



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94192612.5

[51]Int.Cl⁶

A61K 7/26

[43]公开日 1996年7月10日

[22]申请日 94.6.24

[30]优先权

[32]93.6.28 [33]JP[31]181970 / 93

[32]93.12.24[33]JP[31]348108 / 93

[86]国际申请 PCT / JP94 / 01019 94.6.24

[87]国际公布 WO95 / 00110 日 95.1.5

[85]进入国家阶段日期 95.12.28

[71]申请人 狮子株式会社

地址 日本东京都

[72]发明人 西田安邦 森嶋米多里 太田麻衣美

五味哲夫 原田庆宏

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 段承恩

权利要求书 1 页 说明书 28 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 口腔用组合物

[57]摘要

本发明涉及口腔用组合物，该口腔用组合物有良好的使用感。口腔用组合物中的抗体稳定性好，即使长时间保存，抗体也能发挥满意的效果。所说抗体选自血中抗体、卵中抗体和乳汁中抗体。把重量比是 1 : 9-8 : 2 的香料成分和 1-薄荷醇调合在口腔用组合物中，香料成分选自香芹酮、茴香脑、桉树脑、水杨酸甲酯、丁子香酚、丁酸乙酯和肉桂醛。

权 利 要 求 书

1. 口腔用组合物,其特征是在含有抗体的口腔用组合物中,配合加入重量比1:9—8:2的香料成分和1-薄荷醇,抗体选自血中抗体、卵中抗体和乳汁中抗体,香料成分选自香芹酮、茴香脑、桉树脑、水杨酸甲酯、丁子香酚、丁酸乙酯和肉桂醛。

2. 如权利要求1所述的口腔用组合物,其中所说的抗体是虫牙病病原菌的抗体。

3. 如权利要求2所示的口腔用组合物,其中所说的虫牙病病原菌是 *streptococcus mutans*。

4. 如权利要求1所述的口腔用组合物,其中所说的抗体是牙周病病原菌抗体。

5. 如权利要求4所述的口腔用组合物,其中所说的牙周病病原菌是 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*、*porphyromonas gingivalis*、*Actinomyces viscosus*、*prevotella intermedia*、*Fusobacterium nucleatum*、*capnocytophaga* 种、*campylobacter rectus*、*Bacteroides forsythus* 以及 *Treponema denticola* 等螺旋体。

说 明 书

口 腔 用 组 合 物

本发明涉及一种口腔用组合物。该口腔用组合物中含有对虫牙和牙周病具有预防和治疗效果的抗体。更详细地是指本发明涉及这样一种口腔用组合物，该口腔用组合物具有良好的使用感并且即使长时间保存，上述抗体也能发挥满意的效果。

以前进行的研究是一种把抗体配合在牙膏等口腔用组合物中，所说抗体是预防虫牙的有效成分，它特异地作用于链球菌属的 mutants 菌，阻止这些菌体附着在牙面上，并能阻止牙垢形成。

以前进行的研究是把一种抗体配合在牙膏等口腔用组合物中，所说抗体是预防牙周病的有效成分，它特异地作用于牙周病病原菌，抑制这些牙周病病原菌固定在口腔内。

但是，上述抗体在口腔用组合物中的阴离子活性剂等影响下容易失活。因为这个原因，人们一直进行着种种抗体稳定化调合技术的研究。

口腔用组合物是一种口腔内使用的组合物，因此必须具有良好的口感。因此，为了提高使用感，适应消费者的爱好，必须把各种香料成分配合在口腔用组合物中，但大多数香料成分都带来对抗体稳定性不好的影响。

所以，我们希望开发一种抗体稳定性和使用感都好的口腔用组合物。

本发明的目的是提供一种口腔用组合物，该口腔用组合物中含有抗体，并且有良好的使用感，这种抗体稳定性好，即使长时间保存，仍能发挥满意的效果。

为了达到上述目的，本发明人进行了深入的研究，结果发现，如果在含有从血中抗体、卵中抗体及乳汁中的抗体中选择的抗体的口腔用组合物中按照 1:9—8:2 的重量比合并使用选自香芹酮、茴香脑、桉树脑、水杨酸甲酯、丁子香酚、丁酸乙酯和肉桂醛中的香料成分和 1-薄荷醇，即可制得一种出乎意料地能使上述抗体保持稳定，即使在经过长期保存后仍能保留其抗体活性，除了能充分发挥这种效果外还具有优良使用感的口腔组合物，由于这一发现，至此便完成了本发明。

从而，本发明提供了一种口腔用组合物，其特征在于，在含有从血中抗体、卵中抗体及乳汁中抗体选择的抗体的口腔组合物中按照 1:9—8:2 的重量比配合使用选自香芹酮、茴香脑、桉树脑、水杨酸甲酯、丁子香酚、丁酸乙酯和肉桂醛中的香料成分和 1-薄荷醇。

本发明的口腔用组合物可以配制成牙膏、润湿性牙膏、牙粉、液状牙膏等牙膏类；口腔清洗液等液态口腔清凉剂；片剂等固体口腔清凉剂；口香糖等形式使用。口腔用组合物中含有作为有效成分的抗体，它选自血中抗体、卵中抗体和乳汁中抗体。口腔用组合物中含有抗体的同时还含有重量比 1:9—8:2 比率的香料成分和 1-薄荷醇，香料成分选自香芹酮、茴香脑、桉树脑、水杨酸甲酯、丁子香酚、丁酸乙酯和肉桂醛。

上述抗体可以使用各种抗原的抗体。如：可以使用虫牙病病原菌的各种抗原的抗体。作为虫牙病病原菌可以使用链球菌属的 *mutans* 菌等的抗体。

上述抗体也可以使用牙周病病原菌各种抗原的抗体。这里所说的牙周病病原菌，从它的因果关系来考虑可以使用 例如 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*、*porphyromonas gingivalis*、*Actinomyces viscosus*、*prevotella intermedia*、*Fusobacterium nucleatum*、*Capnocytophaga* 种、*Eikenella corrodens*、*campylobacterrectus*、*Bacteroides forsythus*、*Treponema denticola* 等螺旋体。

上述抗体可以用血中抗体或乳汁中抗体，血中抗体或乳汁中抗体是把上记虫牙病病原菌和上记牙周病病原菌的全菌体、线毛、荚膜、菌体提取物或菌体表层得到的多糖等作为抗原，给哺乳动物免疫以后而得到的。上述抗体也可以用卵中抗体，卵中抗体是把上述虫牙病病原菌和上述牙周病病原菌的全菌体、线毛、荚膜菌体萃取物或菌体表层得到的多糖等作为抗原，给家禽免疫以后得到的。另外，也可以用按公知的方法制备的单克隆抗体。

上述抗体的制备方法，也就是动物免疫方法、抗体的特制方法等可以采用通常的方法。具体的制备例子如后述参考例所示。

本发明口腔用组合物中的上述抗体可以单独使用一种，也可以2种以上并用配合。上述抗体配合量无特殊限制，但是，一般在口腔用组合物中占0.0001—10%（重量%，以下相同），优选占0.002—5%。

在含有上述抗体的口腔用组合物中，配合入选自香芹酮、茴香脑、桉树脑、水杨酸甲酯、丁子香酚、丁酸乙酯和肉桂醛中的1种或2

种以上，其中优选使用茴香脑。

上述香料成分可以分别以单体的形式配合到口腔用组合物中，也可以和精油等配合后，再配合到口腔用组合物中。例如，香芹酮可以先配合在薄荷油等中。

和上述香料成分并用的1-薄荷醇可以以单体的形式配合到口腔用组合物中，也可以和精油等配合后，再配合到口腔用组合物中。例如，可以先和薄荷油、日产薄荷油等配合。

上述香料成分和1-薄荷醇的配合比率(重量比)一般是1:9-8:2，最好是2:8-7:3。在这个比率范围之内配合出来的香料成分和1-薄荷醇能和抗体稳定地配合，而且清凉感、味道、辣味等适度，能提高使用感。上述香料成分的配合比率小于上述范围时，味道、辣味不足，使用感下降。上述香料成分的配合比率大于上述范围时，抗体稳定性降低，而且清凉感不足，达不到本发明的目的。

上述香料成分的配合量最好是占口腔用组合物全体的0.01-0.5%。如达不到0.01%，则使用感下降。如超过0.5%，则抗体稳定性下降的同时使用感也下降。

上述香料成分和1-薄荷醇总的配合量一般是占口腔用组合物全体的0.1-5%，最好是0.3-3%。总的配合量达不到0.1%时，味道、清凉感不足。超过5%时，辣味过强，而且抗体的稳定性也不会随配合量的增加而提高。

本发明口腔用组合物中的有效成分除上述抗体以外还要配合葡聚糖酶、淀粉酶、蛋白酶、mutanase、溶菌酶、溶菌酶等酶、双氯苯双胍己烷类、2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯醚、氯化十六烷基吡啶盐等杀菌剂、碱金属一氟磷酸盐、氟化钠、氟化亚锡等氟化物、亚锡化合物、ε

一氨基己酸、凝血酸、尿囊素、铝氟羟基尿囊素、二氢胆甾醇、甘草酸盐、萘、维生素 E、氯化钠、水溶性无机磷酸化合物。上述抗体和一氟磷酸钠等碱金属一氟磷酸盐并用时，抗体稳定，即使长时间保存以后，抗体仍能维持很高的残存率。碱金属一氟磷酸盐的添加量最好是 10ppm—10000ppm。添加水溶性无机磷酸化合物时，正磷酸、焦磷酸、多磷酸的钾盐、钠盐等如范例所示，但最好是上述磷酸钾盐。

除上述香料成分以外，在不影响本发明效果的范围之内，也可以配合进一些碳原子数 7—17 的脂肪族醇和它们的酯、萜烯类烃、苯酚醚、醛、酮、内酯等其他香料成分和精油。

在本发明的组合物中也可以根据口腔用组合物种类不同配合进一些作为其他成分的通常使用的成分。如：牙膏类：可以配合进一些研磨剂，常用的有：氧化铝、氢氧化铝、磷酸氢钙、2 水合物或无水物、硅胶、锆硅酸盐、二氧化硅、铝硅酸盐、碳酸钙、焦磷酸钙、硅酸铝、不溶性偏磷酸钠、磷酸镁、碳酸镁、硫酸钙、合成树脂等。可以配合进一种或二种以上，配合量是全体的 20—90%。牙膏の場合，配合量也可以是 20—60%。在本发明中，最好使用二氧化硅类化合物作为主研磨剂。因为用二氧化硅类化合物作为主研磨剂时，抗体和牙膏体本身的稳定性都会提高。常用的二氧化硅类化合物有：沉降性二氧化硅、硅胶、铝硅酸盐、锆硅酸盐等等。它们的粒径最好是 1—30 μ m。

在牙膏组合物中也可以配合进一些角叉菜胶 (carrageenan)，羧甲基纤维素钠盐、藻酸钠等藻酸的碱金属盐、树脂类、聚乙烯醇、Veegum 等 (配合量通常是 0.3—5%)。有效成分中有碱金属一氟磷酸盐时，考虑到组合物的稳定性及使用感最好和角叉菜胶、藻酸碱

金属盐并用。此时的角叉菜胶，与通常的角叉菜胶(kappa 及 iota 混合系)比较，Kappa—角叉菜胶(K —— 角叉菜胶)在防止皮肤皴裂上，效果更好，所以最好用 Kappa—角叉菜胶。

可以配合进一些粘稠剂，常用的有：山梨糖醇、甘油、丙二醇、1,3—丁二醇、聚乙二醇、木糖醇、maltitol、lactitol 等。(配合量通常：10—70%)。此时粘稠剂的分散液最好用丙二醇，但用量多，长时间保存时，抗体的残存率会下降，所以最好把山梨糖醇作为主粘稠剂，和丙二醇并用。

还可以配合进一些月桂基硫酸钠、月桂酰肌氨酸酯(lauroyl sarcosinate)、 α -磺酸烯烴酯、牛磺酸酯(aurate)、月桂基硫酸单甘油酯、月桂基磺酸单甘油酯、肥皂等阴离子活性剂；月桂酸二乙醇酰胺、硬脂酰单甘油酯、蔗糖脂肪酸酯、乳糖脂肪酸酯、lactitol 脂肪酸酯、maltitol 脂肪酸酯、聚氧乙烯山梨糖醇单硬脂酸酯等非离子活性剂；甜菜碱型、氨基酸型等两性活性剂(配合量通常是 0.5—7%)；糖精钠、蛇菊苷(stevioside)、neohesperidyl dihydro chalcone、taumatine、甘草酸、紫苏亭等甜味剂；对羟基苯甲酸酯、苯甲酸钠等防腐剂；明胶、豚等成分。

制造牙膏时，可以把上記成分和适量的水混合。然后，把得到的牙膏组合物装在层压管、塑料管和瓶状容器、喷雾器等规定的容器内，便可使用了。层压管是用塑料等把铝管、铝箔的两面层压制得的。

牙膏以外的口腔用组合物也可以用常用的原料，用常规方法配制。

本发明的口腔用组合物不仅能保持血中抗体、卵中抗体及乳汁

中抗体的稳定性，而且即使长时间保存抗体仍能发挥满意的效果。
香料成分选择范围大使用感好。

以下，例举了一些实施例和比较例，具体地说明本发明，但本发明不仅仅局限在下述的这些实施例中。

各例中的%是指重量%。

[抗体配制法 A]

首先，用下述方法配制抗原。

(1)PAC 抗原的配制

PAC 抗原的配制根据 Lehner 等人的方法(J. General Microbiology, 122,217—225, 1981)进行。在 20 升 TPY 透析培养基上，培养 *S. mutans* 10449。离心后，用 60%硫酸铵，处理上清液，分离收集沉淀部分。把沉淀溶解在 10mM 的三—盐酸缓冲液(PH7.5)中。用相同的缓冲液透析。然后吸附在 DEAE—Sephacel 柱色谱上。根据 NaCl 的浓度梯度洗脱。浓缩所需部分以后，用 Sepharose 6B 进行凝胶过滤，精制。

(2)全菌体抗原的配制

在 37℃需氧条件下，在 20 升 TTY 培养基上，静置培养 18 小时，培养 *S. mutans* 10449。把培养液，在 8000rpm 的条件下，离心分离 20 分钟，把菌体和培养上清液分离开。集菌后，用磷酸缓冲液(PBS)洗涤 3 次，再用灭菌蒸馏水洗涤 3 次后，冷冻干燥。

(3)菌体连接葡糖基转移酶(GTF)的调制

在 37℃需氧条件下，在 20 升 TTY 培养基上，静置培养 18 小时，培养 *S. mutans* 10449。把培养液在 8000rpm 的条件下，离心分离 20 分钟，把菌体和培养上清液分离开。集菌后，用生理食盐水洗

涤3次。用4M尿素和0.5M食盐液，在室温条件下，用1个小时的时间，边慢慢搅拌边提取。离心(8000rpm, 20分钟)，从菌体中分离出来。用10mM的磷酸缓冲液(PH6.0)透析。用离心法除去生成的沉淀，上清液用60%饱和硫酸铵进行沉淀处理，在上述离心条件下，回收得到的沉淀物。把沉淀物溶解在上述缓冲液中，用相同的缓冲液透析，用离心法除去透析内液的沉淀物，把上清液用0.22 μ m的过滤灭菌膜过滤灭菌，便得到了免疫用抗原。

(4)水溶性葡聚糖合成酶(GTF-S)的调制。

在37 $^{\circ}$ C需氧条件下，在20升TTY培养基上，静置培养18小时，培养*S. mutans* 10449。在8000rpm的条件下，离心分离20分钟培养液。分离成菌体和培养上清液。对培养上清液进行55%饱和硫酸铵沉淀处理，用离心分离法回收得到的沉淀。然后，把沉淀物溶解在Histidine-HCl缓冲液(PH6.0)中，将上清液用0.22 μ m过滤灭菌膜过滤灭菌以后，上柱，柱子是poly butter-PBE94(pharmacia社制)，规格是2.5 \times 25cm。吸附在柱上的部分根据使用poly butter-74(pharmacia社制)的PH梯度，使之选择性地洗脱。PH5.5-4.9的部分有很强的GTF活性。收集这个部分，进行80%饱和硫酸铵沉淀处理，得沉淀物。把沉淀物溶解在10mM的磷酸缓冲液中(PH6.0)，用相同溶液透析，用离心分离法除去溶液中生成的沉淀。上清液便是抗原。

测GTF活性。把10 μ l样品和10 μ l0.2M的磷酸缓冲液(PH6.0)混合，0.2M的磷酸缓冲液是基质，里面有20mM的[14 C-葡萄糖]蔗糖(0.05ci/mol)。在37 $^{\circ}$ C反应1个小时后，把反应液全量点滴在滤纸上(1 \times 1cm)，用甲醇洗涤后，测定在滤纸上残留的甲醇中被转

移到不溶性葡聚糖中的放射能量以后，算出 GTF 活性。我们把 1 分钟内使 $1\mu\text{mol}$ 的葡萄糖转移到葡聚糖中的活性设为 1 个单位。

用下述方法配制上述得到的各抗原的鸡卵抗体、抗血清抗体、母乳抗体。

(1) 鸡卵抗体的配制

把含有 $1\text{mg}/\text{ml}$ 上述抗原的 0.5ml 溶液和 FIA(弗罗因德氏完全佐剂) 0.5ml 溶液，按 1:1 的比例，混合以后，制得 W/O 型乳浊液。把得到的乳浊液每 0.5ml 注射到鸡左右胸筋上，进行初次免疫以后，每隔一周进行一次免疫，一个月后采卵。抗体效价降低时，反复适当免疫，持续约 1 年的时间采卵。在卵中分离出的卵黄中加等量的水，再加等量的 0.5% 的 λ -角叉菜胶悬浮液，搅拌后，在 8000rpm 的条件下，离心 20 分钟，得上清液。这个便是有抗体的部分(WSF)。测定抗体效价。从以上操作便得到 310ml 、含有鸡卵抗体 $80-320$ 单位/ ml ($1\text{mg}/\text{ml}$)的溶液。

(2) 母乳抗体的调制

把抗原配制成 $50\mu\text{g}/\text{ml}-200\text{mg}/\text{ml}$ 的浓度以后，和等量的弗罗因德氏不完全佐剂混合。然后，每个个体以 0.3ml 的量注射到妊娠的山羊、兔子、牛、马背部皮下，免疫。每隔 2-4 周，用抗原和弗罗因德氏不完全佐剂混合物免疫 3 次后，出产后，采取初乳。在上述初乳样品中加等量的 0.9% 食盐水，在 1200rpm 的条件下，离心分离 60 分钟以后，除去上层脂肪和沉淀物，取中间的液体成分，向其中加浓盐酸，调 PH 为 4。再在 5000rpm 的条件下，离心分离 30 分钟。用三羟基苣胺中和上清液以后，加硫酸铵，制成 75% 的饱和液，收集得到的沉淀物。用磷酸缓冲液透析沉淀物，便得母乳抗体成分(内

液)。这个母乳抗体成分是初乳抗体 10—20 单位/ml(1mg/ml)的溶液。

(3) 抗血清抗体的配制

和上述一样，进行 4 次免疫后，采血，使之凝固，把离心的上清液作为样品。在抗血清中加硫酸铵，制成 50% 饱和液，用磷酸缓冲液透析得到的沉淀物，即得抗血清抗体(内液)。这个抗血清抗体溶液是血清抗体约 80—320 单位/ml(1mg/ml)的溶液。

上述各抗体的抗体效价使用菌体凝集试验法，用下述方法测定。抗体效价测定法：

(1) 菌体浮游液

把 TYC 琼脂培养基上的 *S. mutans* 10449 菌落 1—2 接种到 200ml BHI 液体培养基上。在 37℃ 厌氧条件下，培养 18 小时后，集菌，用生理食盐水(BSA 生理食盐水)洗涤 3 次，生理食盐水中含有 0.1% 牛血清白蛋白。把洗涤过的菌体悬浮在 BSA 生理食盐水中，调整到 $OD_{550nm} 1.0$ 。菌体悬浮液用时调制。

(2) 样品抗体

把抗体按 20、30、50、70、90 的稀释倍率稀释以后，再分别按 2^n 倍稀释倍率稀释。

(3) 操作法

在微检测片(micro-plate)上，混合 50 μ l 的稀释抗体和 50 μ l 的菌体悬浮液以后，搅拌，在 37℃ 静置 3 小时，再在 4℃ 静置一夜。

(4) 菌体凝集的判定

静置一夜后，观察微检测片底部，把没出现菌体斑点的情况设为凝集阳性，把观察到那怕是一点点斑点的设为凝集阴性。

[实施例 1—9, 比较例 1,2]

按表 1 所示的处方, 配制牙膏组合物。配制完后立即用免疫抗原, 用 ELISA 法, 测定 40℃保存了一个月的抗体量, 求抗体残存率。把配合后立即测得的值设为 100%作分母。把 40℃保存后的值作分子, 设为残存活性。由专家小组通过官能试验来评价这些牙膏组合物的使用感, 结果如表 1 所示。

表 1

牙膏组合物成分	比较例 1	实施例 1	实施例 2	实施例 3	比较例 2
茴香脑/1-薄荷醇	1:20	1:9	5:5	8:2	9:1
二氧化硅	20 %	20 %	20 %	20 %	20 %
甘油	30	30	30	30	30
山梨糖醇	20	20	20	20	20
羧甲基纤维素钠盐	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
月桂基硫酸钠	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
月桂基二乙醇酰胺	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
明胶	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
茴香脑	0.05	0.1	0.5	0.4	0.45
1-薄荷醇	1.0	0.9	0.5	0.1	0.05
糖精	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
橙皮油	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
苯甲醛	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
氟化钠	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
抗 PAC 马血清抗体	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
水	余量	余量	余量	余量	余量
共计	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
抗体残存率(40℃, 保存一个月)	△	○	○	○	△
使用感	×	○	○	○	V

抗体残存率评价标准

○: 残存率 70% 以上

△: 残存率 30% 以上小于 70%

×: 含量小于 30%

使用感评价标准

○: 良好

×: 香味单调使用感不好

V: 清凉感不足使用感不好

表 2

牙膏组合物成分	实施例 4	实施例 5	实施例 6	实施例 7	实施例 8	实施例 9
二氧化硅	20 %	20 %	20 %	20 %	20 %	20 %
甘油	30	30	30	30	30	30
山梨糖醇	20	20	20	20	20	20
羧甲基纤维素钠盐	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
月桂基硫酸钠	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
月桂基二乙醇酰胺	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
明胶	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
藏回酮	0.4	-	-	-	-	-
桉树脑	-	0.3	-	-	-	-
水杨酸甲酯(或盐)	-	-	0.5	-	-	-
丁子香酚	-	-	-	0.1	-	-
丁酸乙酯(或盐)	-	-	-	-	0.1	-
肉桂醛	-	-	-	-	-	0.3
1-薄荷醇	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
糖精	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
橙皮油	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
苯甲醛	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
氟化钠	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
抗 PAC 马血清抗体	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
水	余量	余量	余量	余量	余量	余量
共计	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
抗体残存率(40℃ 保存一个月)	○	○	○	○	○	○
使用感	○	○	○	○	○	○

[抗体配制法 B]

用下述方法配制抗原

(1) *Porphyromonas gingivalis* 全菌体抗原配制法。

把 *porphyromonas gingivalis* 381 株 (FERM BP-1027), 在加了 氟高铁血红素、维生素 K 的 TODDHEWITT 液体培养剂中培养 2 天后, 集菌。用 PBS (磷酸缓冲液; PH7.4) 洗涤后, 用 0.5% 的福尔马林处理一晚, 用 PBS 洗涤 3 次, 便得到了全菌体抗原。

(2) *Porphyromonas gingivalis* 线毛抗原的配制

和上述一样, 集菌培养了二天的 *porphyromonas gingivalis*, 洗涤后, 在 PBS 中与玻璃珠一起慢慢搅拌 2 天。使通过注射针 (No. 25) 中 3 次, 由菌体分裂出线毛。在 8000rpm 条件下, 离心 15 分钟, 分离出上清液中的线毛层。透析后, 冷冻干燥, 便得到了线毛抗原。

(3) *Porphyromonas gingivalis* 荚膜抗原的配制

和上述一样, 把收集的菌体悬浮在含有 0.01M EDTA 的 PBS 中。在 60°C 反应 30 分钟后, 使通过注射针中 3 次, 由菌体分离出荚膜。在 8000rpm 条件下, 离心分离 15 分钟, 除去菌体, 把得到的上清液, 在 40000rpm 条件下, 超离心分离 2 小时, 沉渣便是荚膜抗原。

(4) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 菌体表层多糖抗原的配制

在 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 株 (ATCC 43718) 中加入 1% 的酵母提取液。在含 5% CO₂ 的恒温箱中, 在 37°C 条件下, 培养 3 天。集菌后, 用生理食盐水洗涤 3 次, 悬浮在生理食盐水中。在 121°C, 进行 15 分钟的高压处理。冷却后, 在 10000Xg 条件下, 离心 20 分钟, 分取上清液。再往沉渣中加入生理食盐水, 反复

进行上述提取操作。收集得到的上清液，用蒸馏水充分透析，冷冻干燥。即得菌体表层多糖抗原。

调制由上述得到的各抗原的鸡卵抗体、抗血清抗体、母乳抗体。

(1) 鸡卵抗体的调制

把含有 1mg/1ml 上述抗原的 0.5ml 溶液和 0.5ml FIA (弗罗因德氏不完全佐剂)，按 1:1 的比例混合以后制成 W/O 型乳浊液。把得到的乳浊液每 0.5ml 注射到鸡左右胸肌中，进行初次免疫后，每隔一周免疫一次，一个月后采卵。抗体效价下降时，反复适当免疫，继续采卵约一年时间。在卵分离出的卵黄中加等量水，再加等量的 0.5% 的 λ -角叉菜胶悬浮液，搅拌后，在 8000rpm 条件下，离心 20 分钟，便得上清液，可作为鸡卵抗体标准样品。

(2) 抗血清抗体的调制

把抗原配制成 50 μ g/ml—200mg/ml 的溶液以后，和等量的弗罗因德氏不完全佐剂混合，每个个体，按 0.3ml 的量，注射到山羊、兔子、牛、马、羊背部皮下，免疫。每隔 2—4 周，用抗原和弗罗因德氏不完全佐剂混合物，免疫 3 次后，取血液，使之凝固，收集离心出的上清液，即得抗血清样品。向该抗血清中加硫酸铵，得 50% 饱和液，用磷酸缓冲液透析得到的沉淀物，可作为抗血清抗体标准样品。

(3) 母乳抗体的调制

和上述一样的方法，给妊娠的山羊、牛、羊免疫 4 次后，在出产后取初乳。在上述初乳样品中加等量的 0.9% 食盐水。在 1200rpm 的条件下，离心分离 60 分钟后，除去上层脂肪和沉淀物，取中间溶液成分，再加浓盐酸，调成 PH4.0。再在 5000rpm 条件下，离心分离

30分钟，用三羟基盖胺中和上清液以后，加硫酸铵，制成75%饱和液，取得到的沉淀物，用磷酸缓冲液透析沉淀物后得到的物质可作为母乳抗体标准样品。

[实施例 10—18、比较例 3,4]

如表 3,4 所示的配方，配制牙膏组合物，配制后立即用免疫抗原，用 ELISA 法，测定在 40℃，放置 1 个月以后的抗体量，求抗体残存率。把配制后立即测得的值作为 100%，设为分母。将 40℃ 保存后的值设为分子，求残存率。由专家小组通过官能试验，评价这些牙膏组合物的使用感。结果如表 3,4 所示。在下述例子中，调合量 (%) 都代表重量 %。Aa 代表 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*，Pg 代表 *Porphyromonas gingivalis*，Av 代表 *Actinomyces Viscosus*，Pi 代表 *Prevotella intermedia*，Fn 代表 *Fusobacterium nucleatum*，Cr 代表 *Campylobacter rectus*，Bf 代表 *Bacteroids forsythus*，Td 代表 *Treponema denticola*。

表 3

牙膏组合物成分	比较例 3	实施例 10	实施例 11	实施例 12	比较例 4
茴香脑/1-薄荷醇	1:20	1:9	5:5	8:2	9:1
二氧化硅	20 %	20 %	20 %	20 %	20 %
甘油	30	30	30	30	30
山梨糖醇	20	20	20	20	20
羧甲基纤维素钠盐	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
月桂基硫酸钠	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
月桂基二乙醇酰胺	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
明胶	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
茴香脑	0.05	0.1	0.5	0.4	0.45
1-薄荷醇	1.0	0.9	0.5	0.1	0.05
糖精	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
橙皮油	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
苯甲醛	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
凝血酸	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
抗 Pg 线毛兔血清抗体	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
水	余量	余量	余量	余量	余量
共计	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
抗体残存率(40℃, 保存一个月)	△	○	○	○	△
使用感	×	○	○	○	V

抗体残存率评价标准

○: 残存率 70% 以上

△: 残存率 30% 以上小于 70%

×: 残存率小于 30%

使用感评价标准

○: 良好

×: 香味单调使用感不好

V: 清凉感不足使用感不好

表 4

牙膏组合物成分	实施例 13	实施例 14	实施例 15	实施例 16	实施例 17	实施例 18
二氧化硅	20 %	20 %	20 %	20 %	20 %	20 %
甘油	30	30	30	30	30	30
山梨糖醇	20	20	20	20	20	20
羧甲基纤维素钠盐	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
月桂基硫酸钠	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
月桂基二乙醇酰胺	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
明胶	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
藏回香酮	0.4	-	-	-	-	-
桉树脑	-	0.3	-	-	-	-
水杨酸甲酯(或盐)	-	-	0.5	-	-	-
丁子香酚	-	-	-	0.1	-	-
丁酸乙酯(或盐)	-	-	-	-	0.1	-
肉桂醛	-	-	-	-	-	0.3
1-薄荷醇	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
糖精	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
橙皮油	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
苯甲醛	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
凝血酸	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
抗Pg线毛兔血清抗体	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
水	余量	余量	余量	余量	余量	余量
共计	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
抗体残存率(40℃ 保存一个月)	○	○	○	○	○	○
使用感	○	○	○	○	○	○

[实施例 19] 牙膏剂

磷酸氟钙·2 水合物	50.0%
山梨糖醇	10.0
甘油	10.0
角叉菜胶	1.0
月桂基硫酸钠	1.0
l-薄荷醇	0.3
薄荷油	0.6
丁子香酚	0.03
茴香脑	0.17
糖精	0.1
乙醇	2.0
葡聚糖酶	0.02
抗 PAc 山羊乳抗体或抗 Pg 菌体	0.2
表层多糖羊血清抗体	
水	剩余量

100.0%

[实施例 20] 牙膏剂

二氧化硅	30.0%
甘油	30.0
山梨糖醇	20.0
羧甲基纤维素	1.0
月桂基硫酸钠	1.2

l-薄荷醇	0.1
香芹酮	0.05
薄荷油	0.4
薄荷油	0.3
糖精	0.1
乙醇	2.0
氟化钠	0.1
抗 PAc 马血清抗体或抗 Pg 全菌体	0.1
马血清抗体	
水	剩余量

100.0%

[实施例 21] 牙膏剂

氢氧化铝	45.0%
山梨糖醇	20.0
角叉菜胶	0.5
羧甲基纤维素	1.0
月桂基二乙醇酰胺	1.0
蔗糖单月桂酸盐	2.0
l-薄荷醇	0.6
薄荷油	0.2
桉树脑	0.4
糖精	0.1
抗 Pg 线毛马血清抗体	0.2

抗 Aa 线毛马血清抗体	0.2
水	剩余量

100.0%

[实施例 22] 牙膏剂

氢氧化铝	45.0%
山梨糖醇	20.0
角叉菜胶	0.5
羧甲基纤维素	1.0
月桂基二乙醇酰胺	1.0
蔗糖单月桂酸盐	2.0
l-薄荷醇	0.6
薄荷油	0.2
桉树脑	0.4
糖精	0.1
抗 Pg 线毛马血清抗体	0.2
抗 Aa 线毛马血清抗体	0.2
水	剩余量

100.0%

[实施例 23] 牙膏剂

磷酸氢钙	45.0%
羧甲基纤维素	1.0
角叉菜胶	0.5

山梨糖醇	35.0
丙二醇	3.0
N—月桂酰甲基牛磺酸钠	0.5
明胶	1.0
对羟基苯甲酸乙酯	0.2
糖精钠	0.1
l-薄荷醇	0.6
水杨酸甲酯	0.3
一氟磷酸钠	0.7
抗 PAc 鸡卵抗体或抗 Av 线毛卵抗体	0.4
水	剩余量

100.0%

[实施例 24] 牙膏剂

氢氧化铝	40.0%
羧甲基纤维素	1.0
角叉菜胶	0.5
山梨糖醇	35.0
丙二醇	3.0
N—肉豆蔻酰甲基牛磺酸钠	0.5
缩氨酸	1.0
对羟基苯甲酸乙酯	0.2
糖精钠	0.1
l-薄荷醇	0.5

薄荷油	0.2
肉桂醛	0.15
香料混合物	0.05
抗 PAc 羊血清抗体或抗 Pi 菌抗	0.5
表层多糖羊血清抗体	
水	剩余量

100.0%

[实施例 25] 牙膏剂

二氧化硅	20.0%
羧甲基纤维素	1.0
山梨糖醇	50.0
聚乙二醇	5.0
N-棕榈酰甲基牛磺酸钠	0.5
酪蛋白	1.0
对羟基苯甲酸钠	0.2
糖精钠	0.1
l-薄荷醇	0.3
桉树脑	0.1
丁酸乙酯	0.01
氟化钠	0.2
抗 GTF 鸡卵抗体	0.3
水	剩余量

100.0%

[实施例 26] 牙膏剂

二氧化硅	20.0%
羧甲基纤维素钠	1.0
山梨糖醇	50.0
聚乙二醇	5.0
N-棕榈酰甲基牛磺酸钠	0.5
酪蛋白	1.0
对羟基苯甲酸钠	0.2
糖精钠	0.1
l-薄荷醇	0.3
桉树脑	0.1
丁酸乙酯	0.01
凝血酸	0.1
抗 Fn 全菌体鸡卵抗体	0.3
水	剩余量

100.0%

[实施例 27] 牙膏剂

乙醇	20.0%
l-薄荷醇	0.2
薄荷油	0.2
丁子香酚	0.1
桉树脑	0.05

茴香脑	0.03
糖精	0.05
月桂基二乙醇酰胺	0.3
Chlorohexidine gluconate	0.01
抗 GTF 马血清抗体或抗 Cr 菌体	
表层多糖山羊血清抗体	0.1
水	剩余量

100.0%

[实施例 28] 漱口剂

山梨糖醇	10.0%
乙醇	20.0
N—肉豆蔻酰甲基牛磺酸钠	0.5
蔗糖硬脂酸酯	1.0
缩氨酸	0.5
对羟基苯甲酸乙酯	0.1
蛇菊苷	0.1
l-薄荷醇	0.2
水杨酸甲酯	0.3
肉桂醛	0.1
丁酸乙酯	0.05
葡聚糖酶	0.2
氟化钠	0.2
抗 Aa 表层多糖鸡卵抗体	0.2

水	剩余量
	100.0%
[实施例 29]漱口剂	
山梨糖醇	10.0%
乙醇	20.0
N—肉豆蔻酰甲基牛磺酸钠	0.5
蔗糖硬脂酸酯	1.0
缩氨酸	0.5
对羟基苯甲酸乙酯	0.1
蛇菊苷	0.1
l-薄荷醇	0.2
水杨酸甲酯	0.3
肉桂醛	0.1
丁酸乙酯	0.05
葡聚糖酶	0.2
1—氯十六烷基吡啶鎓	0.05
抗 B ₁ 全菌体鸡卵抗体	0.2
水	剩余量
	100.0%
[实施例 30]漱口剂	
山梨糖醇	10.0%
乙醇	20.0

N—硬脂酰甲基牛磺酸钠	0.5
POE(20)山梨糖醇单油酸酯	1.0
胶原	0.5
对羟基苯甲酸甲酯	0.1
糖精钠	0.1
l-薄荷醇	0.05
香芹酮	0.1
薄荷油(Spearmint—oil)	0.3
薄荷油(Peppermint—oil)	0.3
抗 PAc 牛乳抗体或抗 T _a 菌体	0.4
表层多糖牛乳抗体	
水	剩余量

100.0%

[实施例 31]片剂

阿拉伯树胶	6.0%
葡萄糖	72.0
明胶	3.0
l-薄荷醇	0.2
桉树脑	0.1
苯甲醛	0.05
抗环血酸钠	0.1
抗 PAc 羊乳抗体或抗 Aa 荚膜羊乳抗体	0.1
水	剩余量

	100.0%
[实施例 32]口腔糖	
胶质基料	43.9%
碳酸钙	2.0
糖水	15.0
砂糖	29.0
蔗糖棕榈酸酯	1.0
果糖	4.0
醛糖	3.0
l-薄荷醇	0.6
香芹酮	0.4
水果混合型香料	1.0
抗 PAc 鸡卵抗体或抗 Pg 线毛鸡卵抗体	0.1
水	剩余量
	100.0%
