Nitric oxide によるヒト陰茎海綿体の弛緩反応

高松赤十字病院泌尿器科 (部長: 湯浅 誠)

木村 和哲 高橋 正幸 奈路田拓史 入口 弘英
宮本 忠幸 川西 泰夫 沼田 明 湯浅 誠

徳島大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 香川 征教授)

田 村 雅 人 香 川 征

THE RELAXATION OF HUMAN CORPUS CAVERNOSUM CAUSED BY NITRIC OXIDE

Kazunori Kimura, Masauki Takahashi, Takushi Naroda, Hirohide Iriguchi,
Tadayuki Miyamoto, Yasuo Kawanishi, Akira Numata
and Makoto Yuasa

Department of Urology, Takamatsu Red Cross Hospital
(Chief: M. Yuasa)

Masato Tamura and Susumu Kagawa
Department of Urology, School of Medicine, Tokushima University
(Director: Prof. S. Kagawa)

Non-adrenergic non-cholinergic nerves (NANC) are thought to be important in the relaxation of corpus cavernosum for erectile function. On the other hand, it has been shown that nitric oxide (NO) is synthesized from L-arginine and released by the endothelium of blood vessels and accounts for the activity of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). We studied whether electrical field stimulation (EFS) of isolated strips of human corpus cavernosum released NO and whether it could act as a NANC neurotransmitter.

Human penile tissue specimens were mounted in an organ bath and the isometric tension recorded. EFS was applied to precontracted strips between two parallel platinum electrodes. Relaxation induced by EFS was not influenced by guanethidine or atropine, but was markedly inhibited by N^G-nitro-L-arginine which is an analog of L-arginine that inhibits the conversion of L-arginine to NO, and hemoglobin which is an agent that inhibits the biological actions of NO. Methylene blue which is an inhibitor of cytosolic guanylate cyclase also reduced the relaxation of EFS, but not completely. The inhibitory effect of N^G-nitro-L-arginine was reversed by addition of excess L-arginine. Exogenous NO relaxed human corpus cavernosum. The relaxation was only a transient response and concentration-dependent. The profile of responses is similar to that evoked by EFS.

Our data clearly demonstrate the release of NO during EFS and the function of NO as a NANC neurotransmitter. Human penile erection may be mediated by NO generated in response to NANC neurotransmission.

Key words: human corpus cavernosum, nitric oxide, endothelium-derived relaxing factor

要旨: Nitric oxide (NO) は, 広汎な情報を伝達するメッセンジャーとして注目されている. NO は内皮依存性弛緩因子としてグアニル酸シクラーゼを活性化させ, 細胞内 c-GMP 濃度を上昇させることにより血管平滑筋の弛緩をもたらすなど, 数多くの生体反応に関与している. そこで, 今回は陰茎勃起に伴う陰茎海綿体平滑筋の弛緩が, この NO によるものであるかどうかを, 薬理学的に検討した. ノルアドレナリンで前収縮させた陰茎海綿体を electrical field stimulation (EFS) すると, 非アドレナリン-非コリン性 (non-adrenergic non-cholinergic: NANC) の弛緩反応が生じ, その反応は frequency-dependent なものであった. NO の合成酵素の阻害剤である N^G-ニトロ-L-アルギニンの前処理によって,

この弛緩反応は有意に阻害され、逆に、L-アルギニンの添加によりその弛緩反応は回復した。また、ヘモグロビンの添加によってこの弛緩反応は阻害され、グアニル酸シクラーゼの阻害薬であるメチレンブルーによっても減弱した。これらの結果より、陰茎海綿体の弛緩は、NANC 神経刺激によって遊離された NO がグアニル酸シクラーゼを介し、c-GMP を増加させ、生じていると考えられた。すなわち、ヒト陰茎海綿体においても、NO が NANC 神経の神経伝達物質の一つであり、勃起の発現に NO が重要な役割を果たしていると考えられた。

キーワード：ヒト陰茎海綿体, nitric oxide, 内皮依存性弛緩因子

結 言

勃起時に陰茎海綿体は弛緩し、海綿体静脈洞への血流量の増加と海綿体からの血流出の閉塞に重要な役割を果たしている。Creed ら¹⁾は骨盤神経刺激に伴う陰茎海綿体の弛緩による陰茎勃起はアトロピン抵抗性であり、その神経支配は non-adrenergic, non-cholinergic 線維である事を示している。また、in vitro の実験よりその弛緩反応は内皮依存性であることが報告されている²⁾。一方、血管系では内皮依存性弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor: EDRF) は L-アルギニンから誘導された一酸化窒素 (nitric oxide: NO) であることが明らかになっている³⁾。そこで、今回は、ヒトの陰茎海綿体組織の electrical field stimulation (EFS) による弛緩反応が内皮由来の NO で生じているものかどうかを in vitro で検討した。

実験方法

a. ヒト陰茎海綿体標本

陰茎海綿体組織は、陰茎手術や剖検時に得られた15片を用いた。陰茎手術は陰茎癌に対する陰茎切断術2例、陰茎折症および陰茎彎曲症に対する陰茎形成術4例であり、剖検時に得た患者の背景は膀胱癌4例、前立腺癌4例であった。年齢は27歳から76歳に分布し、平均50歳であった。手術時の症例は術前の勃起機能は正常であった。また、剖検した症例の勃起機能は不明であった。

ヒト陰茎海綿体は摘出後すみやかに冷却した Krebs 液に侵し、張力がかからないように注意深く約1×2×6mm の標本を作成した。また、剖検時に得られた組織では、死後2時間以内に摘出できた標本で行った。

b. Isometric study

標本は5%CO₂を含むO₂通気下で、37℃のorgan bath (20ml) に懸垂した。そして、収縮弛緩を等尺性にトランスジューサー (NEC sanei 45347A) を介し、レコーダー (島津 R1231) 上に記録した。切片には約5mN の基礎張力を負荷して、equilibration を2時間行い、最終的な張力は3.0±0.3mN であった。2時間後に高

K 溶液 (124mM) にて収縮を起こさせ、その収縮高が3mN に満たない標本は実験に用いなかった。electrical field stimulation は、刺激装置 (SEN-3301, 日本光電) を用い、刺激電極としては長さ5mm の白金線を2mm 離して海綿体の両側に置き、duration 0.8ms, 周波数 2, 4, 8, 16, 32, 64Hz のパルス波で、180秒の間隔で5秒間ずつ刺激した。刺激の強さは最大反応が得られる電圧で行った。

c. 溶液と薬剤

Krebs 液の組成 (mM) は NaCl 119, KCl 4.6, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 15, NaH₂PO₄ 1.2, glucose 11 で pH7.3~7.4 に調整した。高 K 溶液 (124mM) は Krebs 液の Na を当モルの K に置き換えて調整した。使用した薬物は重酒石酸 L-ノルエピネフリン (Sigma), 硫酸アトロピン (和光純薬), 硫酸グアナethジン (東京化成), テトロドトキシン (Sigma), L-アルギニン (Sigma), N^G-ニトロ-L-アルギニン (Sigma), メチレンブルー (Sigma), ヘモグロビン (Sigma) であり、全て蒸留水に溶解し用いた。インドメタシン (Sigma) は水に不溶性であるため、0.1M NaCO₃, 0.1M Na₂PO₄ (pH=6.9) の溶液に溶解した。

外因性 NO の陰茎海綿体に対する作用を検討するために2×10⁻³M, 2×10⁻⁴M, 2×10⁻⁵M 濃度の NO 溶液を調整した。NO 溶液は20ml の脱気した蒸留水を三角フラスコに入れ、氷冷下で20分間 NO ガスをバブリングし NO 飽和溶液を作成した。この NO 飽和溶液の NO 含量をザルツマン法⁴⁾にて定量し (~3×10⁻³M), 直ちに氷冷下で蒸留水にて2×10⁻³M, 2×10⁻⁴M, 2×10⁻⁵M 濃度に希釈した。そして、それぞれの NO 溶液を100μl 定量し20ml の organ bath 内に投与し (200倍希釈), 外因性 NO の反応として観察した。また、調整した NO 溶液は30分以内に使用し、残液は保存せず廃棄した。

d. 検定

統計的有意差の検定は paired t-test を用いて行った。

なお、本実験にあたりヒト陰茎海綿体組織の摘出は徳島大学医学部倫理委員会の規定・承認を受けた。

結 果

ヒト陰茎海綿体をノルアドレナリン $1\times 10^{-5}\text{M}$ で収縮させて、2, 4, 8, 16, 32, 64Hzでそれぞれ electrical field stimulation (EFS) すると frequency-dependent な弛緩反応が得られた (Fig. 1)。その弛緩反応はノルアドレナリン $1\times 10^{-5}\text{M}$ の収縮高を100%とすると、2, 4, 8, 16, 32, 64Hzの刺激でそれぞれ 13.3 ± 4.4 , 32.7 ± 7.1 , 47.1 ± 7.1 , 54.3 ± 6.5 , 57.4 ± 6.2 , $57.4\pm 6.3\%$ となり、32Hz以上の刺激で最大弛緩

Fig. 1 ノルアドレナリン (Nor) で前収縮させたヒト陰茎海綿体の electrical field stimulation (EFS) で生じる弛緩反応。EFSによって一過性の弛緩反応が得られ、その程度は刺激頻度依存性であった。また、32Hz以上で最大弛緩反応が得られた。

Table 刺激頻度依存性弛緩反応

刺激頻度(Hz)	弛緩反応(%)
2	13.3 ± 4.4
4	32.7 ± 7.1
8	47.1 ± 7.1
16	54.3 ± 6.5
32	57.4 ± 6.2
64	57.4 ± 6.3

n=8, means±S.E.

弛緩反応のパーセントはノルアドレナリン ($1\times 10^{-5}\text{M}$) の収縮高を100%として算出した。

反応が得られた (Table)。

なお、EFSに伴って遊離される eicosanoid の作用をマスクする為にノルアドレナリン投与20分前にインドメタシン 10^{-6}M を前投与した。さらに、EFSはグアニチジン 10^{-6}M ・硫酸アトロピン 10^{-6}M の存在下で行い、pureなNANC支配の反応として取り扱った。

NO合成酵素阻害剤であるN^G-ニトロ-L-アルギニン、 10^{-4}M を20分前に前投与したヒト陰茎海綿体は、各刺激頻度の弛緩反応とも有意 ($p<0.05$) に阻害された (Fig. 2)。NOの器質であるL-アルギニンを $5\times 10^{-4}\text{M}$ 投与によりその弛緩反応は回復した (Fig. 3)。NOスカベンジャーであるヘモグロビン 10^{-7}M を前投与してEFSすると弛緩反応はほとんど消失した。

NOにより活性化され細胞内のc-GMP濃度を上昇させるグアニル酸シクラーゼの阻害剤のメチレンブルー $10\mu\text{M}$ をEFS開始20分前に前投与すると、明らかな弛緩反応が阻害されたが、統計的有意差は得られなかった (Fig. 4)。

また、外因性NOを陰茎海綿体を使用させると、NO調製溶液 10^{-7}M 濃度でノルアドレナリン 10^{-5}M 収縮高の約42%の弛緩が得られ、 10^{-5}M 濃度で約76%まで

Fig. 2 N^G-ニトロ-L-アルギニン (L-NAME) の阻害作用。各刺激頻度の弛緩反応ともL-NAMEによって有意 ($p<0.05$) に抑制された。それぞれ mean±S.E.を示す。

Fig. 3 N^G-ニトロ-L-アルギニン (L-NAME) の阻害作用とL-アルギニン添加による回復。L-NAMEで抑制された弛緩反応は、L-アルギニン $5\times 10^{-4}\text{M}$ 添加で回復した。

Fig. 4 メチレンブルー (MB) の阻害作用. 各刺激頻度の弛緩反応とも MB によって抑制されたが統計学的有意差は得られなかった. それぞれ mean $\pm$ S.E. を示す.

Fig. 5 外因性 NO による陰茎海绵体の弛緩作用. EFS の弛緩反応と類似した用量依存性の弛緩反応が得られた.

陰茎海绵体が弛緩した. その弛緩反応は用量依存性であり, EFS で得られた弛緩反応のプロフィールと同様の一過性の弛緩反応であった (Fig. 5).

考 察

EFS によるヒト陰茎海绵体の弛緩は NANC 神経で支配されており, その伝達物質として NO が考えられる. Kim ら⁵⁾は, NANC 神経から遊離されるものは NO の前駆物質 (NO-like factor) であり, 平滑筋細胞に入って NO となることもあると報告している. しかし, NO 合成酵素は血管平滑筋や他の平滑筋よりも自律神経に多く存在することが言われており⁶⁾, NO の合成は主に NANC 神経細胞内で起こっているかも知れない.

一方, 犬の回腸においては, EFS の弛緩反応は adenosine 5'-triphosphate (ATP) や γ -aminobutyric

acid (GABA) が, NANC 神経の細胞上のそれぞれの受容体に作用して NO の放出を引き起こしているとの報告もあり⁷⁾, ヒト陰茎海绵体の弛緩反応もそれら伝達物質を介しているかもしれない.

また, NO 合成酵素は内皮細胞内にも局在していることが組織学的に証明されている⁸⁾. rubbing による内皮除去組織での EFS の弛緩反応は減弱はするが消失しないことから⁹⁾, NANC 神経から遊離された NO あるいは NO 様物質が直接平滑筋細胞に作用する経路と内皮細胞を介して NO を放出させる 2 つの経路が存在することが考えられる. しかし, 今回の実験では EFS によって遊離された NO が内皮細胞由来なのか, あるいは NANC 神経終末から放出したかは断定できない.

次に, cholinergic 神経支配による弛緩反応も NO を介しており, 外因性アセチルコリンによる陰茎海绵体の弛緩は, 内皮細胞由来の NO によって生じている⁵⁾. しかし, 今回の EFS で誘発させた弛緩反応はアトロピン抵抗性であり, 実際に生体内で内因性アセチルコリンによって陰茎海绵体の弛緩が調節されているとは考えにくい.

NO は平滑筋内のグアニル酸シクラーゼを刺激し, c-GMP を増加させ弛緩反応を起こしていることが言われている. メチレンブルーによる弛緩反応の阻害は, 陰茎海绵体も NO によってグアニル酸シクラーゼが活性化され弛緩作用が起きている現象を裏付けるものであった. しかし, 我々の結果では, グアニル酸シクラーゼ阻害剤のメチレンブルーによる EFS 弛緩反応の阻害作用は, Rajfer らの報告⁸⁾に比べると弱かった. この理由として, メチレンブルーの dose の問題とこの EFS 弛緩反応が NO-c-GMP pathway だけでなく, たとえばモルモット回腸縦走筋では NO が presynaptic な機構でサブスタンス P の放出に関与している報告がある様に⁹⁾, 他の経路に影響を及ぼしていることが考えられた.

一方, EFS によって, ヒト陰茎海绵体からは, 弛緩性のプロスタノイド (PGI₂, PGE₂) が遊離することを既に我々は報告しているが¹⁰⁾, 今回の実験条件ではインドメタシン存在下で行っており, NO の放出に伴った弛緩性プロスタノイドの放出は無視できると考えている. しかし, Azadzoï ら¹⁰⁾が NO によって弛緩性プロスタノイドが遊離されることを報告しているように生理的な条件下では, これらプロスタノイドとの相互作用は十分考えられる.

一方、免疫組織化学的手法で陰茎海綿体に VIP (vasoactive intestinal peptide) が海綿体内の神経終末に豊富に存在していることが報告されている¹²⁾。しかし、in vitro の VIP の弛緩作用は非常に緩慢であり、また実際に海綿体内に投与しても勃起が生じないことより¹³⁾、勃起の化学伝達物質としては考えにくい。また、VIP とアセチルコリンとの間で協調作用があると言われているが、最終的にはアセチルコリンを介した内皮細胞由来の NO-pathway を経由した反応とみることができる。しかし、アトロピン投与による勃起への影響は少なく、cholinergic 神経支配によって勃起が発現するとは考えにくい。

以上のように、NO は陰茎海綿体を弛緩させる物質として最も重要なものである。その放出部位は、免疫組織化学的な手法で確認しなければ結論は出せないが、EFS 弛緩反応から見ると内皮細胞由来より NANC 神経終末からの NO が大きなウェートを占めていると思われた。

結 語

electrical field stimulation によるヒト陰茎海綿体の弛緩反応は、non-adrenergic non-cholinergic 神経支配の nitric oxide (NO) が重要な役割を果たしている。

本論文の要旨は日本インポテンス学会第 2 回学術総会において発表した。

文 献

- 1) Creed, K.E., Carati, J. and Keogh, E.J.: Autonomic control and change during penile erection in monkeys. *Br. J. Urol.*, 61, 510—515, 1988.
- 2) Tejada, I.S., Blanco, R., Goldstein, I., Azadzi, K., Morenas, A. and Krane, R.J.: Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum. 1. Responses of isolated tissue. *Am. J. Physiol.*, 254, 459—467, 1988.
- 3) Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S. and Byrns, R.E.: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 9265—9269, 1987.
- 4) 環境測定分析法編集委員会編：環境測定分析法注解. p. 78, 日本環境測定分析協会, 東京, 1984.

- 5) Kim, N., Azadzi, K.M. and Tejada, I.S.: A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. *J. Clin. Invest.*, 88, 112—118, 1991.
- 6) Bredt, D.S., Hwang, P.M. and Snyder, S.H.: Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347, 768—770, 1990.
- 7) Boeckxataens, G.E., Pelckmans, P.A., Bult, H., De Man, J.G., Herman, A.G. and Van Maercke, Y.M.: Evidence for nitric oxide as mediator of non-adrenergic, non-cholinergic relaxation induced by ATP and GABA in the canine gut. *Br. J. Pharmacol.*, 102, 434—438, 1991.
- 8) Rajfer, J., Aronson, W.J., Bush, P.A., Dorey, F. J. and Ignarro, L.J.: Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N. Engl. J. Med.*, 326, 90—94, 1992.
- 9) Gustafsson, L.E., Wiklund, C.U., Wiklund, N.P., Persson, M.G. and Moncada, S.: Modulation of autonomic neuroeffector transmission by nitric oxide in guinea pig ileum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 173, 106—110, 1990.
- 10) Kimura, K., Takahashi, M., Naroda, T., Iriguchi, H., Miyamoto, T., Tamura, M., Kawanishi, Y., Numata, A., Yuasa, M. and Kagawa, S.: The influence of prostaglandins on the relaxation caused by nitric oxide in human corpus cavernosum. *Int. J. Impotence. Res.*, 2, 1, 1992.
- 11) Azadzi, K.M., Kim, N., Brown, M.I., Goldstein, I., Cohen, R.A. and Saenz de Tejada, I.: Endothelium-derived nitric oxide and cyclooxygenase products modulate corpus cavernosum smooth muscle tone. *J. Urol.*, 147, 220—225, 1992.
- 12) Polak, J.M., Gu, J., Mina, S. and Bloom, S.R.: VIPergic nerves in the penis. *Lancet*, 1, 217—219, 1981.
- 13) Wagner, G. and Gerstenberg, T.: Intracavernosal injection of Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) dose not induce in man per se. *World. J. Urol.*, 5, 171—177, 1987.

(1993年2月25日受付, 4月28日受理)