

ラットのフェニレフリン誘発尿道内圧上昇及び血圧に対するシロドシン
(KMD-3213) の作用—下部尿路選択性の検討—

立道 聡,* 小林久美, 丸山 格, 小林 護, 山崎芳伸, 柴田信男

Effects of Silodosin (KMD-3213) on Phenylephrine-induced Increase in Intraurethral Pressure
and Blood Pressure in Rats—Study of the Selectivity for Lower Urinary Tract—Satoshi TATEMACHI,* Kumi KOBAYASHI, Itaru MARUYAMA, Mamoru KOBAYASHI,
Yoshinobu YAMAZAKI, and Nobuo SHIBATAPharmacology Research Laboratory, R&D, Kissei Pharmaceutical Co., Ltd.,
4365-1 Kashiwabara, Hotaka, Azumino City 399-8304, Japan

(Received September 26, 2005; Accepted November 14, 2005)

The effects of silodosin, an α_{1A} -adrenoceptor (AR) antagonist, and of other α_1 -AR antagonists on the phenylephrine (PE)-induced increase in intraurethral pressure (IUP) and on blood pressure (BP) were studied in anesthetized rats. The drugs were administered intravenously (*i.v.* study) or intraduodenally (*i.d.* study). IUP and BP were measured *via* catheters inserted into the prostatic urethra and common carotid artery, respectively. In the *i.v.* study, drugs were administered every 30 min for effects on BP, and 5 min before each PE-injection (30 μ g/kg, every 60 min) with stepwise increases in dose for effects on IUP. In the *i.d.* study, one dose of drug was administered per rat, then IUP and BP were observed for 4 h [IUP being measured time-dependently following PE-injection (30 μ g/kg)], and IUP and BP were expressed as a percentage of the values without any drugs. ID₅₀ for IUP and ED₁₅ for BP were calculated, and uroselectivity was determined as ED₁₅/ID₅₀ for each drug. All drugs both inhibited the IUP increase and lowered BP, each effect being dose-dependent. The order of uroselectivities was silodosin (11.7) > tamsulosin (2.24) > naftopidil (0.133) in the *i.v.* study, and silodosin (26.0) > tamsulosin (3.82) > naftopidil (1.39) in the *i.d.* study. Selectivity for the lower urinary tract (LUT) was higher for silodosin than for tamsulosin (α_{1A}/α_{1D} -AR), naftopidil (α_{1D} -AR), or prazosin (non-selective α_1 -AR). These results suggested that an α_{1A} -AR selective antagonist like silodosin might be effective in the LUT without causing hypotension.

Key words—silodosin (KMD-3213); lower urinary tract selectivity; rat

緒 言

前立腺肥大症に伴う排尿障害の治療に α_1 -アドレナリン受容体 (AR) 遮断薬が第一選択薬として繁用されている。しかし、降圧薬として開発された α_1 -AR 遮断薬である塩酸プラゾシンや塩酸テラゾシンなどもまた本疾患の治療薬としての適応を有するものの、循環器系への副作用を回避することができなかった。現在、塩酸タムスロシン (α_{1A}/α_{1D} -AR 遮断薬) やナフトピジル (α_{1D} -AR 遮断薬) といった、下部尿路に対する特異性の比較的高い薬物を用いているが、依然として血圧低下作用との十分な乖離が認められず、本疾患治療に最大限の効果を得る

まで増量できないのが現状である。この問題を解決すべく、われわれは、 α_{1A} -AR に選択性のある化合物の開発に着手し、シロドシン (開発コード名: KMD-3213) を創製した。本試験では、 α_1 -AR 刺激薬である *l*-塩酸フェニレフリン誘発による前立腺部の尿道内圧上昇及び全身平均血圧に対するシロドシンの作用を静脈内投与及び十二指腸内投与により検討した。さらに、その下部尿路選択性を評価するとともに、他の α_1 -AR 遮断薬である塩酸タムスロシン、ナフトピジル及び塩酸プラゾシンのそれらと比較した。

実験材料及び方法

1. 実験動物 実験には Sprague Dawley (SD) 系雄性ラット (9—11 週齢, 体重: 251.2—397.7 g,

キッセイ薬品工業株式会社開発研究部薬理研究所

*e-mail: satoshi_tatemichi@pharm.kissei.co.jp

日本エスエルシー株式会社, 浜松) を使用した. 恒温 (20—26°C), 恒湿 (35—65%), 12 時間の照明サイクルの環境下で飼育した.

なお, 本実験は, キッセイ薬品工業(株)動物実験倫理委員会の許可を得て, 文部科学省策定の動物実験ガイドライン (141 巻, 1987 年) に準拠して実施した.

2. 使用薬物 実験に使用した薬物は, シロドシン ((-)-1-(3-Hydroxypropyl)-5-[(2*R*)-2-({2-[2-(2,2,2-trifluoroethoxy)phenoxy]ethyl}amino)propyl]-2,3-dihydro-1*H*-indole-7-carboxamide), シロドシンの二臭化水素酸塩, 塩酸タムスロシン ((-)-(*R*)-5-[2-[[2-(*o*-ethoxyphenoxy)ethyl]amino]propyl]-2-methoxybenzenesulfonamidehydrochloride), ナフトピジル ((±)-1-[4-(2-methoxyphenyl)piperazinyl]-3-(1-naphthyl)propan-2-ol) (以上, キッセイ薬品工業株式会社, 松本), 塩酸プラゾシン (Sigma, USA), *l*-塩酸フェニレフリン (phenylephrine, PE), メチルセルロース (methylcellulose, MC) (以上, 和光純薬工業株式会社, 大阪), ハルトマン液 (乳酸リンゲル液) (菱山製薬株式会社, 大阪及び小林製薬工業株式会社, 東京), ウレタン (東京化成工業株式会社, 東京), 生理食塩液 (大塚製薬工場株式会社, 徳島) であった.

静脈内投与試験では, 各薬物を秤量後, シロドシンの二臭化水素酸塩はハルトマン液 (乳酸リンゲル液: NaCl 0.6%; KCl 0.03%; CaCl₂ 0.02% 及び乳酸 0.31% (w/v)) に溶解後, 所定の用量に希釈して使用した. 塩酸タムスロシンは生理食塩液にて溶解, 希釈して使用した. ナフトピジルは等量のリン酸二ナトリウム (Na₂HPO₄) を含む 0.1 mol/l のリン酸 (PA) にて溶解し, 蒸留水にて希釈して使用した. 塩酸プラゾシンは蒸留水にて溶解, 希釈して使用した. 十二指腸内投与試験では, シロドシンは 0.5% MC 溶液にて懸濁後, 所定の用量に希釈した. 塩酸タムスロシンも同様に 0.5% MC 溶液にて溶解, 希釈した. ナフトピジルは静脈内投与試験と同様にして調製した. PE は生理食塩液に溶解した.

3. 実験方法

3-1. PE 誘発尿道内圧 (PE 誘発 IUP) 上昇に対する作用 ラットを 25% ウレタン (1.5 g/kg, s.c.) で麻酔した. 背位に固定後, 気管にカニューレ (ポリエチレンチューブ No. 8, ヒビキ) を挿入

し気道を確保した. 腹部を正中切開し, 尿道に沿って恥骨結合部を切り開いた. 尿道 (前立腺より下方) を縫合糸で結紮し, 膀胱頂部より生理食塩液を満たしたカニューレ (ポリエチレンチューブ No. 5, ヒビキ) を尿道に挿入し, 先端部が前立腺部尿道に位置するように膀胱頸部を結紮固定した. カニューレの他端に接続した圧トランスデューサ (DT-XX, オメダ株式会社) を介してひずみ圧カンプ (1829, 日本 GE マルケットメディカルシステム株式会社) に導出して尿道内圧を測定し, ペン書き記録器 (レクチホリ 8K23, 日本 GE マルケットメディカルシステム株式会社) 上に記録した. 尿道内には少量 (0.1—0.2 ml) の生理食塩液を注入し, 約 10 cmH₂O の尿道内圧負荷をかけた. 左右大腿静脈にはそれぞれ薬物及び PE 投与のためにカニューレ (PE-50, ベクトンディッキンソン株式会社) を留置した. 1 時間に 1 回, PE (30 µg/kg) を右大腿静脈からシリンジポンプ (KdScientific 精密シリンジポンプ Model 100, 室町機械株式会社) により注入 (注入速度: 36 ml/h, 注入時間: 100 s/kg) し, 前立腺部の尿道内圧上昇を惹起した. 各薬物又は溶媒を左大腿静脈より尿道内圧上昇反応惹起の 5 分前に単回投与し, 各薬物投与後の PE 誘発 IUP 上昇値を投与前値と比較した. なお, 各薬物は 1 時間毎に用量漸増法にて投与した. 十二指腸内投与試験においては, 約 15 時間絶食したラットをウレタンで麻酔し, 以下, 上記方法に準じて実験を行った. 各薬物又は溶媒注入路として, 胃底部よりカニューレ (PE-50, ベクトンディッキンソン株式会社) を十二指腸内に挿入し幽門部を結紮固定した. 各薬物又は溶媒を十二指腸内に単回投与し, 投与 5 分, 30 分, 1 時間, 2 時間, 3 時間及び 4 時間後に PE 誘発 IUP 上昇を惹起し, 各薬物又は溶媒投与前の値と比較した.

3-2. 血圧 (BP) 及び心拍数 (HR) に対する作用 BP 測定は, IUP 測定とは別個体にて実施した. ラットを 25% ウレタン (1.5 g/kg, s.c.) で麻酔後, 背位に固定し気管にカニューレ (No. 8, ヒビキ) を挿入し気道を確保した. 左頸動脈にヘパリン-生理食塩液 (10—20 U/ml) を満たしたカニューレ (No. 5, ヒビキ) を挿入し, 他端に接続した圧カトランスデューサ (P23XL, Spectra-med) を介してひずみ圧カンプ (1829, 日本 GE マルケット

メディカルシステム株式会社)に導出し、収縮期及び拡張期血圧をペン書き記録器(8K23, 日本GE マルケットメディカルシステム株式会社)上に記録した。HRは血圧の脈波をタコメータ(1321, 日本GE マルケットメディカルシステム株式会社)に導出し記録した。BP及びHRが安定したのち、大腿静脈に挿入したカニューレ(PE-50, ベクトンディッキンソン株式会社)より各薬物又は溶媒を30分毎に用量漸増法にて単回投与し、投与後のBP及びHRを観察した。十二指腸内投与試験においては、約15時間絶食したラットをウレタンで麻酔し、以下、上記方法に準じて実験を行った。BP及びHRが安定したのち、各薬物又は溶媒を十二指腸内に単回投与し、投与4時間後まで観察した。

4. データ解析

4-1. PE誘発IUP上昇に対する作用 静脈内投与試験においては、薬物投与前のPE誘発IUP上昇値を100%として、各薬物投与後の値をそれぞれ百分率で表し、各群の平均値を時間に対してプロットした。さらに、50%を挟む2点の用量反応直線からID₅₀値(IUP上昇を50%抑制する薬物の投与用量)を求めた。十二指腸内投与試験においても薬物投与前のPE誘発IUP上昇値を100%として、投与5分、30分、1時間、2時間、3時間及び4時間後の値をそれぞれ百分率で表し、各群の平均値を時間に対してプロットした。さらに、薬物投与5分、30分、1時間、2時間、3時間及び4時間後の中で、最も低下したIUPを採取したのち、直線回帰を行い、ID₅₀値を求めた。

4-2. BP及びHRに対する作用 静脈内投与試験においては、薬物投与後30分間で最も低下した平均血圧(MBP)及び最も変化したHRを測定した。なお、MBPは次式： $[\text{拡張期血圧}] + [\text{脈圧} (\text{収縮期血圧} - \text{拡張期血圧}) / 3]$ を用いて算出した。薬物投与前値を100%として、投与後の値をそれぞれ百分率で表し、各群の平均値を時間に対してプロットした。さらに、15%を挟む2点の用量-作用直線からED₁₅値(MBPを15%低下させる薬物の投与用量)を求めた。十二指腸内投与試験では、薬物投与前及び投与5分、30分、1時間、2時間、3時間及び4時間後の収縮期血圧及び拡張期血圧を測定後、MBPを算出し、薬物投与前値を100%として、投与後の値をそれぞれ百分率で表し、各群の平

均値を時間に対してプロットした。さらに、各薬物投与後4時間の中で最も低下したMBP及び最も変化したHRを採取した。なお、MBPは、最も低下した値を採取したのち、直線回帰を行い、ED₁₅値を求めた。求めたID₅₀及びED₁₅より、各薬物の下部尿路選択性(ED₁₅/ID₅₀)を算出した。

5. 統計処理 各データは採取ポイント毎に平均値±標準誤差で表記した。なお、十二指腸内投与試験においては、SASシステム及びその連動パッケージ：SAS前臨床パッケージVersion 5.0(SAS Institute Japan)を用いて検定を実施した。すなわち、各薬物の各用量投与後4時間以内で最も低下したPE誘発IUP上昇及びMBPの投与前値に対する変化率について、溶媒と各薬物投与群間でBartlett検定により等分散性の検定を行い、等分散であった場合はDunnnett検定を、不等分散であった場合はノンパラメトリックDunnnett検定を行い溶媒と各薬物投与群間の差を検定した。両側 $p < 0.05$ をもって有意差有りとした。

結 果

1. 静脈内投与 シロドシン、塩酸タムスロシン、ナフトピジル及び塩酸プラゾシン静脈内投与時のPE誘発IUP上昇抑制作用及びMBP低下作用の用量反応曲線をFig. 1に示す。使用したすべての薬物は用量依存的にPE誘発IUP上昇を抑制し、MBPを低下させた。シロドシンはPE誘発IUP上昇に対して、より強力な抑制作用を示した。一方、塩酸タムスロシンはPE誘発IUP上昇及びMBPに対してほぼ同等の抑制及び低下作用を示し、ナフトピジル及び塩酸プラゾシンは、シロドシンとは対照的にMBPに対してより強力な低下作用を示した。また、HRに対して、ナフトピジルは1000及び3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群において約10%の低下作用を示したが、他の薬物はほとんど作用を示さなかった(図には示さず)。

PE誘発IUP上昇抑制作用のID₅₀値($\mu\text{g}/\text{kg}$)、MBP低下作用のED₁₅値($\mu\text{g}/\text{kg}$)、及び下部尿路選択性をTable 1に示す。PE誘発IUP上昇抑制作用の効力順位は塩酸タムスロシン>シロドシン>塩酸プラゾシン>ナフトピジルであった。一方、MBP低下作用の効力順位は塩酸プラゾシン>塩酸タムスロシン>シロドシン>ナフトピジルであっ

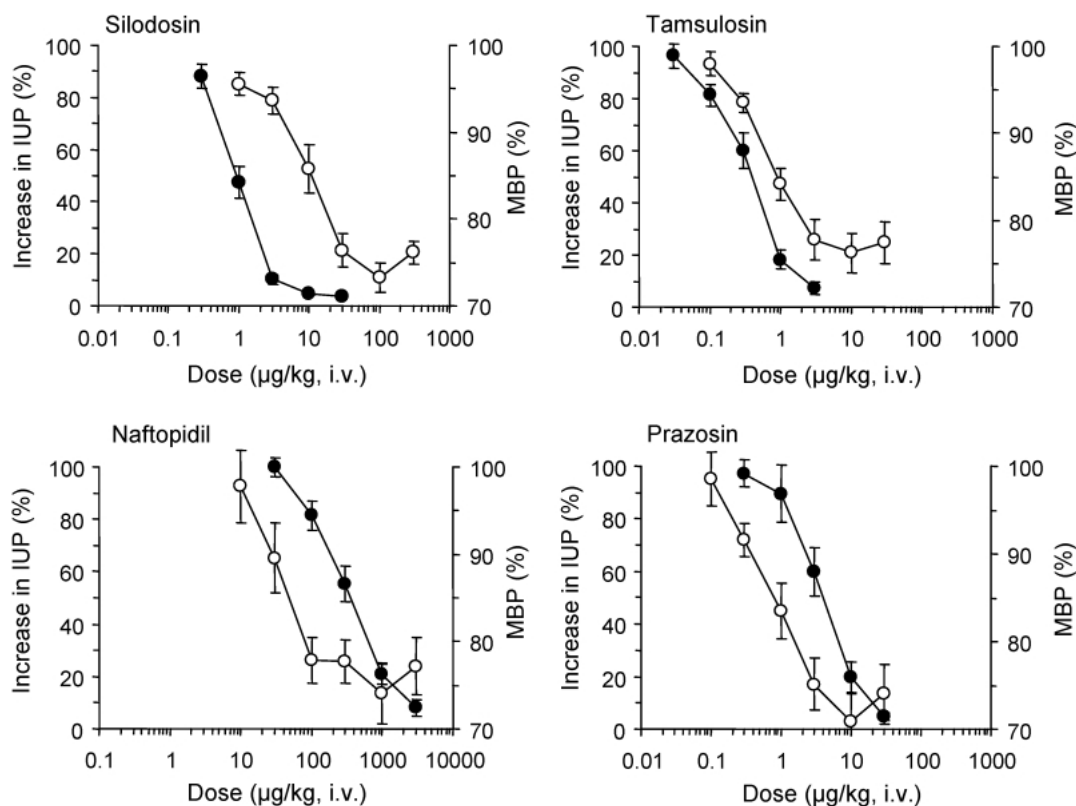


Fig. 1. Effects of Silodosin, Tamsulosin, Naftopidil and Prazosin on Phenylephrine-induced Increase in Intraurethral Pressure (IUP) and Mean Blood Pressure (MBP) in Rats

Each point represents the mean \pm S.E. of 4–5 animals. *i.v.*: intravenous injection. Each drug was intravenously injected at 5 min before injection of phenylephrine (30 μ g/kg, *i.v.*). ●: IUP, the mean value of phenylephrine-induced increase in IUP before administration of each drug was assumed to be 100%. ○: MBP, the mean value of MBP before administration of each drug was assumed to be 100%.

Table 1. ID₅₀ Value, ED₁₅ Value and Uroselectivity of Silodosin, Tamsulosin, Naftopidil and Prazosin after *i.v.* Administration in the Anesthetized Rat

Drug	IUP		MBP		Uroselectivity (ED ₁₅ /ID ₅₀)
	ID ₅₀ (μ g/kg)	ED ₁₅ (μ g/kg)	ID ₅₀ (μ g/kg)	ED ₁₅ (μ g/kg)	
Silodosin	0.932	10.9			11.7
Tamsulosin	0.400	0.895			2.24
Naftopidil	361	48.1			0.133
Prazosin	4.04	0.792			0.196

The ID₅₀ or ED₁₅ value in the Table presents that obtained from 5 animals. MBP: mean blood pressure.

た。シロドシンの下部尿路選択性は 11.7 と本試験に用いた薬物の中で最も高値を示し、以下、塩酸タムスロシン (2.24)、塩酸プラゾシン (0.196)、ナフトピジル (0.133) の順であった。

2. 十二指腸内投与 シロドシン、塩酸タムスロシン及びナフトピジルの十二指腸内投与による PE 誘発 IUP 上昇及び MBP に対する作用をそれぞれ、Figs. 2 及び 3 に示す。各薬物は投与直後から

用量依存的に PE 誘発 IUP 上昇を抑制し、MBP を低下させた。50% 以上の PE 誘発 IUP 上昇抑制作用で比較すると、シロドシンは 30 μ g/kg 以上の用量で抑制作用を示し、その作用は投与 4 時間後まで持続した。塩酸タムスロシンは 10 μ g/kg 以上の用量においてシロドシンと同様の抑制作用を示した。ナフトピジルは 10000 μ g/kg 投与群のみ投与 4 時間後まで抑制作用が持続した。

シロドシン、塩酸タムスロシン及びナフトピジルの MBP を 15% 以上低下させる用量はそれぞれ、300、30 及び 3000 μ g/kg 以上であった。また、シロドシン 3000 μ g/kg 投与群、塩酸タムスロシン 300 μ g/kg 投与群及びナフトピジル 30000 μ g/kg 投与群において、HR は対照群のそれと比較して約 10–15% の低下作用を示した (図には示さず)。

各薬物投与群と投与 4 時間後までに得られた PE 誘発 IUP 上昇抑制作用及び MBP 低下作用の最大変化率の関係を Fig. 4 に示す。シロドシンの PE 誘発 IUP 上昇抑制作用を示す用量と MBP 低下作用

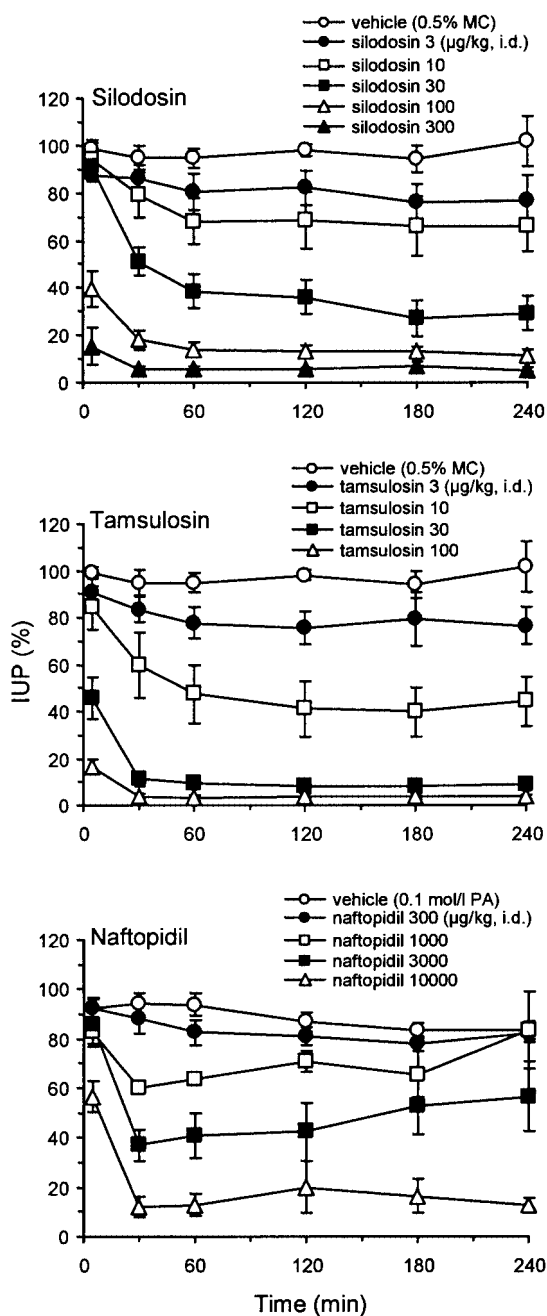


Fig. 2. Effects of *i.d.* Dosed of Silodosin, Tamsulosin and Naftopidil on Phenylephrine-induced Increase in IUP in Rats (Time Course)

Each point represents the mean \pm S.E. of 6 animals. IUP: intraurethral pressure.

を示す用量には乖離が認められ、PE 誘発 IUP 上昇を 80% 以上抑制する用量 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) では MBP は対照群と比較して有意な変化は認められなかったが、塩酸タムスロシン及びナフトピジルでは作用を示す用量が重複しており、PE 誘発 IUP 上昇を 80% 以上抑制する用量 (塩酸タムスロシン及びナフトピジルそれぞれ 30 及び 10000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) では MBP が

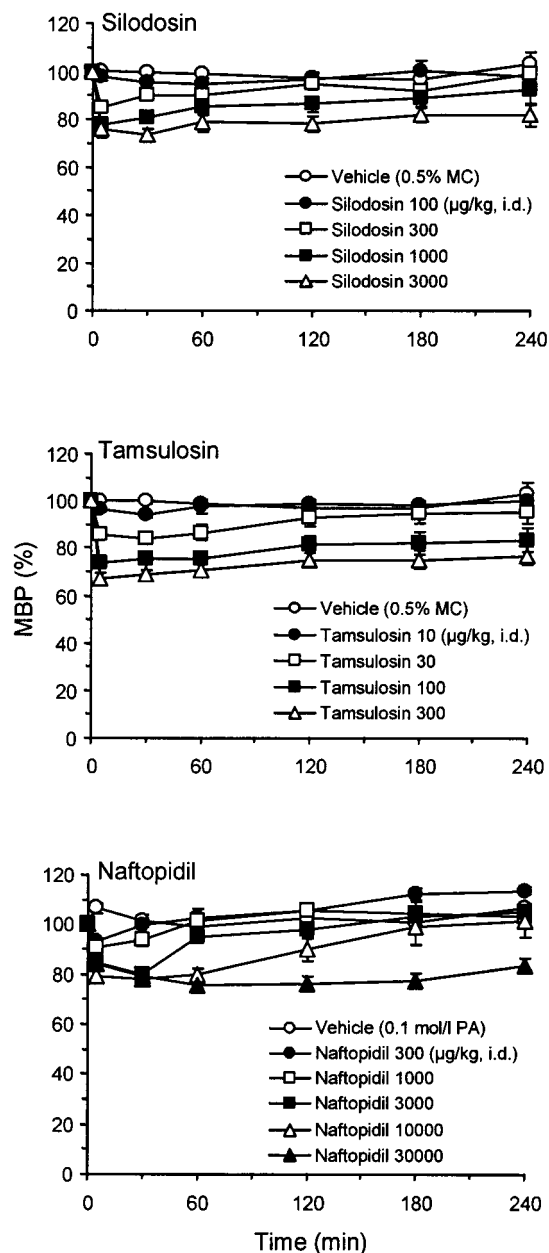


Fig. 3. Effects of *i.d.* Dosed of Silodosin, Tamsulosin and Naftopidil on MBP in Rats (Time Course)

Each point represents the mean \pm S.E. of 5–6 animals. MBP: mean blood pressure.

有意に低下した。

十二指腸内投与時の ID_{50} 値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$), ED_{15} 値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 及び下部尿路選択性を Table 2 に示す。PE 誘発 IUP 上昇抑制作用及び MBP 低下作用の効力順位は、静脈内投与時と同様に、塩酸タムスロシン > シロドシン > ナフトピジルであった。また、十二指腸内投与においてもシロドシンが最も高い下部尿路選択性を示し (26.0), 以下、塩酸タムスロシン (3.82), ナフトピジル (1.39) の順であった。

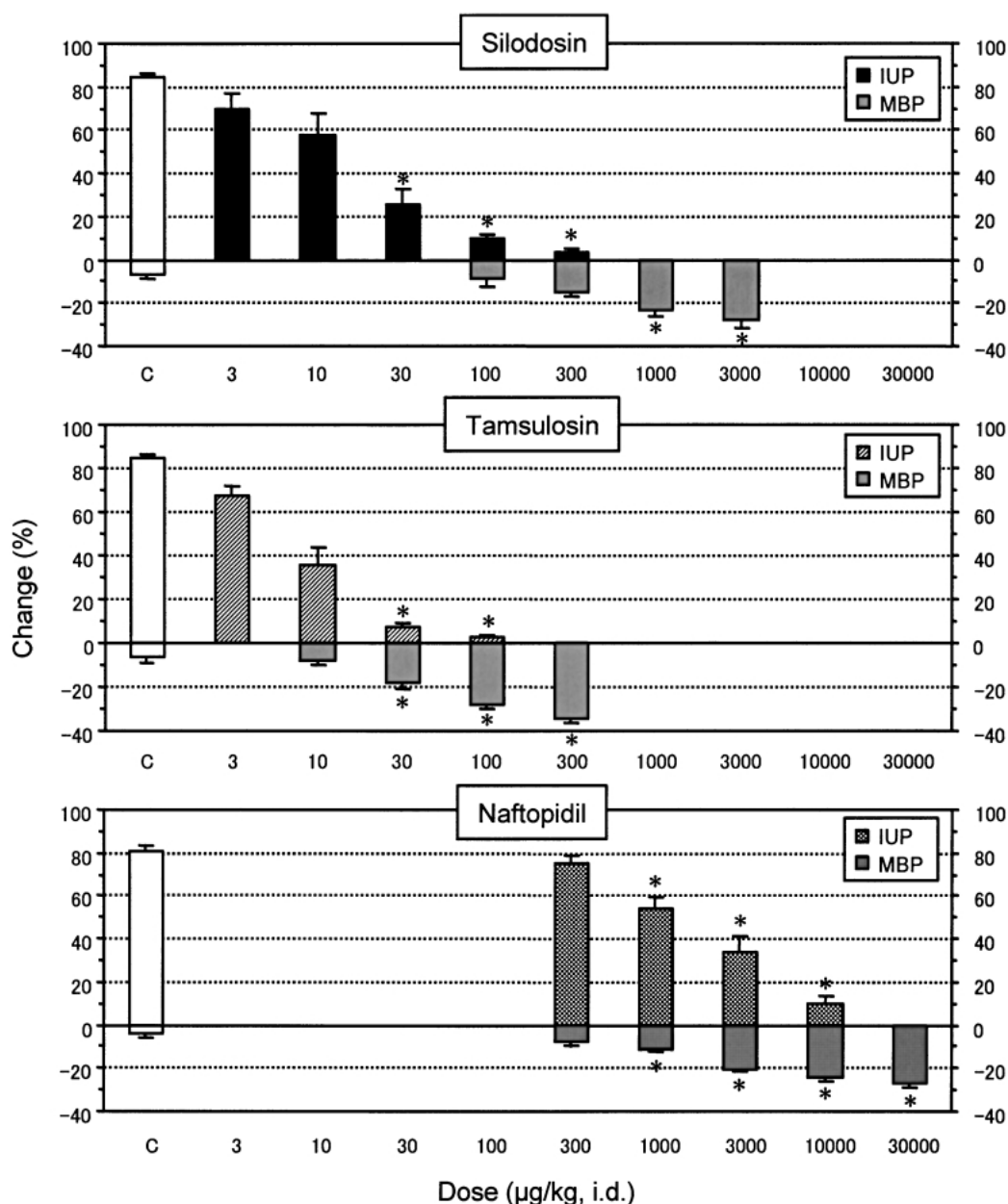


Fig. 4. Effects of Silodosin, Tamsulosin and Naftopidil on Phenylephrine-induced Increase in IUP and MBP in Rats (Dose-response Relations)

Each point represents the mean \pm S.E. of 5–6 animals. *i.d.*: intraduodenal administration. Each column represents the maximum responses observed during the 4-h period after drug administration. *: $p < 0.05$: Significantly different from the control group (Dunnett's multiple comparison test).

Table 2. ID_{50} Value, ED_{15} Value and Uroselectivity of Silodosin, Tamsulosin and Naftopidil after *i.d.* Administration in the Anesthetized Rat

Drug	IUP		MBP		Uroselectivity (ED_{15}/ID_{50})
	ID_{50} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ED_{15} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ID_{50} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ED_{15} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
Silodosin	10.6	276	26.0		26.0
Tamsulosin	5.45	20.8	3.82		3.82
Naftopidil	1200	1666	1.39		1.39

The ID_{50} or ED_{15} value in the Table presents that obtained from 5–6 animals. MBP: mean blood pressure.

なお、本投与方法におけるナフトピジルの下部尿路選択性は、静脈内投与時のそれとは相反する結果であった。

考 察

ラットの前立腺はヒトと同様に α_{1A} -AR が優位であり、¹⁻³⁾ PE は α_{1A} -AR を介して前立腺を収縮させることから、下部尿路に作用する薬物の評価系として適している。シロドシンは *in vitro* 試験におい

て、極めて高い α_{1A} -AR 選択性及び親和性を有することが報告されている。⁴⁾ 今回、シロドシンの PE 誘発 IUP 上昇及び MBP に対する作用を *in vivo* 試験により評価し、その下部尿路選択性を既存の α_1 -AR 遮断薬のそれと比較した。

シロドシンは、静脈内及び十二指腸内投与のいずれの投与方法においても、PE 誘発 IUP 上昇抑制作用が降圧作用に比較してより強力であり、高い下部尿路選択性を示した。このことは、Yamada ら⁵⁾ の *ex vivo* におけるラットを用いた受容体結合試験において、シロドシンが前立腺特異性に優れていること、³H]-シロドシンの前立腺特異的結合量が ³H]-塩酸プラゾシンのそれより多く、大動脈では逆に少なかったという報告と一致している。

本試験によって得られた各 α_1 -AR 遮断薬の下部尿路選択性は、いずれも前項の Tatemichi らの報告⁴⁾ で得られた α_{1A} -AR 選択性及び臓器特異性に比較して低値を示した。一般的に、*in vitro* 試験で得られた選択性が *in vivo* 試験において反映されない例が数多く報告されている。塩酸タムスロシンは *in vitro* 試験で先に報告したように、⁴⁾ α_{1A} -AR 選択性 (α_{1A} -/ α_{1B} - 比: 約 10 倍) を有していたが、本試験において下部尿路選択性がほとんど認められなかったことから、生体位試験において 10 倍以上の下部尿路選択性を示すには、少なくとも *in vivo* 試験における α_{1A} -AR 選択性を 100 倍以上保持する必要があることが示唆された。

下部尿路選択性に関して、シロドシン、塩酸タムスロシン及び塩酸プラゾシン⁶⁾ では投与方法による差が認められなかったが、ナフトピジルのそれは相反していた。この理由として、同薬物投与後の血中動態や組織移行率などが影響していると考えられる。

臨床における前立腺肥大症に伴う排尿障害の治療において、 α_1 -AR 遮断薬の有害事象に起立性低血圧がある。⁷⁾ Cavalli ら⁸⁾ は α_{1B} -AR 遺伝子欠損マウスにおいて、PE 誘発の血圧上昇が正常マウスのそれに比較して抑制されたことから、血圧調節に関与している主な α_1 -AR サブタイプは α_{1B} -AR であることを結論した。したがって、起立性低血圧に α_{1B} -AR の関与が推察される。実際、シロドシンは塩酸タムスロシン及び塩酸プラゾシンに比較して、起立性血

圧反射抑制作用が弱いことが報告されている。⁹⁾ 本試験結果もまた、 α_{1A} -AR に極めて選択性の高いシロドシンが最も高い下部尿路選択性を有しており、薬効を示す用量では血圧低下作用が他剤に比較して弱いことを示した。

以上より、シロドシンは生体位動物実験においても、高度な下部尿路選択性を示し、血圧低下の副作用発現をほとんど認めなかったことから、前立腺肥大症に伴う排尿困難症の有用かつ有効な治療薬となり得ることが示唆された。

謝辞 本研究の実施にあたり、ご助言を賜りましたキッセイ薬品工業株式会社 秋山克良博士に深く感謝致します。

REFERENCES

- 1) Yazawa H., Honda K., *Jpn. J. Pharmacol.*, **62**, 297-304 (1993).
- 2) Price D. T., Schwinn D. A., Lomasney J. W., Allen L. F., Caron M. G., Lefkowitz R. J., *J. Urol.*, **150**, 546-551 (1993).
- 3) Marshall I., Burt R. P., Chapple C. R., *Br. J. Pharmacol.*, **115**, 781-786 (1995).
- 4) Tatemichi S., Kobayashi K., Maezawa A., Kobayashi M., Yamazaki Y., Shibata N., *Yakugaku Zasshi*, **126**, 209-216 (2006).
- 5) Yamada S., Ohkura T., Kimura R., Kawabe K., *Life Sci.*, **62**, 1585-1589 (1998).
- 6) Akiyama K., Hora M., Tatemichi S., Masuda N., Nakamura S., Yamagishi R., Kitazawa M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **291**, 81-91 (1999).
- 7) AUA Practice Guidelines Committee, *J. Urol.*, **170**, 530-547 (2003).
- 8) Cavalli A., Lattion A. L., Hummler E., Nenniger M., Pedrazzini T., Aubert J. F., Michel M. C., Yang M., Lembo G., Vecchione C., Mostardini M., Schmidt A., Beermann F., Cotecchia S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 11589-11594 (1997).
- 9) Akiyama K., Hora M., Yamagishi R., Kitazawa M., *Jpn. J. Pharmacol.*, **90**, 131-137 (2002).