

原著

オレキシン分泌の制御を介した加味逍遥散の抗ストレス作用

渡辺 大士^{1,2,3)} 砂川 正隆¹⁾ 片平 治人¹⁾
金田 祥明¹⁾ 藤原 亜季¹⁾ 山崎 永理^{1,3)}
高島 将⁴⁾ 石野 尚吾^{1,3)} 久光 正¹⁾

1) 昭和大学医学部生理学講座生体制御学部門

2) 昭和大学医学部内科学講座神経内科学部門

3) 昭和大学病院東洋医学科

4) 昭和大学藤が丘病院整形外科

抄録:

【目的】加味逍遥散は、柴胡、芍薬、蒼朮、当帰、茯苓、山梔子、牡丹皮、甘草、生姜、薄荷の 10 種の生薬から構成される漢方薬であり、比較的体力の低下した、精神不安やイライラなどの精神神経症状を有する人の全身倦怠感、のぼせ、寒気、種々の身体痛、食欲不振、好褥的傾向などの症状に用いられている。近年、オレキシシンがストレス反応の制御に関与することが明らかになってきた。オレキシシンは神経ペプチドの一種で、オレキシシン産生神経は視床下部外側野および脳弓周囲に局在するが、その軸索は小脳を除く中枢神経系全域に分布し、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。本研究では、ラット社会的孤立ストレスモデルを用い、加味逍遥散の抗ストレス作用、ならび作用機序の検討としてオレキシシン神経系の関与を検討した。

【方法と結果】初めに、加味逍遥散がオレキシシンの分泌に影響するのかを調べた。Wistar 系雄性ラットに、100mg/kg/day, 400mg/kg/day, 1,000mg/kg/day の 3 種類の用量の加味逍遥散を 7 日間連続で経口投与し、血漿オレキシシン A 濃度を測定した。Control 群と比較し、100mg/kg ならび 400mg/kg の投与で有意な低下が認められたが、1,000mg/kg では有意な変化は認められなかった。次に、ラットをグループ飼育群 (Control 群)、孤立ストレス群 (Stress 群)、ストレス+加味逍遥散 (400mg/kg) 投与群 (Stress+KSS 群) に分け、7 日間の飼育後、攻撃性試験ならび血漿コルチコステロンならびオレキシシン A 濃度の測定を行った。Stress 群では Control 群と比較し、攻撃行動を示す時間が有意に延長し、血漿コルチコステロンならびオレキシシン A 濃度も有意に上昇したが、Stress+KSS 群ではこれらの変化は有意に抑制された。更には、いずれの生薬が主として作用しているのかを検討した。本研究では柴胡に注目し、柴胡単独投与で検証した。ラットを Control 群, Stress 群, ストレス+柴胡投与群 (Stress+saiko) の 3 群に分け、血漿コルチコステロンならびオレキシシン A

濃度の測定を行った。Stress+saiko 群では、これらの濃度の上昇が有意に抑制された。

【考察】ストレス負荷によって、攻撃性が高まり、血漿コルチコステロンならびオレキシン濃度が上昇したが、これらの変化は加味逍遙散の投与によって抑制された。オレキシンが本モデル動物のストレス反応の発現に関与していることから、加味逍遙散の効果は、オレキシン分泌の制御を介した作用であり、柴胡が重要な働きをしていると考えられる。

【結語】加味逍遙散は抗ストレス作用を有し、作用機序として、オレキシン分泌の制御が関与することが示唆された。

キーワード：

加味逍遙散，オレキシン，抗ストレス作用，社会的孤立ストレス，柴胡

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を誘発する。また、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。

加味逍遥散は、柴胡、芍薬、蒼朮、当帰、茯苓、山梔子、牡丹皮、甘草、生姜、薄荷から構成される漢方薬であり (table 1)、「太平惠民和剂局方」を原典とする逍遥散に、牡丹皮と山梔子を加味した処方である。精神不安やイライラなどの精神神経症状のほか、全身倦怠感、のぼせ、寒気、種々の身体痛、食欲不振、好禱的傾向などの症状に用いられている。応用として月経不順、月経困難、更年期障害、自律神経失調症、神経症、抑うつ状態、湿疹、常習性便秘などの疾患に適応されている¹⁾。加味逍遥散の作用機序については、いくつかの研究報告が散見される。臨床研究では、更年期の抑うつ状態に加味逍遥散は有効であり、その作用機序として、interleukin-6 や tumor necrosis factor (TNF)- α の抑制が関与していることが報告されている^{2,3)}。動物実験では、卵巣摘出ラットへの副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンの脳室内投与による自発運動亢進⁴⁾や雄性ラットを用いた強制水泳試験による不動時間⁵⁾が加味逍遥散の前投与によって抑制された。また、雄性マウスを用いた social interaction 試験⁶⁾や社会的孤立ストレスを与えた卵巣摘出ラットを用いた恐怖刺激によるすみ行動の評価から⁷⁾、加味逍遥散は抗不安作用を有し、この抗不安作用^{6,7)}は、内因性のニューロステロイドの産生を促し、GABA_A/ベンゾジアゼピン受容体複合体の活性化を介した作用であることなどが報告されている。

各種ストレスが、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いる。近年、視床下部で分泌されるオレキシンがHPA axis ならびにSAM axis の制御に関与していることが報告されている⁸⁻¹⁰⁾。オレキシンは神経ペプチドの一種で、オレキシン産生神経は視床下部外側野および脳弓周囲に局在し、その軸索は小脳を除く中枢神経系

全域に分布し、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¹¹⁻¹³。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¹⁴、また遊泳運動ストレス¹⁵によって視床下部外側野のオレキシン神経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、視床下部室傍核の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンや、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)、コルチコステロンの分泌を上昇させ¹⁶、全身投与では副腎皮質に直接作用し、血漿コルチコステロンやアルドステロンの分泌を上昇させる¹⁷。また、副腎髄質にもオレキシン受容体が存在し¹⁸、オレキシンがエピネフリンの分泌も促進させる¹⁹。

加味逍遙散には抗ストレス作用があるとされ²⁰、実際にこの効果を期待して用いられているものの、HPA axis ならびにSAM axis への影響を検証した研究はほとんどない。そこで本研究では、ラット社会的孤立ストレスモデル²¹⁻²³を用い、加味逍遙散の抗ストレス作用、ならび作用機序の検討としてオレキシンの関与について検討した。オレキシンは、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 種類が同時に合成される。我々は、加味逍遙散と同様に精神神経症状に用いられている漢方薬・抑肝散^{22,24}の効果を検証したところ、コルチコステロンの分泌上昇、オレキシン A ならび B の分泌の上昇が抑制された (H. Katahira et al., unpublished data)。オレキシン A は、分子内ジスルフィド結合を有し、オレキシン B よりも構造的に安定していること、また、オレキシン A, B ともに脳室内投与¹⁶や全身投与¹⁷で HPA axis を活性化させることなどから、本研究ではオレキシン A にターゲットを絞り研究を行った。

研究方法

実験動物

7 週齢（体重 180～200g）の雄性 Wistar 系ラット（日本生物材料センター，東京）を用い，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．

なお加味逍遙散は，月経不順，月経困難，血の道症などの疾患に頻用されていることから¹⁾，雌性動物を用いた基礎研究も多い^{4,7)}．しかし，臨床では男性にも用いられることもあり，また本研究の評価基準とした攻撃行動は性ホルモンの影響も受ける²⁵⁾ことから，性周期の影響のない雄性ラットを用いて，抗ストレス作用を検証することとした．

加味逍遙散の投与

加味逍遙散は(株)ツムラより提供を受けた原末（TJ-24；Lot. 2130024010）を使用した．これは 10 種類の混合生薬（table 1）の熱水抽出エキスを濃縮後，噴霧乾燥して作製されたエキス粉末である．投与量が 1ml/kg BW になるように水に溶解し，胃ゾンデを用い 1 日 1 回経口投与した．

実験 1 オレキシンの分泌に対する加味逍遙散の影響の検討

非孤立ストレス負荷（1 ケージあたり 3 匹で飼育）のラットに対し加味逍遙散を 7 日間投与し，オレキシン分泌の変化を調べた．ラット 24 匹を無作為に对照群（Control; n=6）と加味逍遙散投与群に分けた．加味逍遙散は 100mg/kg/day（KSS100; n=6），400mg/kg/day（KSS400; n=6），1,000mg/kg/day（KSS1000; n=6）の 3 種類の用量で投与した．对照群には同量の水を経口投与した．実験 8 日目，ペントバルビタールナトリウム（50mg/kg i.p.）（ソムノペンチル；共立製薬，東京）深麻酔下に開腹し，下大静脈より採血した．血液は 4°C ，3000 回転で 10 分間の遠心分離後上清を採取し，血漿を測定まで -80°C で保存した．市販のオレキシン A 測定用 ELISA キット（EKE-003-30; Phoenix Pharmaceuticals, CA, USA）を用い，血漿オレキシン A 濃度を測定した．

実験 2 加味逍遥散の抗ストレス作用の検討

1. 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、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²¹⁻²³。ラット 21 匹を無作為に、対照群 (Control; n=7)、社会的孤立ストレスモデル群 (Stress; n=7)、ストレスモデルに加味逍遥散 (400mg/kg) 投与群 (Stress+KSS; n=7) の 3 群に分け、Stress 群ならび Stress+KSS 群は、7 日間 1 ケージ (26×26×18cm) に 1 匹で飼育した。対照群は 1 ケージ (24×40×20cm) あたり 3~4 匹のグループで飼育した。

2. 抗ストレス作用の評価

1) 行動の評価 (攻撃性試験)

本モデル動物は攻撃性が増すことが知られている²²。実験 7 日目、攻撃性の評価として、Resident intruder test²²を用いた。攻撃性に関与する因子の日内変動の影響を排除するため、本試験は 12~15 時の時間帯に決めて行った。7 日間飼育した居住空間 (縄張り) に、侵入者として被験ラットより小さめ (5 週齢) の雄性同種ラットを入れ、10 分間の行動を観察した。かみつき、マウンティング、ボクシングなどの攻撃行動に費やした時間を測定した。

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、血漿コルチコステロン濃度を測定した²⁶。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 ELISA キット (ADI-900-097; Enzo Life Sciences, NY, USA) を用い測定した。

3. オレキシシン濃度の測定

コルチコステロン同様，ストレス負荷 8 日目に採取した血液を用い，血漿オレキシシン A 濃度を測定した．

実験 3 柴胡の抗ストレス作用の検討

加味逍遙散の構成生薬のうち，いずれの生薬が効果的に作用しているのかを検討した．加味逍遙散と同様に精神神経症状に用いられている漢方薬・抑肝散^{22,24)}の効果を同じ実験系で検証したところ，攻撃性やコルチコステロン濃度，オレキシシン A ならび B 濃度の上昇が抑制された (H. Katahira et al., unpublished data)．そこで我々は，抑肝散と共通する構成生薬，柴胡・蒼朮・茯苓・当帰・甘草のうち柴胡²⁷⁻²⁹⁾に注目し，同じ実験系で柴胡単独での効果を検証した．柴胡は，(株)ツムラより提供を受けたエキス粉末 (Lot. 2131020010) を使用した．ラット 15 匹を無作為に，対照群 (Control; n=5)，社会的孤立ストレスモデル群 (Stress; n=5)，ストレスモデルに柴胡 (40mg/kg) 投与群，(Stress+saiko; n=5) の 3 群に分けた．実験 8 日目に採血を行い，血漿コルチコステロンならびオレキシシン A 濃度を測定した．

統計学的処理

全ての実験結果は平均±標準偏差で示した．2 群間の比較は Student's t-Test を行い，3 群以上の比較は一元配置分散分析後，多重比較 (Tukey) 法を行い，有意水準を 5%未満とした．

結果

1 オレキシシンの分泌に対する加味逍遙散の影響 (実験 1)

100mg/kg/day, 400mg/kg/day, 1,000mg/kg/day の加味逍遙散を 7 日間投与し，血漿オレキシシン A 濃度を測定したところ，Control 群 (0.49 ± 0.12 ng/ml)

と比較し、KSS100 群 (0.29 ± 0.12 ng/ml) ($P < 0.05$) ならび KSS400 群 (0.25 ± 0.12 ng/ml) ($P < 0.01$) で有意な低下が認められた。KSS1000 群 (0.44 ± 0.12 ng/ml) では有意な変化は認められなかった (Fig. 1)。

2 加味逍遙散の抗ストレス作用 (実験 2)

1) 攻撃性試験

実験 7 日目, 10 分間の Resident intruder test²²⁾を行ったところ, Control 群 (5.71 ± 6.90 sec) と比較し, Stress 群 (172.29 ± 43.52 sec) では有意に攻撃行動を示す時間が延長した ($P < 0.01$)。しかしながら, Stress+KSS 群 (116.86 ± 42.39 sec) では, その時間が有意に抑制された ($P < 0.05$) (Fig. 2A)。

2) 血漿コルチコステロン濃度

実験 8 日目, ストレスマーカーとして血漿コルチコステロン濃度を測定した。Control 群 (28.19 ± 8.42 ng/ml) と比較し, Stress 群 (65.49 ± 36.96 ng/ml) では有意に上昇したが ($P < 0.05$)。Stress+KSS 群 (20.95 ± 5.44 ng/ml) では, その上昇が有意に抑制された ($P < 0.01$) (Fig. 2B)。

3) 血漿オレキシン A 濃度

実験 8 日目, 血漿オレキシン A 濃度を測定した。オレキシン A 濃度は, Control 群 (0.30 ± 0.07 ng/ml) と比較し, Stress 群 (0.51 ± 0.14 ng/ml) では有意に上昇したが ($P < 0.01$)。Stress+KSS 群 (0.33 ± 0.05 ng/ml) では, その上昇が有意に抑制された ($P < 0.01$) (Fig. 3)。

3 柴胡の抗ストレス作用 (実験 3)

有効生薬の検討のために柴胡のみを投与し, 血漿コルチコステロンならびオレキシン A 濃度を測定した。コルチコステロン濃度は, Control 群 (25.63 ± 5.73 ng/ml) と比較し, Stress 群 (113.96 ± 69.72 ng/ml) では有意に上昇したが ($P < 0.05$)。Stress+saiko 群 (39.83 ± 28.68 ng/ml) では, その上昇が有意に

抑制された ($P<0.01$) (Fig. 4A). オレキシシン A 濃度も, Control 群 (0.31 ± 0.06 ng/ml) と比較し, Stress 群 (0.53 ± 0.18 ng/ml) では有意に上昇したが ($P<0.01$), Stress+saiko 群 (0.23 ± 0.04 ng/ml) では, その上昇が有意に抑制された ($P<0.01$) (Fig. 4B).

実験 2 で加味逍遙散を投与した Stress+KSS 群と, 実験 3 で柴胡のみ投与した Stress+saiko 群とで比較した. コルチコステロン濃度に関しては有意差はなかったが (Fig.5A), オレキシシン A に関しては, Stress+KSS 群に比べ, Stress+saiko 群の方が有意に抑制されていた ($P<0.01$) (Fig.5B).

考察

初めに, 加味逍遙散がオレキシシンの分泌に影響するのかを調べた. 非ストレス負荷のラットに対し, 100mg, 400mg, 1,000mg/kg/day の 3 種類の用量の加味逍遙散を 7 日間投与し, オレキシシン A 分泌への影響を調べたところ, 400mg/kg で最も有意に血漿オレキシシン A 濃度が低下したが, 1,000mg/kg ではほとんど変化がみられなかった (Fig.1). 一般的に西洋薬は一方向への作用を示すため, 用量-反応曲線がシグモイド曲線を示す. 一方, 漢方薬は数種の生薬から構成され, さらにそのなかには多くの薬理作用を有する成分が含まれているため, アゴニストとアンタゴニストが共存していることもあり, 用量-反応曲線がシグモイド曲線ではなく途中で反応のピークを示すものもある³⁰⁾. 加味逍遙散のオレキシシン A の分泌抑制作用は 400mg/kg でピークを示したことから, 以下の実験では, 加味逍遙散の投与量を 400mg/kg とした.

次に, ラット社会的孤立ストレスモデルを用い, 加味逍遙散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いる. 症状として副腎肥大や血漿 ACTH・コルチコステロン・カテコールアミン分泌の増加²¹⁾, 攻撃性の上昇²²⁾, 自発運動の亢進²³⁾などが生じるが, 本研究では攻撃性ならび血漿コルチコステ

ロン濃度の変化を調べた。攻撃行動は、交感神経系や内分泌系の複雑な制御によって発現する。コルチコステロンは、HPA axis の興奮によって分泌が高まり、一般的にストレスマーカーとして使用されている²⁶⁾。社会的孤立ストレスによる攻撃性の上昇ならびコルチコステロン分泌の増加は、加味逍遙散の投与によって有意に抑制された (Fig.2)。そしてこの効果の作用機序として、オレキシン神経系の関与を検討した。先述の通り、近年、HPA axis ならびSAM axis の制御にオレキシンが関与していることが明らかになってきた⁸⁾。本研究では、社会的孤立ストレス負荷によって血漿オレキシン A 濃度が有意に上昇したが (Fig.3)、加味逍遙散の投与によってこの上昇は有意に抑制された。我々は、本モデル動物におけるストレス反応の誘発にオレキシンが関与していることを確認している (H. Katahira et al., unpublished data)。ストレス負荷した動物に、オレキシン受容体拮抗薬 (TCS1102)¹²⁾を投与したところ、攻撃性ならび血漿コルチコステロン濃度の上昇が有意に抑制された。以上の結果より、加味逍遙散はオレキシン A の分泌制御を介して抗ストレス作用を示したと考えられる。オレキシン受容体には、オレキシン 1 (OX1) 受容体とオレキシン 2 (OX2) 受容体の 2 種類が存在し、OX1 受容体はオレキシンA に高い親和性を示し、OX2 受容体は両者に同程度の親和性を示す¹³⁾。また脳内の OX1 と OX2 受容体の発現分布は同一ではないことから、各種ストレス反応の発現において、オレキシン A と B とでは関りが異なる可能性がある。今後は、オレキシン A と B、また、OX1 と OX2 受容体の作用の違いについても詳細に検討する必要がある。

最後に、加味逍遙散の中で、いずれの生薬が主として作用しているのかを検討した。漢方医学的には、イライラや気の精神不安などの状態には気滯（気の滞り）が関与しており、柴胡には理気作用（気の流れを改善する）を有するとされていること³¹⁾、また、抑肝散^{22,24)}の効果を同じ実験系で検証したところ、同様の効果が認められたことから (H. Katahira et al., unpublished data)、抑肝散との共通の生薬である柴胡に注目した²⁷⁻²⁹⁾。本モデル動物に対して柴胡単独投与でも、血漿コルチコステロンやオレキシン A 濃度の上昇を有意

に抑制したことから (Fig.4), 加味逍遙散の抗ストレス作用には, 柴胡が重要な役割を果たしていることが示唆された.

加味逍遙散を投与したStress+KSS 群と柴胡のみ投与したStress+saiko 群との間で比較すると, コルチコステロン濃度に関しては有意差はなかったが

(Fig.5A), オレキシン A に関しては, Stress+KSS 群に比べ, Stress+saiko 群の方が有意に抑制されていた (Fig.5B). 一般的に漢方薬は, 構成生薬数が多くなると, 各生薬の割合が少なくなる分, 効果がマイルドになると考えられている. よって, 柴胡単独の方が強いオレキシン A 抑制効果を示したことは理解できるが, コルチコステロンに関しては, 今後も検討が必要である.

オレキシン神経は, 種々の因子によって興奮性ならび抑制性の制御を受けているが, セロトニン (5-HT) は, オレキシン神経上の 5-HT_{1A} 受容体を介して抑制的に作用している¹³⁾. 柴胡の水抽出液が 5-HT_{1A} 受容体に親和性を有することから³²⁾, 加味逍遙散ならび柴胡のオレキシン分泌抑制作用は 5-HT_{1A} 受容体を介した作用であるかもしれない. 加味逍遙散の抗不安作用を調べた研究では, 山梔子単独で抗不安作用を示したこと³³⁾, 漢方医学的には, 柴胡と芍薬の組み合わせによって抗ストレス作用を示す²⁰⁾と考えられていることから, 他の構成生薬の関与についても, 今後さらなる検討を行っていく.

本研究より, 精神的ストレスに対し加味逍遙散は有用であり, これは, オレキシンの分泌制御を介した作用であることが示唆された. オレキシン神経は, 大脳辺縁系, 視床下部, 脳幹などからの入力情報を統合し, 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を行っている¹¹⁻¹³⁾. よって, これらの自律機能の障害のなかには, オレキシン神経系の不調から生じるものもある. これら各種生理作用に対する加味逍遙散の効果についても今後検証していく予定である. 我々の知る限り, 加味逍遙散によるオレキシン神経系の調節作用に関する報告はこれまでになく, 今後, 加味逍遙散の適応もさらに広がることが期待される.

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) 一般財団法人日本漢方医学研究所. 新版 漢方医学. 第 2 版. 東京 : 旭洋社 ; 1999. pp232.
- 2) Ushiroyama T, Ikeda A, Ueki M. Kami-shoyo-san, a herbal medicine, reduces plasma interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor concentrations in depressive climacteric women. *J Trad Med.* 2003; **20**:150-155.
- 3) Ushiroyama T, Sakuma K . Saiko-agents, herbal medicines, Kamishoyosan and Saikokeishikankyoto, regulate the plasma interferon- γ (IFN- γ) concentration in the improvement of undefined symptoms in depressed postmenopausal women. *Aino journal.* 2007;**6**:31-37.
- 4) 寺脇潔, 譲原光利, 加瀬義夫, ほか. 卵巣摘出動物における CRF 誘発自発運動亢進に対する漢方方剤の効果. 産婦人科漢方研究のあゆみ. 2004;**21**:119-123.
- 5) Park SW, Kim YK, Lee JG, et al. Antidepressant-like effects of the traditional Chinese medicine kami-shoyo-san in rats. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2007;**61**:401-406.
- 6) Mizowaki M, Toriizuka K, Hanawa T. Anxiolytic effect of Kamishoyosan in mice possible mediation of neurosteroid synthesis. *Life Sci.* 2001;**69**:2167-2177.
- 7) Egashira N, Iba H, Kuwano H, et al. Kamishoyosan reduces conditioned fear-induced freezing behavior in socially isolated ovariectomized rats. *J Pharmacol Sci.* 2016;**131**:279-283.

- 8) 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.
- 9) Kuwaki T. Orexin links emotional stress to autonomic functions. *Auton Neurosci.* 2011;**161**:20-27.
- 10) Messina G, Dalia C, Tafuri D, *et al.* Orexin-A controls sympathetic activity and eating behavior. *Front Psychol.* 2014;**5**:997. (accessed 2017 Nov 20) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4157463/> doi: 10.3389/fpsyg.2014.00997. eCollection 2014.
- 11) 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.
- 12) Hsiao YT, Jou SB, Yi PL, *et al.* Activation of GABAergic pathway by hypocretin in the median raphe nucleus (MRN) mediates stress-induced theta rhythm in rats. *Behav Brain Res.* 2012;**233**:224-231.
- 13) Sakurai T. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci.* 2007;**8**:171-181.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) Kuru M, Ueta Y, Serino R, *et al.* Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport.* 2000;**11**:1977-1980.
- 17) 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.

- 18) 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.
- 19) Nemoto T, Toyoshima-Aoyama F, Ueda Y, *et al.* Involvement of the orexin system in adrenal sympathetic regulation. *Pharmacology.* 2013;**91**:250-258.
- 20) 浅羽 宏一. 不定愁訴に対する漢方薬の使い方 生薬の薬効で漢方薬を理解する～精神的ストレスを例に～. レジデントノート. 2013;**15**:1145-1148.
- 21) 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.
- 22) Takeda A, Iwaki H, Ide K, *et al.* Therapeutic effect of Yokukansan on social isolation-induced aggressive behavior of zinc-deficient and pair-fed mice. *Brain Res Bull.* 2012;**87**:551-555.
- 23) 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.
- 24) de Caires S, Steenkamp V. Use of Yokukansan (TJ-54) in the treatment of neurological disorders: a review. *Phytother Res.* 2010;**24**:1265-1270.
- 25) Ross CN, French JA. Female marmosets' behavioral and hormonal responses to unfamiliar intruders. *Am J Primatol.* 2011;**73**:1072-1081.
- 26) Weiss IC, Pryce CR, Jongen-Rêlo AL, *et al.* Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behav Brain Res* 2004;**152**:279-295.
- 27) Kim SH, Han J, Seog DH, *et al.* Antidepressant effect of Chaihu-Shugan-San extract and its constituents in rat models of depression. *Life Sci.* 2005;**76**:1297-1306.
- 28) Kwon S, Lee B, Kim M, *et al.* Antidepressant-like effect of the methanolic extract from *Bupleurum falcatum* in the tail suspension test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010;**34**:265-270.

- 29) Seo MK, Song JC, Lee SJ, et al. Antidepressant-like effects of Bupleuri Radix extract. *Eur J Integr Med.* 2012;4:e392-e399. (accessed 2017 Nov 29) <http://dx.doi.org/10.1016/j.eujim.2012.07.979>.
- 30) 岡村信幸. 病態からみた漢方薬物ガイドライン. 第2版. 東京: 京都廣川書店; 2009. pp283.
- 31) 谿忠人. 漢方薬の知識 漢方製剤の使用上の注意 柴胡の配剤された理気剤の証と薬能と薬理. 薬局. 1998;49:707-714.
- 32) Liao JF, Jan YM, Huang SY, et al. Evaluation with receptor binding assay on the water extracts of ten CNS-active Chinese herbal drugs. *Proc Natl Sci Counc Repub China B.* 1995;19:151-158.
- 33) Toriizuka K, Kamiki H, Ohmura NY, et al. Anxiolytic effect of Gardeniae Fructus-extract containing active ingredient from Kamishoyosan (KSS), a Japanese traditional Kampo medicine. *Life Sci.* 2005;77:3010-3020.

Figure legends

Table 1 Component galenicals of Kamishoyosan (KSS; TJ-24)

The weights show the mixing amounts.

Fig.1 Plasma orexin A level following the administration of Kamishoyosan (KSS)

Control, KSS100 (KSS 100mg/kg administered group), KSS400 (KSS 100mg/kg) and KSS1000 (KSS 1,000mg/kg) groups. The plasma orexin A levels were significantly decreased in the KSS100 and KSS400 groups versus the Control group (* P <0.05, ** P <0.01).

Fig.2 Effects of Kamishoyosan (KSS) on social isolation stress.

Attack duration by the resident-intruder test (A) and plasma corticosterone level (B). Control (non-stress group), Stress and Stress+KSS (stress plus KSS administered group). (A) Aggressive behavior: the time the rats spent attacking an intruder for ten minutes was measured. The duration was significantly increased in the Stress group versus the Control group (** P <0.01; however, this increase was inhibited in the Stress+KSS group (* P <0.05). (B) The plasma corticosterone level was significantly increased in the Stress group versus the Control group (* P <0.05); however, this increase was significantly inhibited in the Stress+KSS group (** P <0.01).

Fig.3 Effects of Kamishoyosan (KSS) on the secretion of orexin A in rats subjected to social isolation stress

Control (non-stress group), Stress and Stress+KSS (stress plus KSS administered group). The plasma orexin A level was significantly increased in the Stress group versus the Control group (** P <0.01); however, this increase was significantly inhibited in the Stress+KSS group (** P <0.01).

Fig.4 Effects of *Bupleuri radix* (Saiko) on social isolation stress

Plasma corticosterone level (A) and plasma orexin A level (B). Control (non-stress group), Stress and Stress+saiko (stress plus Saiko administered group). These levels were significantly increased in the Stress group versus the Control group (* $P<0.05$); however, these increases were significantly inhibited in the Stress+Saiko group (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

Fig.5 Comparison of effects between Kamishoyosan (KSS) and *Bupleuri radix* (Saiko)

Plasma corticosterone level (A) and orexin A level (B). Stress+KSS (stress plus KSS administered group) and Stress+saiko (stress plus Saiko administered group). A significant difference was not recognized in regards to the corticosterone levels; however, the orexin A level was significantly decreased in the Stress+saiko group versus the Stress+KSS (** $P<0.01$).

THE ANTI-STRESS EFFECT OF THE KAMPO MEDICINE KAMISHOYOSAN VIA THE CONTROL OF THE SECRETION OF OREXIN

Daishi WATANABE^{1,2,3)}, Masataka SUNAGAWA¹⁾, Haruto KATAHIRA¹⁾,
Yasuaki KANADA¹⁾, Aki FUJIWARA¹⁾, Eri YAMASAKI^{1,3)},
Masashi TAKASHIMA⁴⁾, Shogo ISHINO^{1,3)}, Tadashi HISAMITSU¹⁾

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

²⁾ Department of Neurology, School of Medicine, Showa University

³⁾ Department of Oriental Medicine, Showa University Hospital

⁴⁾ Department of orthopaedic surgery, Showa University Fujigaoka Hospital

Abstract

Background: Kamishoyosan (KSS) is a traditional Japanese Kampo medicine that is administered to treat menopausal disorders and neurosis. Orexin is a neuropeptide secreted in the hypothalamus, and is involved in the control of feeding, arousal, the automatic nervous system and the endocrine system. In this study, we investigated the effects of KSS on mental stress and the involvement of orexin in the control of the stress responses in a rat model of social isolation stress.

Methods and Results: The administration of KSS (400 mg/kg, p.o.) to intact rats for one week significantly decreased their plasma level of orexin A. Next, rats were divided into three groups: the group-housed control group (Control), the single-housed stress group (Stress) and the single-housed and KSS-treated group (Stress+KSS). After one week, a resident-intruder aggression test was performed and the plasma levels of corticosterone and orexin A were measured. In the Stress group, aggressive behavior and the levels of corticosterone and orexin A were significantly increased. These increases were inhibited by the administration of KSS. Moreover, the effect of *Bupleuri radix*, a component galenical of KSS, was also investigated. The

increases in the levels of corticosterone and orexin A caused by stress were also inhibited by the administration of *Bupleuri radix*.

Discussion: It is reported that orexin is involved in stress control. These results suggest that KSS exerts an anti-stress effect via the control of the secretion of orexin, and *Bupleuri radix* plays an important role in the effect.

Key words:

Kamishoyosan

orexin

anti-stress effect

social isolation stress

Bupleuri radix

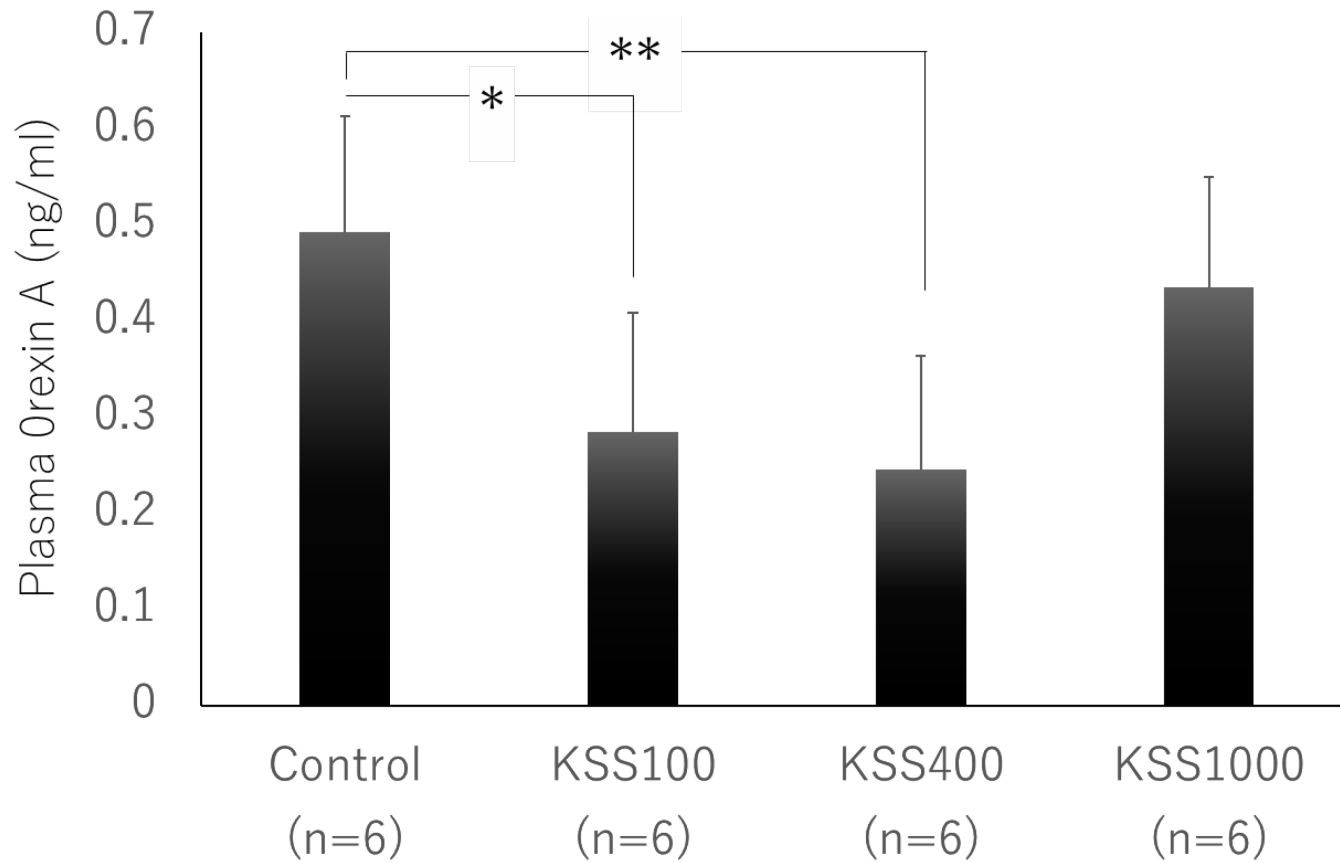
Table 1

	加味逍遙散 (KSS:TJ-24)
Bupleuri Radix (柴胡)	3.0g
Paeoniae Radix (芍藥)	3.0g
Atratilodis Lanceae Rhizoma (蒼朮)	3.0g
Angelicae Radix (當歸)	3.0g
Poria (茯苓)	3.0g
Gardeniae Fructus (山梔子)	2.0g
Moutan Cortex (牡丹皮)	2.0g
Glycyrrhizae Radix (甘草)	1.5g
Zingiberis Rhizoma (生薑)	1.0g
Menthae Herba (薄荷)	1.0g

Table 1 Component galenicals of Kamishoyosan (KSS; TJ-24)

The weights show the mixing amounts.

Fig.1



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig.1 Plasma orexin A level following the administration of Kamishoyosan (KSS)

Control, KSS100 (KSS 100mg/kg administered group), KSS400 (KSS 100mg/kg) and KSS1000 (KSS 1,000mg/kg) groups. The plasma orexin A levels were significantly decreased in the KSS100 and KSS400 groups versus the Control group (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Fig.2

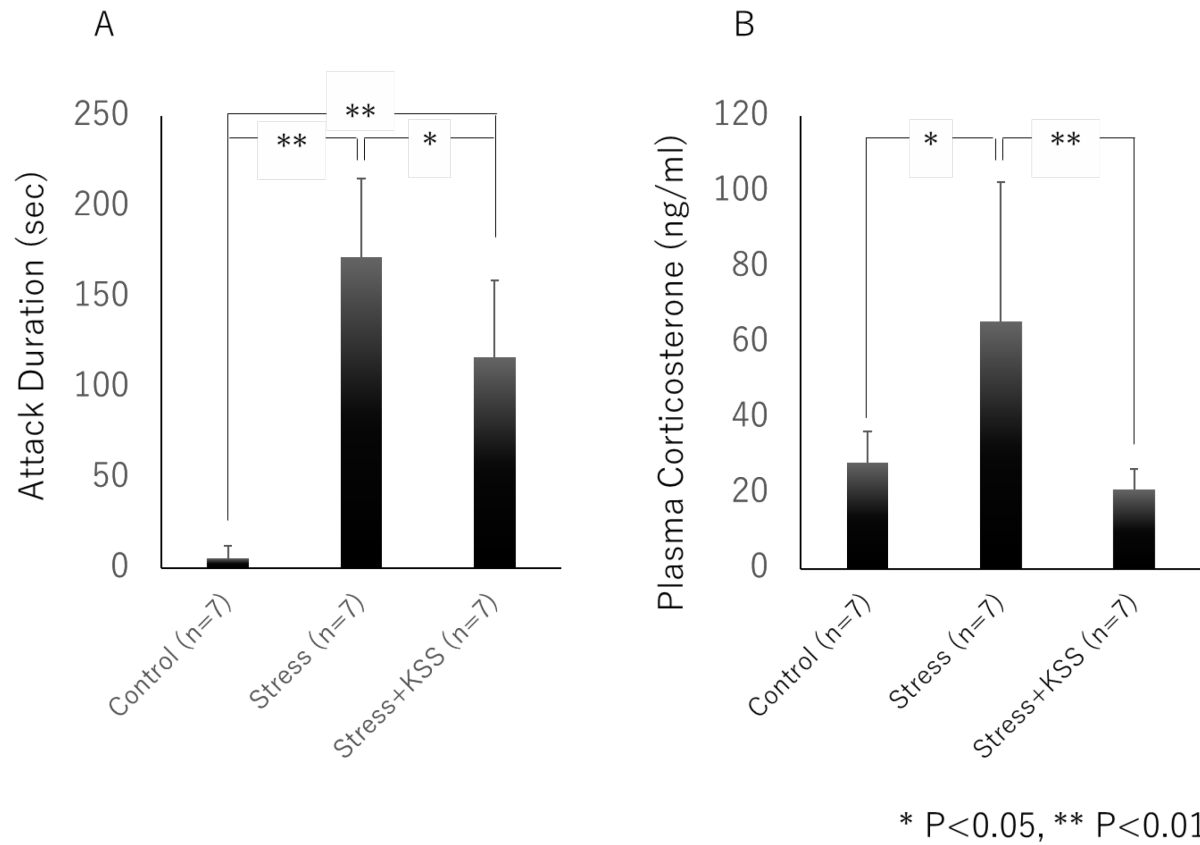


Fig.2 Effects of Kamishoyosan (KSS) on social isolation stress.

Attack duration by the resident-intruder test (A) and plasma corticosterone level (B). Control (non-stress group), Stress and Stress+KSS (stress plus KSS administered group). (A) Aggressive behavior: the time the rats spent attacking an intruder for ten minutes was measured. The duration was significantly increased in the Stress group versus the Control group (** $P<0.01$); however, this increase was inhibited in the Stress+KSS group (* $P<0.05$). (B) The plasma corticosterone level was significantly increased in the Stress group versus the Control group (* $P<0.05$); however, this increase was significantly inhibited in the Stress+KSS group (** $P<0.01$).

Fig.3

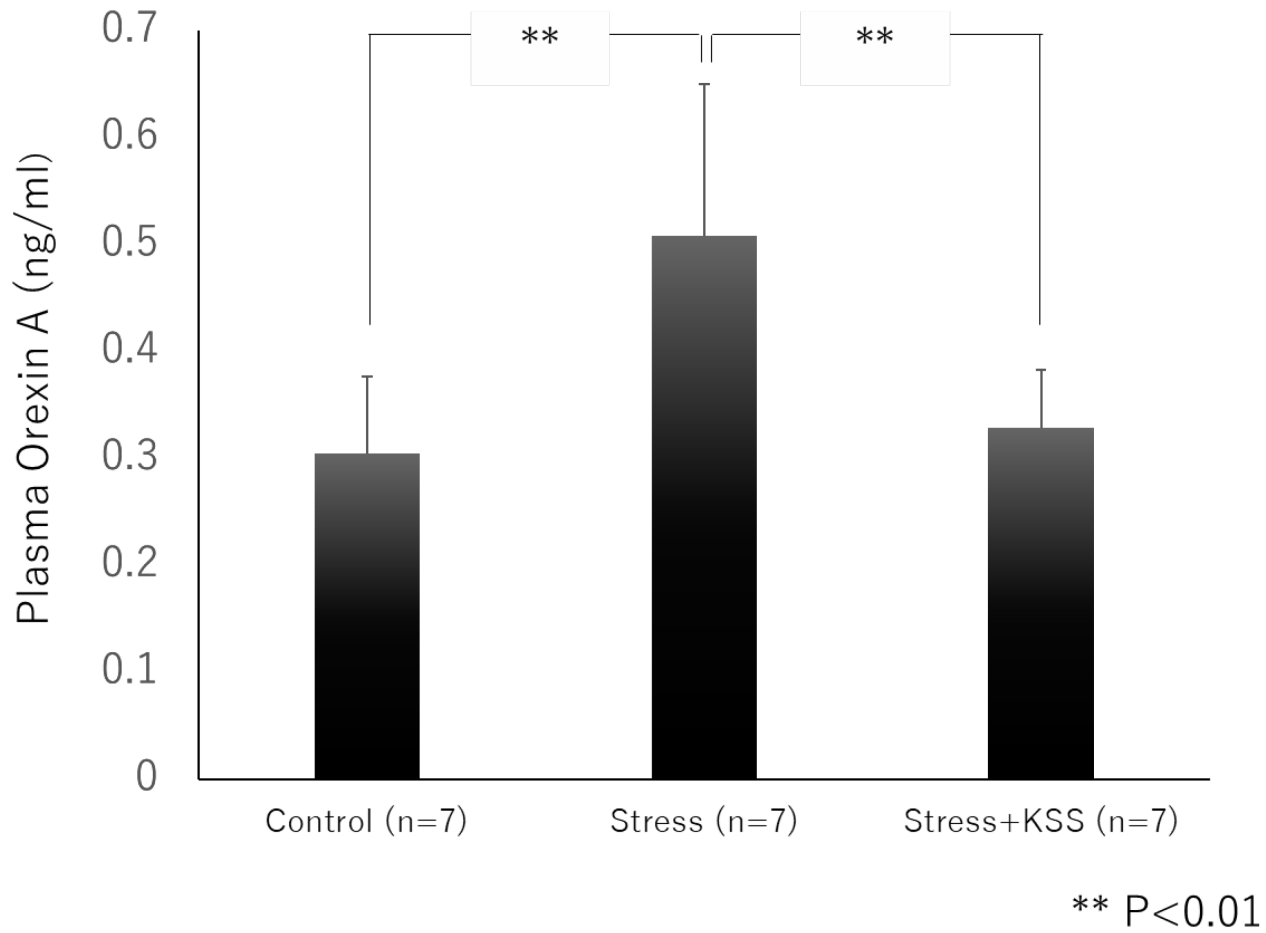


Fig.3 Effects of Kamishoyosan (KSS) on the secretion of orexin A in rats subjected to social isolation stress Control (non-stress group), Stress and Stress+KSS (stress plus KSS administered group). The plasma orexin A level was significantly increased in the Stress group versus the Control group (** $P<0.01$); however, this increase was significantly inhibited in the Stress+KSS group (** $P<0.01$).

Fig.4

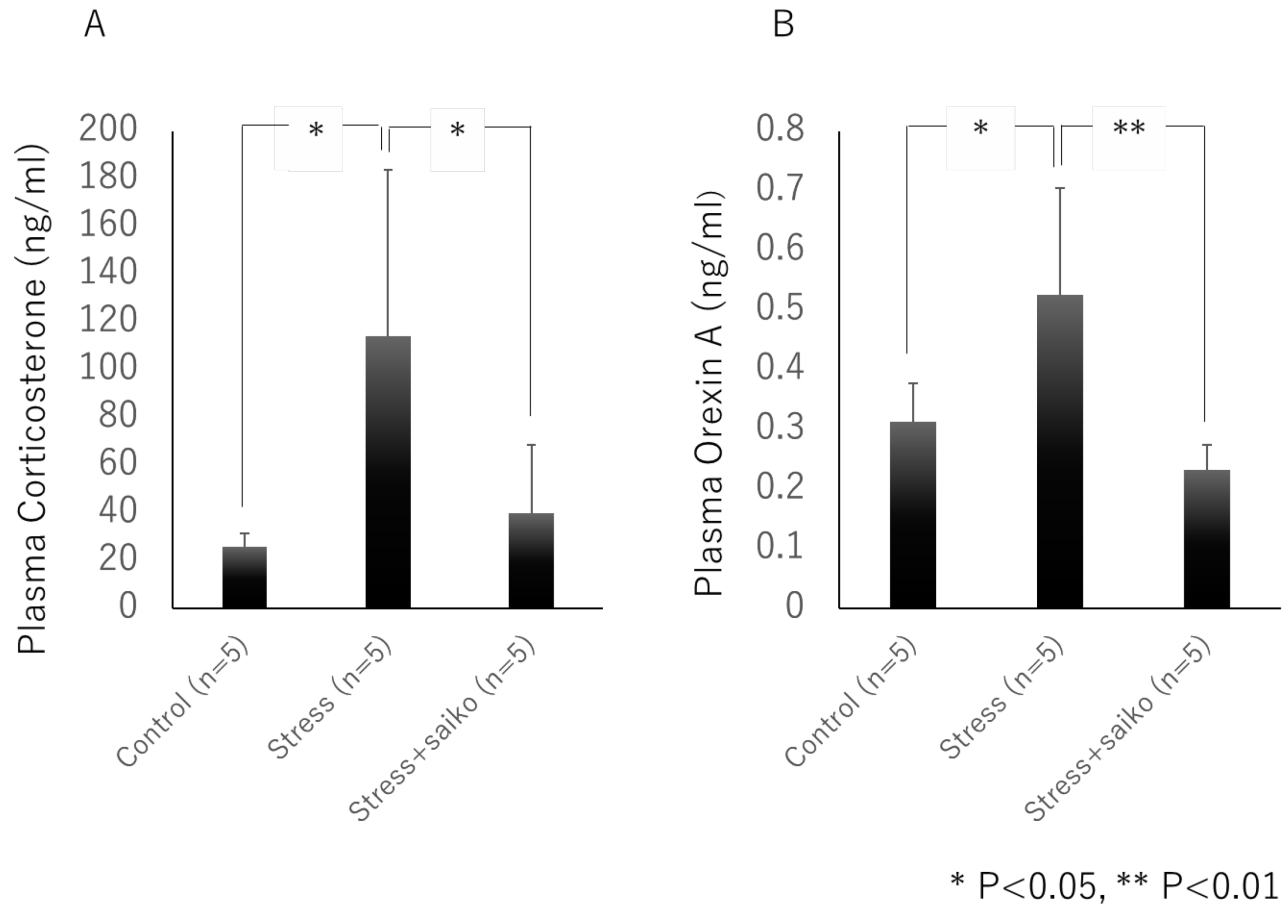
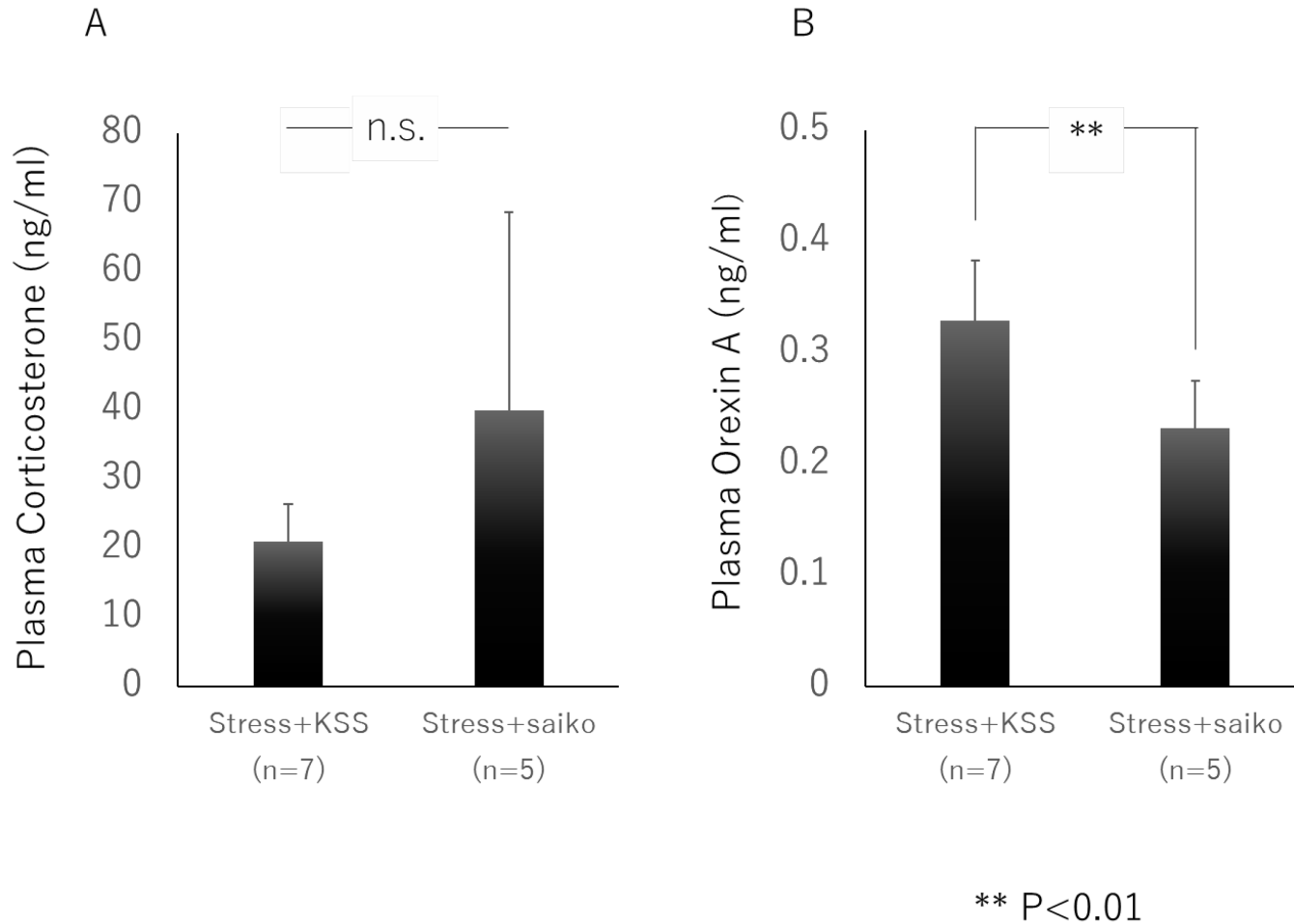


Fig.4 Effects of *Bupleuri radix* (Saiko) on social isolation stress

Plasma corticosterone level (A) and plasma orexin A level (B). Control (non-stress group), Stress and Stress+saiko (stress plus Saiko administered group). These levels were significantly increased in the Stress group versus the Control group (* $P<0.05$); however, these increases were significantly inhibited in the Stress+Saiko group (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

Fig.5



** P<0.01

Fig.5 Comparison of effects between Kamishoyosan (KSS) and *Bupleuri radix* (Saiko)

Plasma corticosterone level (A) and orexin A level (B). Stress+KSS (stress plus KSS administered group) and Stress+saiko (stress plus Saiko administered group). A significant difference was not recognized in regards to the corticosterone levels; however, the orexin A level was significantly decreased in the Stress+saiko group versus the Stress+KSS (** P<0.01).