

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09576

研究課題名(和文)長期ニコチン摂取が及ぼす腎・膀胱の組織学的機能的影響と禁煙効果の解析

研究課題名(英文) Analysis of the histological and functional effects due to long-term nicotine intaking on the kidney and bladder, and analysis of the effect of smoking cessation.

研究代表者

永井 崇 (Nagai, Takashi)

信州大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：50514353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ニコチン摂取と休薬効果を排尿から調べた。長期ニコチン投与群は冷えストレスに対して非投与群に比べて有意な頻尿を認めた。要因に皮膚のTRPM8発現の増加が示唆された。ニコチン投与と休薬を行っても頻尿の改善は認めず、ニコチン休薬による組織学的機能的改善は早期にはみられず時間を要することがわかった。また、ニコチン投与による血液・尿成分分析からは有意な腎機能障害は認めなかったが、N-アセチルグルコサミニダーゼの尿中増加及び多尿を認めた。以上の結果よりニコチン投与による排尿症状への影響は膀胱のみならず、皮膚や腎にも構造的機能的変化をもたらし、ニコチン休薬(禁煙)をしても早期改善を認めないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニコチンの長期摂取は膀胱をはじめ腎や皮膚の構造や機能に影響を及ぼし頻尿、多尿を来しうることが示唆された。この要因の一つとして微小組織環境の低酸素化が考えられた。さらに長期摂取後に中断しても微小組織環境の低酸素化の改善はあるものの早期には頻尿、多尿の改善はみられないことがわかった。この点から喫煙などによるニコチン摂取は様々な臓器への影響を及ぼし頻尿、多尿を来すこと、また長期喫煙によるニコチン摂取後禁煙しても早期には症状改善を認めないため排尿の観点からも喫煙しないことが大事であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effects of nicotine intake and withdrawal were examined from urination. The long-term nicotine-treatment group showed significantly more frequent urination in response to cold stress than the nicotine-free control group. An increase in TRPM8 expression in the skin was suggested as one of factors. Cessation after nicotine-treatment group did not improve the frequency of urination, suggesting that cessation of cigarette smoke could not improve lower urinary tract symptoms in a short period of time. In addition, blood and urine analyses showed no significant renal dysfunction after nicotine intake, but did show an increase in urinary N-acetyl-D-glucosaminidase and polyuria. These results suggest that nicotine administration affects urinary symptoms not only in the bladder but also in the skin and kidneys structurally and functionally, and that early improvement is not observed even after nicotine cessation (smoking cessation).

研究分野：泌尿器科学

キーワード：nicotine cold stress hypoxia LUTS TRPM8 smoking cessation polyuria

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

喫煙によるニコチン摂取の影響は頻尿などの下部尿路症状出現についても多くの報告がある。私たちもニコチンを2週間皮下投与したラットモデルを作成し、膀胱蓄尿機能に影響を与える要因の一つとなることを確認し、その要因の一つとして膀胱血流の低下を画像的に確かめた。しかし、長期摂取が排尿に及ぼす影響についての報告は疫学調査によるもの以外に無く、禁煙によるニコチン摂取中断と下部尿路症状改善の有無については評価が分かれている。

また、高齢者に夜間多尿・頻尿がみられるが、ここでもニコチン摂取が用量依存性に腎機能を低下させることが報告されている。しかし禁煙と腎機能改善の有無についての評価はない。

### 2. 研究の目的

ニコチンと排尿に注目し「長期のニコチン摂取は血管機能障害をもたらす、腎機能低下から多尿となる。また膀胱も組織学的機能的変化から蓄尿障害をきたす。これらが下部尿路症状の発症要因の一つとなる。」と仮説を立て、以下の解析を行った。

#### 1) 膀胱の評価

(実験1-A) 冷えストレス下での排尿に関し、対照群、ニコチン投与群、ニコチン休薬群で膀胱内圧測定から排尿パラメーターの差異を比較した。

(実験1-B) 微小組織環境の低酸素化と膀胱組織の構造変化について3群で免疫組織染色し画像解析した。染色内容：hypoxia inducible factor 1 (HIF1)、Uroplakin III (UP)

(実験1-C) 膀胱血流の変化と血管構造の変化について3群間で画像解析した。

(実験1-D) 冷えストレスの要因の一つとなる皮膚に発現する Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) について前肢にメンソール塗布することで冷えストレス時と同様の排尿パターンを示すか解析するとともに前肢の免疫組織染色を行い、3群間の差異について画像解析をした。染色内容：TRPM8、HIF1 $\alpha$

#### 2) 腎臓の評価

(実験2-A) ケージ内で12時間毎に明期と暗期に分けた一日の排尿測定を行い、一回排尿量、排尿間隔、一日尿量/明期・暗期尿量、飲水量を評価する。

(実験2-B) 1日尿を回収し血液及び尿成分分析を行い腎機能の評価を行う。

### 3. 研究の方法

10-11週齢雌 Sprague Dawley ラットに浸透圧ポンプを用いて4mg/kg/dayのニコチン酒石酸塩/生理食塩水を3ヵ月持続皮下投与したニコチン投与群とその対照群(生理食塩水持続皮下投与)を作成した。さらに、同様に、ニコチン酒石酸塩溶液を2ヵ月持続投与した後、1ヵ月休薬したニコチン休薬群を作成した。

#### (膀胱の評価方法)

冷えストレス実験として室温での排尿パラメーターを測定した後、4の環境下(冷気暴露)での排尿パラメーターの変化を評価した。冷えストレス実験終了後60分間の安定期間を置いた後に、室温下で剃毛した前肢にメンソール溶液塗布刺激(0、5、10%：同濃度を5分間隔で合計4回塗布。)による排尿パラメーターの変化について評価した。

膀胱内圧測定終了後、前肢皮膚及び膀胱を摘出し組織学的解析を行った。

3群のラットを作成し、室温でセボフルラン麻酔下に下腹部正中切開し膀胱を露出した上で、膀胱内に0/0.5/0.75/1.0mLと生理食塩水を注入し、Omega zoneを用いて膀胱血流を評価

した。また膀胱摘出標本を Hematoxylin-Eosin 染色し、小動脈（外径 100 - 300 μm）及び細動脈（外径 15-50 μm）の内外径比を比較した。

（腎臓の評価方法）

自由に摂食・飲水できる測定ケージに 24 時間室温下で 3 群のラットを飼育し、12 時間毎の暗期/明期に分けて以下の項目を観察した。一日尿を回収し、採血を行い、成分分析をした。

・一回尿量 , ・ 排尿間隔 , ・ 排尿回数 , ・ 暗期/明期の尿量 , ・ 一日尿量 , ・ 飲水量

#### 4 . 研究成果

##### 実験 1 -A : 冷えストレスに対する排尿パラメーターの評価

室温での排尿パラメーターは 3 群間で差はなかった。冷気暴露後始めの 20 分では、ニコチン投与群は対照群に比べて有意な排尿間隔の短縮

及び一回排尿量の減少を認めた。ニコチン休薬群はニコチン投与群と比べて有意な排尿パラメーターの改善はなかった。(表 1)

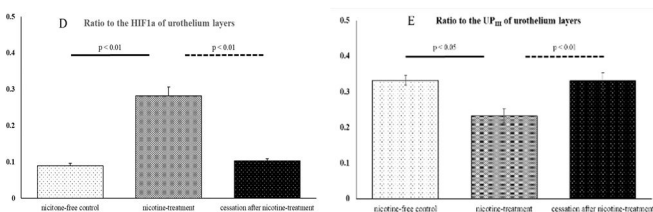
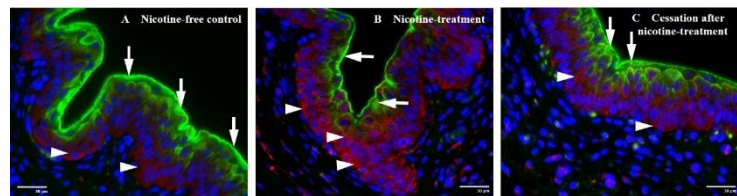
##### 実験 1 -B : 微小組織環境の低酸素化の状況と膀胱組織の構造変化

ニコチン投与群は対照群に比べて有意に HIF1 の発現が高まり、UP の発現が低下した。一方ニコチン休薬群はニコチン投与群に比べて HIF1 、UP の発現が有意に改善し、対照群との有意差を認めないまでになった。(図 1)

(cold stress)		basal pressure	micturition pressure	voiding interval	micturition volume
nicotine-free control	RT	5.63 ± 0.80	37.12 ± 2.76	11.60 ± 0.75	2.00 ± 0.08
	LT (first half)	12.20 ± 1.65**	44.98 ± 3.47	5.87 ± 0.91**	1.20 ± 0.14*
	ratio LT(first half) / RT	2.22 ± 0.16	1.21 ± 0.03**	0.51 ± 0.07**	0.60 ± 0.06
nicotine-treatment	RT	4.18 ± 0.46	29.84 ± 2.08	12.76 ± 1.63	2.52 ± 0.29
	LT (first half)	8.81 ± 1.02†	33.33 ± 4.19	4.12 ± 0.50**	0.91 ± 0.15**
	ratio LT (first half) / RT	2.14 ± 0.22	1.11 ± 0.09	0.30 ± 0.04** ††	0.34 ± 0.06††
cessation after nicotine-treatment	RT	6.20 ± 0.54	42.04 ± 2.75	12.76 ± 1.28	2.14 ± 0.19
	LT (first half)	15.28 ± 1.68** ††	49.46 ± 4.98††	3.63 ± 0.46**	0.83 ± 0.12**
	ratio LT (first half) / RT	2.53 ± 0.28	1.18 ± 0.06**	0.29 ± 0.04** ††	0.40 ± 0.06††

(RT:室温、LT:冷環境) Student-Newman-Keuls two-way analysis  
各群 RT に対して \* : p<0.05 \*\* : p<0.01 対照群 LT に対して †† : p<0.01  
ニコチン投与群 LT に対して ‡ ‡ : p<0.01

表 1 室温及び冷環境の排尿パラメーターとその変化比率



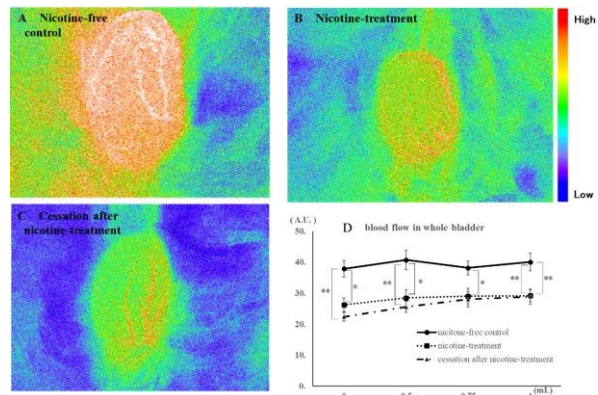
(red-arrowheads: HIF1 、 green-arrows: UP 、 blue: nucleus)

(Student-Newman-Keuls test p<0.01)

図 1 膀胱上皮における HIF1 の発現と UP の発現の比

##### 実験 1 -C: 膀胱血流の変化と血管構造の変化

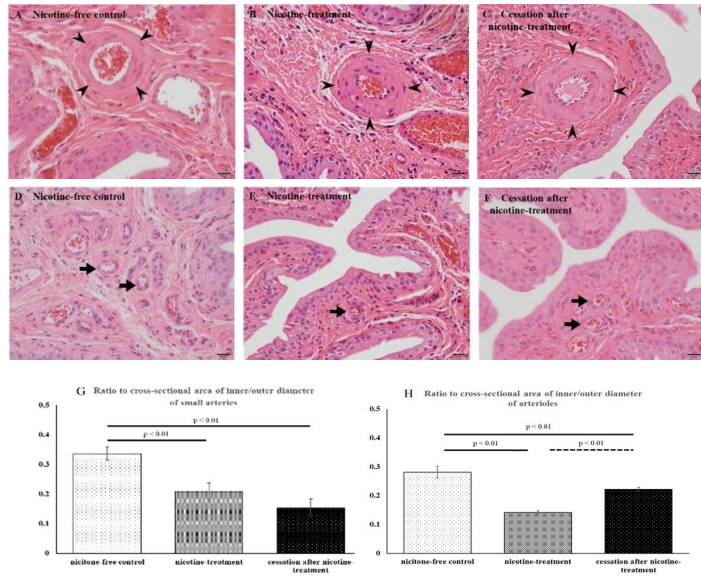
膀胱内に 0、0.5、0.75、1.0mL と生理食塩水を注入し、Omega zone を用いて膀胱血流を評価したところ各群ともどの容量においても膀胱血流速度の有意な変化を認めなかった。一方で、ニコチン投与群は対照群に比べて有意に膀胱血流速度の有意な低下を認め、休薬群は有意な血流速度の改善を認めなかった。(図 2)



(血流比較 : \* p<0.05 \*\* p<0.01, Student-Newman-Keuls test)

図 2 膀胱血流の様子

小動脈（外径 100 - 300  $\mu\text{m}$ ）及び細動脈（外径 15-50  $\mu\text{m}$ ）の内外径比を比較すると、小動脈ではニコチン投与群は対照群に比べて有意に小さくなっていた。また、ニコチン休薬群も有意な改善を認めなかった。一方で、細動脈を比較するとニコチン投与群は対照群に比べて有意に比率が小さくなっていたが、ニコチン休薬群は対照群に比べるとその比率は有意に小さいもののニコチン投与群に比べると有意に改善していた。（図3）



A-C 膀胱内小動脈（diameter: 100 - 300  $\mu\text{m}$ ）: arrowheads HE staining

D-F 膀胱内細動脈（diameter: 15 - 50  $\mu\text{m}$ ）: arrows HE staining

G,H 小動脈・細動脈の内外径比 Student-Newman-Keuls test: \*\* $p < 0.01$

図3 小動脈及び細動脈の変化

実験 1-D : メンソール塗布刺激による排尿パラメーターの変化と皮膚における TRPM8 発現変化

(menthol application)	basal pressure		micturition pressure		voiding interval		micturition volumel		
	value	ratio	value	ratio	value	ratio	value	ratio	
nicotine-free control	0%	3.90 ± 0.83	1.00 ± 0.00	35.32 ± 3.51	1.00 ± 0.00	14.35 ± 0.51	1.00 ± 0.00	2.34 ± 0.08	1.00 ± 0.00
	5%	5.02 ± 0.89	1.40 ± 0.18	33.35 ± 1.96	0.96 ± 0.05	8.96 ± 0.91 <sup>~</sup>	0.62 ± 0.06 <sup>~</sup>	1.48 ± 0.13 <sup>~</sup>	0.63 ± 0.05 <sup>~</sup>
	10%	3.94 ± 0.61	1.17 ± 0.16	27.54 ± 2.05	0.80 ± 0.07	12.18 ± 1.39	0.86 ± 0.12	2.04 ± 0.29	0.89 ± 0.15
nicotine-treatment	0%	3.41 ± 0.51	1.00 ± 0.00	27.39 ± 3.85	1.00 ± 0.00	14.34 ± 1.13	1.00 ± 0.00	2.48 ± 0.20	1.00 ± 0.00
	5%	5.43 ± 0.91	1.67 ± 0.33	27.93 ± 4.03	1.03 ± 0.10	4.63 ± 1.25 <sup>***</sup>	0.32 ± 0.07 <sup>~</sup>	0.80 ± 0.24 <sup>~</sup>	0.31 ± 0.07 <sup>~</sup> *
	10%	4.46 ± 0.54	1.33 ± 0.06	30.04 ± 3.49	1.11 ± 0.06	5.13 ± 1.11 <sup>***</sup>	0.35 ± 0.05 <sup>***</sup>	0.83 ± 0.20 <sup>***</sup>	0.32 ± 0.05 <sup>***</sup>
cessation after nicotine-treatment	0%	3.73 ± 0.39	1.00 ± 0.00	34.46 ± 4.01	1.00 ± 0.00	12.10 ± 1.15	1.00 ± 0.00	2.10 ± 0.21	1.00 ± 0.00
	5%	5.94 ± 1.32	1.56 ± 0.30	36.34 ± 5.34	1.06 ± 0.09	6.13 ± 0.79 <sup>~</sup>	0.51 ± 0.06 <sup>~</sup>	0.94 ± 0.15 <sup>~</sup>	0.46 ± 0.08 <sup>~</sup>
	10%	8.52 ± 2.91	2.75 ± 1.40	33.44 ± 3.60	1.00 ± 0.09	5.17 ± 0.61 <sup>***</sup>	0.44 ± 0.04 <sup>***</sup>	0.83 ± 0.12 <sup>***</sup>	0.41 ± 0.05 <sup>***</sup>

Student-Newman-Keuls two-way analysis

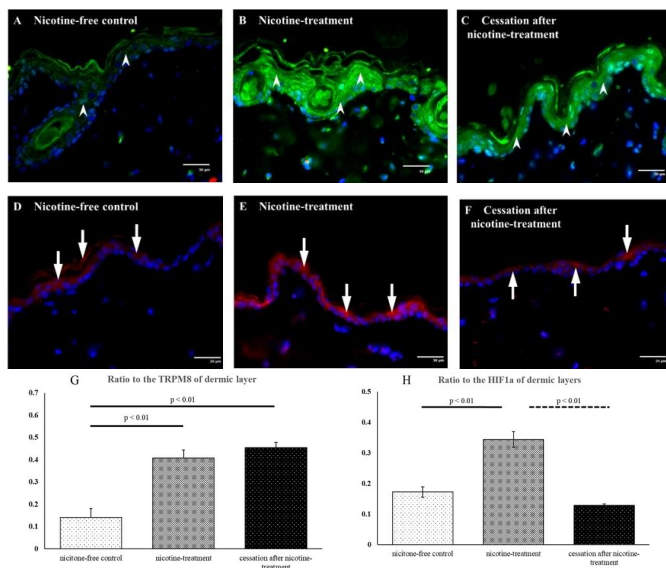
各群メンソール 0% に対して \* :  $p < 0.05$  \*\* :  $p < 0.01$  対照群メンソール 5% に対して † :  $p < 0.05$

対照群メンソール 10% に対して †† :  $p < 0.01$

表2 メンソール前肢塗布による排尿パラメーターの変化

メンソール塗布刺激ではニコチン投与群、対照群ともに 5% 液塗布で 0% 液塗布に比べ有意に排尿間隔は短くなり、一回尿量が減少したが、ニコチン投与群では 10% 液塗布時も排尿間隔及び一回排尿量が未塗布より有意に低下したのに対して対照群は有意な低下を認めなかった。ニコチン休薬群はニコチン投与群と比べて有意な改善を認めなかった。なお、蓄尿時圧、排尿圧に 3 群間で有意な差は認められなかった。（表2）

皮膚の TRPM8 の発現はコントロール群よりニコチン投与群で有意に増加していた。また、ニコチン休薬群は有意な TRPM8 の発現改善を認めなかった。しかし皮膚の HIF1 の発現



A-C 皮膚 TRPM8 発現 (green-arrowheads: TRPM8, blue: nucleus)

D-F 皮膚 HIF1 発現 (red-arrows: HIF1, blue: nucleus.)

について、ニコチン投与群は対照群に比べて有意な発現増加を認められたものの、ニコチン休薬群は有意な改善を示し、対照群と有意差を認めなかった。(図4)

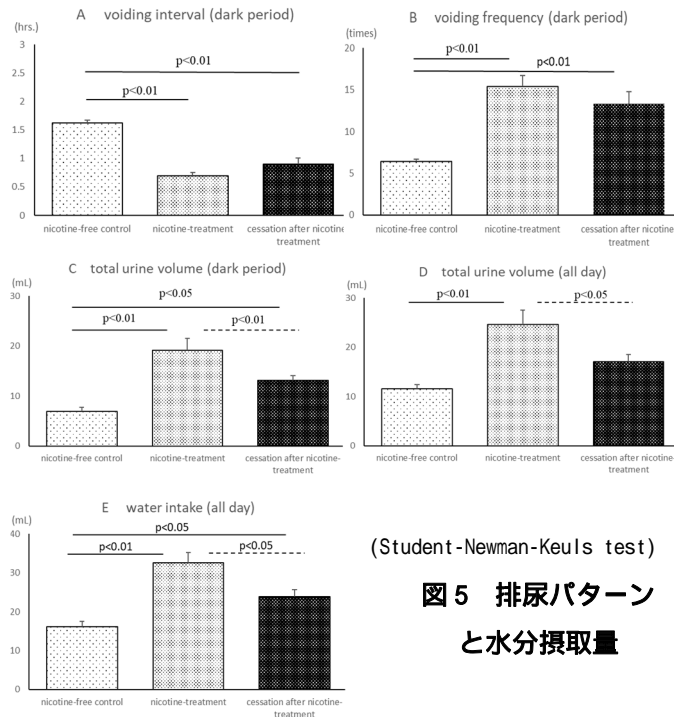
G,H TRPM8・HIF1 の真皮発現比率比較

Student-Newman-Keuls test:\*\* p<0.01

図4 皮膚におけるTRPM8発現とHIF1発現の比較

**実験2 - A : 24時間排尿測定**

ニコチン投与群で暗期の排尿間隔短縮、排尿回数の増加、暗期及び1日排尿量の有意な増加を認められた。ニコチン投与中止後も暗期の排尿間隔や排尿回数の有意な改善を認めず、暗期排尿量はニコチン投与群に比べては有意に改善したものの対照群よりは有意に多かった。また、一日の水分摂取量も対照群に比べてニコチン投与群及び休薬群は有意に多かった。ニコチン休薬群はニコチン投与群に比べて水分摂取量の有意な低下は見られた。(図5)



(Student-Newman-Keuls test)

図5 排尿パターンと水分摂取量

**実験2 - B : 血液及び尿成分分析による腎機能評価**

24時間クレアチンクリアランスに3群間で有意な差は見られなかった。また尿中タンパク質排出量も有意差はなかった。一方で尿中糖排出量はニコチン投与群及びニコチン休薬群は対照群に比べて有意に高くなっていった。(Student-Newman-Keuls test とともに p<0.01)

**考察**

ニコチン長期投与により寒冷暴露に対する頻尿増悪が認められ、休薬を行っても頻尿は改善しなかった。ニコチン投与により微小組織環境の低酸素化や粘膜構造の変化を認められたが休薬により、膀胱血流の改善が認められなかったものの尿路上皮の低酸素化は改善し、尿路上皮構造の改善は見られた。他方、皮膚のメンソール刺激によって誘発される頻尿についてもニコチン投与群及び休薬群は有意に対照群に比べて増悪していた。皮膚に発現するTRPM<sub>8</sub>がニコチン投与群で対照群より有意に増悪し、休薬しても有意な改善を認めないことが原因と思われた。

24時間排尿パターンについてはニコチン投与群で暗期に排尿回数の増加、排尿間隔の短縮が見られ、暗期の尿量及び1日の尿量が有意に増えていた。この要因に水分摂取量の有意な増加が挙げられた。ニコチン休薬により水分摂取量は有意に改善し、結果暗期尿量や1日尿量も有意な改善を認めた。なお腎機能については尿中糖排泄量がニコチン投与群及び休薬群で有意に多かったがクレアチンクリアランスは3群間で有意な差を認めなかった。

**結語**

長期ニコチン投与は寒冷暴露での頻尿の増悪や1日尿量増加などの影響を来すことが推察された。また、ニコチンを休薬しても臓器内の血流改善には差が見られたり、器官によってニコチン休薬の効果発現に差が見られたりすることが推察された。禁煙によるニコチン摂取中止を行っても早期には排尿症状の改善が認められない可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ueno M, Minagawa T, Saito T, Imamura T, Nagai T, Ogawa T, Ishizuka O	4. 巻 12(3)
2. 論文標題 Therapeutic effects of Choreito, a traditional Japanese (Kampo) medicine, on detrusor overactivity induced by acetic acid in rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 LUTS	6. 最初と最後の頁 198-205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永井 崇, 今村 哲也, 皆川 倫範, 小川 輝之, 石塚 修
2. 発表標題 ニコチン長期投与ラットの膀胱機能に対する冷気暴露およびメンソール刺激の影響
3. 学会等名 第29回日本排尿機能学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今村 哲也 (Imamura Tetsuya) (00467143)	信州大学・学術研究院医学系・助教  (13601)	
研究分担者	石塚 修 (Ishizuka Osamu) (20184541)	信州大学・学術研究院医学系・教授  (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------