

Vol. 76 No. 1-3

December 2024

CODEN: KDIZAA

ISSN 0368-5063

鹿児島大学医学雑誌

MEDICAL JOURNAL OF KAGOSHIMA UNIVERSITY

鹿大医誌

Med J

Kagoshima Univ

鹿児島大学医学学会

MEDICAL SOCIETY OF KAGOSHIMA UNIVERSITY

Index

【Case Report】

A case of popliteal artery occlusion due to adventitial cyst

Tsubasa UEMURA, Kenichi ARATA, Koichiro SHIMOISHI, Yoshihiro FUKUMOTO,
Goichi YOTSUMOTO

P1-4

【Case Report】

A case of percutaneous acute revascularization for internal carotid artery involved by oropharyngeal cancer

Hiroaki HAMADA, Takaaki HIWATARI, Shinichi KUROKI, Kenichiro TAJITSU,
Ryosuke HANAYA

P 5-10

【Original Article】

Health food intake and risk of overall death and cancer incidence in the general population of Amami Islands and mainland of Kagoshima, Japan

Takumi AKAHO, Rie IBUSUKI, Tomoko YASUDA, Kaede MIYAMOTO,
Ippei SHIMOSHIKIRYO, Daisaku NISHIMOTO, Hironori MIYAHARA,
Kouichi TOKUSHIGE, Shiroh TANOUE, Chihaya KORIYAMA, Toshiro TAKEZAKI

P11-21

【Original Article】

Inhibitory effect of silk sericin on biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolates

Tomoyo NISHIOBINO, Atsunori BABA, Tomoko FUKUSHIGE, Naoko IMUTA,
Masatoshi NAKAMURA, Junichiro NISHI, Takuro KANEKURA

P22-28

目 次

【症例報告】

外膜嚢腫により膝窩動脈閉塞をきたした一例

植村 翼, 荒田 憲一, 下石 光一郎, 福元 祥浩, 四元 剛一

1-4 頁

【症例報告】

中咽頭癌浸潤に伴う内頸動脈閉塞に対する経皮的急性期血行再建術の 1 例

濱田 寛章, 樋渡 貴昭, 黒木 伸一, 田實 謙一郎, 花谷 亮典

5-10 頁

【原著】

鹿児島県の奄美群島と本土の一般集団における健康食品摂取と全死亡・がん罹患リスクに関する研究

赤穂 拓海, 指宿 りえ, 安田 友子, 宮本 楓, 下敷領 一平, 西本 大策,
宮原 広典, 徳重 浩一, 田ノ上 史郎, 郡山 千早, 嶽崎 俊郎

11-21 頁

【原著】

シルクセリシンのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌バイオフィルム形成抑制効果

西帯野 智代, 馬場 淳徳, 福重 智子, 蘭牟田 直子, 中村 政敏, 西 順一郎,
金蔵 拓郎

22-28 頁

◆◆◆◆◆◆◆◆◆◆ 投稿のしおり ◆◆◆◆◆◆◆◆◆◆

鹿児島大学医学雑誌は、鹿児島大学医学会の機関誌で、医学および関連領域の投稿を受け付けています。投稿は、論文（総説、原著、短報、症例報告）のほか、学会の抄録なども歓迎いたします。なお、掲載料及び別刷代は、別途定めます。動物、組み換え実験を含めて研究はすべて適切な倫理審査を受けていることを原則とし、ヒトを対象とした医学研究については、「ヘルシンキ宣言」を遵守したものでなければなりません。

投稿原稿

投稿を希望する原稿は、投稿規定にしたがっており、体裁が整い、直ちに印刷可能なものでなければなりません。詳細は投稿規定をご覧ください。原則としてMS wordで作成した原稿を電子メールの添付でお送りください。図表について容量が大きい場合には査読段階では十分判別できる鮮明さがあれば原稿も含めてpdfファイルをお送りいただいても構いません。ただし、受理されたあとでは適正な解像度の画像ファイルが必要となります。容量が大きい場合（おおむね3MBを超える場合）には圧縮ファイルなどで提出してください。また、同時に、「申込用紙」と「共著者等の同意書」についても、必要な事項を記入の上、提出してください。

*** 著作権 ***

投稿者全員が、本誌に掲載される著作物の著作権が鹿児島大学医学会に帰属することを了承することが受理される条件です。かならず「共著者等の同意書」に署名してお送りください。

*** 発行予定日 ***

投稿は随時受け付けます。受理されて校正が終了次第web上でアップされます。また、年度ごとに医学中央雑誌に提供され掲示されます。

雑誌についての問い合わせおよび送付先

〒 890-8544

鹿児島市桜ヶ丘8丁目35-1

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 疫学・予防医学分野 気付

編集委員会事務 宛

電話 099-275-5298 (郡山)

Eメール : igakuza@m2.kufm.kagoshima-u.ac.jp

鹿児島大学医学雑誌のホームページ：<https://www3.kufm.kagoshima-u.ac.jp/medikago/>

発行 2023年12月

Editorial Office

c/o Department of Epidemiology and Preventive Medicine

Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

8-35-1, Sakuragaoka.

Kagoshima, 890-8544 Japan

編集と発行

鹿児島大学医学会

〒 890-8544

鹿児島市桜ヶ丘8丁目35-1

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

疫学・予防医学分野 気付

鹿児島大学医学会
Med Soc Kagoshima Univ

外膜嚢腫により膝窩動脈閉塞をきたした1例

植村翼, 荒田憲一, 下石光一郎, 福元祥浩, 四元剛一

鹿児島市立病院心臓血管外科

A case of popliteal artery occlusion due to adventitial cyst

Tsubasa UEMURA, Kenichi ARATA, Koichiro SHIMOISHI,
Yoshihiro FUKUMOTO, Goichi YOTSUMOTO.

Department of Cardiovascular Surgery, Kagoshima-city Hospital
(Received 16 June 2023; Revised 22 November 2023; Accepted 17 January 2024)

* Address to correspondence

Tsubasa UEMURA

Department of Cardiovascular Surgery,

Kagoshima-city Hospital

37-1 Uearata, Kagoshima, Japan, 890-0055

Phine: +81-99-230-7000

e-mail: uemura.tsubasa283@gmail.com

Abstract

A 73-year-old woman presented to hospital with pain in the right leg. Right popliteal artery occlusion was diagnosed via ultrasound, and she was referred to our department for treatment. Close examination revealed that the popliteal artery was occluded by a cystic lesion, and surgery was performed. The popliteal fossa was opened, and a cystic lesion and an elastic-hard mass, both containing a gelatinous substance, were identified around the right popliteal artery. The content of the lesion was aspirated, and the walls were mobilized and resected to complete the procedure. Although pathology did not provide a diagnosis, this case was thought to be an occlusion of the popliteal artery caused by an adventitial cyst.

Key words: adventitial cyst, popliteal artery, arterial occlusion

抄録

73歳女性, 右下肢疼痛を自覚し前医を受診した。エコー検査で右膝窩動脈閉塞と診断され, 加療目的に当科紹介となった。精査の結果, 嚢胞性病変による膝窩動脈閉塞を認めたため手術を行った。右膝窩動脈周囲に嚢胞と弾性硬の腫瘤を認め, ゼリー状の内容物が充満していた。内容物の吸引と壁を可及的に切除し手術を終了した。病理で確定診断が得られなかったが, 本症例は外膜嚢腫により膝窩動脈閉塞をきたしたものと考えられた。

緒言（はじめに）

間欠性跛行を呈する疾患の多くは閉塞性動脈硬化症が原因であるが、その他の鑑別として嚢胞性病変（外膜嚢腫、ガングリオン）が挙げられる。嚢胞性病変により脈管閉塞をきたした報告は少ない。今回我々は外膜嚢腫により膝窩動脈閉塞をきたした1例を経験したので考察を加え報告する。

症例

症例：73歳 女性。

主訴：右下肢安静時疼痛，間欠性跛行。

現病歴：1ヶ月前に急激な右下肢の安静時疼痛を自覚した後，間欠性跛行が持続していた。前医を受診し，エコー検査で右膝窩動脈の閉塞を認めたため精査加療目的に当科紹介となった。

生活歴：飲酒・喫煙なし。

現症：身長 141 cm, 体重 45 kg, 右膝窩動脈・足背動脈・後脛骨動脈触知不可，その他四肢動脈触知可。

血液生化学検査：WBC $6.4 \times 10^3/\mu\text{L}$, Hb 12.0 g/dL, PLT $220 \times 10^3/\mu\text{L}$, PT-INR 0.96, APTT 20.8秒, AST 24 U/L, ALT 11 U/L, BUN 17.9 mg/dL, Cre 1.14 mg/dL, CK 178 U/L, CRP 0.08 mg/dL。足関節上腕血圧比 (ABI)：右) 0.35, 左) 0.96。

皮膚灌流圧 (SPP)：右足底/足背, 40/48 mmHg, 左足底/足背, 76/70 mmHg。

下肢動脈エコー検査：右膝関節背側上方に $18 \times 17 \text{ mm}$, $26 \times 21 \text{ mm}$ 程度の嚢胞があり，嚢胞で圧排され右膝窩動脈内の血流が消失していた。

造影CT検査：右膝関節背側上方に多房性嚢胞を認め，右浅大腿動脈遠位部-膝窩動脈が閉塞していた (Figure 1)。

MRI検査：T2強調画像で高信号を呈する 41 mm , 12 mm 大の多房性嚢胞を認め，右膝窩動脈が圧排されていた。膝関節上方の嚢胞は膝関節後面から立ち上がっており，膝窩動脈を圧迫している嚢胞は周囲の嚢胞と連続していた (Figure 2)。

下肢動脈造影検査：右膝窩動脈に限局性の閉塞を認めた (Figure 3a)。

血管内超音波検査 (IVUS)：右膝窩動脈外に嚢胞を認め，動脈は圧排されていた (Figure 3b)。

治療方針：術前，右間欠性跛行を認めており画像検査において嚢胞性病変による右膝窩動脈の圧排と閉塞を認めた。鑑別は外膜嚢腫もしくはガングリオンを挙げ，手術の方針とした。

手術所見：全身麻酔導入下に腹臥位で膝後面にS状の皮膚切開を置いた。皮下組織と筋膜を切開し，膝窩動静脈と脛骨神経を同定し剥離を進めた。動静脈は周囲組織と高度に癒着していた。術野の中枢側に，術前同定されていた嚢胞を認めたが同部位は動脈を圧迫しておらず，膝窩動脈の拍

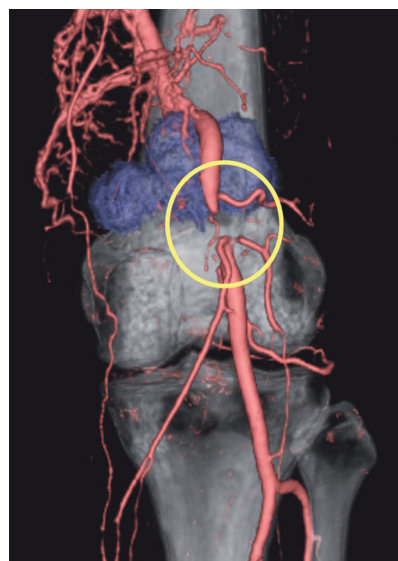


Figure 1
Computed tomography before the operation. The popliteal artery is occluded (yellow circle).

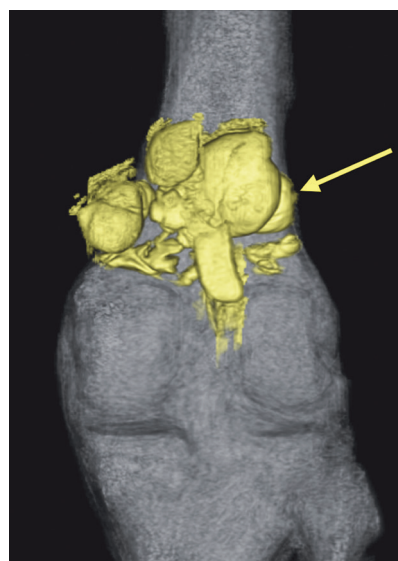
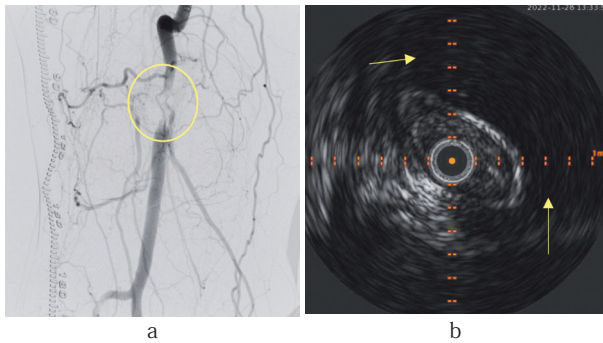


Figure 2
Magnetic resonance imaging before the operation. There is continuity between cysts (yellow arrow).

動は良好であった。嚢胞を穿刺し，黄色透明のゼリー状の内容物を排出した後，被膜を可及的に切除した。嚢胞より 2 cm 程度末梢側に膝窩動脈との境界が不明瞭な弾性硬の腫瘤を認め，末梢の拍動は微弱であった。同部位が閉塞起点と判断し剥離を進め切開すると，無色透明のゼリー状の内容物が排出された。内腔を観察すると動脈内膜もしくは中膜と思われる白色の構造物を同定した。内容物は外膜下に充満していると考えられ，術中は外膜嚢腫と診断した (Figure 4)。外膜と考えられる組織の切開を広げると，膝窩動脈の拍動は良好となった。膝窩動脈のFlowは 50 mL/min , PI 4.0であり，PGE1製剤を動注するとFlowは 150 mL/min , PI 1.0となった。内容物を摘除し，血管壁を補強するため

**Figure 3**

a) Angiogram before the operation. There was focal occlusion of the popliteal artery (yellow circle).
b) IVUS shows low echo lesion (yellow arrow) around the popliteal artery.

腫瘍壁を連続縫合で閉鎖した。

病理所見：膝窩動脈周囲の囊胞壁と腫瘍壁を提出した。いずれもムチンの沈着を伴う線維性結合組織であり明らかな血管壁構造を認めなかった。

術後経過：術後6日目に下肢動脈エコー検査と造影CT検査を行い、囊胞は残存していたが、右膝窩動脈に狭窄や閉塞はなかった。右下肢症状は改善しており、術後10日目に自宅退院となった。

考察

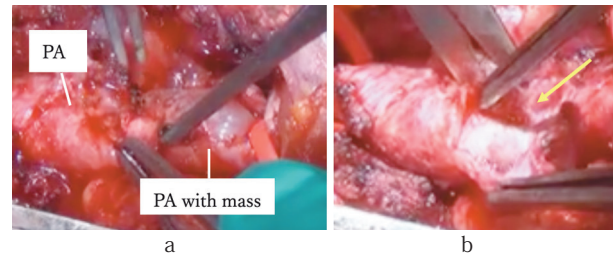
間欠性跛行を呈する疾患は、多くは閉塞性動脈硬化症が原因であるが、その他の鑑別として囊胞性病変（外膜囊腫、ガングリオン）が挙げられる¹⁾。囊胞性病変により症状を呈する頻度は患者の1,200例に1例程度、あるいは下肢動脈造影検査の1,000例に1例程度と少ない^{1),2)}。これらは動脈硬化の少ない、比較的若く活動量の多い男性、非喫煙者に発症すると報告されている³⁾。

膝窩動脈外膜囊腫は動脈の外膜内に発生した囊腫により動脈内腔が分節的に狭窄や閉塞をきたし、下肢の虚血症状を呈する疾患である⁴⁾。原因として、①反復性外傷理論、②ガングリオン理論、③全身性疾患理論、④発達理論（細胞封入理論）、⑤関節（滑液）理論が提唱されているが、正確な原因は不明である⁵⁾。

ガングリオンは関節包や腱鞘から発生する良性腫瘍であり、ゼリー状の内容物を内包している⁶⁾。一般的には手関節に好発するが、膝関節や股関節、足関節など関節や腱鞘があるところであればいかなるところにも発生する可能性があり、股関節由来のガングリオンによる大腿動脈閉塞例が報告されている^{3),6)}。

囊胞性病変の典型的な症状は突然発症する腓腹部の間欠性跛行である⁵⁾。囊胞が限局的であること、流入・流出血管の性状に異常はないため高度慢性下肢虚血への進行は稀である⁵⁾。

診断は身体診察と画像診断（造影CT検査、MRI検査、

**Figure 4**

a) Intraoperative photograph of the right popliteal fossa. The right popliteal artery and the mass was tightly adherent, and the boundary was indistinct. PA; popliteal artery
b) Observation of the vessel lumen identified a white structure that appeared to be the arterial intima or tunica (arrow).

エコー検査、血管造影検査、血管内超音波検査; IVUS) が有用である¹⁻⁵⁾。身体診察では、正常または減弱した足部動脈拍動、および膝窩動脈の血管性雑音を認める⁵⁾。また、下肢伸展位でドプラー聴取できる足部動脈拍動が、股関節と膝の屈曲で消失する可能性がある（石川徴候）^{5),7)}。これは動脈の圧排が完全でない場合に膝関節の屈曲により囊胞の圧排が強くなるためであると考えられている。画像診断では病変が局限しており、その他の部位では動脈硬化性病変がないことが特徴であり、血管内腔は外部からの圧迫で狭小化しているように見える¹⁾。MRI検査ではT2強調画像で高信号域を呈する境界明瞭な像が得られる¹⁾。また血管造影検査では、滑らかな全周性の限局性狭窄像（hourglass appearance）や半月状に圧迫される狭窄像（scimitar sign）が確認でき⁸⁾、IVUSは、狭窄部位で囊胞の分布を確認できるため、囊胞性病変の鑑別に有用とされる^{1),3)}。

囊胞性病変は無治療で自然寛解した報告もあるが、症状が出現した際には治療適応となる^{4),6)}。治療は非切除的治療と切除的治療があり、前者は血管内治療（EVT）、CTまたは超音波ガイド下の経皮的囊胞吸引、および囊胞の外科的排出（囊胞切除を含む）が挙げられ、後者は囊胞切除に加えて直接吻合、パッチ形成、置換、バイパスがあり膝窩動脈血栓性閉塞の合併または広範な動脈変性の場合に選択される^{2),5)}。本邦における外膜囊腫に対する116例の報告があるが、外膜囊腫・ガングリオンいずれに関しても長期成績は不明である²⁾。

外科的治療は茎部からの囊胞切除が理想であるが、神経や重要血管との癒着例では完全切除が困難である⁶⁾。完全切除が困難な場合には、再発を防ぐため囊胞と近傍の関節包との連続性は断つ必要がある^{3),9)}。

本症例は囊胞と外膜の癒着が強くそれぞれの境界が肉眼で同定できず、切開時には外膜と中膜の間がゼリー状物質で満たされているように見えた。剥離操作の段階で関節包との連続性を断ち、また内容物の吸引と囊胞壁の可及的切除で動脈触知が明らかに改善したため完全切除

までは行わなかった。

術後の症状再燃に関してもまとまった報告はない。本症例は術後のエコー検査で膝窩動脈の狭窄や閉塞は認めないものの嚢胞は残存していた。今後症状が再燃する可能性はあるが、上述のように完全切除は困難であったため、最低限の再発予防策を講じた。術後であり周囲組織との癒着はさらに強固になっていることが想定されるため、今後下肢症状の再発を認めた場合に選択する治療としてはエコーガイド下穿刺あるいはバイパス術が望ましいと考えている。

本症例はMRI検査で動脈を圧排している嚢胞と、膝関節周囲組織の動脈圧迫に関与していない嚢胞との連続性があり、下肢造影検査を行った際のIVUSでは嚢胞が血管外に位置していたため、術前診断ではガングリオンの可能性が高いと想定された。術中所見で、腫瘍と血管外膜の癒着が強く境界不明瞭であり、切開を加えた際に外膜と中膜の間に内容物が満たされているような所見であったため術中診断は外膜嚢腫とし、病理検査では確定診断が得られなかった。

外膜嚢腫の原因は未だ確定されていないが、理論の一つにガングリオン理論が挙げられており⁹⁾、本症例も外膜嚢腫の1例であったと考えられる。

結語

外膜嚢腫により膝窩動脈閉塞をきたした1例を経験した。本症例のような病態は稀であるが、下肢の虚血症状を呈する疾患として鑑別に挙げる必要がある。

利益相反の開示

共著者全員が利益相反はない。

文献

- 1) 平本 明德. 血管内超音波検査 (IVUS) が診断に有効であった膝窩動脈外膜嚢腫の1例. 日本臨床外科学会雑誌 2011; 72: 818-821.
- 2) 高橋 英樹, 西岡 成知, 蒔 隆. 間欠性跛行にて発症した膝窩動脈外膜嚢腫に対する1手術例- 本邦における報告 116例の検討を含めて-. 日本心臓血管外科学会雑誌 2010; 39: 220-225.
- 3) 矢田 真希, 庄村 心, 鈴木 仁之, ほか. 股関節由来のガングリオンによる左大腿動脈閉塞を呈した症例. 日本血管外科学会雑誌 2017; 26: 117-120.
- 4) 月岡祐介, 村井則之. 自然回復した膝窩動脈外膜嚢腫の1例: 過去の報告例の検討. 日本血管外科学会雑誌 2011; 20: 937-940.
- 5) 工藤 敏文. 非動脈硬化性末梢動脈疾患- 膝窩動脈疾患について-. 日本血管外科学会雑誌 2022; 31: 201-208.
- 6) 眞岸 克明, 和泉 裕一, 清水 紀之. ガングリオンにより膝窩静脈閉塞をきたした1例. 静脈学 2013; 24: 327-331.
- 7) 石川浩一, 三島好雄, 小林茂. 膝窩動脈外膜嚢腫について. 日本外科学会雑誌 1960; 61: 264-273.
- 8) 湯浅 右人, 藤井 太郎, 山本 直樹, ほか. 膝窩部嚢腫性病変により間欠性跛行を生じた1例. 心臓 2012; 44: 807-811.
- 9) 川井陽平, 森前博文, 松下昌裕. 膝関節包との連続を認めた膝窩動脈外膜嚢腫の1例. 日本血管外科学会雑誌 2016; 25: 97-100.

中咽頭癌浸潤に伴う内頸動脈閉塞に対する 経皮的急性期血行再建術の1例

濱田寛章^{1*)}, 樋渡貴昭¹⁾, 黒木伸一¹⁾, 田實謙一郎¹⁾, 花谷亮典²⁾

川内市医師会立市民病院脳神経外科¹⁾ 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科脳神経外科学²⁾

A case of percutaneous acute revascularization for internal carotid artery involved by oropharyngeal cancer

Hiroaki Hamada^{1*)}, Takaaki Hiwatari¹⁾, Shinichi Kuroki¹⁾,
Kenichiro Tajitsu¹⁾, Ryosuke Hanaya²⁾

1) Department of Neurosurgery, Sendai Medical Association Hospital

2) Department of Neurosurgery, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University

(Received 17 January 2024; Revised 6 March 2024; Accepted 18 March 2024)

* Address to correspondence

Hiroaki HAMADA

#Fujimoto general hospital (# Current affiliation)

17-1 Hayasuzu, Miyakonojo, Miyazaki, Japan, 885-0055

Phone: +81-986-22-1717

Abstract

Internal carotid artery stenosis commonly occurs after radiotherapy for head and neck cancer; however, there are only a few reports on cases of stenosis or occlusion of the internal carotid artery due to tumor enlargement or invasion and acute endovascular treatment in such cases. We report a case of hemodynamic cerebral infarction caused by compression and due to invasion of oropharyngeal cancer in which neurological symptoms improved after acute endovascular revascularization.

A 61-year-old woman ongoing radiation chemotherapy following excision of a right lateral pharyngeal cancer impaired consciousness and left hemiplegia. Head MRI showed multiple cerebral infarctions in the right anterior cerebral artery region, and MRA revealed occlusion of the right common carotid artery. A tumor exposed in the neck displayed blood oozing. Acute endovascular revascularization was performed approximately 3 hours after the last time the patient was seen well. The right internal carotid artery was occluded at a position invaded by the tumor. Aspiration of the thrombus from the proximal area induced recanalization of the internal carotid artery. Percutaneous transarterial angioplasty was performed for the remaining severe stenosis. Neurological findings markedly improved, and there was no progression of

the cerebral infarction. Enhanced CT on the 5th day showed tumor invasion into the internal carotid artery; however, on the 15th day, the right internal carotid artery was re-occluded, resulting in transient paralysis of the left upper extremity. At that time, stenting was reconsidered to prevent recurrence, but no additional treatment was performed, and the patient was discharged with a modified Rankin Scale score of 3. Even in cases of carotid stenosis caused by the involvement or compression of the internal carotid artery, treatment must be considered for temporary blood flow restoration, leading to favorable patient outcomes.

Key words: oropharyngeal cancer, internal carotid artery occlusion, percutaneous transluminal angioplasty

抄録

【はじめに】頭頸部癌の放射線治療後に内頸動脈狭窄を生じることはよく知られているが、腫瘍の増大や浸潤により内頸動脈が狭窄や閉塞を生じた症例や、これに対する急性期の血管内治療に関する報告は少ない。中咽頭癌による内頸動脈の圧迫と浸潤により血行力学的脳梗塞を発症した症例に対して、急性期血行再建を行い神経症状の改善を得た症例を経験した。

【症例】61歳女性。右中咽頭側壁癌と多発性頸部リンパ節転移に対して摘出術後に放射線化学療法を継続中であったが、意識朦朧となり救急搬送された。当院来院時の意識はJapan Coma ScaleでII-20。右共同偏視、左顔面神経麻痺、中等度構音障害、および左上下肢ともにManual Muscle Testing 1/Ⅴの左片麻痺を認めた。頭部Magnetic resonance imaging (MRI)にて右前大脳動脈領域に散在する多発性脳梗塞を認め、Magnetic resonance angiography (MRA)で右総頸動脈起始部は閉塞し、側副血行は開存しているものの、中大脳動脈領域の描出は低下していた。最終健常時刻から3時間程度であったが、頸部に露出した腫瘍からの出血があり重度の貧血も伴うために、血栓溶解療法は行わず直接急性期血行再建術を施行した。右総頸動脈が腫瘍内で閉塞しており、閉塞部よりも中枢側でカテーテルから血栓を吸引することで再開通が得られた。高度狭窄が残存したために、バルーン拡張による経皮的血管形成術を施行し、良好な頭蓋内の再灌流が得られた。さらに頸動脈ステント留置術も検討したが、頸部に露出した腫瘍からの出血をとめない、重度の貧血を呈していたことから、留置後に用いる抗血小板薬による出血リスクの増悪を懸念して、ステント留置は行わなかった。術後、神経学的所見は著明に改善し、術翌日の頭部MRIでも脳梗塞の拡大は認めなかった。第5病日の造影Computed Tomography (CT)では、狭窄した内頸動脈の周囲を腫瘍がとり囲み、内頸動脈の周囲には気泡を認めたことから、内頸動脈に腫瘍が浸潤していると考えられた。第15病日に一過性の左上肢麻痺を認め、頭部MRIでも右内頸動脈の再開塞を認めたが、側副血行路の発達により症状は一過性であった。病状の進行と内頸動脈への腫瘍浸潤によるCarotid blowout syndrome (CBS) 予防のために、Percutaneous Transluminal Angioplasty (PTA) やCarotid Artery Stenting (CAS) を再度検討したが、術後に抗血小板剤の使用は必須であるため、出血リスクを考慮して追加治療は行わなかった。軽度の左片麻痺が後遺するも、modified Rankin Scale 3と日常生活動作はほぼ自立した状態で自宅退院した。

【考察・結論】易出血状態にある担癌患者では、術後の抗血小板の使用が困難なためにステント留置術の適応が躊躇される。側副血行路がある症例では、バルーンを用いた経皮的血管形成術による血流再開で発症時の虚血の重症化を防ぎ、側副血行路の発達により虚血耐性獲得を期待して再開塞に備える方法は、急性期の判断として検討に値すると考えられた。

はじめに

頭頸部癌に関連して、脳梗塞を生じることはよく知られている。特に放射線治療を受けた患者は内頸動脈狭窄をきたす確率が高いとされ、放射線治療技術の向上とともに注目が高まっている¹⁾。一方で、腫瘍の増大や浸潤により内頸動脈の狭窄や閉塞をきたす報告や、これを原因とする脳梗塞に対して急性期血行再建術を行った報告は少ない。頭頸部癌に対する放射線治療後に腫瘍の圧迫と浸潤により右内頸動脈閉塞を発症し、血管内手術による急性期血行再建術にて神経症状の改善を得た症例を経験したので、文献的考察を交えて報告する。

症例

症例は既往歴に甲状腺機能低下を伴う61歳女性。右中咽頭側壁癌 (p16陽性, T2N1M0) に対して、X-2年から化学放射線療法中であった。腫瘍の進行に対して右中咽頭側壁経口切除と右前頸部郭清術 (pT1N3bM0) が行われた後に、化学療法を継続されたが制御は不良であり、modified Rankin Scaleは2相当であった。X年Y月に頸部の腫瘍露出部から出血した後に意識障害を生じたため、近医へ救急搬送された。意識障害、右共同偏視、および左片麻痺を認め、頭部Magnetic resonance imaging (MRI) にて急性期脳梗塞が疑われたため、発症から3時

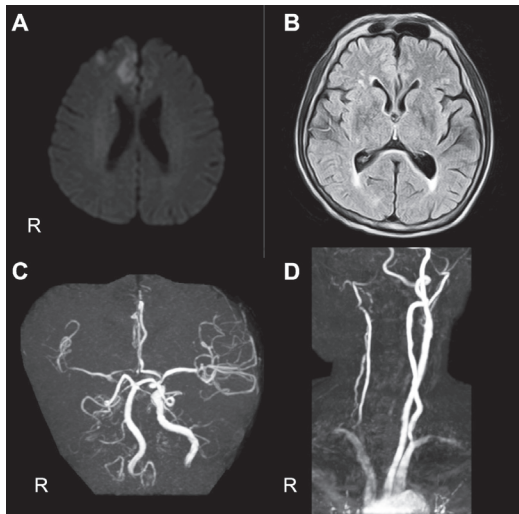


Figure 1 Preoperative magnetic resonance imaging
Infarction in the right frontal lobe is observed on diffusion-weighted imaging (DWI) (A). Hyperintense vessel sign was observed in the sulcus of the right temporal lobe on the fluid-attenuated inversion recovery image (B). Magnetic resonance angiography showed low flow in the right carotid artery (C, D). R; right.

間半程度で当院に紹介搬送となった。来院時の意識は Japan Coma ScaleでⅡ-20, 右共同偏視, 左顔面神経麻痺, 中等度構音障害, および左上下肢ともにManual Muscle Testing (MMT) 1/Vの左片麻痺を認め, National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) スコアは24/42点であった。緊急頭部MRIでは, diffusion-weighted image (DWI) 画像で右前大脳動脈領域の散在性高信号を認め, Fluid Attenuated Inversion Recovery (FLAIR) 画像で右内頸動脈領域に広範なhyperintense vessel signを認めた (Figure 1)。Magnetic resonance angiography (MRA) では右総頸動脈が起始部から閉塞し, 前交通動脈を介したcross flowを認めた。

Alberta Stroke Program Early Computed Tomography Score-DWI (ASPECTS + W)で10/11と血栓溶解療法の適応時間内であったが, 外表面に露出した右頸部腫瘍からの出血が持続し, Hb 5.7 g/dLと重度の貧血を伴ったため, 血栓溶解療法は行わず直接血管内治療を行う方針とした。右大腿動脈からアプローチを行い, バルーン付きガイディングカテーテルを右総頸動脈起始部に誘導して造影すると右総頸動脈末梢の閉塞を認めた。まず, 閉塞部よりも末梢側にカテーテルを誘導し, バルーンを拡張して総頸動脈を閉塞した後に, シリンジで手動的に血栓を吸引した。造影にて再開通を確認したが, 頸部内頸動脈には高度狭窄を伴い, 頭蓋内へ流入する順行性血流は遅延していた。頭蓋内血管に閉塞部位は見られず, 頸部内頸動脈の閉塞による血行力学的脳梗塞と判断した。マイクロカテーテルとマイクロガイドワイヤーを内頸動

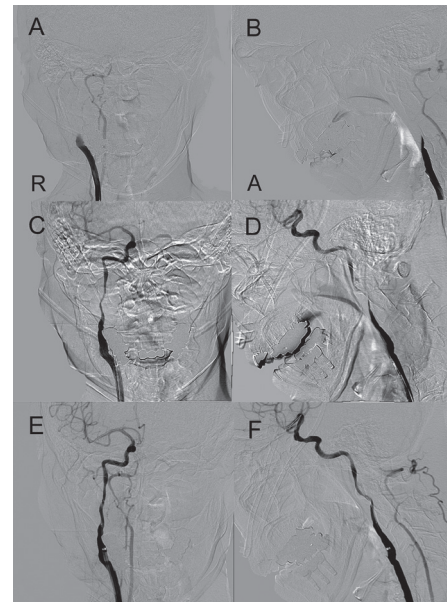


Figure 2 Progress during endovascular treatment
Digital subtraction angiography (DSA) revealed occlusion of the distal right common carotid artery (A, B). After aspiration, DSA showed slow blood flow, indicating recanalization of the common carotid artery (C, D). DSA showed effective dilatation accomplished successfully (E, F). A; anterior, AP; anteroposterior, R; right.

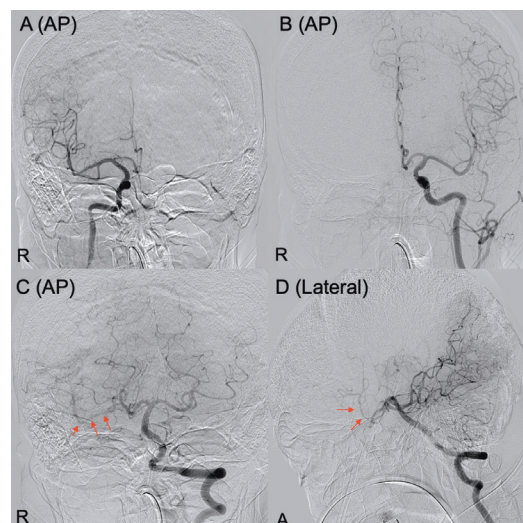


Figure 3 Postoperative digital subtraction angiography (DSA)
DSA clearly showed the right middle cerebral artery (A). Leptomeningeal anastomosis by the anterior communicating artery (B). Collateral circulation by the posterior communicating artery (arrow) (C, D). A; anterior, AP; anteroposterior, R; right.

脈錐体部へ誘導し, Percutaneous Transluminal Angioplasty (PTA) バルーンを狭窄部に誘導し, PTAを遠位から順に3カ所をおこなった。バルーン径がより大きいPTAバルーンを用いて, 同様に3カ所のPTAを追加することで頭蓋内血流は更に改善した (Figure 2)。引き続き頸動脈ステント留置術 (Carotid Artery Stenting: CAS) も検討し

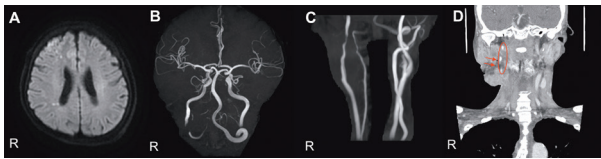


Figure 4 Postoperative images

Diffusion-weighted image showed a small infarction (A). Head (B) and neck (C) magnetic resonance angiography showed recanalization of the internal carotid artery on postoperative day 1.

Contrast computed tomography on postoperative day 5 detected air (arrow) near the internal carotid artery (circle) (D).

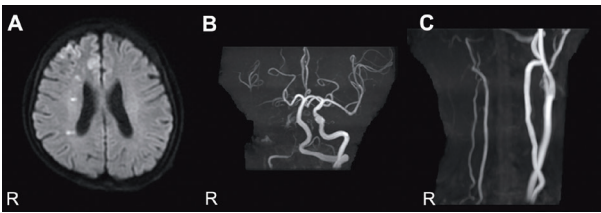


Figure 5 Magnetic resonance imaging (MRI) during the recurrence of internal carotid artery occlusion on postoperative day 15

Diffusion-weighted image showed a small infarction (A). Magnetic resonance angiography of the head (B) and neck (C) detected recurrence of the internal carotid artery occlusion.

たが、腫瘍出血を伴う担癌患者であり、ステント内閉塞予防のために必要な術後の抗血小板薬投与による易出血性の増悪が危惧された。右前大脳動脈と右後大脳動脈からのleptomeningeal anastomosis、後交通動脈を介する側副血行路の開存が良好であることが確認できたため (Figure 3)、ご家族からの、原疾患の治療にならないのであればステント留置を希望しない、という意向も踏まえステント留置は行わず手技を終了した。Door to punctureは22分、onset to recanalizationは5時間44分であった。

術後にNIHSSは6点へと改善し、ごく軽度の左麻痺と、ごく軽度の左半側空間無視が後遺するにとどまった。頭部MRIで右前頭葉と基底核の一部に新規梗塞病変を認めたが、MRAでは頸部内頸動脈及び頭蓋内血管の描出も良好となった。第5病日に施行した造影CTでは、腫瘍内を走行する内頸動脈が強く狭窄している所見とともに、腫瘍の内頸動脈浸潤を示す血管周囲の気泡を認めた (Figure 4)。その後、リハビリテーションが進んでいた第15病日に一過性の左上肢麻痺を来し、頭部MRIで右前頭葉に散在性の新規脳梗塞と、MRAで右内頸動脈の再開塞を認めた (Figure 5)。血管撮影で確認できたように、側副血行路を介して頭蓋内の灌流が保たれ、一過性の軽微な症状に留まったと思われた。

再開塞に対し、PTAやcovered stentを用いたCarotid Artery Stenting (CAS) を再度検討したが、術後に抗血小板剤の使用は必須であり、腫瘍出血の管理が困難になることが予想されたため、本人やご家族と相談の上で再度

の血管内治療は行わないこととした。左上下肢MMTは4、modified Rankin Scaleは発症前の2から3へと低下したものの、日常生活動作はほぼ自立した状態で第27病日に自宅退院した。

考察

頭頸部癌は進行に伴い頸動脈狭窄や脳血管障害をきたす可能性があり、なかでも口腔癌、喉頭癌、咽頭癌の患者で発症しやすい²⁾。また、頭頸部癌の放射線治療後には、約18-38%の患者で内頸動脈狭窄を発症することが報告されている¹⁾。約5年程度で発症²⁾し、特に10Gy以上の線量を用いた放射線治療後には無症候性内頸動脈狭窄を所見として認められるようになる³⁾。さらに、高血圧や脂質異常症のある患者では放射線治療後の頸動脈狭窄が急速に進行することや⁴⁾、喫煙や糖尿病が放射線治療後の頸動脈狭窄進行に関連することが報告されている⁵⁻⁶⁾。本症例は放射線治療後の頸動脈狭窄をきたすリスク因子として、放射線照射量、高血圧、および喫煙が該当する一方で、発症時期が放射線照射後から2年と短いこと、急性閉塞で発症していること、腫瘍内で血管狭窄が顕著であったことから、内頸動脈閉塞の主たる原因は放射線障害よりも腫瘍による物理的な圧迫や浸潤によるものと考えた。頭頸部癌に伴う症候性内頸動脈狭窄症の報告は少ないが、内頸動脈閉塞や高度狭窄によって頭蓋内灌流低下が症候化する場合には、バイパス手術や頸部ステント留置が検討される。頸動脈ステント留置後の注意点として、YuらはCAS後に生じるステント内狭窄の発生率は、病変長が長いほど高まるとも報告しており⁷⁾、CAS後はステント内狭窄予防に抗血小板薬が必要なため、個々の症例で検討を要するとしている。また、岡本らは内頸動脈浸潤癌に対して、頭蓋外でのバイパス術による根治術や良好な側副血行路が存在する場合には内頸動脈を含めた一期的な内頸動脈の切除を行っている。またZhouyangらは、ハイフローバイパスを含めた浅側頭動脈-中大脳動脈バイパス術を行い、その後、腫瘍の内頸動脈への浸潤を遅らせるために内頸動脈閉塞術も行った群では、全体の死亡率に差はないものの、同時期に放射線治療または化学療法を受けた群よりも3ヶ月後の死亡率が有意に低下したことを報告している⁸⁾。重度の内頸動脈狭窄症例ではバイパス手術が検討される場合もあるが、術後に抗血小板剤の投与が必須となるため、腫瘍からの出血が持続している本症例において適応は困難であった。

頭頸部癌に対する放射線治療後の合併症として重要なものに、頭頸部腫瘍に対する放射線治療後に動脈破裂を引き起こすCarotid blowout syndrome (CBS) がある。発生は稀ではあるが、動脈壁の壊死に伴って発生し、出血により気道閉塞をきたす可能性もある致死的な疾患であ

る¹¹⁻¹²⁾. Carlosらは、CBSを3タイプに分類し、画像検査で血管周囲に気泡を認めるものをThreatened (type I)、圧迫などで一時止血が可能な程度の出血を伴うImpending blowouts (type II)、急速に致命的な経過を辿るCarotid system hemorrhage (type III)の3タイプに分類し、中でもtype IIIは致命的となるため、早期発見し予防する必要があるとしている¹²⁾. CBSへの対策として、Matsumotoらは循環動態管理下での総頸動脈近位側の結紮が、脳梗塞の発症リスクを低減させ、CBS発症予防にも有用としている¹³⁾. 岡本らも、内頸動脈切除症例では術後1年目の無再発生存率が50%を超えるのに対し、手術未施行例は全て1年以内に局所腫瘍死したことから、外科的治療の有効性を報告している¹⁴⁻¹⁵⁾. また、岡本らが示すように、血管内治療による仮性動脈瘤などの出血源閉塞や、側副血行路が良好で虚血耐性があれば頸動脈自体を閉塞するなどの選択肢もある¹⁶⁾. さらにBondらはtype Iとtype IIを仮性動脈瘤と定義し、コイル塞栓術やcovered stentによる治療が周術期合併症の少ない安全な治療となりうることを示している¹⁷⁾.

本症例の初発時には、CAS後の抗血小板薬使用によって外出血の悪化や貧血が重症化する可能性が強く懸念されたため、急性期血行再建をPTAにとどめた。しかし、後日、症状は一過性であったが頸動脈の再閉塞を生じたことを考えれば、初発時のCASも選択肢であったかもしれない。一方で、内頸動脈などの主幹動脈閉塞を生じた場合でも、側副血行路の発達によって無症状や軽症に留まることをしばしば経験する。また、血行動態不全による内頸動脈閉塞では、発症時から続く虚血急性期の脳循環動態不安定期を過ぎて血行動態が安定すれば再発リスクは著しく減少するとの報告もある⁹⁻¹⁰⁾. そのため、本症例のように進行癌患者や何らかの理由でステント留置に支障があり、側副血行路が保たれている場合には、虚血急性期には脳梗塞の重症化防止を目的とした主幹動脈狭窄に対するPTAだけで手技を終了し、側副血行路の発達に期待することも妥当な選択肢の一つと考えられた。また、本例では困難であったが、腫瘍浸潤に伴う狭窄に対する血管内治療を行うことも、急性期治療後の状態に応じて、患者ごとに適宜検討されるべきである。

結語

頭頸部癌に対する放射線治療後に生じた右内頸動脈狭窄症の急性閉塞に対して、急性期PTAで症状が著明に改善し、その後に右内頸動脈が再閉塞するも重度の麻痺なく経過した症例を経験した。易出血状態に担癌患者では術後の抗血小板の使用が困難なために、ステント留置術の適応が躊躇される。側副血行路が保たれる症例では、発症時のPTAで虚血の重症化を防ぎ、側副血行路の発達

による虚血耐性獲得を期待し完全閉塞に備える方法は、急性期の判断として検討に値すると考えられた。

利益相反の開示

共著者全員が利益相反はない。

文献

- 1) Azzabi Zouraq S, Bouardi N, Akammar A, et al. Ischemic stroke secondary to radiation-induced carotid artery stenosis. *JMV-Journal de Medecine Vasculaire* 2023; 48: 188-193.
- 2) Liu CH, Huang BS, Lin CY, et al. Head and Neck Cancer Types and Risks of Cervical-Cranial Vascular Complications within 5 Years after Radiation Therapy. *Journal of Personalized Medicine* 2022; 12: 1060.
- 3) Carpenter DJ, Patel P, Niedzwiecki D, et al. Long-term risk of carotid stenosis and cerebrovascular disease after radiation therapy for head and neck cancer. *Cancer* 2023;1-11.
- 4) Cheng YW, Chen CH, Yeh SJ, et al. Association between modifiable vascular risk factors and rapid progression of postirradiation carotid artery stenosis. *Journal of the Chinese Medical Association* 2023; 86: 627-632.
- 5) Liang H, Zhou Y, Xiong W, Zheng S. Impact of radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma on carotid stenosis risk: a meta-analysis. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology* 2022; 88: S98-S107.
- 6) Makita C, Okada S, Kajiura Y, et al. Vascular events from carotid artery atherosclerosis after radiation therapy for laryngeal and hypopharyngeal cancer: the incidence and risk factors. *Nagoya Journal of Medical Science* 2020; 82: 747-761.
- 7) Juan YH, Wu CH, Lin TM, et al. Length and location of post-PIRCS predict percutaneous transluminal angioplasty and stenting-related restenosis in nasopharyngeal cancer. *European Journal of Radiology* 2023; 165: 110894.
- 8) Zhao Z, Huang L, Chen J, et al. Clinical efficacy of bypass grafting in recurrent nasopharyngeal carcinoma patients with internal carotid artery invasion. *American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery* 2021; 42: 102860.
- 9) Biller, J. & Orencia, A. Cerebrovascular Occlusive Disease and Brain Ischemia. *Archives of Neurology* 1995; 52: 235-236.
- 10) 矢野大仁, 澤田元史, 篠田淳, 船越孝. 脳腫冠動脈高度閉塞性疾患例の再虚血発作について. *脳卒中* 1993; 15: 298-302.
- 11) Ergun O, Celtikci P, Durmaz HA, et al. Endovascular treatment of carotid artery blowout syndrome caused by oropharyngeal carcinoma. *Interventional Neuroradiology* 2014; 20: 510-513.

- 12) Suárez C, Fernández-Alvarez V, Hamoir M, et al. Carotid blowout syndrome: Modern trends in management. *Cancer Management and Research* 2018; 10: 5617-5628.
- 13) Matsumoto F, Matsumura S, Mori T, et al. Common carotid artery ligation at the proximal side before rupture in patients with ligation or occlusion of the external carotid artery at risk of carotid blowout syndrome. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2019; 49: 839-844.
- 14) 岡本美孝, 松崎全成, 荻野純, 他. 内頸動脈浸潤癌への対応. *頭頸部腫瘍* 2000; 26: 509-513.
- 15) 岡本美孝. 内頸動脈浸潤癌への挑戦. *耳鼻咽喉科展望* 1999; 42: 232-239.
- 16) Simizu Y. Endovascular Treatment of Carotid Blowout Syndrome. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 2021; 30: 105818.
- 17) Bond KM, Brinjikji W, Murad MH, et al. Endovascular treatment of carotid blowout syndrome. *Journal of Vascular Surgery* 2017; 65: 883-888.

Health food intake and risk of overall death and cancer incidence in the general population of Amami Islands and mainland of Kagoshima, Japan

Takumi AKAHO¹⁾, Rie IBUSUKI²⁾, Tomoko YASUDA³⁾, Kaede MIYAMOTO³⁾,
Ippei SHIMOSHIKIRYO^{4,5)}, Daisaku NISHIMOTO^{5,6)}, Hironori MIYAHARA⁷⁾,
Kouichi TOKUSHIGE⁷⁾, Shiroh TANOUE⁵⁾, Chihaya KORiyAMA⁵⁾, Toshiro TAKEZAKI⁸⁾

¹⁾ Arao Municipal Hospital, Arao, Japan

²⁾ Department of Community-based Medicine, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima, Japan

³⁾ Kameda Medical Center, Kamogawa, Japan

⁴⁾ Environmental Epidemiology Section, Health and Environmental Risk Division, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan

⁵⁾ Department of Epidemiology and Preventive Medicine, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima, Japan

⁶⁾ School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Kagoshima University, Kagoshima, Japan

⁷⁾ Kagoshima Kouseiren Medical Health Care Center, Kagoshima, Japan

⁸⁾ Community Medicine Support Center, Kagoshima University Hospital, Kagoshima, Japan

(Received 22 February 2024; Revised 22 June 2024; Accepted 13 August 2024)

* Address to correspondence

Rie IBUSUKI

Department of Community-based Medicine, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan

Tel +81-99-275-6852 Fax +81-99-275-6899

e-mail: iburie@m2.kufm.kagoshima-u.ac.jp

Abstract

OBJECTIVES: Various health foods have been introduced and marketed on television and the internet; however, evidence of their efficacy and effects is often limited to in vitro and in vivo studies. To examine the relationship between health food intake, overall death and cancer incidence risk, we conducted a cohort study on the general population of the Kagoshima Prefecture.

METHODS: We recruited 7561 eligible participants (3136 men and 4425 women) from the general populations of Amami islands and mainland Kagoshima Prefecture, Japan. We estimated the hazard ratios and 95% confidence intervals for overall death and cancer incidence using Cox proportional hazard models, adjusting for confounding variables, for the total and nine types of health foods (black vinegar, glucosamine, chlorella, Agaricus, royal jelly, green juice, garlic, blueberry, and turmeric).

RESULTS: Black vinegar was the most commonly consumed health food (2.3% in men and 2.6% in women). In the baseline cross-sectional study, positive associations were found between black vinegar and hypertension, garlic and glucose intolerance, and other health foods and dyslipidemia. However, in the prospective study, no significant association was observed between the intake of total and nine-specific health foods and overall deaths and cancer incidence, except for green juice, in which HR for cancer incidence was increased (2.84, 1.15–7.04).

CONCLUSIONS: Health foods commonly consumed by the general population of Kagoshima were not significantly associated with the risk of overall death and cancer incidence, except green juice intake. Further study is required to clarify the potential increased risk of cancer with green juice intake.

Key words: health foods, death, cancer incidence, risk, cohort study

Footnote: The most parts of the present study were done, when Drs. Takumi AKAHO, Tomoko YASUDA and Kaede MIYAMOTO were medical students of the School of Medicine, Faculty of Medicine, Kagoshima University, Kagoshima.

Introduction

Japan has consistently ranked high globally in terms of average life expectancy and healthy life expectancy. However, due to the declining birth rate and aging population, an increase has been observed regarding the number of bedridden individuals and those requiring long-term care ¹⁾. To address this issue, Health Japan 21 (the second term) was launched in 2012, aiming to extend healthy life expectancy, reduce health disparities, prevent lifestyle-related diseases, and promote healthy aging ²⁾. This national initiative has resulted in a growing public interest in health and an increased demand for health-related information and products, leading to the revitalization of health-related markets.

In Japan, health foods are widely used, and various products are marketed as “health foods” through the television and internet. According to recent surveys, approximately 60% of consumers use health foods, with the consumption rate increasing as consumers age ³⁾. People consume health foods for various reasons, such as filling nutritional gaps in their daily diets, promoting beauty and anti-aging effects, supporting overall health and wellness, and aiding in disease management based on their individual health conditions.

The Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare defines health foods as “foods that contribute to the maintenance and promotion of health without legal provisions” ⁴⁾. Health foods are classified into two categories under the Health Claim Food System: health foods and foods with health claims ⁵⁾. Foods with health claims are further categorized into three groups: foods with function claims, foods with nutritional claims, and foods for specified health uses, which aid in maintaining and promoting health by performing functions such as “toning the stomach” and “moderating fat absorption”. Since the establishment of functional claims in 2015, foods with functional claims can now be labeled with functionality related to the structure and function of the body; however, this label is provided under the responsibility of the business operator. Additionally, foods with nutritional function claims can be labeled with the functions of nutrients without obtaining permission from the government, leading to the production and sale of many different types of health foods.

Typical health foods that are widely consumed in Japan today include *Aojiru* (green juice), *Kurozu* (black vinegar), and blueberries. Distributors

advertise the health benefits of these health foods by presenting their functionality. However, evidence of the efficacy and effects of health foods is often examined using *in vitro* and *in vivo* studies ⁶⁾. Several studies have reported the positive effects of green juice, such as improved bowel movements due to dietary fiber ⁷⁾, a suppressed rise in blood sugar levels ⁸⁾, and an antioxidant effect due to flavonoids ⁹⁾; however, studies on health foods have their limitations. Similarly, studies suggest that black vinegar has a hypotensive effect ¹⁰⁾, blood glucose regulation effect ¹¹⁾, and fat synthesis suppression ¹²⁾. On the other hand, blueberries have an antioxidant effect due to anthocyanins ¹³⁾, a blood glucose regulation effect ¹⁴⁾, and a blood pressure improvement effect ^{15,16)}. However, most studies have their limitations ⁶⁾, and some have reported that black vinegar was not significantly associated with blood pressure, blood glucose levels, and body mass index (BMI) ¹⁷⁾. Additionally, other studies reported no association between blueberries and blood pressure improvement ¹⁸⁾. Epidemiological studies on supplementation and health risks often focus on specific components such as catechins, phenols ¹⁹⁾, n3-PUFAs, vitamin D ²⁰⁾, and calcium ²¹⁾.

Health foods often contain multiple ingredients despite their high specific ingredient content, and epidemiological studies regarding the intake and health risks of health foods are limited. Especially, the effects of these health foods on the risk of death and cancer, which are the most significant health events, have not been adequately examined. We conducted a cohort study of the general population of the Kagoshima Prefecture to examine the relationship between health food intake and the risks of overall death and cancer incidence.

Participants and Methods

Study population. Participants were selected from the general population of the Amami Islands and mainland Kagoshima Prefecture, Japan, as part of the Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort (J-MICC) Study, which has been described in detail elsewhere ²²⁾. Briefly, the baseline survey was conducted in five Amami Islands between 2005 and 2008 and in three local cities on the mainland in 2012. The survey was conducted among individuals who underwent routine health checkups that were conducted by local government or private companies. A total of 5015 participants from Amami and 2623

participants from the mainland aged 35–69 years provided written consent and were enrolled in the study, resulting in a response rate of 69.8%. Among these participants, 42 and 35 participants were excluded due to insufficient information and lack of duration information on health food intake, respectively, and the final number of eligible participants was 7561 (3136 men and 4425 women). The Ethics Review Committee for Human Genome/ Gene Analysis Research at the Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences approved the study (Nos. 16 and 382).

Follow-up. Information on participant mortality and migration was collected by obtaining data from the municipality and cross-referencing this data with the basic resident register. Cases where participants moved out of the municipality or were removed from the basic resident register were treated as censored cases. Information on the cause of death was obtained from death certificates and vital statistics data with permission from the Ministry of Health, Labour and Welfare. After obtaining authorized permission, information on cancer incidence was collected through periodic surveys of research collaborators by mail or face-to-face interviews, death certificates, secondary surveys (questionnaires), hospital-based cancer registry materials, and regional cancer registry materials of the Kagoshima Prefecture. Medical records were reviewed for additional information, and written informed consent was obtained from participants.

The baseline survey began in October 2005, and follow-up information was collected until December 2019, resulting in a follow-up period ranging from 0.06 to 14.2 years. During this period, 344 participants moved out of the area, and 341 died. Twelve dead cases who died within one year after the baseline were excluded from the analysis, and final dead cases for the analysis were 329. Cancer cases were defined as those who received a cancer diagnosis one year after their respective baseline dates and had no history of cancer at baseline. The total number of participants diagnosed with cancer was 332, of whom 16.0% ($n = 53$) information was obtained from death certificates (death certificate notification [DCN]: 16.0%).

Health food intake. The present health food consumers were defined as those who had consumed health foods once or more times per week for one or more years. For those who responded “yes”, detailed

information was collected on the type of health food consumed, the duration of intake, and the frequency of intake per week or day. The most commonly consumed health foods, in descending order, were black vinegar (*Kurozu*), glucosamine, chlorella, agaricus bisporus mushroom (*Agaricus*), royal jelly, green juice (*Aojiru*), garlic, blueberry, and turmeric. Other health foods were consumed infrequently.

Lifestyles and biochemical data. Information on various lifestyle factors including smoking history, alcohol intake, daily activities, exercise habits, medical and drug history, and health food intake was collected using a questionnaire. A food frequency questionnaire (FFQ) was also administered to collect information on the dietary intake of three staple foods (rice, bread, and noodles), 43 food items, and several local foods. Daily energy, carbohydrate and fat intakes were estimated using the FFQ and an alcohol intake questionnaire. The validity of the FFQ has been confirmed in two different regions, including Amami, and has demonstrated its usefulness for relative comparison among participants^{23,24}.

Clinical data were obtained from the Kagoshima Kouseiren Medical Health Care Center and Clinical Pathology Laboratory as part of the health examination information. The data included height, weight, systolic and diastolic blood pressures, total cholesterol levels, triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and fasting blood glucose (FBG) levels after fasting for more than 10 hours. Blood pressure was measured in the sitting position using a standard mercury sphygmomanometer or an automated blood pressure measurement monitor. When the low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) examination was not included in the routine health checkup, LDL-C levels were calculated using the Friedewald formula when a TG level <400 mg/dL²⁵.

Statistical Analysis. Age was categorized into three groups (35–49, 50–59, and 60–69 years). Food and beverage intake was stratified into three groups with a similar number of participants. Total and specific health food intake were classified as “yes” or “no”. Smoking and alcohol consumption were categorized as current, former, or never. BMI was categorized as <18.5 kg/m², 18.5–24.9 kg/m², and ≥ 25 kg/m². To estimate metabolic equivalents (METs) for habitual exercise and daily activity, the questionnaire data on intensity, frequency, and duration were considered²⁶. The resulting METs/h/day values were

categorized into three groups with similar numbers of the subjects: <0.17, 0.17–2.17, and ≥ 2.18 for habitual exercise, and <7.0, 7.0–21.0, and ≥ 21.0 for daily activity. Energy-adjusted carbohydrate and fat intake were estimated using the residual method²⁷⁾. Carbohydrate and fat intake were also classified into three groups based on percentiles.

Hypertension was defined as having a systolic or diastolic blood pressure of ≥ 140 mmHg or ≥ 90 mmHg, respectively, or the use of antihypertensive medication. Dyslipidemia was defined as having a TG level ≥ 150 mg/dL, an LDL-C level ≥ 140 mg/dL, HDL-C level <40 mg/dL, or the use of lipid-lowering agents. Glucose intolerance was defined as having an FBG level ≥ 110 mg/dL or the use of antidiabetic medication. Obesity was defined as having a BMI ≥ 25.0 kg/m².

Person-years were calculated from baseline date (October 12, 2005, for the first participant) to the date of death or cancer incidence, the date of relocation out of the region, or the last date of follow-up (December 31, 2019), whichever occurred first. The median follow-up period was 11.5 years (range: 0.06–14.2 years) for death events and 11.4 years (range: 0.06–14.2 years) for cancer incidence events. Cases of death and cancer incidence within one year after the baseline survey were excluded from the analysis to eliminate potential confounding factors due to the reverse causation. An unconditional logistic model was used to estimate the odds ratios (ORs) and their 95% confidence intervals (CIs) for hypertension, dyslipidemia, glucose intolerance, and obesity in the cross-sectional analysis at baseline. Hazard ratios (HRs) and their 95% CIs for death and cancer incidence according to health food intake were estimated using the Cox proportional hazards model. Both ORs and HRs were adjusted for confounding factors such as age; sex; region; smoking; drinking; daily activity; habitual exercise; BMI; hypertension; dyslipidemia; glucose intolerance; family history of cancer; intake of meat, fish, green vegetables, fruits, citrus, and green tea; energy-adjusted carbohydrates; and energy-adjusted fat. For sub-analyses of each type of health food intake, other health foods were also added to the adjusted variables.

The HRs and *p* for trends for death and cancer incidence were also estimated by intake duration (0, 1.0–2.9, ≥ 3.0 years) using median duration years among participants who took health foods every day to evaluate dose-response effects of intake duration.

Subgroup analysis by cause of death and cancer site was not conducted due to the limited number of deaths and incident cancer cases. A comparison of the characteristics of the study participants by sex was performed using chi-square test.

Statistical significance was set at *p* < 0.05. All statistical analyses were performed using Stata software (version 16; Stata Corp., College Station, TX, USA).

Results

The characteristics of the study participants, except for region, and total and several health food intakes, varied by sex, as shown in Table 1. Women had a slightly higher proportion of total health food intake (10.6%) compared to men (9.6%), and 5.2% of men and 5.2% of women had been consuming health foods for more than 3 years, but these differences were not statistically significant. Black vinegar was the most frequently consumed health food, with an intake of 2.3% in men and 2.6% in women. The intake frequency differed by sex, with more men reporting consumption of turmeric compared to women and more women reporting consumption of royal jelly and other health foods compared to men.

Table 1. Characteristics of study participants by sex

	Men		Women		<i>P</i>
	N	(%)	N	(%)	
Age in years					
35–49	752	24.0	977	22.1	0.009
50–59	722	23.0	1147	25.9	
60–69	1662	53.0	2301	52.0	
Total	3136	100	4425	100	
Region					
Amami islands	2035	64.9	2916	65.9	0.364
Mainland	1101	35.1	1509	34.1	
Smoking (current & former)	1653	52.7	677	15.3	<0.001
Drinking (current & former)	2426	77.4	1769	40.0	<0.001
Daily activity (≥ 21.0 METs·h/day)	1254	40.0	1468	33.2	<0.001
Habitual exercise (≥ 2.18 METs·h/day)	1088	34.7	1523	34.4	0.021
BMI (≥ 25.0 kg/m ²)	1287	41.0	1375	31.7	<0.001
Hypertension	1703	54.3	2003	45.3	<0.001
Dyslipidemia	1757	56.0	2228	50.4	<0.001
Glucose intolerance	736	23.5	500	11.3	<0.001
Family history of cancer among parents	964	30.7	1473	33.3	0.002
Health food intake					
Yes (≥ 1 year)	300	9.6	471	10.6	0.127
Years of intake (1–2.5 years)	137	4.4	240	5.4	0.114
Years of intake (≥ 3.0 years)	163	5.2	231	5.2	
Frequency of intake (1–6 times/week)*	55	1.6	91	2.1	
Frequency of intake (≥ 7 times/week)*	205	6.5	315	7.1	
Kinds of health foods†					
Black vinegar (<i>Kurozu</i>)	72	2.3	113	2.6	0.475
Glucosamine	35	1.1	36	0.8	0.179
Chlorella	27	0.9	34	0.8	0.657
Agaricus	24	0.8	34	0.8	0.988
Royal jelly	12	0.4	40	0.9	0.007
Green juice (<i>Aojiru</i>)	16	0.5	27	0.6	0.569
Garlic	22	0.7	26	0.6	0.539
Blueberry	14	0.5	20	0.5	0.972
Turmeric	21	0.7	6	0.1	<0.001
Others	102	3.3	202	4.6	0.004

BMI, body mass index; METs, metabolic equivalents.

* Frequency information was missing in 105 participants.

† Some of intakes were duplicated.

At the baseline, the cross-sectional analyses found no association between total health food intake and atherosclerosis-related factors, except glucose intolerance (Table 2). However, a kind-specific analysis revealed a positive association between

garlic and glucose intolerance (OR: 2.59, 95% CI: 1.17–5.74).

In the prospective study, overall health food intake or specific type of health food intake was not associated with increased or decreased HRs for

Table 2. Odds ratios and 95% confidence intervals for atherosclerosis-related factors according to health food intake in the cross-sectional study at the baseline

	Hypertension			Dyslipidemia			Glucose intolerance			Obesity		
	Case/ctrl	OR [‡]	95% CI	Case/ctrl	OR [‡]	95% CI	Case/ctrl	OR [‡]	95% CI	Case/ctrl	OR [‡]	95% CI
Health food intake												
No	3,271/2,749	1.00	-	3,539/2,946	1.00	-	1,082/4,333	1.00	-	2,389/4,345	1.00	-
Yes*	435/228	0.95	0.77-1.17	446/308	1.06	0.91-1.25	154/409	1.19	0.95-1.49	273/494	1.15	0.97-1.36
Kinds of health foods [†]												
Black vinegar (<i>Kurozu</i>)	120/34	1.00	0.62-1.61	102/80	0.84	0.61-1.16	36/78	1.22	0.78-1.92	52/133	0.93	0.65-1.32
Glucosamine	44/9	0.87	0.39-1.95	46/25	1.33	0.79-2.25	14/27	0.93	0.45-1.92	21/50	1.14	0.66-1.96
Chlorella	37/21	1.08	0.57-2.03	34/25	0.88	0.51-1.53	16/34	1.75	0.89-3.43	30/31	1.45	0.84-2.52
Agaricus	30/26	1.33	0.74-2.40	31/26	0.92	0.53-1.60	14/41	1.40	0.70-2.78	29/26	1.35	0.76-2.41
Royal jelly	29/19	1.06	0.53-2.12	32/18	1.46	0.79-2.67	8/35	0.93	0.40-2.15	15/37	0.70	0.37-1.34
Green juice (<i>Aojiru</i>)	27/10	1.84	0.80-4.21	24/18	0.95	0.50-1.80	10/21	1.90	0.83-4.37	12/31	0.67	0.33-1.36
Garlic	30/11	0.82	0.34-1.97	32/16	1.15	0.61-2.16	16/17	2.59	1.17-5.74	18/30	1.39	0.73-2.62
Blueberry	19/8	0.60	0.20-1.80	13/19	0.48	0.23-1.01	4/13	0.67	0.18-2.56	10/24	1.08	0.50-2.33
Turmeric	12/14	0.59	0.24-1.45	16/11	1.25	0.55-2.83	8/17	1.68	0.68-4.15	13/14	1.18	0.52-2.67
Others	163/97	0.91	0.66-1.25	183/114	1.26	0.98-1.62	49/175	0.82	0.57-1.19	111/192	1.27	0.98-1.64

Ctrl, control; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

* Adjusted for age; sex; region; smoking; drinking; daily activity; habitual exercise; body mass index; hypertension; dyslipidemia; glucose intolerance; intake of meat, fish, green vegetables, fruits except citrus, citrus, and green tea; energy-adjusted carbohydrate; and energy-adjusted fat.

[†] Some of intakes were duplicated.

[‡] Adjusted for age; sex; region; smoking; drinking; daily activity; habitual exercise; body mass index; hypertension; dyslipidemia; glucose intolerance; intake of meat, fish, green vegetables, fruits except citrus, citrus, and green tea; energy-adjusted carbohydrate; energy-adjusted fat; and each health food.

Table 3. Hazard ratios and 95% confidence intervals for overall death and cancer incidence according to health food intake in the prospective study

	Overall death			Cancer incidence		
	Event / PY	HR [‡]	95% CI	Event / PY	HR [§]	95% CI
Health food intake						
No	300 / 72,270	1.00	-	295 / 70,445	1.00	-
Yes*	29 / 7,321	0.91	0.61-1.34	37 / 7,117	1.13	0.79-1.62
Kinds of health foods [†]						
Black vinegar (<i>Kurozu</i>)	7 / 1,516	1.30	0.60-2.82	9 / 1,480	1.52	0.74-3.14
Glucosamine	1 / 561	0.41	0.06-2.99	6 / 523	1.77	0.71-4.41
Chlorella	4 / 661	0.91	0.29-2.89	5 / 631	1.68	0.69-4.09
Agaricus	1 / 764	0.28	0.04-2.01	1 / 758	0.30	0.04-2.13
Royal jelly	3 / 512	1.44	0.45-4.67	1 / 505	0.43	0.06-3.15
Green juice (<i>Aojiru</i>)	3 / 425	1.42	0.45-4.50	5 / 379	2.84	1.15-7.04
Garlic	2 / 417	1.21	0.29-4.93	0 / 410	-	-
Blueberry	0 / 270	-	-	0 / 264	-	-
Turmeric	2 / 308	0.91	0.22-3.71	2 / 300	1.06	0.26-4.34
Others	10 / 2,866	0.91	0.48-1.71	13 / 2,819	1.11	0.63-1.94

PY, person-years; HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

* Adjusted for age; sex; region; smoking; drinking; daily activity; habitual exercise; body mass index; hypertension; dyslipidemia; glucose intolerance; intake of meat, fish, green vegetables, fruits except citrus, citrus, and green tea; energy-adjusted carbohydrate; and energy-adjusted fat.

[†] Some of intakes were duplicated.

[‡] Adjusted for age; sex; region; smoking; drinking; daily activity; habitual exercise; body mass index; hypertension; dyslipidemia; glucose intolerance; intake of meat, fish, green vegetables, fruits except citrus, citrus, and green tea; energy-adjusted carbohydrate; energy-adjusted fat; and each health food.

[§] Adjusted for age; sex; region; smoking; drinking; daily activity; habitual exercise; body mass index; hypertension; dyslipidemia; glucose intolerance; family history of cancer; intake of meat, fish, green vegetables, fruits except citrus, citrus, and green tea; energy-adjusted carbohydrate; energy-adjusted fat; and each health food.

overall mortality (Table 3). Additionally, there was no association found between health food intake and increased or decreased HRs for cancer incidence, except for a positive association between green juice intake and HR (OR: 2.84, 95% CI: 1.15–7.04).

The *p* for trends on the HRs for death and cancer incidence according to health food intake duration were not statistically significant among those who took health foods every day, except blueberry intake which number of participants were too small to estimate HRs, although increased HR for overall death with green juice intake was observed in a relative shorter intake duration group (Table 4).

Site-specific analysis for increased HRs for cancer incidence with green juice intake showed significant

increased HRs for stomach cancer in men and women (HR: 8.07, 95% CI: 1.05–61.9) and breast cancer in women (HR: 4.99, 95% CI: 1.11–22.5), although the number of events was very small (*n* = 1 and 2, respectively) (Table 5).

Discussion

This study investigated the impact of health foods on the risk of death and cancer incidence in a cohort study of the general population in the Kagoshima Prefecture. Our findings suggest that total health food intake did not have a significant impact on the risk of death or cancer incidence. While the cross-sectional analysis at baseline revealed positive associations between some health foods and arteriosclerosis-

Table 4. Hazard ratios and 95% confidence intervals for overall death and cancer incidence according to health food intake by intake duration among those who took every day

	Overall death						Cancer incidence					
	0 years	1.0-2.9 years		≥3 years		P for trends [†]	0 years	1.0-2.9 years		≥3 years		P for trends [†]
	HR	HR [‡]	95% CI	HR [‡]	95% CI		HR	HR [‡]	95% CI	HR [‡]	95% CI	
Kinds of health food*												
Black vinegar	1.00	0.89	0.21-3.74	1.22	0.38-3.90	0.811	1.00	1.56	0.48-5.01	1.77	0.65-4.86	0.192
Glucosamine	1.00	-		-		1.000	1.00	2.00	0.49-8.16	1.96	0.47-8.18	0.214
Chlorella	1.00	-		1.34	0.18-10.1	0.890	1.00	-		2.74	0.68-11.2	0.354
Agaricus	1.00	-		-		-	1.00	-		-		-
Royal jelly	1.00	1.03	0.13-7.98	1.71	0.23-12.8	0.643	1.00	-		2.00	0.28-14.5	0.981
Green juice	1.00	4.13	1.01-16.9	-		0.814	1.00	2.45	0.34-17.7	1.21	0.17-8.83	0.634
Garlic	1.00	-		2.19	0.53-9.11	0.382	1.00	-		-		-
Blueberry	1.00	-		-		-	1.00	-		-		-
Turmeric	1.00	-		5.80	1.39-24.2	0.080	1.00	1.63	0.22-12.2	1.75	0.24-12.9	0.481
Others	1.00	1.09	0.35-3.42	0.79	0.25-2.48	0.749	1.00	0.89	0.29-2.81	1.24	0.51-3.03	0.721

HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

* Some of intakes were duplicated.

[†] Adjusted for age; sex; region; smoking; drinking; daily activity; habitual exercise; body mass index; hypertension; dyslipidemia; glucose intolerance; intake of meat, fish, green vegetables, fruits except citrus, citrus, and green tea; energy-adjusted carbohydrate, energy-adjusted fat; and each health food.

[‡] Adjusted for age; sex; region; smoking; drinking; daily activity; habitual exercise; body mass index; hypertension; dyslipidemia; glucose intolerance; family history of cancer; intake of meat, fish, green vegetables, fruits except citrus, citrus, and green tea; energy-adjusted carbohydrate, energy-adjusted fat; and each health food.

Table 5. Hazard ratios and 95% confidence intervals for specific-site cancer incidence according to green juice intake

	Green juice intake		HR*	95% CI
	Yes	No		
	Event / PY	Event / PY		
Stomach	1 / 378	48 / 77,184	8.07	1.05-61.9
Colon	0 / 378	39 / 77,184	-	
Lung	0 / 378	44 / 77,184	-	
Breast in women	2 / 261	78 / 45,461	4.99	1.11-22.5
Prostate in men	1 / 117	32 / 31,722	3.56	0.28-45.8

PY, person-years; HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

* Adjusted for age; sex; region; smoking; drinking; daily activity; habitual exercise; body mass index; hypertension; dyslipidemia; glucose intolerance; family history of cancer; intake of meat; fish; green vegetables; fruits except citrus; citrus; green tea; energy-adjusted carbohydrate; energy-adjusted fat; and each food product/supplement.

related factors, the prospective study showed no association between health food intake and overall death or cancer incidence, except for a positive association between green juice intake and cancer incidence.

The popularity of health foods is driven by the desire to maintain and improve health, improve nutritional balance, and provide various other benefits such as fatigue recovery, joint health, beautiful skin and skin care, and nutritional support³⁾. In this study, the most consumed health foods, in descending order, were black vinegar, glucosamine, chlorella, agaricus, royal jelly, green juice, garlic, blueberry, and turmeric. Each health food has unique properties that are associated with specific health benefits. For instance, black vinegar has been shown to reduce blood pressure¹⁰⁾, regulate blood glucose levels¹¹⁾, and inhibit fat synthesis¹²⁾. Glucosamine is known to improve joint health and reduce osteoarthritis symptoms in the knee and hip joints²⁸⁾, while chlorella has been found to promote overall health and wellness²⁹⁾. Agaricus bisporus mushrooms are believed to have cancer-preventive properties³⁰⁾, and royal jelly is associated with health longevity³¹⁾. Green juice is a great source of antioxidants that can help improve bowel movements⁷⁾, decrease blood sugar levels⁸⁾, and protect against oxidative stress⁹⁾. Garlic has been shown to improve cardiovascular function³²⁾, boost the immune system, and reduce inflammation³³⁾. Anthocyanins, which are present in blueberries and other foods, can improve night vision³⁴⁾, regulate blood glucose levels¹⁴⁾, lower blood pressure^{15,16)}, and provide antioxidant and anti-inflammatory benefits¹³⁾. Turmeric is known for its powerful antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer properties³⁵⁾. However, the effects of these health foods on the risk of death and cancer, which are the most significant health events, have not been adequately examined.

In the current cross-sectional study, a reverse causality between health food intake and health events was assumed. As a result, positive associations were found between black vinegar and hypertension, garlic and impaired glucose tolerance, and other health foods and dyslipidemia.

The 14-year prospective study found that total health foods and the nine-specific health foods were not associated with overall deaths and cancer incidence, except for green juice that was associated with increased HR for cancer. There is no study

reported a positive association between intake of green juice itself and increased cancer risk, as far as we know. Green juice (*Aojiru*) is a common health food in Japan made from young barley leaves, kale, Angelica keiskei (*Ashitaba*), moroheiya, and chlorella; green juice has been shown to improve bowel movements with dietary fiber⁷⁾, suppress the rise in blood glucose levels⁸⁾, and provide antioxidant effects with flavonoids⁹⁾. The decrease in cancer risk due to green juice was expected; however, the opposite relationship observed in this study may be due to an accidental alpha-error, confounding with unknown factors such as ingestion by high-risk individuals, or the negative effects of antioxidant overdosing^{36, 37)}. As dose-dependent relationship between intake duration and the increased HRs with green juice intake was not observed in Appendix Table 1, the possibility of an accidental alpha-error cannot be rule out. Furthermore, cancer site-specific relationship was not observed in Appendix Table 2, and the specific cause of this relationship are currently unknown. Further study is required to clarify the potential increased risk of cancer with green juice intake.

One limitation of this study is that the number of participants who consumed health foods was relatively small, which may have increased the susceptibility to random errors. To address this limitation, the follow-up period was extended to 14 years to increase person-years. Additionally, the reasons why participants began consuming health foods are unknown; additionally, the phenomenon of reverse causality may not have been completely eliminated, even in a prospective study. To mitigate this effect, individuals who died or developed cancer within 1 year of the baseline survey were excluded from the analysis. Furthermore,

due to the relatively small number of participants who consumed health foods, statistical power may be small to analyze the dose-response effects of intake period as the sub-group analysis among every day consumers. Although definitive amount and duration of health food intake which involve in health effects is unclear, we defined the definition of health food intake as one or more times per week for one or more years with reference to the previous reports. In experiments using mice, each health food was administered for 4-12 weeks^{7,10-12,14,29)}, and in intervention trials on humans, it was administered for 3-16 weeks^{8,15,17,30,34)}, except glucosamine for 1-144

weeks²⁸⁾. In addition, the FFQ used in this study collected the information on the average dietary habit of the past one year. Another limitation is the variability in the raw materials and ingredients of health foods, which may affect their effectiveness, making it challenging to evaluate their effects accurately. As the study participants were recruited in Amami islands and mainland of Kagoshima, Japan, the study results reflected the characteristics of this region.

Conclusion

This study aimed to investigate the relationship between health food intake, and risks of death and cancer incidence in a general population cohort in Kagoshima Prefecture, Japan. In the baseline cross-sectional study, several health foods were found to be associated with arteriosclerosis-related factors, and reverse causality was observed. In this prospective study, health food intake was not associated with overall death or cancer incidence, except for green juice intake. In conclusion, the consumption of healthy foods by the general population in Amami Islands and mainland of Kagoshima, Japan did not have a significant impact on the risk of overall

death or cancer incidence, except green juice intake. Further study is required to clarify the increased risk of cancer with green juice intake.

COI declaration

No conflicts of interest to be declared.

Acknowledgement

We appreciate the help of the study participants and the local staff. We also acknowledge the cooperation of Kagoshima Prefecture, Wadomari Town, China Town, Isen Town, Tokunoshima Town, Amagi Town, Yoron Town, Amami City, Setouchi Town, Tatsugou Town, Kikai Town, Isa City, Kanoya City, Izumi City, JA Kagoshima Kouseiren Medical Health Care Center, Clinical Pathology Laboratory, Oshima Medical Association, and hospitals and clinics in Amami Island and Kagoshima mainland regions. We would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas of Cancer (No. 17015018), Innovative Areas (No. 221S0001), and JSPS KAKENHI Grant Number JP16H06277 (CoBiA) from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology.

References

- 1) General Bureau of Government Statistics (e-Stat). Long-term Care Insurance Business Status Report / FY Reiwa 2 Long-term Care Insurance Business Status Report (Annual Report). [Cited 2023/2/27], https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00450351&tstat=000001031648&cycle=8&tclass1=000001169206&stat_infid=000032230955&tclass2val=0 (in Japanese).
- 2) Ministry of Health Labour Welfare of Japan. Health Japan 21 (Second) Final Assessment Report. [Cited 2023/2/27], https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_28458.html (in Japanese).
- 3) Cabinet Office of Japan. Fact-finding survey on consumers' use of health foods (questionnaire survey), May 2012. [Cited 2023/2/27], https://www.cao.go.jp/consumer/iinkaikouhyou/2012/houkoku/201205_report.html (in Japanese).
- 4) Ministry of Health Labour Welfare of Japan. Homepage of so-called "health food" What is Kang Foods? [Cited 2023/2/27], https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/hokenkinou/index.html (in Japanese).
- 5) Consumer Affairs Agency of Japan. What is the labeling system for nutrition and health functions? [Cited 2023/2/27], https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/health_and_nutrition_labelling/ (in Japanese).
- 6) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition. Information system on safety and effectiveness for health foods. [Cited 2023/2/27], <https://hfnet.nibiohn.go.jp/> (in Japanese).
- 7) Ikeguchi M, Tsubata M, Takano A, et al. Effects of young barley leaf powder on gastrointestinal functions in rats and its efficacy-related physicochemical properties. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014; 974840.
- 8) Takano A, Kamiya T, Tomozawa H, et al. 2013. Insoluble fiber in young barley leaf suppresses the increment of postprandial blood glucose level by increasing the digesta viscosity. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 137871.
- 9) Benedet JA, Umeda H, Shibamoto T. Antioxidant

- activity of flavonoids isolated from young green barley leaves toward biological lipid samples. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 5499-5504.
- 10) Nishikawa Y, Takata Y, Nagai Y, Mori T, Kawada T, Ishihara N. Antihypertensive effect of kurosu extract, traditional vinegar produced from unpolished rice, in the SHR rats. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* (Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology) 2001; 48: 73-75 (in Japanese).
 - 11) Nagano M, Fujii A, Aoyama Y, Kurita M, Fujii M. Effects of Kurozu Moromi powder and kurozu concentrated liquid on carbohydrate metabolism. *Jap Pharmacol Ther* 2006; 34: 199-206 (in Japanese).
 - 12) Ueno T. Functionality of black vinegar and black vinegar powder: focusing on immunostimulatory and glucose metabolism improvement effects. *J Brewing Society of Japan* 2011; 106: 183-189 (in Japanese).
 - 13) Heinonen IM, Meyer AS, Frankel EN. Antioxidant Activity of Berry Phenolics on Human Low-Density Lipoprotein and Liposome Oxidation. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 4107-4112.
 - 14) Takikawa M, Inoue S, Horio F, Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J Nutr* 2010; 140: 527-533.
 - 15) Yousefi M, Shadnoush M, Khorshidian N, Mortazavian AM. Insights to potential antihypertensive activity of berry fruits. *Phytother Res* 2021; 35: 846-863.
 - 16) Hügel HM, Jackson N, May B, Zhang AL, Xue CC. Polyphenol protection and treatment of hypertension. *Phytomedicine* 2016; 23: 220-231.
 - 17) Moriuchi A, Takada K, Asano S, et al. Examination of the metabolic syndrome protective efficacy with the black vinegar. *Journal of Metabolism and Clinical Nutrition* 2009; 12, 13-19 (in Japanese). https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpfsm/9/3/9_115/_pdf/-char/en
 - 18) Zhu Y, Sun J, Lu W, Wang X, Han Z, Qiu C. Effects of blueberry supplementation on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J Hum Hypertens* 2017; 31, 165-171.
 - 19) Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003; 43: 89-143.
 - 20) Manson JE, Bassuk SS, Cook NR, Lee IM, Mora S, Albert CM, Buring JE, VITAL Research Group. Vitamin D, Marine n-3 Fatty Acids, and Primary Prevention of Cardiovascular Disease Current Evidence. *Circ Res* 2020; 126: 112-128.
 - 21) Aune D, Navarro Rosenblatt DA, Chan DS, et al. Dairy products, calcium, and prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Am J Clin Nutr* 2015; 101: 87-117.
 - 22) Hamajima N; J-MICC Study Group. The Japan Multi Institutional Collaborative Cohort Study (J-MICC Study) to detect gene environment interactions for cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2007; 8: 317-323.
 - 23) Tokudome S, Goto C, Imaeda N, Tokudome Y, Ikeda M, Maki S. Development of a data-based short food frequency questionnaire for assessing nutrient intake by middle-aged Japanese. *Asian Pac J Cancer Prev* 2004; 5: 40-43.
 - 24) Nakahata NT, Takada AN, Imaeda N, et al. Validity of a food frequency questionnaire in a population with high alcohol consumption in Japan. *Asia Pac J Clin Nutr* 2016; 25: 195-201.
 - 25) Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
 - 26) Glass S, Dwyer GB. ACSM's metabolic calculations handbook. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2007.
 - 27) Willett WC, Howe GR, Kushi LH. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 1997; 65(Suppl): 1220S-1231S.
 - 28) Zhu X, Sang L, Wu D, Rong J, Jiang L. Effectiveness and safety of glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Orthop Surg Res* 2018; 13: 170.
 - 29) Bito T, Okumura E, Fujishima M, Watanabe F. Potential of Chlorella as a Dietary Supplement to Promote Human Health. *Nutrients* 2020; 12: 2524.
 - 30) Blumfield M, Abbott K, Duve E, Cassettari T, Marshall S, Fayet-Moore F. Examining the health effects and bioactive components in Agaricus bisporus mushrooms: a scoping review. *J Nutr Biochem* 2020; 84: 108453.
 - 31) Kunugi H, Mohammed Ali A. Royal Jelly and Its Components Promote Healthy Aging and Longevity: From Animal Models to Humans. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 4662.

- 32) Alali FQ, El-Elimat T, Khalid L, Hudaib R, Al-Shehabi TS, Eid AH. Garlic for Cardiovascular Disease: Prevention or Treatment? *Curr Pharm Des* 2017; 23: 1028-1041.
- 33) Arreola R, Quintero-Fabián S, López-Roa RI, Flores-Gutiérrez EO, Reyes-Grajeda JP, Carrera-Quintanar L, Ortuño-Sahagún D. 2015. Immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic compounds. *J Immunol Res* 2015; 401630.
- 34) Kalt W, McDonald JE, Fillmore SA, Tremblay F. Blueberry effects on dark vision and recovery after photobleaching: placebo-controlled crossover studies. *J Agric Food Chem* 2014; 62: 11180-11189.
- 35) Kocaadam B, Sanlier N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; 57: 2889-2895.
- 36) Miller ER 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 2005; 142: 37-46.
- 37) Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2007; 297: 842-857.

鹿児島県の奄美群島と本土の一般集団における健康食品摂取と全死亡・がん罹患リスクに関する研究

赤穂 拓海¹⁾、指宿 りえ²⁾、安田 友子³⁾、宮本 楓³⁾、下敷領 一平⁴⁾、西本 大策^{5,6)}、
宮原 広典⁷⁾、徳重 浩一⁷⁾、田ノ上 史郎⁵⁾、郡山 千早⁵⁾、嶽崎 俊郎⁸⁾

¹⁾荒尾市民病院

²⁾鹿児島大学大学院医歯学総合研究科地域医療学分野

³⁾亀井総合病院

⁴⁾国立環境研究所環境リスク・健康領域環境疫学研究室

⁵⁾鹿児島大学大学院医歯学総合研究科疫学・予防医学分野

⁶⁾鹿児島大学医学部保健学科

⁷⁾JA鹿児島厚生連病院健康管理センター

⁸⁾鹿児島大学病院地域医療支援センター

和文要約

【背景と目的】様々な健康食品がテレビやインターネットで紹介され、販売されているが、それらの有効性と効果の証拠は、多くの場合、in vitroおよびin vivo研究に限定されている。本研究では、健康食品摂取と全死亡とがん罹患リスクとの関連を検索するため、鹿児島県の一般人口を対象としたコホート研究を行った。

【方法】研究対象者は奄美群島と鹿児島県本土の一般集団7,561人(男性3,136人、女性4,425人)である。健康食品全体および9種類の健康食品(黒酢、グルコサミン、クロレラ、アガリクス、ローヤルゼリー、青汁、ニンニク、ブルーベリー、ターメリック)について、Cox比例ハザードモデルを用いて交絡変数を調整し、全死亡およびがん発生のハザード比(HR)と95%信頼区間を見積もった。

【結果】健康食品の中で、最も高頻度に摂取されていたのは黒酢であった(男性で2.3%、女性で2.6%)。ベースライン時の横断的解析では、ニンニクと耐糖能異常との間に正の関連が見られた。しかし、前向き研究では、青汁摂取とがん罹患HR上昇(2.84, 1.15-7.04)が認められた他には、健康食品全体および9種類それぞれの健康食品摂取と全死亡および、がん罹患との間に有意な関連は認められなかった。

【結論】鹿児島の一般集団が一般的に摂取している健康食品と全死亡およびがん罹患リスクとの間に有意な関連は、青汁摂取以外には認められなかった。青汁摂取に伴うがんリスク上昇の可能性に関しては、さらなる研究が必要である。

シルクセリシンのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 バイオフィルム形成抑制効果

西帯野智代^{1,2)}, 馬場淳徳³⁾, 福重智子²⁾,
藺牟田直子⁴⁾, 中村政敏⁵⁾, 西 順一郎⁴⁾, 金蔵拓郎²⁾

- 1) 鹿児島大学病院看護部
- 2) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野
- 3) 鹿児島市立病院皮膚科
- 4) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科微生物学分野
- 5) 鹿児島大学病院医療技術部

Inhibitory effect of silk sericin on biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolates

Tomoyo NISHIOBINO^{1,2)}, Atsunori BABA³⁾, Tomoko FUKUSHIGE²⁾, Naoko IMUTA⁴⁾,
Masatoshi NAKAMURA⁵⁾, Junichiro NISHI⁴⁾, Takuro KANEKURA²⁾

- 1) Nursing department, Kagoshima University Hospital
- 2) Department of Dermatology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences
- 3) Department of Dermatology, Kagoshima City Hospital
- 4) Department of Microbiology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences
- 5) Clinical technology department, Kagoshima University Hospital

(Received 12 April 2024; Revised 16 August 2024; Accepted 3 October 2024)

* Address to correspondence

Tomoyo NISHIOBINO

Nursing department, Kagoshima University Hospital

8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima Japan, 890-8520

Phone: +81-99-275-5111

e-mail: tmy-n28@m2.kufm.kagoshima-u.ac.jp

Abstract

In chronic wounds such as bedsores, bacterial infection prolongs wound healing, and biofilms are a particularly important inhibitory factor in wound healing. Therefore, wound management requires inhibition of biofilm formation, and research is being conducted to develop products with anti-biofilm properties. Silk is composed of two types of proteins, fibroin and sericin, and it has been reported that fibroin promotes wound healing and sericin has antibacterial activity. Therefore, we wondered whether sericin could inhibit biofilm formation and investigated the inhibitory effect of sericin on the

biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from wounds in vitro. Two MRSA strains with high biofilm forming ability and a standard strain were used. Sericin was extracted from silk by high-pressure steam sterilization. Sericin was added to the biofilm forming process of MRSA strains and its inhibitory effect on biofilm formation was evaluated. Morphological observation showed that the pigment in the stained biofilm was attenuated. Biofilm assay using a microtiter plate showed that the mean biofilm index was significantly inhibited by 66.1% in the sericin 250 µg/mL group compared to the control group (0.417 vs. 1.231, $p < 0.01$). These results show that silk sericin has an inhibitory effect on the biofilm formation by MRSA strains. Sericin contains many positively charged amino acids with hydrophilic amino acid residues, which are easy to combine with the negatively charged bacterial surface. The feature of molecular structure was thought to be related to its anti-biofilm properties.

Key words: chronic wound, biofilm, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), silk, sericin

抄録

褥瘡など慢性創傷において細菌感染は創傷治癒を遷延化させるが、特に創傷治癒の重要な阻害要因としてバイオフィルムの存在がある。そのため創傷管理では、バイオフィルムの形成を阻害することが求められ、抗バイオフィルム作用を有する製品開発が進められている。シルクは、フィブロインとセリシンの2種類のタンパク質で構成され、フィブロインは創傷治癒を促進し、セリシンは抗菌作用を有するとの報告がある。そこで、慢性創傷の難治化する要因であるバイオフィルムの形成をセリシンによって阻害できないかと考え、創傷から分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) 株のバイオフィルム形成能に対する影響をin vitroで検討した。

MRSA株は、高バイオフィルム形成能を有する臨床分離株2株と標準株を用いた。シルクは高圧蒸気滅菌法でフィブロインとセリシンに分離させてセリシンを抽出した。バイオフィルム形成過程でセリシンを加え、バイオフィルム形成に対する阻害効果を形態学的に観察するとともに、マイクロタイタープレートを用いたバイオフィルムアッセイでbiofilm index (BI)を測定した。形態学的観察では染色したバイオフィルムの色素が減弱することを確認した。バイオフィルムアッセイでは、最終濃度250 µg/mLのセリシン添加群が対照群に比べて平均BIが66.1%低下しており(0.417 vs. 1.231, $p < 0.01$)、セリシンがMRSAによるバイオフィルム形成を阻害することが明らかになった。セリシンは正に荷電した親水性アミノ酸残基をもつアミノ酸を多く含有し、負に荷電している細菌表面と結合しやすいことが予想され、その分子構造がバイオフィルム形成阻害効果と関連していると考えられた。

諸言

褥瘡など慢性創傷では細菌が壊死組織中にバイオフィルムを形成し治癒が遷延化することが知られている¹⁾。創傷面に付着した細菌は、菌体表面に多糖体を産生し膜状の構造物を形成しバイオフィルムとして存在する^{3,4)}。バイオフィルムは慢性創傷の60%以上に存在し遷延化の重要な要因である²⁾。バイオフィルムは多糖類、蛋白質、糖脂質および細胞外DNA等から組成される細胞外高分子物質 (extracellular polymeric substances: EPS) によって形成され、内部あるいは下層に存在する細菌は、バイオフィルムを防御壁とし、炎症性細胞の貪食や抗菌薬・消毒薬に対する抵抗性を増すため、創傷管理においてはバイオフィルムの形成を阻害することが極めて重要である¹⁾。

慢性創傷である褥瘡部の菌種調査では、数種の菌が検出され、特にmethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) を含む黄色ブドウ球菌が多く⁵⁾、慢性下腿潰瘍の調査では、黄色ブドウ球菌が93.5%、緑膿菌が52.5%を占めていた⁶⁾。特にMRSAに感染した創傷は難治化し、

院内感染症の原因の一つとして徹底した対策が必要となる。

創傷のバイオフィルムに対して従来外用剤として、スルファジアジン銀、ポビドンヨード・シュガーが使用されていたが効果は限定的である^{7,8)}。他にも、酢酸、蜂蜜、ヨウ素、ポリヘキサメチレンビグアニド (PHMB)、銀などの抗バイオフィルム剤としての可能性が報告されている¹⁴⁻¹⁸⁾。近年では抗菌成分のポリヘキサニド、界面活性剤のベタインが配合されたゲルが使用され一定の効果が得られるようになった^{19,20)}。しかし、細菌が形成したバイオフィルムのため治療に難渋する褥瘡など慢性創傷の症例は多く、バイオフィルムを予防・治療するための新規戦略が必要とされている⁹⁾。

シルクはフィブロインとセリシンの2種類のタンパク質で構成される。セリシンは、フィブロイン繊維同士を接着させる粘着層に含まれる。シルクを絹糸として使用する場合、セリシンは精製処理時に取り除かれ、残った繊維部分のフィブロインが利用されている。シルクは外科手術の縫合糸として使用されているように生体適合性

に優れた素材である。軟膏、ゲル、スポンジやパウダーなど様々な形態に加工することが可能であり、この特性は医療機器開発において利点である。マウスの実験的潰瘍にフィブロインフィルムを貼付すると、真皮線維芽細胞の増殖と遊走、血管新生を促進し良好な肉芽組織を形成することが示されている¹⁰⁾。一方セリシンは、抗菌作用を有することが報告されている^{11,12,21,22)}。セリシンは親水性アミノ酸残基をもつアミノ酸を多く含み、その構造と細菌細胞との相互作用によって、細菌細胞膜の透過性が変化し、細胞内タンパク質と炭水化物の漏出、細菌細胞の代謝の阻害、細胞圧の上昇を来し細菌の増殖抑制および細胞死につながると考えられている²⁷⁾。

そこで、我々は、セリシンの抗菌作用に着目し、慢性創傷管理で難渋するバイオフィームへの影響について検討することとし、創傷から採取されたMRSA臨床分離株のバイオフィーム形成能に対する抑制効果をin vitroで検討した。

対象と方法

1. セリシンの抽出と定量

セリシンは高圧蒸気滅菌法（オートクレーブ法）で抽出した。シルク繭1.5gを1cm角程度に裁断し蒸留水60mLを加え、121℃で20分間の高圧蒸気滅菌を行い、繊維部分のフィブロインと溶液部分のセリシンに分離させ(Fig. 1)、滅菌ガーゼでろ過した。

抽出したセリシンのタンパク質濃度は、Bicinchoninic (BCA) 法に基づき、Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。



Figure 1 Extraction of sericin(High-pressure steam sterilization method) (a) Silk cocoons. (b) Cut silk cocoons into 1 cm squares. (c) Cut cocoons with distilled water in a medium bottle. (d) After autoclaving at 121℃ for 20 minutes.

2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

抽出されたセリシンの分子量は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)で確認した。分子量マーカーはDynaMarker® Protein MultiColor (BioDynamics Laboratory Inc.)を用い、CBB (Coomassie brilliant blue) 染色を行った。

3. 対象菌株

MRSA株は、2021～2022年に鹿児島大学病院で創傷

検体から分離された臨床分離株6株（#1～6）を使用した。対照株としてMRSA標準株(ATCC:33591)1株（#7）を使用した。

菌種同定は、VITEK-MS(バイオメリュー・ジャパン)で実施した。薬剤感受性試験は、VITEK-2 ブルー(バイオメリュー・ジャパン)またはIA40 MICi(栄研化学)を用いて実施した。MRSAの判定基準は、CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) M100 S-29の基準(oxacillin $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ または cefoxitin $\geq 8 \mu\text{g/mL}$)に従った。

菌懸濁液は、スキムミルクで凍結保存した菌株を血液寒天培地に塗布し37℃で24時間培養し、それぞれの菌株をTSB液体培地で、37℃ 18時間振盪培養し作製した。

4. 菌増殖に対するセリシンの影響の評価

マイクロタイタープレートの各ウェルにおいて、セリシン濃度250 $\mu\text{g/mL}$ のTSB液体培地 200 μL に18時間培養した菌株の菌懸濁液5 μL をそれぞれ加え、37℃で静置培養し、濁度を吸光度595nm (OD595)で測定した。吸光度は開始時から3時間までは1時間毎に測定し、その後は6時間後、9時間後、12時間後、24時間後に測定した。セリシンを添加しないTSB液体培地における各株の増殖を対照とした。

5. バイオフィームアッセイ

バイオフィーム形成能の測定は、マイクロプレートで行った¹³⁾。96ウェルプレートの各ウェルに37℃で18時間振盪培養した菌懸濁液5 μL と2%スクロースを加えたTSB液体培地200 μL を添加し、37℃で18時間培養した。培養上清を破棄し水道水で静かに洗浄した後、ウェルの底面と側面に形成されたバイオフィームを0.1%クリスタルバイオレットで5分間染色し、再度洗浄した後、95%エタノール200 μL を加えて溶解しOD595を測定し、培地のみの対照ウェルのOD595を減じた値をbiofilm index (BI)とした。

6. バイオフィームの形態学的観察

バイオフィームアッセイでウェル底面に形成されたバイオフィームを5分間染色、洗浄後、顕微鏡（キーエンス オールインワン蛍光顕微鏡）を用いて、位相差観察と明視野観察を行った。

7. バイオフィーム抑制試験

マイクロタイタープレートの各ウェルに、セリシン濃度250 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 0 $\mu\text{g/mL}$ の2%スクロース添加TSB液体培地200 μL と菌懸濁液5 μL を加え、37℃で18時間培養した後、バイオフィームアッセイでBIを測定した。

8. 統計解析

バイオフィーム抑制試験において測定された吸光度は、平均値±標準誤差として表した。統計的比較は、滅菌蒸留水を対照群とし、一元配置分散分析と、それに続くTukeyの多重比較検定を実施した。菌増殖に対するセリシンの影響の評価では、Mann-Whitney U検定を実施した。統計解析ソフトは、Statcel ver.3 software (OMS, 日本)を使用した。有意水準を0.01とし、 $p < 0.01$ を有意差ありとした。

結果

1. セリシンの抽出

セリシンは抽出毎にBCA法でタンパク質濃度を測定した。抽出は3回行い、濃度は1回目10.8 mg/mL、2回目13.2 mg/mL、3回目14.4 mg/mLであった。

2. SDS-PAGE

14.4 mg/mLのセリシン溶液5 μ L, 10 μ L, 18 μ LをSDS-PAGEで展開した。分子量はおおよそ30 kDaから220 kDaに分布しており、連続性のあるスミア状に確認された (Fig. 2)。

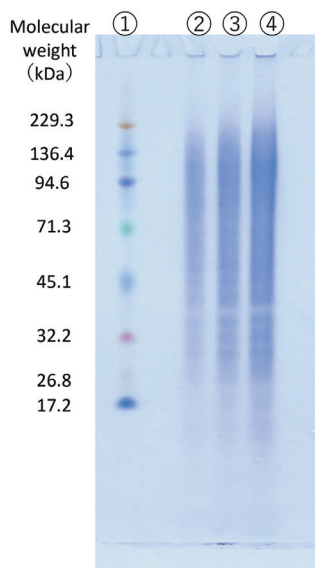


Figure 2 SDS-PAGE of extracted sericin. ① molecular marker. ② sample 5 μ L ③ sample 10 μ L ④ sample 18 μ L. Sericin was distributed from 30 kDa to 220 kDa like a smear.

3. 対象菌株のバイオフィーム形成能

臨床分離株6株とMRSA標準株1株のバイオフィームアッセイを実施した。それぞれのBIは、#1が0.278, #2が0.858, #3が1.216, #4が1.679, #5が1.423, #6が0.906, #7 (標準株) が1.317であった。#7 (標準株) より高いBIを示した#4, #5, および#7 (標準株) の3株を用いてバイオフィーム抑制試験を行った。

4. 菌増殖に対するセリシンの影響

セリシンを添加していないTSB培地とセリシン濃度250 μ g/mLのTSB培地における増殖性を比較した。菌株#4, #5, #7全てにおいて両群で統計学的な有意差は認めなかった (Fig. 3)。

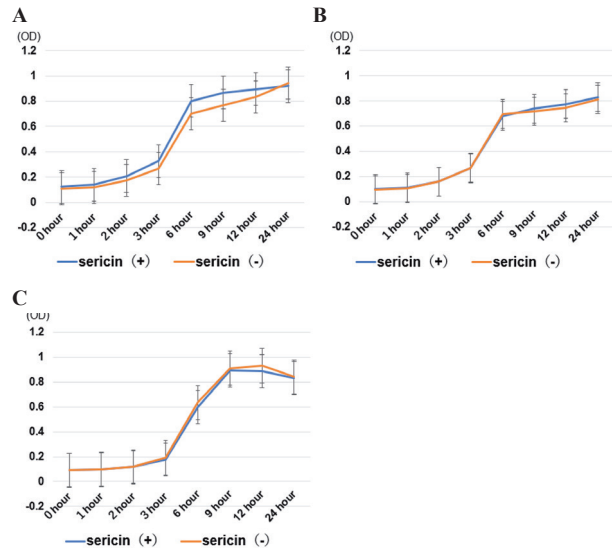


Figure 3 Effect of sericin on growth of MRSA strains in liquid culture. The growth of MRSA strains in TSB liquid medium with sericin (250 μ g/mL) and without sericin was compared. Turbidity was measured over time at OD595. (a) strain #4. (b) strain #5. (c) strain #7. Data are presented as means \pm standard error and Mann-Whitney's U test was performed. $n=3$.

5. バイオフィームの形態学的観察

位相差顕微鏡では菌株#4のバイオフィームの構造体がセリシン濃度250 μ g/mLで破壊されていることが観察された (Fig. 4a)。菌株#5と#7も同様にセリシン濃度250 μ g/mLでは対照に比べてバイオフィームの構造体が著明に減少していた。明視野顕微鏡では、菌株#5のバイオフィームを染色したクリスタルバイオレットの色素が著明に減弱した (Fig. 4b)。菌株#4および#7も同様に、250 μ g/mL, 50 μ g/mL, 10 μ g/mLの濃度で減弱することが観察された。

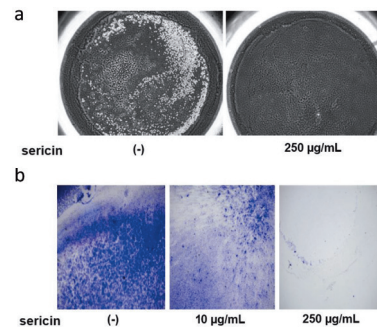


Figure 4 Morphological observation (a) Phase contrast microscopy findings (#4). (b) Brightfield microscopy findings (#5). Biofilms were stained with crystal violet and observed.

6. バイオフィーム抑制試験

マイクロタイタープレートでの実験デザインをFig. 5aに、37℃ 18時間で培養後の菌液をFig. 5bに、形成されたバイオフィームを0.1%クリスタルバイオレットで染色後に95%エタノールで溶解した状態をFig. 5cに、また各濃度のセリシン溶液中のBIをTable 1に示す。

菌株#4、#5、#7のセリシン濃度0 µg/mLのBIに対する各セリシン濃度でのBIの抑制率 (inhibition rate) をそれぞれFig. 5d-fに示す。菌株#4は対照と各濃度間で統計学的な有意差をみとめ、濃度依存的にバイオフィーム形成が阻害された(Fig. 5d)。菌株#5は対照と10 µg/mLの間に有意な差はなかったが、250 µg/mLでは有意に阻害されていた (Fig. 5e)。菌株#7は濃度依存的な阻害効果がみられ、250 µg/mLでは有意にBIが低下していた (Fig. 5f)。セリシン濃度250 µg/mLと対照との比較では、菌株#4が64.3% (平均値0.412 vs. 1.153, $p < 0.01$)、菌株#5が56.1% (0.466 vs. 1.061, $p < 0.01$)、菌株#7が74.8% (0.373 vs. 1.480, $p < 0.01$)、平均66.1% (0.417 vs. 1.231, $p < 0.01$)の抑制効果がみられた。

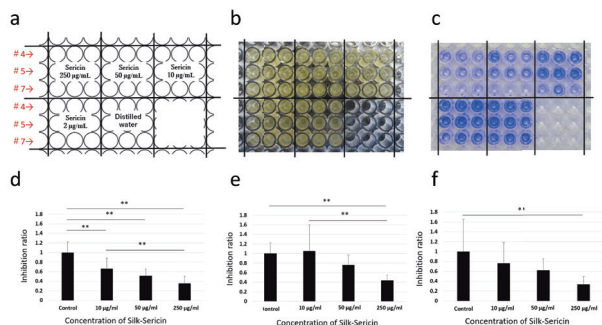


Figure 5 Biofilm inhibition test on biofilm assay (a) Experimental design on a 96-well microtiter plate. (b) Culture solution incubated at 37℃ for 18h. (c) 95% ethanol solution of stained biofilm with crystal violet. (d-f) Inhibition rate of biofilm index by strain #4, #5, and #7, respectively. Data are presented as means \pm standard error, and one-way analysis of variance and subsequent Tukey's multiple comparison test were performed. $n=3$, $**p < 0.01$.

Table 1. Biofilm inhibition test

strain		Sericin concentration				
		250 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$	0 $\mu\text{g/mL}$
# 4	mean biofilm index	0.412	0.597	0.767	1.079	1.153
	standard error	0.049	0.043	0.072	0.086	0.073
# 5	mean biofilm index	0.466	0.806	1.119	1.091	1.061
	standard error	0.034	0.064	0.164	0.095	0.067
# 7	mean biofilm index	0.373	0.743	1.059	1.216	1.480
	standard error	0.040	0.110	0.168	0.120	0.230

考察

本研究では、高圧蒸気滅菌法で得られたセリシンがMRSA株によるバイオフィーム形成を阻害する作用を有することを明らかにした。今回バイオフィーム抑制効果がみられたセリシン濃度は、褥瘡の治療に軟膏として用いた場合には十分達成可能な濃度であり、本研究の結果

は、抗バイオフィーム作用を有する製品としての開発の基礎的データとなると考えられる。

セリシンは、加熱処理、アルカリや酸、尿素を用いる化学処理などの方法でシルクから抽出されることが知られているが、最も一般的に行われている抽出法は加熱処理法である。アルカリ、酸、尿素を用いた抽出では化学的汚染等により透析など追加の精製手順が必要となる。さらに、尿素による抽出では尿素によってセリシンが加水分解された結果高い抗菌作用をもつとされ、アルカリあるいは酸による抽出ではセリシンが尿素よりも分解され構造が大きく変化したことで抗菌作用が減弱するという報告²¹⁾があることから、今回は高圧蒸気滅菌法によるセリシンの抽出を試みた。高圧蒸気滅菌法で抽出したセリシンをSDS-PAGEで展開したところ分子量およそ30-220 kDaの領域にスミア状に確認された。この結果は、セリシンは17種類のアミノ酸で構成される水溶性のタンパク質で、抽出後の分子量は24-250 kDaに分布する^{12,23)}という過去の報告と合致した。高圧蒸気滅菌法で問題なくセリシンを抽出できたと判断した。

Table 2. Amino acid composition of sericin

abbreviation	amino acid name	mol%	polarity
Ser	serine	31.0	hydrophilic
Gly	glycine	19.1	hydrophobic
Asp	aspartic acid	17.8	hydrophilic
Thr	threonine	8.0	hydrophilic
Glu	glutamic acid	4.4	hydrophilic
Arg	arginine	3.9	hydrophilic
Ala	alanine	3.8	hydrophobic
Val	valine	3.1	hydrophobic
Lys	lysine	2.7	hydrophilic
Tyr	tyrosine	2.2	hydrophilic
His	histidine	1.0	hydrophilic
Pro	proline	0.4	hydrophobic
Ile	isoleucine	0.4	hydrophobic
Leu	leucine	0.2	hydrophobic
Phe	phenylalanine	0.2	hydrophobic
Cys	cysteine	< 0.05	hydrophilic
Met	methionine	< 0.05	hydrophobic

セリシンにはアミノ酸としてセリンが31%、グリシンとアスパラギン酸がそれぞれ19.1%、17.8%と多く、次いでスレオニン、グルタミン酸など17種類が含まれ²³⁾、多くが親水性アミノ酸残基である (Table 2)。アミノ酸の立体構造には、アミン基 (-NH₂) があり、条件によってプロトン化されアミノ基 (-NH₃) に変換され正に荷電する。親水性アミノ酸残基が多くを占めるセリシンは、このアミノ酸の立体構造によって抗菌作用をもつと考えられている^{21,27)}。

細菌細胞の表面は、水環境中で表面に露出している分子のカルボキシル基やリン酸基などが解離して負に帯電している場合が多く、付着表面も水中では負に帯電して

いることが多い。細菌は、ブラウン運動や鞭毛運動などによって負に帯電した表面に近づき、van der Waals引力と静電反発力の両方が働くことで可逆的な付着と脱離を繰り返している（DLVO理論）^{24,25)}。ある菌体が固体表面に付着した際、生体活動に伴うEPSの生成とともに不可逆付着が起こり、その菌体の増殖や多層吸着を繰り返すことでバイオフィームが発達する。

グラム陽性菌の細胞壁は、ペプチドグリカン層にタイコ酸を含み、脂質を有するリポタイコ酸は細胞質膜と結合している。タイコ酸は負に荷電し、グラム陽性菌の細胞壁の電荷を負に保っている²⁶⁾。このように細菌細胞は液体培地中において負に帯電しているため、セリシンの親水性アミノ酸残基がもつ正に荷電したアミノ酸と結合しやすい。この相互作用によって細菌の増殖抑制および細胞死を引き起こすことでセリシンは抗菌作用を有する^{11,22,27)}。そこで、セリシンが菌の増殖を抑制するかどうかについて液体培地での増殖性を検討したが、セリシン濃度250μg/mLではMRSA株の増殖は抑制されなかった。しかし、バイオフィーム抑制試験ではセリシンが同じ濃度でバイオフィーム形成を抑制する結果となったことから、セリシンのバイオフィーム形成抑制効果は、抗菌活性とは異なるメカニズムによることが示唆される。今後さらに検討が必要であるが、正に荷電したセリシンのアミノ基が負に荷電する細菌細胞と結合し、菌体が固体表面に付着できなかった可能性、もしくはセリシンがEPSの形成を抑制した可能性が考えられる。

本研究の制限として、使用したMRSA菌株が3株と少なく、さらなる抑制効果を確認するために多くの菌株で検証する必要がある。また、MRSA以外の褥瘡の創傷治癒を遷延化させる病原菌に対しても同様の作用がみられるか検討が必要と考える。

結論

高圧蒸気滅菌法によって得られたセリシンが褥瘡から分離されたMRSA株によるバイオフィームの形成を阻害することを明らかにした。褥瘡など慢性創傷におけるバイオフィーム形成はいまだに臨床上克服すべき課題である。シルクは生体適合性に優れ安全性の高い素材であり、今回得られた結果はセリシンを原材料とする創傷治療外用剤の開発の可能性を示すものである。

利益相反

本研究に関して開示すべき利益相反はありません。

謝辞

シルク繭の扱いについてご教示いただいた株式会社アーダンの平田美信氏に深謝致します。

文献

- 1) 秋山尚範, 多田譲治, 荒田次郎. バイオフィーム (biofilm). 臨床皮膚科 1999; 53: 59-63.
- 2) James GA, Swogger E, Wolcott R, et al. Biofilms in chronic wounds. Wound Repair Regen 2008; 16: 37-44.
- 3) Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". J Bacteriol 2007; 189: 7945-7947.
- 4) Percival SL. Importance of biofilm formation in surgical infection. Br J Surg 2017; 104: e85-94.
- 5) 真田弘美, 大西美千代, 北山幸枝, ほか. 褥瘡を有する高齢者の創周囲皮膚における石鹸洗浄の有効性の検討. 日本褥瘡学会誌 2000; 2: 32-39.
- 6) Gjødtsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Klein BM, Kroghfelt KA. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. Int Wound J 2006; 3: 225-231.
- 7) 中尾裕史, 坪井良治, 小川秀興. 白糖・ポビドンヨード混合製剤の創傷治癒促進メカニズム — 培養細胞および動物モデルを用いた解析. Therapeutic Research 2002; 23: 1625-1626.
- 8) 山崎 修, 秋山尚範, 大野貴司, 岩月啓氏. 黄色ブドウ球菌のバイオフィームに対する白糖・ポビドンヨード配合軟膏（ユーパスタ®）の効果. Therapeutic Research 2002; 23: 1619-1622.
- 9) Cooper R, Bjarnsholt T, Alhede M. Biofilms in wounds: a review of present knowledge. J Wound Care 2014; 23: 570, 572-574, 576-580.
- 10) Baba A, Matsushita S, Kitayama K, et al. Silk fibroin produced by transgenic silkworm overexpressing the Arg-Gly-Asp motif accelerates cutaneous wound healing in mice. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2019; 107: 97-103.
- 11) Xue R, Liu Y, Zhang Q, et al. Shape changes and interaction mechanism of Escherichia coli cells treated with sericin and use of a sericin-based hydrogel for wound healing. Appl Environ Microbiol 2016; 82: 4663-4672.
- 12) Hazeri N, Tavanai H, Moradi AR. Production and properties of electrosprayed sericin nanopowder. Sci Technol Adv Mater 2012; 13: 035010.
- 13) Manago K, Nishi J, Wakimoto N, et al. Biofilm formation by and accessory gene regulator typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains recovered from patients with nosocomial infections. Infect Control Hosp Epidemiol 2006; 27: 188-190.
- 14) Lenselink E, Andriessen A. A cohort study on the efficacy of a polyhexanide-containing biocellulose dressing in the treatment of biofilms in wounds. J of Wound Care 2011; 20: 534, 536-539.
- 15) Bjarnsholt T, Alhede M, Jensen P, et al. Antibiofilm properties

- of acetic acid. *Adv Wound Care* (New Rochelle) 2015; 4: 363-372.
- 16) Halstead FD, Webber MA, Rauf M, Burt R, Dryden M, Oppenheim BA. In vitro activity of an engineered honey, medical-grade honeys, and antimicrobial wound dressings against biofilm-producing clinical bacterial isolates. *J Wound Care* 2016; 25: 93-94, 96-102.
- 17) Hoekstra MJ, Westgate SJ, Mueller S. Povidone-iodine ointment demonstrates in vitro efficacy against biofilm formation. *Int Wound J* 2017; 14: 172-179.
- 18) Thorn RM, Austin AJ, Greenman J, Wilkins JP, Davis PJ. In vitro comparison of antimicrobial activity of iodine and silver dressings against biofilms. *J Wound Care* 2009; 18: 343-346.
- 19) Andriessen AE, Eberlein T. Assessment of a wound cleansing solution in the treatment of problem wounds. *Wounds* 2008; 20: 171-175.
- 20) Durante CM, Greco A, Sidoli O, Maino C, Gallarini A, Ciparandi G. Evaluation of the effectiveness of a polyhexanide and propyl betaine-based gel in the treatment of chronic wounds. *Minerva Chir* 2014; 69: 283-292.
- 21) Aramwit P, Napavichayanum S, Pienpinijtham P, Rasmi Y, Bang N. Antibiofilm activity and cytotoxicity of silk sericin against *Streptococcus mutans* bacteria in biofilm: an in vitro study. *J Wound Care* 2020; 29: S25-S35.
- 22) Sonnleitner D, Sommer C, Scheibel T, Lang G. Approaches to inhibit biofilm formation applying natural and artificial silk-based materials. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021; 131: 112458.
- 23) 加藤範久. セリシンの機能特性とその利用. 製糸夏期大学 2001; 54: 25-32.
- 24) 大島広之. 生体コロイド粒子間の相互作用のモデル. *オレオサイエンス* 2016; 16: 71-80.
- 25) 堀克敏, 石川聖人. 細菌ナノファイバーによる微生物の表面付着. *環境バイオテクノロジー学会誌* 2010; 10: 3-7.
- 26) Gross M, Cramton SE, Götz F, Peschel A. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun* 2001; 69: 3423-3426.
- 27) Schäfer S, Avani F, Köpf M, et al. Silk proteins in reconstructive surgery: Do they possess an inherent antimicrobial activity? A systematic review. *Wound Repair Regen* 2023; 31: 99-110.

Author Index

第 76 卷 人 名 検 索

A

Takumi AKAHO	赤穂 拓海	11
Kenichi ARATA	荒田 憲一	1

B

Atsunori BABA	馬場 淳徳	22
---------------	-------	----

F

Yoshihiro FUKUMOTO	福元 祥浩	1
Tomoko FUKUSHIGE	福重 智子	22

H

Hiroaki HAMADA	濱田 寛章	5
Ryosuke HANAYA	花谷 亮典	5
Takaaki HIWATARI	樋渡 貴昭	5

I

Rie IBUSUKI	指宿 りえ	11
Naoko IMUTA	蘭牟田 直子	22

K

Takuro KANEKURA	金蔵 拓郎	22
Chihaya KORIYAMA	郡山 千早	11
Shinichi KUROKI	黒木 伸一	5

M

Hironori MIYAHARA	宮原 広典	11
Kaede MIYAMOTO	宮本 楓	11

N

Masatoshi NAKAMURA	中村 政敏	22
Junichiro NISHI	西 順一郎	22
Tomoyo NISHIOBINO	西帯野 智代	22
Daisaku NISHIMOTO	西本 大策	11

S

Koichiro SHIMOISHI	下石 光一郎	1
Ippei SHIMOSHIKIRYO	下敷領 一平	11

T

Kenichiro TAJITSU	田實 謙一郎	5
Toshiro TAKEZAKI	嶽崎 俊郎	11
Shiroh TANOUE	田ノ上 史郎	11
Kouichi TOKUSHIGE	徳重 浩一	11

U

Tsubasa UEMURA	植村 翼	1
----------------	------	---

Y

Tomoko YASUDA	安田 友子	11
Goichi YOTSUMOTO	四元 剛一	1

Editorial Board

編 集 委 員 会

Editor-in-Chief Chihaya KORIYAMA 郡山 千早
Editors

Masahisa HORIUCHI	堀内 正久
Michiyo HIGASHI	東 美智代
Shuji KANMURA	上村 修司
Ken SASAKI	佐々木 健
Hideyuki TERAZONO	寺蘭 英之
Hidetaka YOKOO	横尾 英孝

Acknowledgement

All editorial board members deeply appreciate following reviewers. They sincerely estimated manuscripts and gave proper advices to the authors. Their gratuitous works support editing this journal.

Reviewers

Shingo FUJIO
Michiyo HIGASHI
Itsumi IMAGAMA
Hideki KAWAMURA
Yuga KOMAKI
Shiroh TANOUE
Hideyuki TERAZONO

査読者

藤尾 慎吾
東 美智代
今釜 逸美
川村 英樹
小牧 裕雅
田ノ上 史郎
寺蘭 英之