

摘出ラット尿道平滑筋および横隔膜神経筋収縮に対する 八味地黄丸の作用

田中奈保子*, 山下 明, 小坂 昇

鐘紡株式会社 漢方研究所

Effects of Hachimi-jio-gan on the contraction of isolated rat urethral smooth muscle and phrenic nerve-diaphragm

Naoko TANAKA*, Akira YAMASHITA and Noboru KOSAKA

Kampo Research Laboratories, Kanebo, Ltd.

(Received April 28, 1998. Accepted June 17, 1998.)

Abstract

Hachimi-jio-gan (HMG, Ba-Wei-Di-Hang-Wan) has been clinically used for the treatment of micturitional disorder, especially accompanied with prostatic hyperplasia. In this study, the effects of HMG on the contraction of urethral smooth muscle (USM) and external sphincter urethrae were investigated using isolated rat USM and phrenic nerve-diaphragm, respectively.

HMG at $3 \times 10^{-4} \sim 10^{-2}$ g/ml inhibited the contraction of USM by norepinephrine (NE, 10^{-4} M), while it did not affect the contraction by high K^+ (10^{-1} M). The NE-induced maximum contraction of USM was reduced in the presence of HMG, suggesting that inhibition of NE-induced USM contraction by HMG is non-competitive. Among the crude drugs composing HMG, each extract of Corni Fructus, Alismatis Rhizoma, Hoelen, Moutan Cortex and Cinnamomi Cortex inhibited NE-induced USM contraction.

HMG at $10^{-3} \sim 10^{-2}$ g/ml inhibited the twitch responses of isolated rat phrenic nerve-diaphragm preparations induced by both direct and indirect (i.e. via nerve) electric stimulation.

These results indicate that HMG relaxes USM and external sphincter urethrae and is useful for the treatment of micturitional disorder.

Key words Hachimi-jio-gan, norepinephrine, phrenic nerve-diaphragm, urethral smooth muscle, micturitional disorder.

Abbreviations HMG, Hachimi-jio-gan (Ba-Wei-Di-Hang-Wan), 八味地黄丸; IC₅₀, 50 % inhibitory concentration; NE, norepinephrine; USM, urethral smooth muscle.

緒 言

膀胱, 尿道, 前立腺などで構成される下部尿路系は, 自律神経および体性神経の複雑な支配下にあり, 排尿機構において重要な働きをしている。これら下部尿路系の

協調性や神経支配に異常が生じると, 排尿障害が起こる。このうち, 前立腺肥大症による排尿障害は, 加齢により肥大した前立腺結節による尿道の機械的閉塞に加え, 結節内の平滑筋の活動性増加による機能的閉塞が原因で起こると考えられている。^{1, 3)}

前立腺肥大症に伴う排尿障害に対する薬物療法には,

*〒534-8666 大阪市都島区友利町1-5-90
1-5-90 Tomobuchi-cho, Miyakojima-ku, Osaka 534-8666,
Japan

抗アンドロゲン薬、アドレナリン α_1 受容体遮断薬 (α_1 -blocker)、花粉抽出エキスなどのほか、漢方薬として八味地黄丸、猪苓湯、牛車腎気丸などが用いられている。^{3,5)} このうち、八味地黄丸は地黄、山茱萸、山薬、沢瀉、茯苓、牡丹皮、桂皮、附子の8生薬で構成される処方であり、既に臨床において前立腺肥大症に伴う排尿障害に対する有効性が報告されている。^{6,7)} また、実験動物を用いた検討においても、ラットやウサギの膀胱運動に対する作用が報告されているが、^{8,9)} 排尿機能に関与する尿道平滑筋や外尿道括約筋に対する八味地黄丸の作用については検討されていない。そこで、今回著者は、排尿障害に対する八味地黄丸の効果を明らかにするために、尿道平滑筋および外尿道括約筋に対する作用を、それぞれ摘出ラット尿道平滑筋標本および横隔膜神経筋標本をモデルとして検討した。

材料と方法

(1) 使用動物：8週齢のWistar系雄性ラット（体重約180 g、日本エスエルシー）を、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 2\%$ 、午前8時点灯午後8時消灯の条件下で約1週間予備飼育後、実験に用いた。なお、これらの動物は飼育期間中、自由に摂食摂水させた。

(2) 使用薬物：八味地黄丸はエキス粉末（鐘紡）を使用した。すなわち、地黄（5）、山茱萸（3）、山薬（3）、沢瀉（3）、茯苓（3）、牡丹皮（3）、桂皮（1）および加工附子（1）を（ ）内の重量比で混合し、約10倍量の水で $95 \sim 100^\circ\text{C}$ 、約1時間抽出し、遠心ろ過して得られた抽出液を減圧濃縮後噴霧乾燥して、収率23.6%で得たものを使用した。また、生薬単味エキスとして、八味地黄丸の構成生薬をそれぞれ約10倍量の水で $95 \sim 100^\circ\text{C}$ 、約1時間抽出し、ろ過して得られた抽出液を凍結乾燥して、収率1.6~79.9%で得たものを使用した。なお、八味地黄丸および生薬単味エキスは0.25%カルボキシメチルセルロースナトリウム（和光純薬）を含む栄養液に懸濁して使用した。

塩酸ペラバミル（Sigma）、塩酸パパペリン（Sigma）、塩化 *d*-ツボクラリン（Sigma）、塩化サクシニルコリン（Sigma）、臭化ネオスチグミン（Sigma）、酒石酸ノルエピネフリン（NE, Sigma）および塩化カリウム（KCl, 和光純薬）は、いずれも蒸留水に溶解して使用した。また、塩酸プラゾシン（Sigma）およびグントロレンナトリウム（Sigma）は、それぞれメタノール（和光純薬）およびジメチルスルホキシド（和光純薬）に溶解して使用した。

(3) 尿道平滑筋標本に対する作用：尿道平滑筋標本の作製は中瀬ら¹⁰⁾ および渡辺ら¹¹⁾ の方法に準じた。すなわ

ち、ラットの頭部を殴打し、瀉血致死後、腹部を開いて骨盤恥骨結合部を切断し、尿道を露出させた。次に、尿道を膀胱頸部から外尿道括約筋の間で摘出し、縦方向に2等分したものを尿道平滑筋標本とした。マグヌス槽内（10 ml）に栄養液（Krebs-Henseleit 液、 37°C 、組成：NaCl 118.4 mM, KCl 4.7 mM, CaCl_2 2.5 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgCl_2 1.2 mM, NaHCO_3 25.0 mM, glucose 11.1 mM）を満たして混合ガス（95% O_2 -5% CO_2 ）を通気し、その中に標本を0.3 gの静止張力で懸垂した。

NE収縮に対する作用では、NE 10^{-4} M添加による収縮が一定になった後、薬物を累積添加し、薬物添加前の収縮反応に対する比率（%）で薬物の効果を表した。KCl収縮に対する作用では、薬物を5分間処置した後にKCl 10^{-1} Mを添加し、薬物非処置時のKCl収縮に対する比率（%）で薬物の効果を表した。また、薬物存在下でのNE累積添加による収縮においては、薬物を5分間処置した後にNEを $10^{-6} \sim 10^{-3}$ Mの範囲で累積添加し、薬物非処置時のNEによる最大収縮反応に対する比率（%）で薬物の効果を表した。なお、いずれの場合も収縮力はアイソメトリック・トランスデューサー（IM-20-BS, スター・メディカル）およびプレッシャー・アンプリファイヤー（PA-001, スター・メディカル）を介して、ポリグラフ（RECTI-HORIZ-8K, 日本電気三栄）上に記録した。

(4) 横隔膜神経筋標本に対する作用：横隔膜神経筋標本の作製はBülbring¹²⁾の方法に準じた。すなわち、ラットをエーテル麻酔下で頸椎脱臼により致死後、胸郭前部を切除した。次に、横隔膜神経を約25 mmの長さで結紮し、中枢側を切断後、第12肋骨に沿って腹膜を切断し、横隔膜を腱部が頂点の扇形になるように摘出した。更に横隔膜を下辺の肋骨部分で約25 mm、横隔膜神経侵入部位で約6 mm幅、上辺の腱部で約3 mmの台形にして下辺を白金電極に固定した。マグヌス槽内（50 ml）に栄養液（Krebs 液、 37°C 、組成：NaCl 137.0 mM, KCl 5.0 mM, CaCl_2 2.0 mM, NaH_2PO_4 1.0 mM, MgCl_2 1.0 mM, NaHCO_3 12.0 mM, glucose 11.0 mM）を満たして混合ガス（95% O_2 -5% CO_2 ）を通気し、その中に電極に固定した標本を1.0 gの静止張力で懸垂した。

横隔膜神経筋標本の筋に対する直接刺激（1.0 msec, 80 V, 0.1 Hz）および神経を介する間接刺激（1.0 msec, 35 V, 0.1 Hz）は、電気刺激装置（PST-001, スター・メディカル）およびアイソレーター（ISS-011, スター・メディカル）を用い、白金電極を介して行った。薬物は直接刺激および間接刺激による単収縮が一定になった後に累積添加し、薬物添加前の収縮反応に対する比率（%）でその効果を表した。なお、収縮力はアイソメトリック・ト

ランスデューサー (IM-20-BS, スター・メディカル) およびプレッシャー・アンプリファイヤー (PA-001, スター・メディカル) を介してポリグラフ (RECTI-HORIZ-8K, 日本電気三栄) 上に記録した。

(5) 統計学的処理: 結果は平均値±標準誤差で示した。薬物の50%抑制濃度 (IC_{50} 値) は直線回帰法によって算出した。

結 果

1. 尿道平滑筋の NE および KCl 収縮に対する作用

八味地黄丸は NE 収縮に対して 3×10^{-4} g/ml より濃度依存的な抑制作用を示し, 10^{-2} g/ml では薬物添加前の43%にまで抑制したが, KCl 収縮に対しては影響を及ぼさなかった (Fig. 1A)。プラゾシンは NE 収縮に対して $10^{-7} \sim 3 \times 10^{-5}$ M で濃度依存的な抑制作用を示したが, KCl 収縮に対しては影響を及ぼさなかった (Fig. 1B)。ベラパミルは KCl 収縮に対して $10^{-6} \sim 10^{-4}$ M で濃

度依存的な抑制作用を示した。また, ベラパミルは NE 収縮に対しても 3×10^{-5} M 以上で抑制作用を示したが, その作用は KCl 収縮に対する作用よりも弱いものであった (Fig. 1C)。一方, パパベリンは NE 収縮, KCl 収縮のいずれに対しても 10^{-5} M 以上で抑制作用を示した (Fig. 1D)。なお, これらの薬物の NE 収縮および KCl 収縮に対する IC_{50} 値を Table I に示した。

Table I Inhibitory concentrations (IC_{50}) of Hachimi-jio-gan extract and other drugs against the contraction of isolated rat urethral smooth muscle induced by NE (10^{-4} M) and KCl (10^{-1} M).

Drug	IC_{50}	
	NE 10^{-4} M	KCl 10^{-1} M
Hachimi-jio-gan	6.0×10^{-3}	$> 10^{-2}$
Prazosin	8.2×10^{-7}	$> 3 \times 10^{-5}$
Verapamil	$> 10^{-4}$	5.5×10^{-6}
Papaverine	4.2×10^{-5}	1.5×10^{-5}

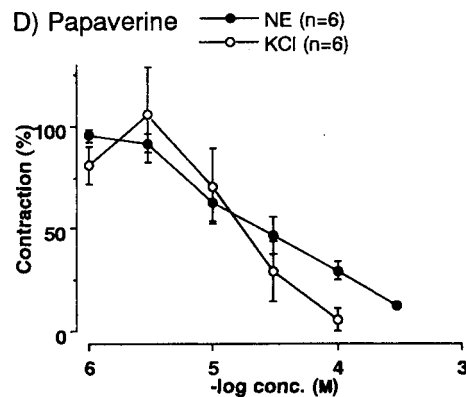
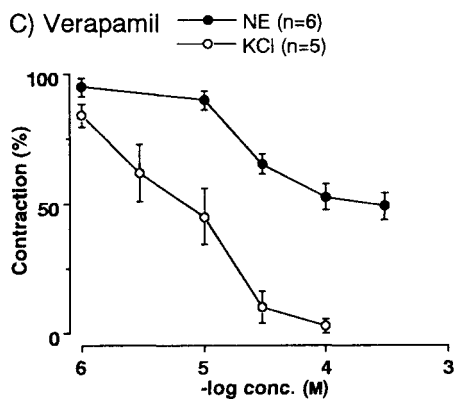
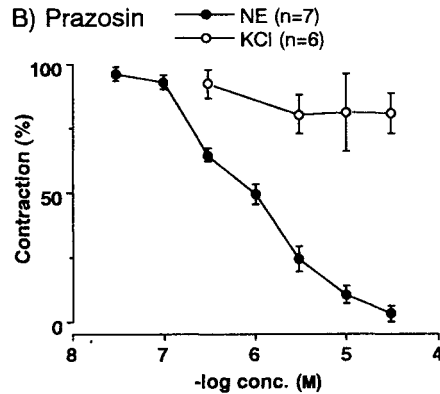
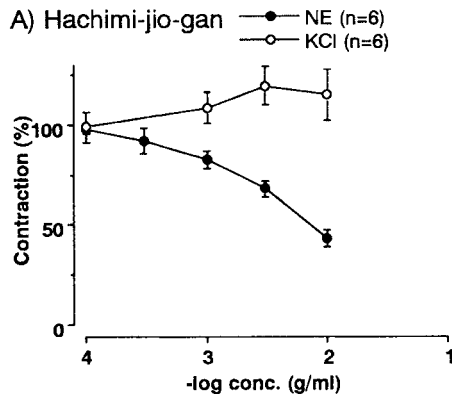


Fig. 1 Effects of Hachimi-jio-gan extract (A), prazosin (B), verapamil (C) and papaverine (D) on the contraction of isolated rat urethral smooth muscle induced by norepinephrine (NE, ●) and KCl (○). Contractions are expressed as percentages of the contraction induced by NE (10^{-4} M) and KCl (10^{-1} M) before adding test drugs. Each point represents the mean±S.E.

2. 尿道平滑筋のNE 累積添加による収縮に対する作用

尿道平滑筋標本にNEを 10^{-6} ~ 10^{-3} Mの濃度範囲で累積添加すると、濃度依存的な収縮反応が認められた。薬物非存在下 (control) の場合と一定濃度の薬物存在下の場合とでNE濃度-収縮反応曲線を比較すると、八味地黄丸 10^{-3} g/ml存在下ではNEによる曲線はcontrolと比較して変化がなかった (Fig. 2A)。しかし、八味地黄丸 3×10^{-3} g/mlおよび 10^{-2} g/ml存在下では、NEによる濃度依存的な収縮反応は認められたものの、最大収縮反応はcontrolのそれぞれ80%および59%にまで減少した (Fig. 2B, 2C)。プラゾシン 10^{-7} M存在下では、NEによる最大収縮反応はほとんど変化することなく、曲線は右方に移動した (Fig. 3A)。一方、パパペリン 10^{-6} M存在下では、NEによる濃度依存的な収縮反応は認められたものの、最大収縮反応はcontrolの57%にまで減少した (Fig. 3B)。

3. 尿道平滑筋のNE収縮に対する生薬単味エキスの作用

作用

八味地黄丸の構成生薬の各単味エキスについて、尿道平滑筋のNE収縮に対する作用を検討した。8生薬のうち

Table II Inhibitory concentrations (IC_{50}) and yield of Hachimi-jio-gan extract and crude drug extracts against the contraction of isolated rat urethral smooth muscle induced by NE (10^{-4} M).

Crude drug	IC_{50} (g/ml)	Yield (%) *
Rehmanniae Radix (地黄)	$>10^{-2}$	54.4
Corni Fructus (山茱萸)	5.6×10^{-3}	50.9
Discoreae Rhizoma (山藥)	$>10^{-2}$	16.5
Alismatis Rhizoma (沢瀉)	7.6×10^{-3}	25.6
Hoelen (茯苓)	3.4×10^{-3}	1.6
Moutan Cortex (牡丹皮)	2.5×10^{-3}	11.8
Cinnamomi Cortex (桂皮)	2.9×10^{-3}	22.7
Aconiti Tuber (附子)	$>10^{-2}$	79.9
Hachimi-jio-gan (八味地黄丸)	6.0×10^{-3}	23.6

* Yield : w/w % extracted with boiling water.

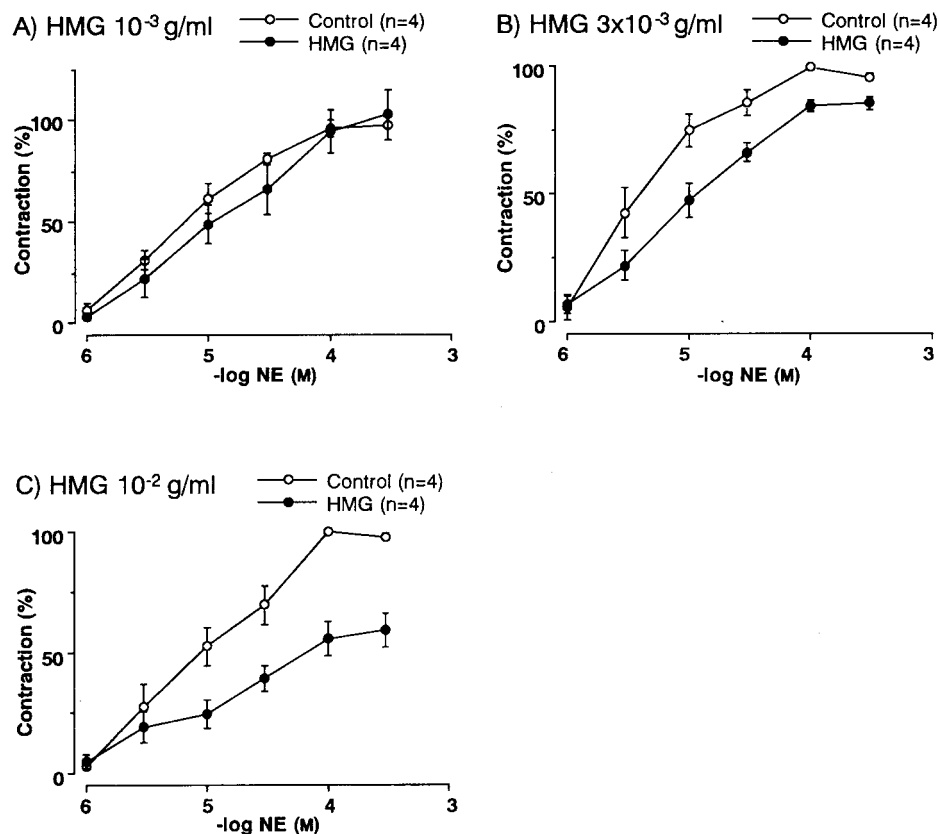


Fig. 2 Concentration-response curves for the contraction of isolated rat urethral smooth muscle induced by cumulatively increasing concentrations of NE in the presence of Hachimi-jio-gan (HMG) extract (10^{-3} g/ml : A, 3×10^{-3} g/ml : B, 10^{-2} g/ml : C). Contractions are expressed as percentages of the maximum contraction induced by NE. Each point represents the mean $\pm$ S.E.

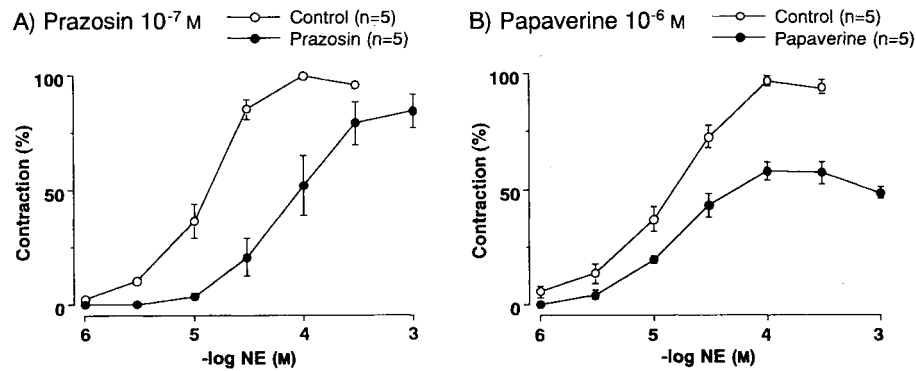


Fig. 3 Concentration-response curves for the contraction of isolated rat urethral smooth muscle induced by cumulatively increasing concentrations of NE in presence of prazosin (10^{-7} M: A) and papaverine (10^{-6} M: B). Contractions are expressed as percentages of the maximum contraction induced by NE. Each point represents the mean $\pm$ S.E.

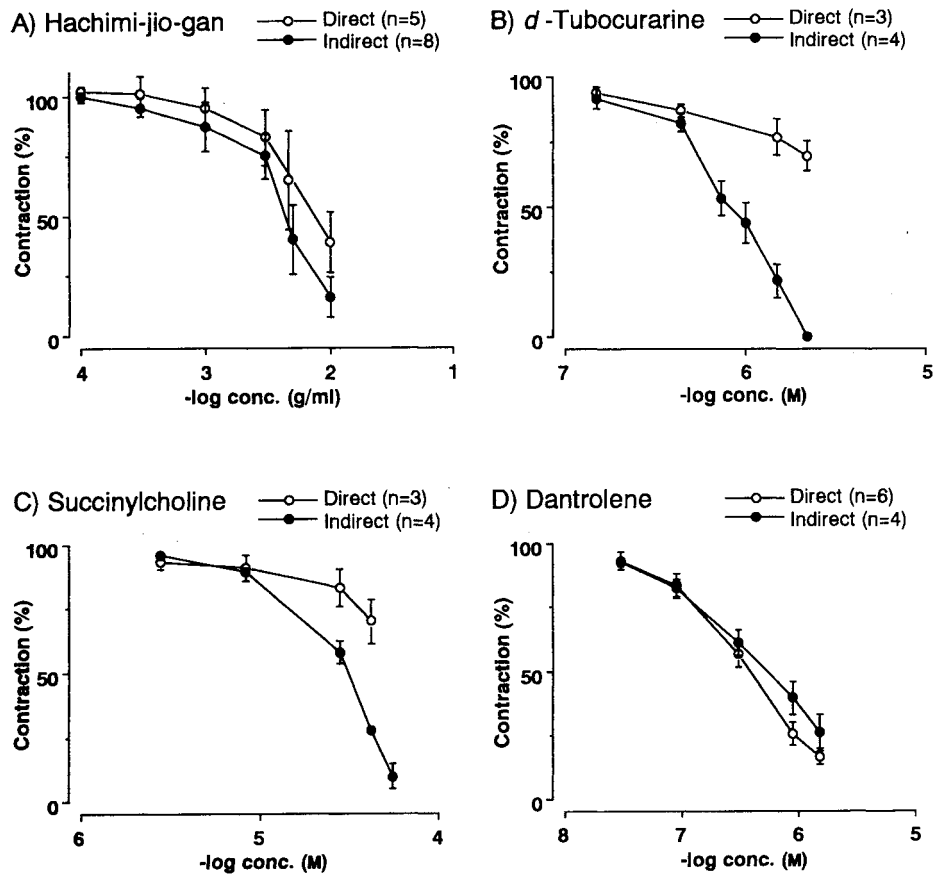


Fig. 4 Effects of Hachimi-jio-gan extract (A), *d*-tubocurarine (B), succinylcholine (C) and dantrolene (D) on the contraction of phrenic nerve-diaphragm preparation induced by electric stimulation of diaphragm (Direct, $\circ$) and phrenic nerve (Indirect, $\bullet$). Contractions are expressed as percentages of the twitch tension induced by electric stimulation before adding test drugs. Each point represents the mean $\pm$ S.E.

ち、地黄、山薬および附子エキスは最高濃度の 10^{-2} g/ml においても、50 % 以上の収縮抑制作用を示さなかった。一方、山茱萸、沢瀉、茯苓、牡丹皮および桂皮エキスは、

$3 \times 10^{-4} \sim 10^{-2}$ g/ml で濃度依存的な抑制作用を示した。なお、各エキスの NE 収縮に対する IC_{50} 値およびエキス収率を Table II に示した。

Table III Inhibitory concentrations (IC_{50}) of Hachimi-jio-gan extract and other drugs against the contraction of phrenic nerve-diaphragm preparation induced by electric stimulation of diaphragm (Direct) and phrenic nerve (Indirect).

Drug	IC_{50}		Recovery by neostigmine*
	Direct	Indirect	
Hachimi-jio-gan	8.3×10^{-3}	4.0×10^{-3} (g/ml)	—
<i>d</i> -Tubocurarine	$> 2.2 \times 10^{-6}$	8.1×10^{-7} (M)	+
Succinylcholine	$> 5.5 \times 10^{-5}$	2.5×10^{-5} (M)	—
Dantrolene	3.6×10^{-7}	4.8×10^{-7} (M)	—

*+ : Contraction was recovered by neostigmine (1.6×10^{-5} M).

— : Contraction was not recovered by neostigmine.

4. 横隔膜神経筋標本の電気刺激による収縮に対する作用

横隔膜神経筋標本において、筋に直接、あるいは神経を介して間接的に電気刺激を与えると単収縮が発生した。八味地黄丸は直接刺激、間接刺激のいずれによる収縮に対しても $10^{-3} \sim 10^{-2}$ g/ml で濃度依存的な抑制作用を示した (Fig. 4A)。なお、八味地黄丸により抑制された収縮は、ネオスチグミン 1.6×10^{-6} M の添加によって回復しなかった (データは示していない)。*d*-ツボクラリンは $4.4 \times 10^{-7} \sim 2.2 \times 10^{-6}$ M で間接刺激による収縮に対して濃度依存的な抑制作用を示したが、直接刺激による収縮に対しては明らかな影響を及ぼさなかった (Fig. 4B)。また、*d*-ツボクラリンにより抑制された収縮は、ネオスチグミンの添加によって回復した。同様に、サクシニルコリンは $8.3 \times 10^{-6} \sim 5.5 \times 10^{-5}$ M で間接刺激による収縮に対して濃度依存的な抑制作用を示したが、直接刺激による収縮に対しては明らかな影響を及ぼさなかった (Fig. 4C)。また、サクシニルコリンにより抑制された収縮はネオスチグミンの添加によって回復しなかった。一方、ダントロレンは $3 \times 10^{-8} \sim 1.5 \times 10^{-6}$ M で直接刺激および間接刺激による収縮の両方を抑制した (Fig. 4D)。また、ダントロレンにより抑制された収縮はネオスチグミンの添加によって回復しなかった。なお、各薬物の IC_{50} 値およびネオスチグミン添加による収縮の回復の有無を Table III に示した。

考 察

今回の検討で、八味地黄丸は尿道平滑筋の NE による収縮に対しては濃度依存的な抑制作用を示したが、高濃度 KCl による収縮に対しては影響を及ぼさなかった。尿道平滑筋の NE による収縮は、アドレナリン α_1 受容体を介して受容体制御 Ca^{2+} チャンネルが開口し、細胞外

Ca^{2+} が細胞内に流入することによって起こると考えられている。一方、高濃度 KCl 添加による収縮は、細胞外 K^+ 濃度の上昇により膜の脱分極が引き起こされ、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが開口して細胞外 Ca^{2+} が細胞内に流入することによって起こると考えられている。今回の検討でも、 α_1 受容体遮断薬であるプラゾシンは、尿道平滑筋の NE 収縮を抑制したが、KCl 収縮に対しては影響を及ぼさなかった。一方、 Ca^{2+} 拮抗薬ベラパミルは電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを阻害することが知られており、¹³⁾ プラゾシンとは反対に NE 収縮には明らかな影響を及ぼさず、KCl 収縮を抑制した。パパベリンは、ホスホジエステラーゼ阻害に基づく細胞内 cAMP 濃度上昇作用などにより非特異的に平滑筋弛緩作用を示すことが知られており、¹⁴⁾ 今回の検討においても、NE 収縮および KCl 収縮の両方に対して抑制作用を示した。これらのことから、八味地黄丸は尿道平滑筋においては、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した筋収縮には作用せずに、 α_1 受容体を介した筋収縮を抑制すると考えられる。

次に、これらの薬物を一定濃度で存在させた条件下で NE を累積添加し、尿道平滑筋の NE 濃度-収縮反応曲線を薬物非処置の場合と比較した。その結果、プラゾシン存在下では NE による最大収縮反応はほとんど変化することなく、曲線は右方に移動した。このことから、尿道平滑筋の NE 収縮に対するプラゾシンの抑制作用は α_1 受容体における競合的拮抗作用¹⁵⁾ であることが確認された。一方、パパベリン存在下では NE による濃度依存的な収縮反応は認められたものの、最大収縮反応は減少した。従って、パパベリンの NE 収縮に対する抑制作用は α_1 受容体以降での非競合的拮抗作用¹⁴⁾ であることが確認された。同様に、八味地黄丸の存在下では NE による濃度依存的な収縮反応は認められたものの、最大収縮反応は減少した。このことから、八味地黄丸の NE 収縮に対する抑制作用は非競合的拮抗作用であると考え

られる。

次に、八味地黄丸の尿道平滑筋に対する収縮抑制作用における個々の構成生薬の関与について調べるため、尿道平滑筋のNE収縮に対する各生薬単味エキスの作用を検討した。その結果、地黄、山薬および附子エキスは尿道平滑筋のNE収縮に対して作用を示さなかったが、山茱萸、沢瀉、茯苓、牡丹皮および桂皮エキスは抑制作用を示した。このことから、八味地黄丸の作用には少なくともこれら5生薬の成分が関与していると推察される。ただし、例えば茯苓はエキス収率が低く、また桂皮は処方中の配合比が低いなど、これらの生薬のエキス収率や処方中の配合比はそれぞれ異なる。また、生薬を単味で抽出した場合と、複数の生薬を混合して抽出した場合とでは、それぞれの収率が異なることも考えられる。従って、単味エキスで作用を示したこれらの生薬が、それぞれ八味地黄丸の作用に実際にどの程度関与しているかは、今回の結果だけでは不明である。

外尿道括約筋のモデルとして横隔膜神経筋標本を用い、電気刺激による収縮に対する作用を調べた検討では、八味地黄丸は筋直接刺激および神経を介する間接刺激による収縮の両方を濃度依存的に抑制した。また、八味地黄丸により抑制された収縮は、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬であるネオスチグミンの添加によって回復しなかった。神経-筋接合部のアセチルコリン受容体における競合的遮断薬であるd-ツボクラリンは、直接刺激による収縮に対しては影響を及ぼさなかったが、間接刺激による収縮に対しては抑制作用を示した。また、d-ツボクラリンによって抑制された収縮はネオスチグミンの添加によって回復した。脱分極性筋弛緩薬であるサクシニルコリンも同様に、直接刺激による収縮に対しては影響を及ぼさずに、間接刺激による収縮を抑制したが、サクシニルコリンにより抑制された収縮はネオスチグミンの添加によって回復しなかった。一方、筋小胞体からのCa²⁺遊離を抑制することによって骨格筋弛緩作用を示すダントロレン¹⁶⁾は、直接刺激による収縮および間接刺激による収縮の両方を抑制した。また、ダントロレンにより抑制された収縮はネオスチグミンの添加によって回復しなかった。これらのことから、八味地黄丸は骨格筋に対してはダントロレンに類似した弛緩作用を示し、その作用部位は神経筋接合部のアセチルコリン受容体以降の過程であると推察される。

以上の結果から、八味地黄丸は下部尿路系において、尿道平滑筋に対しては交感神経の α_1 受容体を介した収縮を非競合的に抑制するとともに、外尿道括約筋に対しては筋に直接作用して弛緩させ、排尿障害を改善すると考えられる。今回は尿道平滑筋および骨格筋の摘出標本

を用いて八味地黄丸の作用を検討したが、下部尿路系の機能に対する効果を明らかにするにはこれらの検討だけでは不十分である。今後は更に生体位尿道内圧に対する作用¹⁷⁾や、頻尿モデル動物に対する作用^{18,19)}など、*in vivo*での検討を行う必要性がある。

References

- 1) Kimura, M. and Kimura, I.: Kafun no yakuri (花粉の薬理). *The Journal of Medicine* (医学と薬学) **15** (2), 521-532, 1986.
- 2) Kleeman, F.J.: The physiology of the internal urinary sphincter. *J. Urol.* **104**, 549-554, 1970.
- 3) Hieble, J.P., McCafferty, G.P., Naselsky, D.P., Bergsma, D.J. and Ruffolo, R.R.: Recent progress in the pharmacotherapy of diseases of the lower urinary tract. *Eur. J. Med. Chem.* **30** (Suppl), 269s-298s, 1995.
- 4) Kanimoto, Y. and Okada, K.: Antiandrogen therapy of benign prostatic hyperplasia. *Acta Urol. Jpn.* (泌尿器科紀要) **37**, 1423-1428, 1991.
- 5) Tokunaga, S.: Kampo-therapy for benign prostatic hyperplasia. *The Journal of Traditional Sino-Japanese Medicine* (現代東洋医学) **15** (1), 31-36, 1994.
- 6) Yamauchi, A., Kato, M., Igarashi, K., Koyama, Y. and Yokokawa, M.: Treatment of benign prostatic hyperplasia with Hachimijiogan. *The Nishinippon Journal of Urology* (西日本泌尿器科) **44** (2), 227-233, 1982.
- 7) Mikata, R.: Zenritsusenidaishou ni taisuru Hachimi-jio-gan ryo ekisu jou no shiyoukeiken (前立腺肥大症に対する八味地黄丸料エキス錠の使用経験). *Medical Consultation and New Remedies* (診療と新薬) **28** (12), 177-180, 1991.
- 8) Sukamoto, T., Ito, K. and Nose, T.: Hachimi-jio-gan ekisu no boukou ni taisuru sayou (八味地黄丸エキスの膀胱に対する作用). *The Clinical Report* (基礎と臨床) **16** (6), 179-185, 1982.
- 9) Yoshimura, N., Sasa, M., Yoshida, O. and Takaori, S.: Inhibitory effects of Hachimijiogan on micturition reflex via the locus coeruleus. *Folia Pharmacol. Jpn.* **99**, 161-166, 1992.
- 10) Nakase, K., Takenaga, K., Hamanaka, T. and Kimura, M.: Inhibitory effect and synergism of cernitin pollen extract on the urethral smooth muscle and diaphragm of the rat. *Folia Pharmacol. Jpn.* **91**, 385-392, 1988.
- 11) Watanabe, K., Hayashi, Y., Ikeda, K. and Ohnishi, H.: Effect of moxisylyte on the lower urinary tracts (1). Effect on the isolated rabbit urethra and bladder. *Folia Pharmacol. Jpn.* **97**, 145-151, 1991.
- 12) Bülling, E.: Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **1**, 38-61, 1946.
- 13) Kaufmann, R., Tritthart, H., Rost, B. and Fleckenstein, A.: Complete excitation-contraction uncoupling on in vitro-cultured embryonic chicken heart cells by isoptin (verapamil, iproveratril). *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **316**, R12, 1970.
- 14) Brading, A. F., Burdya, V. and Scripnuk, Z.D.: The effects of papaverine on the electrical and mechanical activity of the guinea-pig ureter. *J. Physiol.* **334**, 79-89, 1983.
- 15) Hatano, A., Takahashi, H., Tamaki, M., Komeyama, T., Koizumi, T. and Takeda, M.: Pharmacological evidence of distinct α_1 -adrenoceptor subtypes mediating the contraction of human prostatic urethra and peripheral artery. *Br. J. Pharmacol.* **113**, 723-728, 1994.

- 16) Røed, A. : Effects of dantrolene on twitch and tetanic contractions of the rat phrenic nerve-diaphragm preparation. *Arch.Int. Pharmacodyn.* **297**, 260-271, 1989.
- 17) Watanabe, K., Hayashi, Y., Ikeda, K. and Ohnishi, H. : Effect of moxisylyte on the lower urinary tracts (2). Effect on the urethra in anesthetized dogs. *Folia Pharmacol. Jpn.* **97**, 153-165, 1991.
- 18) Yaksh, T.L., Durant, P.A.C. and Brent, C.R. : Micturition in rats : a chronic model for study of bladder function and effect of anesthetics. *Am. J. Physiol.* **251**, R1177-R1185, 1986.
- 19) Kontani, H., Nakagawa, M. and Sakai, T. : Effects of adrenergic agonists on an experimental urinary incontinence model in anesthetized rabbits. *Jpn. J. Pharmacol.* **58**, 339-346, 1992.