

ラット重症虚血肢モデルにおける 血流慢性化過程と血管新生因子の発現

鳥取大学器官制御外科学講座器官再生外科学分野（主任 應儀 成二教授）

佐伯宗弘, 金岡 保, 應儀成二

The process of progression into a chronic state of blood flow and expression of the endogenous growth factors in a rat model of severe hindlimb ischemia.

Munehiro SAIKI, Yasushi KANAOKA and Shigetsugu OHGI

*Division of Organ Regeneration Surgery, Department of Surgery, Faculty of Medicine,
Tottori University, Yonago, Japan*

ABSTRACT

This study was designed to clarify the process of progression into a chronic state and expression of the endogenous growth factors used rat hindlimb ischemia model. A mild ischemia model and a severe ischemia model were prepared in rats by ligating the common femoral artery group (CFA) and both the CFA and the common iliac artery group (CIA), respectively. We examined blood flow, clinical ischemia index, growth factor expression and capillary density. Hindlimb necrosis occurred in 100% of CIA. The values of blood flow in the adductor muscle were significantly lower from day 1 to 28 in the CIA than in the CFA and sham. While those in the CFA became normalized after day 21. The values of vascular endothelial growth factor (VEGF) in CIA were significantly higher than those in CFA and sham at day 1 and 3. The values of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in CIA were significantly higher than those in sham at day 3 and 7. The VEGF increased in the severe ischemia coincidentally with a decrease in blood flow, while the FGF-2 increased in both severe and mild ischemia coincidentally with an increase in blood flow and became normalized as the blood flow became stable. (Accepted on November 17, 2003)

Key words : VEGF, FGF-2, severe hindlimb ischemia

はじめに

近年、糖尿病の増加や高齢化社会への移行とともに閉塞性動脈硬化症 (arteriosclerotic oblite-

rans : ASO)が増加している^{1,2)}。ASOは冠動脈硬化症、脳動脈硬化症とともに全身性動脈硬化症における三大疾患であり、心筋梗塞や下肢の運動機能障害などにより生命予後も不良となることが判

明している^{3,4)}。ASOに対する臨床的な治療として抗凝固療法や血行再建術が行われその有効性は確立されているが、進行した重症虚血肢では標準的治療法により救肢できない場合も少なくない^{3,4)}。こうした慢性動脈閉塞による重症虚血肢に対して、近年、骨髄幹細胞^{5,6)}や遺伝子治療⁷⁻¹⁰⁾により血管新生因子を誘導する血管新生療法が注目されている。しかし、有効性が確認されたとする血管新生療法の動物実験は大部分が急性虚血肢モデルを使用しており、また、壊死を伴わない軽症虚血であった^{5,11-13)}。急性虚血において、壊死のない軽症虚血と足趾壊死を伴う重症虚血における内因性の血管新生因子の発現の相違は充分解明されていない。また、慢性虚血では臨床的にも急性虚血とは異なる血管新生療法が必要と考えられるが、慢性虚血に関する病態解明はいまだ不十分と思われる。

本研究では、ラット急性虚血肢モデルとして、壊死のない軽症虚血と足趾壊死を伴う重症虚血を作成し、これら虚血重症度の異なるモデルを使用し、急性虚血の慢性化過程における血流変化と内因性の血管新生因子の発現を解析した。

対象および方法

実験モデル

本実験は鳥取大学医学部動物実験委員会の承認を得た。

実験動物として体重250-300 g, 8週齢のWistar系雄性ラット（日本SLC, 静岡）75匹を使用した。実験期間中は室温23°C, 12時間サイクルの明暗（照明時間6:00-18:00）環境下で飼育し、市販飼料（Clea CE-2, 日本クレア）と飲料水を自由に摂取させた。

全身麻酔として、50 mg/kg体重のペントバルビタールナトリウム（Nembutal, Abbott Laboratories, North Chicago, IL）を腹腔内に投与した。従来多用されている下肢虚血モデル^{5,11-13)}、すなわち右鼠径部に横切開を加え、右総大腿動脈とその分枝を露出、剥離し4-0絹糸で結紮抜去したものを軽症虚血（Common Femoral Artery : CFA）群とした。さらに腹部正中切開をおき、開腹下に右総腸骨動脈を露出、剥離し4-0絹糸で結紮切離を加えたものを重症虚血（Common Iliac Artery : CIA）群とし、CIA群と同様の処置で血管剥離のみ行った対照（sham）群の3群で比較検討した。

虚血肢の肉眼的変化

ラット虚血肢モデルを作成後に、各群それぞれ14日目、28日目に屠殺予定とした5匹ずつ計10匹を用いて、肢の病変の進展を14日間にわたり毎日観察した。肢の肉眼的所見を「正常」、「変色」、「足趾壊死」に分類し評価した。浮腫は参考所見とした。

虚血肢血流の計測

下肢の皮膚血流および大腿内転筋の血流量双方の評価を行った。モデル作成後、1, 3, 7, 14, 21および28日目に各群5匹ずつ測定した。皮膚血流の測定にはlaser Doppler perfusion imager (LDPI, Lisca Inc., Linköping, Sweden)¹⁴⁾を、大腿内転筋の血流量の測定にはlaser Doppler flowmetry (LDF, ALF21D, ADVANCE, Tokyo, Japan)^{15,16)}をそれぞれ使用した。

再び前述の方法で全身麻酔を行った後、ラットをホットプレート上で仰臥位にし、体温を37°Cに保温した状態で鼠径部以下の下肢皮膚血流を計測した。今回の実験では、LDPIによる血流は非虚血肢（左下肢）の平均値を1として相対的に評価した。これに引き続いて虚血肢鼠径部に切開を加え、大腿の中央部付近で血管を避けながら、内転筋の血流量を血流測定用プローベを直接筋肉に接触させ計測した。LDFによる内転筋の血流量は、10回の測定値の平均値をもって評価した。

虚血肢内転筋中のvascular endothelial growth factor (VEGF) およびfibroblast growth factor-2 (FGF-2)蛋白濃度の測定

モデル作成後 1, 3, 7, 14および28日後に各群それぞれ5匹ずつ使用した。下肢血流量計測後に屠殺し、虚血肢の内転筋を採取し重量を計測した。採取した筋肉に0.01Mリン酸緩衝食塩水（PBS）を2.5 ml加え、氷中でホモジナイザーを用い1分間ホモジネートした。これらを10,000×g, 5分間遠心分離後に上清を採取し測定まで-80°Cで保存した。上清中のVEGF およびFGF-2蛋白濃度はenzyme-linked immunoassay (ELISA) キット（R&D Systems, Minneapolis, MN）を用いて計測した。測定法は使用手順に従った。内転筋中のVEGFおよびFGF-2蛋白濃度は、計測値を採取時の重量で割った値（pg / g muscle）で評

図 1-a : CIA群

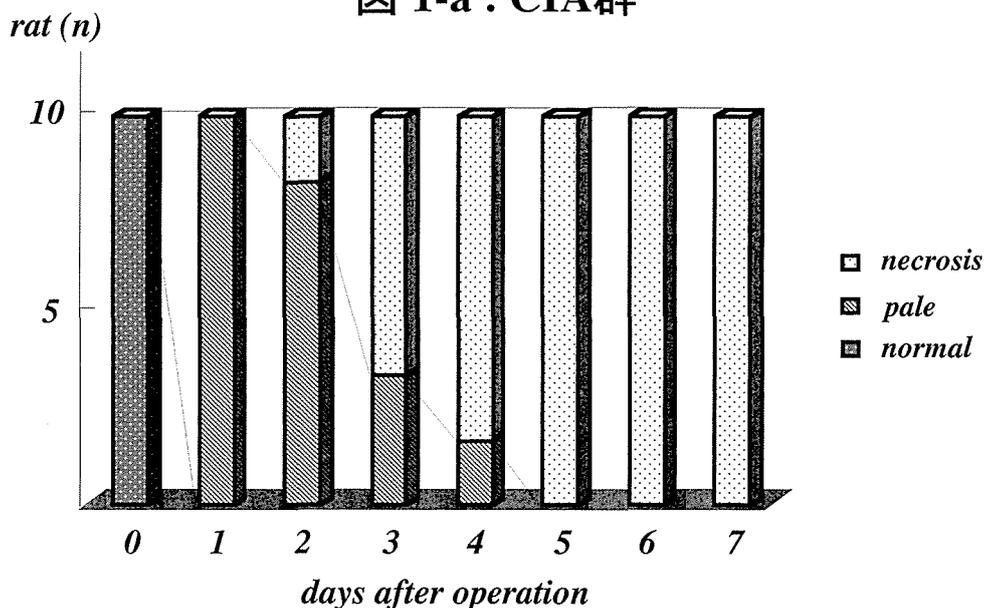


図 1-b : CFA群

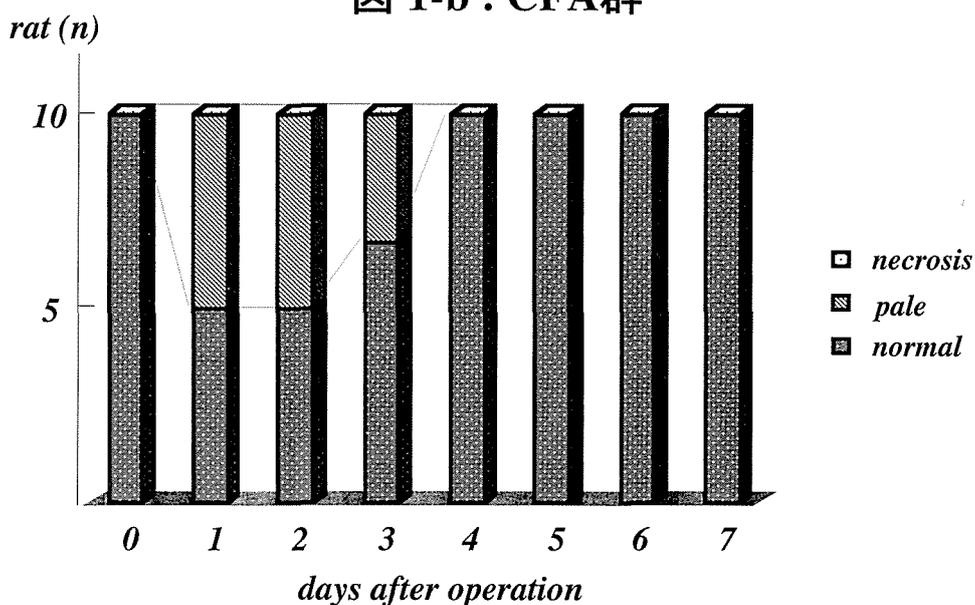


図1：虚血肢の肉眼的変化
 a：重症虚血 (CIA) 群
 b：軽症虚血 (CFA) 群

備した。

血管密度の測定

モデル作成後28日目に，下肢血流量計測後に各群5匹ずつ屠殺し虚血肢内転筋を採取した．採取後速やかにoptinum cutting temperature compound (OCT Compound : Miles, Elkhart, IN)

を用い，液体窒素内で封入した．切片中の微小血管を評価するためにマイクロームを用いて5 μmの厚さに薄切した切片をアルカリ性フォスファターゼ染色法にて染色した¹⁷⁾．薄切した切片を4 °Cのアセトンに5分間浸漬し，固定を行った後蒸留水で洗浄した．その後，ナフトールAS-BIリン酸・ナトリウム塩5 mg，蒸留水25 ml，0.05Mト

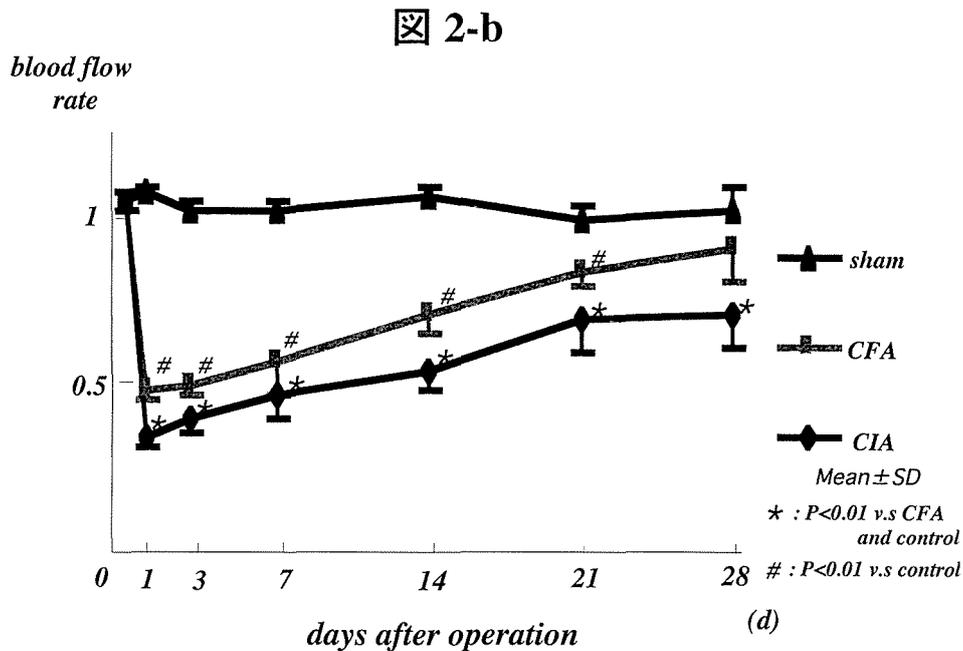
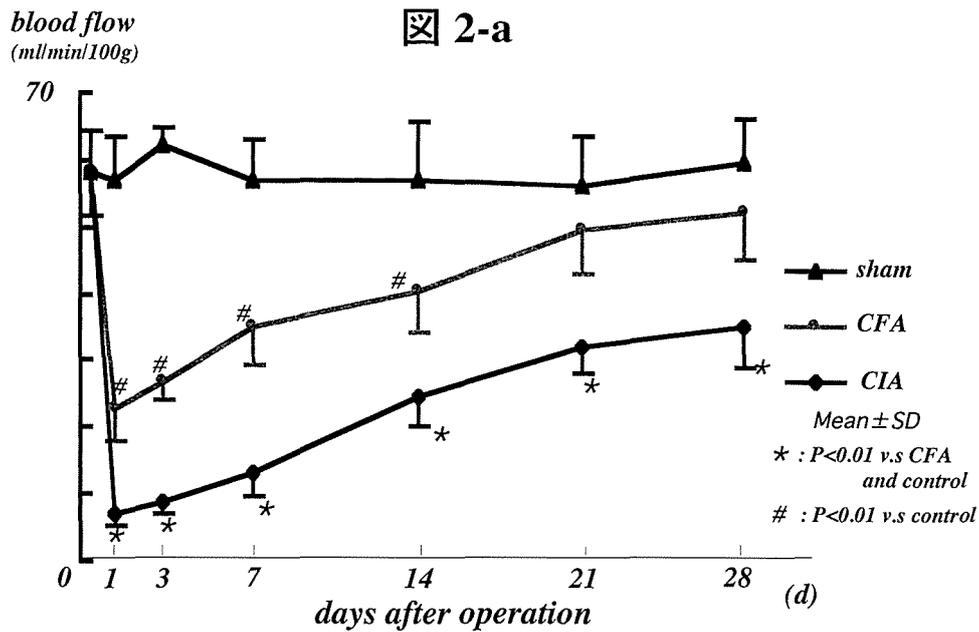


図2：下肢血流の継時的変化

a：大腿内転筋の血流量

b：虚血肢皮膚血流

リス塩酸緩衝液 (pH 8.5) 25 ml, およびジアゾニウム塩ファースト赤TR塩30 mgを混和した反応液中に10分間浸漬した後に蒸留水で洗浄した。Derafield hematoxylinにて対比染色し, 蒸留水で洗浄後に封入し光学顕微鏡で観察した。200倍の10視野で血管数を計測し, 1 mm²あたりの血管数をもって評価した。

統計処理

平均値は平均±標準偏差とした。統計処理は, StatViewのScheffe法を用いてANOVAで行った。有意水準は全て, $p < 0.05$ を有意とした。

結果

虚血肢の肉眼的変化

CIA群では1日目には100%に変色が発生し, 2

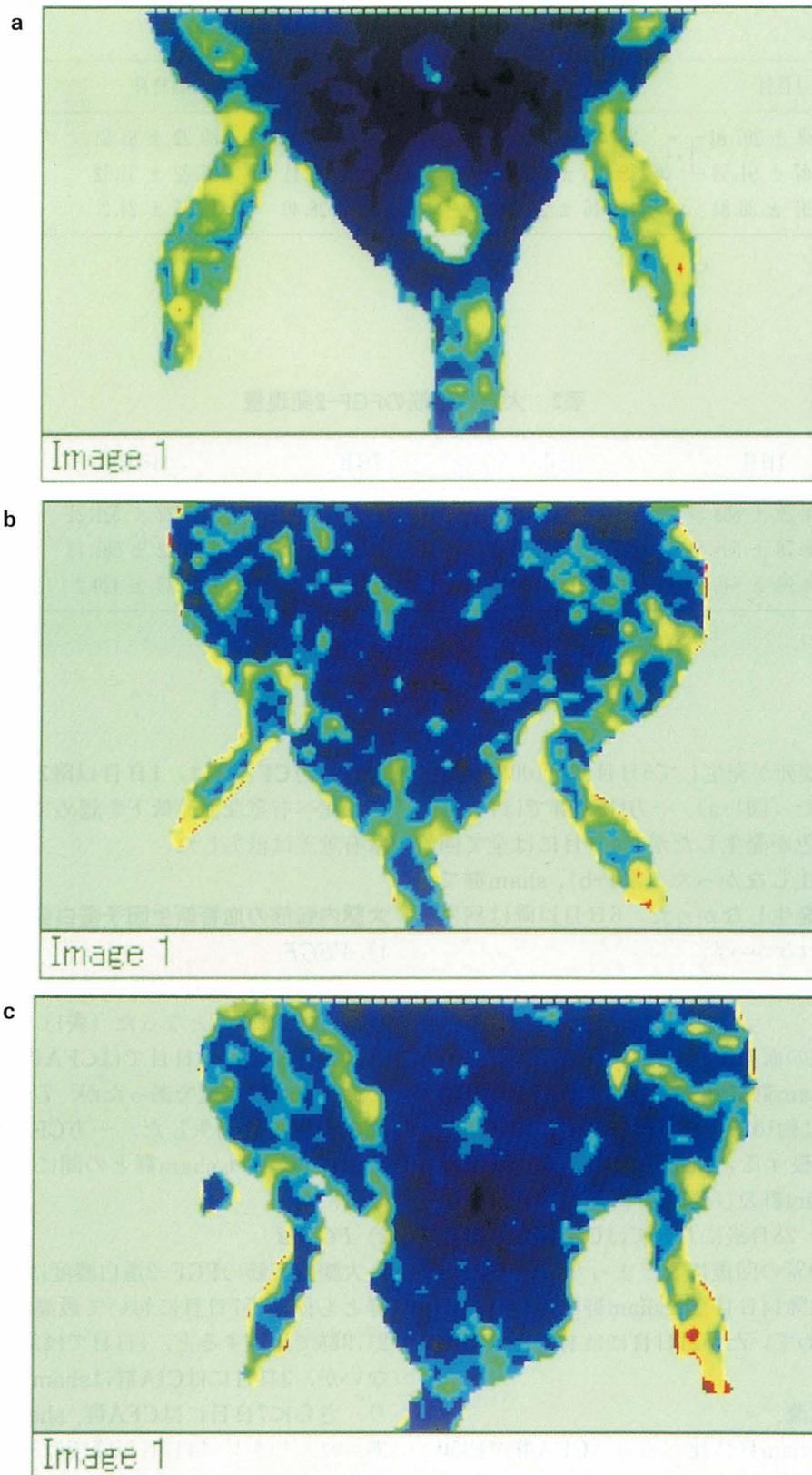


図3：術後28日目のLDI画像

a : sham群

b : 軽症虚血 (CFA) 群

c : 重症虚血 (CIA) 群

表1：大腿内転筋のVEGF発現量

	1日目	3日目	7日目	14日目	28日目
CIA群	894.88 ± 207.81	291.58 ± 116.25	273.52 ± 155.76	189.22 ± 81.21	113.32 ± 58.75
CFA群	206.07 ± 91.55	156.95 ± 45.79	152.94 ± 65.11	126.22 ± 31.12	109.23 ± 36.92
sham群	116.91 ± 36.84	128.16 ± 28.592	128.24 ± 28.49	116.35 ± 24.2	118.93 ± 35.71

pg / g tissue

*: P<0.01

: P<0.001

表2：大腿内転筋のFGF-2発現量

	1日目	3日目	7日目	14日目	28日目
CIA群	2291.29 ± 698.87	3567.32 ± 603.2	6277.63 ± 1046.42	2969.22 ± 521.21	2669.01 ± 796.01
CFA群	2318.78 ± 501.51	2305.12 ± 559.78	3197.58 ± 469.35	2216.22 ± 581.12	1947.46 ± 943.92
sham群	1804.96 ± 845.69	1414.61 ± 342.96	1244.42 ± 434.4	1621.35 ± 420.2	1855.99 ± 781.61

pg / g tissue

*: P<0.05

: P<0.005

日目より足趾壊死が発生して5日目には100%が足趾壊死となった(図1-a)。一方CFA群では1日目には50%に変色が発生したが、4日目には全て回復し壊死は発生しなかった(図1-b)。sham群では虚血所見は発生しなかった。6日目以降は病変の進展はみられなかった。

大腿部の血流

1) 大腿内転筋の血流量

血流量はsham群に比べると、CFA群で約40%、CIA群では約10%まで有意に低下した(図2-a)。3群間で比較するとCIA群は、1日目以降28日目まで常にsham群及びCFA群に比べ有意に血流低下を認めた。28日後においてはCIA群の血流量はsham群の60%の回復にとどまった。一方CFA群は、1日目以降14日目までsham群に比べ有意に血流低下を認めていたが21日目には有意差は消失した。

2) 下肢皮膚血流

皮膚血流はsham群に比べると、CFA群で約50%、CIA群では約35%まで有意に低下した(図2-b, 図3-a, b, c)。3群間で比較すると内転筋の血流量と同様にCIA群は、1日目以降28日目まで常にsham群及びCFA群に比べ有意な血流低下を認め

た。一方CFA群は、1日目以降21日目までsham群に比べ有意な血流低下を認めていたが28日目には有意差は消失した。

大腿内転筋の血管新生因子蛋白発現量

1) VEGF

大腿内転筋のVEGF蛋白濃度は、CIA群では術後1日目に最高値となった(表1)。3群で比較するとCIA群は、1, 3日目ではCFA群およびsham群に比べ有意に高値であったが、7日目以降では3群間の有意差は消失した。一方CFA群はいずれの時期においてもsham群との間に有意差は認めなかった。

2) FGF-2

大腿内転筋のFGF-2蛋白濃度は、CIA群、CFA群ともに術後7日目において最高値となった(表2)。3群で比較すると、1日目では3群間に有意差はないが、3日目にはCIA群はsham群より高値となり、さらに7日目にはCFA群、sham群より高値であった。しかし14日目以降では3群間で有意差は消失した。

大腿内転筋血管密度

術後28日目における虚血肢大腿内転筋の血管密

図 4

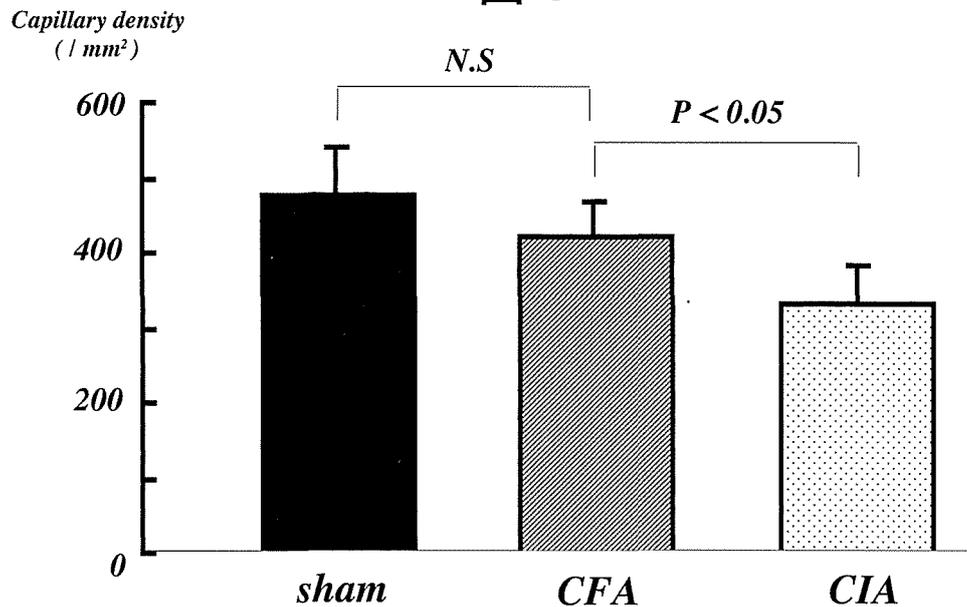


図4：術後28日目の虚血肢内転筋血管密度

度は、sham群およびCFA群はCIA群に対して有意に高値であった（図4，図5-a, b, c）。一方CFA群とsham群の間には有意差はみられなかった。

考 察

血管新生療法は急性動脈閉塞，慢性動脈閉塞の両方に応用できることから，現在使用されている動物実験モデルは大部分が急性動脈閉塞による虚血肢モデルであり，通常，壊死を伴わない軽症虚血である^{5, 11-13}。しかし臨床的に血管新生療法が応用されているのは慢性動脈閉塞の壊死を伴う重症虚血肢である⁶⁻⁹ことから，本研究では，臨床的な病態に近い慢性化重症虚血肢モデルを作成して，血行障害と血管新生因子との関係を検討した。

慢性動脈閉塞を動物実験で作成する場合には，Ameroid constrictorsを使用して狭窄を漸増していく方法^{18, 19}が知られているが，小動物での使用は不可能であり，また，壊死を伴う重症虚血肢を作成することもできない。従って，本研究でも急性動脈閉塞により重症虚血肢を作成する方法を選択した。動物は，マウスを使用した場合は，大腿動脈を結紮すると下肢が壊死脱落してしまい長期の観察ができないことから²⁰，本実験ではラットを使用した。結果として，頻用されている大腿動

脈の結紮のみの軽症虚血肢モデルでは壊死は発生しなかったが，大腿動脈と腸骨動脈を結紮することにより足趾壊死を伴う重症虚血肢モデルを作成することが可能であった。また，通常モデルと異なり今回作成した重症モデルでは，28日後においても有意な血流低下を伴う虚血状態を維持可能であった。これらのモデルは方法的に急性動脈閉塞ではあるが，急性虚血による血流変化が安定した状態では慢性閉塞と共通する病態が存在すると考えられる。従って，今回作成したモデルを使用して急性虚血の慢性化過程における血流変化と内因性の血管新生因子との関連を検討した。

慢性動脈閉塞の虚血重症度は，Fontaineによる臨床的分類が普及しており，無症状を1度，間歇性跛行を2度，安静時疼痛を3度，壊死あるいは虚血性潰瘍を4度としている。一方，急性動脈閉塞の重症度分類はBalasの分類²¹があるが，虚血の範囲により分類されるので応用し難い。ここでは急性虚血から慢性虚血への移行の評価であり，急性虚血所見により，正常（無所見），変色，足趾壊死と肉眼的に評価した。軽症虚血群では，正常，あるいは変色から正常への回復であり，壊死が発生せずに軽症虚血となった。一方重症虚血群では，変色から足趾壊死となり重症虚血となった。従って，軽症虚血はFontaine 2度，

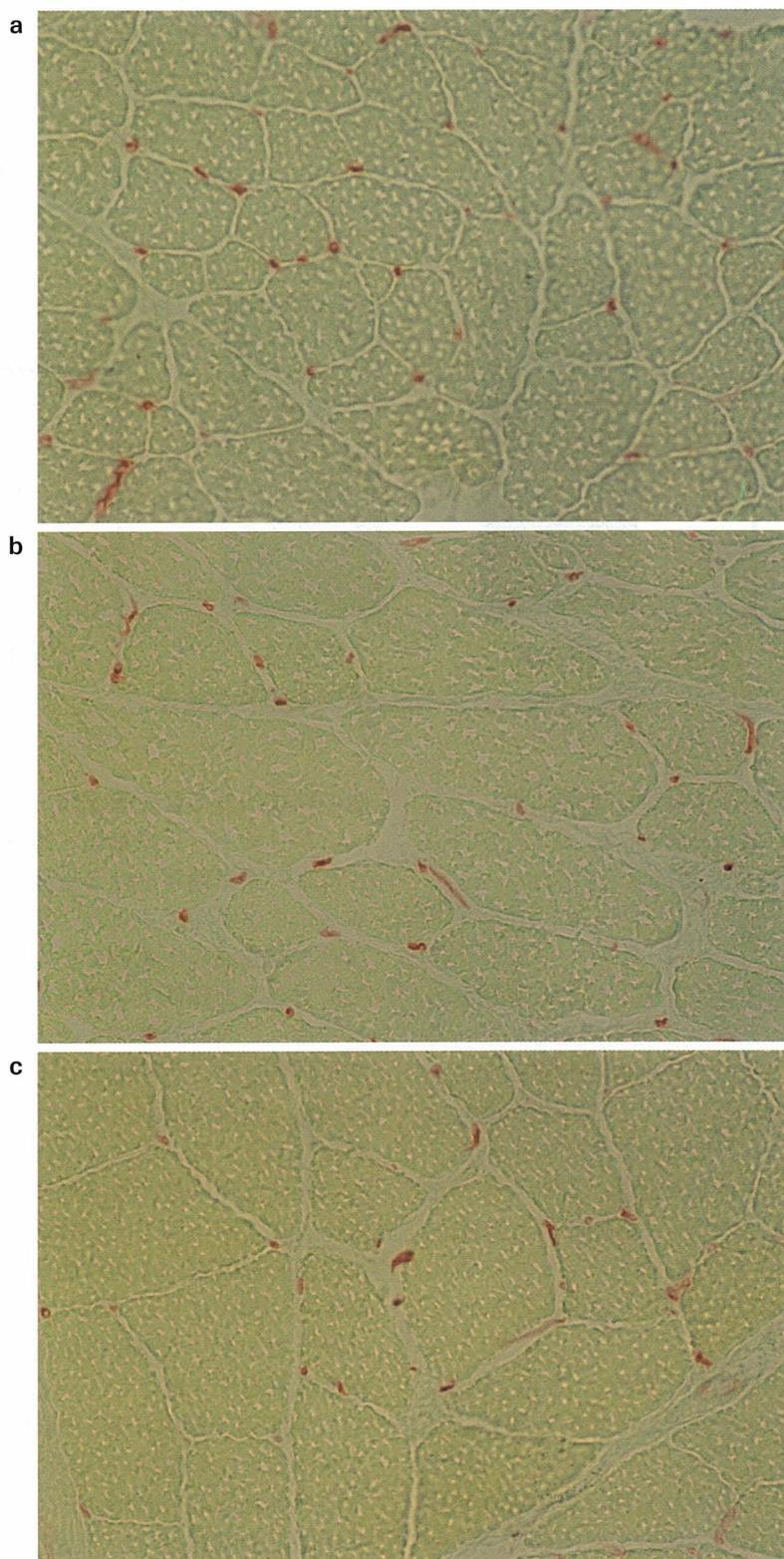


図5：術後28日目の虚血肢内転筋（アルカリ性フォスファターゼ染色）

- a：sham群
- b：軽症虚血（CFA）群
- c：重症虚血（CIA）群

重症虚血はFontaine 4度に相当すると考えられる。

中枢側結紮後、大腿内転筋の血流量、並びに虚血肢の皮膚血流は一旦低下し、以後漸増して21日目で安定し、軽症虚血肢モデルでは血流低下が消失したが重症虚血肢モデルでは血流低下が残存した。こうした結果から、急性虚血は21日目以降で安定化した血流状態になることが判明し、これ以降が慢性虚血と近似した病態と考えられた。

血管新生因子のうち、VEGFは低酸素状態により誘導されることが判明している^{22,23)}。今回、大腿内転筋の血流変化に関連して、VEGF蛋白発現は重症虚血では血流変化に呼応して著増したが軽症虚血では増加はなかった。VEGF蛋白発現量からも、作成した重症虚血肢モデルは十分な虚血が得られたことが確認できる。

一方FGF-2は、低酸素状態とは独立して局所の炎症反応に関連して誘導されるといわれている²⁴⁻²⁶⁾。下肢の虚血に伴い炎症反応がおこることは知られているが^{27, 28)}、本実験においても、重症虚血群の方が虚血による局所の炎症が強いため、軽症虚血群に比べ発現が早く、また蛋白発現量が多かったと思われる。また、大腿内転筋の血流変化からみると、FGF-2蛋白発現量は重症虚血では血流増加と一致して7日目に最大となり、また、軽症虚血でも7日目に最大となった。FGF-2は脈管形成が行われている局所において発現量が増大していると報告されていることから^{20,27)}、本実験の結果でも、FGF-2蛋白発現量の増加が組織の血流増加過程に一致していることより、血管新生を含む側副路機能の促進に関与する可能性が考えられた。

急性虚血が安定化すれば慢性虚血に近似した病態になると仮説した。軽症虚血、重症虚血の血流変化並びに血管新生因子の発現から、急性虚血は21日以降では安定化した状態であった。特に重症虚血肢モデルでは、血流低下が存在するにもかかわらずVEGFやFGF-2の増加がないことが特徴的であった。すなわち、慢性化した重症虚血とは、血流低下が存在するにもかかわらず内因性の血管新生因子が活性化されない病態と考えられる。また、この時期の血管密度は重症虚血では軽症虚血に比べ低下していた。今回の測定法では既存血管と新生血管を区別できないことから、血流低下のある重症虚血での血管密度の低下は予測された結

果であった。

以上のような検討から、従来多用されている軽症虚血肢モデルでは、既存の側副路で血流低下が正常化されることから血管新生療法の効果判定は困難と考えられる。一方重症虚血肢モデルでは、急性虚血の安定化過程である21日以内では内因性の血管新生因子の影響が存在すると考えられ、やはり血管新生療法の効果に影響すると考えられる。しかし、21日以上経過した重症虚血肢モデルは慢性虚血に近似した病態であり、外因性に投与する血管新生療法の効果判定に有用と考えられる。

結 語

1. ラットの虚血肢モデルとして、大腿動脈の結紮では軽症虚血となり、腸骨動脈と大腿動脈の結紮では足趾壊死を伴う重症虚血となった。
2. 大腿内転筋の血流量は、軽症虚血では21日目に正常化した。重症虚血は正常化しなかった。
3. 大腿内転筋のVEGF蛋白発現量は、軽症虚血では増加しなかったが、重症虚血では血流低下と一致して1日目に最高となり7日目より正常化した。一方、FGF-2蛋白発現量は、血流増加に一致して軽症虚血、重症虚血ともに7日目に最高となり、14日目には正常化した。
4. 慢性化した重症虚血とは、血流低下が存在するにもかかわらず内因性の血管新生因子が活性化されない病態と考えられた。

稿を終えるにあたり、懇切なる御指導と御校閲を賜りました鳥取大学医学部器官制御外科学講座器官再生外科学分野應儀成二教授、また御助言、御校閲賜りました鳥取大学医学部基盤病態医学講座器官病理学分野井藤久雄教授、同大学院医学系研究科機能再生医科学専攻遺伝子再生医療学講座久留一郎教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究遂行にあたり御協力頂きました器官再生外科学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

なお本論文の要旨は第31回日本血管外科学会総会(2003年7月)ならびに第44回日本脈管学会総会(2003年11月)において発表した。

文 献

- 1) Johnson, G. (1987) The second generation vascular surgeon. *J Vasc Surg* 5(2), 211-

- 221.
- 2) European Working Group on Critical Leg Ischemia. (1991) Second European consensus document on chronic critical leg ischemia. *Circulation* 84(suppl IV):IV-1-IV-26.
 - 3) Criqui, M. H., Langer, R. D., Fronek, A., Feigelson, H. S., Klauber, M. R., McCann, T. J. and Browner, D. (1992) Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N Engl J Med* 326, 381-386.
 - 4) Dormandy, J., Mahir, M., Ascady, G., Balsano, F., De Leeuw, P., Blombery, P., Bousser, M. G., Clement, D., Coffman, J. and Deutshinoff, A. (1989) Fate of the patient with chronic leg ischaemia. A review article. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 30(1), 50-57.
 - 5) Hamano, K., Li, T. S., Kobayashi, T., Tanaka, N., Kobayashi, S., Matsuzaki, M. and Esato, K. (2001) The induction of angiogenesis by the implantation of autologous bone marrow cells : A novel and simple therapeutic method. *Surgery* 130, 44-54.
 - 6) Tateishi-Yuyama, E., Matsubara, H., Murohara, T., Ikeda, U., Shintani, S., Masaki, H., Amano, K., Kishimoto, Y., Yoshimoto, K., Akashi, H., Shimada, K., Iwasaka, T. and Imaizumi, T. (2002) Therapeutic angiogenesis using cell transplantation (TACT) study investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone marrow cells ; a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360, 427-435.
 - 7) Baumgartner, I., Pieczek, A., Manor, O., Blair, R., Kearney, M., Walsh, K. and Isner, J. M. (1998) Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 97, 1114-1123.
 - 8) Rivard, A., Silver, M., Chen, D., Kearney, M., Magner, M., Annex, B., Peters, K. and Isner, J. M. (1999) Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *Am J Pathol* 154, 355-363.
 - 9) Sellke, F. W., Laham, R. J., Edelman, E. R., Pearlman, J. D. and Simons, M. (1998) Therapeutic angiogenesis with basic fibroblast growth factor : technique and early results. *Ann Thorac Surg* 65, 1540-1544.
 - 10) Morishita, R., Nakamura, S., Hayashi, S., Taniyama, Y., Moriguchi, A., Nagano, T., Taiji, M., Noguchi, H., Takeshita, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Higaki, J. and Ogihara, T. (1999) Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension* 33, 1379-1384.
 - 11) Takeshita, S., Isshiki, T., Mori, H., Tanaka, E., Eto, K., Miyazawa, Y., Tanaka, A., Shinozaki, Y., Hyodo, K., Ando, M., Kubota, M., Tanioka, K., Umetani, K., Ochiai, M., Sato, T. and Miyashita, H. (1997) Use of synchrotron radiation microangiography to assess development of small collateral arteries in a rat model of hind limb ischemia. *Circulation* 95, 805-808.
 - 12) Chang, D. S., Su, H., Tang, G. L., Brevetti, L. S., Sarkar, R., Wang, R., Kan, Y. W. and Messina, L. M. (2003) Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer of VEGF normalizes skeletal muscle oxygen tension and induces arteriogenesis in ischemic rat hindlimb. *Mol Ther* 7(1), 44-51.
 - 13) Shimpo, M., Ikeda, U., Maeda, Y., Takahashi, M., Miyashita, H., Mizukami, H., Urabe, M., Kume, A., Takizawa, T., Shibuya, M., Ozawa, K. and Shimada, K. (2002) AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model. *Cardiovasc Res* 53(4), 993-1001.
 - 14) Taniyama, Y., Morishita, R., Aoki, M., Nakagami, H., Yamamoto, K., Yamazaki,

- K., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda, Y. and Ogihara, T. (2001) Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hind limb ischemia models : preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Ther* 8, 181-189.
- 15) Uranishi, R., Nakase, H., Sakaki, T. and Kempinski, O. S. (1999) Evaluation of absolute cerebral blood flow by laser-Doppler scanning—comparison with hydrogen clearance. *J Vasc Res* 36, 100-105.
 - 16) Tsugawa, K., Hashizume, M., Tomikawa, M., Migou, S., Kawanaka, H., Shiraishi, S., Sueishi, K. and Sugimachi, K. (2001) Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the rat portal hypertensive gastropathy. *J Gastroenterol Hepatol* 16, 429-437.
 - 17) Bauters, C., Asahara, T., Zheng, L. P., Takeshita, S., Bunting, S., Ferrara, N., Symes, J. F. and Isner, J. M. (1995) Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J Vasc Surg* 21(2), 314-324.
 - 18) Bin, J. P., Pelberg, R. A., Wei, K., Coggin, M., Goodman, N. C. and Kaul, S. (2000) Relation between regional function and coronary blood flow reserve in multivessel coronary artery stenosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279(6), H3058-3064.
 - 19) Lazarous, F. D., Scheinowitz, M., Shou, M., Hodge, E., Rajanayagam, S., Hunsberger, S., Robison, W. G. Jr, Stiber, J. A., Correa, R., Epstein, S. E. and Unger, E. F. (1995) Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. *Circulation* 91(1), 145-153.
 - 20) Masaki, I., Yonemitsu, Y., Yamashita, A., Sata, S., Tanii, M., Komori, K., Nakagawa, K., Hou, X., Nagai, Y., Hasegawa, M., Sugimachi, K. and Sueishi, K. (2002) Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia : acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ Res* 90(9), 966-973.
 - 21) Balas, P., Bonatsos, G., Xeromeritis, N., Karamanakos, P. and Kambilafkas, J. (1985) Early surgical results on acute arterial occlusion of the extremities. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 26(3), 262-269.
 - 22) Banai, S., Shweiki, D., Pinson, A., Chandra, M., Lazarovici, G. and Keshet, E. (1994) Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res* 28, 1176-1179.
 - 23) Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. and Keshet, E. (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359, 843-845.
 - 24) Arras, M., Ito, W., Scholz, D., Winkler, B., Schaper, J. and Schaper, W. (1997) Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hind limb. *J. Clin. Invest* 101, 40-50.
 - 25) D'Amore, P. A. and Smith, S. R. (1993) Growth Factor effects on cells of the vascular wall : a survey. *Growth Factors* 8, 61-75.
 - 26) Lefaucheur, J. P., Gjata, B., Lafont, H. and Sebillé, A. (1996) Angiogenic and inflammatory responses following skeletal muscle injury are altered by immune neutralization of endogenous basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1. *J Neuroimmunol* 70(1), 37-44.
 - 27) Luo, F., Wariaro, D., Lundberg, G., Blegen, H. and Wahlberg, E. (2002) Vascular growth factor expression in a rat model of severe limb ischemia. *J Surg Res* 108, 258-267.
 - 28) Tisi, P. V. and Shearman, C. P. (1998) The evidence for exercise-induced inflammation in intermittent claudication: should we encourage patients to stop walking? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 15(1), 7-17.