ滞、間質および肺胞性肺水腫、肺胞腔内出血などを認める。また発症には、肺性(肺炎など)あるいは肺外性(瘵炎など)の様々な危険因子が関与している³⁾。致死率は現在でも約40%であり、死亡原因として呼吸不全以上に多臓器不全の関与が指摘されている。

発症機序は未解明な部分も多いが、高度侵襲に対する生体反応としてサイトカインを主体とする炎症性メディエーターが産生・放出されて非特異的な過剰炎症が惹起され、好中球の活性化と肺への集積が起る結果、肺毛細血管内皮細胞の広範な傷害を伴う透過性亢進型肺水腫をも発症すると理解されている。早期には炎症細胞の浸潤、肺間質の浮腫、肺胞隔壁の傷害・脱落、肺胞腔への出血が出現し、後期にはII型肺胞上皮細胞、線維芽細胞の肺胞内増殖を認め、肺の線維化を来す。

ARDSの治療に関しては、これまで生存率の改善効果を確認し得た薬剤がない一方で^{3)~6)}、人工呼吸領域では最

ARDS

慶應義塾大学医学部救急医学

Yuichiro Ikeda and Seitaro Fujishima

Department of Emergency and Critical Care Medicine, Keio University, School of Medicine, Tokyo 160-8582, Japan

表 1

PaO ₂ /F _I O ₂	
ALI	PaO ₂ <300 mmHg
ARDS	PaO ₂ <200 mmHg

- ① 急性の経過
- ② 胸部 X 線上の両側びまん性浸潤陰影
- ③ 低酸素血症
- ④ 左心不全の否定(肺動脈楔入圧<18 mmHg)

近幾つかの進歩がみられている。今回、ARDS の人工呼吸管理法について最新の知見を含め概説する。

II. 肺保護戦略

ALI/ARDS のなかでも特に ARDS は、重篤な低酸素血症を伴うために高い確率で人工呼吸管理が必要となる。本治療に関連した最も大きな進歩は、生命の維持に必須である人工呼吸という治療行為が、一方で肺を傷害し得ることが判明したことであろう。この ventilator induced lung injury (VILI) という概念が 1980 年代に登場し、今日まで病態と対処法が鋭意研究されてきている。

VILI の病態として、高気道内圧、肺実質の過膨脹 (barotrauma, volutrauma)⁷⁾⁸⁾ や、無気肺に陥っている肺胞の虚脱と再開通の繰り返しによる shear stress (atelectrauma)⁹⁾ などの機械的要因が肺損傷を引き起こす原因となる。さらに、これらの機械的刺激が肺細胞からの炎症性メディエーターの産生を促し、肺局所にとどまらず全身臓器にも傷害を及ぼすことが明らかになってきており注目を集めている (biotrauma)¹⁰⁾。

一方、臨床的に VILI を回避するための呼吸管理法についても多くの知見が得られており、肺保護戦略と呼ばれている。この呼吸管理法では、1 回換気量を制限する低容量換気と、肺の虚脱を防止して適正な膨脹を保つ open lung approach の 2 つが大きな柱となっている。

1. 低容量換気 (low tidal volume ventilation)

ALI/ARDS などの傷害肺では、通常肺と比較し換気可能な肺容量が減少するため、少なくとも重症例では 1 回換気量の低減が必要となる。健常肺では通常 1 回換気量を 8~10 ml/kg に設定するが、重症 ARDS に対し同じ 1 回換気量を用いた場合、気道内圧のピーク値が高くなり VILI を誘発する。そこで Hickling らが、低酸素血症を来さない範囲で 1 回換気量を減らし、付随する高炭酸ガス血症を容認する換気法 “permissive hypercapnia” を提唱したのがはじまりである¹¹⁾。

その後、低容量換気に関し、5 つの RCT が行われている^{12)~16)} (表 2)。Brochard, Stewart, Brower らによる 3 つの RCT では有効性は示されなかったが、Amato らの 1998 年の小規模 RCT でその有効性を示唆した後、ARDS Net が 1996~1999 年にかけて実施した大規模 RCT において、従来換気群に比べて低容量換気群において死亡率が改善することを報告した。同検討では、低容量換気群 (1 回換気量を 6 ml/kg (予測体重) から開始し、最高気道内圧が 25~30 cmH₂O となるよう調節) と対象群 (1 回換気量 12 ml/kg から開始し、気道内圧が 45~50 cmH₂O になるよう調節) を比較したが、F_IO₂ と PEEP に関しては、事前に決めた組み合わせに従って設定している (表 3)。その結果、死亡率は低容量換気群で 31%、対象群で 39.8% と低下を認めている。さらに人工呼吸器非装着期間が 2 日間、肺以外の臓器不全のない期間が 3 日間、それぞれ低容量換気群で延長したが、本検討では barotrauma の合併率に有意差を認めていない。なお、前述した 5 つの RCT の結果は、それぞれ人工呼吸の条件などが異なっているが、大規模症例で改善効果を示した ARDS Net の上記プロトコルが現状では比較的妥当であると考えられる。

低容量換気は “permissive hypercapnia” とほぼ同義に扱われるように、その導入直後には急性呼吸性アシドーシスを呈するが、腎機能が正常で他に代謝性アシドーシスの原因がなければ、徐々に腎性代償機転が働き pH が正常化する。通常重炭酸による補正の必要はない。ただし、高度の循環不全や脳血管障害などで頭蓋内圧亢進を伴う場合などは、早期から補正する必要がある。Paco₂ や pH の許容基準に関するコンセンサスはないが、Feihl らが主張する Paco₂ < 80 mmHg、pH > 7.15 当たりが妥当であると思われる¹⁷⁾。

2. open lung approach

傷害肺は、肺胞が不均一に虚脱しており、換気によって虚脱と再膨張のサイクルを繰り返す際に隣接した肺胞間に shear stress がかかり、機械的あるいは biotrauma により肺損傷を来す可能性が高い。これを防ぐために肺胞の持続的開存を意図した呼吸管理法が考案された¹⁸⁾。

さらに Amato らは、PEEP を肺胞の開存を保つ最小値 (lower inflection point : LIP) より 2~3 cmH₂O 高い値 (至適 PEEP) に保持し、かつ最大気道内圧が肺胞の過伸展を起こさない限界値 (upper inflection point : UIP) 以下になるよう 1 回換気量を設定し、肺胞の虚脱と過伸展を理論的に防ぐ open lung approach を提唱した¹⁹⁾。前述したごとく、その後、open lung approach に低容量換気を組み合わせた呼吸法の有効性が小規模 RCT で示唆されたが、

表 2

	対象者数		1 回換気量 (ml/kg)		プラトー圧 (cmH ₂ O)	死亡率 (%)	p 値
ARDS Network (2000 年)	861	対象群	11.8	予測体重	33	39.8	0.007
		治療群	6.2	予測体重	25	31	
Amato, <i>et al</i> (1998 年)	53	対象群	768 (ml)		37	71	<0.001
		治療群	348 (ml)		30	38	
Brochard, <i>et al</i> (1998 年)	116	対象群	10.3 dry body weight		32	38	0.38
		治療群	7.1 dry body weight		26	47	
Stewart, <i>et al</i> (1998 年)	120	対象群	10.8	理想体重	27	47	0.72
		治療群	7.2	理想体重	22	50	
Brower, <i>et al</i> (1999 年)	52	対象群	10.2	予測体重	31	46	0.61
		治療群	7.3	予測体重	25	50	

表 3 ARDS Net により施行された低容量換気の臨床試験で使用された呼吸管理基準と Pao₂ と PEEP の組み合わせ

変数	対照群		低容量換気群	
人工呼吸モード	volume assist-control		volume assist-control	
初期 1 回換気量 (ml/kg) (予測体重)*	12		6	
プラトー圧 (cmH ₂ O)	≤50		≤30	
pH を 7.3~7.4 に保つための人工呼吸回数 (呼吸数/分)	6~35		6~35	
吸気呼気時間比	1:1~1:3		1:1~1:3	
酸素化ゴール	PaO ₂ 55~80 mmHg または Spo ₂ 88~95 %		PaO ₂ 55~80 mmHg または Spo ₂ 88~95 %	
F _{IO₂} と PEEP (cmH ₂ O) の組み合わせ**	0.3	5	0.3	5
	0.4	5	0.4	5
	0.4	8	0.4	8
	0.5	8	0.5	8
	0.5	10	0.5	10
	0.6	10	0.6	10
	0.7	10	0.7	10
	0.7	12	0.7	12
	0.7	14	0.7	14
	0.8	14	0.8	14
	0.9	14	0.9	14
	0.9	16	0.9	16
0.9	18	0.9	18	
1.0	18	1.0	18	
1.0	20	1.0	20	
1.0	22	1.0	22	
1.0	24	1.0	24	
weaning	pressure support で プロトコール適用 F _{IO₂} ≤ 0.4		pressure support で プロトコール適用 F _{IO₂} ≤ 0.4	

* : その後プラトー圧が対照群で 50 cmH₂O, 低容量換気群で ≤30 cmH₂O となるなら調節** : 34 cmH₂O まで負荷可

高 PEEP 負荷のみに関しては、ARDS Net が 1 回換気量 6 ml/kg、最高気道内圧 30 cmH₂O 以下の条件下で、PEEP 8.3 cmH₂O と 13.8 cmH₂O の呼吸管理を比較した大規模 RCT を行い、生存率に差を認めなかった²⁰⁾。

しかし、上記大規模 RCT については、①肺の酸素化を指標として PEEP 値を調節しているが、同指標が必ずしも肺胞の開存を反映しないため、指標として不適切、②他の lung recruitment の有効性を示した検討に比し両群ともに PEEP 値が低かったために、酸素化は改善したが肺保護作用は発揮しなかった、などの批判があり、上記の結果のみをもって高 PEEP による lung recruitment が無効とは結論できない²¹⁾。さらに最近では、ARDS 患者で recruit 可能な領域が多いほど死亡率が高く²²⁾、recruitment の程度に応じて酸素化が改善されることも示されており²³⁾、今後有用性が示される可能性も十分あると思われる。なお、2007 年 5 月の ATS (米国胸部疾患学会) において、カナダを中心に実施された LOVS (Lung Oven Ventilation Study) の結果が報告されたが、高 PEEP 群で院内死亡率が低下傾向にあることと治療不応性低酸素血症発生率の低下を認めたものの、28 日生存率には有意差がなかったとのことであった。

3. recruitment maneuver

一度高い気道内圧で虚脱した肺胞を開存すれば、以後はより低い気道内圧で開存を維持可能である。この原理を利用し、15~45 秒、40~50 cmH₂O 程度の気道内圧を負荷し、その後 15~30 cmH₂O 程度で維持する方法を recruitment maneuver と呼び、ALI/ARDS に対する有用性が検討されている。しかし、本法単独の有効性は RCT で検証されておらず、また短時間でも高気道内圧により ALI が惹起される可能性もあるため、標準的治療法としてはまだ認知されているとはいえない²¹⁾²³⁾。

Ⅲ. その他の人工呼吸管理

1. 腹臥位換気 (prone positioning)

ALI/ARDS 患者における長時間の仰臥位保持は、重力の影響による肺胞内水腫液、気道内分泌物の背側 dependent zone へのシフト、同部の肺虚脱、および、これによる肺胞低換気を引き起こす。一方、肺血流は背側に多く分布するため、換気血流比の不均衡分布を生じ、肺の酸素化が増悪する。腹臥位で換気を行うことにより、これらの要因が取り除かれ病態の改善が期待されるとともに、排痰を促す呼吸学的な意味合いもある。しかし、ヨーロッパで行われた大規模 RCT では、7 時間の腹臥位換気により酸素化の改善は認められたものの、予後の改善効果は示さ

れなかった²⁴⁾。2004 年にも 791 人を対象に 8 時間の腹臥位換気を用いた RCT が施行されたが、酸素化の改善と肺炎の発生率の低下を認めたものの、生存率の改善はなく、挿管チューブの閉塞や褥瘡の発生などの合併症が多く認められた²⁵⁾。現時点では、「Surviving Sepsis Campaign Guidelines」(Sepsis ガイドライン)²⁶⁾にもあるように、本換気法に習熟した施設において重症例に限り試みてもよい治療法であると考えられる。今後、有効性のさらなる検討が必要である。

2. 高頻度振動換気 (high frequency oscillatory ventilation ; HFOV, HFO)

HFOV (HFO) は、1 分間に 5~40 Hz の振動を与えて換気を行う方法であり、もともと新生児の呼吸管理法として発展してきたものである。1 回換気量は 1~2 ml/kg と解剖学的死腔量よりはるかに少ないが、振動で生じる乱流によりガス交換を可能としている。成人 ARDS に対する RCT としては、Derdak らが 2002 年に報告したものがあり、酸素化が早期に改善したものの 24 時間以上は持続せず、その後徐々に酸素化の増悪を認めている²⁷⁾。また、同報告により 30 日後死亡率は HFOV 群 37%、対照群 52% と低下傾向にあったが、統計学的有意差は認めなかった。最近では HFOV を腹臥位換気や recruitment maneuver と組み合わせると、酸素化の改善により有効との報告も出ており²⁸⁾²⁹⁾、今後大規模 RCT が待ち望まれるところである。なお、わが国でも成人用にメトラン社製 R100 が開発されて以降、成人重症 ARDS に対し使用される機会が増えている。

3. 非侵襲的陽圧換気 (noninvasive positive pressure ventilation ; NPPV, NIPPV)

NPPV (NIPPV) は顔マスクや鼻マスクを用いて行う陽圧換気法である。従来の陽圧換気 に比べ患者侵襲が少なく、特に人工呼吸関連肺炎 (ventilator associated pneumonia ; VAP) の発症頻度が低いことが大きな特徴である。ただし、循環不全や意識障害、気道分泌物が多い患者には適しておらず、気道管理の確実性の面で劣っている。

NPPV の COPD や心原性肺水腫に対する有効性は早期から確立されている。しかし、血液悪性腫瘍、免疫不全の患者を除き、ARDS を含む急性呼吸不全に対する NPPV の予後改善効果はまだ確認されておらず^{30)~32)}、試みる場合でも、約半数例で気管挿管が必要となることを承知したうえで十分な管理体制のもと行うべきである。

4. NO 吸入療法 (inhaled nitric oxide)

NO 吸入は選択的に換気肺の血管拡張を促し、肺換気血流比の改善、肺高血圧、低酸素血症の改善を示す。また、サイトカインの産生を抑制する効果も期待されている。し

かし、2003年の500人以上を対象としたメタ解析では、NO吸入により一過性の酸素化の改善は認めるものの、生存率の改善を認めないことが示された³³⁾。また、2004年に行われた385人を対象としたRCTにおいてARDS患者に対し5ppmにてNO吸入を施行したところ、48時間後にPao₂の改善を認めたものの、生存率や人工呼吸離脱までの期間に有意差を認めていない³⁴⁾。現時点においてNO吸入療法は標準的治療とはいえず、ECMO(extracorporeal membrane oxygenation)同様に低酸素血症に対する緊急避難的意味合いの強い治療といえる。

IV. おわりに

以上、ALI/ARDSに対する呼吸管理について概説したが、ALI/ARDS患者は長期間の人工呼吸管理を要する場合が多く、VAPの合併率も30~55%と高いことにも留意すべきである。2005年にはATSと米国感染症学会(Infectious Disease Society of America; IDSA)の合同委員会によるVAPを含む院内肺炎に対する診療ガイドラインが公表されており³⁵⁾、エビデンスに基づくVAPの予防対策、早期診断、および適切な抗菌化学療法も重要であることを最後に述べ、稿を終えることとする。

文 献

- 1) Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2 : 319—323, 1967
- 2) Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS : definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149 : 818—824, 1994
- 3) Frutos-Vivar F, Nin N, Esteban A. Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 10 : 1—6, 2004
- 4) Milberg JA, Davis DR, Steinberg KP, et al. Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) : 1983—1993. *JAMA* 273(4) : 306—309, 1995
- 5) Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ, et al. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 132(3) : 485—489, 1985
- 6) Rubenfeld GD. Epidemiology of acute lung injury. *Crit Care Med* 31(4 Suppl) : s276—s284, 2003
- 7) Webb HH, Tierney DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis* 110 : 556—565, 1974
- 8) Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema : respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis* 137 : 1159—1164, 1988
- 9) Slutsky AS. Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest* 116 : 9s—15s, 1999
- 10) Tremblay LN, Slutsky AS. Ventilator-induced lung injury : from barotrauma to biotrauma. *Proc Assoc Am Physicians* 110 : 482—488, 1998
- 11) Hickling KG, Henderson SJ, Jackson R. Low mortality associated with low volume pressure limited ventilation with low volume pressure in severe adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 16(6) : 372—377, 1990
- 12) Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, et al. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 338 : 347—354, 1998
- 13) Brochard L, Roudot-Thoraval F, Roupie E, et al. Tidal volume reduction for prevention of ventilator-induced lung injury in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 158 : 1831—1838, 1998
- 14) Stewart TE, Meade MO, Cook DJ, et al. Evaluation of a ventilation strategy to prevent barotrauma in patients at high risk for acute respiratory distress syndrome : pressure and volume limited ventilation strategy group. *N Engl J Med* 338 : 355—361, 1998
- 15) Brower RG, Shanholtz CB, Fessler HE, et al. Prospective, randomized controlled clinical trial comparing traditional versus reduced tidal volume ventilation in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med* 27 : 1492—1498, 1999
- 16) The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342 : 1301—1308, 2000
- 17) Feihl F, Perret C. Permissive hypercapnia. How permissive should we be? *Am J Respir Crit Care Med* 150(6 Pt 1) : 1722—1737, 1994
- 18) Lachmann B. Open up the lung and keep the lung open. *Intensive Care Med* 18(6) : 319—321, 1992
- 19) Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, et al. Beneficial effects of the “open lung approach” with low distending pressures in acute respiratory distress syndrome. A prospective randomized study on mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 152(6 Pt 1) : 1835—1846, 1995
- 20) The National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Clinical Trials Network. Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 351 : 327—336, 2004
- 21) Mols G, Priebe HJ, Guttman J. Alveolar recruitment in acute lung injury. *Br J Anaesth* 96(2) : 156—166, 2006
- 22) Gattinoni L, Caironi P, Cressoni M, et al. Lung recruitment in patient with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 354(17) : 1775—1786, 2006
- 23) Borges JB, Okamoto VN, Matos GF, et al. Reversibility of lung collapse and hypoxemia in early acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 174(3) : 268—278, 2006
- 24) Gattinoni L, Tognoni G, Pesenti A, et al. Effect of prone positioning on the survival of patients with acute respiratory

- ry failure. *N Engl J Med* 345(8) : 568—573, 2001
- 25) Guerin C, Gaillard S, Lemasson S, *et al.* Effects of systematic prone positioning in hypoxemic acute respiratory failure. A randomized controlled trial. *JAMA* 292 : 2379—2387, 2004
- 26) Dellinger RP, Carlet JM, Maur H, *et al.* Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 32(3) : 858—873, 2004
- 27) Derdak S, Mehta S, Stewart TE, *et al.* High-frequency oscillatory ventilation for acute respiratory distress syndrome in adults : a randomized, controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 166(6) : 801—808, 2002
- 28) Papazian L, Gainnier M, Marin V, *et al.* Comparison of prone positioning and high-frequency oscillatory ventilation in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 33(10) : 2162—2171, 2005
- 29) Ferguson ND, Chiche JD, Kacmarek RM, *et al.* Combining high-frequency oscillatory ventilation and recruitment maneuvers in adults with early acute respiratory distress syndrome : the Treatment with Oscillation and an Open Lung Strategy (TOOLS) Trial pilot study. *Crit Care Med* 33(3) : 479—486, 2005
- 30) Martin TJ, Hovis JD, Costantino JP, *et al.* A randomized, prospective evaluation of noninvasive ventilation for acute respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med* 161(3 Pt1) : 807—813, 2000
- 31) Delclaux C, L'Her E, Alberti C, *et al.* Treatment of acute hypoxemic nonhypercapnic respiratory insufficiency with continuous positive airway pressure delivered by a face mask : A randomized controlled trial. *JAMA* 284(18) : 2352—2360, 2000
- 32) Antonelli M, Conti G, Bui M, *et al.* Noninvasive ventilation for treatment of acute respiratory failure in patients undergoing solid organ transplantation : a randomized trial. *JAMA* 283(2) : 235—241, 2000
- 33) Sokol J, Jacobs SE, Bohn D. Inhaled nitric oxide for acute respiratory failure in children and adults : a meta-analysis. *Anesth Analg* 97 : 989—998, 2003
- 34) Taylor RW, Zimmerman JL, Dellinger RP, *et al.* Low-dose inhaled nitric oxide in patients with acute lung injury : a randomized controlled trial. *JAMA* 291 : 1603—1609, 2004
- 35) Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 171(4) : 388—416, 2005

Original article

Neutrophil elastase and systemic inflammatory response syndrome in the initiation and development of acute lung injury among critically ill patients

Seitaro Fujishima ^{a,*}, Hiroshi Morisaki ^b, Akitoshi Ishizaka ^c, Yoshifumi Kotake ^b, Masaru Miyaki ^a, Kikuo Yoh ^a, Kazuhiko Sekine ^a, Junichi Sasaki ^{a,1}, Sadatomo Tasaka ^c, Naoki Hasegawa ^c, Yohko Kawai ^{d,2}, Junzo Takeda ^b, Naoki Aikawa ^a

^a Department of Emergency and Critical Care Medicine, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

^b Department of Anesthesiology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

^c Division of Pulmonary Medicine, Department of Medicine, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

^d Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

Received 26 June 2007; accepted 4 July 2007

Available online 31 July 2007

Abstract

Critically ill patients are commonly associated with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and are at a greater risk of developing acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS). Under these conditions, large amounts of various cytokines are produced, which either directly or indirectly induce tissue injury and finally organ dysfunctions, through the activation of neutrophils and as a result of release of cytotoxic molecules, especially neutrophil elastase (NE). In the present study, we determined plasma neutrophil elastase–alpha-1 antitrypsin complex (NE–AT) and elastase digests of cross-linked fibrin (e-XDP) in critically ill patients to elucidate the significance of NE in the initiation and progression of ALI and ARDS in the presence or absence of SIRS. We found significantly increased levels of plasma NE–AT in the patients with ARDS, especially when the definition of SIRS was met. Among ALI/ARDS groups, plasma NE–AT, but not e-XDP, correlated significantly with the decrease in PaO₂/FIO₂ ratio and the duration of ALI/ARDS. Furthermore, NE–AT, but not e-XDP, significantly increased in subgroups whose PaO₂/FIO₂ ratio decreased by more than 20%. Such correlations and differences between the subgroups were not observed in the non-ALI patients. From these results, we speculate that NE–AT, but not e-XDP, may be predictive of progressive lung injury in the early stage of ALI and ARDS.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: SIRS; ALI; ARDS

1. Introduction

Patients in a critical condition, especially those suffering from severe sepsis, are commonly associated with systemic

inflammatory response syndrome (SIRS) [1]. These patients are at greater risk of developing multiple organ dysfunction syndrome (MODS), including acute lung injury (ALI)/acute respiratory distress syndrome (ARDS), which is currently the major determinant of their prognosis [2]. However, there is only a small fraction of the available evidence for the treatments [3], such as early fluid resuscitation [4], tight glucose control [5], activated protein C [6] for severe sepsis and low tidal volume ventilation for ALI/ARDS [7]. There is therefore a clear need to accumulate further clinical evidence for sepsis and septic ALI/ARDS is being awaited.

* Corresponding author. Tel.: +81 3 3225 1323; fax: +81 3 3353 2232.

E-mail address: fujishim@sc.itc.keio.ac.jp (S. Fujishima).

¹ Present address: Division of Emergency Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

² Present address: International University of Health and Welfare, Department of Preventive Health Examination Center in Sanno Hospital, Tokyo, Japan

In SIRS and sepsis, various proinflammatory and anti-inflammatory cytokines are produced in large quantities, and this either directly or indirectly induces tissue injury and finally organ dysfunction [8]. Neutrophils are intensely activated by multiple stimuli, such as bacterial toxins and endogenous proinflammatory mediators, and play key roles in inducing tissue injury and the resulting organ dysfunctions through the release of various cytotoxic molecules, including reactive oxygen intermediates and granular enzymes. Among these, neutrophil elastase (NE), a serine proteinase, is thought to be one of the major cytotoxic molecules because of its abundance and powerful degrading activity against a wide variety of substrates [9]. In addition, NE has recently become known for its proinflammatory functions [10]. Since NE is harmful even to the host, there exist multiple defensive mechanisms to neutralize free NE. In blood, alpha-1 antitrypsin (AT) and alpha-2 macroglobulin are abundant, and intravascularly released NE is immediately neutralized. In contrast, although there exist NE inhibitors in the extravascular space, such as AT, secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and elafin, the concentrations of these endogenous protease inhibitors of high molecular weight may be insufficient to adequately neutralize extravascularly released NE, especially when a large amount of NE is released in patients with SIRS and sepsis [11].

Neutrophils exist mostly within the circulation and either float in or are loosely attached to the peripheral vasculature under physiological conditions, but they easily migrate out of capillaries in response to various stimuli. NE can be released either intravascularly or extravascularly, but the place where NE is released is critical in the induction of tissue injury and organ dysfunction. However, thus far, there has been no method or marker to indicate where NE is released, and a plasma marker for extravascularly released NE is eagerly awaited as it would enable prediction of the degree of NE-induced tissue injury, especially in patients with SIRS. We hypothesized that plasma levels of elastase digests of cross-linked fibrin (e-XDP) correlate with the amount of extravascularly released NE, especially in the lungs, and thus may be useful in predicting the degree of lung injury. In the present study, we determined plasma levels of NE–AT complex and e-XDP in critically ill patients, and examined their significance in ALI and ARDS.

2. Methods

2.1. Study population

We conducted a single-center retrospective observational study at the university hospital of the School of Medicine, Keio University. The study population included 136 patients, who were admitted to our intensive care unit, followed up for more than 7 days, and whose blood was drawn on the day of admission. The study has been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki. There were 94 men and 42 women (mean \pm SEM age, 60.9 ± 1.4 years). Sixty-four had cardiovascular diseases,

32 had gastrointestinal diseases, 10 had respiratory diseases, seven had neurological diseases, and 23 had other diseases. Patients receiving postoperative care were included in each category. Based on the definition by the American–European consensus conference, all the patients were divided into the following three groups: (1) non-ALI: the $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$ ratio on the day of inclusion in the study was >300 or an apparent cause for hypoxia was identified; (2) mild ALI: $200 < \text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 300$ with bilateral infiltration on chest X-ray; and (3) ARDS: $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 200$ and bilateral infiltration on chest X-ray. One hundred twelve patients were categorized as non-ALI, 16 as mild ALI, and eight as ARDS. To analyze the outcome, the mild ALI and ARDS groups were combined because of the small patient numbers in these two groups. Plasma was used for the analysis of NE–AT and e-XDP. However, NE–AT and e-XDP in four and three patients were not determined because of insufficient sample volume, respectively.

The diagnosis of SIRS and sepsis was made based on the diagnostic criteria adopted by the combined committee of American College of Chest Physicians (ACCP) and the Society of Critical Care Medicine (SCCM) [2]. Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II score, Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score and multiple organ dysfunction score (MODS) were determined on the day of inclusion in the study [12,13].

2.2. Determination of neutrophil elastase-related molecules

The NE–AT complex and elastase digests of e-XDP in plasma were determined with a latex agglutination method specific for each molecule [14,15]. The detection limits were 14.3 ng/ml for NE–AT and 0.1 U/ml for e-XDP.

2.3. Statistical analysis

We used the Mann–Whitney *U* test to compare two or three independent groups and the Kruskal–Wallis test to compare more than three groups. To examine the correlations between two parameters, Spearman's rank correlation was used. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Patient characteristics

Of the 136 patients, 112 were placed in the non-ALI category, 16 in the ALI category, and eight in the ARDS category. Ninety-seven patients (71.3%) fulfilled the criteria of SIRS and 80 patients (58.8%) fulfilled the criteria of sepsis on the day of inclusion in the study. On the day of inclusion, the mean APACHE II score of the patients was 9.6 ± 0.5 (range 0–31), the mean SOFA score was 5.1 ± 0.3 (range 0–16), and the mean MODS score was 3.0 ± 0.3 (range 0–14). Mortality at discharge was 8.1%.

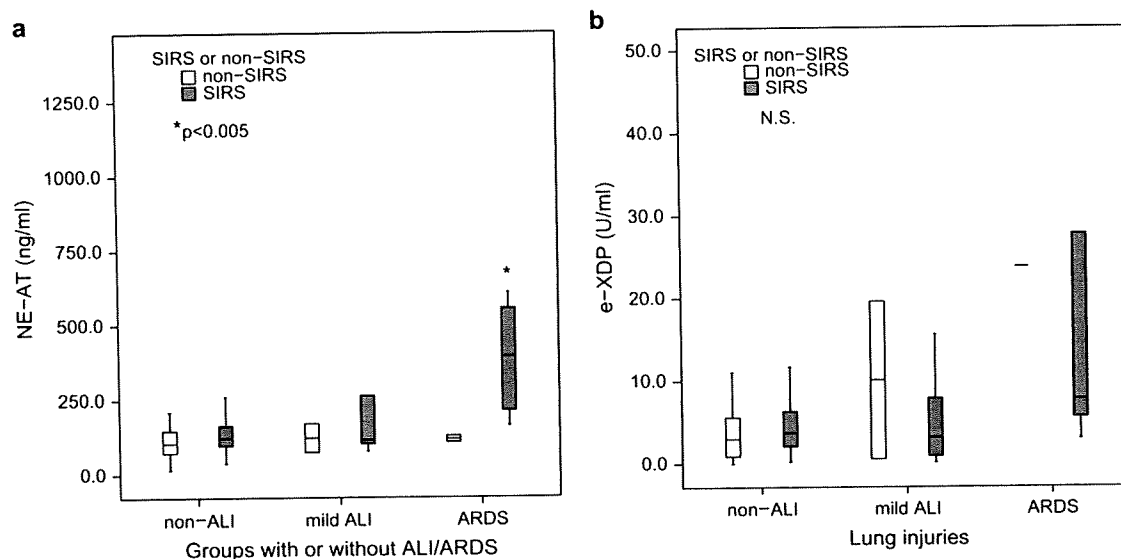


Fig. 1. Box plots showing median plasma levels of (a) NE-AT and (b) e-XDP in patients with or without SIRS in the non-ALI, mild ALI, and ARDS groups. Boxes show interquartile ranges and I bars represent highest and lowest values. * $p < 0.005$. NE-AT, neutrophil elastase- α -1 antitrypsin complex; e-XDP, elastase digests of cross-linked fibrin; and SIRS, systemic inflammatory response syndrome.

3.2. Plasma levels of NE-AT and e-XDP in non-ALI, mild ALI, and ARDS

Fig. 1a,b shows plasma NE-AT and e-XDP levels in the non-ALI, mild ALI, and ARDS groups with or without SIRS. NE-AT was detectable in all the patients, but e-XDP was undetectable in four patients. Among the three groups, plasma NE-AT and e-XDP levels were significantly higher in the ARDS group than in the non-ALI group ($p < 0.005$, $p < 0.05$, data not shown). When the presence of SIRS was considered, NE-AT levels were still significantly higher in the patients with SIRS and ARDS than in the SIRS and non-ALI groups (Fig. 1a). In contrast, there was no statistically significant difference in e-XDP levels among the groups (Fig. 1b). NE-AT levels were significantly higher in the patients with SIRS than in those without SIRS (115.0 ± 10.1 vs. 176.2 ± 17.7 , $p < 0.05$), but there was no difference in e-XDP levels between the groups (5.3 ± 1.0 vs. 12.4 ± 3.3 , $p = 0.15$). NE-AT levels were also significantly higher in septic patients than those in nonseptic patients (122.1 ± 8.2 vs. 210.7 ± 28.3 , $p < 0.01$). Although there was a trend for higher e-XDP levels in sepsis, there was no statistically significant difference (5.4 ± 0.8 vs. 17.4 ± 5.6 , $p = 0.06$). There was a weak correlation between NE-AT and e-XDP levels ($r = 0.178$, $p < 0.05$).

3.3. Correlations of NE-AT and e-XDP with clinical indices

We then divided patients into two subgroups with or without ALI/ARDS, namely non-ALI and ALI/ARDS groups, and examined the relationships of NE-AT and e-XDP with various clinical indices. In the ALI/ARDS group, plasma NE-AT levels significantly correlated with the decrease between the

initial and lowest $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$ (P/F) ratio, and the duration of ALI/ARDS during hospital stay (Fig. 2a,b). When only patients with mild ALI were analyzed, the correlations with the decrease in P/F ratio and the duration of ALI/ARDS were still significant ($r = 0.40$, $p = 0.034$; $r = 0.43$, $p = 0.019$). In contrast, plasma e-XDP did not correlate with these parameters (Fig. 2c,d). NE-AT also correlated well with APACHE II, SOFA, and MODS scores on the first day in the ALI/ARDS group (Fig. 3a,b), but e-XDP did not (Fig. 3c,d). In the non-ALI group, neither NE-AT nor e-XDP correlated with any of the above parameters, except that a weak correlation was observed between NE-AT and the decrease in P/F ratio and SOFA score.

3.4. NE-AT and e-XDP for subsequent development of lung injury and fatal outcome at the 28th day

We next examined whether plasma NE-AT and e-XDP levels were predictive of patients' subsequent development of lung injury and fatal outcome at the 28th day in the patients with or without ALI and ARDS. In the ALI/ARDS group, plasma NE-AT levels were significantly higher in the subgroup with a decrease of more than 20% between the initial and lowest P/F ratios than in those with a decrease of equal to or less than 20% (Fig. 4a). In contrast, there was no difference in e-XDP level between the two subgroups (Fig. 4b). Similar results were observed when patients were divided into two subgroups with and without a decrease of more than 10% in the P/F ratio (data not shown).

We then examined plasma NE-AT and e-XDP levels and fatal outcome at the 28th day. There was a trend for a higher median NE-AT level in deceased patients than in alive patients, although the difference was not statistically significant

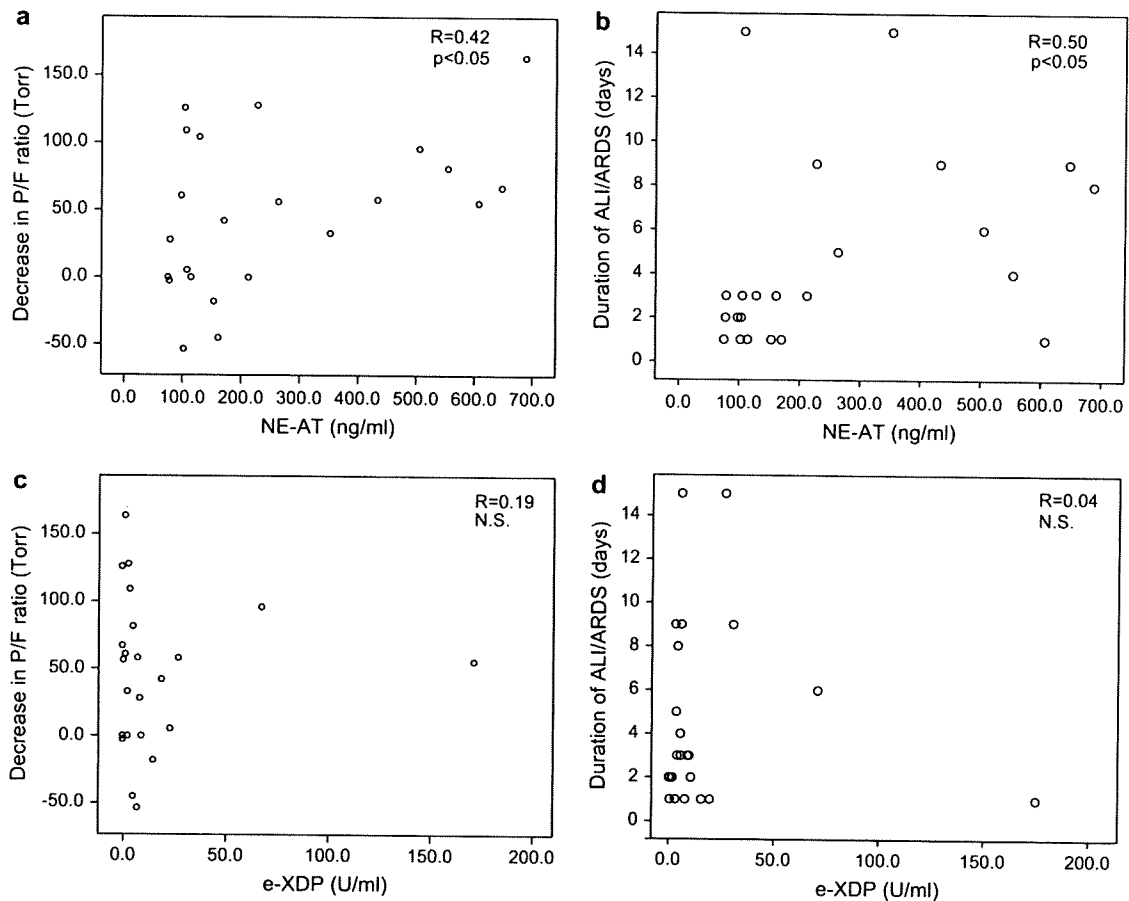


Fig. 2. Comparison of plasma NE-AT and e-XDP with the decrease in P/F ratio and duration of ALI/ARDS. (a) NE-AT vs. decrease in P/F ratio. (b) NE-AT vs. duration of ALI/ARDS. (c) e-XDP vs. decrease in P/F ratio. (d) e-XDP vs. duration of ALI/ARDS. NE-AT, neutrophil elastase- α -1 antitrypsin complex; e-XDP, elastase digests of cross-linked fibrin; and P/F ratio, $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$.

($p = 0.20$, data not shown). There was no difference in e-XDP between the two subgroups ($p = 0.44$, data not shown).

4. Discussion

In the present study, we examined plasma NE-AT and e-XDP levels in critically ill patients to elucidate the significance of NE in the initiation and progression of ALI and ARDS in the presence or absence of SIRS. We found significantly increased levels of plasma NE-AT in the patients with ARDS, especially when the definition of SIRS was met. Among the ALI/ARDS groups, the plasma NE-AT levels, but not the e-XDP levels, correlated significantly with the decrease between the initial and lowest P/F ratios and the duration of ALI/ARDS during the hospital stay. Furthermore, the levels of NE-AT, but not e-XDP, significantly increased in the subgroup with a decrease of more than 20% between the initial and lowest P/F ratios than in those with a decrease of equal to or less than 20%. In contrast, the above correlations and differences between the subgroups were not observed in the non-ALI patients. From these results, we speculated that NE-AT, but not e-XDP, may be predictive of progressive respiratory failure in the early stage of ALI and ARDS. In addition, the combined criteria of ALI/ARDS and SIRS may be

useful for predicting neutrophil activation *in vivo*, and thus applicable for selecting the target for an anti-neutrophil strategy in critically ill patients.

High levels of plasma NE-AT have been reported previously. Rocker et al. examined plasma NE-AT in 50 patients with respiratory failure and showed that higher levels of NE-AT occurred in pre-ARDS and ARDS, as diagnosed by Petty's definition [15]. Moreover, they found that NE-AT was significantly correlated with the P/F ratio, BAL protein, and differential neutrophil counts. Donnelly et al. prospectively examined plasma NE-AT levels in patients with multiple trauma and found that NE-AT increased in patients who developed ARDS as defined by Murray's expanded definition [16]. In the present study, we examined critically ill patients with various etiologies and classified them into non-ALI, mild ALI, and ARDS with or without SIRS, following the definition by the American-European consensus conference. We found that plasma NE-AT increased in patients who fulfilled the criteria of SIRS and ARDS. Furthermore, NE-AT was predictive of progressive lung injury among patients with ALI and ARDS. Our results support the idea that NE makes a significant contribution to the initiation and development of ALI and ARDS during the early phase of critical illness, especially when SIRS is complicated.

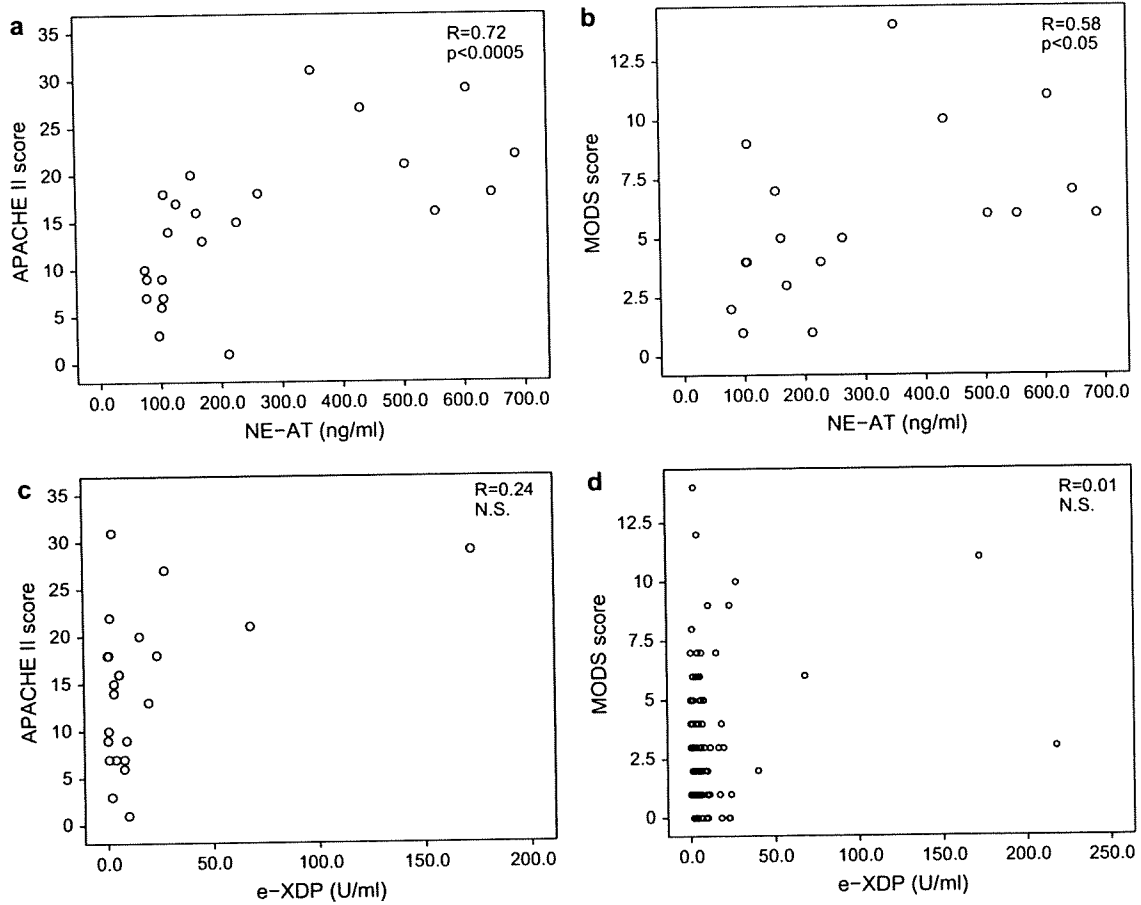


Fig. 3. Comparison of plasma NE-AT and e-XDP with the decrease in P/F ratio and duration of ALI/ARDS. (a) NE-AT vs. APACHE II score. (b) NE-AT vs. MODS score. (c) e-XDP vs. APACHE II score. (d) e-XDP vs. MODS score. NE-AT, neutrophil elastase- α -1 antitrypsin complex; e-XDP, elastase digests of cross-linked fibrin; APACHE II, acute physiology and chronic health evaluation; and MODS, multiple organ dysfunction score.

NE is a potent serine proteinase and could harm vital organs and tissues in addition to killing of invading microorganisms. Acting as protection against the harmful effects of NE, there are several endogenous NE inhibitors, including AT, in the circulation and they can neutralize NE soon after NE is released. In contrast, in SIRS and sepsis, neutrophils are

activated, migrate out from the vasculature, firmly attach to lung endothelial and epithelial cells, and can directly injure them by releasing NE to the neutrophil-stromal cell interface, where no or only a very low concentration of natural NE inhibitors exist. In the present study, we expected that the amount of e-XDP produced would correlate with that of NE released

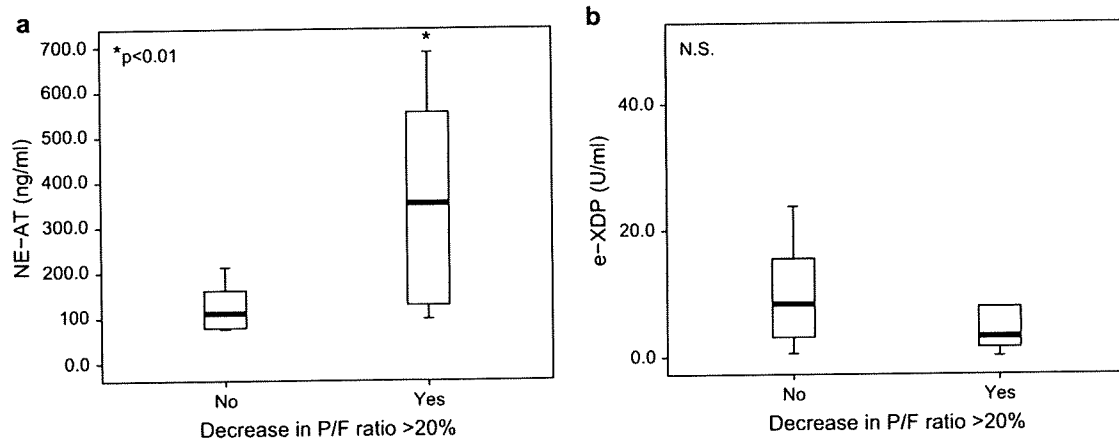


Fig. 4. Box plots showing median plasma levels of (a) NE-AT and (b) e-XDP in two groups of patients, one with a decrease of more than 20% in P/F ratio and another group with a decrease of equal to or less than 20%. Boxes show interquartile ranges and I bars represent highest and lowest values. $*p < 0.01$. NE-AT, neutrophil elastase- α -1 antitrypsin complex; e-XDP, elastase digests of cross-linked fibrin; and P/F ratio, PaO_2/FIO_2 .

extravascularly, especially in the lungs, and therefore could predict the degree of lung injury. However, NE–AT was superior to e-XDP in predicting lung injury in our study. Since there could be several parameters other than free NE that regulate the amount of e-XDP produced, such as the concentration of cross-lined fibrin, extravascularly released NE may not be the major determinant of plasma e-XDP levels.

Although NE–AT seems to play pivotal roles in inducing lung injury, the international clinical trial of the NE antagonist sivelestat sodium for ALI and ARDS (the STRIVE study) failed to demonstrate a useful effect of this agent. In contrast, a Japanese clinical trial showed a significant improvement in lung oxygenation and the number of days not in the intensive care unit in patients with SIRS and ALI. In the international STRIVE study, 78.6% of patients fulfilled the criteria of ARDS [17], whereas only 39.0% of the patients enrolled into the Japanese phase III study fulfilled the criteria of ARDS, and patients with more than three organ failure were excluded [18,19]. In view of our present results showing that plasma NE–AT was predictive of upcoming lung injury in the mild ALI group as well as in the ARDS group, patients with mild ALI may be a better target for NE antagonists, including sivelestat sodium. It is quite probable that NE antagonism may not be effective enough in improving survival. However, since there are no established drugs for ALI/ARDS and sivelestat is available commercially in Japan and Korea, the effectiveness of sivelestat for mild ALI and SIRS needs to be validated in these countries.

Acknowledgements

We thank Ms. Satoko Mino and Ms. Mieko Hayakawa for collecting clinical data. This study was supported in part by Grants-in-Aid from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Keio Gijuku Fukuzawa Memorial Fund for the Advancement of Education and Research, and a research grant from Ono Pharmaceuticals.

References

- [1] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101(6):1644–55.
- [2] Alberti C, Brun-Buisson C, Goodman SV, Guidici D, Granton J, Moreno R, et al. Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(1):77–84.
- [3] Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, et al. Surviving sepsis campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2004;30(4):536–55.
- [4] Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001;345(19):1368–77.
- [5] van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, et al. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med* 2001;345(19):1359–67.
- [6] Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344(10):699–709.
- [7] Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med* 2000;342(18):1301–8.
- [8] Fujishima S, Aikawa N. Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. *Intensive Care Med* 1995;21(3):277–85.
- [9] Lee WL, Downey GP. Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(5):896–904.
- [10] Devaney JM, Greene CM, Taggart CC, Carroll TP, O'Neill SJ, McElvaney NG. Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. *FEBS Lett* 2003;544(1–3):129–32.
- [11] Kawabata K, Hagio T, Matsuoka S. The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *Eur J Pharmacol* 2002;451(1):1–10.
- [12] Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13(10):818–29.
- [13] Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med* 1995;23(10):1638–52.
- [14] Nakahara K, Kazahaya Y, Shintani Y, Yamazumi K, Eguchi Y, Koga S, et al. Measurement of soluble fibrin monomer-fibrinogen complex in plasmas derived from patients with various underlying clinical situations. *Thromb Haemost* 2003;89(5):832–6.
- [15] Ricker GM, Wiseman MS, Pearson D, Shale DJ. Diagnostic criteria for adult respiratory distress syndrome: time for reappraisal. *Lancet* 1989;1(8630):120–3.
- [16] Donnelly SC, MacGregor I, Zamani A, Gordon MW, Robertson CE, Steedman DJ, et al. Plasma elastase levels and the development of the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(5):1428–33.
- [17] Zeiher BG, Artigas A, Vincent JL, Dmitrienko A, Jackson K, Thompson BT, et al. Neutrophil elastase inhibition in acute lung injury: results of the STRIVE study. *Crit Care Med* 2004;32(8):1695–702.
- [18] Tamakuma S, Ogawa M, Aikawa N, Kubota T, Hirasawa H, Ishizaka A, et al. Relationship between neutrophil elastase and acute lung injury in humans. *Pulm Pharmacol Ther* 2004;17(5):271–9.
- [19] Matsuoka S. Personal communication; 2006.