

第60回 名古屋市立大学医学会総会
特別講演 VI

陰茎虚血モデルを用いた動脈性 ED の病態解明

木村和哲

名古屋市立大学大学院医学研究科 臨床薬理学

Assessment of arteriogenic ED using penile ischemia model.

KAZUNORI KIMURA

*Department of Clinical Pharmaceutics & Therapeutics,
Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences*

要 約

動脈性勃起障害の治療法としては、外科的な陰茎動脈血行再建術、海綿体トレーニングが試みられているが、科学的裏付けはまだ得られていない。我々は、限局性の動脈血管病変により、どの程度陰茎海綿体平滑筋が影響を受けているかを検討し、外科的治療法や海綿体トレーニングに代わる新しい治療法を検索することを目的とした。内腸骨動脈結紮による段階的な陰茎虚血モデル（ウサギ、ラット）を作成し、摘出した海綿体平滑筋の弛緩反応、海綿体平滑筋の各種 NOS mRNA の発現変動および海綿体神経刺激による海綿体内圧の変化を調べた。結紮3日後、1週間後、4週間後に海綿体神経刺激による人工勃起を起こさせ、海綿体内圧を測定した。その後、陰茎海綿体を摘出し isometric tension study にて収縮弛緩反応を観察した。摘出した陰茎海綿体の一部にて total RNA を抽出し、real-time PCR 法により各種 NOS mRNA の発現変動を検討した。

収縮弛緩反応の結果より、虚血早期に内皮機能障害を呈することが明らかとなった。しかしながら、結紮期間が長期に及ぶと内皮依存性弛緩が回復し、何らかの修復機構もしくは代替機構の存在が示唆された。また、結紮後早期に eNOS、nNOS の発現が減少したが4週間後には回復傾向にあり、弛緩反応の結果を裏付けるものであった。これらの結果より、結紮後の数週間で海綿体平滑筋の機能的な一部分は回復する傾向にあり、このタイミングに何らかの処置を施せば陰茎海綿体の機能を温存できる可能性があり、動脈性 ED の治療法に新しい知見が加わるかもしれない。

はじめに

勃起は性的刺激の伝導により、海綿体内に存在する一酸化窒素合成酵素（nitric oxide synthase；NOS）が活性化し一酸化窒素（NO）が放出されることにより始まる。NOにより陰茎動脈ならびに海綿体平滑筋細胞が弛緩し、陰茎への血液流入量が増加する。それと同時に、海綿体白膜の伸展によって血液流出路が制限されることで陰茎海綿体が血液で満たされ、海綿体

内圧が上昇し勃起が完成する。このように陰茎勃起は血液動態のダイナミックな変化を伴って生じる生理現象である。

勃起障害（erectile dysfunction；ED）は「満足な性交渉のための勃起が発現できないか、維持できない状態」と定義される病態であり、現在、世界中の成人男性の5～20%が中等度以上のED（中等度ED；時々、性交に十分な勃起を得ることができて維持することもできる）で

あるとされている。社会の高齢化とともにED患者数は増加し、2025年には全世界で3億人を超えると予想されている。EDは大きく心因性EDと器質性EDに分類され、器質性EDの1つに動脈性EDがある。動脈性EDは陰茎海綿体に血液を供給する動脈に狭窄や閉塞が発生した場合に生じるEDであり、主な原因として閉塞性動脈硬化症や骨盤内臓器手術、交通事故などによる骨盤骨折や会陰部への鈍的な外傷などがある。外傷性の動脈性ED患者では、受傷後EDの症状に気付かず長期間放置されることも多く、また症状に気付いても受診に抵抗を感じる人も少なくない。

これまで外傷性動脈性EDモデルを用いた研究においては勃起機能の変化や組織学的検討はなされているものの、実際の陰茎海綿体機能の評価はほとんどなされていない。そこで本研究では、限局的な動脈閉塞に伴う動脈性EDの病態解明を目指し、内腸骨動脈を結紮して陰茎への血液流入を制限した動物モデル（ウサギ・ラット）を用いて海綿体の弛緩反応および各種NOSの変動を検討した。

方法と結果

A. ウサギ陰茎海綿体張力測定

雄性NZWウサギをpentobarbital sodium 30 mg/kgで麻酔後、両側の内腸骨動脈を総腸骨動脈および静脈と剥離し、総腸骨動脈との分岐部にて縫合糸を用いて結紮を行った。結紮3日後、1週間後、4週間後に陰茎を摘出した。張力測定はisometric tension studyにて行った。Acetylcholine (ACh, 内皮細胞を介する弛緩)、SNP (NO/cGMP経路を介する弛緩) およびelectrical field stimulation (EFS, NO作動性神経を介する弛緩) による弛緩反応を測定した。

弛緩反応の強さはノルアドレナリン (NE) 30 μ Mの収縮高を100%として表した。結紮により陰茎が虚血に陥った場合の内皮への影響を検討するため、AChによる弛緩反応を測定した。陰茎海綿体をNEで収縮させた後AChを累積投与すると、濃度依存的な弛緩反応が見ら

れた。結紮3日後の組織においては、結紮群とsham群は同程度の弛緩反応を示した (Fig. 1 a)。しかし結紮期間が1週間に及ぶと、結紮群においてAChによる弛緩反応が有意に低下した (Fig. 1 b)。さらに結紮4週間後に摘出し

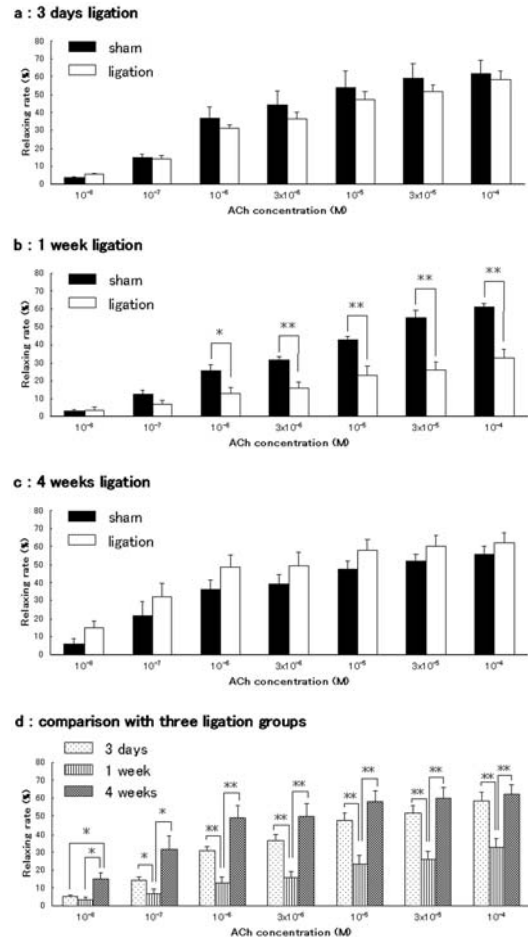


Fig. 1 The change of ACh-induced relaxing response by ligation.

(a) The relaxing response by ACh after 3 days ligation, (b) after 1 week ligation, (c) after 4 weeks ligation, (d) comparison with three ligation groups. In the tissue of 3 days ligation, there was not significant change between ligation and sham group. In 1 week ligation, the relaxing response was lower than that of sham group (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). After 4 weeks ligation, there was not clear difference between ligation and sham group. Among three ligation groups, the relaxing response had significant change (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). (n=5-7)

た組織では、結紮群における弛緩反応が回復し、結紮群と sham 群との間に有意な差は見られなかった (Fig. 1 c).

ACh による弛緩反応を結紮群のみで比較すると、結紮 1 週間後の組織において顕著な弛緩反応の減弱が見られ、結紮 3 日後と結紮 1 週間後及び結紮 1 週間後と結紮 4 週間後の間には有意な差があった。また、結紮 3 日後と結紮 4 週間後の組織の間に明らかな変化は見られなかった (Fig. 1 d).

B. 海綿体内 NOS mRNA 発現

RT-PCR 法を用いて、各種 NOS mRNA の発現変動について検討した。陰茎海綿体内において弛緩反応に重要な役割を担っている NOS (nNOS, eNOS, iNOS) について、陰茎虚血に伴う発現への影響を検討した。ポジティブコントロールとしては β -actin を用いた。nNOS mRNA の発現は、normal 群と各結紮群を比較し明らかな変動は見られなかった。しかし、eNOS においては結紮 3 日後の組織で僅かに発現が確認できたものの、結紮 1 週間後の組織ではほとんど発現が確認出来ないまでに減少していた。さらに結紮が 4 週間に及ぶと、再び eNOS mRNA の発現が確認された (Fig. 2)。iNOS はいずれの群においても発現が見られなかった。

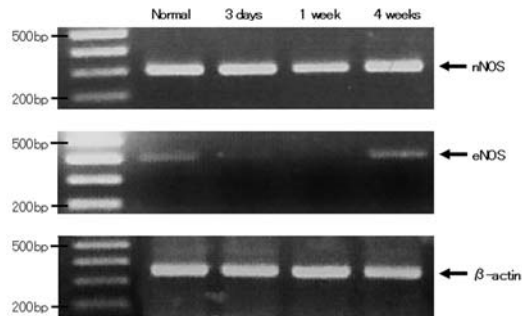


Fig. 2 NOS mRNA expression in ligation groups. In nNOS mRNA expression, there were no significant changes in all periods.

In 3 days ligation, eNOS mRNA expression was confirmed slightly, and there was very little expression in 1 week ligation. In 4 weeks ligation, eNOS mRNA expression increased and returned to normal level.

C. 海綿体組織染色

陰茎海綿体における組織学的な構造変化を検討するため、Azan 染色による解析を行った。Azan 染色は筋線維とコラーゲンを染め分けることが可能であり、筋線維・細胞質・核が赤く染まり、コラーゲン・基底膜・細網線維は青く染まる。そこで、赤く染まった部分を海綿体平滑筋、青く染まった部分をコラーゲンとみなし、染まらなかった空洞の部分をシヌソイドとしてそれぞれの面積比を算出し、比較・検討した。

海綿体平滑筋 (smooth muscle ; SM) については normal 群と比較して結紮群において減少傾向にあり、結紮 1 週間後の組織においては normal 群と比較して有意に減少していた。また、コラーゲンに関しては平滑筋とは逆に増加傾向が見られ、結紮 4 週間後の組織では normal 群と比較して有意に増加していた。シヌソイドは結紮 3 日後の組織で顕著に減少したが、結紮 1 週間後及び 4 週間後の組織では normal 群と比べて明らかな変化は認められなかった (Fig.

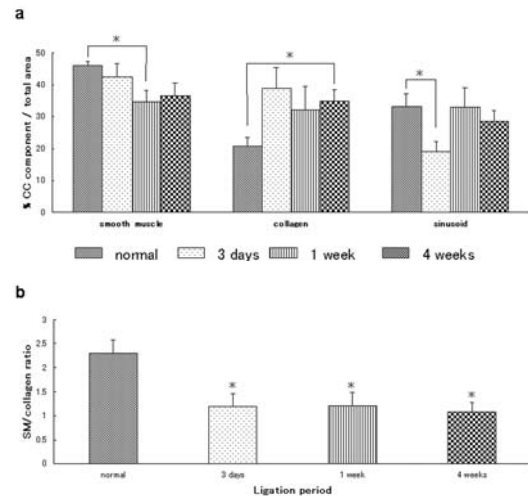


Fig. 3 Structural change in rabbit CC

(a) Change of smooth muscle, collagen and sinusoid, (b) SM/collagen ratio. Smooth muscle tended to decrease by ligation, and contrarily collagen tended to increase. In 3 days ligation, sinusoid space was lower than normal CC. SM/collagen ratio was decreased in all ligation groups. (* $P < 0.05$)

3a). さらに, SM/collagen 比を求めると, どの結紮期間においても normal 群と比較して有意に減少していた (Fig. 3 b).

D. 動脈性 ED モデルラットの作製

動物は8週齢の雄性 Wistar-ST ラット (SLC) を用いた. ラットに Pentobarbital sodium (55mg/kg) を腹腔内注射し麻酔をかけた. ラットが眠った後, 解剖板に仰向けに四肢を固定した. 70%エタノールで下腹部を消毒した後, 正中線に沿って4~5 cm 切開した. 開腹後, 膀胱を陰茎側に押し上げ生理食塩水に浸したキムワイプで固定し視野を確保した. 顕微鏡 (Olympus SZ60) 下で大動脈から2本に枝分かれしている総腸骨動脈を同定した. 総腸骨動脈から陰茎方向へ分岐している内腸骨動脈を同定し, 併走している神経や静脈を傷つけない様注意を払いながら, 糸を用いて慎重に内腸骨動脈を単離した. 単離した内腸骨動脈を糸で二重結紮した. 内腸骨動脈を両側共結紮した後, 傷口を縫合した. コントロール群は, 開腹, 縫合のみの sham 手術を施したラットを用いた. 結紮術, もしくは sham 手術を施してから3日間, 1週間, 4週間後に各群の勃起機能を評価した.

E. 海綿体内圧 (Intracavernous pressure ; ICP) 測定

ラットに pentobarbital sodium (55mg/kg) を腹腔内注射し麻酔をかけ, 解剖板に仰向けに四肢を固定した. 下顎から胸骨にかけて正中切開し左頸動脈を同定, 単離した. 単離した左頸動脈の心臓側を動脈クレンメでクランプし, 中枢側を糸で二重結紮した. クランプ部位と結紮部位の間に圧トランスデューサーに繋いだ PE 50チューブ (BECTON DICKINSON) を挿管し糸で固定し, クレンメを開き血圧を測定した.

下腹部を陰茎上部から肋骨まで正中切開した. 陰囊から精巣を上部へ押し出し陰囊の裏側に位置する陰茎脚を露出した. 左陰茎脚に ICP 測定用に PE50チューブにコネクした23G 注射針を穿刺しアロンアルファで固定した. PE 50チューブは圧トランスデューサーに繋いだ.

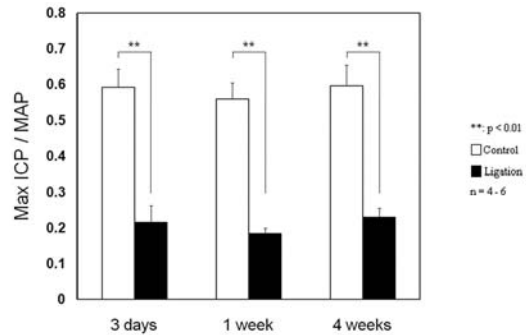


Fig. 4 ICP change at each period
ICP/MAP ratios in ligation groups at 3 days, 1 week and 4 weeks were significantly lower than those of each control group ($p < 0.01$).

PE50チューブは, いずれも250 U/ml のヘパリンで満たした. 次に, 前立腺近くに位置する海綿体神経を, 双極形鉤電極を用いて1分間電気刺激を行い, ICPの変動を測定した. 刺激は Electronic Stimulator を用いて10V, 20Hz, pulse width 5 msec の条件で行った. ICPの値は血圧にも左右されるため, 本研究では刺激後の ICP の最大値 (maximum ICP ; max ICP) を動脈圧の平均血圧 (mean arterial pressure ; MAP) で除した max ICP / MAP にて評価した. 3日間, 1週間, 及び4週間後の全ての期間で, 結紮群の max ICP/MAP 値は, コントロール群に比べ有意に減少していた ($p < 0.01$) (Fig. 4).

考 察

動脈性 ED は器質性 ED の1つであり, 陰茎に流入する動脈の機能不全は ED においてよく見受けられる原因の一つである¹⁾. 若年者においては, バイク事故やスポーツ中の事故などによる外傷性の動脈性 ED を呈する患者が増加している. また, 陰茎へと流入する動脈の中で内腸骨動脈は, 腎移植の際に腎動脈と吻合されることや, 骨盤骨折などの外傷による出血を止める際に塞栓術を施されることがある. 陰茎への栄養血管は内腸骨動脈のみではないため陰茎が壊死することなどは考えにくい, 術後に ED を発症する可能性もあり術後の QOL の低下を

予防するためにも内腸骨動脈の再建, もしくはそれに準じた対処が必要である。

今までに行われた外傷性動脈性 ED の研究としては, 両側内腸骨動脈結紮手術を行ったラットにおいて陰茎海綿体内圧の低下, NOS 含有神経線維の減少, シヌソイドの崩壊, TGF- β_1 の増加などが起こったという報告²⁾, 内腸骨動脈の片側もしくは両側を 4 週間結紮したラットにおいて, 片側結紮群では組織学的な変化はほとんど見られなかったが, 両側結紮群において神経線維密度・nNOS の減少, 内皮細胞の減少および断片化, α -actin の減少が見られたという報告³⁾, また, 両側内腸骨動脈を 2 週間もしくは 6 週間結紮したラットにおいて, シュワン細胞の増加, 筋フィラメントの減少, 平滑筋の萎縮が起こったとする報告⁴⁾などがある。

これらの結果を踏まえつつ, よりヒトに近い陰茎構造を持ち, 収縮弛緩のパターンにおいてもヒト陰茎海綿体と類似しているウサギを用いて^{5,6)}, 限局的な動脈閉塞が生じた場合の陰茎海綿体における収縮弛緩機構の変化を検討した。

陰茎海綿体の張力測定については, 内腸骨動脈結紮 3 日後では内皮依存性弛緩反応に著明な変化は無かったが, 結紮 1 週間後の組織において内皮依存性の弛緩反応が低下していた (Fig. 1 a, 1 b)。このことから結紮後早期から海綿体内皮細胞において機能障害が生じることが明らかとなった。総腸骨動脈を 2 週間閉塞させたウサギにおいても海綿体での内皮依存性弛緩反応の減弱が報告されている⁷⁾。同実験において, 何も刺激しない状態での陰茎海綿体内への血液流入量は閉塞群と sham 群において明らかな違いは無かったこと, 閉塞群において陰茎海綿体内に内因性 NOS 阻害剤である *N*-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) と asymmetric dimethylarginine (ADMA) の蓄積が起きたことが述べられている。L-NMMA と ADMA はタンパク質を構成するアルギニン残基のグアニジノ窒素が protein arginine *N*-methyltransferases (PRMT) の媒介によってメチル化され, メチル修飾を受けたタンパク質の分解に伴って

symmetric dimethylarginine (SDMA) と共に遊離される。このうち L-NMMA と ADMA のみが NOS 阻害活性を有し, 全ての NOS アイソフォームを阻害する。また, L-NMMA と ADMA は単に NO 産生の抑制にとどまらず, 活性酸素を過剰に産生し内皮機能を低下させることも知られている⁸⁾。このことから今回の我々の実験において, 結紮後 3 日ではまだ内皮に障害は現れなかったものの, 虚血期間が長くなるにつれて阻害物質が蓄積し, 内皮障害及び内皮依存性弛緩反応の低下が起きた可能性も考えられる。

また, 生体内において過度の酸化ストレスの原因となるスーパーオキシド (O_2^-) も, O_2^- の持つ NO 消去作用により NO と O_2^- のバランスが破綻すると, 細胞に障害が起きると考えられている⁹⁾。さらにスーパーオキシドと NO の反応産物であるペルオキシナイトライトも細胞毒性が強いと考えられているため¹⁰⁾, 今後内因性 NOS 阻害物質や酸化ストレスについて調べることも更なる病態解明において重要となるであろう。

さらに結紮期間が長くなると, 結紮 4 週間後の組織で内皮依存性弛緩反応の回復が見られた (Fig. 1 c)。低酸素状態においては血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の産生誘導が起きると言われているため, 慢性的な陰茎虚血により VEGF を始め様々な成長因子が誘導され, 内皮細胞の増殖や内皮機能の改善が起きたと推測される。内皮細胞の増殖については, 内腸骨動脈を 6 週間結紮したラットにおいても報告されている⁴⁾。あるいは虚血組織においては血管新生の促進が考えられるため, 内皮細胞の増殖および側副血行路の発達・新生により虚血状態が緩和され, NO 合成能が改善したのかもしれない。

動脈結紮後の陰茎海綿体における NOS mRNA の発現変化を RT-PCR 法により検討したところ, eNOS mRNA においてのみ変動が見られ, 結紮 3 日後ではやや発現が確認されるものの, 結紮 1 週間後の海綿体において発現が確認されなかった。さらに結紮 4 週間後には再

び発現が確認された (Fig. 2). これは、張力測定の結果とほぼ一致している. このことから, eNOS に関しては虚血早期において少なくとも mRNA レベルでは一旦減少するものの, その後虚血状態の緩和などにより発現が回復したのではないかと考えられる.

また, nNOS mRNA の発現はすべての結紮群において確認され, 顕著な変化は見られなかった. 内腸骨動脈結紮ラットにおいて免疫染色でのみ nNOS 発現分布の減少などが報告されているが, 虚血状態においては陰茎海綿体内での nNOS mRNA 量自体は大きく変化しないかもしれない. また, アテローム性動脈硬化によりウサギの陰茎海綿体を虚血状態にした実験では, 虚血後 6 週間までは nNOS mRNA の発現が増加したものの, 虚血後 8 週間以降で低下したという報告¹¹⁾や, 同モデルにおいて EFS による弛緩反応が虚血後 8 週間以降で低下したとする報告¹²⁾もあり, 虚血に対する nNOS の変化は虚血後ゆっくりと進行するのかもしれない.

さらに, 今回の実験系においてはどのウサギの陰茎海綿体においても iNOS mRNA の発現は確認されなかった. iNOS は血管内皮および平滑筋において発現するが, 定常状態ではほとんど発現が認められず, サイトカインなどによる誘導刺激によって初めて発現を認める酵素であること, また NO 自体による iNOS の発現抑制が報告されていることなどから⁹⁾, iNOS が誘導されるほどの障害や炎症が海綿体平滑筋に生じていなかったものと思われる. 今後これらの結果に関しては mRNA のみならず, ウェスタンブロット法による NOS タンパク質の定量などを行って補完しなければならないと考えられる.

虚血陰茎海綿体の組織化学的検討を行うために, Azan 染色を行った. Azan 染色では, 陰茎海綿体を平滑筋 (赤色) とコラーゲン (青色) に染め分けることが可能である. その結果, 平滑筋は結紮期間が長くなるにつれて減少傾向にあり, コラーゲンはどの結紮期間においても増加傾向を示した. また, SM/collagen 比を nor-

mal 群と比較するとどの結紮期間においても有意に減少していた (Fig. 3b). このことから陰茎が虚血に陥ると, 虚血早期から陰茎海綿体の線維化が起こると考えられる. このことに関しては自然発症高血圧ラットを用いた実験において, 海綿体での線維性のリモデリングは大動脈などの大血管のリモデリングに先行して起こることも示されているため¹³⁾, 早期の線維化の予防は動脈病変に伴う ED において治療上の重要な鍵となるであろう. 虚血によって線維化が進行する機構についてはまだ不明な点が多いが, 低酸素下において TGF- β_1 が過剰発現することが原因の一つと考えられている¹⁴⁾. TGF- β_1 は海綿体平滑筋細胞においてコラーゲン合成を増加させることが確認されている. コラーゲンが増加し海綿体平滑筋が萎縮すると, 陰茎海綿体の弾性が失われ, さらに進行すれば静脈閉鎖機構不全の発生率の増大を招く恐れがある. コラーゲンなどの結合組織と平滑筋の比率は正常な勃起機能を保つために重要な要因であるため, 今後は免疫染色を用いた平滑筋や内皮細胞, nNOS 陽性神経などの含有量に関する詳しい調査や, コラーゲンのサブタイプ (特に I 型と III 型) の変化などに着目したさらに深い検討を要するであろう.

ラットの海綿体神経刺激による人工勃起の実験では, 結紮後 4 週間経っても勃起機能の回復が見られず, ウサギの張力試験および NOS mRNA の結果とは異なった結果であった. その理解として結紮後一定期間で内皮機能は回復傾向にあるが, それだけでは勃起機能は改善せず, TGF- β_1 の過剰発現など別の要因が実際の勃起反応を遅らせているかもしれない. 現在我々は, PDE-5 阻害剤の連続投与により, 結紮後の勃起機能の回復を見ており, その効果が期待される.

また, 全身性の血管疾患と ED とは多数の共通リスクファクターを持つことから, ED が動脈硬化・心血管イベント・無症状の全身性血管疾患などに対する早期マーカーとなりうると考えられている¹⁵⁾. 全身性血管疾患の一症状として内腸骨動脈など陰茎に流入する動脈の機能不

全が起こると考えると、今回の結果は全身性血管病変を有する動脈性EDの病態解明にもヒントを与えるのではないかと考えている。

動脈性EDにおける新規治療法の候補としては、動物実験において既にVEGFの慢性投与が試みられており、勃起機能の回復などが確認されている⁴⁾。また、PGE₂の海綿体内注射による勃起を繰り返した症例の中には、陰茎海綿体動脈血流量の改善に伴い自然勃起の回復が見られることもあるため¹⁶⁾、PGE₂注射による海綿体トレーニングも有効かもしれない。さらに心筋においてsildenafilが血管新生を刺激するという実験データ¹⁷⁾、海綿体性EDモデルラットに対するvardenafil慢性投与により海綿体の線維化を抑制できたとする報告などから¹⁸⁾、PDE-5阻害剤の慢性投与により陰茎への側副血行路の発達促進ならびに海綿体の正常な組織構造の保持が期待できると考えられる。

今後のさらなる研究の発展により、より非侵襲的で効果の高い治療法が開発されることが期待される。

参考文献

- 1) Lin CS, Ho HC, Gholami S, et al.: Gene expression profiling of an arteriogenic impotence model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285: 565-569, 2001.
- 2) El-Sakka AI, Yen TSB, Lin CS, et al.: Traumatic arteriogenic erectile dysfunction: a rat model. *Int. J. Impot. Res.*, 13: 162-171, 2001.
- 3) Young LD, Bella A, Howard J, et al.: Arteriogenic erectile dysfunction alters protein expression within the cavernosal tissue in an animal model. *J. Sex. Med.*, 2: 199-206, 2005.
- 4) Lee MC, El-Sakka AI, Graziottin TM, et al.: The effect of vascular endothelial growth factor on a rat model of traumatic arteriogenic erectile dysfunction. *J. Urol.*, 167: 761-767, 2002.
- 5) Lin YM and Lin JSN.: The rabbit as an intracavernous injection study model. *Urol. Res.*, 24: 27-32, 1996.
- 6) Taub HC, Lerner SE, Melman A, et al.: Relationship between contraction and relaxation in human and rabbit corpus cavernosum. *Urology*, 42: 698-704, 1993.
- 7) Masuda H, Tsujii T, Okuno T, et al.: Accumulated endogenous NOS inhibitors, decreased NOS activity, and impaired cavernosal relaxation with ischemia. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp Physiol.*, 282: 1730-1738, 2002.
- 8) 増田均, 東洋. 内因性 NOS 阻害物質と疾病. *日薬理誌*, 119: 29-35, 2002.
- 9) 平田結喜緒. 別冊・医学のあゆみ NO のすべて: 医歯薬出版株式会社, 1996.
- 10) Pacher P, Beckman JS, Liaudet L.: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, 87: 315-424, 2007.
- 11) Wang T, Soker S, Atala A, et al.: Alterations in angiogenic growth factors and neuronal nitric oxide synthase expression in chronic cavernosal ischemia. *Int. J. Impot. Res.*, 16: 403-411, 2004.
- 12) Azadzi KM, Master TA, Siroky MB.: Effect of chronic ischemia on constitutive and inducible nitric oxide synthase expression in erectile tissue. *J. Androl.*, 25: 382-388, 2004.
- 13) Behr-Roussel D, Gorny D, Mevel K, et al.: Erectile dysfunction: an early marker for hypertension? A longitudinal study in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 288: 276-283, 2005.
- 14) Wespes E.: Smooth muscle pathology and erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.*, 14 (Suppl 1): 17-21, 2002.
- 15) Billups KL. Erectile dysfunction as an early sign of cardiovascular disease. *Int. J. Impot. Res.*, 17: 19-24, 2005.
- 16) 白井将文, 三浦一陽, 石井延久. 性機能障害: 南山堂, 1998.
- 17) Koneru S, Penumathsa SV, Thirunavukkarasu M, et al.: Sildenafil mediated neovascularization and protection against myocardial ischemia reperfusion injury in rats: probable role of VEGF/Angiopoietin-1. *J. Cell. Mol. Med.*, Mar:

28, 2008.

- 18) Ferrini MG, Davila HH, Kovanecz I, et al.: Vardenafil prevents fibrosis and loss of corporal smooth muscle that occurs after bilateral cavernosal nerve resection in the rat. *Urology*. 68: 429-435, 2006.