

応用微生物学 ISSN 0266-8254 の書簡

原著

銀と銅を含むメチシリン耐性黄色ブドウ球菌に攻撃された抗菌材料の有効性に対する温度と湿度の影響
H.T. ミシェル¹、J.O. Noyce² と C.W. Keevil²

¹ Copper Development Association Inc.、ニューヨーク、ニューヨーク、米国

² サウサンプトン大学生物科学部、サウサンプトン、イギリス

キーワード 抗菌、有効性、感染症、MRSA、ブドウ球菌、試験方法。

対応

ハロルド T. ミッシェルズ、銅開発協会、ニューヨーク州マディソンアベニュー260、ニューヨーク 10016、アメリカ。

電子メール : hmichels@cda.copper.org

2009/0248 : 2009年2月7日受領、2009年3月20日改訂、承認

2009年3月23日

doi : 10.1111/j.1472-765X.2009.02637.x

この記事の再利用は、<http://www3.interscience.wiley> に記載されている利用規約に従って許可されています。 [com/authorresources/onlineopen.html](http://www3.interscience.wiley.com/authorresources/onlineopen.html)

概要

目的 : メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に挑戦して、有効性に対する温度と湿度の影響を評価することにより、既知の抗菌特性を持つ金属である銀と銅を比較します。

方法と結果 : 世界的に使用されている日本の工業規格、JIS Z 2801 に記載されている標準的な方法論を使用して、銀イオン含有材料は、20°Cおよび35°Cで相対湿度 (RH) > 90%で24時間後、MRSA 生存率の5対数の減少を示した。ただし、相対湿度22%および20°Cでは0~3未満のログのみであり、相対湿度22%および35°Cでは減少しません。銅合金は、すべてのテスト条件下で5を超える対数減少を示しました。

結論 : JIS Z 2801 で利用されている高湿度 (> 90%RH) と高温 (35°C) は、銀イオン含有材料で測定可能な有効性を生み出しますが、屋内環境に典型的な低温および湿度レベルでは、有意な応答を示しませんでした。

研究の重要性と影響 : 同じ条件下での銀イオン含有材料の低い有効性と比較して、屋内環境に典型的な温度および湿度レベルで、銅合金によって示される高い有効性レベルは、病院などの屋内環境における抗菌材料として、銅合金の使用に有利です。

前書き

MRSA は約30年前に病院に出現して以来、大きな問題であり続けています。2005年には、米国の94 650人の患者が侵襲性のMRSA感染症を患っていると推定されました。これらの感染により18 650人が死亡した (Klevens et al. 2007)。米国疾病対策センターは、これがエイズによる死亡者数を超えていることを示しています。MRSA は主要な健康問題であり、もはや集中治療室に限定されていません (Klevens

et al. 2007) が、病院に感染したか院内感染した深刻な感染症が一般社会に広がっています。MRSA が患者と医療スタッフの手によって広まることは一般に認められていますが (Cimolai 2008)、環境表面が感染性細菌の重要なリザーバーとしても機能する可能性があるという証拠が増えており (Casey et al. 2008)、それらが細菌の伝播に寄与している可能性があります。

MRSA 感染は、ヘルスケア環境だけでなく、家畜にも懸念を引き起こし続けています。どちらの状況でも、MRSA の出現は特に問題です。オランダでは、豚および牛の飼育に関連する MRSA の新系統が報告されており、豚の調査では、約 40%がこのクローンを保有していた (van Loo et al. 2003)。韓国では、MRSA 株が鶏および乳牛で発見された (Lee 2003)。MRSA は家畜に定着しており、家畜から農家 (Lee 2003)、そして一般の人々に広がる可能性があります。

地域社会で獲得した MRSA もまた、大きな問題となっています (Klevens et al. 2007)。感染者は一般に、院内感染 MRSA 患者よりも若いです。MRSA は、最近病院から退院した個人や、明らかな危険因子のない他の人で発見されました。伝染には、軽微な皮膚外傷、スポーツおよびパーソナルケア機器の共有、混雑した状況および近所での生活が含まれます。集団発生は、学校、専門学校および高校のスポーツ施設、軍事訓練センター、刑務所で発生しました。

微生物が物体上で成長および/または生存する能力を低下させるために、抗菌活性成分が材料に導入されています。環境表面としての抗菌材料の利用は、臨床現場およびそれ以降の MRSA レベルを低下させる可能性があります。環境表面上の MRSA のレベルが低下すると、これらの表面に触れたときに、その後人間に伝染する細菌の量が減少する可能性があります。US EPA (米国環境保護局 2008) が公衆衛生上の主張を行うことが法的に許可されている抗菌材料として登録されている銅合金の他に、抗菌効果を示すとされる銀イオンを含むものなど、他の材料があります。

銀イオン含有材料は、JIS Z 2801 (日本規格協会 2000) で規定されている、90%RH を超える高温、35°C、高湿度の条件下で効果を発揮します。この研究は、病院で見られる典型的な屋内環境の低レベルの温度と湿度における銀イオン含有材料の有効性を理解するために行われました。銅合金は、病院で一般的に見られる低レベルの温度と湿度で抗菌効果を示すため、比較として使用されました (Noyce et al. 2006a)。

材料および方法

2つの市販の銀含有材料がテストされましたが、それらは専有製品であるため、完全な説明はありませんでした。この研究の目的で Ag-A と指定された最初の材料は、製造業者によって「ゼオライト担体に銀イオンを組み込んでいる」と説明されています。ゼオライトは、微細孔構造のアルミノケイ酸塩鉱物です。Ag-B と呼ばれる 2 番目の材料は、製造元によると「有機マトリックス中の有効成分としての銀イオン」で構成されています。Ag-A と Ag-B の両方で、銀イオン含有コーティングは、テストサンプルのソースとしてステンレス鋼基板に商業的に適用されました。

銀と銅を含む材料の効率

表 1 公称合金組成 (重量%)

UNS number: common name	Cu	Zn	Sn	Ni	Fe	Cr	P	Ag
C11000: copper	99-90							
C51000: phosphor bronze	95		5				0.2	
C70600: Cu-Ni	90			10				
C26000: cartridge brass	70	30						
C75200: Cu-Ni-Zn	65	17		18				
S30400: stainless steel				8	74	18		2.5
Ag-A*: proprietary product								2.5

* Ag-A は金属合金ではないため、UNS 合金番号は適用されません。この独自の銀イオン含有コーティングの銀含有量のみが提供されました。

5 つの銅合金の組成と S30400 ステンレス鋼の実験制御は、広く使用されている合金指定システムである UNS 番号で説明されています。銅合金とステンレス鋼の組成、および銀イオン含有材料の 1 つである Ag-A の銀含有量を表 1 に示します。Ag-B の銀含有量は提供されていません。名目上、Ag-A と同等であり、Ag が 2~5%含まれています。これらのテストに 99~9%の純銀を含めることも科学的に重要です。しかし、実際には、強度が低くコストが高いため、ファインシルバーは構造材料として使用されていません。

サンプル材料はすべて、1.1 cm または 2.54・2.54 cm の正方形のいずれかのサイズにカットされました。合金サンプルは、直径 2 mm のガラスビーズ 30 個を含むアセトン 10 ml で 30 秒間ボルテックス(渦操作)することにより、脱脂洗浄されました。洗浄後、合金サンプルはエタノール浸漬とブンゼンフレーミングによって滅菌され、汚染を防ぐために接種前にカバーされたプラスチック容器に移されました。銀イオンを含むサンプルを洗浄し、アルコールに浸しましたが、コーティングの損傷を避けるために脱脂および火炎処理はしていません。

テストの最初のフェーズでは、典型的な屋内条件下での MRSA 接種材料への曝露時間の関数として有効性を評価することが目的でした。トリプトン大豆培養液に MRSA (NCTC 10442) を接種し、37°C で 16 時間インキュベートしました。これに続いて、連続希釈によって決定されるように、約 $2 \cdot 10^7$ CFU /クーポンの濃度で、各データポイントの各材料の 3 枚のクーポンを接種しました。これらの接種されたサンプルは、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ または $\sim 22^\circ\text{C}$ 、 $50 \pm 10\% \text{RH}$ または $\sim 50\% \text{RH}$ で 15 分から 6 時間の範囲のさまざまな時間に曝露されました。曝露期間後、直径 2 mm のガラスビーズ 20 個を含む滅菌リン酸緩衝生理食塩水 10 ml 中で 30 秒間ボルテックスすることにより、微生物をサンプルから除去しました。サンプルから除去された生菌数を確認するために、100 μl を除去し、段階希釈しました。栄養寒天プレートに各希釈液 50 μl を接種し、表面に均一に広げ、37°C で 18 時間インキュベートし、CFU の数をカウントして、CFU /サンプルの数を計算するために使用しました。他の場所 (Noyce et al. 2006a)。

銀イオンを含むものなどの抗菌材料は、JIS Z 2801 規格で要求されているように、35°C、90%以上の相対湿度で 24 時間実施されたテストに基づく結果を報告します。必要な高湿度レベルは、サンプル表面の接種材料にプラスチックフィルムを押し付け、カバーされたペトリ皿に入れて水分を保持することによって維持されます。対照的に、銅合金は通常、 -20°C の典型的な実験室環境および JIS Z 2801 で指定されている $> 90\% \text{RH}$ よりはるかに低い周囲湿度レベルでテストされます。

試験の第 2 フェーズでは、JIS Z 2801 試験条件 (日本規格協会 2000) と、その他の温度および相対湿度で 24 時間後の有効性を評価することが目的でした。実際の JIS Z 2801 試験は、 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ ($\sim 35^\circ\text{C}$) および 90%以上の相対湿度で 24 時間実施されました。テストは 90%以上の相対湿度で繰り返されましたが、 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ($\sim 20^\circ\text{C}$) の低温で行われました。さらに、実験室で見つかったより低い湿度レベルで 2

つの並行した一連のテストが行われました。これらの低湿度テストは空気中で行われ、湿度を維持するためにプラスチックフィルムは使用されませんでした。1つ目は $15 \pm 24\%RH$ で $35 \pm 2^{\circ}C$ であり、2つ目は $19 \pm 28\%RH$ で $20 \pm 2^{\circ}C$ でした。簡単にするために、 $15 \sim 24\%RH$ は $-20\%RH$ として表示され、 $19 \sim 28\%RH$ は $-24\%RH$ として表示されます。テストの最初のフェーズで前述したものと同様の標準的な微生物学的手法を使用して、細菌の培養、回収、および列挙を行いました。このテスト段階では、合成ブロス AOAC に MRSA (ATCC 33592) を無菌で接種し、 $37^{\circ}C$ で一晚インキュベートしました。接種材料には、約 $6 \cdot 10^8$ CFU/ml の MRSA と、5%ウシ胎児血清および 0.01% Triton X-100 の土壌負荷が含まれていました。各材料または合金の3枚のクーポンを接種し、希望の温度と相対湿度レベルで24時間暴露しました。暴露後、残りの生菌を回収し、培養し、計数した。他のすべての物質の減少は、温度と相対湿度のテスト条件下で、24時間のテスト期間の終了時に、コントロールマテリアル S30400 ステンレス鋼の生存者数と比較して測定されました。

結果

テストの最初のフェーズの目的は、MRSA 接種材料への曝露時間の関数として、銀イオン含有材料と銅の有効性を評価することでした。具体的には、2つの以前に定義された銀イオン含有材料、Ag-A と Ag-B、および C11000 銅の抗菌効果は、S30400 ステンレス鋼が $-22^{\circ}C$ および $-50\%RH$ の典型的な実験室温度で測定され、実験コントロール。図1に示す最初の研究の結果は、C11000 銅の75分の7ログの削減を示していますが、Ag-A と Ag-B と指定された2つの銀イオン含有材料では、360分の意味のある削減は見られませんでした。Bだけでなく、実験コントロール、S30400 ステンレス鋼。2つの銀イオン含有材料は互いに区別できず、試験条件下での実験対照である S30400 ステンレス鋼との有効性に有意差はありませんでした。

銀と銅を含む材料の効率

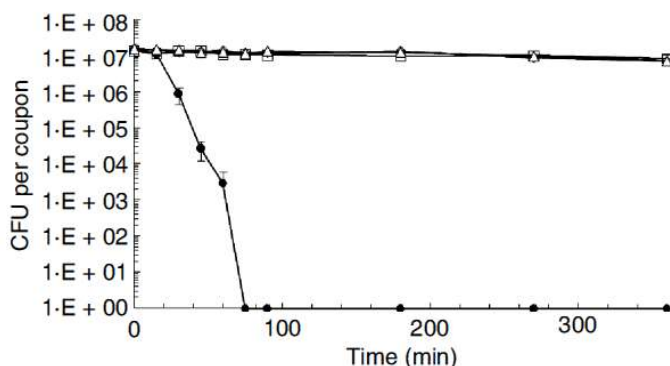


図1 C11000 銅 (d)、Ag-A (D)、Ag-B (e)、S30400 ステンレス鋼 (h) の2つの銀イオン含有材料での、約 $22^{\circ}C$ 、約 $50\%RH$ での MRSA の生存率。

テストの第1フェーズが完了した後、テストの第2フェーズが実施され、銀イオン含有材料の有効性の主張をよりよく理解し、温度と湿度の範囲にわたる抗菌効果に対する追加の洞察を得ました。この第2段階では、JIS Z 2801 プロトコルに準拠して銀イオン含有材料の1つである Ag-A と5つの銅合金をテストし、S30400 ステンレス鋼を再び実験対照として使用しました。さらに、JIS Z 2801 湿度レベル $> 90\%RH$ で、ただし $20^{\circ}C$ の低温で、24時間有効性試験が行われました。他の2つの24時間有効性試験は、より低い湿度レベルで行われました。最初は $-20\%RH$ および $-35^{\circ}C$ で、2つ目は $-24\%RH$ および $-20^{\circ}C$ で行われました。これらの結果を表2に示します。

JISZ 2801 のテスト条件-35°Cおよび> 90%RH でテストした場合、Ag-A と指定された銀イオン含有材料では> 6.4 のログドロップが見られましたが、-20°C、相対湿度 90%以上で同じ材料。より低い湿度レベルでは、銀イオン含有材料である Ag-A は、-35°C と-24%RH で減少がないかゼロであり、-20°C で非常に小さい<0.2 log の減少を示しましたおよび—24%RH。対照的に、湿度と温度のすべての組み合わせで、5 つすべての銅合金は、24 時間後に生存可能な MRSA で> 5.5~> 6.4 の対数減少を示しました。

表 2 > 90%RH&-35 C、> 90%RH&-20 C、-20%RH&35OC、または-24%RH で 24 時間後の S304 ステンレス鋼コントロールと比較したライブ MRSA の Log10 の減少 20 C

Materials	>90% RH*	>90% RH	~20% RH	~24% RH
	~35°C	~20°C	~35°C	~20°C
C11000: copper	>6.4	>6.1	>5.5	>5.9
C51000: phosphor bronze	>6.4	>6.1	>5.5	>5.9
C70600: Cu-Ni	>6.4	>6.1	>5.5	>5.9
C26000: cartridge brass	>6.3	>6.1	>5.5	>5.9
C75200: Cu-Ni-Zn	>6.4	>6.1	>5.5	>5.9
Ag-A†	>6.4	5.5	0	<0.2

* JIS Z 2801 プロトコルの高湿度および高温試験条件。

f 銀イオン含有コーティング。

討論

表 2 に示すデータは、銀イオン含有材料である Ag-A が、JIS Z 2801 の 90%RH 以上および-35°C の高湿度および高温条件下、および 90%以上の RH で効果を示すことを示しています。ただし、Ag-A は、-20% RH および 35°C、さらに重要なのは-24%RH および 20°C で意味のある抗菌効果を示しません。後者は室内環境で一般的です。これは、JIS Z 2801 が一般的な屋内環境での使用を目的とした抗菌材料の有効性を評価するための適切な方法論ではないことを示唆しています。JIS Z 2801 の結果は、有効性が病院で見られる環境などの一般的な屋内環境に適用できると解釈する可能性があるため、消費者に誤った自信を与えて誤解させる可能性があります。

銀イオン含有材料の有効性の欠如は最近、Wood らによって確認されました。(2007) -24%RH および 20°C の試験条件に近い病院設定で。銀イオン含有材料 Ag-A で作られた聴診器保護隔膜カバーのサンプルあたりの平均コロニー数は 246.5 であり、カバーされていない聴診器隔膜は 1 サンプルあたり 71.4 のコロニーであったことが判明しました (Wood et al. 2007)。したがって、抗菌性であると報告されている銀イオンを含む保護カバーは、保護されていない聴診器の隔膜よりも重度に汚染されていました。この Ag-A の有効性の欠如は、抗菌銀イオン含有材料が公衆衛生の主張を許可する米国 EPA 登録を持たない理由の一部を説明している可能性があります。Ag-A のような資料は合法的に米国で公衆衛生上の主張を行うことはできません。しかし、彼らは、扱われた記事の免除の下で主張をすることができます (米国環境保護庁 2003)。扱われた記事の免除は、有効成分である銀が、銀イオン含有コーティング自体を細菌による劣化または攻撃から保護することを示しています。

銀イオン含有材料とは著しく対照的に、最近 3 つの米国に従ってテストされたときに 5 つの細菌に対する強力な抗菌効果を示した後、公衆衛生の主張 (米国環境保護庁。2008) で固体材料として登録されて

いる抗菌銅合金 EPA プロトコル (Michels and Anderson 2008)。これらの 5 つの細菌は、黄色ブドウ球菌、大腸菌 O157 : H7、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、エンテロバクターエアロゲネスおよび緑膿菌です。EPA の登録に先立ついくつかの研究は、銅合金がテストされた 1 つのウイルスだけでなく、さまざまな細菌に対して強力な抗菌効果があるという証拠を提供しました。これらの生物には、クロストリジウムディフィシル (Weaver et al. 2008)、大腸菌 O157 (Wilks et al. 2005) および (Noyce et al. 2006b)、リステリア菌 (Wilks et al. 2006)、結核菌 (Mehtar et al. 2008)、およびインフルエンザ A (Noyce et al. 2007)。

銅表面での細菌不活化のメカニズムは解明されていませんが、これまでに生成された結果は、乾燥した銅表面で細菌が急速に殺されることを示唆しています。この速い作用は、一部には、重要な銅耐性病原菌の欠如を説明するかもしれません。銅は広く使用され、何世紀にもわたって人間と接触しており、細菌を致死量以下の曝露にさらすべきでした。予備調査 (Espirito Santo et al. 2008) は、細菌が乾燥状態でバイオフィルムを形成する時間がないことを示しており、ストレスおよび生存条件は水系のものとは異なります。考えられる毒性のメカニズムの 1 つは、DNA 損傷です。しかしながら、マコンバー等 (2007) は、乾燥した銅の表面の毒性に関する研究で、「銅が生体内で有意な酸化的 DNA 損傷を触媒しないことは明らかである。したがって、銅の毒性は異なるメカニズムで発生する必要があります。」したがって、たとえ水性環境で生物が銅耐性を持っていたとしても、乾燥した銅表面で生き残ることはできないかもしれません。毒性のメカニズムに関する研究は続いています。

数種類のバクテリアに対する銅合金で見られる強力で一貫した有効性は、このクラスの材料が病院環境でさらに評価される必要があることを示しています。その目的を達成するために、米国の 3 つの施設の集中治療室で、調整された臨床試験が進行中です。治験施設は、サウスカロライナ州チャールストンにあるニューヨーク市のメモリアルスローン=ケタリングがんセンター、サウスカロライナ州医科大学のラルフ H. ジョンソン VA メディカルセンターにあり、米国国防総省の遠隔医療および先端技術研究センター。英国のバーミンガムにある大学病院 NHS 財団トラストで行われた臨床試験の予備結果 (Casey et al. 2008) は、すべての銅含有アイテムの微生物は、同等のコントロールよりも 90~100% 少ないことを示しています。この試験も続いています。

これらの試験の結果は、銅合金が病院で有効であり、院内感染の原因となる細菌の制御を助ける役割を果たす可能性があることをさらに実証することが期待されています。