

アトピー性皮膚炎における皮膚の知覚反応
と TRPV 1 との関連性に関する研究

2014 年

東京農工大学・早稲田大学

大学院共同教育課程

共同先進健康科学専攻

夏彦

目次

緒言	4
I 章 アトピー性皮膚炎自然発症モデル NC/Tnd マウスにおける知覚神経刺激 に対する反応性の検討	6
[1] 序論.....	6
[2] NC/Tnd マウスにおける痒み惹起物質に対する反応性.....	9
1) 材料と方法.....	9
2) 結果.....	10
3) 考察.....	13
[3] NC/Tnd マウスにおける痛み刺激に対する反応性.....	14
1) 材料と方法.....	14
2) 結果.....	15
3) 考察.....	18
[4] 小括.....	19
II 章 アトピー性皮膚炎自然発症モデル NC/Tnd マウスにおける TRPV1 の発 現量及び反応性の検討	20
[1] 序論	20
[2] 脊髄中 TRPV1 の発現量の検討.....	22
1) 材料と方法	22
2) 結果.....	23
3) 考察.....	25
[3] TRPV1 の反応性の検討	26
1) 材料と方法.....	26
2) 結果	27

3) 考察.....	30
[4] 小括.....	31
III章 アトピー性皮膚炎の痒みにおける TRPV1 の役割	32
[1] 序論.....	32
[2] アトピー性皮膚炎における capsaicin の局所投与効果の検討.....	34
1) 材料と方法	34
2) 結果.....	35
3) 考察.....	38
[3] 小括.....	39
総括.....	40
謝辞.....	44
引用文献.....	45

緒言

アトピー性皮膚炎は強い痒みを伴う、皮膚における慢性炎症をその病態とする湿疹・皮膚炎群の一疾患である(4)。アトピー性皮膚炎は表皮、なかでも角層の異常に起因する皮膚の乾燥とバリア機能異常という皮膚の生理学的異常を伴い、多彩な非特異的刺激反応および特異的アレルギー反応が関与して発症する(16)。近年、西洋型のライフスタイルへの変化とともに、他のアレルギー疾患と同様にアジア各国でも増加してきた。アトピー性皮膚炎で最も問題となるのは、強い痒みである。痒みにより患者は自分の皮膚を搔破し、その搔破が皮膚炎をさらに悪化させ、同時に痒みもさらに増加させてしまう。また、強い痒みは集中力を削いで勉強や仕事に支障をきたし、快適な睡眠も妨害される。このような生活の質の低下は、患者にさまざまなストレスを引き起こすが、ストレスがたまるとますます痒みが強くなる(12,34,38)。このような悪循環を断ち切るために、痒みや搔破行動をいち早くコントロールすることは、アトピー性皮膚炎の治療において非常に重要である。

痒みには末梢性の痒みと中枢性の痒みとがある(52)。末梢性の痒みは、表皮と真皮の境界部に分布している神経繊維(無髄神経、C繊維)の自由神経終末が、さまざまな刺激によって活性化されて生じる(38,39)。痒みを誘発する刺激には、電気刺激、機械的刺激、温度刺激のような物理的刺激とケミカルメディエータによる化学的刺激がある。末梢性の痒みで最も重要な搔痒惹起物質はヒスタミンである(16,50)。一方、中枢性の痒みは、内因性オピオイドペプチドがメディエータとして神経組織に存在するオピオイド受容体に作用するこ

とで惹起される (52)。オピオイド受容体が関与する中枢性の痒みはアトピー性皮膚炎患者の痒み、透析患者の痒み、肝硬変や慢性腎不全による皮膚搔痒症などに関与する。このように、アトピー性皮膚炎の痒みにはオピオイド受容体が関与しているため抗ヒスタミン薬では完全に痒みを抑えられない。また、アトピー性皮膚炎患者では、神経終末のプロテアーゼ活性化型受容体 (protease-activated receptor、PAR) -2 の発現が亢進していて、肥満細胞由来のトリプターゼが PAR-2 を介して痒みを引き起こしているという報告もある (6)。

アトピー性皮膚炎の病態解析のため、本研究ではアトピー性皮膚炎自然発症モデルである NC/Tnd マウスを使用した。NC/Tnd マウスは空気洗浄を行っていない環境 (コンベンショナル環境) では生後 6 ~ 8 週齢頃から強い痒みを伴う皮膚炎を発症する。また、血中 IgE レベルも上昇する (33)。しかし、空気洗浄を行った環境 (SPF 環境) では皮膚炎を発症しない。NC/Tnd マウスに起こる皮膚炎は、免疫学、病理学、皮膚科学および分子生物学的分析からヒトのアトピー性皮膚炎に酷似していることが知られている (1,23,32,56)。

本研究では、ヒトのアトピー性皮膚炎における痒みのメカニズムの解析を目的に、NC/Tnd マウスを用いて皮膚知覚神経刺激への反応性について解析した。また、対照マウスとの反応性の違いについて、その分子メカニズムを検証した。さらに、痛みと痒みの関係性に着目し、侵害受容器への刺激がアトピー性皮膚炎の痒みと搔破行動におよぼす影響を解析した。

I 章 アトピー性皮膚炎自然発症モデル NC/Tnd マウスにおける知覚神経刺激に対する反応性の検討

[1] 序論

「痛み」および「痒み」は皮膚感覚の1つである。また、痛みや痒みは人体の生体防御機構でもあり、皮膚疾患や全身疾患の警告症状である。痛みは皮膚だけでなく体内でも感じるが、痒みは体内の臓器にはない感覚である。皮膚に存在する痒みを知覚する神経は皮膚表面近くまで伸びており、皮膚炎が起ると神経を成長させる物質が皮膚表層から分泌され、神経線維がさらに伸びる事で痒みを強く感じるようになると考えられている。痒みを引き起こす代表的搔痒惹起物質の1つに、肥満細胞に含有されるヒスタミンがある。ヒスタミンはH1受容体 (histamine receptor 1) を介しC線維を興奮させる。この他にも、痒みを誘発する物質として、セロトニン、アセチルコリン、アラキドン酸代謝物であるプロスタグランジンやロイコトリエン、神経ペプチドであるサブスタンスP、interleukin (IL) -1 や tumor necrosis factor (TNF) - α などの各種サイトカイン、神経成長因子(nerve growth factor、NGF)、PAR-2を活性化する各種プロテアーゼ、そして一酸化窒素 (Nitric oxide、NO) などが挙げられる (16,51)。

痛みには侵害受容器を介した侵害受容性疼痛、侵害受容器が侵害刺激を受けていないにもかかわらず末梢神経あるいは痛み伝達ニューロンの興奮が引き起こされる神経性疼痛および心因性疼痛がある。また、侵害受容性疼痛には生理的な痛みと炎症性の痛みがある。生理的な痛みは組織損傷を引き起こす可能性のある侵害刺激 (侵害性機械刺激、侵害性熱刺激、侵害性化学刺激) により侵

害受容器が興奮して、A δ 線維やC線維を介した痛み情報伝達により生じる

(11,30)。炎症性の痛みは、組織破壊の結果、炎症部位で産生されるブラジキニン、adenosine triphosphate (ATP)、酸 (プロトン) などの発痛物質やプロスタグランジン (prostaglandin、PG) などの感作物質により引き起こされる (52)。

痛みと痒みは共にC線維を介して上位に伝達される知覚であるという類似点がある一方、痛み刺激は痒みの伝達を抑制するが、痛みを抑制するオピオイドは痒みを誘発するという逆説的な関係にもある (52)。アロディニア

(allodynia、通常痛みを誘発しない程度の刺激によって痛みを生じること) や痛覚過敏 (hyperalgesia、弱い痛み刺激でより強い痛みを起こすこと) は神経障害性疼痛において頻繁に発生するが、痒みにおいても類似した現象であるアロネーシス (alloknesis、本来痒みをもたらさない刺激により痒みが起こること) やハイパーネーシス (hyperknesis、ヒスタミンなどの痒み刺激がより強い痒みを生じさせること) が存在する (18,31)。アトピー性皮膚炎の患者では、電気刺激誘発性の痒みには痒み過敏状態になっている報告がある (66)。これは、末梢性および中枢性に感作が生じて搔痒閾値が低下した結果であるといえる。アトピー性皮膚炎患者の皮膚病理標本では一次感覚神経の表皮内への伸展が認められる。これはケラチノサイトから遊離されたNGFのチロシンキナーゼA (tyrosinekinase A、TrKA) 受容体を介した作用とされる (53)。

アトピー性皮膚炎の病態には、様々な痒み物質が関与しているが、それぞれの痒み物質に対する反応性がどのように変化しているかについての研究は不十分である。また、重要な皮膚感覚の一つ、侵害性の痛みに対する反応性の報告

も少ない。本章では、アトピー性皮膚炎自然発症モデルNC/Tndマウスを用いて、痒みと痛み刺激への反応性について、対照マウスとの違いを解析した。痒みの誘発には4種類の搔痒惹起物質を使用した。痛みに対する反応性の解析では機械刺激、熱刺激および化学刺激を行った。

[2] NC/Tnd マウスにおける痒み惹起物質に対する反応性

1) 材料と方法

1. 使用動物および飼育条件

実験にはSPF環境で飼育した6～8週齢のNC/Tndマウスを使用した。対照として同週齢のBALB/cマウスおよびC57BL/6 (B6) マウス (Japan SLC Inc., Tokyo, Japan) を使用した。マウスは室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、12時間明暗サイクルの動物室にて飼育した。食餌は固形飼料CE-2 (Clea Japan Inc., Tokyo, Japan) および滅菌水道水を自由給餌した。動物の取り扱いは国立大学法人東京農工大学実験動物論理委員会の承認を得て行った。

2. 皮膚バリア破壊処置

痒み惹起物質を投与する前処置として、Acetone/ether (AE) 水法によってマウスの皮膚バリアの破壊を行った。まず、2～3%イソフルランによってマウスに吸入麻酔をかけ、頸背部を剪毛した。乾燥綿をAcetoneとetherを1 : 1の濃度で混合した溶液に浸し、マウスの頸背部に1分間静置した。AE溶液を拭き取った後、蒸留水に浸した乾燥綿を1分間静置した。以上の処置を1日1回、3日間繰り返した後、経皮水分蒸散量 (Transepidermal water loss, TEWL) の測定により皮膚バリアの破壊状況を確認した。

3. 痒み惹起物質の投与および行動学的評価

痒み惹起物質にはhistamine、serotonin、chloroquine (CQ) 、SLIGRL-NH₂ (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) を使用した。これらの痒み惹起物質をそれぞれ

れ10 $\mu\text{mol/mL}$ 、10 $\text{nmol}/\mu\text{L}$ 、25 mg/mL 、1 mg/mL となるように生理食塩水に溶解し、各溶液30 μl をマウスの頸背部に塗布した。行動学的評価として、各溶液を塗布する前と塗布した直後1時間の皮膚擦過回数と皮膚擦過持続時間をSCLABA[®]-Realシステム (Noveltec Inc.、Kobe、Japan) を用いて測定した。

4. 統計処理

統計学的有意差の判定として、2群間での比較にはStudent's T-testを用いた。3群間での比較には、一元配置分散分析法および多重比較法を用いた。多重比較としてはTukey法を使用した。危険率 $P < .05$ を有意な差とした。

2) 結果

A/E水法による皮膚バリア破壊を行う前のTEWLの値は、NC/Tnd、BALB/c、B6マウスにおいて5 $\text{g/h}/\text{m}^2$ 程度であり正常範囲内であったが、3日間の処置後、TEWLの値はいずれのマウスにおいても25 $\text{g/h}/\text{m}^2$ 前後に上昇した (図1)。このことから、マウスに施したA/E水処置によりマウスの皮膚バリアを軽度に破壊したことを確認した。

痒み惹起物質をマウスの頸背部に塗布すると、塗布前に比べて皮膚擦過回数および皮膚擦過持続時間はすべてのマウスにおいて増加した。しかし、NC/Tndマウスにおいては、BALB/cマウスやB6マウスに比べて皮膚擦過回数および皮膚擦過持続時間の増加の程度は小さかった (図2)。特に、serotoninおよびCQ塗布後は、BALB/cまたはB6マウスに比べてNC/Tndマウスにおいて皮膚擦過回数および皮膚擦過持続時間の増加の程度が有意に小さかった。

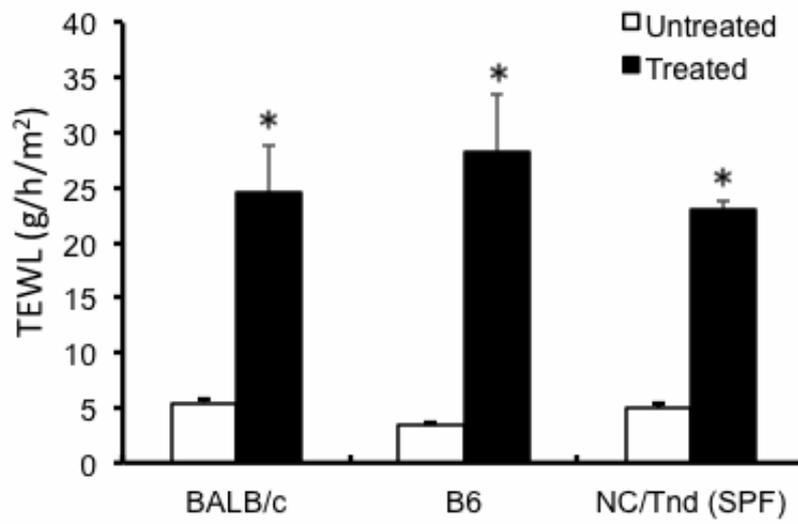


図1 皮膚バリア破壊処置前後における皮膚バリア機能の評価

A/E水法により、TEWLは処置前と比べ、処置後に有意に上昇した。実験は各群5匹のマウスについて行い、TEWLの平均値をグラフに示した。グラフのバーは標準誤差を示す。* $P < .05$ vs untreated

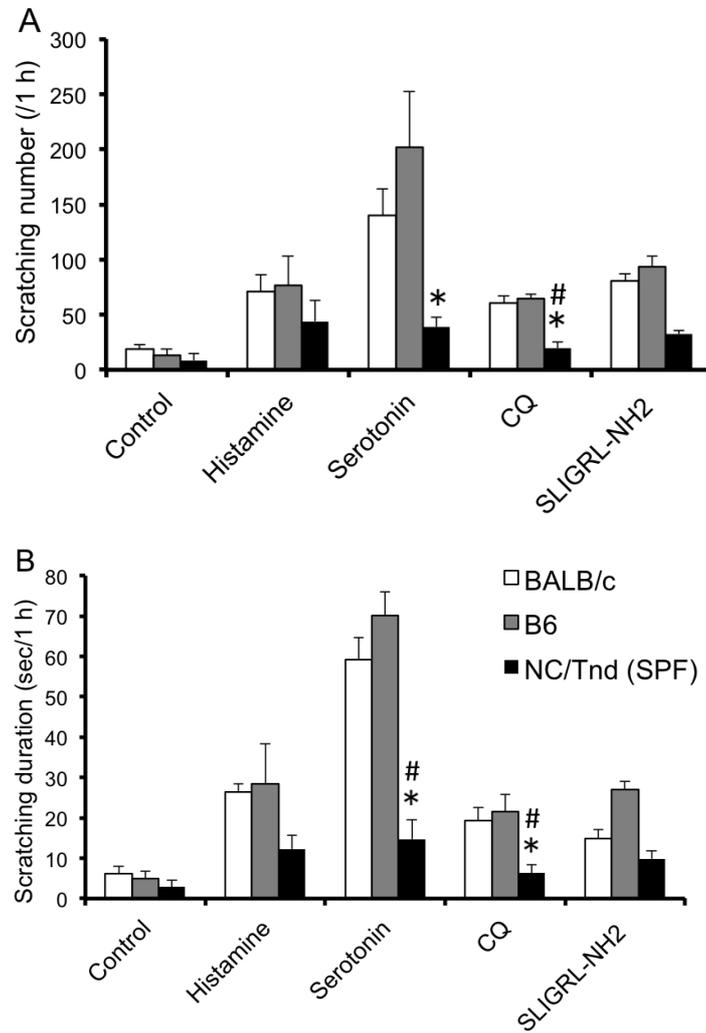


図2 痒み惹起物質投与後の行動学的評価

SCLABA®-Realシステムにより、擦過行動を解析した。痒み惹起物質塗布前に比べて皮膚擦過回数および皮膚擦過持続時間はすべてのマウスにおいて増加した。NC/Tndマウスにおいては、BALB/cやB6マウスに比べてNC/Tndマウスにおいて皮膚擦過回数および皮膚擦過持続時間の増加の程度は小さかった。実験は各群4匹のマウスを用いて行い、擦過回数および皮膚擦過持続時間の平均値をグラフに示した。グラフのバーは標準誤差を示す。* $P < .05$ vs B6 mice; # $P < .05$ vs BALB/c mice

3) 考察

今回使用した4種類の痒み惹起物質は、痒み誘発実験において頻繁に使用されてきた。痒み惹起物質としてよく知られているhistamineは、histamine H1受容体を介して痒みを伝達している (2)。serotonin誘発の痒みはホスホリパーゼC β に依存している (21)。抗マラリア薬の一種であるCQは、histamine非依存性物質で、Gタンパク質共役受容体Mrgpr A3により痒みのシグナルを伝達している (41)。SLIGRL-NH2はプロテアーゼ活性化受容体2 (PAR2) のアゴニストである (58)。

痒み惹起物質の投与方法については、一般的な皮内注射ではなく、皮膚塗布を選択した。注射は外部刺激の一種と考えられ、痒み以外の刺激をマウスに与えてしまう可能性があるためである。痒み惹起物質を投与する前には、A/E水法を用いてマウスの皮膚バリアを破壊した (14)。NC/TndマウスはBALB/cマウスやB6マウスと比べ、それぞれの痒み惹起物質に対する反応性は鈍くなっていた。アトピー性皮膚炎自然発症マウスであるNC/Tndマウスは、空気清浄を行っていない環境で飼育すると7週齢頃より皮膚炎を発症し、皮膚擦過行動の顕著な増加が観察される。今回の結果より、NC/Tndマウスにおける各痒み刺激への反応性は、他のマウスと比較して低いことが判明した。つまり、アトピー性皮膚炎を発症したNC/Tndマウスで認められる皮膚擦過行動の増加は、痒み刺激に対する高反応性によるものではないと考えられる。

[3] NC/Tnd マウスにおける痛み刺激に対する反応性

1) 材料と方法

1. 使用動物および飼育条件

実験には、SPF環境で飼育したNC/TndマウスおよびBALB/cマウス、B6マウスを使用した。動物の取り扱いには国立大学法人東京農工大学実験動物論理委員会の承認を得て行った。

2. 熱刺激に対する反応性の評価 (Hot plateテスト)

熱刺激に対する反応性を評価するために、Hot/Cold plate (Ugo Basile, Varese, Italy) を使用した。マウスは透明な測定用ケージに入れ30分間馴化した。ホットプレートを52°Cに加熱し、ケージから取り出したマウスをホットプレートの上に置いて、跳ぶ・足を振る・足を舐めるなどの回避行動を行うまでの時間を測定した。反応後、すぐにマウスをプレートから取り出し、15分間隔で3回測定して平均値を計算した。

3. 機械刺激に対する反応性の評価 (Von Freyテスト)

Dynamic Planter Aesthesiometer (Ugo Basile) を用いて機械刺激に対する反応性の評価を行った。マウスは網目板の上に置いてある透明なケージに入れ、30分間馴化した。網目の下からマウスの後肢足蹠に圧力 (0~10 g) を掛け、回避までの圧力を測定した。15分間隔で3回測定し、平均値を計算した。

4. 化学刺激に対する反応性の評価

化学刺激に対する反応性評価にはformalinおよびcapsaicinを使用した。マウスは事前に2~3%イソフルランを用いて吸入麻酔をかけ、左後肢と頭部右側にそれぞれ赤色と青色（B6マウスは黒色の体毛を持ち青色では認識しにくいいため、青色の代わりに黄色を使用した）のマーカールをつけた。測定の直前に、マウスを透明な測定用ケージに入れ30分間馴化した。Formalinは生理食塩水で2.5%に希釈し、capsaicinは100%のジメチルスルホキシド（Dimethyl sulfoxide、DMSO）で溶かした後、生理食塩水で0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に希釈した。マウスの左後肢足蹠にformalinまたはcapsaicinを20 μL 注射し、ケージに入れた。60分間の行動をデジタルビデオカメラで撮影した。撮影された画像はSCLABA[®]システム（Noveltec Inc.）ソフトウェアで解析した。マーキングした赤色と青色（黄色）の接近をマウスの舐める行動として計測した。0~5分は急性期、6~60分は慢性期として評価した。

5. 統計処理

3群間での比較には、一元配置分散分析法および多重比較法を用いた。多重比較としてはTukey法を使用した。危険率 $P < .05$ を有意な差とした。

2) 結果

Hot plateテストでは、NC/Tndマウスにおいて、熱刺激を受けてから回避するまでの時間がBALB/cマウスやB6マウスと比べ有意に長かった（図3A）。これは、熱刺激に対する痛みの反応性が他のマウスに比べ鈍いことを示してい

る。Von Freyテストでは、機械刺激への反応性に各マウス間で有意な差は認められなかった（図3 B）。Formalinに対する反応性は、急性期においては各マウス間で差はなかった。しかし慢性期における反応性は、NC/Tndマウス（黒カラム）においてB6マウス（グレーカラム）と比べ半分程度だった（図3 C）。また、特異的痛み物質であるcapsaicinに対し、BALB/cマウスおよびB6マウスでは急性期に反応が見られたが、NC/Tndマウスでは急性期の反応がほとんど認められなかった（図3 D）。慢性期ではすべてのマウスで反応が観察されたが、NC/Tndマウス（黒カラム）はBALB/cマウス（白カラム）やB6マウス（グレーカラム）と比べ1/5程度であった。

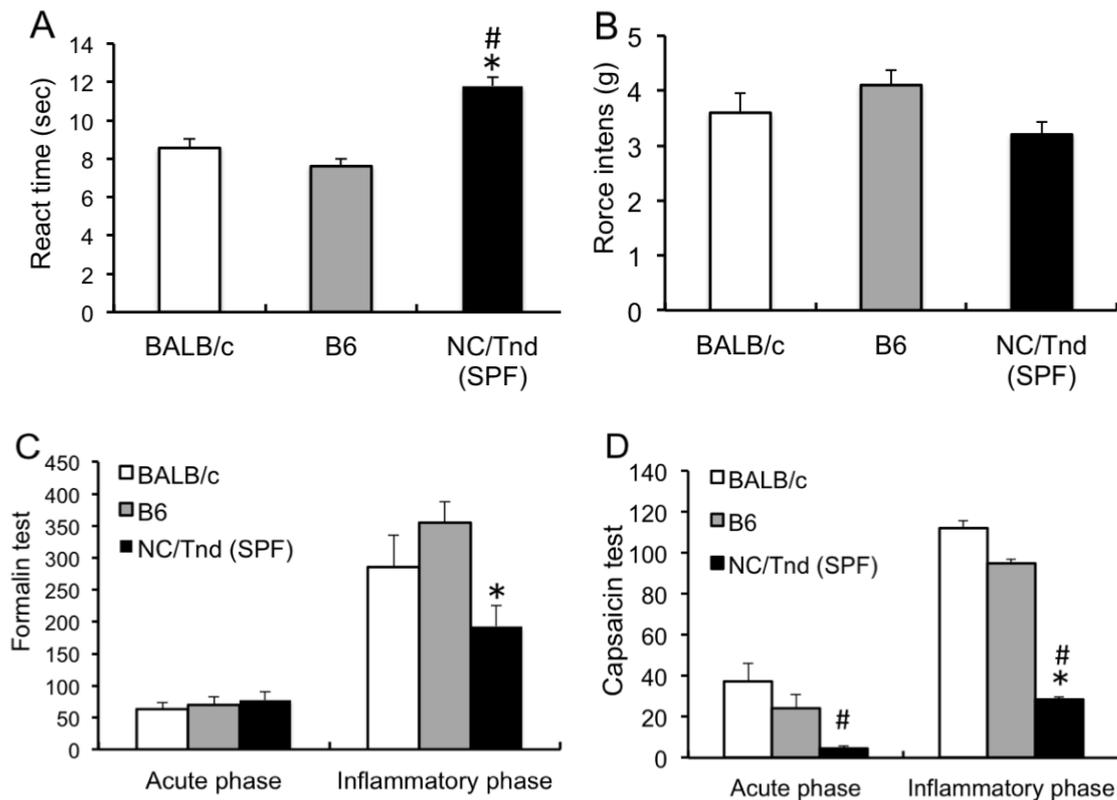


図3 痛み刺激に対する反応性の評価

Hot plateテストによる侵害性熱刺激の解析で、NC/TndマウスはBALB/cマウスやB6マウスと比べ痛みによる回避時間が有意に長かった (A)。Von Freyテストによる侵害性機械刺激の解析では、各マウス間に有意な差はなかった (B)。Formalinテストによる侵害性化学刺激の解析では、急性期各マウス間で有意な差はなかったが、慢性期においてNC/Tndマウスの投与部を舐める行動はB6マウスの半分程度だった (C)。Capsaicinテストによる侵害性化学刺激の解析では、急性期および慢性期のNC/Tndマウスにおける投与部を舐める行動が有意に減少した。実験は各群少なくとも4匹のマウスを用いて行い、痛みによる回避時間および痛みに対する舐める行動の回数の平均値をグラフに示し

た。グラフのバーは標準誤差を示す。* $P < .05$ vs B6 mice; # $P < .05$ vs

BALB/c mice

3) 考察

強い痒みが惹起しているアトピー性皮膚炎の患者では、通常痒みを誘発しない程度の刺激によっても痒みが生じる、温度が高い環境で痒みが生じるなど、皮膚知覚神経への反応性の変化が報告されている (15,20)。NC/Tndマウスは熱刺激および化学刺激による痛みの反応性が鈍くなっていたことから、知覚神経の反応性に変化が起こっている可能性がある。また、この痛みに対する低反応性は皮膚擦過行動に関与していると考えられる。正常な皮膚では、虫刺されなどの外部刺激により搔爬が惹起されたとしても、痛みによりある程度以上の搔爬が抑制される。しかし、アトピー性皮膚炎患者の皮膚では、皮膚炎による様々な炎症性物質により痒みが惹起され搔爬行動が起こるが、痛みに対する反応性が鈍いために、搔破行動が抑制されないことが示唆されている。したがって、皮膚炎による搔爬行動の惹起、搔破行動の継続による皮膚バリアの破壊と皮膚炎の悪化、更なる搔爬行動の惹起という悪循環が起こっている可能性が考えられた。

[4] 小括

本章では、痒み惹起物質に対するNC/Tndマウスの反応性は、他のマウスと比較して特別に高反応性ではないことが分かった。また、機械刺激への反応性は他のマウスと同等程度であった。さらに、熱刺激および化学刺激に対する痛みの反応性は、他のマウスに比べ鈍いことが判明した。このことから、アトピー性皮膚炎患者では、痛みに対する低反応性による搔破行動の異常な持続が起こっている可能性が示唆された。

Ⅱ章 アトピー性皮膚炎自然発症モデル NC/Tnd マウスにおける TRPV1の発現量及び反応性の検討

[1] 序論

痛みを惹起する侵害刺激は、温度刺激（熱刺激と冷刺激）、化学刺激、機械刺激に大きく分けられる。侵害刺激の受容には神経細胞における陽イオンチャンネルが関与すると報告されている。侵害刺激によって陽イオンが細胞内に流入し、神経細胞を脱分極させて電位作動性Na⁺チャンネルの活性化から活動電位の発生をもたらすと考えられている。侵害刺激を受容する陽イオンチャンネルの多くは、TRP（Transient receptor potential）スーパーファミリーに属する（9,37）。TRPチャンネルは1つのサブユニットが6回の膜貫通領域を有するCa²⁺透通性の高いチャンネルであり、TRPスーパーファミリーは哺乳類では大きくTRPC、TRPV、TRPM、TRPML、TRPP、TRPAの6つのサブファミリーに分けられている。そのうち、TRPV、TRPM、TRPAのサブファミリーに属するTRPV1、TRPV2、TRPM8、TRPA1は感覚神経細胞での発現が強く、侵害刺激受容または痛覚の軽減に関わっていると考えられている（8）。

TRPV1は後根神経節（dorsal root ganglion, DRG）や三叉神経の小型ないし中型細胞、脊髄後角表層（I、II層）において発現が確認されている

（27,28）。TRPV1はCa²⁺透通性の高い非選択性陽イオンチャンネルであり、唐辛子の成分であるcapsaicinや熱（43℃）、酸（プロトン）によって活性化する（68）。TRPV1欠損マウスでは熱性痛覚敏感の減弱が観察されることから、

TRPV1が炎症性疼痛の発生に深く関わっていることが示唆されている
(22,25)。

第1章の結果より、NC/Tndマウスでは熱刺激および化学刺激に対する低反応性が認められたが、その反応性の減弱化にTRPV1が関与している可能性が考えられる。そこで本章では、NC/Tndマウスおよび対照としてBALB/cおよびB6マウスを用いて、TRPV1の発現量および反応性を検討した。

[2] 脊髄中 TRPV1 の発現量の検討

1) 材料と方法

1. 使用動物

実験には、SPF環境で飼育したNC/TndマウスおよびBALB/cマウス、B6マウスを使用した。動物の取り扱いには国立大学法人東京農工大学実験動物論理委員会の承認を得て行った。

2. 組織学的解析

NC/TndマウスおよびBALB/cマウス、B6マウスの脊髄を採取し、中性ホルマリン緩衝液にて固定した。パラフィン包埋した組織を6 μ m厚に薄切して切片を作製した後、脱パラフィン処置、水洗、二次抗体の免疫動物種の5%血清による30分間のブロッキングを行った。一次抗体として、抗TRPV1抗体を4°Cで一晩反応させ、続いてビオチン標識二次抗体を1時間室温で反応させた。抗原を可視化するためにhorseradish peroxidase-streptavidin (Dako, Tokyo, Japan) と diaminobenzidine (Dako) を使用した。陽性細胞は任意に選んだ3視野をカウントし、その平均値を算出した。

3. 統計処理

3群間での比較には、一元配置分散分析法および多重比較法を用いた。多重比較としてはTukey法を使用した。危険率 $P < .05$ を有意な差とした。

2) 結果

TRPV1の発現量を調べるために、脊髄の免疫染色を行った。TRPV1は脊髄後角表層（I、II層）に分布している（図4）。任意に選んだ3視野をカウントし、その平均値を算出したTRPV1陽性細胞数をグラフ化した。NC/TndマウスにおけるTRPV1陽性細胞数はBALB/cやB6マウスと比べ差は認められなかった（図4）。

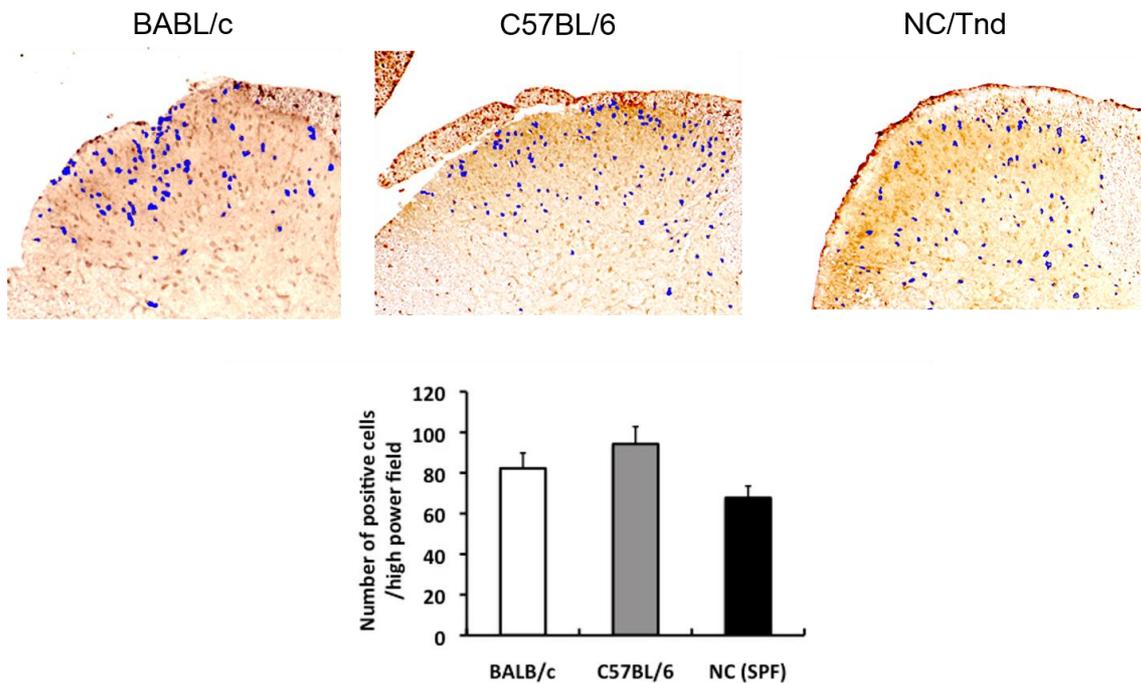


図4 脊髄中TRPV1の発現量の組織学的解析

脊髄の免疫染色法により、脊髄後角表層（I、II層）におけるTRPV1を検出した（上図）。NC/TndマウスにおけるTRPV1陽性細胞数は、BALB/cやB6マウスと比べ差は認められなかった（下図）。実験は各群4匹のマウスについて行い、脊髄のTRPV1陽性細胞数の平均値をグラフに示した。グラフのバーは標準誤差を示す。

3) 考察

NC/Tndマウスの熱およびcapsaicin誘発性の痛みに対する低反応性の原因として、TRPV1の反応性が低下している可能性を考慮し、実験を行った。TRPV1はDRGや三叉神経の小型ないし中型細胞、脊髄後角表層（I、II層）に分布しており、熱刺激誘発性の痛みに関与していると報告されている(9, 54)。また、capsaicinはTRPV1の選択的アゴニストであることから、NC/Tndマウスの痛みに対する低反応性に関与している可能性が高いと考えられた。しかし、今回の実験結果から、NC/Tndマウスの脊髄におけるTRPV1の発現量は、BALB/cマウスやB6マウスの脊髄におけるTRPV1の発現量と同程度であることが明らかとなった。したがって、NC/Tndマウスで観察された熱や化学刺激に対する低反応性は、TRPV1発現量が低下しているためではないと考えられた。

[3] TRPV1 の反応性の検討

1) 材料と方法

1. DRGニューロンの分散培養

生後6-8週のNC/TndマウスおよびBALA/cマウス、B6マウスより胸腰髄レベルのDRGを以下の手順で摘出した。まず、胸部から腰部までの脊椎を一塊として切り出し、吻側から尾側に向けてはさみを入れ脊柱管を切り開いた後、脊髄を除去した。実体顕微鏡を用いて神経節を確認し、精密ピンセットで1個ずつ摘出してDulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) 培養液を満たしたディッシュに入れた。ニューロンの回収率を上昇させるため、摘出した神経節を実体顕微鏡下で観察しながら神経線維束を神経節に近い部位で切断して取り除いた。振とう恒温槽を用いて、0.2%コラゲナーゼ (37°C、120分) による酵素処理の後、十分にピペッティングした。PBS液で2回洗浄し、30%パーコールによる密度勾配遠心分離 (1,000回転、5分) により、ニューロンとミエリン、その他の細胞とを分離した。この処理により、ニューロン以外の細胞やミエリンはその大部分が上層に残る一方、ニューロンの多くは最下層に移り、ペレット状に沈降する。回収したニューロンをウシ胎仔血清 (Fetal Bovine Serum) 入りの培養液で2回洗い、ポリリジンコートした培養ディッシュに撒布した。細胞を撒布したディッシュを37°CのCO₂インキュベーターに入れ、24時間以内にCa²⁺イメージングによる解析を行った。

2. Ca²⁺イメージング

前項目でディッシュに撒布した細胞を回収し、Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2-AM) を添加した (1 M) 。アルミホイルで遮光し、37°CのCO₂インキュベーターに入れ45分間培養した。その後細胞をPBSで2回洗浄し、分光蛍光光度測定器F-2500 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、capsaicin (100 μM) に対する波長340nmと380nmの細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。図5のように、測定開始後30秒の時点でcapsaicinを添加し、添加後90秒間の細胞内カルシウム濃度の変化を計測した。

3. 統計処理

3群間での比較には、一元配置分散分析法および多重比較法を用いた。多重比較としてはTukey法を使用した。危険率 $P < .05$ を有意な差とした。

2) 結果

TRPV1の反応性を評価するために、TRPV1のアゴニストであるcapsaicinを用い、DRGニューロンの細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。BALB/cマウスのニューロンでは、capsaicinを添加した後、カルシウム濃度は時間の経過とともに徐々に上昇し、最大4 nM程度にまで達した (図5) 。B6マウスのニューロンでは、capsaicinの添加後すぐに3 nM程度まで上昇し、その濃度を維持した。NC/Tndマウスのニューロンでは、反応が小さく、カルシウム濃度は最大2 nM程度にしか上昇しなかった。各マウスのニューロンにおけるcapsaicinに対す

るTRPV1の反応性を定量化するために、曲線下面積（area under the curve, AUC）を計算し、比較した。その結果、NC/TndマウスのDRGニューロンはBALB/cマウスやB6マウスのDRGニューロンと比べ、capsaicinに対するTRPV1の反応性が有意的に低かった（図5）。

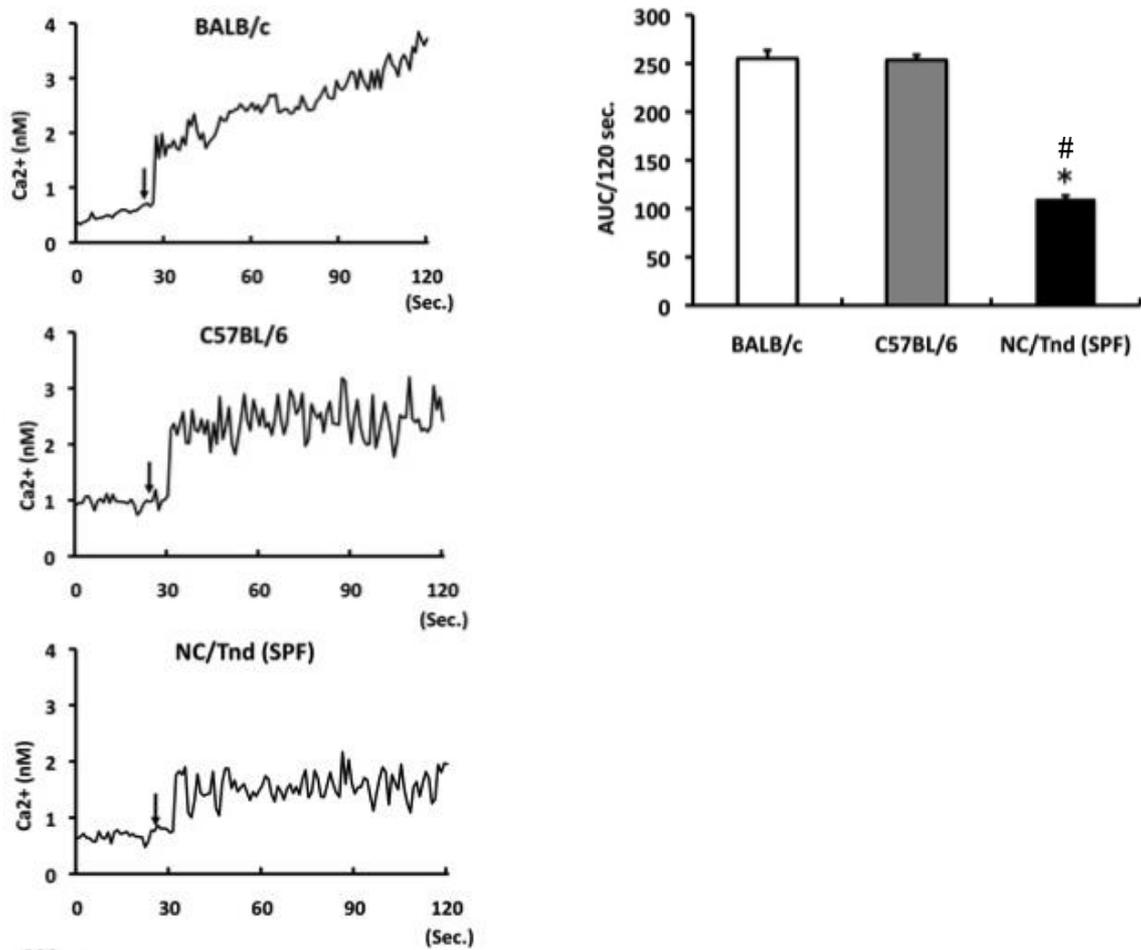


図5 Capsaicinに対するTRPV1の反応性の評価

Ca²⁺イメージング法により、capsaicinを添加した後（30 sec）のDRGニューロンにおける細胞内カルシウム濃度の変化を記録した（左図）。曲線下面積（AUC）を計算したところ、NC/TndマウスのDRGニューロンはBALB/cマウスやB6マウスのDRGニューロンと比べ、capsaicinに対するTRPV1の反応性が有意に低かった（右図）。実験は3回行ない、その平均値をグラフに示した。グラフのバーは標準誤差を示す。* $P < .05$ vs B6 mice; # $P < .05$ vs BALB/c mice

3) 考察

前項で、NC/Tndマウスの脊髄には他のマウスと同程度のTRPV1が発現していることが明らかとなった。しかし、TRPV1の発現量が同程度でも、その反応性に違いがある可能性がある。そこで本項では、NC/TndマウスのDRGより採取したニューロンにおけるTRPV1の反応性について、BALB/cマウスおよびB6マウスとの比較を試みた。TRPV1はCa²⁺透通性の高い非選択性陽イオンチャネルであり、その反応性の解析には一般的にCa²⁺イメージング法が使用される

(25)。分光蛍光光度測定器を用いたCa²⁺イメージング法によってTRPV1の反応性を検討したところ、NC/TndマウスのDRGニューロンはBALB/cマウスやB6マウスのニューロンに比べ、capsaicinに対する細胞内Ca²⁺濃度の上昇が少なく、TRPV1の反応性は有意に低いことが判明した。前項および本項の実験結果より、NC/Tndマウスにおいて熱刺激や化学刺激による痛みに対する反応性が他のマウスに比べて低いのは、TRPV1の発現量によるものではなく、その反応性が低下していることが原因であると考えられた。このことから、アトピー性皮膚炎患者では、TRPV1の反応性が低いために、搔破行動による痛みシグナルが抑制されず、痒み-搔破の悪循環が起こっている可能性があると考えられた。

[4] 小括

本章では、NC/Tnd マウスの TRPV1 の発現量および反応性を他のマウスと比較・検討を行った。その結果、NC/Tnd マウスにおける脊髄中の TRPV1 発現量は BALB/c マウスや B6 マウスと比べ差は認められなかったが、capsaicin に対する TRPV1 の反応性は低いことが判明した。このことから、NC/Tnd マウスにおける痛みに対する低反応性は TRPV1 の低反応性によるものであると考えされた。これらの結果から、アトピー性皮膚炎患者の異常な持続性搔破行動は、TRPV1 の反応性が低下していることが原因となっている可能性が推察された。

Ⅲ章 アトピー性皮膚炎の痒みにおける TRPV1 の役割

[1] 序論

アトピー性皮膚炎の治療には正しい診断と重症度の評価を行った上で、原因および悪化因子の探索と対策、スキンケア（異常な皮膚機能の補正）、薬物療法を行なうことが基本である。薬物療法には、抗アレルギー剤の内服と皮膚への局所塗布がある。現在利用可能な抗アレルギー剤はI型アレルギー反応（即時型アレルギー反応）に対する抗アレルギー剤（ベシル酸ベポタスチン、塩酸フェキソフェナジン、塩酸オロパタジン）であり、肥満細胞や好塩基球における化学伝達物質の合成および放出を阻害する作用や、放出された化学伝達物質に拮抗する作用がある。またIgE抗体産生抑制作用を持つ薬（トシル酸スプラタスト）も最近開発されたが(65)、IV型アレルギー反応（遅延型アレルギー反応）に対する効果はなく、内服用の抗アレルギー薬には現在のところ、補助的な効果しか期待できない。皮膚の局所外用剤療法はアトピー性皮膚炎にとって最も重要な治療である。主に使われているのはグルココルチコイド療法である。グルココルチコイド外用薬は、効果の強さや形状（軟膏、クリームなど）に基づいて、アトピー性皮膚炎の重症度に加え、個々の皮疹の部位や性状、年齢に応じて選択するのが重要である。以上のような薬物療法には、注意すべき副作用が存在する。抗ヒスタミン薬、抗アレルギー薬の副作用は、眠気、だるさなどが主なものである(26)。グルココルチコイド外用薬の副作用としては、皮膚の萎縮、血管拡張、毛囊炎などである。特に顔面において発現しやす

いので、顔面の症状に対する使用はできるだけ控えなければならない

(45, 49)。以上のような状況の中、有効性が高く副作用が少ない薬の開発が期待されている。

近年、capsaicinはsubstance Pを枯渇させる、または再蓄積を防ぐことで鎮痒効果があることが明らかにされてきた(7, 10)。また、capsaicinの外部投与はヒスタミン誘発性の痒みを抑制できることも報告されている(55)。そこで本章では、TRPV1アゴニストであるcapsaicinを用いてTRPV1を活性化させ、アトピー性皮膚炎の痒みに対する鎮痒効果を評価した。*In vivo*実験として、コンベンショナル環境で飼育し、皮膚炎が発症しているNC/Tndマウスを使用した。

[2] アトピー性皮膚炎における capsaicin の局所投与効果の検討

1) 材料と方法

1. 使用動物および飼育条件

実験にはコンベンショナル環境で飼育した8~10週齢のNC/Tndマウスを使用した。マウスは室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、12時間明暗サイクルの動物室にて飼育した。食餌は固形飼料CE-2 (Clea Japan Inc.、Tokyo、Japan) および水道水を自由給餌した。動物の取り扱いは国立大学法人東京農工大学実験動物論理委員会の承認を得て行った。

2. capsaicinの皮下投与の評価capsaicinの経皮投与の評価

2~3%イソフルランによってマウスに吸入麻酔をかけ、Hamilton syringe (Reno, Nev, USA) を使用して、各マウスにcapsaicin (15 mg/kg) を20 μL 皮下注射した。24時間後、SCLABA[®]-Realを用いて1時間の皮膚擦過行動を評価した。

3. capsaicinの経皮投与の評価

マウスはcapsaicin投与群とコントロール群各6匹ずつ使用した。まず、2~3%イソフルランによってマウスに吸入麻酔をかけ、頸背部を剪毛した。0.025% capsaicinを含んだ親水性軟膏、または親水性軟膏のみをマウスの頸背部に1日1回7日間塗布した。塗布前と塗布後3、7日にSCLABA[®]-Realを用いて1時間の皮膚擦過行動を評価した。

4. 統計処理

Capsaicin皮下投与前と投与24時間後の皮膚総擦過回数の統計学的有意差の判定にはPaired t testを用いた。capsaicin投与前、投与3日目と投与7日目における皮膚総擦過回数の統計学的有意差の判定にはOne repeated measured ANOVAを用いた。危険率 $P<.05$ を有意な差とした。

2) 結果

アトピー性皮膚炎の痒みに対するTRPV1の役割を明らかにするために、TRPV1アゴニストであるcapsaicinを皮膚炎が発症しているNC/Tndマウスに投与した。15 mg/kgのcapsaicinを皮下注射し、24時間後の擦過行動を評価した。Capsaicin投与前と比べ、1時間あたりの皮膚擦過回数が半分程度に減少した（図6）。次に、capsaicin軟膏を皮膚に塗布する実験では、投与前1時間の皮膚擦過回数は150回程度だったが、capsaicin軟膏を投与後、擦過回数は徐々に減少し、7日目は80回程度に減少した。しかし、コントロール群では、皮膚擦過回数は下がらず、上昇傾向を示した（図7）。

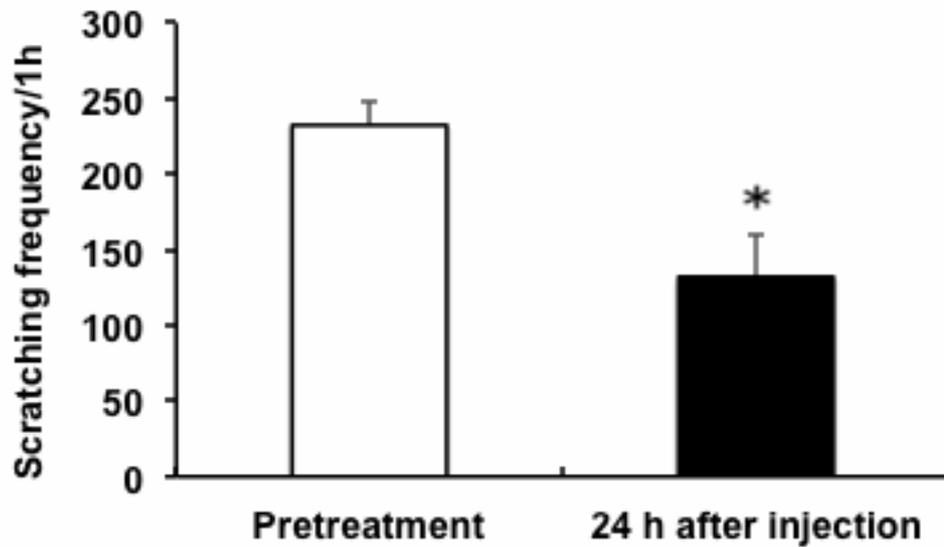


図6 Capsaicin皮下投与による皮膚擦過行動回数の評価

capsaicin (15 mg/kg) を皮下注射することで、24時間後の皮膚擦過回数は Capsaicin投与前と比べ有意に減少した。実験は各群4匹のマウスを用いて行い、擦過回数の平均値をグラフに示した。グラフのバーは標準誤差を示す。* $P < .05$ vs pretreatment

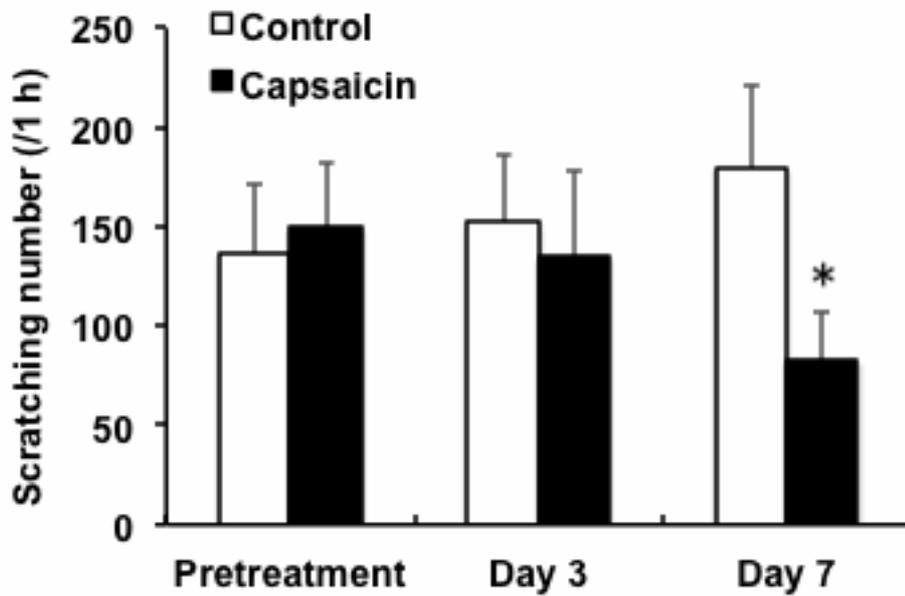


図7 Capsaicin経皮投与による皮膚擦過行動回数の評価

NC/Tndマウスの頸背部に0.025% capsaicin軟膏を塗布したところ、7日目には投与前と比べ皮膚擦過回数が有意に減少した。コントロール群では上昇傾向を示した。実験は各群6匹のマウスについて行い、擦過回数の平均値をグラフに示した。グラフのバーは標準誤差を示す。* $P < .05$ vs capsaicin pretreatment

3) 考察

第 I、II 章の結果から、NC/Tndマウスにおける熱および炎症性の痛みに対する低反応性は、TRPV1に対する反応性障害が原因となっていることが示唆され、その結果として擦過行動の増加に関与していると考えられる。本項の結果より、低濃度のcapsaicinをアトピー性皮膚炎が発症している皮膚に投与してTRPV1を活性化すると、擦過行動が著しく減少することが明らかとなった。このことから、TRPV1の感受性を調節することで、アトピー性皮膚炎の痒みをコントロールできることが示唆された。

近年、新生仔のマウスやラットに高濃度のcapsaicinを皮下投与すると、3週齢頃から強いかゆみのあるADに類似した皮膚炎を発症し、その症状は15週齢以上になるまで続くと報告されている(3,5,13,59)。このことは、本項の実験データと矛盾するように思われるが、高濃度のcapsaicinはTRPV1の機能を破綻させてしまうため、逆にTRPV1の反応性は低くなっていると考えられる

(22,29)。TRPV1の反応性が低いことで、痛みによる抑制機能が失われ、皮膚の擦過行動が持続し、病変形成を促進したと考えられる。

[3] 小括

本章では、低濃度の capsaicin を投与し、TRPV1 を活性化させることで、アトピー性皮膚炎の痒みが改善することを明らかにした。このことから、TRPV1 の活性化がアトピー性皮膚炎の新たな治療戦略となる可能性がある。

総括

アトピー性皮膚炎は慢性で難治性の皮膚疾患である。昨今の気密性の高い住宅の整備、スギ花粉など植物アレルゲンの曝露量の増加といった環境の変化に伴い、アトピー性皮膚炎患者数は増えている。そして、慢性的に皮膚症状が再燃を繰り返し、次第に悪化して難治性となった重症例が少なくない。アトピー性皮膚炎の最も重要な臨床症状の一つは痒みである。アトピー性皮膚炎の痒みに伴う搔破行動は二次的な皮膚病変を形成することから、その抑制が重要となる。搔破は機械的侵害刺激であり、痛み刺激である。この痛み刺激は痒みを抑制するため、搔痒に対する欲求を充足するが、一方で痒み-搔爬悪循環 (itch-scratch cycle) をもたらす (15,63)。痒みによる搔破は皮膚バリアを破壊し、IL-1 や TNF- α などの炎症性サイトカインを放出させる (67)。また、軸索反射により神経細胞からサブスタンス P などの搔痒惹起物質を遊離させる。これらの物質は肥満細胞、ケラチノサイト、ランゲルハンス細胞などに作用し、神経原性炎症と呼ばれる炎症を増幅させ、さらに搔痒を増悪させる。これまでアトピー性皮膚炎患者における皮膚感覚の変化が多く報告されているが、具体的にどのような刺激への反応性が変化しているのかなど、不明点が多い。本研究では、アトピー性皮膚炎モデルである NC/Tnd マウスを用いて、皮膚の痒みおよび痛みに対する反応性の違いを検討した。その結果、NC/Tnd マウスは痒み惹起物質に対する反応性は対照マウスよりも低い傾向があり、弱い痒み刺激を強く感じているわけではないことがわかった。一方、NC/Tnd マウスにおいては、熱刺激誘発性の痛みおよび formalin や capsaicin 誘発性の炎症性疼痛に対する反応性が低下していた。こ

のことは、搔爬により引き起こされる炎症性の痛みを感じにくく、いつまでも搔爬を続けてしまう原因になっていると考えられる。

また本研究では、NC/Tnd マウスにおける炎症性の痛みに対する低反応性は、TRP チャンネルが関与するという仮説のもと、そのメカニズムも検証した。TRP チャンネルは主として一次感覚神経に発現する陽イオンチャンネルで、ここ十数年で次々とクローニングされている。種々の化学物質刺激に加えて、温度刺激、侵害刺激、機械刺激、浸透圧刺激などを感知することが判明している、これまで痛みのターゲットとして注目されてきたが、痒みメカニズムにも関与する可能性が示唆されてきている。本研究では、TRP チャンネルの1つであり、capsaicin や43°以上の熱刺激に反応する TRPV1 に注目し、NC/Tnd マウスにおける発現量および反応性を確認した。その結果、NC/Tnd マウスの痛みに対する低反応性は、TRPV1 の発現量ではなく、反応性が低下していることが原因であると考えられた (図8)。

1999年から厚生労働省研究班や日本皮膚科学会によるアトピー性皮膚炎治療ガイドラインが作成された。その中で、薬物療法としては主にステロイド剤の使用が推奨されている。しかし、ステロイド剤の内服や外用には副作用があるため、安全にそして短期間で皮膚症状を改善させる治療が必要である。本研究により、皮膚炎を発症している NC/Tnd マウスにおいて、capsaicin の皮下注射および capsaicin 軟膏の塗布が、擦過行動を減少させる事を明らかにした。capsaicin は辛味をもたらすアルカロイドであり、食物として一般的に摂取される物質である。capsaicin の局所投与による搔痒感の減少を応用すれば、より安全性の高い治療法が開発されることが考えられる。

本研究で得られた新知見は、アトピー性皮膚炎において重要な課題である *itch-scratch cycle* のメカニズムを解析するための一助となる。さらに、アトピー性皮膚炎の新規治療戦略を提唱するものである。

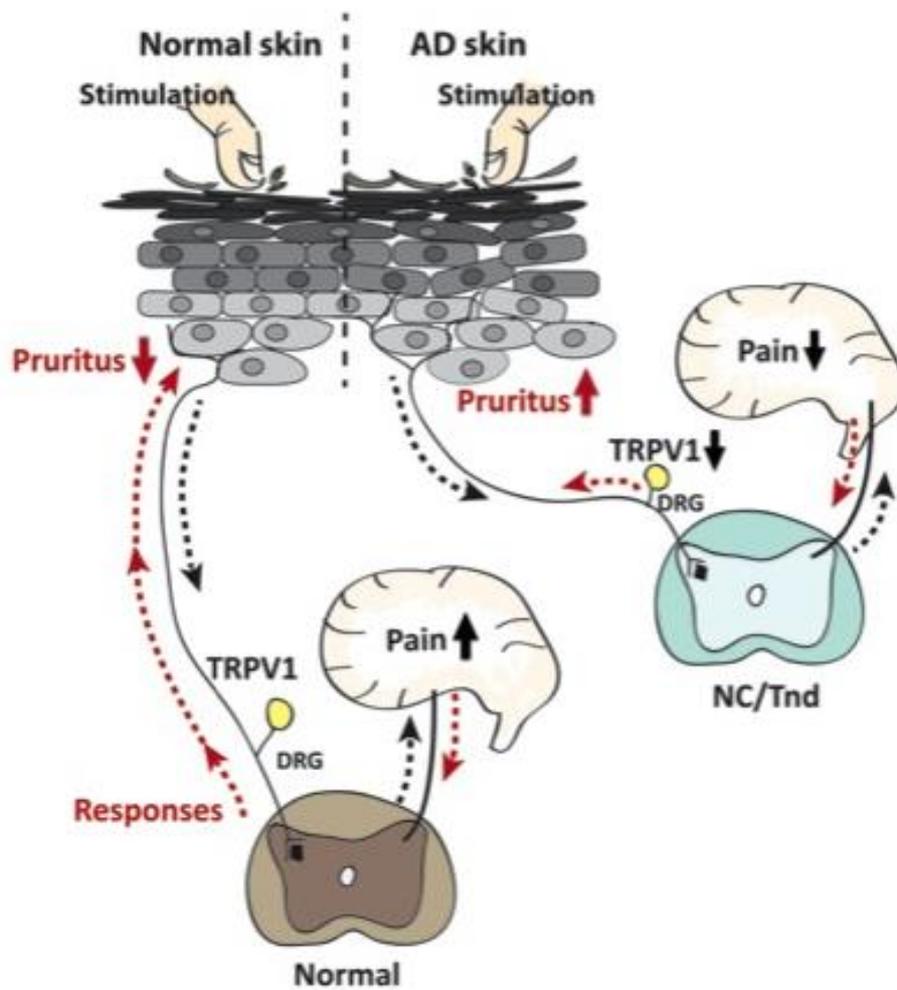


図8 正常な皮膚およびアトピー性皮膚炎の皮膚知覚刺激への反応

本研究から考察された、正常な皮膚およびアトピー性皮膚炎の皮膚知覚刺激への反応を示す。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、様々な方面からご支援・ご教授を賜りました東京農工大学生物応用システム科学府共同先進健康科学専攻の田中あかね教授に深謝いたします。また、論文作成に際しご指導いただいた、共同先進健康科学専攻の松田浩珍教授、柴田重信教授、田中秀幸准教授、および東京農工大学農学部野村義宏教授に感謝いたします。さらに、研究のすみやかな進行にご配慮くださった東京農工大学獣医分子病態治療学研究室および比較動物医学研究室内の諸先輩方、研究員、大学院生、研究生、学部生のみなさんにお礼を申し上げます。

引用文献

1. Aioi A, Tonogaito H, Suto H, Hamada K, Ra C, Ogawa H et al. Impairment of skin barrier function in NC/Nga Tnd mice as a possible model for atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2001;144:12-18.
2. Alving K, Sundstrom C, Matran R, Panula P, Hokfelt T, Lundberg JM. Association between histamine-containing mast cells and sensory nerves in the skin and airways of control and capsaicin-treated pigs. *Cell Tissue Res.* 1991;264:529-38.
3. Back Sk, Jeong KY, Li C, Lee SB, Na HS. Chronically relapsing pruritic dermatitis in the rats treated as neonate with capsaicin; a potential rat model of human atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2012;67:111-9.
4. Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 2008;358:1483-1494.
5. Breneman DL, Cardone JS, Blumsack RF, Lather RM, Searie EA, Pollack VE. Topical capsaicin for treatment of hemodialysis-related pruritus. *J Am Acad Dermatol.* 1992;26:91-4.
6. Briot A, Deraison C, Lacroix M, Bonnart C, Robin A et al. Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *J Exp Med.* 2009;206:1135-47.

7. Carrillo P, Camacho M, Manzo J, Martinez-Gomez M, Salas M, Pacheco P. Cutaneous wounds produced by capsaicin treatment of newborn rats are due to trophic disturbances. *Neurotoxicol Teratol.* 1998;20:75–81.
8. Caterina MJ, Julius D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:487-517.
9. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997;389:816-824.
10. Clapham D. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 2003;426:517-24.
11. ClapperJR, Moreno-SanzG, RussoR, GuijarroA, VacondioF, DurantiAet al. Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nat Neurosci.* 2010;13:1265-70.
12. Dalgard F, Lien L, Dalen I. Itch in the community: associations with psychosocial factors among adults. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007; 21: 1215–1219.
13. de Groat WC, Nadelhaft I, Milne RJ, Booth AM, Morgan C, Thor K. Organization of the sacral parasympathetic reflex pathways to the urinary bladder and large intestine. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1981;3:135–60.
14. Endo K, Suzuki N, Yoshida O, Sato H, Fujikura Y. The barrier component and the driving force component of transepidermal water loss and their application to skin irritant tests. *Skin Res Technol.* 2007;13:425-35.

15. Hashimoto Y, Arai I, Nakanishi Y, Sakurai T, Nakamura A, Nakaike S. Scratching of their skin by NC/Nga mice leads to development of dermatitis. *Life sciences*. 2004;76:783-794.
16. Heyer GR, Hornstein OP. Recent studies of cutaneous nociception in atopic and non-atopic subjects. *J Dermatol*. 1999;26:77-86.
17. Hunzkaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* .1987;30:103-14.
18. Ikoma A, Steinhoff M, Stander S, Yosipovitch G, Schmelz M. The neurobiology of itch. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:535–47.
19. Ikezawa Z, Komori J, Ikezawa Y, Inoue Y, Kirino M, Katsuyama M, Aihara M. A Role of *Staphyococcus aureus*, Interleukin-18, Nerve Growth Factor and Semaphorin 3A, an Axon Guidance Molecule, in Pathogenesis and Treatment of Atopic Dermatitis. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2010;2:235-46.
20. Ikoma A, Fartasch M, Heyer G, Miyachi Y, Handwerker H, Schmelz M. Painful stimuli evoke itch in patients with chronic pruritus: central sensitization for itch. *Neurology*. 2004;62:212-7.
21. Ikoma A, Steinhoff M, Stander S, Yosipovitch G, Schmelz M. The neurobiology of itch. *Nat Rev Neurosci*. 2009;7:535-547.
22. Imamachi N, Park GH, Lee H, Anderson DJ, Simon MI et al. TRPV1-expressing primary afferents generate behavioral responses to

- pruritogens via multiple mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:11330-11335.
23. Jung K, Tanaka A, Fujita H, Matsuda A, Oida K, Karasawa K et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ -mediated suppression of dendritic cell function prevents the onset of atopic dermatitis in NC/Tnd mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:420-429.
24. Katsuyama S, Mizoguchi H, Komatsu T, Sakurada C, Tsuzuki M, Sakurada S, Sakurada T. Antinociceptive effects of spinally administered nociceptin/orphanin FQ and its N-terminal fragments on capsaicin-induced nociception. *Peptides*. 2011;32:1530-5.
25. Kim BM, Lee SH, Shim WS, Oh U. Histamine-induced Ca^{2+} influx via PLA(2)/lipoxygenase/TRPV1 pathway in rat sensory neurons. *Neurosci Lett* 2004;361:159-62.
26. Klein PA, Clark RAF. An evidence-based review of the efficacy of anti-histamines in relieving pruritus in atopic dermatitis. *Arch Dermatol* 1999; 135: 1522–1525.
27. Kush NP, Qin L, Sonya M, Bradley JU, Xinzhong D. Pirt, a TRPV1 modulator, is required for histamine-dependent and –independent itch. *PLoS One*. 2011;6:e20559.
28. Lu Y, Fei Y, Hao L, Fengyu L, Jisheng H, Guogang Z, You W. The role of TRPV1 in different subtypes of dorsal root ganglion neurons in rat chronic

- inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant. *Mol Pain*. 2008;4:61.
29. Louise AR, Mark C. TRPV1 antagonist as a potential treatment for hyperalgesia. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2006;1:65-76.
 30. Mallory B, Steers WD, de Groat WC. Electro-physiological study of micturition reflexes in rats. *Am. J. Physiol*. 1989;257:R410–21.
 31. Marina M, Galina G, Andrey N, Uwe G. Innovative neurophysiological methods in itch research: long-latency evoked potentials after electrical and thermal stimulation in patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*. 2011;91:656-659.
 32. Matsuda A, Tanaka A, Pan W, Okamoto N, Oida K, Kingyo N et al. Supplementation of the fermented soy product ImmuBalance™ effectively reduces itching behavior of atopic NC/Tnd mice. *J Dermatol Sci*. 2012;67:130-9.
 33. Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J et al. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol*. 1997;9:461-6.
 34. Matterne U, Apfelbacher CJ, Loerbroks A et al. Prevalence, correlates and characteristics of chronic pruritus: a population-based cross-sectional study. *Acta Derm Venereol* 2011; 91: 674–679.

35. Montilel-Ruiz RM, Reyes-Garcia G, Flores-Murrieta F, Déciga-Campos M. Antinociceptive interaction between benfotiamine and resveratrol in capsaicin-induced licking. *Proc West Pharmacol Soc.* 2009;52:67-71.
36. Negi O, Tominaga N, Tengara S, Kamo A, Taneda K, Suga Y et al. Topically applied semaphorin 3A ointment inhibits scratching behavior and improves skin inflammation in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *Dermatol Sci.* 2012;66:37-43.
37. Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 2007;87:165-217.
38. Patel KN, Dong X. An itch to be scratched. *Neuron.* 2010;68:334-339.
39. Picardi A, Abeni D, Melchi CF et al. Psychiatric morbidity in dermatological outpatients: an issue to be recognized. *Br J Dermatol* 2000; 143: 983–991.
40. Puig S, Sorkin LS. Formalin-evoked activity in identified primary afferent: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain.* 1996;64:345-55.
41. Qin L, Zongxiang T, Lenka S, Seungil K, Kush NP, Andrew K et al. Sensory neuron-specific GPCR Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. *Cell.* 2009;139:1353-1365.
42. Ramer LM, Borisoff JF, Ramer MS. Rho-kinase inhibition enhances axonal plasticity and attenuates cold hyperalgesia after dorsal rhizotomy. *J Neurosci.* 2004;24:10796-805.

43. Rathor N, Mehta AK, Sharma AK, Mediratta PK, Sarma KK. Acute Effect of Aloe vera Gel Extract on Experimental Models of Pain. Inflammation. 2012.
44. Sawada J, Shimizu S, Tamatani T, Kanegasaki S, Saito H, Tanaka A, et al. Stem cell factor has a suppressive activity to IgE-Mediated chemotaxis of mast cells. *J Immunol*. 2005;174:3626-32.
45. Schacke H, Docke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther*. 2002;96(1):23-43.
46. Schemelz M, Schmidt R, Bickel A, Handwerker HO, Torebjork HE. Specific C-receptors for itch in human skin. *J Neurosci*. 1997;17:8003-8008.
47. Schmelz M, Schmidt R, Bickel A, et al. Specific C-receptors for itch in human skin. *J Neurosci*. 1997;17:8003-8008,
48. Schmelz M, Schmidt R, Weidner C, et al. Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens. *J Neurophysiol*. 2003;89:2441-2448.
49. Schoepe S, Schacke H, May E, Asadullah K. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. *Exp Dermatol*. 2006;15(6):406-420.
50. Sekine R, Satoh T, Takaoka A, Saeki K, Yokozeki H. Anti pruritic effects of topical crotamiton, capsaicin, and a corticosteroid on pruritogen-induced scratching behavior. *Exp Dermatol*. 2012;21:201-4.

51. Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI et al. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVPI). *Br J Pharmacol.* 2000;129:227-230.
52. Stante M, Hanna D, Lotti T. Itch, pain, and metaesthetic sensation. *Dermatol Ther.* 2005;18:308-313.
53. Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev.* 1999;51:159-212.
54. Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6:357-72.
55. Talbot S, Dias JP, Lahjouji K, Bogo MR, Campos MM, Gaudreau P, Couture R. Activation of TRPV1 by capsaicin induces functional kinin B(1) receptor in rat spinal cord microglia. *J Neuroinflammation.* 2012;9:16.
56. Tanaka A, Amagai Y, Oida K, Matsuda H. Recent findings in mouse models for human atopic dermatitis. *Exp Anim.* 2012;62:77-84.
57. Tanaka A, Matsuda H. Expression of nerve growth factor in itchy skins of atopic NC/NgaTnd mice. *J Vet Med Sci.* 2005;67:915-9.
58. Taujll K, Andoh T, Ui H, Lee JB, Kuraishi Y. Involvement of tryptase and proteinase-activated receptor-2 in spontaneous itch-associated response in mice with atopy-like dermatitis. *J Pharmacol Sci* 2009;109:388-98.

59. Thomas DA, Dubner R, Ruda MA. Neonatal capsaicin treatment in rats results in scratching behavior with skin damage: potential model of non-painful dysesthesia. *Neurosci Lett.* 1994;171:101–4.
60. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.* 1992;51:5-17.
61. Twycross R, Greaves MW, Handwerker H, et al.. Itch: Scratching more than the surface. *QJM* 2003;96:7-26.
62. Urashima R, Mihara M. Cutaneous nerves in atopic dermatitis. A histological, immunohistochemical and electron microscopic study. *Virchows Arch.* 1998;432:363-370.
63. Werfel T. The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2009;129:1878-1891.
64. Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors-noxious stimulus detectors. *Neuron.* 2007;55:353-46.
65. Yosipovitch G, Greaves MW, Schmelz M. Itch. *Lancet* 2003;361: 690-694.
66. Yudina MM, Toropina GG, Lvov A, Gieler U. Innovative neurophysiological methods in itch research: long-latency evoked potentials after electrical and thermal stimulation in patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 2011;91:656-9.

67. Zhang JL, Lin ZH, Jiang H, Yuan XB, Zhao YZ, Wu JM et al. The dynamic expression of TNF-alpha mRNA of hypertrophic scars and its roles. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 2004;20:57-9.
68. Zhang X, Du XN, Zhang GH, Jia ZF, Chen XJ, Huang DY et al. Agonist-dependent potentiation of vanilloid receptor transient receptor potential vanilloid type 1 function by stilbene derivatives. *Mol Pharmacol.* 2012;81:689-700.