(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6506258号
(P6506258)

(45)発行日　平成31年4月24日(2019.4.24)　(24)登録日　平成31年4月5日(2019.4.5)

(51)Int.Cl.		F I		
A01N 25/12	(2006.01)	A01N	25/12	101
A61L 29/00	(2006.01)	A61L	29/00	
A61K 6/02	(2006.01)	A61K	6/02	
A61K 6/027	(2006.01)	A61K	6/027	
A61K 6/06	(2006.01)	A61K	6/06	

請求項の数 13　(全 49 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-513444(P2016-513444)
(86)(22)出願日　平成26年5月16日(2014.5.16)
(65)公表番号　特表2016-521681(P2016-521681A)
(43)公表日　平成28年7月25日(2016.7.25)
(86)国際出願番号　PCT/GB2014/051515
(87)国際公開番号　WO2014/184582
(87)国際公開日　平成26年11月20日(2014.11.20)
審査請求日　平成29年5月15日(2017.5.15)
(31)優先権主張番号　1308926.3
(32)優先日　平成25年5月17日(2013.5.17)
(33)優先権主張国　英国(GB)

前置審査

(73)特許権者　519012909
ペルティナックス　ファーマ　リミティド
イギリス国，ブリストル　ビーエス３４　８アールビー，ストーク　ギフォード，フィルトン　ロード，ユーダブリュイー　ノース　ゲート，フューチャー　スペース
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100123582
弁理士　三橋　真二
(74)代理人　100092624
弁理士　鶴田　準一
(74)代理人　100114018
弁理士　南山　知広

最終頁に続く

(54)【発明の名称】クロルヘキシジン塩を含む抗菌性マイクロ粒子及びナノ粒子、その製造方法、並びに使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

クロルヘキシジン塩を含む抗微生物性マイクロ粒子又はナノ粒子であって、ここで、前記塩のアニオンが：

ピロホスファート及びトリホスファートから選択されるポリホスファートである、抗微生物性マイクロ粒子又はナノ粒子。

【請求項２】

前記塩のアニオンが、トリホスファートである、請求項１に記載の抗微生物性マイクロ粒子又はナノ粒子。

【請求項３】

前記マイクロ粒子又はナノ粒子の少なくとも１つの粒径が、２０～２００ｎｍである、請求項１又は２に記載の抗微生物性マイクロ粒子又はナノ粒子。

【請求項４】

請求項１～３のいずれか１項に記載の抗微生物性マイクロ粒子又はナノ粒子を含むコロイド懸濁液。

【請求項５】

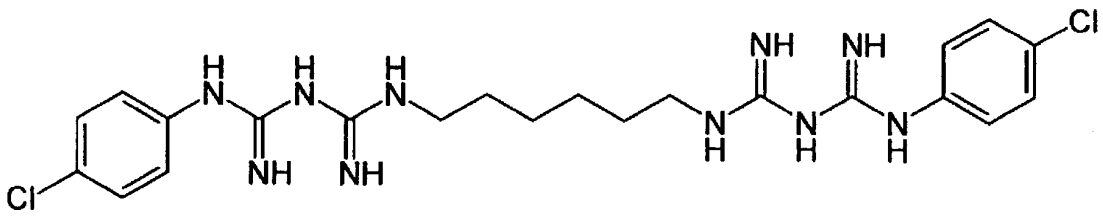
前記コロイドが、水又は水性溶液中に分散している、請求項４に記載のコロイド懸濁液。

【請求項６】

ゼータ（ζ）電位の絶対値が少なくとも２０ｍＶである、請求項４又は５に記載のコロ

イド懸濁液。
【請求項７】
請求項１～３のいずれか１項に記載の抗微生物性マイクロ粒子又はナノ粒子を含む医療用物品。
【請求項８】
前記物品が、静脈カテーテル、尿道カテーテル、歯科インプラント、マウスガード、義歯、創傷包帯又は医療品の包装である、請求項７に記載の医療用物品。
【請求項９】
請求項１～３のいずれか１項に記載の抗微生物性マイクロ粒子又はナノ粒子を含む複合材料。
【請求項１０】
前記複合材料が、歯科用セメント、塗布剤又はオーラルケア組成物である、請求項９に記載の複合材料。
【請求項１１】
前記複合材料が、複合材料全体の１重量％～６０重量％の量で抗微生物性マイクロ粒子又はナノ粒子を含む、請求項９又は１０に記載の複合材料。
【請求項１２】
前記複合材料が、グラスアイオノマーセメント（ＧＩＣ）である、請求項９～１１のいずれか１項に記載の複合材料。
【請求項１３】
抗微生物性マイクロ粒子又はナノ粒子を製造する方法であって、
クロルヘキシジンカチオンを含む水溶液を、以下の：
ピロホスファート及びトリホスファートから選択されるアニオンと、１：１００～１００：１の比で反応させて、マイクロ粒子又はナノ粒子のコロイド懸濁液を製造する
ことを含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、抗微生物性マイクロ粒子又はナノ粒子（ＭＮＰ）の分野に関する。より詳しく述べると、本発明は、クロルヘキシジン塩を含む抗微生物性マイクロ粒子又はナノ粒子、並びにその製造及び使用方法；クロルヘキシジンの送達を制御するために斯かる抗微生物性ＭＮＰを含む医療用物品及び複合材料に関する。
【背景技術】
【０００２】
クロルヘキシジン（ＣＨＸ）は、様々な医療応用での使用が見出されたよく知られた抗微生物薬である。それらには、皮膚洗浄用製剤、手指消毒剤、及び口内洗浄剤が挙げられる。グラム陽性菌及び陰性菌の両方、並びに多くの種の酵母に対する有効性のため、ＣＨＸは有用な抗微生物薬である。他の抗微生物薬を越える更なる利点は、ＣＨＸに関連する望ましい抗生物質耐性特性である。高い環境濃度に晒されると、個々の微生物集団はＣＨＸに対して感受性がなくなることもあるが、試験はこの耐性が一時的なものであり、ＣＨＸ刺激が取り除かれると低下することを示した。ＣＨＸの系統名は、Ｎ’，Ｎ’’’’’’－ヘキサン－１，６－ジイルビス［Ｎ－（４－クロロフェニル）（イミドジカルボンイミド酸ジアミド）］であり、以下の化学式を有する。
【０００３】

【化１】



【０００４】
最も一般的なＣＨＸ抗微生物薬は、易溶性塩であるＣＨＸ二グルコン酸塩の水溶液である。わずかに溶けにくい塩であるＣＨＸ二酢酸塩（ＣＨＡ）も、時にはそれらの材料にある程度の抗微生物特性を与えるために材料に加えられる乾燥結晶粉末として使用された。
これらのＣＨＸ化合物に関する問題は、抗微生物組成物で使用されると、標的領域へのＣＨＸ水溶液の送達が非常に短時間しか提供できないことにある。例えば、口腔衛生用途では、ＣＨＸ二グルコン酸塩は口内洗浄剤の状態で口腔に提供され得るが、数分以内に、この水溶液中のＣＨＸレベルが著減する。標的領域への十分なレベルの抗微生物薬の送達を維持するには処置の繰り返しが必要である。
【０００５】
更なる制限は、溶液状態の可溶性ＣＨＸ塩で表面処理するとき、処理された基材から放出され得るＣＨＸの量（例えば、単位表面積あたりの量）が、該ＣＨＸ溶液の濃度に制限され、且つ、関連するため、これらの溶液の抗微生物効果もまた制限され、容易に管理できないので、十分でなくなる可能性がある。
【０００６】
ＥＰ２４６２９６０Ａ２は、抗微生物剤を含むカテーテルなどの医療用留置デバイスを開示する。そのデバイスは、シリコーン－ウレタン共重合体及びＣＨＸなどの生物活性物質又はＣＨＡなどのその好適な薬理学的塩である原料物質を含んでいる。ＣＨＸは具体的な共重合体組成に依存した速度で原料物質から放出される。ＣＨＸのゆっくりとした放出は１４日間にわたって観察される。しかしながら、ＣＨＸを保持するのに塩基重合体が必要であるので、その用途はポリマーカテーテル上のコーティングに限定される。加えて、さらに広い範囲にＣＨＸの持続放出を提供することが望まれる。
【０００７】
ＵＳ２００７／０２１２４１９Ａ１は、歯根膜感染の処置における使用のための、マトリックスゲル、ナノ粒子（ＮＰ）及びＣＨＸを含んでいるナノ複合体の生体適合性ヒドロゲル（ＮＣＨＧ）を開示する。ＮＰは、共重合した２－ヒドロキシエチルメタクリラート（ＨＥＭＡ）とポリエチレングリコールジメタクリラート（ＰＥＧＤＭＡ）から作られた重合体である。架橋化マトリックスを作製するのに同じモノマーが使用される。ＣＨＸ二グルコン酸塩は活性物質として使用される。ＮＰはＣＨＸを吸収し、そして、２００時間を超える持続放出が観察される。一方、用途はマトリックスゲルの存在によって制限されるので、いくつかの用途では、ＣＨＸの放出プロフィールがまだ不十分である。既存の医療用物品又は組成物に抗微生物特性を付与するのにＮＣＨＧは使用できない。
本発明は、ＣＨＸ塩を含む抗微生物性マイクロ粒子又はナノ粒子（ＭＮＰ）を提供することによって先に考察された問題に対処する。
【０００８】
本明細書中に構想した特定のＣＨＸ塩のいくつかは、いくつかの態様では、ただ数日又は数週間よりむしろ数カ月の長期間にわたるＣＨＸの素晴らしい放出プロフィールを示す難溶性ＭＮＰをもたらす。いくつかの実施形態において、本明細書中に記載したＣＨＸＭＮＰは、８０日間より長い間、徐々にＣＨＸを放出する。本明細書中に構想された他のＣＨＸ塩は、より短いＣＨＸ放出の期間を有するが、数時間又は数日にわたり、非常に高

い用量の可溶性ＣＨＸを放出する。いくつかの態様において、これらのＣＨＸ塩のＭＮＰで処理されたサンプルからのＣＨＸの放出は、ＣＨＸ溶液だけで処理されたサンプルより速く、且つ、より大量であった。これらのより速い放出態様は、汚染除去の用途において、或いは特に難治性の若しくは急性の感染又は大流行を処置するのに有効であり得る。さらに、ＭＮＰは、追加の抗微生物特性を付与するための医療用物品に若しくはその中に埋め込まれるコーティングか、或いは抗微生物性ＭＮＰの外側に可溶性ＣＨＸのゆるやかな浸出を用いて長期間にわたり標的領域に抗微生物性ＣＨＸの一定用量を送達するため、又はＣＨＸ溶液で処理されたサンプルから可能であるよりはるかに高い用量のＣＨＸをより一層迅速に送達するために使用される複合材料の成分としてなどの幅広い用途での使用が見出される可能性がある。さらに、本発明のＭＮＰはまた、遅延放出プロフィール、又はＣＨＸの放出が環境条件の変化によって引き起こされるプロフィールを呈してもよい。

【発明の概要】

【０００９】

特定の態様において、本発明は、ＣＨＸ塩を含む抗微生物性マイクロ粒子又はナノ粒子を提供する。特に、本発明は、ＣＨＸ塩を含む抗微生物性マイクロ粒子又はナノ粒子を提供し、該塩のアニオンは、リン、炭素、窒素、及び硫黄のオキソアニオン並びに部分的に水素化されたオキソアニオンから選択される。好ましくは、アニオンはリン、炭素、窒素、及び硫黄のオキソアニオンから選択され、そしてより好ましくは、アニオンはホスファート、カルボナート、ニトラート又はスルファートから選択される少なくとも１つである。より好ましくは、アニオンは、ピロホスファートに始まるポリホスファートの同族列、及びトリメタホスファートに始まる環状メタホスファートの同族列、並びに窒素及び硫黄のオキソアニオン及び部分的に水素化されたオキソアニオンから選ばれたホスファートから選択される。より好ましくは、アニオンは、ピロホスファートに始まるポリホスファートの同族列及びトリメタホスファートに始まる環状メタホスファートの同族列から選ばれたホスファートから選択される。最も好ましくは、アニオンは、トリメタホスファート、特にヘキサメタホスファートに始まる環状メタホスファートの同族列から選択される。

【００１０】

好ましい態様において、ＭＮＰはナノサイズである、すなわち、構造物は１ｎｍ～１μｍの範囲内に少なくとも１つの寸法を有する。

本発明はまた、本明細書中に記載した抗微生物性ＭＮＰのコロイド懸濁液も提供する。

これらの構想はまた、本明細書中に記載した抗微生物性ＭＮＰを含む医療用物品及び本明細書中に記載した抗微生物性ＭＮＰを含む複合材料を提供する。

本発明はまた、本明細書中に記載した抗微生物性ＭＮＰを製造及び使用する方法を企図する。

【００１１】

「抗微生物性（ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ）」とは、微生物を殺滅するか、又はそれらの生長を少なくとも阻害するように作用する物質を意味する。「微生物（ｍｉｃｒｏｂｅ）」という用語は、例えば、細菌、古細菌、及び／又は真菌などの微生物を表すのに使用される。そのため、本明細書中の抗微生物性化合物及び組成物は、微小生物を殺滅し得るか、又はそれらの成長を少なくとも阻害し得る。

「ホスファート（ｐｈｏｓｐｈａｔｅ）」という用語は、本明細書中で使用される場合、あらゆるリン及び酸素ベースのアニオンも指す。ホスファートは、通常、四面体的に配置されたオルトリン残基を作り出す。ホスファートは、直鎖、分岐又は環状であってもよい。代表的なホスファートとしては、オルトホスファート及びピロホスファートに始まる直鎖ホスファート及びポリホスファートの同族列、並びにトリメタホスファートに始まる環状メタホスファートの同族列のホスファートが挙げられる。有機ホスファートもまた、この定義の中に含まれている。代表的な有機ホスファートとしては、C_{1-6}アルキルホスファートなどのアルキルホスファートが挙げられる。

「マイクロ粒子又はナノ粒子（ｍｉｃｒｏ ｏｒ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅ）」では、約１ｎｍ～１００μｍのサイズを有する粒子を意味する。

【００１２】
今の説明の中で、「マイクロ粒子又はナノ粒子」はまた、チューブ（単一及び複数の壁を有するものの両方）や、スクロールや、ロッドや、円錐や、「ハリネズミ（ｈｅｄｇｅｈｏｇ）」形態や、結晶（伸長結晶など）及び非結晶などの他の好適なマイクロ構造及びナノ構造を包含することを意図する。斯かる構造は、約１ｎｍ～１００μｍ、好ましくは１ｎｍ～１０μｍ、好ましくは１ｎｍ～１μｍ未満（すなわち、「ナノ構造（ｎａｎｏｓｔｒｕｃｔｕｒｅ)」又は「ナノスケール（ｎａｎｏｓｃａｌｅ）」の寸法）、より好ましくは５ｎｍ～５００ｎｍ、より好ましくは２０～２００ｎｍ、そして、より一層好ましくは２０～１４０ｎｍのうちの少なくとも１つの空間的規模を呈する。構造物の三次元構造のすべてがこの粒径範囲内に収まる。

【図面の簡単な説明】
【００１３】
注意事項－スケールバーサイズ及び画像の倍率は、各ＳＥＭに関して角括弧の中に示した。
【図１】図１は、以下の組成物への浸漬後のホウケイ酸ガラス製カバーガラスのＳＥＭ顕微鏡写真を示す。（ａ）水又はＣＨＸ水溶液（２５μＭと５ｍＭ）［２２０μｍ、５４０×］；（ｂ）５／５ＣＨＸ－オルトホスファート［１０μｍ、６２００×］；（ｃ）５／５ＣＨＸ－ピロホスファート［２０μｍ、５３５０×］；（ｄ）５／５ＣＨＸ－トリホスファート［２０μｍ、５１５０×］。
【図２】図２は、以下の組成物への浸漬後にホウケイ酸ガラス製カバーガラスのＳＥＭ顕微鏡写真を示す。（ｅ）５／５ＣＨＸ－ＨＭＰ［１０μｍ、６５００×］；（ｆ）５／５ＣＨＸ－ニトラート［１０μｍ、６４００×］；（ｇ）５／５ＣＨＸ－カルボナート［１０μｍ、７８００×］。
【図３】図３は、オルトホスファート、ピロホスファート、及びトリホスファート標本のＣＨＸ溶出プロフィールを示す。
【図４】図４は、それぞれ２５μＭと５ｍＭのＣＨＸ溶液に晒された対照標本と共に、ニトラート及びカルボナート標本のＣＨＸ溶出プロフィールを示す。
【図５】図５は、アルギン酸塩創傷包帯に関する以下のＳＥＭ顕微鏡写真を示す。（ａ）対照標本、ＭＮＰなし［６０μｍ、２０００×］；（ｂ）ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５ＭＮＰ［１０μｍ、１０４００×］；（ｃ）ＣＨＸ－ＨＭＰ－５ＭＮＰ［１０μｍ、１００００×］。
【図６】図６は、ホウケイ酸ガラス製カバーガラスに関する以下のＳＥＭ顕微鏡写真を示す。（ａ）対照標本、ＭＮＰなし［６０μｍ、１９８０×］；（ｂ）ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５ＭＮＰ［１０μｍ、９９００×］；（ｃ）ＣＨＸ－ＨＭＰ－５ＭＮＰ［１０μｍ、１００００×］。
【図７】図７は、その一部がＭＮＰを組み込んでいる、エチレン酢酸ビニル（ＥＶＡ）重合体に関する以下のＳＥＭ顕微鏡写真を示す。（ａ）対照標本、ＭＮＰなし［１０μｍ、９９００×］；（ｂ）ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５ＭＮＰ［１０μｍ、９８００×］；（ｃ）ＣＨＸ－ＨＭＰ－５ＭＮＰ［１０μｍ、１０２００×］。
【図８】図８は、その一部がＭＮＰで処理されたチタニウム表面に関する以下のＳＥＭ顕微鏡写真を示す。（ａ）対照標本、ＭＮＰなし［５０μｍ、２０８０×］；（ｂ）ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５ＭＮＰ［１０μｍ、１００００×］；（ｃ）ＣＨＸ－ＨＭＰ－５ＭＮＰ［１０μｍ、１００００×］。
【図９】図９は、その一部がＭＮＰで処理された以下のチタニウム表面に関するＡＦＭ画像を示す（水平目盛１μｍ、垂直目盛５５ｎｍ）。（ａ）研磨したＴｉ表面；（ｂ）ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５ＭＮＰ；（ｃ）ＣＨＸ－ＨＭＰ－５ＭＮＰ。
【図１０】図１０は、その一部がＭＮＰで処理された以下のガラス表面のＡＦＭ画像を示す（水平目盛１μｍ、垂直目盛６０ｎｍ）。（ａ）清浄した未処理ガラス；（ｂ）ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５ＭＮＰ；（ｃ）ＣＨＸ－ＨＭＰ－５ＭＮＰ。
【図１１】図１１は、その一部がＭＮＰで処理された以下の雲母（「ウルトラフラット」

）表面のＡＦＭ画像を示す（水平目盛１μｍ、垂直目盛２０ｎｍ）。（ａ）清浄した未処理ガラス；（ｂ）ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５ＭＮＰ。
【図１２】図１２は、対照（２５μＭのＣＨＸ）溶液、ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５、及びＣＨＸ－ＨＭＰ－５で処理されたアルギン酸塩包帯からのＣＨＸ溶出プロフィールを示す。
【図１３】図１３は、対照（２５μＭのＣＨＸ）溶液、ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５、及びＣＨＸ－ＨＭＰ－５で処理されたガラスからのＣＨＸ溶出プロフィールを示す。
【図１４】図１４は、対照（２５μＭのＣＨＸ）溶液、ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５、及びＣＨＸ－ＨＭＰ－５で処理されたＥＶＡ重合体からのＣＨＸ溶出プロフィールを示す。
【図１５】図１５は、対照（２５μＭのＣＨＸ）溶液、ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５、及びＣＨＸ－ＨＭＰ－５で処理されたチタニウムからのＣＨＸ溶出プロフィールを示す。
【図１６】図１６は、異なったレベルのＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰで処置されたグラスアイオノマーセメント（ＧＩＣ）標本からの累積ＣＨＸ放出プロフィールを示す。
【図１７】図１７は、異なったレベルのＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰで処置されたＧＩＣ標本からの累積フッ素放出を示す。
【図１８】図１８は、ＧＩＣ標本の破壊表面を示す以下のＳＥＭ顕微鏡写真を示す。（ａ）未処理ＧＩＣ［２０μｍ、５０００×］；（ｂ）１ｗｔ％ＭＮＰ［２０μｍ、５０５０×］；（ｃ）２ｗｔ％ＭＮＰ［２０μｍ、５０００×］；（ｄ）５ｗｔ％ＭＮＰ［２０μｍ、５０００×］；（ｅ）１０ｗｔ％ＭＮＰ［２０μｍ、５０００×］；（ｆ）２０ｗｔ％ＭＮＰ［２０μｍ、５０５０×］。
【図１９】図１９は、ＭＲＳＡに対するＣＨＸ及びＣＨＸ－ＨＭＰ－５に関する６２０ｎｍにおける吸光度（ＯＤ）の測定値を示す。これらから最小発育阻止濃度が計算できる。暗灰色の棒グラフ：２５μｍのＣＨＸ；薄灰色の棒グラフ：ＣＨＸ－ＨＭＰ－５。
【図２０】図２０は、Ｐ．エルギノーサに対するＣＨＸ及びＣＨＸ－ＨＭＰ－５に関する６２０ｎｍの吸光度（ＯＤ）の測定値を示す。これらから最小発育阻止濃度が計算できる。暗灰色の棒グラフ：２５μｍのＣＨＸ；薄灰色の棒グラフ：ＣＨＸ－ＨＭＰ－５。
【図２１】図２１は、ＭＲＳＡに対するＣＨＸ又はＣＨＸ－ＨＭＰ－５処置後の５９５ｎｍにおける吸光度（ＯＤ）の測定値を示す。これらからバイオフィルム阻害が評価できる。暗灰色の棒グラフ：２５μｍのＣＨＸ；薄灰色の棒グラフ：ＣＨＸ－ＨＭＰ－５。
【図２２】図２２は、Ｐ．エルギノーサに対するＣＨＸ又はＣＨＸ－ＨＭＰ－５処置後の５９５ｎｍにおける吸光度（ＯＤ）の測定値を示す。これらからバイオフィルム阻害が評価できる。暗灰色の棒グラフ：２５μｍのＣＨＸ；薄灰色の棒グラフ：ＣＨＸ－ＨＭＰ－５。
【図２３】図２３は、（上側）ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５及び（下側）ＣＨＸ－ＨＭＰ－５ＮＰのＴＥＭ顕微鏡写真を示す。個々のＮＰの例を矢印で示す。スケールバー＝５００ｎｍ。
【図２４】図２４は、（上側）ＣＨＸ－ＨＭＰ－５及び（下側）ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５のサイズ分布を示すＤＬＳデータを示す。３つのデータセットは、測定が各濃度にて三連で実施されたことを示す。
【図２５】図２５は、（上側）ＣＨＸ－ＨＭＰ－５及び（下側）ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５ＮＰの荷電分布を示すζ電位データを示す。３つのデータセットは、測定が各濃度にて三連で実施されたことを示す。
【図２６】図２６は、特定の量のＣＨＸ－ＨＭＰ－５ ＮＰを含むＣＭＣフィルム（１m^2あたり５５ｇのＣＭＣ）からのＣＨＸ溶出プロフィールを示す。四角形は７００ｋＤａのＣＭＣ Ｍｗと６ｗｔ％ＮＰを示し；三角形は２５０ｋＤａのＣＭＣ Ｍｗと６ｗｔ％ＮＰを示し；×印は７００ｋＤａのＣＭＣ Ｍｗと３つのｗｔ％ＭＮＰを示し；菱形は２５０ｋＤａのＣＭＣ Ｍｗと3ｗｔ％ＮＰを示し；円は２５０ｋＤａのＣＭＣ Ｍｗと０ｗｔ％ＮＰを示す。
【図２７】図２７は、特定の量のＣＨＸ－ＨＭＰ－５ＭＮＰを含むアルギン酸塩フィルムからのＣＨＸ溶出プロフィールを示す。四角形は６ｗｔ％のＭＮＰを示し；菱形は３ｗｔ％のＭＮＰを示す。

【図２８】図２８は、（菱形）１回のディップコートにてＣＨＸ－ＨＭＰ－５ ＮＰでコートされたポリウレタン及び（ダッシュ記号）２５μＭのＣＨＸ水溶液で処理されたポリウレタンに関するＣＨＸ溶出プロフィールを示す。
【図２９】図２９は、（左側）５回反復［５０μｍ、２０００×］及び（右側）１０回の反復［５０μｍ、２０２０×］のディップコーティング方法を使用してＣＨＸ－ＨＭＰ－５ ＮＰでコートされたポリウレタンを示すＳＥＭ画像を示す。右側の領域はＮＰの堆積を示す。
【図３０】図３０は、（左から右に向かって）ＭＮＰなし（未処理）；ＣＨＸ－ＨＭＰ－５ＭＮＰ；ＣＨＸ－ＨＭＰ－５０ＭＮＰで処理されたポリウレタン基材上で培養した４種類の微生物：（上から下に向かって）ＭＲＳＡ；Ｅ．コリ（E. coli）；Ｐ．エルギノーサ（P. aeruginosa）；及びＫ．ニューモニエ（K. pneumonia）、に関する生死染色画像を示す。
【図３１】図３１は、（上側）本体（Ｂ）シリコーンと（下側）密封材（Ｓ）シリコーンに関して、１分間（菱形）、３０分間（四角形）、２時間（三角形）又は６時間（円）のディップコーティング時間を用いてＣＨＸ－ＨＭＰ－５ ＮＰで、及び対照ＣＨＸ溶液（ダッシュ記号）でコートしたシリコーンからのＣＨＸ放出を示す。あらゆる飽和が説明できるように、媒質は８週間で新しくされた。
【図３２】図３２は、（上側）本体（Ｂ）シリコーンと（下側）密封材（Ｓ）シリコーンに関して、１分間（菱形）、３０分間（四角形）、２時間（三角形）又は６時間（円）のディップコーティング時間を用いてＣＨＸ－ＴＰ－５ ＮＰで、及び対照ＣＨＸ溶液（ダッシュ記号）でコートしたシリコーンからのＣＨＸ放出を示す。あらゆる飽和が説明できるように、媒質は８週間で新しくされた。
【図３３】（上側）本体（Ｂ）シリコーンと（下側）密封材（Ｓ）シリコーンに関して、１分間（菱形）、３０分間（四角形）、２時間（三角形）又は６時間（円）のディップコーティング時間を用いてＣＨＸ－ＴＭＰ－５ ＮＰで、及び対照ＣＨＸ溶液（ダッシュ記号）でコートしたシリコーンからのＣＨＸ放出する図３３を示す。あらゆる飽和が説明できるように、媒質は８週間で新しくされた。
【図３４】図３４は、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５ ＮＰのコーティング（左側、薄灰色の棒グラフ）がある、及びＣＨＸ－ＨＭＰ ＮＰのコーティング（右側、暗灰色の棒グラフ）がないチタニウム表面におけるＳ．ゴルドニイ（S. gordonii）の増殖を示す。
【図３５】図３５は、ＣＨＸ水溶液又は脱イオン水中の等価濃度のＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰ懸濁液で処理されたヒドロキシアパタイトディスクからのＣＨＸ放出を示す。ＣＨＸ水溶液のデータは破線として示され、それに対して、ＮＰ懸濁液のデータは実線として示されている。５ｍＭの濃度は黒で示され；２．２ｍＭの濃度は中間の灰色で示され；１ｍＭの濃度は薄灰色で示されている。下から上に向かって：ＣＨＸ水溶液１ｍＭ；ＣＨＸ水溶液２．２ｍＭ；ＮＰ懸濁液１ｍＭ；ＣＨＸ水溶液５ｍＭ；ＮＰ懸濁液２．２ｍＭ；ＮＰ懸濁液５ｍＭ。
【図３６】図３６は、質量で２５％のＣＨＸ－ＨＭＰ－５ ＮＰを含む（左側）Diamond Mattエマルジョン塗布剤［２４０μｍ、４９０×］及び（右側）Diamond Mattエマルジョン塗布剤［２２０μｍ、５３０×］の表面のＳＥＭ画像を示す。
【図３７】図３７は、２４時間のインキュベーション後の、Diamond Matt塗布剤（陰性対照、左側の棒グラフ）、Sterishield塗布剤（陽性対照、中央の棒グラフ）、及び「Nanopaint」（ＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰを含む塗布剤、右側の棒グラフ）上の（左側）ＭＲＳＡ及び（右側）Ｅ．コリの増殖を示す。ｙ軸の単位は、コロニー形成単位（ｃｆｕ）である。
【発明を実施するための形態】
【００１４】
詳細な説明
抗微生物性ナノ粒子
本発明の第一の態様によると、クロルヘキシジン塩を含む抗微生物性マイクロ粒子又は

ナノ粒子を提供し、ここで、該塩の中のアニオンは、リン、炭素、窒素、及び硫黄のオキソアニオン及び部分的に水素化されたオキソアニオンから選択される。好ましくは、アニオンは、リン、炭素、窒素、及び硫黄のオキソアニオンから選択され、そして、より好ましくは、アニオンは、ホスファート、カルボナート、ニトラート又はスルファートから選択される少なくとも１つである。このリストから選択された少なくとも１つのアニオンがＣＨＸと共に化合物中で使用されるとき、難溶性であるＭＮＰが形成される。この難溶性は、本発明のＭＮＰがオーダーメイドの放出プロフィールを実証できることを意味している。いくつかの態様において、プロフィールは、持続放出プロフィールであり、長期間にわたり周囲の液体環境中に安定したレベルのＣＨＸを放出する。他の態様において、ＣＨＸの放出は、先に述べたように、より速く及び／又はより大量である；例えば、場合によっては、ＣＨＸのみの溶液で処理された表面から達成可能であるものより、より速く且つより大量であった。

【００１５】

本発明では、「ホスファート」としては、酸素原子の共有によって連結された四面体的に配置されたオルトリン残基で構成され、且つ、リン酸の脱プロトン反応から得られる任意のリンベースのアニオンが挙げられる。

本発明に使用され得る特定のホスファートアニオンは、特に制限はないので、リン及び酸素原子を含む任意のアニオンを挙げることができる。好ましくは、ホスファートアニオンは、モノホスファート又はポリホスファートである。好ましくは、ホスファートアニオンは、直鎖、分岐又は環状構造を有する。好ましくは、ホスファートアニオンは、一般式ＨＯ（PO_2OH）$_n$Ｈ｛式中、ｎは任意の整数であってもよいが、一般的に１～最大数百、好ましくは１～１０、より好ましくは１～６である｝を有してポリリン酸からの１若しくは複数の水素原子の除去によって得られる。

【００１６】

より一層好ましくは、ホスファートはオルトホスファート、ピロホスファート、トリホスファート又はヘキサメタホスファートのうちの少なくとも１つから選択される。メタホスファート、とりわけヘキサメタホスファートが特に好ましい。

いくつかの態様において、本発明の抗微生物性ＭＮＰは、難溶性ＣＨＸ塩を含む。ＭＮＰが難溶性を有する斯かる塩を含むとき、ＭＮＰから周囲の液体環境へのＣＨＸの放出は長期にわたる。さらに、塩がこのように難溶性であるとき、ＭＮＰは、液体全体でより均一なＭＮＰの分配をもたらし、且つ、ナノ粒子の荷電が材料表面へのそれらの吸着を容易にするので、ディップコーティングによる表面へのＭＮＰの堆積に有利である水中コロイド懸濁液を形成する傾向がある。

【００１７】

いくつかの態様において、本発明の抗微生物性ＭＮＰは、長期間にわたる液体環境への可溶性ＣＨＸの徐放を実証する。これは少なくとも９０日間であってもよい。他の態様において、本発明の抗微生物性ＭＮＰは、簡単なＣＨＸ溶液を使用した表面の処置で達成できるより高いレベルでのＣＨＸの放出を実証する。これは、短期間のみ（最大５日間、最大１日間、最大１２時間、最大６時間、最大１時間、最大３０分間、最大１０分間又は最大１分間の期間）にわたるものであっても、又は長期間（最大９０日間、最大６０日間、最大３０日間、又は最大１０日間など期間）にわたる徐放であってもよい。

【００１８】

特に好ましくは、クロルヘキシジン塩がクロルヘキシジンヘキサメタリン酸塩（ＣＨＸ－ＨＭＰ）である。ＣＨＸ－ＨＭＰは難溶性であり、そのためＭＮＰのコロイド懸濁液を形成する。これらのＭＮＰは、次いで、物品をコートするのに使用されても、又は複合材料に組み入れられてもよい。ＣＨＸ－ＨＭＰの相対的不溶性とは、ＣＨＸがゆっくりと途切れることなく周囲の環境に放出されることを意味する。ＣＨＸ－ＨＭＰはＣＨＸの放出に関して持続放出プロフィールを示す。

【００１９】

好ましくは、本発明の抗微生物性ＭＮＰは、少なくとも７日間、好ましくは２０日間、

より好ましくは少なくとも３０日間、より好ましくは少なくとも５０日間、より好ましくは少なくとも６０日間、より好ましくは少なくとも１００日間、そして、状況によっては少なくとも６カ月間又は少なくとも１２カ月間の期間にわたり、可溶性ＣＨＸの液体環境（好ましくは水溶液環境）への持続放出及び徐放を示す。この持続放出及び徐放とは、その期間の間中、ＣＨＸが継続的にＭＮＰから放出されることを意味する。好ましくは、放出速度は、この期間を通じてほぼ一定であるが、放出速度が変化する、例えば時間が延びるほど遅くなる、実施形態が構想される。この徐放プロフィールは、付加的な介入の必要なしに長期間にわたって利用されるようなＭＮＰの抗微生物特性を可能にする。

【００２０】

好ましくは、抗微生物性ＭＮＰは実質的にはＣＨＸ塩から成り、ここで、該塩の中のアニオンは、ホスファート、カルボナート、ニトラート又はスルファートのうちの少なくとも１つから選択される。これは、ＣＨＸ塩が特定のＭＮＰ中に存在しているが、他の成分もまた存在し得ることを意味する。好ましくは、ＣＨＸ塩は、抗微生物性ＭＮＰの少なくとも４０ｗｔ％、より好ましくは少なくとも６０ｗｔ％、より好ましくは少なくとも９０ｗｔ％、特に好ましくは少なくとも９９ｗｔ％を占める。状況によっては、ＣＨＸ塩が抗微生物性ＭＮＰの１００ｗｔ％を占めてもよい。ＭＮＰ中の他の成分としては、１若しくは複数の重合体（ポリエチレングリコールなど）、増量剤、着色剤、そして、複合材料の表面への接着又はその中への取り込みを容易にする作用物質（例えば、シラン又はポリリシン）が挙げられる。ＭＮＰ中の高レベルのＣＨＸ塩は、促進された（例えば、より強い、及び／又はより長く持続する）抗微生物効果をもたらす。

【００２１】

指定されたアニオンの組み合わせはまた、例えば、異なったアニオンの混合物とＣＨＸカチオンの共沈によって、抗微生物性ＭＮＰを製造するのに使用されてもよい。例えば、高レベルのＣＨＸの急速な放出を呈するＭＮＰに通じるアニオンが、低レベルであるが長期間にわたるＣＨＸ放出を呈するＭＮＰに通じるアニオンと組み合わせられてもよい。斯かる粒子は、例えば医療機器、特に初期の高レベルのＣＨＸ放出が外科手術自体に起因する細菌の存在を無効にし、そして、長期間の低レベルのＣＨＸ放出が長期間にわたって清潔な部位を維持する外科的に移植されるもので有用であり得る。好ましくは、抗微生物性ＭＮＰは、ＣＨＸの塩及び先に列挙したものから選択した１つのアニオンを含む。例えば、本構想としては、アニオンがオルトホスファート、ピロホスファート、トリホスファート、カルボナート、及びニトラートから選択されるＣＨＸ塩を含むＭＮＰを伴った、ＣＨＸのヘキサメタリン酸塩を含むＭＮＰの混合物が挙げられる。

いくつかの態様において、ＣＨＸカチオンに加えて、抗微生物性ＭＮＰ中に１若しくは複数の追加カチオン、例えば１若しくは複数の金属カチオン、例えばＣｕ又はＡｇが存在していてもよい。

【００２２】

場合によっては、本発明の抗微生物性ＭＮＰは、遅延放出粒子である、すなわち、基材の表面にＭＮＰが塗布されるか又はそれらが複合材内に組みこまれた後に、ＣＨＸの放出がしばらく遅れる。この遅延期間の間、好ましくはＭＮＰからＣＨＸが全く放出されないか、又は場合によっては、この遅延期間のＭＮＰからのＣＨＸの放出が低速、例えば遅延期間直後の最終的な放出速度の１０％未満、好ましくは５％未満と、より好ましくは１％未満である。好ましい場合では、ＭＮＰは環境条件の変化に感受性がある。斯かる場合には、ＭＮＰは「スマートな」特性を示すと言うこともできる。好ましくは、ＭＮＰからのＣＨＸ放出は環境条件における変化によって引き起こされる。例えば、ｐＨ、特定のトリガー成分の濃度、又は周囲環境の温度の変化である。より一層好ましくは、ＭＮＰは、ｐＨ低下（すなわち、酸性の増大）などの環境における変化によって引き起こされるＣＨＸ放出を伴うＣＨＸの遅延放出を呈する。斯かるｐＨ低下は、細菌性バイオフィルムの形成によって起こり得るので、ＭＮＰは細菌性バイオフィルムの存在に対応してＣＨＸを放出する。これは、例えば前記のものなどの環境条件における変化に感受性のあるＭＮＰ成分の封入又はＭＮＰ上のコーティングによって達成されてもよい。あるいは、遅延放出特徴

は、例えば適切な（単数若しくは複数の）アニオンの選択による、適切なＣＨＸ塩の選択によって調製されてもよく、該アニオンは、環境条件における所望の変化、例えばｐＨ低下によってプロトン付加反応又は脱プロトン反応などの変化を呈する。好ましくは、ＭＮＰは、細菌性バイオフィルムの存在又は形成を原因とするｐＨ低下によって引き起こされる固有のＣＨＸ遅延放出を示す。

【００２３】

場合によっては、本発明の抗微生物性ＭＮＰは固有の抗微生物特性を有する。言い換えれば、ＭＮＰは、環境への可溶性ＣＨＸの放出に関連した効果に加えて及びそれを増大させる抗微生物特性を実証する。観察された抗微生物効果は、溶液中に放出されたＣＨＸによるだけではなく、ＭＮＰ自体の存在にもよる。例えば、状況によっては、ＣＨＸヘキサメタホスファートのＭＮＰは、固有の抗微生物特性を示すように見える。このように、本発明の抗微生物性ＭＮＰは、抗微生物性ＣＨＸ水溶液、又はいずれかの抗微生物効果を示す媒介物の放出を伴わずに、環境へと抗微生物性ＣＨＸを単純に放出する組成物の抗微生物特性に加えて、抗微生物特性を提供し得る。

本発明の抗微生物性ＭＮＰは、様々な構造形態を有してもよい。それらは、粒子、（単一及び複数の壁を有する）チューブ、スクロール、ロッド、円錐、ハリネズミ形態、結晶、及び非結晶から選択されてもよい。好ましくは、ＭＮＰは、粒子又は結晶である。

本発明の抗微生物性ＭＮＰは、１ｎｍ～１００μｍ、好ましくは１ｎｍ～１０μｍ、好ましくは１ｎｍ～１μｍ（すなわち、ナノ規模）、より好ましくは５ｎｍ～５００ｎｍ、より好ましくは２０～２００ｎｍ、そしてより一層好ましくは２０～１４０ｎｍのサイズを有する。

【００２４】

抗微生物性ナノ粒子のコロイド懸濁液

本発明の他の態様によれば、本明細書中に記載した抗微生物性マイクロ粒子又はナノ粒子を含むコロイド懸濁液を提供する。

好ましくは、本発明のコロイド懸濁液は水中のコロイド懸濁液である。水は簡単、且つ、一緒に働かせるのに安全な溶媒であり、その生物学的適合性は、その懸濁液を感受性用途に使用することを無難にしている。

より一層好ましくは、本発明のコロイド懸濁液は水溶液中のコロイド懸濁液である。これはＣＨＸの水溶液であってもよい。溶液はまた、他の溶存イオン又は追加成分（例えば、界面活性剤、安定剤、保存料など）を含んでもよい。

【００２５】

好ましくは、本発明のコロイド懸濁液は、１５ｍＶ以上、より好ましくは２０ｍＶ以上、より一層好ましくは４０ｍＶ以上、及び特に好ましくは５０ｍＶ以上の大きさのゼータ（ζ）電位の絶対値を有する。ゼータ電位は、コロイド分散系の安定性及び凝集体を形成するそれらの傾向の基準である。高い絶対ゼータ電位値は、凝固又は凝集しそうにない安定した懸濁液を示す。これは、基材のディップコーティングによる調製がより容易な、より高い均一性を有するコーティングを作り出す望ましい特性である。

コロイド分散系のゼータ電位の絶対値又は係数が少なくとも３０ｍＶであるとき、分散液は凝固に関して許容される安定性を実証する。ゼータ電位の絶対値が少なくとも４０ｍＶであるとき、懸濁液の安定性は素晴らしく、懸濁液は、凝固しないと予想され、長期間にわたる堆積挙動を示すのみである。さらに、ゼータ電位の絶対値が少なくとも２０ｍＶであるとき、ＭＮＰは、望ましいコーティング特性を呈し、そして、抗微生物性ＭＮＰの表面コートを提供するために物品の表面に付着する。

【００２６】

医療用物品

本発明の更なる態様において、本明細書中に記載した抗微生物性ＭＮＰを含む医療用物品を提供する。本発明の医療用物品は、特に制限されることはないので、外部的若しくは内部的のいずれかでの体との接触、又は病院若しくは医師の外科手術などの医療環境における使用を意図した任意の物品であってもよい。斯かる物品は、当業者にとって周知のも

のである。本構想では、代表的な物品は様々なタイプのカテーテル；歯科インプラント、義歯及びマウスガードなどの経口物品；創傷包帯又は医療品包装、を含んでいる。

【００２７】

好ましくは、本発明の医療用物品は、静脈カテーテル、尿道カテーテル、歯科インプラント、マウスガード、義歯、創傷包帯又は医療品包装である。斯かる物品には、有利なことには、例えば、物品上にＭＮＰを含む表面コートを構築するための表面処理によって、又は物品自体の材料中へのＭＮＰの取り込みによって、本明細書中に記載した抗微生物性ＭＮＰを用いた機能化によって追加の抗微生物特性が提供されてもよい。

好ましくは、本発明の医療用物品はカテーテルである。いくつかの態様において、カテーテルは表面コートによって抗微生物性ＭＮＰを用いて機能化される。

【００２８】

他の態様において、抗微生物性ＭＮＰは、カテーテルを作るのに使用される材料の製造中にカテーテルの少なくとも一部の中に組み込まれる。メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス（ＭＲＳＡ）などの細菌によるカテーテル表面及び周辺組織のコロニー形成は重大な健康問題である。抗微生物性ＭＮＰで機能化した本発明のカテーテルでは、細菌によるコロニー形成は、ＭＮＰの抗微生物活性により予防又は低減される。

【００２９】

好ましくは、本発明の医療用物品は歯科インプラントである。歯科インプラントは、下顎又は上顎の天然の骨（顎骨）を置換又は増強するのに使用されるデバイスである。インプラントの支台歯部分は歯茎から突き出し、（単数若しくは複数の）人工歯がこれに取り付けられる。斯かるインプラントに関連する問題は、細菌によるインプラント表面のコロニー形成及び病原性の細菌性バイオフィルムの形成に起因する、媒質中での長期的なインプラントの不具合である。本発明の歯科インプラントでは、歯科インプラントは、抗微生物性ＭＮＰ（表面コーティングとして又は歯科インプラント自体の材料に組み込まれるかのいずれか）を含み、そして、これがバイオフィルム形成の傾向を予防又は低減するので、感染傾向がより高くなる危険性なしにインプラントをうまく組み込める。

【００３０】

好ましくは、歯科インプラントは表面コートの形態で抗微生物性ＭＮＰを含む。より一層好ましくは、歯科インプラントの表面は抗微生物性ＭＮＰで薄くコートされる。例えば、２５％以下、好ましくは１５％以下、より好ましくは１０％以下、より一層好ましくは５％以下の領域被覆率が好まれる。チタニウムは、骨とのオッセオインテグレートのためのチタニウムの有用な特性のため歯科インプラントを作製するのに使用されることが多い（骨自体と同じくらいの強度で材料と骨の間の接点を形成する）。オッセオインテグレーションがかなりの程度まで存在し続けながら、ＭＮＰに関連する抗微生物特性を提供し続けるので、チタニウム表面におけるＭＮＰの薄いコーティングが有利である。濃過ぎるコーティングが使用された場合、オッセオインテグレーションはそれほど完全ではないので、インプラントと骨の間の接点がより弱い。薄過ぎるコーティングが使用された場合、ＭＮＰの抗微生物特性がそれほど明らかでない。

【００３１】

医療用物品はまた、創傷包帯であってもよい。本発明の抗微生物性ＭＮＰを含む創傷包帯は、普通の創傷包帯や他の既知の抗微生物性包帯より長続きする抗微生物効果を提供する。これは、急性及び外科的創傷、並びに慢性又は非回復期の創傷を含めた創傷の包帯に重要である。本発明の抗微生物性ＭＮＰ、特にＣＨＸヘキサメタホスファートＭＮＰは、熱傷において最も一般的な感染性物質であるシュードモナス・エルギノーサ細菌に対して有効であり、そして、ＭＲＳＡ及びストレプトコッカス・ゴルドニイに対しても有効である。本発明の機能化創傷包帯は、火傷や他の同様の創傷を含めた創傷を手当てするのに使用されると、感染の危険を低減するのに役立つ。

【００３２】

本発明の医療用物品は、義歯又は口蓋栓塞子を含めた義歯製品であってもよい。義歯製品又は義歯は、欠けている歯及び／又は口蓋の部分を置換して、歯の機能を回復するため

に口腔内で使用されるデバイスである。口蓋に隣接する義歯の下側は、特に酵母カンジダ・アルビカンスによる感染の傾向がある。いくつかの態様において、本発明のＭＮＰ、特にＣＨＸヘキサメタホスファートＭＮＰは、Ｃ．アルビカンスを含めた様々な酵母に対して有効である。本発明の抗微生物性ＭＮＰを含む義歯製品が使用された場合、感染の危険性が大いに低減される。

【００３３】

本発明の医療用物品はマウスガードであってもよい。マウスガードは、歯を保護するためのスポーツでの使用、及び歯ぎしり（bruxism or teeth grinding）の予防としての使用を含めた様々な用途に使用される。これらのマウスガードは、エチレン酢酸ビニル（ＥＶＡ）などの重合体で一般的に作られているので、表面に細菌性バイオフィルムが形成される傾向がある。本発明のマウスガードは、斯かるバイオフィルムの形成を予防するか又は遅らせ、感染から着用者を保護するのに有効である、本明細書中に記載した抗微生物性ＭＮＰを（表面コーティングとしてか又はＥＶＡ重合体内に組み込むかのいずれかで）含む。

【００３４】

本発明の医療用物品は、医療品包装、手術室のトレー又は医療用ドレープであってもよい。医療品包装は、医療機器を梱包するか又は保護するのに使用されるあらゆる種類の包装である。手術室のトレーは、ステンレスで作られていることが多く、滅菌した外科用器具を運ぶのに使用される。医療用ドレープは、医療環境で使用されるいずれかのドレープ、カーテン、又は他の織物であり得る。本発明によると、これらのいずれも、細菌によるコロニー形成を低減又は予防するために本明細書中に記載した抗微生物性ＭＮＰを有利に含み得る。

【００３５】

抗微生物性ＭＮＰは、様々な方法で医療用物品に組み入れられてもよく、その方法は特に制限されない。

状況によっては、医療用物品としては、抗微生物性ＭＮＰの表面コーティングが挙げられる。表面コーティングは、ディップコーティング又はスプレーコーティングによって容易に塗布できる。表面コートは、細菌によってコロニーを形成されることが多い物品の外面の保護において有効である。

【００３６】

状況によっては、ＭＮＰは、物品内に一体化して組み込まれる。好ましくは、医療用物品は、その物品の外面の少なくとも一部の中に埋め込まれた抗微生物性ＭＮＰを含む。ＭＮＰは、製造中、例えば、重合体をカテーテルに加工している間又はカテーテル管の押出成形の間、物品を作製するのに使用される材料中に組み入れられてもよい。

いくつかの態様において、医療用物品を構成する１若しくは複数の材料にＭＮＰを提供してもよい；例えば、それらはＭＮＰでディップコートされてもよい。いくつかの態様において、材料は、次の：医療用シリコーンや、ＥＶＡや、ポリウレタンなどの医療用又は消費者関連の重合体、チタニウムなどのインプラント材料、ガラス、或いは市販の創傷包帯を含む。

【００３７】

複合材料

更なる態様において、本発明は、本明細書中に記載した抗微生物性ＭＮＰを含む複合材料を提供する。これらの抗微生物性ＭＮＰを含む複合材料は、ＭＮＰ自体と関連して先に記載したように、長期間にわたってＣＨＸを放出できる。これはこれらの材料に抗微生物特性を付与する。

本発明の複合材料は、特に制限されることはないので、その材料に抗微生物特性を付与するために抗微生物性ＭＮＰを組み込むあらゆる材料を含み得る。代表的な材料としては、これだけに限定されるものではないが、塗布剤（paint）、ペースト、重合体、ヒドロゲル、及び歯科用セメントが挙げられる。

【００３８】

好ましくは、本発明の複合材料は、グラスアイオノマーセメント、塗布剤又はオーラルケア組成物である。これらの材料は、それらの中に抗微生物性ＭＮＰを含むことによって追加の抗微生物特性を有利に提供されてもよい。次のＭＮＰ含有複合体：グラスアイオノマーセメント、アルギン酸塩フィルム、カルボキシメチルセルロースフィルム、塗布剤、及びオーラルケアリンス／局所トリートメント、が首尾よく作製された。

【００３９】

好ましくは、抗微生物性ＭＮＰは、最大６０ｗｔ％、５０ｗｔ％、４０ｗｔ％又は３０ｗｔ％で複合材料中に存在する。６０ｗｔ％超のレベルでは、ＭＮＰの高い含有量のため、複合物はその意図された機能性又は構造特性の一部を失う可能性がある。好ましくは、抗微生物性ＭＮＰは、１ｗｔ％、５ｗｔ％、又は１０ｗｔ％以上で複合材料中に存在する。

約１ｗｔ％を下回るレベルでは、ＭＮＰの存在による抗微生物特性が顕著に低減されるが、それでも一部の目的のためには適切であり得る。

【００４０】

好ましくは、本発明の複合材料は、グラスアイオノマーセメント（ＧＩＣ）である。ＧＩＣは、歯色の充填材料として、合着材や裏張り材として、非侵襲的修復治療（ＡＲＴ）において、歯肉縁の近くの修復において及び裂溝封止材としての使用、を含めた多くの目的で歯医者に使用される。ＧＩＣが、口腔環境の中でイオン交換に従事できることが知られている。本明細書中に記載した抗微生物性ＭＮＰを含む複合材料がＧＩＣである場合、ＣＨＸはＧＩＣから浸出し、ＭＮＰからのＣＨＸの持続放出がＧＩＣ処置を取り囲む領域における継発性齲蝕を予防するのに役立つ。ＣＨＸ放出は、ＣＨＸ－二酢酸塩又はＣＨＸ－二グルコン酸塩などの可溶性ＣＨＸ塩を組み込んだ他のＧＩＣよりかなり長期にわたって維持される。いくつかの態様において、本発明のＧＩＣは、３０日間より長く、好ましくは６０日間より長く、さらに好ましくは９０日間より長く、環境中にＣＨＸを浸出し得る。

【００４１】

従来のＧＩＣは抗微生物効果を欠いているので、継発性齲蝕（充填した周り又はその下の齲蝕の再発生）がよくある問題であった。ＧＩＣが本発明の抗微生物性ＭＮＰを含む場合、ＧＩＣに付与された抗微生物が、継発性齲蝕を予防するのに役立つ。

好ましくは、本発明のＧＩＣは環境からＣＨＸを吸収できる。このように、ＧＩＣは、既存の供給量を使い果たした場合、ＧＩＣ中の本来のＣＨＸ塩のＭＮＰを再形成するためにＣＨＸを「再充填」されてもよい。ＧＩＣは、口腔からのフッ化物の取り込みに関してこのように作用することが知られている。このように、ＧＩＣの抗微生物効果は、ＧＩＣの耐用年限の間を通じて無期限に継続し、必要な場合には、ＣＨＸ塩のＭＮＰの供給量を補給し得る。本発明の抗微生物性ＭＮＰの使用は、ＣＨＸの持続放出のため、これらの補給の間隔が比較的長く、例えば少なくとも６０又は１００日、或いはさらに長くできることを意味する。

【００４２】

好ましくは、抗微生物性ＭＮＰは、１ｗｔ％～３０ｗｔ％、より好ましくは１ｗｔ％～２０ｗｔ％、最も好ましくは１ｗｔ％～１０ｗｔ％でＧＩＣ中に存在する。３０ｗｔ％超のＭＮＰレベルでは、ＧＩＣの取扱適性及び引張り強度が悪い影響を受け、そして、約１ｗｔ％を下回るレベルでは、ＭＮＰの存在に起因する抗菌性作用が低減される。

本発明の複合材料は塗布剤であってもよい。抗微生物性塗布剤は、手術室、歯科及び医療用クリニック、育児室、ケアホーム、及び他の同様な環境で使用されてもよい。本発明の抗微生物性ＭＮＰによって実証された持続的な抗微生物特性を有する塗布剤を提供することは、非常に有利である。本発明の抗微生物性ＭＮＰは、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス（ＭＲＳＡ）を含めた様々な微生物に対して効果を生じる。本発明の抗微生物性ＭＮＰを含む塗布剤は、他の感染性微生物の中でもＭＲＳＡに対して耐性を提供し、そしてそれは、特に前記のような環境内で使用されるとき、非常に有利である。

【００４３】

本発明の複合材料は、本明細書中に記載した抗菌性ＭＮＰを含むオーラルケア組成物であってもよい。オーラルケア組成物は、一般的な衛生、又は齲歯若しくは特定の歯根膜感染の処置のを理由に口腔内での使用が意図される材料である。好ましくは、オーラルケア組成物は、歯磨き粉、保護ペースト、又は口内洗浄剤である。

【００４４】

抗微生物性ナノ粒子の作製方法

本発明の更なる態様において、ＣＨＸカチオンの水溶液を、リン、炭素、窒素、及び硫黄の１若しくは複数のオキソアニオン及び部分的に水素化されたオキソアニオンから選択されたアニオンと反応させることを含む、本明細書中に記載した抗微生物性ＭＮＰを作製する方法を提供する。好ましくは、アニオンはリン、炭素、窒素、及び硫黄のオキソアニオンから選択される、そして、より好ましくは、アニオンはホスファート、カルボナート、ニトラート、及びスルファートから選択される少なくとも１つである。好ましくは、マイクロ粒子又はナノ粒子のコロイド懸濁液を生じさせるための混合は、１：１００～１００：１のＣＨＸカチオン：選択されたアニオンのモル比である。

【００４５】

好ましくは、２種類の反応物が等モル濃度、すなわち、５０：５０で存在する。等モル反応物質濃度では、得られるコロイド懸濁液は、満足できるコロイドサイズとゼータ電位を有する。好ましくは、反応混合物中のＣＨＸカチオンの濃度は約５ｍＭである。好ましくは、先に記載するアニオンの反応混合物中での濃度は約５ｍＭである。

好ましくは、前記方法は、ＣＨＸカチオンの水溶液をオルトホスファート、ピロホスファート、トリホスファート、及びヘキサメタホスファートから選択されたホスファートアニオンと反応させることを含む。より一層好ましくは、前記方法は、ＣＨＸカチオンの水溶液をヘキサメタホスファートアニオンと反応させることを含む。ＨＭＰを使用することで、良好なゼータ電位及びサイズ特性、並びに良好な溶解性を有するコロイド懸濁液が生じる。

【００４６】

好ましくは、ＨＭＰ反応物は、使用前に試薬の好ましくない加水分解の危険を避けるために、例えば、使用前６０分以降に準備された、新たに準備されたＨＭＰである。いくつかの態様において、１若しくは複数の追加アニオンが反応混合物中に存在してもよい。いくつかの態様において、（ＣＨＸに加えて）１若しくは複数の追加カチオンもまた反応混合物中に存在してもよい。

追加成分もまた、反応混合物中に存在してもよい。これらは、ＭＮＰ中に組み入れられることが意図される成分、又は例えば、形成後にＭＮＰをコートすることによって、ＭＮＰの凝集を予防するのに役立つ成分であってもよい。好ましくは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）が凝集防止剤として反応混合物中に存在する。場合によっては、ＰＥＧは形成後にＭＮＰ表面にコートされる。

【００４７】

好ましくは、反応混合物は、混合プロセス及びＭＮＰ形成プロセスを通じて素早く撹拌されている。

特定の態様において、ＭＮＰは更なるステップにおいてコロイド懸濁液から回収される。これは、約２１０００ｇにて６０分間の遠心分離と、それに続く上清の除去、そして、４０～６０℃にて数日間の乾燥によって達成され得る。次に、得られた粒子は、取り出され、そして、微細な粉末まですりつぶされて、ＭＮＰ凝集体を得る。

あるいは、約１Ｍの濃度のＫＣｌ溶液が懸濁液に加えられ、そして、約１５分間静置されてもよい。これは電荷層の圧縮を作り出し、ＭＮＰが堆積する原因となる。上清の除去に続いて、約５０００ｇにて１０分間の遠心分離で、上清の除去後にペーストを得る。これを適宜乾燥させて、ＭＮＰを製造する。

【００４８】

抗微生物性ナノ粒子を使用する方法

本発明の更なる態様によると、物品をＭＮＰのコロイド懸濁液中に浸漬すること、該物

品を懸濁液から取り出すこと、そして、適宜、該物品を脱イオン水ですすぎ、乾燥させることを含む、本明細書中に記載した抗微生物性ＭＮＰの表面コーティングを形成する方法を提供する。

好ましくは、懸濁液中への物品の浸漬中、その懸濁液は、例えば、約１５０ｒｐｍで素早く撹拌される。

好ましくは、物品は１秒～３０分間の間、コロイド懸濁液中に浸漬される。達成されるＭＮＰ被覆は浸漬時間に関係するので、より濃い被覆が必要である場合、従って、浸漬時間は延長されなければならない。

【００４９】

適宜、物品は浸漬後に脱イオン水ですすがれる。すすぐことで物品の表面から余分なＭＮＰを取り除く。好ましくは、物品は１秒～３０秒の間すすがれる。達成されるＭＮＰ被覆は、すすぎ時間に関係するので、より濃い被覆が必要である場合、従って、すすぎ時間は短縮されなければならないか、又はリンスステップが排除されてもよい。

ＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰ、及び／又はＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰで機能化された材料は、ＭＲＳＡ、Ｅ．コリ、Ｐ．エルギノーサ、Ｋ．ニューモニエ、Ａ．バウマニイ（A. baumanii）、Ｓ．ゴルドニイ、Ｐ．ジンジバリス（P. gingivalis）、及びＣ．アルビカンス（C. albicans）を含めた多くの微生物に対して有効性を有する。総生細胞数のカウント（コロニー形成単位）、時間－死滅アッセイ、抑制域、生／死生存率試験、及び顕微鏡技術の範囲を使用した造影などの多くの方法及びアッセイが、抗微生物効果を評価するのに使用された。

【００５０】

今の説明で開示された数値域に関して、もちろん、正常な方法では、上限に対する技術的な評価基準は下限に対する技術的な評価基準と異なっている、すなわち、上限及び下限は内因的に別個の構想であることが理解される。

疑問の回避のために、上記の概説では、通常の方法におけるＭＮＰ、物品、組成物、及び方法の異なった特徴に関する一般的な好み及び選択肢が独立に記載されているので、それらが適合可能である限り、特徴の他の組み合わせで組み合わせ可能であることは確認されている。

【実施例】

【００５１】

以下の実施例は本発明の例証である。

実施例１－６；比較実施例１－３：機能化ホウケイ酸ガラス表面からのＣＨＸの溶出

室温にて素早い撹拌下、１００ｍＬのクロルヘキシジン（１０ｍＭの濃度にて二グルコン酸塩の水溶液として）と１００ｍＬの水溶液の状態の様々なアニオンのうちの１つとを、同様にそれぞれの５ｍＭの有効最終総濃度を達成するように、１０ｍＭの初期濃度にて組み合わせることによって、クロルヘキシジンベースの塩を調製した。使用したアニオンを、表１に示す。

【００５２】

【表１】

表１

短縮名	試薬	供給業者
オルトリン酸塩	オルトリン酸 水素二ナトリウム	Fisher Scientific, Loughborough, UK
ピロリン酸塩	ピロリン酸四ナトリウム 五塩基性	Fisher Scientific
三リン酸塩	三リン酸ナトリウム 五塩基性	Sigma Aldrich, Gillingham, UK
ヘキサメタリン酸塩	ヘキサメタリン酸ナトリウム	Sigma Aldrich
炭酸塩	炭酸カルシウム	Fisher Scientific
硝酸塩	硝酸カルシウム 四水和物	Sigma Aldrich

【００５３】

そして、沈殿物を、ホウケイ酸ガラス製カバーガラス上に付着させた。カバーガラス（Agar Scientific, Stansted, UK）を、アセトンでの１０分間の超音波処理と、それに続く工業用変性アルコールでの１０分間の超音波処理によって清浄し、風乾させた。

それらを、先に記載した２００ｍＬの懸濁液中に、磁気撹拌プレートを使用して素早く撹拌しながら浸漬した。カバーガラスを、３０秒間浸漬し、取り出し、脱イオン水に１０秒間浸漬してすすぎ、ふき取って余分な液体を取り除き、そして、風乾させた。

【００５４】

ＣＨＸベースの沈着物を伴った得られたガラス表面を、走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）と原子間力顕微鏡（ＡＦＭ）を使用して調査した。窒化ケイ素カンチレバーを用いてタッピングモードで作動するベンチトップＳＥＭ（Phenom, Eindhoven, Netherlands）及び原子間力顕微鏡（Nanoscope IIIa, Digitial Instruments, CA, USA）を、表面を調べるのに使用した。標本を、ＳＥＭ前にスパッタコーターを使用して金パラジウム層でコートした。

機能化ガラス表面からの可溶性ＣＨＸの溶出を、紫外線分光測光を使用して調べた。それぞれのタイプの８個の標本を、紫外線分光測光に好適な、個別に標識したキュベット内に入れた。２．５ｍＬの脱イオン水をキュベットに加え、そして、それらをキュベットの蓋を使用してしっかり密閉した。これらを、１５０ｒｐｍで回転するオービタル振盪機でかき混ぜた。キュベットを密閉したままにし、１４日間の間隔をおいてクロルヘキシジン濃度についてサンプル抽出した。

【００５５】

標本を脱イオン水中のみに浸漬した、及びそれらを２５μＭ又は５ｍＭのＣＨＸ溶液中のみに浸漬した対照セットを調製した；２５μＭはＣＨＸ－ＨＭＰ懸濁液中に残った可溶性ＣＨＸの濃度であり、５ｍＭは調製における（可溶性及び結合）ＣＨＸの総濃度である。

標本のＳＥＭ画像を図１～２に示す。

標本のＣＨＸ溶出プロフィールを図３～４に示す。すべての標本が可溶性ＣＨＸを放出した。

表２は、試験した種々のＣＨＸ塩のＣＨＸ放出特性を示す。

【００５６】

【表２】

表２

	コーティング媒質	CHX放出期間
実施例1	5/5 CHX-オルトリン酸塩	即時放出のみ 持続放出なし
実施例2	5/5 CHX-ピロリン酸塩	即時放出のみ 持続放出なし
実施例3	5/5 CHX-三リン酸塩	即時放出のみ 持続放出なし
実施例4	5/5 CHX-ヘキサメタリン酸塩	>14日間
実施例5	5/5 CHX-炭酸塩	48-72時間
実施例6	5/5 CHX-硝酸塩	48-72時間
比較実施例1	脱イオン水	N/A
比較実施例2	25μM CHX	48-72時間
比較実施例3	5mM CHX	48-72時間

【００５７】

実施例１－ＣＨＸ－オルトホスファート

ＣＨＸ－オルトホスファート（ＣＨＸ－ＯＰ）機能化標本は、自己構築型多孔質マトリックス沈着を有するいくつかの領域を示したが、図１ｂ及び図３ａに見られる異常構造も示した。これらは、中心部から発生し、この点から放射状に伸長する細長い微結晶の配列で構成されている（「ハリネズミ」型）。これらの構造は、概して直径３０～５０μｍ、そして、個々の微結晶が約０．５０～１μｍの幅であった。微結晶がわずかに曲がっていることも多かった。

【００５８】

実施例２－ＣＨＸ－ピロホスファート；実施例３－ＣＨＸ－トリホスファート；実施例４－ＣＨＸ－ヘキサメタホスファート

ＣＨＸ－ピロホスファート（ＣＨＸ－ＰＰ）、ＣＨＸ－トリホスファート（ＣＨＸ－ＴＰ）及びＣＨＸ－ＨＭＰで機能化した標本はすべて、自己構築型多孔質マトリックスと同様の沈着を呈した。これは、密度とＣＨＸ－ＨＭＰに比べてＣＨＸ－ＰＰ及びＣＨＸ－ＴＰの広範囲の被覆に現れた。

【００５９】

ＣＨＸのオルトホスファート、ピロホスファート、及びトリホスファートは最も高いＣＨＸ放出を呈した。これらは、短期間にわたるＣＨＸの非常に大量の放出をもたらすことができ、そしてそれは、ＣＨＸ溶液に単純にさらされた標本で観察される放出に比べ、非常に大量、且つ、迅速であった。最も高い放出はピロホスファートから見られ、中間レベルの放出はトリホスファートから見られ、及び最も低い放出はオルトホスファートから見られたが、それでも試験した他の標本から見られたＣＨＸ放出の大きさの約４倍であった。すべての場合において、放出は徐放に関する証拠もなく初期の時期に起こった。これらの粒子は、局所に多量の抗微生物剤投与量を必要とする材料に使用できる。例としては、口蓋栓塞子又は義歯などの医療機器の汚染除去処理である。

【００６０】

ＣＨＸのヘキサメタホスファートがどのアニオンでも最も低い総放出を呈したが、これは、実験の継続中（１４日間）持続され、測定の結論の時点でもまだ進行中であった。他のより長い実験では、ＣＨＸヘキサメタホスファートは少なくとも９０日間にわたる放出を示した。これらの粒子は、留置カテーテルや、カニューレや、インプラントなどのより長い期間にわたって抗微生物効果を有することが必要とされるそれらの材料での用途が見つかる。

【００６１】
実施例５－ＣＨＸ－カルボナート；実施例６－ＣＨＸ－ニトラート
ＣＨＸ－カルボナート調製物に晒した標本は、ほぼ球形に配置された自然に形成されたナノチューブ構造を呈した（図２ｇ）。それらは主に単一壁チューブであったが、いくつかの領域では、二重壁ナノチューブ、又はナノチューブの中のナノチューブが見られた。
ＣＨＸ－ニトラート機能化標本で観察された沈着物は、まばらに分散し、そして、ほとんどの領域がＳＥＭにおいて特徴がないように見えた。
【００６２】
ＣＨＸのニトラート及びカルボナートは、オルトホスファート、ピロホスファート、及びトリホスファートよりも少ないＣＨＸ放出を呈し、その放出が数日にわたり続いた。ニトラート及びカルボナートの標本は、ＣＨＸを放出し、そして、この放出が約４８～７２時間継続した；この後、ＣＨＸ濃度が安定したので、放出が完了したと見なすことができる。これらには、創傷包帯又は縫合糸など、この期間にわたって抗微生物効果を必要とする製品における用途が見つかる。
【００６３】
比較実施例１～３
水又はＣＨＸ水溶液で処理したガラス表面は特徴がなく平らに見える（図１ａ）。ＣＨＸ処理した標本は共にＣＨＸを放出し、そして、この放出は約４８～７２時間にわたり継続した；この後、ＣＨＸの濃度が安定したので、放出が完了したと見なすことができる（図４）。
【００６４】
実施例７～１４；比較実施例４－７：ＣＨＸ－ＨＭＰ機能化材料からのＣＨＸの溶出
ナノ粒子の合成及び特徴づけ
それぞれ５及び５又は０．５及び０．５ｍＭの最終総濃度をもたらすように、室温にて素早い撹拌下、ＣＨＸ（二グルコン酸塩の水溶液として）とＨＭＰ（ナトリウム塩の水溶液として）とを組み合わせることによってＣＨＸ－ＨＭＰナノ粒子（ＮＰ）を調製した。これらは今後、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５とＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５と呼ばれる。２種類の試薬を混合することで、コロイド懸濁液の形成はもたらした。コロイド懸濁液中のナノ粒子の粒度とゼータ電位は、時間と電気泳動度（Malvern Zetasizer, Malvern, UK）の係数として動的光散乱法（ＤＬＳ）を使用して特徴づけられた。
ナノ粒子の調製と特徴づけ－機能化材料
様々な材料の標本をナノ粒子によってコートした。使用した材料を表３に示す。
【００６５】

【表３】

表３

実施例	短縮名	説明	調製	供給業者
7,8	ガラス	12mmの直径の円形のホウケイ酸ガラス製カバーガラス	アセトン中で10分間超音波処理し、工業用変性アルコール中で10分間超音波処理し、風乾する	Agar Scientific, Stansted, UK
9,10	アルギン酸塩創傷包帯	アルギン酸塩繊維を含む市販の創傷包帯の10×7mm小片	供給されたままで使用した	“Savlon Alginate Dressings”, Novartis Consumer Health, Horsham, UK
11,12	EVA重合体	7×7×3mmのエチレン酢酸ビニル小片	工業用変性アルコール中で10分間超音波処理し、風乾する	Date Plastics, Witney, UK
13,14	チタニウム	グレード2の市販の純粋なチタニウムの10×10×1mmの正方形の小片	80グリットの炭化ケイ素紙を使用して磨き、10分間、アセトン中で超音波処理し、10分間、工業用変性アルコール中で超音波処理し、風乾する	Titek, Sutton Coldfield, UK

【００６６】

２００ｍＬのコロイド懸濁液を、新たに調製した試薬（ＨＭＰの加水分解を予防するため）を使用して調製した。標本を、素早く撹拌しているコロイド中に３０秒間浸漬し、次に、取り出し、脱イオン水中に１０秒間浸漬してすすぎ、そして、ふき取って余分な液体を取り除き、風乾させた。

【００６７】

好適な表面を有するもの（ガラス、チタニウム）については、ナノ粒子で機能化した表面を、原子間力顕微鏡（ＡＦＭ；Nanoscope IIIa, Digital Instruments, CA, USA）を使用して調べたが、非常に荒い又は不揃いな表面を有するもの（アルギン酸塩包帯、ＥＶＡ重合体）については調べなかった。すべての標本を、スパッタコーティングユニット（SC 7620, Emitech, Taiwan）を使用した金パラジウム合金でのコーティング後に、走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）（Phenom, Eindhoven, Netherlands）を使用して調べた。ガラスもチタニウムも原子論的に平らな表面ではないので、小さい（＜２０ｎｍ）表面特徴と小さいナノ粒子を見分けることは難しかった；この理由から、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５とＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５ナノ粒子も新たに固着した雲母上に堆積させて、それらの中で最も小さいものを決定した。

【００６８】

ＣＨＸ－ＨＭＰ－５及びＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５のナノ粒子でコートしたそれぞれの材料の８個の標本を、紫外線分光測光に好適な、個別に標識したキュベット内に入れた。

脱イオン水をキュベットに加え、そして、それらをキュベットの蓋を使用してしっかり密閉した。これらを、１５０ｒｐｍで回転するオービタル振盪機でかき混ぜた。キュベットを密閉したままにし、６０～９０日間の間隔をおいてクロルヘキシジン濃度についてサンプル抽出した。標本を脱イオン水中に浸漬した、及びそれらを２５μＭのＣＨＸ溶液中に浸漬した対照セットを調製し、該２５μＭは、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５コロイド懸濁液中に残ったＣＨＸ水溶液の濃度である。

【００６９】

コロイド懸濁液からのＮＰの任意の回収

反応が行われた後に、適宜、ＮＰを懸濁液から回収してもよい。本実施例の場合にはこれをおこなわなかったが、しかしながら、以下の選択肢の１つによってそれを達成してもよい：

【００７０】

１）高ｇ用遠心分離管又はEppendorf内に入れ、６０分間、２１０００ｇにて遠心分離する。これにより適度な分離がもたらされる；わずかに濁っている液体として見られる上清中に残ったＮＰの痕跡がまだ存在する。上清を取り出して捨て、そして、ＮＰペーストを使用するか、又はオーブン内、数日間にわたり４０～６０度で乾燥させ、掻き出し、微細な白色粉末に粉砕し、ＮＰの凝集体を得る。これらは、例えば歯科用セメント又はその他の材料に加えてもよい。

【００７１】

２）あるいは、２５０ｍＬの５／５コロイド懸濁液に２５ｍＬの１Ｍ ＫＣＬを加え、１５分間置くと、電荷層の圧縮のせいでＮＰのバルクが容器の底に沈殿する。デカントして、上清を捨て、底で濃密になった液体を遠心分離機容器の中に集める。５０００ｇにて１０分間、遠心分離する。これにより、ＮＰの周りの電荷層の圧縮によるはるかに効果的な分離をもたらすので、より典型的な実験装置を用いてより大量のＮＰを加工するのに使用できる。上清を捨てた後で、ペーストを掻き出してもよく、例えば、塗布剤又はその他の材料に加えるために使用されてもよい。あるいは、ペーストを乾燥させて、先に記載したように使用してもよい。

ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５及びＣＨＸ－ＨＭＰ－５懸濁液の主な粒度及びゼータ電位を表４に示す。

【００７２】

【表４】

表４

ナノ粒子の調製	粒度［nm］（標準偏差）	ゼータ電位［mV］（標準偏差）
CHX-HMP-0.5	122 (47)	-39.6 (3.2)
CHX-HMP-5	141 (44)	-47.5 (6.5)

【００７３】

ＤＬＳは、はるかに小さい直径の第二のピークが約２０～６０ｎｍで観察されたいくつかの標本で二つのモードのサイズ分布を示した。ナノ粒子機能化表面のＳＥＭ画像を図５～８に示し、機能化ガラス、チタニウム、及び雲母表面のＡＦＭを図９～１１に示す。チタニウム及びガラス標本は、約４０ｎｍより小さい直径を有するナノ粒子と基板面を区別するのを不可能にするナノ規模の荒さを呈するが、対照雲母表面は、原子論的に平らであるので、これらの画像は典型的に２０～１００ｎｍの直径を有するナノ粒子の密集層の明確な表示をもたらす。

【００７４】

ナノ粒子で機能化された表面からのクロルヘキシジン溶出を図１２～１５に示す。

調査した異種材料の標本は、ＣＨＸ－ＨＭＰの抗微生物性ナノ粒子によって首尾よく機能化され、最大９０日間の期間にわたる可溶性ＣＨＸのゆるやかな浸出を呈した。図５～１１のＳＥＭ及びＡＦＭ画像は、個々のナノ粒子の明確な視覚化をもたらし、そして、自然の自己構築型多孔質ナノ粒子がほとんどの表面で凝集している。

表５は、様々な機能化材料に関するＣＨＸ放出期間を示す。ＣＨＸ放出量に関しては、図１２～１５を参照のこと。

【００７５】

【表５】

表５

	材料	塗料	CHX放出期間
実施例7	ガラス	CHX-HMP-5	>90日間
実施例8	ガラス	CHX-HMP-0.5	20～25日間
実施例9	アルギン酸塩包帯	CHX-HMP-5	>50日間
実施例10	アルギン酸塩包帯	CHX-HMP-0.5	>50日間
実施例11	EVA重合体	CHX-HMP-5	>80日間
実施例12	EVA重合体	CHX-HMP-0.5	～20日間
実施例13	チタニウム	CHX-HMP-5	>60日間
実施例14	チタニウム	CHX-HMP-0.5	5日間
比較実施例4	ガラス	25μM CHX溶液	放出なし
比較実施例5	アルギン酸塩包帯	25μM CHX溶液	>60日間
比較実施例6	EVA重合体	25μM CHX溶液	放出なし
比較実施例7	チタニウム	25μM CHX溶液	顕著な放出がほとんどない又は全くない

【００７６】
実施例７－ＣＨＸ－ＨＭＰ－５で機能化したガラス
実施例８－ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５で機能化したガラス
比較実施例４－対照２５μＭのＣＨＸ溶液に晒したガラス
ナノ粒子で機能化されたガラス表面は、実験期間を通じてＣＨＸを放出し（図１３）、放出されたＣＨＸは、ナノ粒子の初期密度及びナノ粒子凝集体に関連し、より密にコートされているＣＨＸ－ＨＭＰ－５の表面ほど、より低い密度でコートしたＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５の表面に比べて、より高い、より持続した放出を呈する（図６）。ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５標本に関して、可溶性ＣＨＸの放出は約２０～２５日後に止まったが、一方で、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５標本に関して、放出は９０日の時点でまだ続いていた。２５μＭのＣＨＸで処理した対照群は、ＣＨＸ放出を全く示さず、すすぎステップで可溶性ＣＨＸが完全に取り除かれ、そのため、ナノ粒子で機能化された標本で観察されたＣＨＸ放出が、これらのナノ粒子の存在によることを示した。
【００７７】
この知見は、セメント材料に埋め込まれたガラス粒子を含む歯科充填用材料であるグラスアイオノマーセメントなどの持続した抗微生物機能性の利益を得るガラス含有及びガラス様生物医療用品、並びに消費者製品における用途を見つけることができる。
【００７８】
実施例９－ＣＨＸ－ＨＭＰ－５で機能化したアルギン酸塩創傷包帯
実施例１０－ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５で機能化したアルギン酸塩創傷包帯
比較実施例５－対照２５μＭのＣＨＸ溶液に晒したアルギン酸塩創傷包帯
【００７９】
表面積で標準化すると、最も高いＣＨＸ放出は、アルギン酸塩創傷包帯からであった（図１２）。ＳＥＭ画像は、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５ナノ粒子によるほとんどすべての繊維におけるナノ粒子凝集体の濃いコーティングを明確に示し、そして、ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５ナノ粒子でコートした標本のよりまばらな分配を明確に示した（図５）。対照２５μＭのＣＨＸ溶液で処理した標本からのＣＨＸの何らかの放出があったが、材料は溶液からいく

らかの可溶性ＣＨＸを吸収したが、対照標本から放出されたＣＨＸの量はナノ粒子で機能化された標本で見られたそれよりはるかにわずかであることを示す（図１２）。用量－反応相関があり、これより、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５標本がＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５標本より多くの放出を呈し、これはＣＨＸ－ＨＭＰ－５調製物を用いたナノ粒子の広範囲の被覆と関連する（図５）。ＣＨＸ－ＨＭＰ－５及びＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５標本の両方に関して、放出は実験の結論の時点でまだ進行中であり、この時点でナノ粒子が使い果たされていないことを示す。これらの知見は、慢性又は非回復期創傷を感染から保護する創傷包帯を開発するのに有用であり得る。

【００８０】

実施例１１－ＣＨＸ－ＨＭＰ－５で機能化したＥＶＡ重合体

実施例１２－ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５で機能化したＥＶＡ重合体

比較実施例６－対照２５μＭのＣＨＸ溶液に晒したＥＶＡ重合体

【００８１】

ＣＨＸ－ＨＭＰ－５でコートしたＥＶＡ重合体表面は、ガラスやアルギン酸塩創傷包帯上で観察されるのと同じ特徴的なナノ粒子凝集体を示したが、被覆は他の基材のそれより概していくらか低い密度であった（図７）。ＥＶＡ ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５標本は非常に低く長続きしない可溶性ＣＨＸ放出を示した。しかしながら、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５標本は、最大で少なくとも８０日間、ＣＨＸの持続放出を示し（図１４）、表面積に対して標準化した場合、これはガラス標本で見られた放出に匹敵していたが、それよりわずかに高かった。これらの知見は、静脈カテーテルや尿カテーテルなどの抗微生物性重合体ベースの医療機器の開発、及びスポーツ用マウスガードや歯ぎしり用マウスガードなどの脱着可能なポリマー製品向けの抗菌性コーティングの周期的な局所使用における用途を見つけることができる。

【００８２】

実施例１３－ＣＨＸ－ＨＭＰ－５で機能化したチタニウム

実施例１４－ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５で機能化したチタニウム

比較実施例７－対照２５μＭのＣＨＸ溶液に晒したチタニウム

【００８３】

チタニウム表面は、図８で見られるように、ＣＨＸ－ＨＭＰナノ粒子の凝集に関する明らかな証拠を示した。ＣＨＸ－ＨＭＰ－５で機能化された標本は、実験期間にわたって可溶性ＣＨＸの連続放出及び徐放を示した；数の上では、この放出はガラス及び重合体表面から見られるものの約二倍であった。ＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５で機能化させた表面は、わずかなＣＨＸしか放出せず、この放出は約５日後に止まった。ＣＨＸ－ＨＭＰ－５ナノ粒子には、チタニウム若しくはチタニウム合金から作られた歯科又は整形外科用インプラントのための抗菌性コーティングの開発における用途が見つかり、そして、ナノ粒子が非連続的なコーティングを作り出していて、多くのチタニウムがまだ晒されているので、骨芽細胞によるコロニー形成に利用可能である、従来の抗菌性コーティングを超える利点をもたらす。

【００８４】

実施例１５～１８；比較実施例８～１０：微生物学試験

微生物学：菌株

メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス（ＭＲＳＡ；ＮＣＴＣ１３１４２）をミューラーーヒントン（ＭＨ）培地で培養した。シュードモナス・エルギノーサＮＣＩＭＢ８６２６（ＡＴＣＣ９０２７）を栄養培地（ＮＢ）又は栄養寒天培地（ＮＡ）で培養した。すべての培養物を、試験を通じて好気的に３７℃にてインキュベートした。

【００８５】

微生物学：最小発育阻止濃度

プランクトン様細菌に対して対照である２５μＭのクロルヘキシジン水溶液及びＣＨＸ－ＨＭＰ－５コロイドの最小発育阻止濃度（ＭＩＣ）を、（British Society for Antimicrobial Chemotherapy methodology for determining MICに従って）９６ウェルマイクロ

タイタープレート内、全容積１００μＬの適切な培地中に連続倍加希釈（０～２５μＭ）によって測定した。培養物を好気性条件で３７℃にて１６時間インキュベートし、吸光度（ＯＤ）測定値を、標準的なマイクロタイタープレートリーダ（SpectroStar Nano; BMG Labtech）を使用して６２０ｎｍ（Ａ６２０）で評価した。

【００８６】

微生物学：総生細胞数のカウント

サンプルを、マイクロタイタプレートのウェルから採取し、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中で連続的に希釈した（10^{-1}～10^{-6}）；１０μｌのアリコートを、非選択的培地としてＭＨ又はＮＡを用いるMiles及びMisraの総生細胞（ＴＶＣ）カウント法（Hyg (Lond), vol. 38, pp. 732-749, 1938を参照）を使用して数えた。回収細胞数をｃｆｕ ｍｌ$^{-1}$として計算した。

【００８７】

微生物学：固定バイオフィルムモデル

菌株をまず１６時間培養し、これらの定常期培養物を遠心分離で集菌し、そして、ＯＤ６５０＝０．１に調整した。バイオフィルムを、５０μＬの適切な培地中で好気的に３７℃にて４８時間培養し、次に、培地を取り出して捨てた。バイオフィルムを１００μｌのＰＢＳで二度洗浄することによって、緩く付着している細菌を取り除いた。ＰＢＳ中に希釈したクロルヘキシジン又はクロルヘキシジンナノ粒子を、先に記載したように倍加希釈（０～２５μＭ）を使用してバイオフィルムに加えた。プレートを３７℃にて２時間インキュベートした；生物量を評価するために、連結していない細胞をそっと吸引して捨て、接着細胞を、ＰＢＳで二度洗浄し、そしてクリスタルバイオレット（０．２５％ ｗ／ｖ）で１０分間染色した；ＰＢＳで更に二回洗浄を続け、細胞が結合したクリスタルバイオレットを７％の酢酸で再可溶化し、そして、吸光度を５９５ｎｍ（A_{595}）で計測した。

【００８８】

微生物学：ナノ機能化ＥＶＡポリマー標本上のバイオフィルム

ＭＲＳＡ及びＰ．エルギノーサの前培養を、適切な培地中、３７℃にて１６時間好気的に培養した。ポリマー片上での増殖に関するアッセイを、２４ウェルＭＴＰのウェル内に各キューブを置き、そして、（ポリマー標本を覆うのに十分な）１ｍｌの適切な液体培地を加えることによって測定した。ポリマー標本は、ＩＭＳ中での１０分間の超音波処理と、それに続く、処置なし（対照）、撹拌したＣＨＸ－ＨＭＰ－５中への３０秒間の浸漬と、それに続く、脱イオン水中への１０秒間の浸漬（低いＮＰ）、及びすすぎを伴わない撹拌したＣＨＸ－ＨＭＰ－５中への３０秒間の浸漬（高いＮＰ）のいずれかによって清浄した、表３のＥＶＡ重合体であった。各ウェルに１０μｌのＭＲＳＡ又はＰ．エルギノーサの前培養物のいずれかを植え付け、次に、３７℃にて２４時間インキュベートした。ポリマー標本をウェルから無菌の鉗子を使用して取り出し、１ｍｌのＰＢＳを入れた微小遠心チューブに移した。チューブを１分間ボルテックス処理し、付着細菌を取り外し、そして、細胞懸濁液を連続的に希釈（10^{-1}～10^{-6}）し、細菌を、Miles及びMisraの方法を使用して数えた。

表６は対照及びＣＨＸ－ＨＭＰ－５培地についてＭＩＣを示す。

【００８９】

【表６】

表６

	媒質	MIC, 総CHX conc (可溶性CHX conc)
実施例15	CHX-HMP-5 懸濁液	MRSA: 0.625mM (3.12μM); P.a.: 0.312mM (1.56μM) (試験した最小値)
比較実施例8	25μM CHX	MRSA: 確立されず (効果なし) P.a.: (25μM)

【００９０】
表７は、ＭＲＳＡ及びＰ．エルギノーサの固定細菌性バイオフィルムに対する異なった培地の効果を示す。
【００９１】
【表７】

表７

	媒質	バイオフィルムへの効果
実施例16	CHX-HMP-5	MRSA: 激しい破損 P.a.: 激しい破損
比較実施例9	25μM CHX	MRSA: わずかな破損 P.a.: わずかな破損

【００９２】
表８は、ナノ機能化ＥＶＡポリマー標本の抗菌性作用を示す。
【００９３】
【表８】

表８

	標本	結果
実施例17	EVA上に高NP CHX-HMP-5	MRSA: 細菌なし P.a.: 細菌なし
実施例18	EVA上に低NP CHX-HMP-5	MRSA: 細菌なし P.a.: 高レベルの細菌、 低濁度の液体培地
比較実施例10	未処理のEVA	MRSA: 5×10^5 cfu ml^{-1}を回収 P.a.: 高レベルの細菌を回収、 高濁度の液体培地

【００９４】
ＣＨＸ－ＨＭＰ－５コロイド懸濁液に関するＭＲＳＡのＭＩＣは、コロイドの８×希釈であることがわかり、それは、０．６２５ｍＭの総（可溶性及び結合）ＣＨＸ濃度及び３．１２μＭの可溶性ＣＨＸ濃度に相当する。ＭＲＳＡのＭＩＣは２５μＭのクロルヘキシジンについて確立されず、この溶液がＭＲＳＡに対して効果を生じなかったことを示している（図１９）。Ｐ．エルギノーサに関して、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５に関するＭＩＣは、コ

ロイドの１６×希釈であることがわかり、それは、試験した最小の濃度であった；これは、０．３１２ｍＭの総ＣＨＸ濃度及び１．５６μＭの可溶性ＣＨＸ濃度に相当する。２５μＭのクロルヘキシジン濃度に関するＭＩＣは、無希釈溶液、すなわち、２５μＭであり、Ｐ．エルギノーサがＭＲＳＡよりナノ粒子に対して感受性を有することを示している（図２０）。ＭＲＳＡ未処理対照について１．５×10^{12}ｃｆｕ ｍｌ$^{-1}$を回収し、且つ、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５コロイドの８×及び４×希釈物を用いて培養したサンプルからまったく細菌を回収できず、ＭＩＣもまた殺菌性を有することが示唆されたＴＶＣは、ＭＩＣデータを裏付けた。同様に、Ｐ．エルギノーサに関して、未処理対照で１．３４×10^{9}ｃｆｕｍｌ$^{-1}$を回収したのと比較して、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５コロイドの１６×及び８×希釈物を用いて培養したサンプルから細菌を回収できなかった。

【００９５】

ＭＲＳＡのバイオフィルムは、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５コロイドによって破損し、２５μＭのクロルヘキシジン水溶液によってある程度破損した（図２１）。ＣＨＸ－ＨＭＰ－５コロイドもまた、１６×～４×の希釈における２５μＭのクロルヘキシジン水溶液に比べ、より効率的にＰ．エルギノーサのバイオフィルム（図２２）を破損させた；２×及び未希釈レベルにおいて、２５μＭのクロルヘキシジン及びナノ粒子は等しく有効であった。ナノ機能化ＥＶＡ重合体上でのバイオフィルム増殖に関して、対照重合体について、標本から回収したＰ．エルギノーサ細菌細胞は使用した希釈の全てにおいてカウントできないくらい非常に多かった；ＭＲＳＡでは５×10^{5}ｃｆｕ ｍｌ$^{-1}$が回収された。低濃度のナノ粒子でコートしたポリマー片に関して、細菌細胞は、Ｐ．エルギノーサについては、すべての希釈でカウントできないくらい非常に多かったが、ＭＲＳＡについては、細胞がまったく回復できなかった。Ｐ．エルギノーサについて、多数の細菌が回収されたにもかかわらず、周囲の液体培地は対照（より少ない増殖を示す）ほど濁っておらず、そして、ＭＲＳＡについては、周囲の培地は透明であり、ゼロ増殖を示したことに注意しなければならない。高濃縮のナノ粒子でコートしたポリマー片に関して、ＭＲＳＡ又はＰ．エルギノーサのいずれについても細菌は回収できず、周囲の培地は両方の事例で透明であった。

【００９６】

微生物学実験は、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５コロイドが生体外において浮遊状態で（planktonically）に培養したＭＲＳＡ及びＰ．エルギノーサに対して効果を生じること、並びにこの効果がコロイドを洗う溶液中の残った２５μＭの可溶性ＣＨＸの存在によるものでないことを示した。さらに、バイオフィルム試験は、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５コロイドが生体外においてＭＲＳＡ及びＰ．エルギノーサのバイオフィルムに対して効果を生じることを示した。さらに、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５ナノ粒子でコートしたＥＶＡポリマー標本は、ＭＲＳＡ及びＰ．エルギノーサのバイオフィルムに対する有効性を呈した。

実施例１９～２４；比較実施例１１：ＣＨＸ－ＨＭＰ ＮＰで置換したグラスアイオノマーセメント

【００９７】

ＣＨＸ－ＨＭＰナノ粒子の合成及び調製

クロルヘキシジン二グルコン酸塩とヘキサメタリン酸ナトリウム（共にSigma Aldrich）水溶液の原液を、終濃度が４ｍＭのＣＨＸ及び５ｍＭになるように脱イオン水中で混合した。得られたコロイド懸濁液を、徹底的に混合し、次に２１０００ｇにて６０分間遠心分離した。上清を取り出して捨て、そして、ＮＰペレットを少なくとも４８時間４０℃にて乾燥させた。そして、ペレットを遠心分離管から取り出し、乳鉢と乳棒を使用して微細な白色粉末に粉砕した。この粉末をガラス粉末との置き換えによってＧＩＣに加えた。

【００９８】

ナノ機能化グラスアイオノマーセメント

市販のＧＩＣ（Diamond Carve (TM), Kemdent, Purton, UK）を出発物質として使用した。製造業者の取扱説明書に従ってＧＩＣを混合し、取り出し易くなるように薄層のワセリンでコートしたPerspex鋳型内で押し固めることによって、６ｍｍの直径と３ｍｍの高さの公称寸法を有する円筒ＧＩＣ標本を形成した。混合は、ＧＩＣ調製の広範囲の経験を

有する個人によって行われた。それぞれの標本の正確な寸法を、ノギスを使用して測定し、記録した。ＮＰ粉末を、０、１、２、５、１０、２０及び３０ｗｔ％の置換にてＧＩＣガラス粉末のアリコートと混合した。それぞれの置換の１０個の標本を作製して、合計７０個の標本を得た。それらを６０分以内に鋳型から取り出し、標本と直接接触しないようにウェットティッシュペーパーを入れた個々の小さく、密封されたプラスチック容器内に置いて、１００％の湿度の雰囲気を達成したが、重要な設定の初期相中の溶解をもたらす場合がある液状の水と標本との接触を予防した。これらは３７℃にて７日間保存した。

【００９９】

この後、標本をそれぞれ５個の標本から成る２つのセットに分割した。それぞれの置換の一方のセットを引張り強度及び形態学的試験のためにとっておき、もう片方のセットをセメントからのクロルヘキシジン及びフッ化物の浸出を調査するのに使用した。

クロルヘキシジン及びフッ素放出の調査のために、各標本を３７℃にて個別に標識した容器内の１ｍＬの人工唾液中に浸漬した。人工唾液は、$CaCl_2$・$2H_2O$ ０．１０３ｇL^{-1}、$MgCl_2$ ０．０１９ｇL^{-1}、KH_2PO_4 ０．５４４ｇL^{-1}、$C_8H_{18}N_2O_4S$（ＨＥＰＥＳバッファー酸性型）４．７７ｇL^{-1}、ＫＣｌ ２．２４ｇL^{-1}、１．８０ｍＬの１Ｍ ＨＣｌ、６．８のｐＨを得るために滴定したＫＯＨから構成される。クロルヘキシジン及びフッ化物濃度のためにサンプル抽出される可能性がある状況で人工唾液と標本がインキュベートされるように、標本を定期的に取り出し、そして、新鮮な人工唾液の入った二連のチューブに入れた。予備実験をおこない、サンプリング期間が適切に選択されて、且つ、測定値間の大き過ぎるずれを除外することによって、フッ化物塩による溶出物の飽和による誤った測定値を得ないことを確実にするために、容器内のフッ化物濃度の飽和限界を確立した。この予備実験から知見を使用して、サンプリングは、初日の間、１時間おきにおこない、続いて４時間の間隔でおこない、その後は毎日、そして、その後は毎週おこなった。ＧＩＣ標本を含まず人工唾液のみを含む対照も同じようにサンプル抽出した。

【０１００】

クロルヘキシジンの測定値

人工唾液中のクロルヘキシジン濃度を、紫外線（ＵＶ）分光測光を使用して計測した。１ｍＬの人工唾液を、紫外波長下で透過性のセミマイクロキュベット内に入れ、そして分光光度計を使用して、吸収を２５５ｎｍにて計測した。測定値を、それぞれの計測サイクルの最初と最後に計測した５、１０、２０、３０、４０、５０μｍｏｌ．l^{-1}クロルヘキシジンの較正基準を基準にしてクロルヘキシジン濃度に変換した。濃度を、各標本の個々の寸法測定を基準にして、ＧＩＣ標本の単位表面積あたり放出されたクロルヘキシジンのモル数に変換した。

【０１０１】

フッ素化合物の測定値

人工唾液中のフッ化物濃度を、０．５ｍＬの人工唾液を０．５ｍＬのＴＩＳＡＢ溶液と混ぜることによってイオン選択電極を使用して計測した。データ出力を、同様に等量のＴＩＳＡＢで希釈した０．１、０．５、１、２及び５ｍｇ／ＬのＦ$^-$の較正基準を基準にしてｍｇ／Ｌフッ素イオンに変換した。

引張り強度の測定値

破断が起こるまで円筒状試料に直径方向の圧縮力をかけ、破断時点の負荷を記録し、そして、これを使用して引張り強度を計算することによって、間接的な引張り強度を計測した。

【０１０２】

統計解析

１時間、２４時間、８日間、１５日間及び３３日間の時点での累積ＣＨＸ及びフッ素放出、並びに間接的な引張り強度を、テューキーの正直有意差ポストｈｏｃ検定（Tukey honestly significant difference post-hoc test）を用いた一元配置ＡＮＯＶＡを使用して比較した。

【０１０３】
形態及び構造
引張り強度について試験した標本を、金パラジウム（SC7620, Emitech, Taiwan）の薄層でコートし、走査型電子顕微鏡（Phenom, Eindhoven, Netherlands）で調べた。画像を４００、１０００及び５０００×の公称倍率にて得た。
表９は置換したＧＩＣ及び非置換ＧＩＣの特性を示す。
【０１０４】
【表９】

表９

	NP 含有量 (wt%)	取扱特性	CHX 放出期間	F 放出期間	直径方向の 引張強度 (MPa) (括弧内は 標準偏差)
実施例19	1	良好	>33日間	>33日間	14.3 (4.9)
実施例20	2	良好	>33日間	>33日間	15.7 (4.3)
実施例21	5	良好	>33日間	>33日間	15.5 (1.1)
実施例22	10	良好	>33日間	>33日間	11.5 (2.8)
実施例23	20	良好	>33日間	>33日間	9.4 (2.6)
実施例24	30	不十分 (破棄)	N/A	N/A	N/A
比較実施例11	0	良好	>33日間	>33日間	14.1 (3.7)

【０１０５】
表１０は累積ＣＨＸ放出を示す。各時点の範囲内では、文字が統計的に均質な群を示すので、異なった文字を含む図面はその時点で９５％の信頼度で統計的に有意差がある。
【０１０６】

【表１０】

表10

	累積CHX放出[nmol.mm-2]（括弧内は標準偏差）				
	1時間	24時間	8日間	15日間	33日間
実施例19	0.16 (0.08)a,b	0.20 (0.09)a,b	0.48 (0.15)a,b	0.56 (0.16)a,b	0.65 (0.17)a,b
実施例20	0.66 (0.18)b	0.70 (0.19)b	1.04 (0.21)b	1.17 (0.22)b	1.30 (0.24)b
実施例21	1.30 (0.24)c	1.39 (0.25)c	2.03 (0.34)c	2.30 (0.36)c	2.51 (0.38)c
実施例22	2.52 (0.38)d	2.65 (0.40)d	3.40 (0.43)d	3.73 (0.44)d	4.01 (0.45)d
実施例23	4.02 (0.48)e	4.20 (0.50)e	5.09 (0.55)e	5.46 (0.59)e	5.94 (0.67)e
比較実施例11	0.01 (0.003)a	0.01 (0.02)a	0.11 (0.06)a	0.12 (0.07)a	0.16 (0.08)a

【０１０７】

表１１は累積フッ素放出を示す。各時点の範囲内では、文字が統計的に均質な群を示すので、異なった文字を含む図面はその時点で９５％の信頼度で統計的に有意差がある。

【０１０８】

【表１１】

表11

	累積フッ素放出[ng.mm-2]（括弧内は標準偏差）				
	1時間	24時間	8日間	15日間	33日間
実施例19	2.61 (1.11)b	18.59 (3.12)a,b	70.72 (8.40)a	106.9 (14.1)a	148.1 (16.6)a
実施例20	1.68 (0.73)b	17.10 (2.33)b	64.30 (7.68)a	101.1 (12.2)a	147.5 (15.7)a
実施例21	1.74 (0.70)b	19.31 (4.32)a,b	82.67 (7.49)a	124.2 (9.2)a	181.4 (14.0)a,b
実施例22	1.83 (0.96)b	18.73 (9.50)a,b	81.73 (30.22)a	122.8 (39.3)a	184.4 (49.8)a,b
実施例23	2.09 (0.34)b	23.74 (5.89)a,b	81.73 (13.15)a	134.6 (19.2)a	204.4 (23.4)b
比較実施例11	7.38 (1.69)a	27.65 (0.85)a	85.82 (5.68)a	119.9 (11.0)a	154.5 (14.3)a,b

【０１０９】

概説

ガラス粉末の１、２、５、１０及び２０ｗｔ％のＣＨＸ－ＨＭＰナノ粒子による置換を伴うＧＩＣ標本を首尾よく作製し、未処理ＧＩＣ（０ｗｔ％置換）と比較した。ＣＨＸ－ＨＭＰナノ粒子の３０ｗｔ％置換を伴うものはもろく、且つ、取り扱いが難しかったので、破棄した。

【０１１０】

クロルヘキシジン放出

表面積に対して標準化した、７９１ｈ（３３日間）にわたるＣＨＸ放出は、図１６で見られる。ＣＨＸ放出は、試験の継続期間の間、持続し、且つ、最後の計測時点では明らかな安定期に入っていなかった。用量－応答は、ＣＨＸ－ＮＰのより高度な置換を有する標本がより大きいＣＨＸ放出を呈したが、相関は正比例していなかった。

【０１１１】

６つの標本群に関する１及び２４時間、並びに８、１５及び３３日間の累積ＣＨＸ放出、そして、統計的分析の結果を表１０に示す。結果は、それぞれの時点について、０ｗｔ％及び１ｗｔ％が互いに統計的に有意差がなかったこと、そして、１ｗｔ％及び２ｗｔ％が互いに統計的に有意差がなかったことは同じであったが、その他のすべての組み合わせで有意差があり、すべての計測時点においてナノ粒子置換の増大に関連するクロルヘキシジン放出の明らかな増大を示した。

【０１１２】

フッ化物放出

表面積に対して標準化した、７９１ｈ（３３日間）にわたるフッ化物放出は、図１７で見られる。ＧＩＣ標本のすべてが実験の継続期間を通じて持続してフッ化物を放出した。初期の放出速度が最も速く、これが実験期間を通して次第に遅くなった。

【０１１３】

６つの標本群に関する１及び２４ｈ時間、並びに８、１５及び３３日間の累積フッ素放出、そして、統計解析の結果を表１１に示す。１時間では、未処理ＧＩＣが置換フッ化物よりもかなり多くのフッ化物を放出したが、別の置換との間に統計的な有意差はなかった。それ以降の時間において、わずかしか違いがなく、且つ、フッ素放出は、すべてのＧＩＣ標本で非常に類似していたので、ナノ粒子置換の効用としての変化はなかった。

【０１１４】

引張り強度

６つの標本群に関する直径方向の引張り強度を表３に示す。ＡＮＯＶＡにより０．０５４のｐ値を得、１０及び２０ｗｔ％置換セメントに関して低い引張り強度に向かう数字上の傾向があったが、これらの値及び他のＧＩＣの値の間には、統計学的な有意差はなかったことを示す。

【０１１５】

形態及び構造

代表的なＧＩＣ標本の走査型電子顕微鏡写真を図１８に示す。

異なったナノ粒子置換によるＧＩＣ標本の外観はガラス充填剤粒子と周囲のマトリックスがはっきりと見え、区別がつかなかった。２０ｗｔ％ナノ粒子置換のみ、より小さい粒子又はナノ粒子凝集体の徴候を有する、わずかに異なった外観を呈した（図１８ｆ）。

【０１１６】

結論

市販のＧＩＣにＣＨＸ－ＨＭＰナノ粒子を加えることによって、用量依存性様式で長期間にわたりＣＨＸを放出する材料を作製することが可能であることが判明した。ＣＨＸは様々な細菌及び酵母に対して効果があるので、これがこれらの新しいナノ機能化歯科充填材料に抗微生物性及び抗齲蝕特性を与える。最大５ｗｔ％の置換は、セメントの引張り強度（表９）に有意な有害影響を有していないように見えた。より高度な置換は引張り強度の低下につながる可能性があるが、これは統計的に有意でなかった；２０ｗｔ％では、セメント構造内にいくつかの異なった形態を見ることができ（図１８）、ナノ粒子及びナノ粒子凝集体の存在を示した。これらのより高い置換は強度の低下につながる場合がある。なぜなら、それらはガラス充填剤粒子と同様の方法でポリ酸と相互作用すると思えないからである。ナノ機能化ＧＩＣは、未処理セメントと同じフッ化物放出プロフィールを示した。

【０１１７】

本明細書中に記載したＣＨＸ－ＨＭＰナノ粒子の使用は、すりつぶした（ground up）ＣＨＸ二酢酸塩やＣＨＸ二グルコン酸塩水溶液の使用などの他のアプローチと対照的に、ＣＨＸ放出がＧＩＣを用いるよりかなり長期間持続される利点を示す（図１６）。

本明細書中で見られた少なくとも３３日間の持続放出と比較して、粉末化したＣＨＸ二酢酸塩を補ったコンポジットレジンは、約７日後に安定期に入るＣＨＸ放出を示した（Dent Mater, vol. 28, pp. 573-583, 2012）。

【０１１８】

ＣＨＸ二酢酸塩粉末又はＣＨＸ二グルコン酸塩溶液を補ったＧＩＣが報告され（J Esthet Restor Dent, vol. 20, pp. 29-44; discussion 45, 2008）、これらはいくつかの口腔微生物の増殖を阻害した。これらのＧＩＣからのＣＨＸ放出は直接的に計測されなかった。ほとんどの標本では６０～９０日後には抗微生物性挙動を示さなかった。これらの既知のＧＩＣの有効性のピークは、すべてのＧＩＣ標本で最初の２４時間であり、ほとんどのＣＨＸがこの初期期間の間に放出されることを示している。本構想のＭＮＰを組み込んだＧＩＣで観察されたさらに延長されたＣＨＸ放出は、より持続した抗微生物効果につながる。

【０１１９】

実施例２５－ＣＨＸナノ粒子で機能化したＥＶＡサンプルにおける微生物学

ＥＶＡ標本を、水中のＣＨＸ－ＨＭＰ－５のコロイド懸濁液中に３０秒間浸漬し、続いて脱イオン水中に１０秒間浸漬するか（「低濃度」）又はその後脱イオン水中への浸漬を

せず（「高濃縮」）、機能化した。そして、これらのサンプルをＭＲＳＡ細菌の培養物に晒した。次に、それらを、１ｍＬの増殖培地中に浸漬し、そして、１８時間インキュベートした。放出実験によれば、今回、ＥＶＡ標本は１m^2材料あたり約６μＭを放出しなければならない。標本の表面積が０．０００１８２m^2なので、予想総放出は１ｍＬ中に１．１ｎＭのＣＨＸでなければならず、１．１μＭのＣＨＸの結果濃度をもたらす。

【０１２０】

約１．１μＭのＣＨＸ濃度をもたらすこれらの標本では、回収可能なＭＲＳＡがなかった。しかしながら、（ＣＨＸ－ＨＭＰ－５懸濁液と対照的に）２５μＭのＣＨＸ溶液を使用した同様の処置は、ＭＲＳＡに対して効果がなかった。これらの結果は、ナノ粒子がＭＲＳＡに対して有効であり、且つ、ナノ粒子自体が、放出したＣＨＸに起因する効果に加えて何らかの追加的な抗菌性効果を呈し得ることを示している。これは、材料の表面に最も近い、ＣＨＸの局在化した非常に高い濃度に起因するか；及び／又はナノ粒子が固有の抗微生物活性を有している。

【０１２１】

実施例２６－ＣＨＸナノ粒子によって機能化したチタニウムサンプルの微生物学

ＣＨＸ－ＨＭＰ－５で機能化したチタニウム標本もまた、ストレプトコッカス・ゴルドニイ細菌の培養物に晒した。サンプルを、２ｍＬの増殖培地に浸漬し、最大４８時間インキュベートした。放出実験によると、これは１m^2あたり約７μＭの放出しなければならない。標本の表面積が０．０００２４m^2なので、予想される放出は２ｍＬ中に１．７ｎＭのＣＨＸでなければならず、０．８μＭのＣＨＸの結果濃度をもたらす。

ナノ粒子で機能化されたチタニウム表面はサンプル中の細菌を排除した。

【０１２２】

Ｓ．ミュータンス（S. mutans）（Ｓ．ゴルドニイに類似したグラム陽性ストレプトコッカス細菌もまた齲歯に関係した）のためのＭＩＣが、約１．４ｍＭに相当する、すなわち今標本で作用するＣＨＸ濃度より４桁高い、質量で０．１２５％のＣＨＸ二グルコン酸塩と報告された。

これらの結果は、ナノ粒子自体がバルク溶液中への可溶性ＣＨＸの放出に加えて、何らかの固有の抗菌性作用を呈することを示唆している。

【０１２３】

実施例２７－ＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰの特性

ＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰの組成、化学量論性、サイズ、及び凝集特性に関する直接的な証明を本明細書中に提供する。

ＭＮＰ、具体的には、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５及びＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５組成物のＴＥＭ解析をおこなった（図２３）。ＣＨＸ－ＨＭＰ－５及びＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５ ＮＰを炭素コートした銅格子（Agar Scientific Ltd., Essex, UK）上に置き、ＴＥＭ及びＥＤＸ（Jeol 120 kV 1200 Mk2; Jeol, Tokyo, Japan）にかけた。ＴＥＭ格子を、２秒間ＮＰ懸濁液に浸漬し、２秒間脱イオン水ですすぎ、風乾させた。

【０１２４】

ＭＮＰは、幅広いサイズで凝集体を見つけることが多かった。図２３は左側にＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５のサンプル、そして、右側にＣＨＸ－ＨＭＰ－５のサンプルの実施例を示す。高濃度サンプルの画像は、個々のナノ粒子の良好な可視性を有する凝集体の周縁部でＭＮＰが見られることを示す（画像の右上部）。矢印は別々の、個々のナノ粒子の２つの例を示す。ＴＥＭは、ＭＮＰが一緒に融合することが多く、静電気的に固定されているだけではないことを示す（特に低濃度サンプルの画像を参照）。いくつかの非常に小さい凝集体もまた観察された。

【０１２５】

ＥＤＸをＴＥＭ格子上のＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰにおこなって、ＭＮＰの組成物を調査した。Ｃｌ（ＣＨＸから）及びＰ（ＨＭＰから）の両方をスペクトル中に観察し、ＭＮＰがＣＨＸとＨＭＰから構成されていることを確認した。Ｃｕ及びＡｕからのシグナルはＭＮＰを乗せたＴＥＭ格子に起因する。

【０１２６】
動的光散乱法（ＤＬＳ）及びゼータ電位測定（Zetasizer NanoZS; Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK）をおこなった（それぞれ図２４及び図２５）。ＣＨＸ－ＨＭＰ－５懸濁液はある程度の堆積した凝集体を含んでいたので、上清を分析する前に標本を沈殿させた。報告したそれぞれの数値は、図示した３つの測定の平均である；各計測を異なったナノ粒子懸濁液でおこなった。ＤＬＳを使用して計測した粒度は、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５及びＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５において異なっており、それぞれ２０２及び１４０ｎｍの平均値を得た。ＤＬＳによって得られた値は、ＴＥＭによって明らかになった値（ＴＥＭ解析は約４０～８０ｎｍの値を示唆した）よりわずかに大きく、それは、ＴＥＭによって観察された凝集の結果であろうと思われた（先に考察した）。このことは、粒子が高濃度懸濁液中でより大きい凝集体を一般的に形成するという観察によって支持される。ゼータ電位測定は、ＭＮＰの濃縮物が両方とも陰性荷電であることを明らかにした；ＣＨＸ－ＨＭＰ－５はＣＨＸ－ＨＭＰ－０．５より大きい正味電荷を有していた（それぞれ－５０．８及び－４２．２ｍＶ）。
ＣＨＸ－ＨＭＰ－５堆積物の元素分析は、ナノ粒子が３イオンのＣＨＸ対１イオンのＨＭＰの比で構成されることを示した。

【０１２７】
実施例２８～２９及び比較実施例１２～１３－複合材料：創傷包帯フィルム
天然多糖類ＣＭＣ（比較実施例１２）及びアルギン酸塩（比較実施例１３）の膜を作製した。同等なフィルムに、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５ナノ粒子を様々な用量で組み込んだ（実施例２８～２９）。これらのフィルムは新規抗微生物性創傷包帯における使用のために有望である。

【０１２８】
アルギン酸塩の５ｗｔ％水溶液を、乾燥アルギン酸塩（Protanal LF 10/60 FT, FMC Biopolymers）を、６ｗｔ％、３ｗｔ％又は０ｗｔ％に相当するクロルヘキシジンヘキサメタリン酸塩ナノ粒子の素早く撹拌した水性懸濁液に加えることによって調整した。これらの溶液をペトリディッシュ（９０Φ＝ｍｍ）に注ぎ入れ、室温で３日間水を蒸発させた。$CaCl_2$（３０ｍＬ、２ｗｔ％ａｑ．）をペトリディッシュに追加し、２５分間、架橋させた。架橋アルギン酸塩フィルムを、次に、ペトリディッシュから取り出し、蒸留水で洗浄し、パラフィルム上で風乾させた。

【０１２９】
カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）の５ｗｔ％水溶液を、乾燥ＣＭＣ（３タイプ：Ｍｗ＝９０，０００、２５０，０００、及び７００，０００であり、それぞれ無水グルコース単位あたり０．７、０．７、及び０．９個のＣＭ基を有する）を、６ｗｔ％、３ｗｔ％又は０ｗｔ％に相当するクロルヘキシジンヘキサメタリン酸塩ナノ粒子の素早く撹拌した水性懸濁液に加えることによって調整した。これらの溶液をペトリディッシュ（９０Φ＝ｍｍ）に注ぎ入れ、室温で４日間水を蒸発させた。１５ｍＬのエタノールは、各フィルムを覆うように加え、蒸発するまで室温で放置した。フィルムを取り出せるように１５ｍＬのエタノールから成る第二のカバーをペトリディッシュに加えた。それらを、それに続いてパラフィルム上に置いて風乾させた。

【０１３０】
フィルムの３．３２mm^2（アルギン酸塩）又は５．００mm^2（ＣＭＣ）の小片をセミマイクロキュベットに入れ、水（２．２ｍＬ）で覆い、そして、キュベットを蓋とパラフィルムで密封した。キュベットをオービタル振盪機（１５０ｒｐｍ）によって撹拌し、吸光度（２５５ｎｍ）を２４時間に１度計測し、標準プロトコールに従って、クロルヘキシジン二グルコン酸塩基準のものと比べた。ＣＨＸ－ＨＭＰ ＮＰがアルギン酸塩フィルム内の架橋プロセスを免れることを示し、１４９２cm^{-1}のピーク及びＣＨＸ－ＨＭＰスペクトルの２つのメインピークに相当する１５３０cm^{-1}の肩部の存在によってＦＴ－ＩＲで確認された。

【０１３１】

ＣＭＣが、水中への浸漬により素早く溶解し、崩壊し、そして、約１０分間の期間にわたってすべてのＣＨＸを放出することがわかった。ＣＨＸ放出は、数分以内に完了し、そしてそれは、より高いｗｔ％のＭＮＰ含有フィルムが放出を完了するためにより長い時間を示す用量依存性を有する（図２６）。

対照的に、アルギン酸塩は崩壊せず、７日間の期間にわたってＣＨＸを放出した（図２７）。ＣＨＸ放出は、５～７日間の期間にわたって続き、より多くのＭＮＰを組み込むほどより高いＣＨＸ放出で放出する用量依存性があった。これは、ＭＮＰの適切な用量を選択することによって放出を制御する可能性を提供する。

【０１３２】

実施例３０及び比較実施例１４－創傷包帯の抗微生物効果

実施例２８のアルギン酸塩ＭＮＰフィルムを抗微生物性アッセイで試験した。試験微生物は、創傷感染に非常に関連があると考えられる：ＭＲＳＡ、エシェリキア・コリ（Escherichia coli）、シュードモナス・エルギノーサ（Pseudomonas aeruginosa）、クレブシエラ・ニューモニエ（Klebsiella pneumoniae）、及びアセニトバクター・バウマニイ（Acenitobacter baumanii）。［アセニトバクター・バウマニイは、細胞膜中のイオン輸送チャンネルによってＣＨＸに対して耐性を有することが報告された最初の微生物である。それは、広範囲の病原菌でないが、特に軍隊の病院で見られる。］

フィルムはまた、銀ナノ粒子を含む市販の包帯の小片に対しても試験した（比較実施例１４）。

【０１３３】

表１２は、市販の銀ベースの包帯と比較した、５種類の創傷関連病原菌に関する実験的なＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰアルギン酸塩複合包帯の抑制域を示し、そして、ＭＲＳＡ、Ｅ．コリ、Ｐ．エルギノーサ、及びＫ．ニューモニエに関して、ＭＮＰ包帯が、市販の包帯より細菌増殖をより強く阻害することを示す。

銀包帯は、Ａ．バウマニイに関してＭＮＰ包帯より大きい抑制域を有するが、Ａ．バウマニイがＣＨＸに対して広く認められている耐性を有することを考えれば、ＮＰフィルムはこの微生物の増殖を阻害することを促すと思われる。

【０１３４】

【表１２】

表12

	MRSA	E.コリ (coli)	P.エルギノーサ (aeruginosa)	K.ニューモニエ (pneumoniae)	A.バウマニイ (baumanii)
0wt% MNP	0	0	0	0	0
3wt% MNP	21.0 (0.9)	18.4 (1.5)	13.5 (0.4)	15.6 (0.7)	13.0 (0.7)
6wt% MNP	22.6 (1.9)	19.9 (1.6)	14.2 (0.4)	16.5 (0.6)	14.9 (1.0)
Ag包帯	15.4 (0.5)	12.1 (0.7)	12.1 (0.7)	11.9 (0.7)	16.1 (2.4)

【０１３５】

実施例３１－複合材料：グラスアイオノマーセメント

ＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰを含むグラスアイオノマーセメントを製造した。ＭＮＰを封鎖し、そして、ＧＩＣ中への封入に好適なそれらをレンダリングする２つの方法を開発した：

（ｉ）ＭＮＰがコロイドから沈殿物を生じさせ、そして、操作者に上清をデカントさせ、濃厚な白色ペーストを残すために、遠心処理が使用される湿式法、及び
（ｉｉ）乾燥させ、続いてボールミルで粉砕して、白色粉末を得た。これらの方法の両方の生成物は様々な特性の計測のために市販のＧＩＣ中に組み入れられた。

【０１３６】

実施例３２－表面をコートした材料：ポリウレタンカテーテル
ポリウレタン基材及びカテーテルをＣＨＸ－ＨＭＰ－５ＭＮＰでコートした。
ＣＨＸの長期間（＞３カ月）放出を実証することが、この適用に望ましい。少なくとも８５日間のＣＨＸ放出があると実証した（図２８）。

【０１３７】

試薬濃度（５０ｍＭのＣＨＸ及びＨＭＰ）及びディップコーティングの型（１、５、１０回の浸漬の繰り返し）を変更することによって、コート密度を調査した。より長い浸漬時間がより多くの放出をもたらし、大抵の場合、５０ｍＭのＮＰ濃度が５ｍＭ超の濃度を放出することがわかった。より多くの浸漬がより高いコート密度をもたらす（図２９）。初期データは、場合によっては、ＣＨＸのより少ない放出がより密にコートした標本に関して観察されたことを示唆し、そしてそれは、いかなる理論にも縛られることを望むものではないが、より厚くコートした標本には孔が少ない可能性があり、そのため、環境に対して活性物質のより少ない表面積しか提示していないか、或いは、それはコーティングのはげに関係し得るが、これは直接的に観察されていない。
反復したディップコート及び／又はディップコーティングの時間を変更は、ＭＮＰ用量の制御を可能にする。

【０１３８】

実施例３３～３６及び比較実施例１５～２２－ポリウレタン含有標本に関する微生物阻害有効性
大規模な微生物学作業も終了した。表１３は、様々な表面処理を伴うポリウレタン標本に関して、細菌増殖培地中での２４時間のインキュベーション後の微生物の増殖を示す。凡例：－完全阻害；＋わずかな増殖（10^{-1}～10^{-3}の希釈のときに観察された増殖）；＋＋中程度の増殖（10^{-4}～10^{-6}の希釈のときに観察された増殖）；＋＋＋高い増殖（10^{-7}～10^{-12}の希釈のときに観察された増殖）。ＣＨＸ－ＨＭＰ－５０でコートしたポリウレタン標本は、ＭＲＳＡ、Ｅ．コリ、及びＰ．エルギノーサの増殖を示さず、水（比較実施例１５～１８）又は水溶液のＣＨＸ溶液（比較実施例１９～２２）で処理した対照と比較して、Ｋ．ニューモニエ（実施例３３～３６）の増殖の低下を示した。

【０１３９】

【表１３】

表13

	MRSA	E.コリ (coli)	P.エルギノーサ (aeruginosa)	K.ニューモニエ (pneumoniae)
対照	++	++	+++	+++
CHX-HMP-50 コートPU	-	-	-	++
80μM CHX	++	++	++	++

【０１４０】

実施例３７～４４及び比較実施例２３～２６－生－死染色
生－死染色もまた、先の実施例３３～３６に挙げた微生物を使用しておこなった。最初に、ポリウレタン小片を、
３０秒間ディップコーティングし、そして１０秒間すすぐことによってＮＰ（ＣＨＸ－ＨＭＰ－５及びＣＨＸ－ＨＭＰ－５０）でコートし、次に関連細菌懸濁液に２４時間浸漬し

た。ＳＹＴＯ９及びヨウ化プロピジウム生／死染色を染色に使用した。

【０１４１】

図３０のより明るい領域は、微生物増殖の領域を示す。それで、高レベルの微生物の増殖が未処理対照（比較実施例２３～２６、図３０の一番左の列）で見られる。これらの画像は、微生物増殖（図３０の真ん中及び右側の列）に対するＭＮＰの効果を示し、そして、微生物増殖がいずれの濃度においてもＭＮＰの存在によって根本的に低減されることを示す（実施例３７～４４）。ＭＮＰ自体がある程度の蛍光色素を溶かし、そしてそれが、ＣＨＸ－ＨＭＰ－５０画像において明るい領域に見える可能性がある（実施例４１～４４）ことに注意する。

【０１４２】

実施例４５～５０及び比較実施例２７～３２－表面をコートした材料：医療用シリコーン

シリコーンを、全身のプロテーゼ及び他の生体材料デバイスとして使用する。この実施例の特定の注目点は、口腔、口蓋栓塞子の構築（外科手術又は発生異常のため口蓋内の欠陥を修正するために使用されるデバイス）及び義歯に使用されるシリコーンである。

【０１４３】

これらのシリコーンは、病原菌及び酵母、特にカンジダ・アルビカンスによって容易にコロニー形成されるようになる。医療用シリコーンへのＣＨＸ－Ｘ ＭＮＰの接着を調査した。これらのデバイスに対する微生物負荷は特に高く、このため、ＣＨＸのより高い用量が必要とされ得る。それで、ＣＨＸ－ＨＭＰ以外の配合物を開発した。

３種類の配合物（ＣＨＸ－ＨＭＰ－５、ＣＨＸ－ＴＭＰ－５、及びＣＨＸ－ＴＰ－５）からのＣＨＸ放出を、１分間～６時間の様々な時間について、経口シリコーンのディップコーティング後に調査した。本体（Ｂ）及び密封材（Ｓ）は、供給された２種類の異種シリコーンを表す。あらゆる飽和が説明できるように、溶出媒質は８週間で新しくした。

【０１４４】

具体的には、義歯の柔軟な裏打ち材及び栓塞子構築中に使用される「本体」及び「密封材（sealant）」シリコーンの標本（Mucopren Soft; Kettenbach, Eschenburg, Germany）を５×８×２．５ｍｍを区画するシリコーン鋳型を使用して作製した。ワセリンを使用して鋳型をグリースアップし、シリコーンをその鋳型に詰め込み、そして、室温で１５分間硬化させた。次に、標本を鋳型から取り出し、７０％のエタノール中で１０分間超音波処理し、１５分間風乾し、そして、密閉容器内に乾燥状態で保存した。

【０１４５】

３種類の配合物（ＣＨＸ－ＨＭＰ－５、ＣＨＸ－ＴＭＰ－５、及びＣＨＸ－ＴＰ－５）からのＣＨＸ放出を、１分間～６時間の様々な時間について、経口シリコーンのディップコーティング後に調査した。

標本を、割り当てられた時間の間、撹拌したＮＰ懸濁液（ＴＭＰを除く、ＴＭＰは撹拌できない粘度の高い、粘着性の物質を形成する）に浸漬し、脱イオン水中で１０秒間すすぎ、そして、風乾した。ｎ＝１０標本から成る更なる群を、２５μＭのクロルヘキシジン二グルコン酸塩溶液（ナノ粒子形成後の水溶液中のクロルヘキシジンの残留濃度）に６時間浸漬して、正の対照を提供した。これをＣＨＸ－Ｃと表した。

【０１４６】

図３１に示すように、ＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰコートした標本は、実験期間を通じてＣＨＸのゆるやかな放出を呈した。放出速度は時間と共に低下したが、人工唾液を置換すると、速度は再び上昇し、人工唾液が新しくする前では、ＣＨＸ塩に関する人工唾液の飽和度がＣＨＸ放出を妨げていたことが示唆された。以下で考察した他の２種類の塩とは対照的に、ＣＨＸの放出を持続させた。ＣＨＸ－ＨＭＰコートした標本からのＣＨＸの放出はコーティング時間によって変化し、コーティング時間が長いほど観察されるＣＨＸが増大する（しかし、相関は直線的でなかった）。より多くのＣＨＸ放出を、密封材シリコーンより本体シリコーンから観察した。

【０１４７】

図３２に示すように、ＣＨＸ－ＴＰ ＭＮＰコートした標本は、ＣＨＸ放出の大部分又はすべてが最初の２４時間以内に観察される、ＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰとはかなり異なったＣＨＸ放出プロフィールを呈した。わずかな追加的なＣＨＸ放出が人工唾液交換後に観察されたが、人工唾液が導入された後の最初の２４時間以内に、このわずかな放出も同様に完了した。従って、ＭＮＰのこの配合物は、ＣＨＸ－ＨＭＰに比べて約３倍のＣＨＸ放出がある高い放出を示したが、この放出は短期間であった。ＣＨＸ－ＴＰコートした標本からのＣＨＸ放出はコーティング時間により変化し、コーティング時間が長いほどＣＨＸが増大した（しかし、この場合も相関は直線的でなかった）。ＣＨＸの放出は本体及び密封材シリコーンからで類似していた。

【０１４８】

図３３に示すように、ＣＨＸ－ＴＭＰ ＭＮＰコートした標本は、ＣＨＸ－ＴＰ ＭＮＰコートした標本のように、開始時及び人工唾液を新しくした後の両方で、人工唾液にさらした最初の２４時間以内に大部分又はすべてのＣＨＸ放出を呈した。コーティング時間がＣＨＸ放出に影響するが、他の塩とは異なった様式である：最大のＣＨＸ放出は３０分間コートした標本で観察されたが、２時間及び６時間コートした標本は、中程度のＣＨＸ放出しか示さず、１分間コートした標本で最少のＣＨＸ放出があった。本体シリコーンに比べて、密封材シリコーンからより多くのＣＨＸ放出を観察した。

【０１４９】

異なったアニオン（ＨＭＰ、ＴＭＰ、ＴＰ）及び浸漬時間を選択することによってＣＨＸ放出の用量及び持続期間を制御するための範囲があるように思えたことは注目に値する。ＭＮＰでシリコーンをコートすることがそれらの水の吸い上げを大きく増強しなかったことにも注目した；水の吸い上げは、これらのシリコーンの性能に有害なので、抗微生物特性をそれらに与える他の試みの副作用として観察した。これは、本発明のＭＮＰによって実証された更なる利点である。

【０１５０】

ＭＮＰの抗真菌性を調査した。初期実験は、ＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰとの播種後のＣ．アルビカンスの用量－依存性の増殖阻害を一貫して示し、真菌増殖が１時間で低下し、そして、４時間で増殖がなくなった。

【０１５１】

実施例５１及び比較実施例３３－表面をコートした材料：チタニウム製インプラント

チタニウムをコートするためにＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰを使用して、インプラントの抗真菌性コーティングを開発した。

ＣＨＸ－ＨＭＰ－５ ＭＮＰ－コートしたチタニウム基板（ＣＨＸ－ＨＭＰ－５懸濁液中に３０秒間浸漬し、脱イオン水で１０秒間すすぎ、次に、乾燥させることによって製造した）は、ストレプトコッカス・ゴルドニイ（Streptococcus gordonii）及びポリフィロモナス・ジンジバリス（Porphyromonas gingivalis）の増殖を阻害することを示した。さらに、チタニウム基板を、口内にあるあらゆる物質をコートするタンパク様フィルムである唾液の薄膜でコートしたときにも、抗真菌作用は妨げられない。ＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰを伴う（実施例５１）及び伴わない（比較実施例３３）チタニウム表面上のＳ．ゴルドニイに関する代表的なコロニー形成単位のデータを図３４に示す。

【０１５２】

実施例５２～５４及び比較実施例３４～３６－オーラルケア製品及び局所トリートメント

水溶液のＣＨＸは歯医者が既に使用している。それは、プラーク及び歯周病／歯茎の炎症をコントロールするのに好適な２．２ｍＭの経口リンスとしてスーパーマーケットや薬局で入手可能である。それはまた、さらに進行した歯周病、口腔手術中、歯内治療中などの多くの用途における局所抗微生物剤としても使用される。

【０１５３】

この実施例は、水溶液でというよりむしろＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰとしてＣＨＸを送達することで、ＣＨＸの放出が変化することを示す。

ヒドロキシアパタイトディスク（１群あたりｎ＝６）を歯組織の代替物として使用した。３種類のＣＨＸ二グルコン酸塩水溶液、１、２．２、及び５ｍＭ（それぞれ比較実施例３４～３６）を調製した。３種類のＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰ懸濁液を、相応の総濃度を用いて、従って１、２．２、５ｍＭのＣＨＸ及びＨＭＰ（それぞれ実施例５２～５４）を用いて調製した。ヒドロキシアパタイトディスクを調製物中に１５秒間浸漬し、すすぎ、そして、ＣＨＸ放出を時間の関数として観察した（図３５）。

【０１５４】

水溶液に比べて、より持続し、且つ、全体的に見てより多くのＣＨＸ放出を、ＭＮＰ懸濁液で処理したディスクから観察した。ＣＨＸ－ＨＭＰ ＭＮＰ処理したディスクは、より持続した、より大量のＣＨＸ放出を示し、溶液の状態で送達されるときよりもＭＮＰの形態のときの方がより多くのＣＨＸが保持されたことを示した。このことは、店頭販売のオーラルケア製品、及び／又は非常に長く持続する抗微生物性口腔環境をもたらすための専門家向けの局所治療薬の開発に可能性を与えた。

【０１５５】

実施例５５及び比較実施例３７－抗微生物性塗布剤

抗微生物性塗布剤での使用のための好適なペーストとしてＭＮＰを封鎖する方法を実施し、エマルジョン塗布剤の状態の２５質量％のＭＮＰペーストを用いてプロトタイプを作製し、市場のトップにある抗微生物性塗布剤（Ｄｕｌｕｘ Sterishield）と比較した。

【０１５６】

２００ｍＬの１０ｍＭ ＣＨＸ二グルコン酸塩を２００ｍＬの１０ｍＭＨＭＰナトリウムと室温で混合し、そして、激しく混合している間、圧力をかけることによって４００ｍＬのＣＨＸ－ＨＭＰ－５を調製することによって、ＮＰペーストを作製した。約５０ｍＬの１Ｍ ＫＣｌは加え、次に、撹拌はやめた。得られた混合物を沈殿させ、そして、上部～３００ｍＬの透明な上清を捨てた。残った液体をベンチトップ遠心分離機により５０００ｒｐｍで２０分間遠心分離し、それが上清と、塗布剤と歯磨き粉とで一致している粘着性の白いペーストの分離をもたらした。再び上清を捨て、ペーストをチューブから取り出して、使用した。

【０１５７】

実験の塗布剤は実用的であり（実施例５５、図３６、右側の画像）、（目視により）外見上正常に乾燥し、そして、未処理塗布剤と類似した表面の仕上がりだった（比較実施例３７、図３６、左側の画像）。

【０１５８】

実施例５６～５７及び比較実施例３８～４１－抗微生物性塗布剤の微生物阻害効果

ＭＲＳＡ及びＥ．コリの増殖を、細菌培養物中での２４時間のインキュベーション後、陰性対照（未処理の乳濁液、比較実施例３８～３９）、実験用（ＮＰ添加）及び陽性対照（Sterishield、比較実施例４０～４１）塗布剤に対して調査した。ガラス製カバーガラスを塗布剤の単回コートで両面コートし、そして、乾燥させた。

【０１５９】

ＭＲＳＡに関しては、SterishieldはＭＲＳＡ増殖の１０分の１の低減に作用したが、ＭＮＰ塗布剤は同じように１０００分の１の低減を生じさせた（図３７）。

Ｅ．コリに関しては、Sterishieldは細菌増殖に対して効果がなかったが、ＭＮＰ塗布剤は回収できる細菌がないほどＥ．コリの増殖を排除した（図３７）。

【図１】

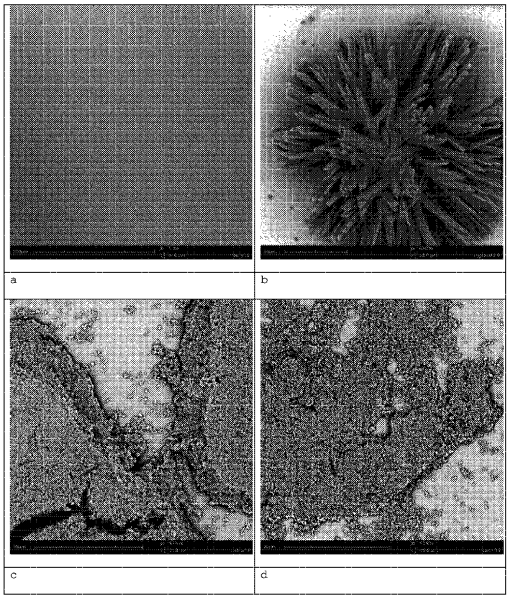


FIG. 1

【図２】

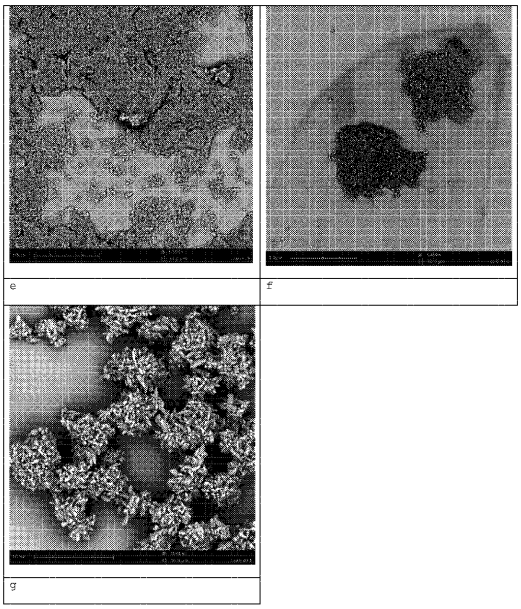


FIG. 2

【図３】

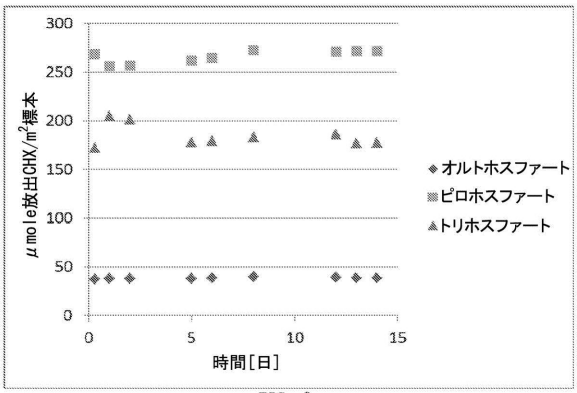


FIG. 3

【図４】

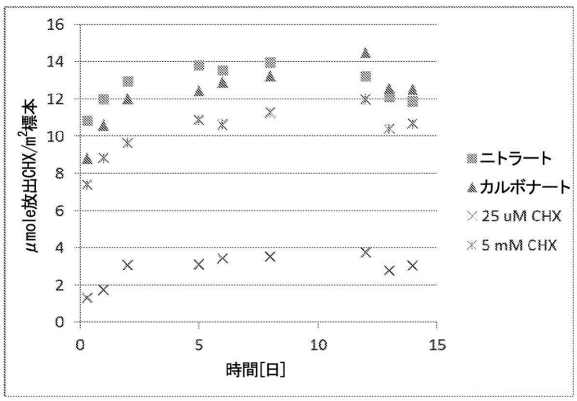


FIG. 4

【図５】

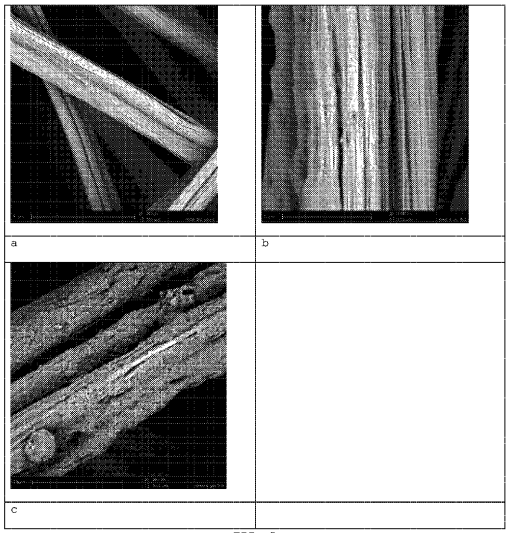


FIG. 5

【図６】

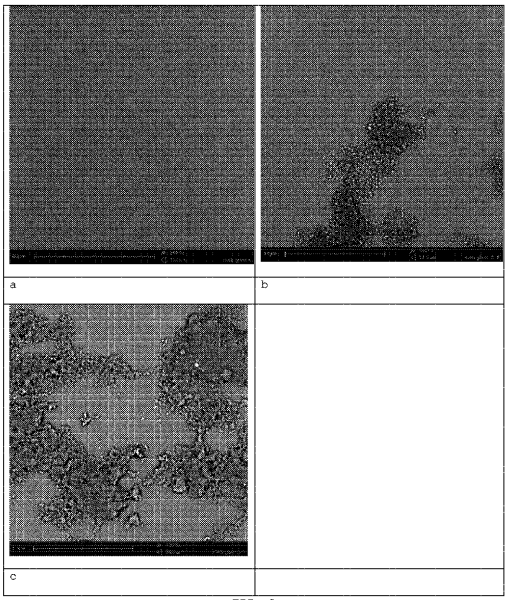


FIG. 6

【図７】

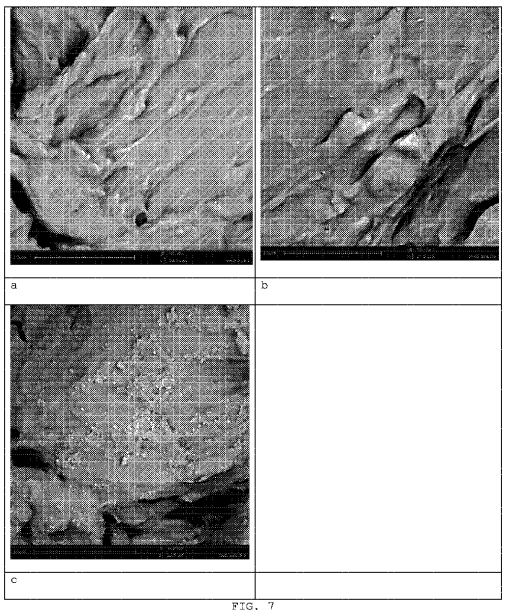


FIG. 7

【図８】

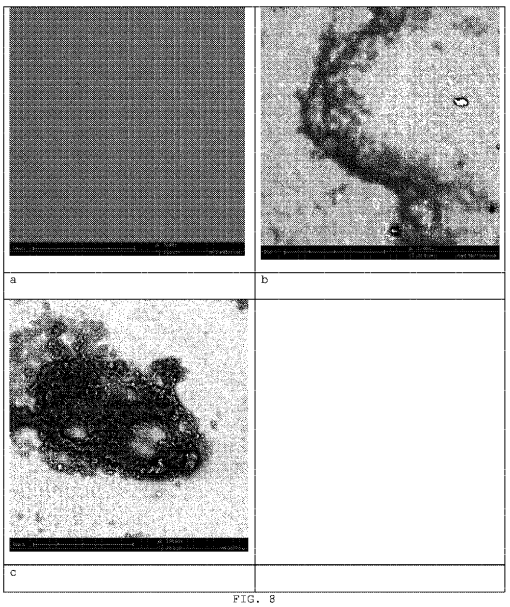


FIG. 8

【図９】

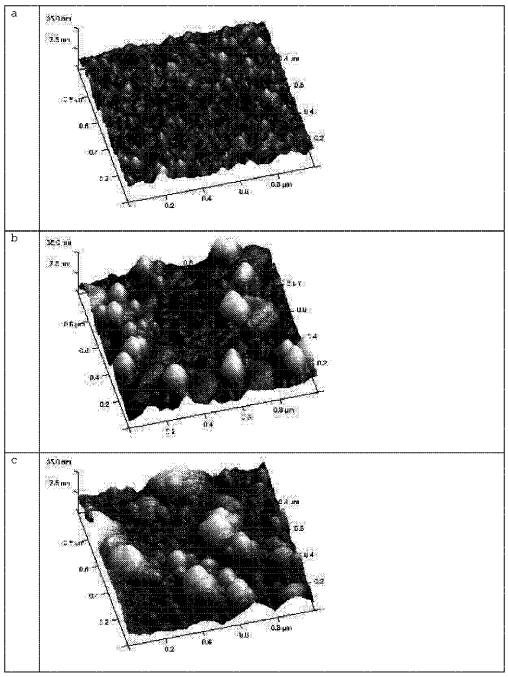


FIG. 9

【図１０】

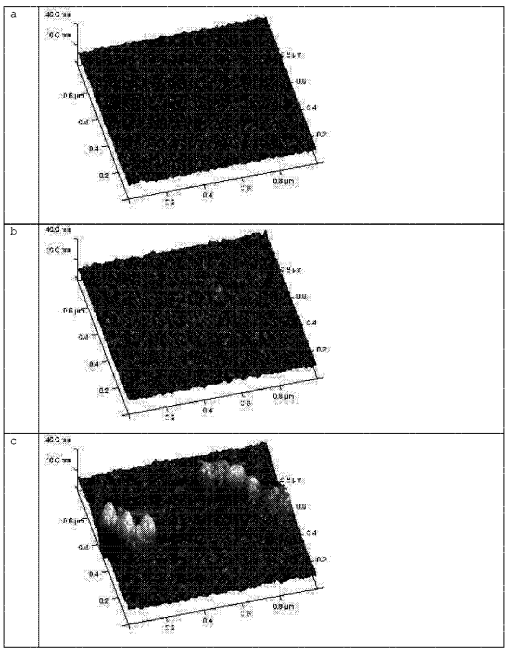


FIG. 10

【図１１】

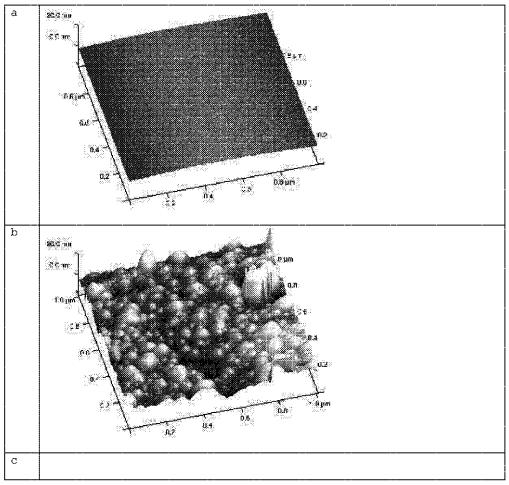


FIG. 11

【図１２】

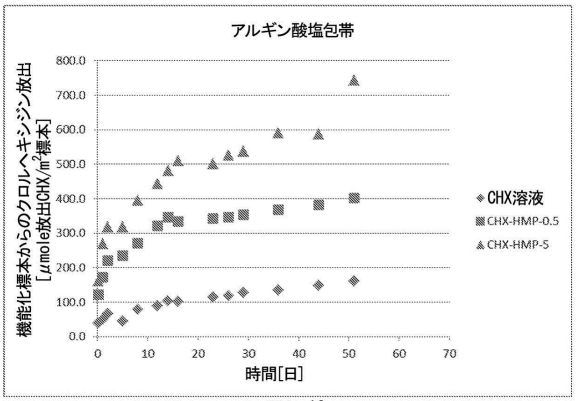


FIG. 12

【図１３】

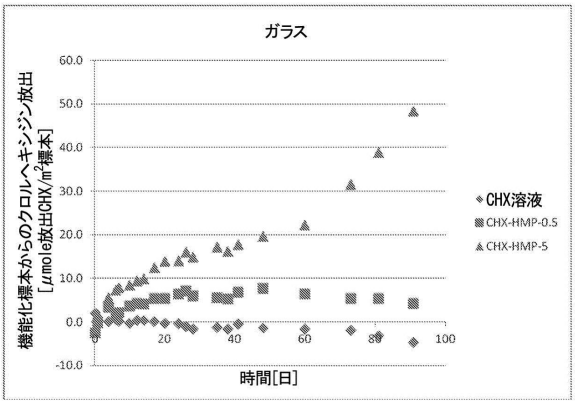


FIG. 13

【図１４】

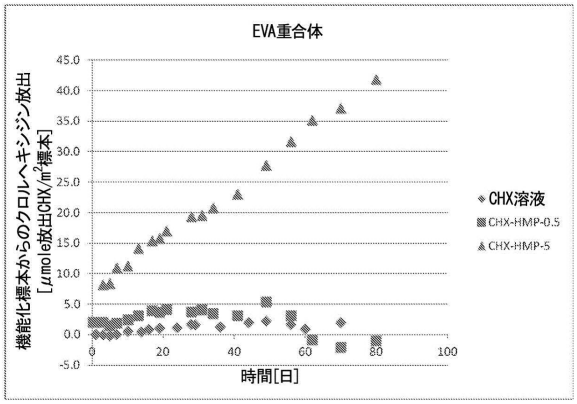


FIG. 14

【図１５】

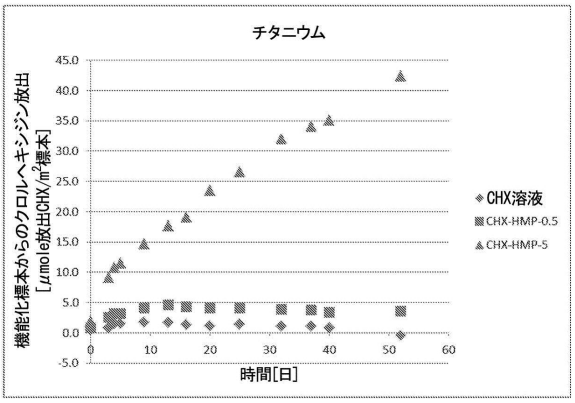


FIG. 15

【図１６】

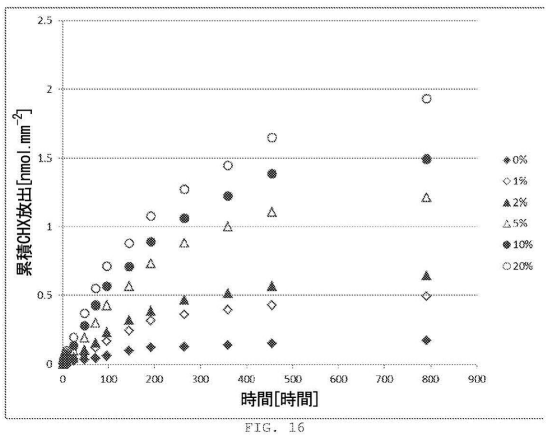


FIG. 16

【図１７】

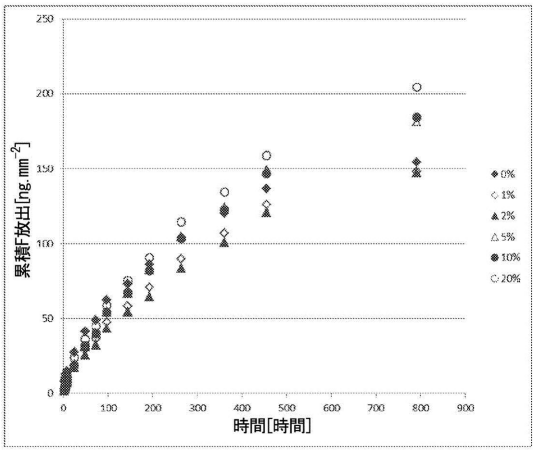
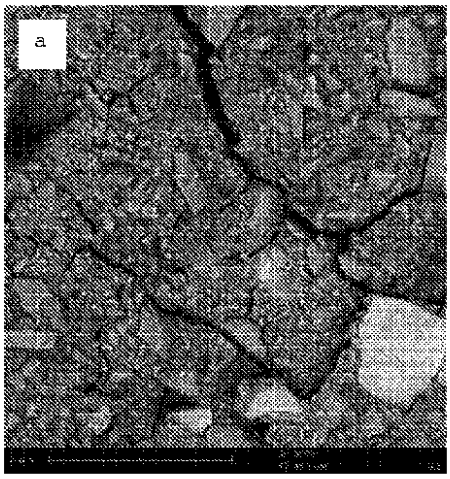
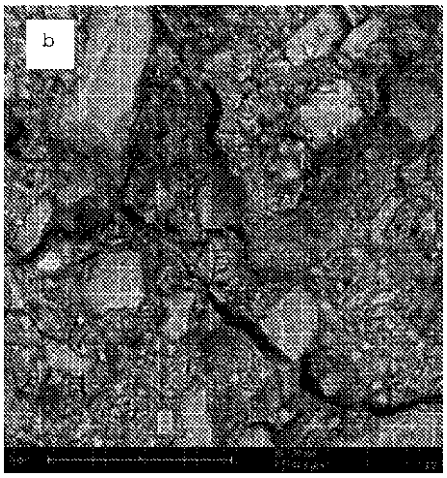


FIG. 17

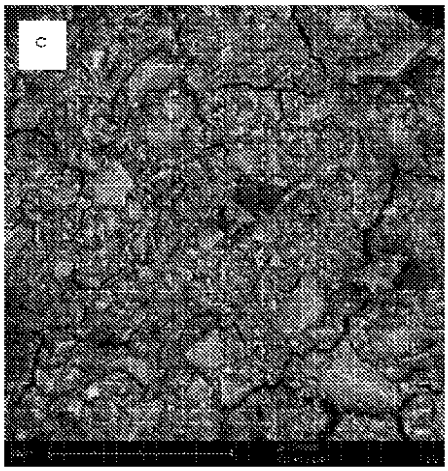
【図１８ａ】



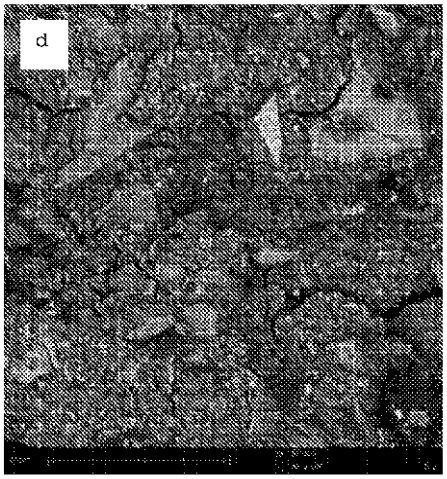
【図１８ｂ】



【図１８ｃ】



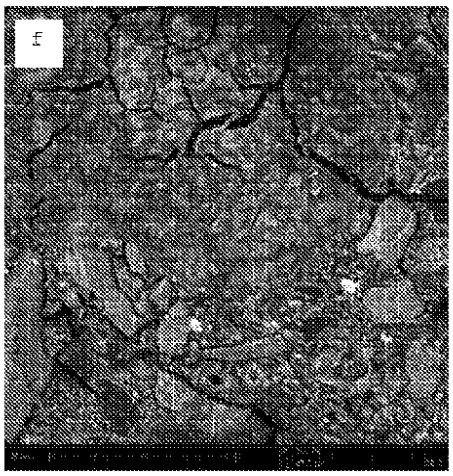
【図１８ｄ】



【図１８ｅ】



【図１８ｆ】



【図１９】

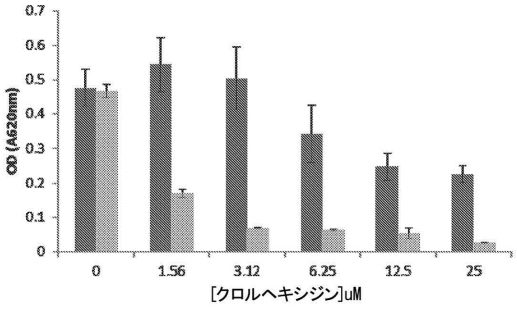


FIG. 19

【図２０】

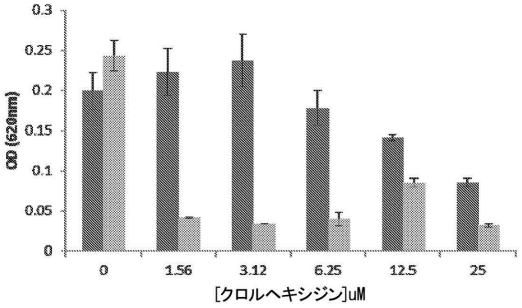


FIG. 20

【図２１】

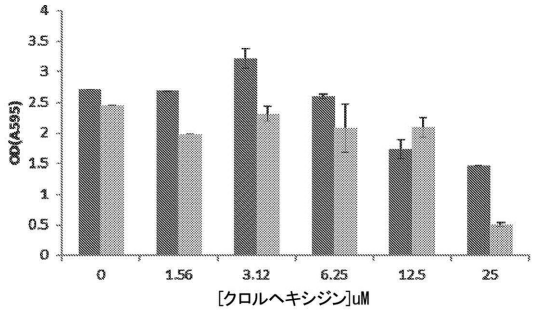


FIG. 21

【図２２】

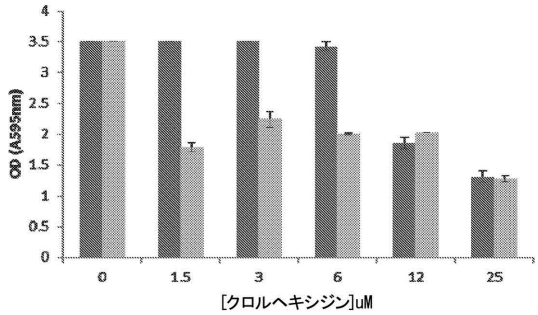


FIG. 22

【図２３】

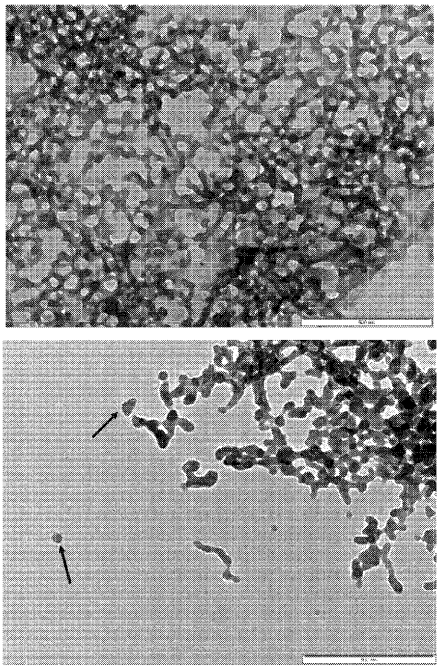


FIG. 23

【図２４】

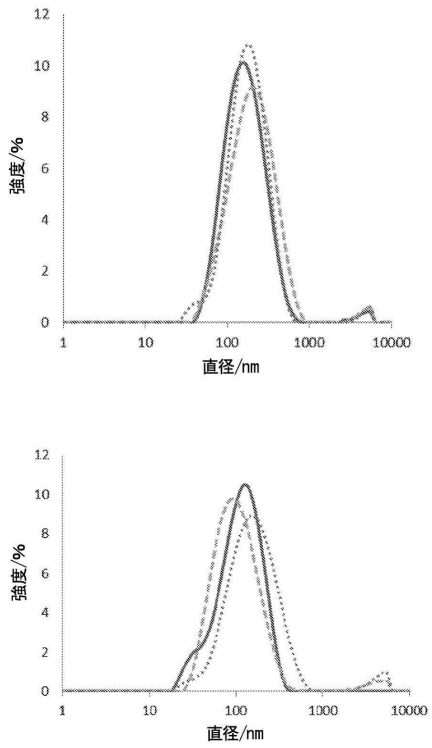


FIG. 24

【図２５】

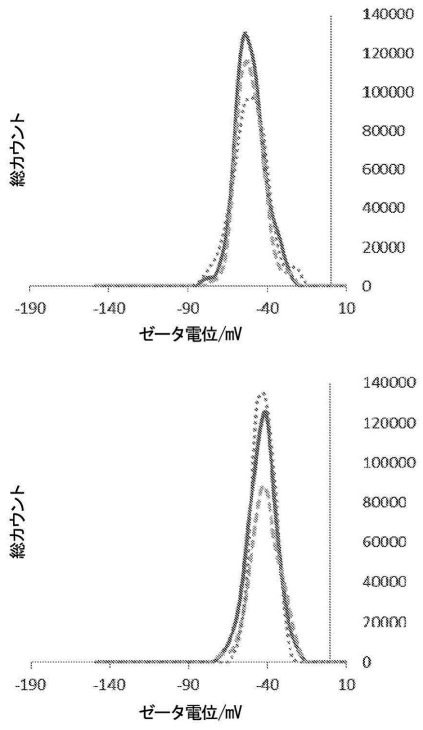


FIG. 25

【図２６】

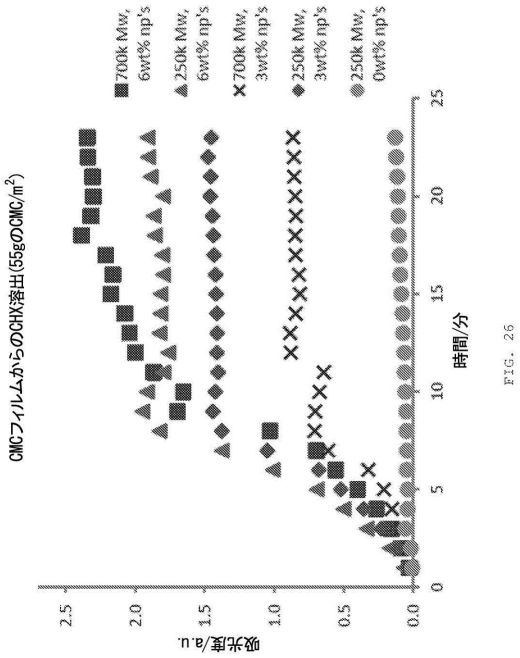


FIG. 26

【図２７】

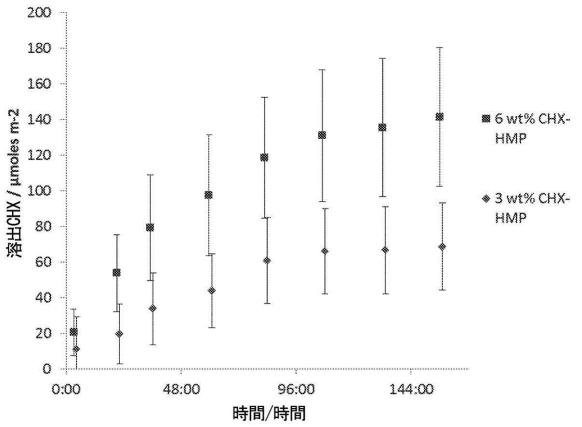


FIG. 27

【図２８】

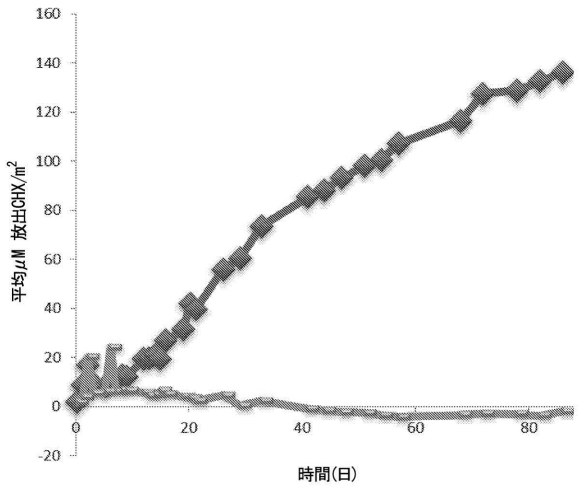


FIG. 28

【図２９】

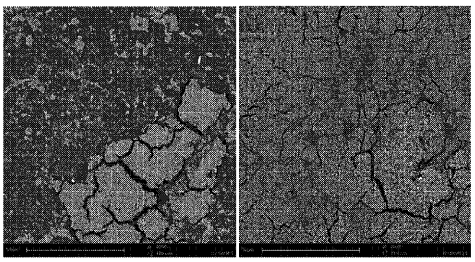


FIG. 29

【図３０】

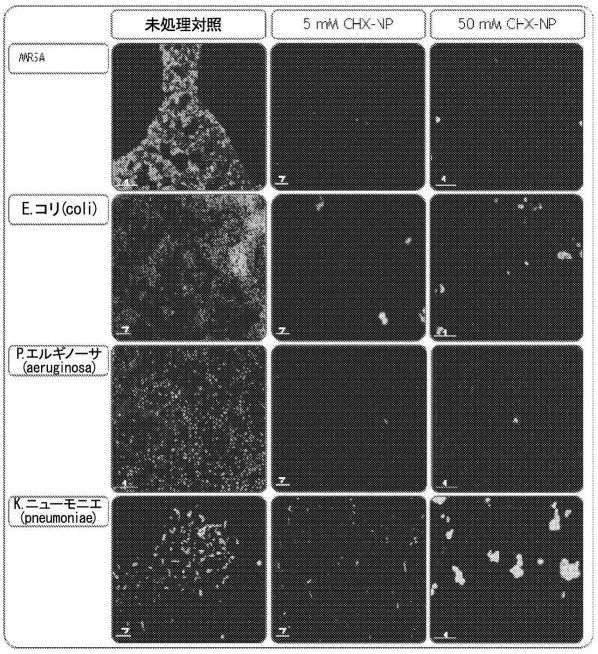


FIG. 30

【図３１】

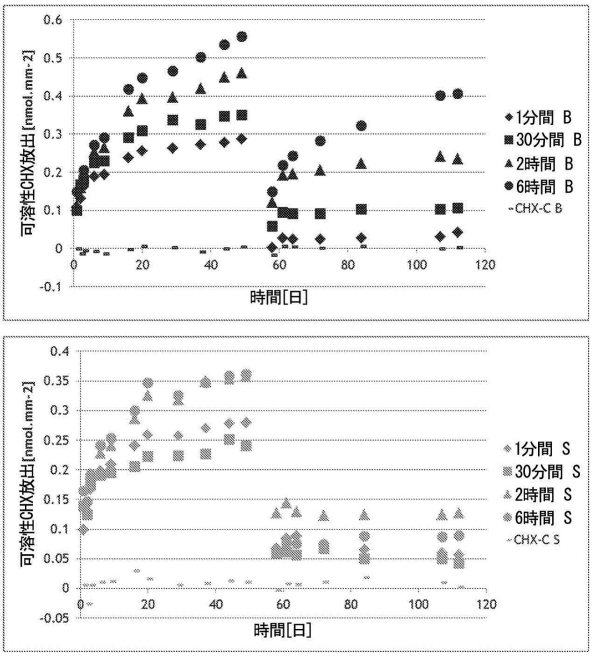


FIG. 31

【図３２】

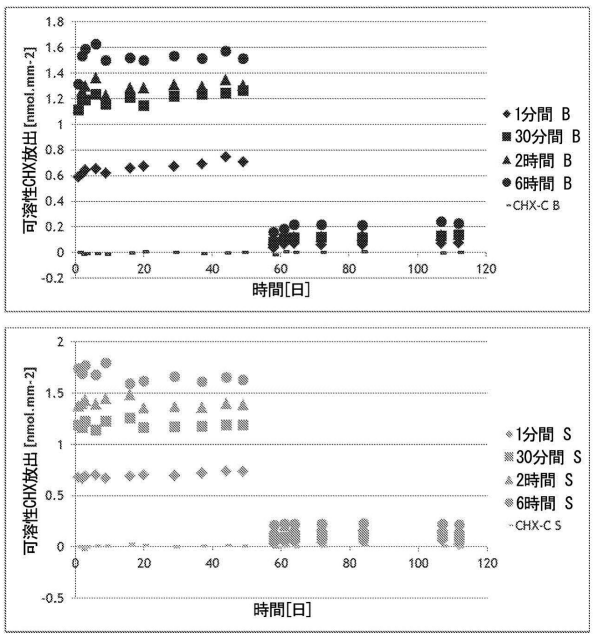


FIG. 32

【図３３】

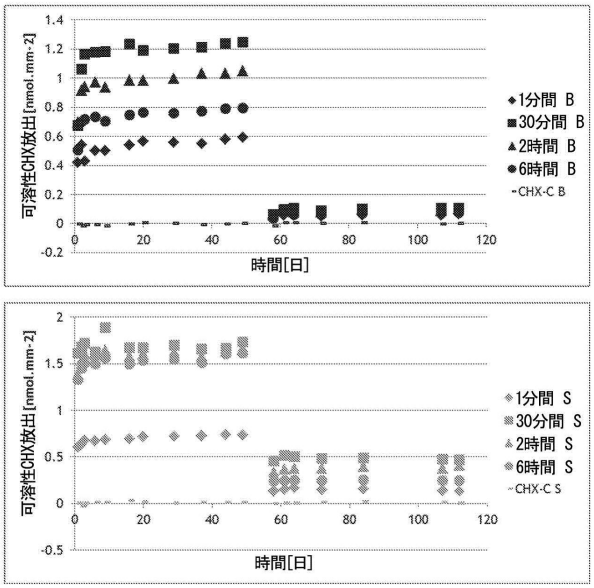


FIG. 33

【図３４】

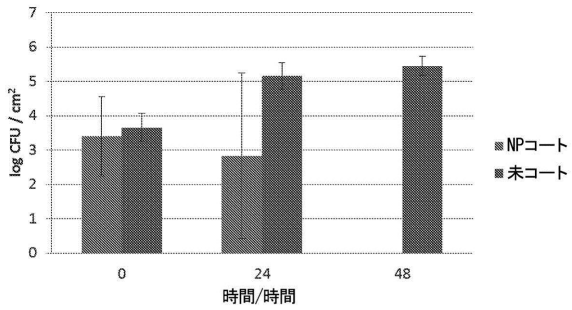


FIG. 34

【図３５】

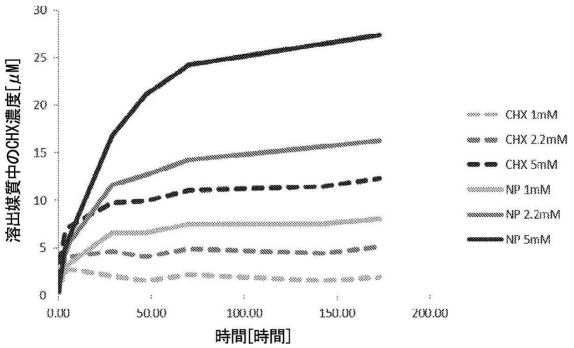


FIG. 35

【図３６】

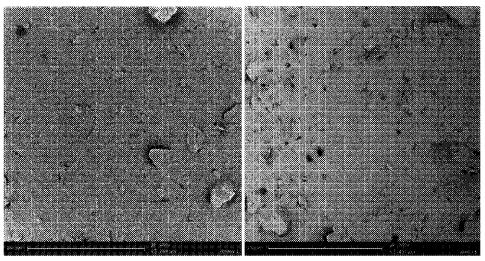


FIG. 36

【図３７】

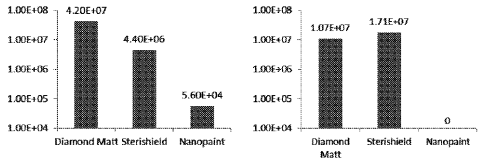


FIG. 37

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
A61K	*8/24*	*(2006.01)*	A61K	8/24	
A61K	*8/19*	*(2006.01)*	A61K	8/19	
A61K	*8/43*	*(2006.01)*	A61K	8/43	
A61Q	*11/00*	*(2006.01)*	A61Q	11/00	
A61L	*15/00*	*(2006.01)*	A61L	15/00	
A01N	*25/04*	*(2006.01)*	A01N	25/04	102
A01N	*47/44*	*(2006.01)*	A01N	47/44	
A01P	*1/00*	*(2006.01)*	A01P	1/00	
A01P	*3/00*	*(2006.01)*	A01P	3/00	
A61M	*25/00*	*(2006.01)*	A61M	25/00	
A61C	*13/00*	*(2006.01)*	A61C	13/00	C
A61C	*13/08*	*(2006.01)*	A61C	13/08	

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74)代理人 100173107
弁理士 胡田 尚則
(72)発明者 ミッシェル エミリー レドモンド
イギリス国, グロスターシャー ジーエル１２ ８アールワイ, ワットン アンダー エッジ, キングスウッド, ティンデル ビュー １１

審査官 鈴木 雅雄

(56)参考文献 国際公開第２０１２／１１９１５５（WO, A1）
特開昭５９－２２７８２４（JP, A）
特開２０１２－２０６９６７（JP, A）
特表２０１０－５１６７１９（JP, A）
特開２００３－０８９６０６（JP, A）
HATCH, G. B. et al., SURFACE-ACTIVE PROPERTIES OF HEXAMETAPHOSPHATE, Industrial & Engineering Chemistry, １９３９年, 31(1), pp 51-58

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A01N 25／12
A01N 25／04
A01N 47／44
A01P 1／00
A01P 3／00
A61C 13／00
A61C 13／08
A61K 6／02
A61K 6／027
A61K 6／06
A61K 8／19
A61K 8／24
A61K 8／43
A61L 15／00
A61L 29／00

A61M 25/00
A61Q 11/00
CAplus/REGISTRY(STN)