

虚血肢に対する自己骨髄単核球細胞移植による血管新生療法 - 臨床結果と評価法について -

岡崎 悌之¹ 明石 英俊¹ 大塚 裕之¹ 廣松 伸一¹
田山慶一郎¹ 青柳 成明¹ 室原 豊明²

要 旨：虚血肢に対して自己骨髄単核球細胞移植による血管新生療法の臨床応用を行った。ASO 4肢, Buerger病 9肢, 症状は潰瘍 9肢, 上肢の安静時疼痛 1肢, 間歇性跛行 3肢に行い, 症状の改善は 4週後83.3%であった。安静時疼痛と間歇性跛行の 4肢は 4週後に全例で改善をみたが, 潰瘍例では 4週後で75%の治癒および縮小, 6カ月後で62.5%の治癒であった。血流評価では 4週後にABI 50%, LDBF 54.5%の改善がみられた。改善例 9肢では 4週後, 6カ月後のABI, 4週後のLDBFで有意な血流の改善を認めた。(J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 37-43)

Key words: therapeutic angiogenesis, bone-marrow cells, ischemic limb

はじめに

1998年にBaumgartnerらにより, 虚血性潰瘍を伴う閉塞性動脈硬化症にVEGF165プラスミド遺伝子を筋肉内投与し, 57%に潰瘍が改善, ankle-brachial pressure index (ABI)で約45%に改善, magnetic resonance angiography (MRA)で約80%が末梢血流の改善をみたと報告された¹⁾。これ以降, 種々の遺伝子や組み換え蛋白による血管新生療法が臨床応用されるようになった。また, 1997年にAsaharaらにより成人末梢血中に内皮前駆細胞が存在することが証明され, その内皮前駆細胞は骨髄に由来し, 必要に応じて血管新生部位に動員されることが報告された²⁾。2001年に当大学のMurohara, Shintaniらのグループにより, ウサギの片側下肢虚血モデルにおいて自己骨髄細胞移植により血管新生が認められたことが報告されている³⁾。これらの実験的根拠に基づき, 当大学において自己骨髄単核球細胞の虚血骨格筋内移植が有望な血管新生療法として臨床レベルで応用可能かどうかを検証するため, 臨床研究実施試験を当大学倫理委員会に申請した。この臨床研究の結果を報告する。

¹久留米大学医学部外科

²名古屋大学大学院医学系研究科病態内科学講座器官制御内科

対 象

対象は末梢動脈閉塞性疾患(閉塞性動脈硬化症, Buerger病)とし, Fontaine分類ではIIb~IV度の中等度以上の虚血を認めるもので, 虚血症状に対する治療経験を有し難治性であるものとした。血管造影では重症末梢病変を有し, バイパス術困難と判断した患者とした。糖尿病合併した潰瘍例は, 糖尿病の加療がなされていること, 血管造影にて虚血症状に相当する狭窄性病変が存在すると判断した場合に適応とした。年齢は45歳以上75歳以下で申請していたが, Buerger病の発症年齢を考慮し, 倫理委員会に20歳以上の適応を再申請し認められた。適応除外項目として悪性新生物を有する患者および5年以内にその既往のある患者, 別途規定の諸検査により悪性腫瘍の可能性があると判断された患者, 重症の糖尿病性網膜症を有する患者, 虚血性心臓病を有し治療されていない患者, その他インフォームド・コンセントを得られない患者とした。原則的に血液透析患者は適応除外としなかった。

方 法

方法は, 腸骨より骨髄液を約600~900ml採取し, 比

2004年 2月16日受付 2005年 1月21日受理

重遠心分離法 (CS 3000, Baxter社製)にて骨髄単核球細胞を分離する。骨格筋への投与は3cm²間隔にて、1カ所につき1ml以下の投与を行い、約50~60カ所に行う。骨や神経の走行を考慮しマーキングを行い、筋肉量の少ない部分には減量し投与した。麻酔方法は、上肢の場合は全身麻酔で、下肢の場合は腰椎麻酔にて行う。術前より400mlの自己血貯血を行い、骨髄液採取時に返血を行った。1例の血液透析患者では自己血貯血は不可で、骨髄採取時に濃厚赤血球2単位の輸血を行った。分離後に得られた赤血球成分は直ちに返血した。

血管新生療法前に約3週間の検査入院としたが、この間にはprostaglandin製剤の静脈内投与は行わず、創処置に対しても抗生物質配合の外用剤とした。以前より内服されている抗血小板剤、抗凝固剤については移植1週前まで内服を継続した。移植後翌日より術前同様の薬剤を再開した。

治療効果判定法

1) 虚血による臨床症状の改善度

潰瘍については潰瘍径、性状(乾性/湿性)、腱および骨の露出の有無などで評価した。感染合併例では発熱、白血球数の上昇がなく、菌血症が否定されれば適応とした。安静時疼痛と間歇性跛行については、後述するvisual analog scale (VAS)と歩行可能距離にて評価した。

2) 歩行可能距離 (pain-free walking distance)

平坦な廊下を歩行してもらい、疼痛出現までの歩行距離を測定した。50m以上の歩行距離延長を認めたものを改善とした。

3) VAS

最大の疼痛を10cmとし、疼痛をスコア化し評価した。改善は2cm以上の軽減がみられたものとした。

4) ABI

ABI Form(日本コーリン社製)にて安静時のABIを測定した。ABIは0.1以上増加したものを改善とした。

5) Laser-Doppler blood flow (LDBF)

レーザー・ドプラ式血流画像化装置(モンテシステム社製moorLDI)により組織血流量の測定をした。足関節以下のある一定の範囲を設定、両側を対称性に測定、

左右の血流量を比較し、血流比(LDBF ratio)として評価した。LDBF ratioで0.1以上の増加がみられたものを改善とした。すでに非移植肢が切断されている場合は、対側下肢の下腿または同側の大腿部との比較を行った。

6) 血管造影 (digital subtraction angiography : DSA)

足(手)関節以下および趾(指)動脈レベルまで評価を行った。上肢の場合はチアミナルナトリウムの静脈麻酔下に、下肢の場合には腰椎麻酔下に行った。これはスパズムの影響を除外し、可及的に末梢血管まで評価するために麻酔下に行った。また穿刺部位、カテーテルの先端位置、造影剤の注入圧および量、循環動態(血圧、脈拍数)においては同様の条件で行った。血管造影での改善は上下肢の主要動脈本幹の充満像から静脈層になる直前までを評価し、側副血行路、血管影の増加がみられたものとした。複数の医師(循環器内科医、血管外科医)にて評価した。

これらの治療評価の判定は、4週後、6カ月後に行うこととした。解析の方法は、VAS、ABIおよびLDBFの3項目について、術前と4週後および6カ月後の測定値を対応のあるt検定(paired t-test)にて比較し、有意水準5%で有意差ありと判断した。

結 果

2000年11月より、12例の患者(男性10例、女性2例)、13肢(上肢3肢、下肢10肢)に対して自己骨髄細胞移植を行った。疾患は閉塞性動脈硬化症(ASO)4肢、Buerger病9肢で、虚血症状として潰瘍9肢、安静時疼痛1肢、間歇性跛行3肢であった。上肢の3肢はすべてBuerger病であった。平均年齢はASO 67.2歳(60~73)、Buerger病 47.1歳(29~67)であった(Table 1)。糖尿病合併例でインスリン加療中の患者は6例で半数を占めた。糖尿病性腎不全による透析患者は1例であった。今回の治療の対象とした臨床症状における病期期間は平均7.3カ月間(3~14カ月間)であった。症例ごとの結果をTable 2, 3に示した。

1) 臨床症状の改善の有無

潰瘍例(9肢): 4週後に6肢に改善傾向を認め、6カ月後に5肢は治癒、1肢は最終的に趾切断となった。4週後に不変であったものは2肢(Case 3, 7)、細

Table 1 Clinical symptoms of the patients

	ASO	Buerger's disease
Case (Limbs)	4 (4)	8 (9)
Sex (Male/Female)	2/2	8/0
Age	67.2 (60–73)	47.1 (29–67)
Symptoms (Limbs: lower/upper 10/3)		
Ischemic ulcer (9)	3/0	4/2
Rest pain (1)	0/0	0/1
Intermittent claudication (3)	1/0	2/0

ASO: arteriosclerosis obliterans

Table 2 Results of the lower limb patients

			VAS (before/4w/6m)	ABI (before/4w/6m)	LDBFR (before/4w/6m)	DSA# (4w/6m)
Lower limb/ulcer						
ASO						
Case 1	73/F	<i>healing</i>	10/7/6	0.26/0.55/0.54	0.70/0.83/0.48	+/+
Case 2	65/M	<i>healing</i>	5/0/0	0.58/0.81/0.77		-/-
Case 3	60/M	no change	10/8/	0.0/0.0/	0.51/0.47/	
Buerger's disease						
Case 4	52/M*	leg amputation**	10/3/0	0.44/0.42/0.65	1.07/1.02/1.19	+/+
Case 5	48/M	<i>healing</i>	3/1/0	0.74/1.31/0.79	0.3/0.44/	+/+
Case 6	44/M*	toe amputation	6/3/3	0.65/0.53/0.58	2.44/1.94/	-/+
Case 7	67/M*	no change	10/8/	0.71/0.47/		
Lower limb/intermittent claudication						
Pain-free walking distance (before/4w/6m)						
ASO						
Case 8	71/F	200/400/900	8/6/6	0.65/0.67/0.8	0.89/0.97/1.25	-/-
Buerger's disease						
Case 9	29/M	150/209/800	6.5/4.2/3.5	0.21/0.50/0.49	0.70/0.83/0.80	+/+
Case 10	62/M	156/349/300	3.5/2/2	0.65/0.83/1.05	1.19/1.68/	+/

*ulcer exposed of the tendon and the bone, **amputation just before implantation, #newly visible collateral blood vessels (+).
 VAS: visual analog scale, ABI: ankle-brachial pressure index, LDBFR: laser-Doppler blood flow ratio,
 DSA: digital subtraction angiography

胞移植と同時にやむなく下腿切断としたものが 1 肢 (Case 4)であった。移植時に下腿切断をした 1 肢は Buerger病でリスフラン関節切断の断端部潰瘍で骨・腱が露出し、MRSA感染を合併していた。血管新生療法前の検査期間中に潰瘍は増悪したため、同時に下腿部での切断を行った。この患者の臨床症状の経過観察は行えなかった。

6 カ月後に完全治癒した 5 肢 (Case 1, 2, 5, 12, 13) は、Buerger 病 3 肢 (上肢 2 肢, 下肢 1 肢)と糖尿病合併した ASO の下肢の 2 肢であった。Buerger 病の上肢の 1 肢を除き、4 肢は指・趾尖部に限局した小潰瘍で、骨・腱の露出、壊死、感染は伴っていなかった。

不変の 2 肢は下肢の潰瘍で、ASO 1 肢、Buerger 病 1 肢であった。ASO 1 肢 (Case 3)は糖尿病性腎症により

Table 3 Results of the upper limb patients

		Symptoms	VAS (before/4w/6m)	LDBFR (before/4w/6m)	DSA# (4w/6m)
Upper limb					
Buerger's disease					
Case 11	42/M	rest pain/improve	7/0/0	0.70/0.94/0.80	+/+
Case 12	48/M	ulcer/healing	6/1/0	0.81/0.84/0.89	+/+
Case 13	33/M	ulcer*/healing	5/2/0	0.52/0.72/0.74	-/-

*ulcer exposed of the tendon and the bone, #newly visible collateral blood vessels (+), VAS: visual analog scale, LDBFR: laser-Doppler blood flow ratio, DSA: digital subtraction angiography

Table 4 Results of the response cases

	After 4w	6m
Pain-free walking distance (50 m)	5/5	5/5
VAS (2 cm)	12/13	10/11
ABI (>0.1)	5/10	6/8
LDBF ratio (>0.1)	6/11	5/7

VAS: visual analog scale, ABI: ankle-brachial pressure index, LDBF: laser-Doppler blood flow

血液透析中で、すでに他院にて2回の大腿動脈 - 膝窩動脈バイパス(膝上部および膝下部にて)が行われていた。膝下部でのバイパス閉塞により潰瘍が再燃したものであった。この患者は同側に自家静脈が存在しないこと、対側下肢にも高度な虚血が存在したことを考慮し、今回は細胞移植を選択した。結果的に移植3カ月後に潰瘍治癒の見込みはなく下腿切断となる可能性が高いと判断し、対側下肢の大伏在静脈を用い外腸骨動脈 - 後脛骨動脈バイパス術を行った。この患者のバイパスは開存し、潰瘍は4カ月後に治癒した。Buerger病の1肢(Case 7)は大腿動脈 - 後脛骨動脈バイパスを行ったが早期閉塞し、血管新生療法を行った。血管新生療法前より第3~5趾は壊死し、中足骨の腱も部分的に露出していた。潰瘍・壊死の範囲が広範であるため、細胞移植18日後に全趾の中足骨レベルの切断を行ったが、6カ月後には治癒した。

安静時疼痛(1肢): Buerger病の上肢の1肢(Case 11)であるが、以前に胸部交感神経節切除が行われていたが改善がなく、チアノーゼと指尖部の萎縮を認めており、血管新生療法の適応とした。移植7日後には明らかに疼痛およびチアノーゼの改善を認め、4週後、6カ月後ともに改善は維持された。

間歇性跛行(3肢): 全例で4週後に改善がみられ、6カ月後まで改善傾向を認めた。

細胞移植と同時に下腿部切断を行った1肢を除く12肢では、対象とした臨床症状の改善は4週後で10肢(83.3%)、6カ月後で9肢(75%)であった。潰瘍8肢では4週後で75%の治癒および縮小、6カ月後で62.5%の治癒であった。また4週後に潰瘍の不変であった2例と6カ月後の評価を拒否された間歇性跛行1肢(Case 10)の3例では6カ月後の血流評価を行えなかった。

2)歩行可能距離(pain-free walking distance)

疼痛出現までの歩行距離を測定したが、歩行可能であった5肢の全例で、4週後、6カ月後ともに改善を認めた(Table 4)。潰瘍症例では全例に疼痛を伴っており、9肢中4肢で歩行不能の状態であった。

3)VAS

13肢の全肢を対象としたが、2cm以上の疼痛の改善は4週後で12肢にみられた(Table 4)。しかし、潰瘍が不変の2肢ではその後に疼痛は再燃している。統計学的には、術前と比較して4週後($p < 0.0001$)、6カ月後($p < 0.0001$)ともに有意差をもって改善していた。

4) ABI

ABIは4週後で10肢中5肢, 6カ月後で8肢中6肢に改善傾向を認めた (Table 4)。統計学的には, 術前と比較して4週後 ($p=0.052$) では有意な改善はみられなかったが, 6カ月後 ($p=0.011$) では有意差をもって血流の改善を認めた。また症状改善例のみで解析すると, 4週後 ($p=0.026$) および6カ月後 ($p=0.009$) とともに改善していた (Fig. 1)。

5) LDBF

LDBF ratioは4週後で11肢中6肢, 6カ月後で7肢中5肢の改善傾向を認めた (Table 4)。統計学的には術前と比較して4週後 ($p=0.211$) , 6カ月後 ($p=0.157$) とともに有意な改善は認められなかった。症状改善例のみで解析すると, 4週後 ($p=0.001$) のみで改善を認めた (Fig. 1)。LDBF ratioは対側肢がすでに切断されていたり (Case 2, 4, 5, 7), 高度虚血肢 (Case 3, 6) の場合では測定値に信頼を欠き, 一部のデータを除いた (Case 2, 3, 5, 6)。

6) DSA

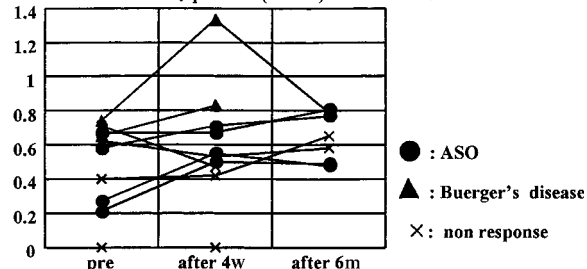
4週後に潰瘍が不変であった2肢については血管新生療法後のDSAを行っていないが, 11肢中7肢 (63.6%) で血管影の増加がみられた。症状改善例9肢中6肢で4週後に血管影の増加がみられ, 6カ月後まで増加が維持されていた。

7) 移植単核球細胞

骨髓より採取した平均細胞数は, 単核球細胞: $2.63 \pm 1.27 \times 10^9$, CD34陽性細胞: $5.19 \pm 4.42 \times 10^7$ であった。単核球細胞は改善例で $3.12 \pm 1.15 \times 10^9$, 非改善例で $1.54 \pm 0.74 \times 10^9$ と有意差 ($p=0.03$) をもって改善例で多く認めた。CD34陽性細胞は改善例で $6.65 \pm 4.64 \times 10^7$, 非改善例で $1.92 \pm 0.51 \times 10^7$ と改善例に多い傾向にあったが有意差 ($p=0.07$) は認められなかった。疾患別の単核球細胞数およびCD34陽性細胞数は, ASOで $1.89 \pm 0.44 \times 10^9$, $2.48 \pm 1.13 \times 10^7$, Buerger病で $2.96 \pm 1.39 \times 10^9$, $6.39 \pm 4.85 \times 10^7$ であった。採取された単核球細胞数およびCD34陽性細胞数とともにBuerger病に多い傾向にあった。

分離後の骨髓液の単核球細胞は80%前後を占め, 顆粒球は除かれていた。1例の有核細胞の分画を示すと, 骨髓芽球0.8%, 前骨髓球2.3%, 骨髓球7.6%, 後

ankle-brachial pressure index (ABI)

before vs. 4w : $p=0.052$ (0.026*)before vs. 6m : $p=0.011$ (0.009*)

laser-Doppler blood flow (LDBF) ratio

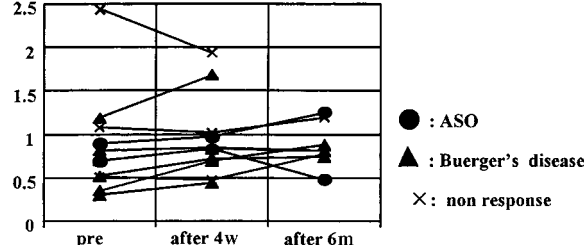
before vs. 4w : $p=0.211$ (0.001*)before vs. 6m : $p=0.157$ (0.157*)

Figure 1 Results of ABI and LDBF ratio.

In response cases (9 limbs), the ABI improved significantly at 4 weeks ($p=0.026$) and 6 months ($p=0.009$), the LDBF ratio improved significantly at 4 weeks ($p=0.001$).

骨髓球3.8%, 杆状核球6.9%, 分葉核球9.9%, リンパ球27.5%, 単球12.2%, 好酸球0.8%, 赤芽球28.2%で, 単核球(骨髓芽球, 前骨髓球, 骨髓球, リンパ球, 単球, 赤芽球)は78.6%であった。血小板はこの比重遠心分離装置の特性では約60%含まれている。

考 察

自己骨髓細胞移植による重症虚血肢患者の血管新生療法の臨床応用が, 国内3施設 (久留米大学, 関西医科大学, 自治医科大学)において行われた。これは, therapeutic angiogenesis using cell transplantation (TACT) trialとして, 45人の患者に治療が行われ報告されている⁴⁾。その結果では, ABIが平均で約1ポイント増加, 下肢疼痛完全寛解が約90%, トレッドミルテストの歩行距離は約2.6倍へと増加している。虚血性潰瘍も1~2カ月で約80%に改善がみられている。われわれの結果でも, 臨床症状の改善が4週後83.3%, 6カ月後75%にみられた。虚血性潰瘍の改善は62.5%であったが, 潰瘍治癒した5例中4例は骨・腱の露出および壊死は

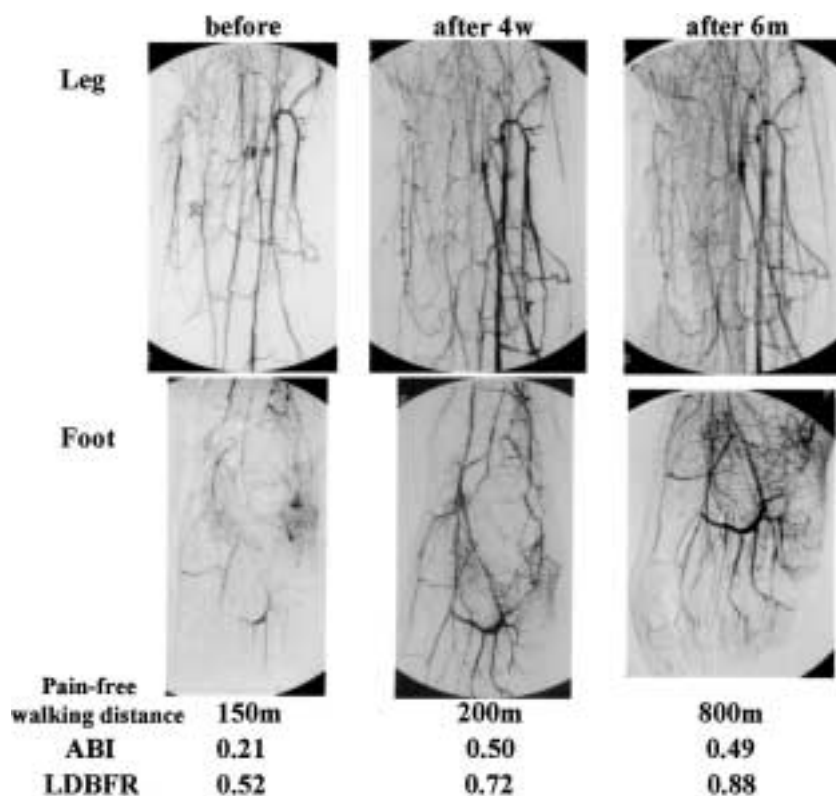


Figure 2 DSA of the Buerger's disease with intermittent claudication. Newly visible collateral blood vessels were directly documented by digital subtraction angiography 4 weeks and 6 months after the transplantation. In this case, the ABI and LDBF ratios improved 4 weeks and 6 months after the transplantation. ABI: ankle-brachial pressure index, LDBFR: laser-Doppler blood flow ratio, DSA: digital subtraction angiography

なく、指趾に限局した小潰瘍であった。疼痛は移植後1~2週ごろより軽減する傾向にあり、疼痛緩和の時期は非常に早期より認め、血流以外の因子も考慮される。また疼痛は患者の意識、精神状態に左右されるところもあるが、鎮痛剤の使用は明らかに軽減していた。

現状では血流を評価する検査として、一般的にABI, LDBF, サーモグラフィー, 組織酸素分圧 (tcPO₂), 皮膚灌流圧 (SPP) などが行われている。筋血流シンチを行われる施設もみられている。ABIは主幹動脈の狭窄性病変を反映するが、側副血行路の血流や、足関節以下の末梢血流の評価には適切ではない。よって、血管形成術やバイパス術後の評価には有用であるが、主に下腿以下に細胞移植をしている血管新生療法の血流の評価に適切とはいえない。また石灰化を伴った患者ではオーバーシュートしABIが高く評価される。足趾血圧を測定すれば足関節以下の血流まで評価できるが、

潰瘍症例には不可である。LDBFは組織の微小循環を測定しているが、種々の影響に左右されやすい。よって、移植肢の皮膚血流量 (ml/min/100g) で評価せず、対側との血流比で評価することとした。

しかし、対側が切断されている場合は下腿部や同側の大腿部との比較となり、組織の厚みも違い、測定値に誤差を生じた。対側が高度虚血肢であっても正確な比較はできなかった。けれども、ABIとLDBFの統計学的解析では、症状改善例9肢では4週後、6カ月後のABI, 4週後のLDBFの血流は有意に改善をしており、血流を反映した可能性もある。定量性の高い客観的な血流評価法が確立されるまでは、種々の検査を総合的に評価し、検査間の相関性を検討する必要があると思われる。

血管造影については、動脈相の充満像まで観察していくと血管影の増加、濃染像として認め、移植前に認めなかった末梢側の主幹動脈の描出がなされる場合も

ある。これは毛細血管レベルでの血管床が増加し、run offが改善された結果ではないかと思われる。血管新生により再生された血管は100 μ m以下のものとされ、現状の血管造影で評価できるものではない。われわれは麻酔下に血管造影を行っているが、種々の要因によるスパズムは回避され、側副血行路(側副循環)を評価するためには、良好な条件下で行っていると考えている。150mの間歇性跛行のBuerger病の症例(Case 9)の血管造影を示したが、下腿から足関節以下の血管影が増加し、側副血行路も発達している(Fig. 2)。この患者の間歇性跛行(歩行可能距離)は著しく改善し、ABIとLDBFも改善をしていた。

移植細胞数は 1×10^9 個以上を全例で確保し、結果的にCD34陽性細胞数は 1×10^7 個以上存在していた。CD34陽性細胞をさらに選別し移植する施設もあるが、現状では血管内皮前駆細胞の取り込みとサイトカインや増殖因子の分泌によるパラクリン的な効果のいずれが主なメカニズムかは明らかではなく、われわれはCD34陽性細胞を選別せず単核球細胞を移植している。

症状改善例では6カ月後も改善状態を維持しており、ABI、LDBFおよび血管造影でも改善状態が維持されている症例も存在し、何らかの血流の改善があったものと判断する。

結 論

今後、重症虚血肢、難治性潰瘍の救肢目的に有効な治療になることを期待しているが、現状では血管新生療法後の血流を客観的には評価されていない。これらの臨床結果をさらに検討し、骨髄細胞移植による血管新生療法が末梢動脈閉塞性疾患、さらに虚血性心臓病にも応用できるものと期待する。

文 献

- 1) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O et al: Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*, 1998, **97**: 1114–1123.
- 2) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964–967.
- 3) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*, 2001, **103**: 897–903.
- 4) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: A pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002, **360**: 427–435.

Therapeutic Angiogenesis for Ischemic Limbs by Autologous Transplantation of Bone-marrow Cells

Teiji Okazaki,¹ Hidetoshi Akashi,¹ Hiroyuki Ohtsuka,¹ Shinichi Hiromatsu,¹
Keiichiro Tayama,¹ Shigeaki Aoyagi,¹ and Toyoaki Murohara²

¹Department of Surgery, Kurume University Hospital, Fukuoka, Japan

²Department of Cardiology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Aichi, Japan

Key words: therapeutic angiogenesis, bone-marrow cells, ischemic limb

Autologous transplantation of bone-marrow mononuclear cells was performed in 13 limbs of 12 patients with nonhealing ischemic ulcer (n=9/13), rest pain (n=1/13) and intermittent claudication (n=3/13) due to peripheral arterial occlusive disease. Four had arteriosclerosis obliterans (ASO) and nine had Buerger's disease. We injected with the upper limb in three and the lower limb in ten. The symptoms improved in 83.3% at 4 weeks, in 75% at 6 months. The ankle-brachial index (ABI) improved in 50% and the laser-Doppler blood flow (LDBF) ratio improved in 54.5% at 4 weeks. Newly visible collateral blood vessels were directly documented by digital subtraction angiography in 7 limbs(63.6%). In response cases (9 limbs), the ABI improved significantly at 4 weeks (p=0.026) and 6 months (p=0.009), the LDBF ratio improved significantly at 4 weeks (p=0.001).

(*J Jpn Coll Angiol*, 2005, **45**: 37–43)