

原著

昭和学士会雑誌 第75巻 第3号（平成27年6月）掲載予定

円皮鍼はラット社会的孤立ストレスモデルにおけるオレキシン A
分泌促進を抑制する

1) 昭和大学医学部生理学講座生体制御学部門

2) 筑波技術大学保健科学部附属東西医学統合医療センター

福島 正也^{1,2)} 砂川 正隆¹⁾ 片平 治人¹⁾ 渡辺 大士¹⁾

草柳 肇¹⁾ 小林 喜之¹⁾ 樋口 毅史¹⁾ 久光 直子¹⁾

久光 正¹⁾

ランニングタイトル：

社会的孤立ストレスに対する円皮鍼の効果

連絡先

砂川正隆

昭和大学医学部生理学講座生体制御学部門

email: suna@med.showa-u.ac.jp

phone: 03-3784-8110

抄録:

【目的】円皮鍼は鍼治療に用いられる鍼の一種で、1mm 前後の極めて短い鍼を絆創膏で皮膚に留置することによって、種々の生体の反応を引き出す。本研究では、ラット社会的孤立ストレスモデルを用い、ストレスに対する円皮鍼の効果を調べ、作用機序の検討としてオレキシン神経系の関与を検討した。

【方法】8 週齢 Wistar 系雄性ラットを使用し、コントロール群 (Con 群)、ストレスモデルにシャム鍼を貼付した群 (Sham 群)、ストレスモデルに円皮鍼を貼付した群 (PTN 群) の 3 群に分けた。社会的孤立ストレスモデルは 8 日間単独で飼育することで作製した。Con 群は 1 ケージに 3~4 匹で飼育した。ストレス負荷 7 日目、PTN 群と Sham 群には百会穴相当部への円皮鍼 (パイオネックス®, セイリン社製) またはシャム鍼を貼付した。ストレス評価として、嘔みつき行動時間の測定 (7 日目と 8 日目) と、EIA 法にて血漿コルチコステロンの測定を行った。また、オレキシン神経系の関与を検討するために、EIA 法にて血漿オレキシン A 濃度を測定し、外側視床下部におけるオレキシンニューロンの変化を組織学的に検討した。

【結果】ストレス負荷 8 日目、10 分間の嘔みつき行動時間は、Sham 群 (460.2 ± 24.2 秒) に対し、PTN 群 (263.3 ± 53.7 秒) で有意に抑制された ($p < 0.01$)。血漿コルチコステロン濃度は、Con 群 (44.0 ± 8.2 ng/ml) に対し Sham 群 (128.6 ± 26.4 ng/ml) では有意に増加したが、PTN 群 (73.5 ± 8.9 ng/ml) ではその増加が有意に抑制された ($P < 0.05$)。血漿オレキシン A 濃度は、Con 群 (0.17 ± 0.01 ng/ml) に対し Sham 群 (0.36 ± 0.04 ng/ml) では有意に増加したが、PTN 群 (0.23 ± 0.03 ng/ml) ではその増加が有意に抑制された

($P < 0.05$). 外側視床下部におけるオレキシン A の発現も Con 群 (26.88 ± 3.03 Optical Density: OD) に対し Sham 群 (80.89 ± 6.03 OD) では有意に上昇したが, PTN 群 (49.87 ± 1.84 OD) ではその上昇が有意に抑制された.

【考察】百会穴への円皮鍼治療は, ラット社会的孤立ストレスモデルにおけるストレス反応を抑制し, 視床下部オレキシンニューロンの活性を抑制した. ストレスによる交感神経系や内分泌系の興奮に視床下部オレキシン神経系が関与することが報告されている. 円皮鍼治療はオレキシン神経系を抑制することにより, ストレス反応を抑制したと考えられる.

キーワード: 円皮鍼, 鍼治療, 社会的孤立ストレス,
オレキシン A, コルチコステロン

わが国における調査では、約 6 割の人が日常生活の中でストレスを感じており、その原因としては仕事や収入のほか、職場や学校における人間関係、家族関係、親戚や近所付き合いなどの人間関係によるものも多い¹⁾。ストレスは、不安や緊張、怒りなどの不快な心理的变化をもたらすとともに、身体的変化や行動変化をもたらし、うつ病や不安障害などの精神疾患のほか、自律神経系や内分泌系、免疫系にも影響を与え、様々な疾患の発症や増悪に関与する。

東洋医学において鍼治療は、様々な疾病や愁訴の治療に利用されており、不安障害、抑うつ、双極性障害、統合失調症、薬物依存症、摂食障害、睡眠障害などの精神的要因の関連する症状にも適応されている²⁾。治療用鍼のひとつである円皮鍼は、1mm 前後の極めて短い鍼で、絆創膏で皮膚に留置し、筋痛や筋疲労、月経痛、睡眠障害、透析患者の身体愁訴に対する有効性が報告されている³⁾。抗ストレス作用に関するヒトの研究では、ストレス負荷による精神性発汗や唾液 α -アミラーゼの分泌促進を円皮鍼が抑制することが報告されているが^{4,5)}、その機序に関する報告はまだない。

各種ストレッサーが、視床下部－下垂体－副腎皮質系 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA axis) ならび視床下部－交感神経－副腎髄質系 (sympathetic-adrenal-medullary axis: SAM axis) を介し、ストレス反応をもたらすことはよく知られており⁶⁾、動物実験で、各種ストレス負荷によって誘発されるストレス行動や HPA ならび SAM axis の失調が鍼治療によってコントロールされることは数多く報告されている⁶⁻¹⁰⁾。

近年、オレキシンが HPA ならび SAM axis の制御に関与していることが報告されている¹¹⁻¹³⁾。オレキシンは神経ペプチドの一種で、

同一の前駆体であるプレプロオレキシンからオレキシンAとオレキシンBの2種類が合成される。オレキシンニューロンは視床下部外側野 (lateral hypothalamic area: LHA) および脳弓周囲 (perifornix: PF) に局在するが、その軸索は小脳を除く中枢神経系全域に分布し¹⁴⁾、摂食行動や覚醒反応ほか様々な生理活性の制御に関与している¹³⁾。鍼とオレキシンとの関連については、オレキシンAは鎮痛に関与しており、電気鍼はオレキシンの分泌を介して鎮痛作用をもたらすこと¹⁵⁾、またオレキシンAは呼吸の制御にも関係しており、慢性閉塞性肺疾患において電気鍼は、オレキシン分泌の上昇を抑制することによって肺の機能を改善させること¹⁶⁾が報告されているだけで、ストレスコントロールに関する報告はない。

本研究では、ラット社会的孤立ストレスモデルを用い、精神的ストレスに対する円皮鍼の効果を調べ、この作用機序の検討としてオレキシンAの分泌ならび視床下部におけるオレキシンニューロンの変化を調べた。

研究方法

1. 実験動物

8週齢 (体重 250~300g) の雄性 Wistar 系ラット (日本生物材料センター, 東京) を用い、コントロール (Con) 群, ストレスモデルにシャム鍼を貼付した群 (Sham 群), ストレスモデルに円皮鍼を貼付した群 (Press tack needle; PTN 群) の3群に分けた。水および飼料 (CE-2; 日本クレア, 東京) は自由摂取とし、12時間

ごとの明暗サイクルで飼育し、飼育室は室温 25 ± 1 度、湿度 $55 \pm 5\%$ に設定した。本実験は昭和大学動物実験委員会の承認の下（承認番号 04022）、昭和大学動物実験実施指針を遵守して行った。

2. 社会的孤立ストレスモデル

本モデルは精神的ストレスモデルのひとつで、慢性的な軽度ストレスモデルとして用いられており¹⁷⁻¹⁹⁾、本来集団生活を営む動物を単独飼育することによりストレス負荷し作製する。Sham 群と PTN 群は、8 日間 1 ケージ ($26 \times 26 \times 18\text{cm}$) に 1 匹で飼育した。Con 群は、1 ケージ ($24 \times 40 \times 20\text{cm}$) あたり 3~4 匹のグループで飼育した。

3. 円皮鍼治療

ストレス負荷 7 日目、PTN 群はペントバルビタール浅麻酔下 (30mg/kg i.p. ソムノペンチル®; 共立製薬, 東京) に、頭頂部周囲の剃毛を行い、頭頂部 (百会穴相当部) (Fig.1a) への円皮鍼 (Fig.1b) (長さ 1.2mm , 直径 0.2mm . パイオネックス®; セイリン, 静岡) を貼付した。Sham 群は同様の方法で、シャム鍼 (鍼を取り除いた絆創膏のみ) を貼付した。

4. 抗ストレス作用の評価

1) 行動の評価 (噛みつき行動時間の測定)

本モデル動物は攻撃性が増すことが知られている¹⁸⁾。攻撃性の評価として、ケージ内へ木の棒 (直径 5mm , 長さ 20cm) を差し出し、10 分間のうちに噛みつき行動を示す時間を測定した。測定は Con

群 (n=6), Sham 群 (n=10) と PTN 群 (n=10) において, ストレス負荷 7 日目の円皮鍼貼付前と 8 日目の 12~15 時の時間帯に行った。

2) 生化学的評価 (血漿コルチコステロン濃度の測定)

精神的ストレスの指標として, Con 群 (n=6), Sham 群 (n=8), PTN 群 (n=11) の血漿コルチコステロン (CORT) 濃度を測定した^{6,7)}。ストレス負荷 8 日目, ペントバルビタール深麻酔下 (50mg/kg i.p.) に下大静脈から採血を行い, 血漿を分離した。測定用キット (ADI-900-097; Enzo Life Sciences, NY, USA) を用い EIA 法にて測定した。

5. オレキシン神経系への作用の評価

1) 血漿オレキシン A 濃度の測定

CORT 同様, ストレス負荷 8 日目に採取した血液を用い, Con 群 (n=8), Sham 群 (n=12), PTN 群 (n=12) の血漿オレキシン A 濃度を測定した。測定には, オレキシン A 測定用 EIA キット (EKE-003-30; Phoenix Pharmaceuticals, CA, USA) を用いた。

2) 視床下部オレキシンニューロンの組織学的検討

Con 群 (n=5), Sham 群 (n=5), PTN 群 (n=5) を用い, 通法により蛍光免疫染色を行った。ストレス負荷 8 日目, ペントバルビタール深麻酔下 (50mg/kg i.p.) に PBS ならび固定液 (4%パラホルムアルデヒド) で灌流固定した後, 脳を摘出した。視床下部の凍結切片 (20 μ m) を作製し, 10%ヤギ血清 (S-1000; VECTOR LABORATORIES, CA, USA) でブロッキングした後, 一次抗体 (4 $^{\circ}$ C,

overnight) (1:100. Anti-Orexin A Rabbit Antibody; Calbiochem, CA, USA), 二次抗体 (室温, 2 時間) (1:1000. Alexa Fluor® 555 Donkey Anti-Rabbit Antibody, Life Technologies, CA, USA) と反応させた. 最後に 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI) (室温, 10 分) (1:2000. Life Technologies) にて核染色を行い, 退色防止用封入剤 (H-1000; VECTOR LABORATORIES) を用い封入した. 共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV1000D ; オリンパス, 東京) にて観察し, オレキシン A の発現量は専用ソフトウェア (FV10-AW; オリンパス) を用い, 同一エリア内 (1200×1200µm) の光学密度を測定した.

6. 統計学的処理

全ての実験結果は平均±標準誤差で示し, Fisher's PLSD による多重比較検定を行った. 有意水準は 5%未満とした.

結果

1. 抗ストレス作用の評価

1) 噛みつき行動時間

7 日間の孤立ストレス負荷を受けた動物は, Con 群 (8.2±2.4 秒) と比較し, 有意に噛みつき行動を示すようになった. 7 日目 (鍼貼付前), Sham 群 (454.8±25.1 秒) と PTN 群 (460.9±26.1 秒) とでその時間に差がなかったが, 8 日目 (鍼貼付後 1 日) では, Sham 群 (460.2±24.2 秒) に対し PTN 群 (263.3±53.7 秒) では噛みつ

き行動時間が有意に減少した ($P<0.01$) (Fig.2a). Con 群 (8.3 ± 0.4 秒) と比べれば完全な抑制とは言えないものの, 円皮鍼によってストレス負荷による興奮性が抑制された.

2) 血漿コルチコステロン濃度

ストレス負荷 8 日目の血漿 CORT 濃度は, Con 群 (44.0 ± 8.2 ng/ml) に対し Sham 群 (128.6 ± 26.4 ng/ml) では有意に上昇したが ($P<0.01$), PTN 群 (73.5 ± 8.9 ng/ml) ではその上昇が有意に抑制された ($P<0.05$) (Fig.2b). Con 群と PTN 群とでは有意差はなかった. 円皮鍼によってストレス負荷による血漿 CORT 濃度の上昇が抑制された.

2. オレキシン神経系への作用の評価

1) 血漿オレキシン A 濃度

ストレス負荷 8 日目の血漿オレキシン A 濃度は, Con 群 (0.17 ± 0.01 ng/ml) に対し Sham 群 (0.36 ± 0.04 ng/ml) では有意に上昇したが ($P<0.01$), PTN 群 (0.23 ± 0.03 ng/ml) ではその上昇が有意に抑制された ($P<0.05$) (Fig.3a). Con 群と PTN 群とでは有意差はなかった. 円皮鍼によってストレス負荷による血漿オレキシン A 濃度の上昇が抑制された.

2) 視床下部オレキシンニューロン

ストレス負荷 8 日目, オレキシン A 抗体を用い, オレキシンニューロンの局在する視床下部の免疫染色を行った. 結果は, オレキシン A の発現量を専用ソフトウェア (FV10-AW ; オリンパス) によ

って測定した光学密度 (optical density : OD) で示した. Con 群 (26.88±3.03 OD) に対し Sham 群 (80.89±6.03 OD) では有意に上昇したが (P<0.01), PTN 群 (49.87±1.84 OD) ではその上昇が有意に抑制された (P<0.01) (Fig.3b). ストレス負荷による視床下部におけるオレキシニン A の分泌亢進が, 百会穴への円皮鍼治療によって抑制された. 代表的な組織像を Fig.3c に示す.

考察

ラット社会的孤立ストレスモデルを用い, 円皮鍼の抗ストレス作用を検証した. 本モデル動物は, 人間社会における社会的交流の欠如を想定した精神的ストレスモデルとして用いられており, 症状として副腎肥大や血漿副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)・CORT・カテコールアミン分泌の増加¹⁷⁾, 攻撃性の上昇¹⁸⁾, 自発運動の亢進¹⁹⁾などが生じるが, 本研究では攻撃性ならび血漿 CORT 濃度の変化を調べた. 社会的孤立ストレスによる攻撃性 (噛みつき行動時間) の上昇ならび CORT 分泌の増加は, 百会穴への円皮鍼によって有意に抑制された (Fig.2). これまでも, 慢性寒冷ストレスモデルに対する足三里穴への電気鍼⁶⁾や, 母子分離ストレスモデルに対する神門穴への撚鍼 (鍼を刺入し捻転を加える)⁷⁾など, 各種ストレスモデル動物を用いて, ストレス負荷による HPA axis の興奮が鍼によって抑制されることが報告されている. また Lee ら⁸⁾によると, CORT 慢性投与によるストレス行動や HPA axis の失調が内関穴への鍼によって抑制された. 更には, 拘束ストレスモデルに対する少海穴ならび内関穴への電気鍼⁹⁾や, 歯痛ストレスモデルに対する合谷穴へ

の電気鍼¹⁰⁾など、SAM axisの興奮によるカテコールアミンの分泌促進が鍼治療によって抑制されることも報告されている。今回用いた円皮鍼は長さ1.2mmの短い鍼で、刺激の大きさは電気鍼や捻鍼と比べると遥かに小さく、このような微弱な刺激でも全身調節機能を有することが証明された。過去には、浅刺の鍼による脳や皮膚の血流の変化^{20,21)}、浮腫の軽減²²⁾や筋皮弁の定着率の向上²³⁾などが報告されているが、抗ストレス作用に関する基礎研究の報告はこれが初めてである。

本研究では円皮鍼を頭頂部の百会穴に留置した。百会穴は、督脈（体の後正中線を流れる経絡）に属する頭頂部の経穴で、頭顔面部、五官（顔にある感覚器官）、精神神経系の病証（東洋医学で病態と症状を指し示す）を主治するとされ²⁴⁾、鍼灸臨床において精神神経系の病症などに多用される経穴である。また百会穴は円皮鍼を貼付するにあたり、ラットのグルーミングにより剥がされにくい利点があるために選んだ。臨床的には、任脈の膻中穴⁴⁾や心包経の大陵穴⁵⁾、内関穴などもストレス症状に対して頻用されているが、今後は、これらの経穴または非経穴部位への円皮鍼治療との効果の違いも検討していく。

本研究では円皮鍼の作用機序の検討としてオレキシンニューロンへの影響を検討した。オレキシンは視床下部における自律機能の調節に深くかかわっており^{12,13)}、近年、HPA axisならびSAM axisの制御にもオレキシンが関与していることが明らかになってきた¹¹⁾。ストレスモデル動物を用いた実験では、拘束ストレスや寒冷ストレス²⁵⁾、また遊泳運動ストレス²⁶⁾によってLHAのオレキシンニューロンの活性化が生じることが報告されている。そして、オレキ

シンの脳室内投与は、視床下部室傍核（Paraventricular hypothalamic nucleus: PVN）の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRF）、ACTH や CORT レベルを上昇させ²⁷⁾、全身投与では副腎皮質に直接作用し、血漿 CORT やアルドステロンレベルを上昇させる²⁸⁾。また、副腎髄質にもオレキシン受容体が存在し²⁹⁾、オレキシンがエピネフリンの分泌も促進させる³⁰⁾。以上のことからオレキシンが、HPA axis や SAM axis を介したストレス反応に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、社会的孤立ストレス負荷によって外側視床下部におけるオレキシンニューロンの活性が高まり（Fig.3b）、血漿オレキシン濃度が有意に増加したが（Fig.3a）、百会穴への円皮鍼によってこれらの変化は有意に抑制された。円皮鍼は視床下部におけるオレキシンニューロンの活性をコントロールすることによって、HPA axis や SAM axis を介したストレス反応を抑制したと考えられる。オレキシンは、摂食行動や情動行動、覚醒や睡眠、循環や呼吸、緊急反応、内分泌系、鎮痛といった種々の行動や自律機能の調節に関与している^{12,13)}。本研究で円皮鍼がオレキシン分泌に影響を与えたことから、円皮鍼はストレス反応の抑制のみならず、オレキシンの制御を介して生体のホメオスタシス機構に広く作用すると考えられる。ところで、Feng ら¹⁵⁾の報告では、開腹手術を行ったラットでは視床下部におけるオレキシンの分泌が減少したが、脚（足三里穴と三陰交穴）への電気鍼によってその低下が抑制され、鎮痛効果が得られた。これは、オレキシン分泌の上昇が抑制された本研究結果とは異なる変化であるが、鍼治療特有の中庸化作用（過不足がなく調和がとれた状態にすること）の結果と考

えられる。但し、本研究とは鍼の部位や刺激方法の違いもあり、この結果の相違を生理学的に分析することは今後の重要な課題である。

本研究より、精神的ストレスによる交感神経系や内分泌系の興奮に視床下部におけるオレキシンの分泌亢進が関与しており、円皮鍼治療はオレキシン分泌を制御することにより、各種ストレス反応を抑制すると考えられる。

利益相反

本研究に関して、開示すべき利益相反はない。

文献

- 1) 内閣府. 2.ストレス社会と現代的病理. 平成 20 年版国民生活白書. 2008. pp63-69.
- 2) Pilkington K. Acupuncture therapy for psychiatric illness. *Int Rev Neurobiol.* 2013;111:197-216.
- 3) 片山憲史. 円皮鍼に関する基礎と臨床応用について. 鍼灸 OSAKA. 2009; 24:399-405.
- 4) 中橋舞, 小倉智恵, 中園利夫. 円皮鍼による唾液アミラーゼに及ぼす影響. *東洋療学協会誌.* 2009;33:56-58.
- 5) 山口真佐美, 久保俊光, 田口辰樹. 鍼刺激が精神性発汗に及ぼす影響について. *東洋療学協会誌.* 2009;33:162-166.
- 6) Eshkevari L, Permaul E, Mulroney SE. Acupuncture blocks cold stress-induced increases in the

- hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the rat. *J Endocrinol.* 2013;217:95-104.
- 7) Park HJ, Park HJ, Chae Y, et al. Effect of acupuncture on hypothalamic-pituitary-adrenal system in maternal separation rats. *Cell Mol Neurobiol.* 2011;31:1123-1127.
 - 8) Lee B, Shim I, Lee HJ, et al. Effects of acupuncture on chronic corticosterone-induced depression-like behavior and expression of neuropeptide Y in the rats. *Neurosci Lett.* 2009;453:151-156.
 - 9) Yang CH, Lee BB, Jung HS, et al. Effect of electroacupuncture on response to immobilization stress. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002;72:847-55.
 - 10) Han SH, Yoon SH, Cho YW, et al. Inhibitory effects of electroacupuncture on stress responses evoked by tooth-pulp stimulation in rats. *Physiol Behav.* 1999; 66:217-22.
 - 11) López M, Tena-Sempere M, Diéguez C. Cross-talk between orexins (hypocretins) and the neuroendocrine axes (hypothalamic-pituitary axes). *Front Neuroendocrinol.* 2010;31:113-127.
 - 12) Kuwaki T. Orexin links emotional stress to autonomic functions. *Auton Neurosci.* 2011;161:20-27.
 - 13) Messina G, Dalia C, Tafuri D, et al. Orexin-A controls sympathetic activity and eating behavior. *Front Psychol.* 2014;5:997. doi: 10.3389/fpsyg.2014.00997. eCollection 2014.

- 14) Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci.* 1998;18:9996-10015.
- 15) Feng XM, Mi WL, Xia F, et al. Involvement of spinal orexin A in the electroacupuncture analgesia in a rat model of post-laparotomy pain. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:225. doi: 10.1186/1472-6882-12-225.
- 16) Zhang XF, Zhu J, Geng WY, et al. Electroacupuncture at Feishu (BL13) and Zusanli (ST36) down-regulates the expression of orexins and their receptors in rats with chronic obstructive pulmonary disease. *J Integr Med.* 2014;12:417-24.
- 17) Miyashita T, Yamaguchi T, Motoyama K, et al. Social stress increases biopyrrins, oxidative metabolites of bilirubin, in mouse urine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;349:775-780.
- 18) Uchida N, Egashira N, Iwasaki K, et al. Yokukansan inhibits social isolation-induced aggression and methamphetamine-induced hyperlocomotion in rodents. *Biol Pharm Bull.* 2009;32:372-375.
- 19) Gentsch C, Lichtsteiner M, Frischknecht HR, et al. Isolation-induced locomotor hyperactivity and hypoalgesia in rats are prevented by handling and reversed by resocialization. *Physiol Behav.* 1988; 43:13-16.

- 20) MacPherson H, Green G, Nevado A, et al. Brain imaging of acupuncture: comparing superficial with deep needling. *Neurosci Lett*. 2008;434:144-149.
- 21) Huang T, Wang RH, Zhang WB, et al. The influence of different methods of acupuncture on skin surface perfusion. *J Tradit Chin Med*. 2012;32:40-44.
- 22) Ceccherelli F, Gagliardi G, Visentin R, et al. Effects of deep vs. superficial stimulation of acupuncture on capsaicin-induced edema. A blind controlled study in rats. *Acupunct Electrother Res*. 1998;23:125-134.
- 23) Jansen G, Lundeborg T, Samuelson UE, et al. Increased survival of ischaemic musculocutaneous flaps in rats after acupuncture. *Acta Physiol Scand*. 1989;135:555-558.
- 24) 森和, 西條一止編. 鍼灸医学大辞典. 第1版. 東京: 医歯薬出版; 2012.
- 25) Ida T, Nakahara K, Murakami T, et al. Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;270:318-323.
- 26) Chang H, Saito T, Ohiwa N, et al. Inhibitory effects of an orexin-2 receptor antagonist on orexin A- and stress-induced ACTH responses in conscious rats. *Neurosci Res*. 2007;57:462-466.
- 27) Kuru M, Ueta Y, Serino R, et al. Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport*. 2000;11:1977-1980.

- 28) Malendowicz LK, Hochol A, Ziolkowska A, et al. Prolonged orexin administration stimulates steroid-hormone secretion, acting directly on the rat adrenal gland. *Int J Mol Med.* 2001;7:401-404.
- 29) Blanco M, García-Caballero T, Fraga M, et al. Cellular localization of orexin receptors in human adrenal gland, adrenocortical adenomas and pheochromocytomas. *Regul Pept.* 2002;104:161-165.
- 30) Nemoto T, Toyoshima-Aoyama F, Ueda Y, et al. Involvement of the orexin system in adrenal sympathetic regulation. *Pharmacology.* 2013;91:250-258.

THE PRESS TACK NEEDLE DOWNREGULATES THE SECRETION OF OREXIN IN RATS SUBJECTED TO CHRONIC SOCIAL ISOLATION STRESS

Masaya FUKUSHIMA^{1,2)}, Masataka SUNAGAWA¹⁾,
Haruto KATAHIRA¹⁾, Daishi WATANABE¹⁾,
Hajime KUSAYANAGI¹⁾, Yoshiyuki KOBAYASHI¹⁾,
Takeshi HIGUCHI¹⁾, Naoko HISAMITSU¹⁾,
Tadashi HISAMITSU¹⁾

¹⁾ Department of Physiology, School of Medicine, Showa University

²⁾ Center for Integrative Medicine, Faculty of Health Sciences, Tsukuba University of Technology

Abstract

Objective: Press tack needles (PTN) are a kind of acupuncture needle. The aim was to investigate the effects of PTN treatment on social isolation stress and the involvement of orexin A in this effect.

Methods: Male rats were divided into three groups: non-stress group (Con), stress plus sham PTN treatment group (Sham) and stress plus PTN treatment group (PTN). The rats in the PTN and Sham groups were housed alone for eight days. In the PTN

group, a PTN (Pyonex, Seirin Co., Japan) was fixed on the GV 20 acupuncture point (Baihui) on day 7. We measured the stress behavior based on the time the rats spent biting a wooden stick for ten minutes on days 7 and 8 and then measured the plasma corticosterone levels on day 8. In addition, the plasma orexin A levels and morphology of the lateral hypothalamic orexin neurons were investigated on day 8.

Results: On day 8, the biting time and the plasma corticosterone levels were observed to have significantly increased in the Sham group versus the Con group, although these increases were inhibited in the PTN group. Furthermore, the plasma orexin A levels and the number of hypothalamic orexin neurons were significantly increased in the Sham group versus the Con group; these increases were also inhibited in the PTN group.

Conclusions: PTN may inhibit the response to social isolation stress. The inhibitory effects of the secretion of hypothalamic orexin may be one of the mechanisms underlying this phenomenon.

Key words:

Press tack needle

acupuncture

social isolation stress

orexin A

corticosterone

a. Press tack needle (Pyonex®) on Baihui (GV20)



b. Press tack needle (PTN) and Sham PTN

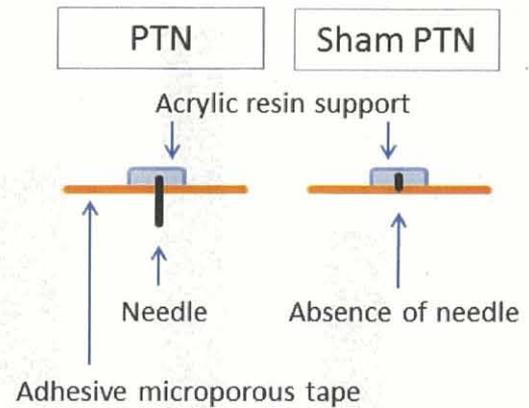


Fig.1 Press tack needle (PTN)

(a) PTN (Pyonex®, length of 1.2mm, Seirin Co., Japan) was fixed on the GV 20 acupuncture point (Baihui). (b) Structures of PTN and sham PTN. Sham PTN: the needle element had been removed.

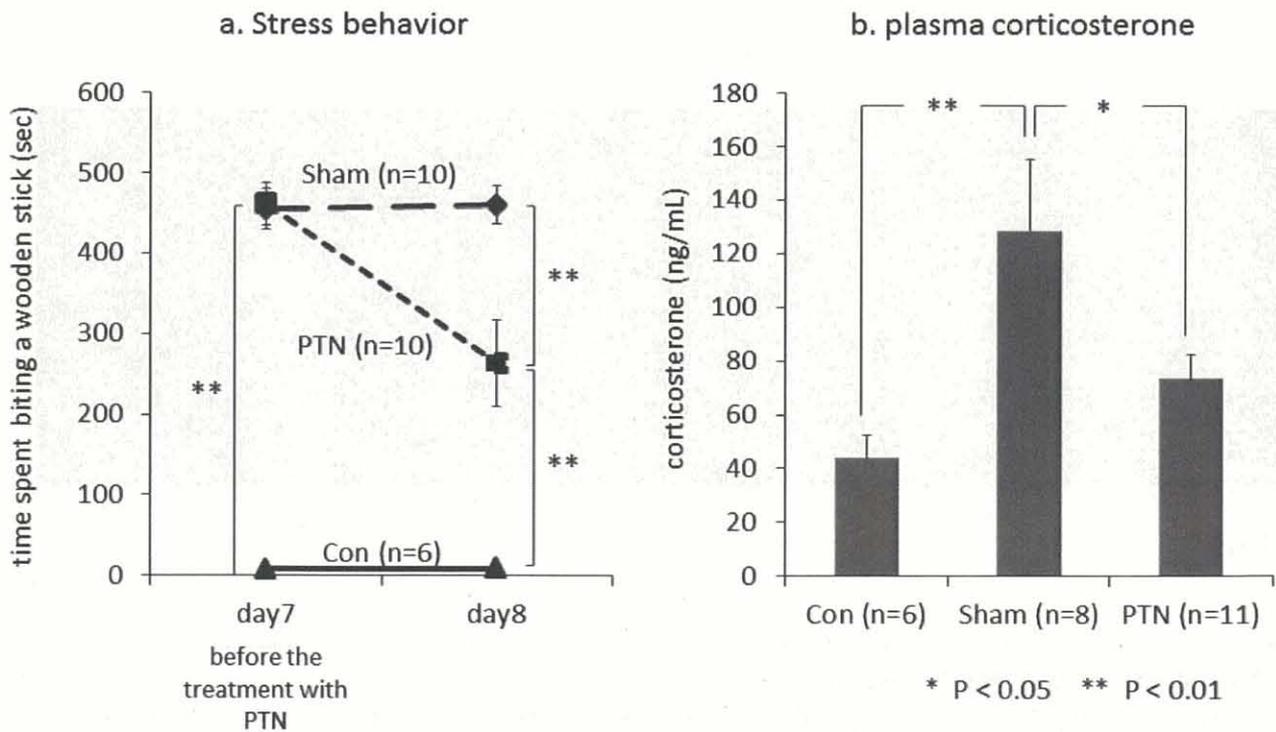


Fig.2 The effects of PTN in rats subjected to chronic social isolation stress

Con (non-stress group), Sham (stress plus sham PTN treatment group) and PTN (stress plus PTN treatment group). (a) Stress behavior: the time the rats spent biting a wooden stick for ten minutes was measured. The time was significantly inhibited in the PTN group versus the Sham group on day 8 (**P<0.01). (b) The plasma corticosterone levels were significantly increased in the Sham group versus the Con group (**P<0.01), although this increase was inhibited in the PTN group (*P<0.05).

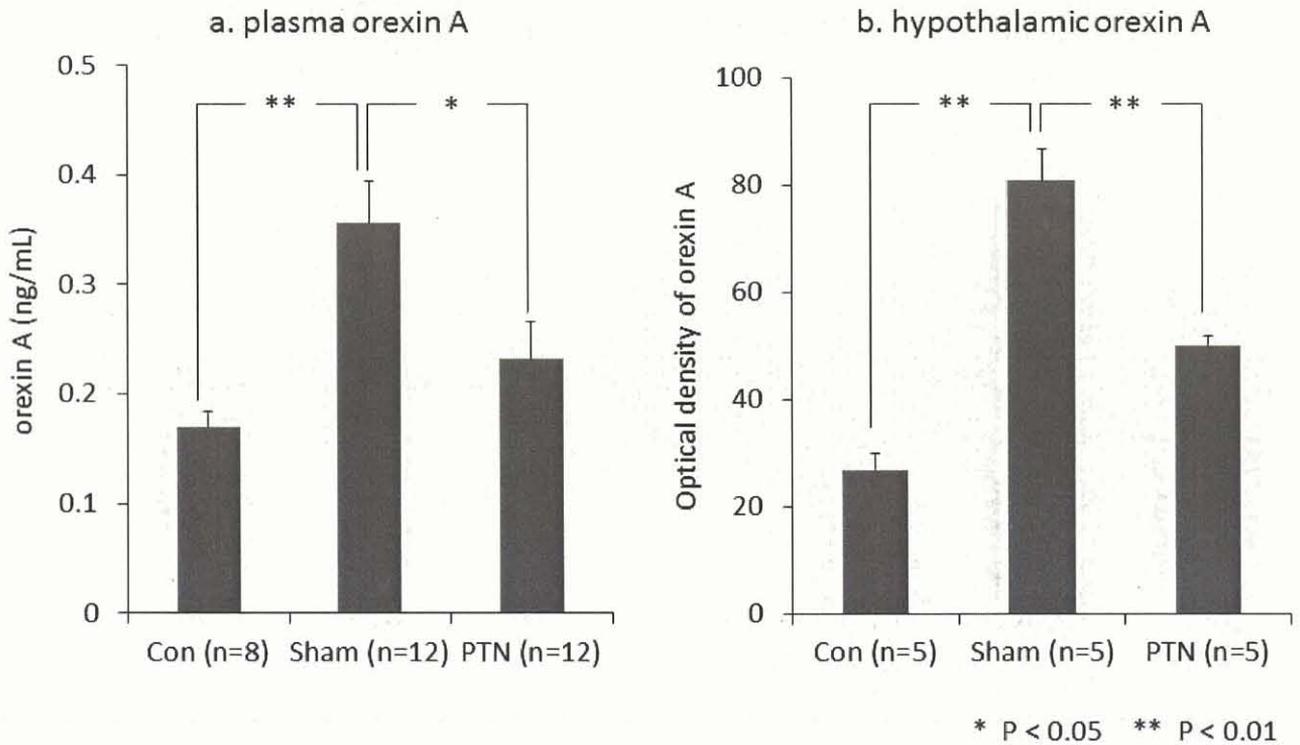


Fig.3

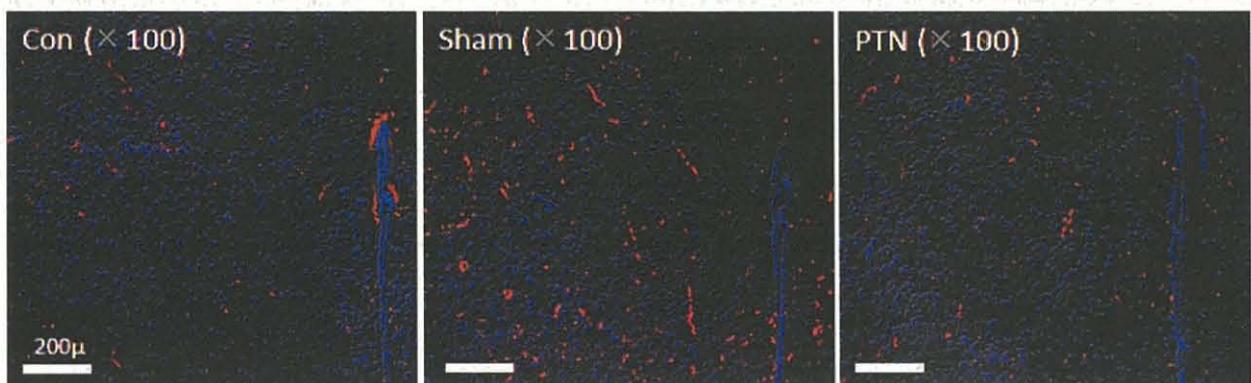


Fig.3c

Fig.3 The influences of PTN on orexin A levels

Con (non-stress group), Sham (stress plus sham PTN treatment group) and PTN (stress plus PTN treatment group).

(a) The plasma orexin A level was significantly increased in the Sham group versus the Con group (**P<0.01), but this increase was inhibited in the PTN group (*P<0.05). (b) The optical density (OD) of the hypothalamic orexin neurons was significantly increased in the Sham group versus the Con group (*P<0.01), and this increase was also inhibited in the PTN group (*P<0.01). (c) Immunofluorescent images showing orexin A (red) and the nucleus (blue) in the hypothalamus. The expression of orexin A was increased in the Sham group compared with the Con group. This increase was inhibited in the PTN group.