

R
008.8
2623

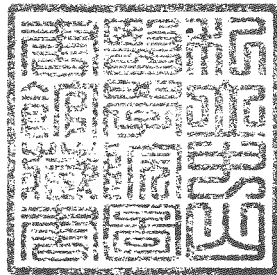
私立中山醫學院

醫學研究所

碩士論文

Salicylanilide 衍生物抗口腔微生物之研究

In Vitro Susceptibilities of Oral Bacteria to
Salicylanilide Derivatives



指導教授：簡宏堅博士

研究生：吳重進

中華民國八十五年一月

中山醫學院圖書館



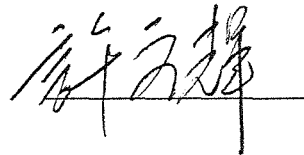
C034315

本論文為中山醫學院授予以理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

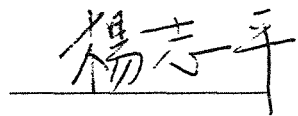
國立中興大學分子生物所

許文輝 博士



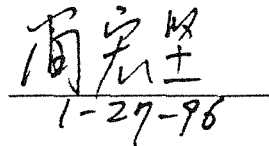
生物技術開發中心天然物及化學合成組

楊志平 博士



私立中山醫學院醫醫學研所

簡宏堅 博士



1-27-96

中華民國八十五年二月

學生吳重進 論文題目為 Salicylanilide 衍生物抗口腔
微生物之研究，其論文已經中山醫學院醫學研究所碩士論
文考試委員會審查合格及口試通過，並經指導教授核閱後
無誤。

指導教授： 簡宏堅

簽名：簡宏堅
2-14-96

摘 要

口腔中有 300 種以上的微生物，然而其中會造成牙周疾病的大約只有十多種。在牙周炎中，病原菌大部份是革蘭氏陰性、厭氧性桿菌及運動性桿菌。由於厭氧菌培養及鑑定的不易，常造成研究上的困難。在本文中，我們將描述牙周炎病原菌的培養技術及鑑定方法。

Salicylanilide 是一種氧化磷酸化去伴合劑 (oxidative phosphorylation uncoupler)，能阻斷細胞內 ATP 的合成。目前，salicylanilide 及其衍生物常被應用於家畜的寄生蟲驅蟲藥和人類皮膚、黏膜的抗黴菌藥。已有將之運用於口腔抗牙菌斑形成之細菌，抑制牙菌斑的形成。

我們有 22 種 salicylanilide 衍生物，本研究之目的，即是要測試這 22 種 salicylanilide 衍生物對口腔中牙菌斑形成細菌和牙周炎病原菌之抑制能力。我們選擇了 *Streptococcus sanguis* ATCC 25175、*Streptococcus mutans* ATCC 10556 及牙周炎病原菌 *Selenomonas artemidis* ATCC43528、*Fusobacterium nucleatum* VPI 5351、*Centipeda periodontii* 35019、*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277、*Prevotella intermedius* ATCC 25611 及 ATCC 33563、*Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 29522 和 *Campylobacter curva* ATCC 35224。這些細菌分別加入 salicylanilide 衍生物，培養後測細菌在 O.D.590 之吸光值，再與無藥物之細菌在 O.D.590 之吸光值作比較，以決定其抑制百分比。結果是 *S. sanguis* ATCC 25175 和 *S. mutans* ATCC 10556 不受抑制，而 *F. nucleatum* VPI 5351，和 *P. intermedius* Group B ATCC 33563 的感受性最高。在 22 種 salicylanilide 衍生物中，以 N-(2,4-dimethoxyl-phenyl)-3-methoxy-benzamide 的抑制力最強。

Abstract

There are more than 300 kinds of microorganism habitated in human oral cavity but only approximally 10 species associated with periodontal disease. In periodontitis, pathogens consist of Gram negtive, anaerobic rods and motile rods. The difficulty of anaerobic culture and indentification technique is the main problem of periodontitis investigation. The methods of anaerobic culture and indentification technique were presented in this study.

Salicylanilide is known to act as uncouplers in oxidative phosphorylation and inhibit ATP synthesis in cells. At present, salicylanilide and its derivatives are extensively applied as anthelmintic agents in animal and antifungal in human. They had also been applied as antimicrobial agents to inhibit dental plaque formation.

22 salicylanilide derivatives were charactetized the ability to against plaque formation and periodontal pathogens in this syudy. *Streptococcus sanguis* ATCC 25175, *Streptococcus mutans* ATCC 10556 and periodontal pathogens including *Selenomonas artemidis* ATCC 43528, *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351, *Centipeda periodontil* ATCC 35019, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedius* ATCC 25611 & ATCC 33563, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 29522 and *Campylobacter curva* ATCC 35224 were choosen. These bacteria were incubated respectirely with different salicylanilide derivatives. The O.D. values detected after incubation were compared with those without salicylanilide derivatives. The results indicated that *S. sanguis* ATCC 25175 and *S. mutans* ATCC 10556 are not inhibited, while *Fusobactrium nucleatum* VPI 5351 and *Prevotella intermedius* Group B ATCC 33563 have higher susceptibilities. N-(2,4-dimethoxyl-phenyl)-3-methoxyl-benzamide showed the best antimicrobial ability to all of the oral bacteria used in this study.

銘 謝

對於指導與幫助我完成這篇論文的每個人，我都要致上最誠摯的感謝。特別是我的指導教授簡宏堅博士，謝謝他在我研究生時期對我的關心，指導和嚴格的訓練。感謝錢佑老師平日的細心指導以及在我實驗期間所提供的技術，方法和建議。同時，也要感謝生物技術開發中心楊志平博士，提供給我這次實驗的機會，並提供有關藥物方面的資訊。感謝賈景山博士提供 *Streptococcus mutans*。此外，特別感謝口試委員許文輝教授對本論文清楚指正，在此一併感謝。

我也要感謝微生物科所有教職員及研究生，對我的關懷和支援。

最後，感謝我的雙親的支持和親友的鼓勵，使我能免於生活上的匱乏，而能專心於學業。

目 錄

第一章	導 論.....	1
第一節	前言.....	1
第二節	牙菌斑.....	2
第三節	牙菌斑形成.....	2
第四節	牙菌斑的細菌組成.....	3
第五節	牙周炎病原菌研究歷史.....	4
第六節	牙周炎病原菌.....	5
第七節	Salicylanilide 衍生物.....	13
第二章	動機與目的.....	15
第三章	材料與方法.....	17
第四章	結果.....	24
第五章	討論.....	29
圖表	34
參考文獻	68

第一章 導論

第一節 前言

成年人最常罹患的口腔疾病為牙周病 (Periodontal disease), 很少人一生未曾受其影響. 許多人由於在牙周炎初期並未妥善治療, 而導致牙周進一步的惡化, 等到影響到咀嚼才尋醫治療. 對個人而言, 是一種身心的困擾, 對社會而言, 也是一種負擔. 因此, 牙周病的研究, 包括病因, 診斷, 治療及預防, 是不可輕忽的.

牙周病在病理學上, 大致可分成兩類: 牙齦炎 (gingivitis) 和 牙周炎 (periodontitis) (117). 牙齦炎是牙周炎的初期症狀, 但是並非所有的牙齦炎都會發展成牙周炎. 導致牙齦炎轉變成牙周炎的因素, 目前還是未知.

牙齦炎在臨床上的症狀, 是牙齦有紅 (erythematous), 腫 (edematous)(54)現象, 牙齦溝 (gingival sulcus) 經刺激後會出血 (bleeding)(72,73,87), 通常有化膿 (suppuration), 大量的多形核白血球 (polymorphonuclear leukocytes) 游移到發炎的部位, 造成發炎細胞 (inflammatory cells) 浸潤 (infiltration), 發炎細胞是大約等量的 T- ,B- 淋巴球 (T- ,B- lymphocytes)(118,119) 和較少數的漿細胞 (plasma cells)(113). 牙齦炎影響軟組織, 不影響牙齒的支持.

牙周炎除牙齦發炎外, 還有深層結締組織 (deeper connective tissue) 發炎 (54), 接合上皮 (conjunctival epithelium) 從牙齒表面游離, 形成牙周囊袋 (pocket), 結締組織纖維和牙周韌帶 (periodontal ligament) 遭受破壞 (115). 發炎細胞以漿細胞為最大多數, 淋巴球大部份是 B- 淋巴球 (118,119). 這種情形若不加以治療, 最後會因齒槽骨 (alveolar bone) 的流失而造成牙齒鬆動, 脫落 (53). 牙周炎最常見的形式是慢性牙周炎 (chronic periodontitis), 病人多為 35 歲以後(117).

不管是牙齦炎或是牙周炎, 細菌牙菌斑 (bacterial plaque) 是首要因素(77), 但是可能受到系統性疾病 (systemic disease), 免疫調節, 遺傳 (heredity) 和其他因子所調節 (117). 系統性疾病如糖尿病 (diabetes mellitus), 有較高頻率的牙周炎發生 (92). 後天性免疫不全症 (Acquired immunodeficiency syndrome) 的病人

常伴隨有快速進行性牙周炎和急性壞死性潰瘍性牙齦炎 (acute necrotizing ulcerative gingivitis) (93). 局部性青年型牙周炎 (localized juvenile periodontitis) 被懷疑與遺傳有關, 目前發現有不同的遺傳組態, 包括 X-染色體聯鎖顯性 (X-linked dominant), 體染色體隱性 (autosomal recessive), 或體染色體顯性 (autosomal dominant)(114); 有些特定的 HLA (human leukocyte antigen) 組態也與局部性青年型牙周炎有關 (132). 其他因素如荷爾蒙 (hormone), 懷孕婦女在第二個三月期 (trimester) 牙齦炎發生率明顯增加, 同時細菌吸收的雌二醇 (estradiol) 和黃體脂酮 (progesterone) 也明顯增加 (65); 又如營養, 缺乏維生素-C, 使膠原 (collagen) 被分解, 容易產生水腫 (edema) 和出血 (hemorrhage), 細菌滋生容易而導致牙齦炎和牙周炎.

第二節 牙菌斑

牙菌斑 (dental plaque), 一般係指聚集在牙齒表面的微生物, 及其細胞外多糖體和其他基質的集合物 (23). 牙菌斑依其發生的部位, 可分為牙齦上牙菌斑 (supragingival plaque) 和牙齦下牙菌斑 (subgingival plaque). 兩者除發生部位相異外, 顯微結構也有不同: 牙齦上牙菌斑的細菌多附著在牙齒表面. 而牙齦下牙菌斑的細菌則懸浮於牙齦液 (gingival fluid) 和死亡細胞, 或細胞的細胞質殘骸中. 但不管是牙齦上或牙齦下牙菌斑, 都是參與牙齦炎或牙周炎的造成因子. 因此, 牙菌斑的控制, 在這些疾病的治療中, 扮演關鍵角色; 因此, 了解牙菌斑的形成, 發展和結構是很重要的 (74).

第三節 牙菌斑形成 (Dental plaque formation)

牙菌斑在牙齒表面的發展, 開始於唾液薄膜 (salivary pellicle) 的沉積(30). 唾液薄膜可以在天然牙齒及假牙表面形成 (137). 同時, 它是由覆蓋於牙齒表面的唾液轉化而來的一層有機薄膜. 唾液含有 95%的水和 5%可溶性有機或無機物

(137), 整個唾液尚有一些細胞, 包括細菌, 多形核白血球, 上皮細胞 (epithelial cells), 發炎細胞和紅血球 (erythrocytes). 唾液中細菌的密度大約為 2×10^8 cells/ml. 唾液薄膜一開始時, 所含細菌不多, 但在它沉積於牙齒表面數小時後, 口腔細菌就開始附著於其上, 形成牙齒斑累積的基礎.

實驗證實, 當牙齒表面清洗後的幾分鐘之內, 細菌就快速地固著在唾液薄膜上 (145,146). 這些附著於牙齒表面的第一類細菌是球菌 (cocci) 和桿菌 (rods). 主要是 *Streptococcus sanguis* (68,46,22) 及革蘭氏陽性 (Gram positive) 的多形態桿菌如 *Actinomyces viscosus* 和 *Actinomyces israelii*. 由於 *S. sanguis* 這一類細菌會發酵果糖, 產生多醣類的黏稠性聚合物, 附著於光滑牙齒琺瑯質表面, *Actinomyces* spp. 會附著於 *S. sanguis* 這一類細菌, 接著其他細菌會陸續著生, 形成初期的牙菌斑. 至於革蘭氏陰性 (Gram negative) 細菌, 在牙菌斑最早期很少或沒有被發現 (48).

Loe 等人研究(78)健康口腔在二至三週的時間內牙菌斑細菌組成的變化, 首先描述有關實驗牙齦炎牙菌斑的細菌成熟過程. 從清洗牙齒表面後開始, 大致可分成三個不同的時期; 第一時期是革蘭氏陽性球菌, 桿菌及 30% 的革蘭氏陰性球菌, 桿菌, 與唾液中細菌組成相近. 第二期 (1-4 天) 的特徵是梭狀桿菌 (*Fusobacteria*) 和菌絲 (bacterial filaments) 的數目增加. 第三期 (4-9 天) 的特徵是螺旋體的出現. 此時期的牙菌斑已形成成熟的牙齦上牙菌斑, 而臨床上也可偵到牙齦炎了. 在牙周炎, 牙菌斑會往齒根表面和牙周囊袋上皮的邊緣處牙齦下沿伸, 形成牙齦下牙菌斑.

第四節 牙菌斑的細菌組成

在牙菌斑的成熟過程中, 培養的研究顯示, 微生物的組成份子是有順序性的. 在最早期的牙菌斑中, 是 *Streptococci* 和 *Actinomyces*. 一旦牙菌斑成熟, 增加了其他細菌如 *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Treponema* 和 *Bacteroides* 等. 而這種順序是因為對環境和營養需求的結果 (133). 就環境而言, 在牙齦邊緣, 或牙齦溝 1~2 mm 深的區域, 可保護一些疏鬆附著的細菌, 或是運動性細菌, 防止被舌頭和頰

部的清潔動作清潔掉,因而此區域容易著生此類細菌(80).牙齦溝一旦有細菌著生,細菌的代謝就會降低這個環境的氧化還原電位(61).造成厭氧環境,於是厭氧菌得以生長.就營養而言,早期牙菌斑,如 *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp.* 等會消化果糖等糖類,代謝產物會侵蝕牙齒表面,造成齲齒;若口腔衛生不良的話,更容易造成牙齦炎.牙齦發炎時,由於細菌破壞上皮組織造成出血,於是提供了血晶質和一些血液中的蛋白.血晶質等又提供了另一群細菌生長所必須的營養,如 *Porphyromonas*, *Prevotella* 等屬細菌(53). 其中的 *Fusobacterium nucleatum* 分解蛋白的產物通常是去羧基胺基酸,稱為屍毒 (ptomaines). 如 putrescine, cadaverine, spermine, spermidine, 屍毒鹼提供螺旋體營養. *Prevotella intermedius* 和 *Veillonella alcalescens* 製造 Vitamine K, 提供 *P. intermedius* 和 *Porphyromonas gingivalis* 利用. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 製造 bacteriocin 抑制 *S. sanguis*, 降低它的數目 (132).

第五節 牙周炎病原研究歷史

早在 1683 年,李文霍克 (Antony van Leeuwenhoek) 用顯微鏡觀察細菌,當時他所觀察到的細菌即是取自牙菌斑的細菌 (34), 同時他描述良好的口腔衛生可減少口腔中的細菌.但是直到 200 年後的柯霍 (Koch,1876) 發現,炭疽 (Anthrax) 係由一特定細菌 -- 炭疽桿菌 (*Bacillus anthrax*) 所造成的,人們才了解細菌與疾病的關係.因此在 1890 年,柯霍的學生米勒氏 (Miller) 即致力於分離齒槽膿漏 (*pyorrhea alveolaris*) 的病原菌.但米勒的努力並未成功,它的結論是許多細菌造成膿漏 (88). 他的發現形成了所謂的「非特定牙菌斑假說」 (non-specific plaque hypothesis). 根據這個假說,斑是由相同種細菌所型成的團塊.當累積到超過宿主的防衛能力,就會造成牙周病. Bass 和 Johns 則在 1915 年提出相反的看法,他們認為牙周病係由一特定微生物 -- *Endoameba buccalis* 所造成,如果發展出對抗微生物的疫苗,應可用來防止牙齒脫落 (14). 根據這個觀點,形成現在所稱的「特定牙菌斑假說」 (specific plaque hypothesis): 疾病部位的牙菌斑不同於附近健康部位的牙菌斑. 由於受限於超顯微技術和厭氧培養技術,一直無法找出與牙周炎有

關的特定細菌，而在 1950 年到 1975 年間，學者們傾向支持「非特定牙菌斑假說」。1970 年代後期，厭氧培養技術，分類學及牙周病診斷大幅進步，學者們發現，在成人型牙周炎 (adult periodontitis) 病灶部位，某些細菌的數目的確與健康部位有所不同 (125,95)。於是才傾向支持「特定牙菌斑假說」。有鑒於牙菌斑的細菌種類太多，很難找出單一種致病菌，S.S.Socransky 於 1977 年修正了 Koch 的主張，而提出五點牙周炎病原菌的標準 (133)：1. 此微生物在疾病部位的數目必須高於非疾病部位。2. 消除此微生物，必須可減緩此疾病的進展。3. 此微生物應有與牙周炎發生及進展有關的毒素。4. 細胞免疫或體液免疫必須對此微生物有較高的反應，足以顯示此菌在疾病中的獨特地位。5. 從動物的病理產生試驗中，必須能推論出人類牙周炎的形成。根據這五項標準，1980 年代便已發現 *A. actinomycetemcomitans* (131)，*P. gingivalis* (47)，*P. intermedius* (130)，及 *Campylobacter recta* (47) 等。1980 年代後期，牙周病病原菌的研究，進入了分子生物學的階段。藉由分子生物技術，研究了許多細菌蛋白，內毒素 (endotoxin)，抗原力 (antigenicity) 及其他酵素。

第六節 牙周炎病原菌

根據 S.S.Socransky 的五項準則，目前並未發現有完全符合這五項準則的細菌。不過，這五項準則仍為微生物學家提供了一套方針而找出了數種細菌，作為可能的牙周炎病原菌。在這些最有可能是牙周炎病原的細菌中，牙周囊袋是它們最主要的棲息場所。其中也有一些可在身體其他部位的感染中發現，包括頭，頸部，肺臟，心臟，喉腔，血液，腸胃道等。*P. gingivalis*，*P. intermedius* 和 *A. actinomycetemcomitans* 是目前被研究得較清楚的三個病原。*P. gingivalis* 是成人慢性牙周炎最重要的細菌，而 *A. actinomycetemcomitans* 則被認為是局部性青年型牙周炎的主要病原。*P. intermedius* 則在牙周炎病灶處佔有高比率。其他病原菌在其本身特性及其在各型牙周炎中所扮演的角色等方面的研究數據較少。*F. nucleatum* 是牙周檢體中最常見的細菌。*Eikenella corrodens*，本被認為是口腔外感染，但已被發現於進行性牙周炎病灶處，而且在實驗老鼠可誘發齒槽骨流失

(31, 141). 運動性桿菌 (motile rods) 和螺旋體, 在牙周炎牙周囊袋檢體中, 在暗視野顯微鏡下是很常見的 (76). 運動性桿菌大致可分兩群: 一群是 *Campylobacter curva*, 和 *C. recta*. 另一群是 *Selenomonas spp.* 和 *Centipeda periodontii*. *C. periodontii* 是近年來從慢性成年型牙周炎患者之病灶分離出來, 在健康部位則未曾發現過 (71,154). 本實驗室的研究, 也發現在牙周炎患者患部有 *C. periodontii* 的存在, 而健康者和牙齦炎患者均未發現該菌的存在. 同時, 在口腔中檢出有該菌之病人, 體內對該菌之抗體效價有明顯升高 (154), 顯示 *C. periodontii* 和某些牙周炎應有一定之關連性. 口腔中螺旋體全被歸類在 *Treponema* (104), 只有少數是可培養的, 其中最著名的是 *Treponema denticola*. 螺旋體雖與牙周炎及急性壞死性潰瘍性牙齦炎有密切關係, 但在其種別被歸類前, 很難探討它在牙周炎中所扮演的角色.

(1) *Porphyromonas gingivalis*

革蘭氏陰性, 絕對厭氧, 不產芽胞 (non-sporeforming) 之無運動性桿菌 (non-motile rods) 或球桿菌 (cocci). 細菌細胞在培養液 (broth) 中的大小約為 $0.5 \times 1-2 \mu\text{m}$. 在固體培養基 (solid media) 的細胞是球桿菌或非常短的桿菌. 在血液瓊脂平板 (blood agar plate) 上的菌落 (colony) 的形態是平滑, 光亮, 圓凸型, 直徑 1-2 mm. 年輕菌落呈黃到綠色, 培養到 4 到 8 天時, 顏色變黑, 尤其是在含已溶血的血液瓊脂平板上. 但在不含血的培養基上可能不會產生黑色素. *P.gingivalis* 不發酵醣類, 因此生長不受醣類影響, 但受蛋白水解物 (protein hydrolysates), 如 trypticase, proteose, peptone 和 yeast extract 影響. 在 0.5%-0.8% NaCl 或含氮受質 (nitrogenous substrates), 可加強生長. 生化特性如下: 發酵主產物是 n-butyric acids 和 acetic acids, 及少量的 propionic, isobutyric, isovaleric, 和 phenylacetic acids. 具蛋白酶 (protease), 如 trypsinlike enzyme 和 collagenase. 產 indole, 不產 α -fucosidase, nitrate 不被還原成 nitrite. Starch 和 esculin 不被水解. 細胞能凝集綿羊紅血球 (sheep erythrocyte)(121).

P.gingivalis 長久以來即被認為與牙周炎有密切關係 (47). Ebersole 等人於 1988 年, 以猿猴 (*Macaca fascicularis*) 為模型, 誘發猿猴產生牙周炎, 以了解 *P.gingivalis* 所扮演的角色. 結果猿猴體內抗 *P.gingivalis* 的抗體力價上昇, 而且

有明顯的骨質流失 (56). 而由牙齦炎演變到牙周炎的期間, 抗 *P.gingivalis* 的 IgG 和 IgM 力價上昇, 與病灶部牙齦下牙菌斑中此菌百分比增加的情形吻合 (39). *P.gingivalis* 具有破壞組織的各種蛋白酶和毒素, 如 trypsinlike enzymes. Ebersole 發現缺乏 trypsinlike enzyme 的突變種不具感染力, 而有 trypsinlike enzyme 的野生種則仍具有毒性. 可見此類蛋白酶在牙周炎病因有重要地位. *P.gingivalis* 會抑制吞噬作用 (phagocytosis) 且可分解補體 (complement) 和免疫球蛋白 (immunoglobins), 藉以躲避免疫系統的攻擊 (95,130). 最近也發現, 有些夫妻之間, 檢出有相同基因型 (genotype) 的 *P.gingivalis*, 因此 *P.gingivalis* 可能會傳染 (110,147).

(2) *Prevotella intermedia*

革蘭氏陰性, 絕對厭氧之無運動性桿菌. 細胞通是 0.4-0.7 μm 寬, 1.5-2.0 μm 長, 但有時呈多樣性, 長度甚至長達 12 μm . 在血液瓊脂平板上的菌落呈平滑圓弧狀, 直徑約 0.5-2 mm. 菌落不透明, 培養 2-4 天內, 在短波長紫外光下呈磚紅色螢光. 在厭氧培養 48 小時後, 菌落因培養基之不同而產生褐色, 灰色, 紅棕色或黑色色素. 在含溶血血液的平板上, 色素的產生會比全血平板更快. 色素主要來自原血質 (protoheme) (39).

P.intermedius 可以醱酵醣類, 如 glucose, dexrrin, maltose 和 sucrose. 醱酵產物為 succinic, acetic, isobutyric, isovaleric acids. 不會利用 lactose 和 pyruvate. 不會將 threonine 轉變成 propionate. 血晶質 (hemin) 為生長所必須, 而 Vitamin K 可刺激醱酵作用. 在 6.5% NaCl 下生長受抑制 (55,57).

P.intermedius 可發現於正常牙周的牙齦溝 (9,63), 然而在牙齦炎 (66,81) 和牙周炎也都有高比率的發現 (130). 因此, 不同基因型的 *P.intermedius* 可能參與不同的牙周病: Group A (與 VPI-4197 相似的菌株, 包括標準株 ATCC25611) 與牙周炎有關, 而 Group B (與 VPI-8944 相似的株, 包括標準株 ATCC33563) 則與牙齦炎有關(132).

P.intermedius 的細胞表面具有一些接受器, 可與免疫球蛋白的 Fc 部份結合, 以躲過吞噬作用, 這個接受器可能與一個 65 Kd 的蛋白有關 (69).

(3) *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

革蘭氏陰性，兼性厭氧，無運動性之嗜碳酸 (capnophilic) 桿菌。細胞為短小桿菌 ($0.4 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$)，直或彎曲，而兩端圓形。電子顯微鏡下可觀察到許多胞外小泡，可能是從細胞中釋放出來。初分離的菌株，菌落表面粗糙，有放射狀條紋。而在實驗室中經繼代培養後的菌落，就失去這項特徵。菌落在血液瓊脂平板上為小而灰至白色，半透明，平滑，不溶血。在 5%-10% CO_2 會刺激生長；而液體培養基中加有 sodium bicarbonate (1mg/ml) 也有相同效果。在加有全血或加熱過的血液瓊脂平板都可以生長地很好。*A. actinomycetemcomitans* 可發酵一部份醣類，包括葡萄糖和果糖。發酵產物包括 lactose, sucrose, acetate 和 propionate(132)。

有兩種選擇性培養基可用來鑑定 *A. actinomycetemcomitans*。這兩種培養基以枯草桿菌素 (bacitracin) 為選擇劑，且以 10% CO_2 增殖。Tryptone-soy-bacitracin-vancomycin 瓊脂，可產生白色，半透明帶有星狀條紋的菌落。另一種是含綿羊血，枯草桿菌素和孔雀綠 (malachite)(85)。選擇性培養基鑑定出來的結果，還須進一步以分解過氧化氫 (hydrogen peroxide) 和 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside (MUG) 陽性反應，即具有 catalase 和 β -galactosidase，才能證實。

A. actinomycetemcomitans 是最為人知的牙周炎病原，它是局部性青年型牙周炎 (localized juvenile periodontitis) 和快速進行性牙周炎 (actively progressing periodontitis) 的主要病原 (5,9,155,127)。根據細菌細胞表面多醣體對熱的穩定度，可分成五個血清型 (serotype)(156,108)。但每個個體的口腔中通常只能檢出一種血清型和基因型 (109)。*A. actinomycetemcomitans* 具有許多侵犯人體防衛機制的的能力 (129)。其中獨特的一點是產生白血球毒素 (leukotoxin)，可溶解人類多形核球和單核球 (monocytes)(11) 以躲避吞噬作用。*A. actinomycetemcomitans* 在牙周健康者佔 10%，成人進行性牙周炎佔 30-50%，而局部性青年型牙周炎佔 90% (9,7,1,128,105)。同時，它也能造成身體其他部位的嚴重感染，如心內膜炎 (endocarditis) 和腦，肺及頸部的膿腫 (abscess)(149)。有些夫妻間及子女父母間檢出相同血清型或基因型的 *A. actinomycetemcomitans* (156,2,3,111) 而唾液應是重要媒介，因為它通常也存在唾液中 (8)。

不同菌株的毒力也不同，血清型 c 較流行於牙周健康者，而血清型 b 則常見於牙周炎 (7,10)。但也有些血清型 b 發現於健康牙周而有些血清型 c 發現

於牙周炎。因此，要利用基因型來預測是否會患牙周病，顯然是相當困難 (109)。不過，DiRienzo 仍致力於將此菌分群，並使用一段已選殖 (cloned) 的 DNA 片段當探針，來探測某菌株，以作為危險指數 (risk indicator)。(33)

(4) *Fusobacterium nucleatum*

革蘭氏陰性，厭氧性，非發酵性之無運動性桿菌。細胞呈梭狀，兩端呈尖形，無鞭毛。菌落在血液瓊脂平板上為圓弧，光滑，邊緣不規則或點狀。*F. nucleatum* 不發酵醣類，能量由胺基酸代謝而來，主要代謝終產物為 butyrate。與其他 *Fusobacterium* 的種 (species) 不同處在不能將 lactate 轉變成 propionate。

F. nucleatum 在許多血液瓊脂平板上都能生長地不錯，但很難在藥物感受性試驗所用的培養基上培養，在 trypticase soy 培養基也很難生長 (36,43)。有一種選擇性培養基可用來初分離 *F. nucleatum*：CVE 培養基，含結晶紫 (crystal violet)，erythromycin，*F. nucleatum* 在其上可長出紫色菌落，可明顯區分出 (132)。*F. nucleatum* 常在牙齦下牙菌斑檢體培養出，平均佔同區微生物群的 8-10% (37, 89,38)。它發現於牙周炎的破壞區域，可是在痊癒部位和健康部位也都有發現(38, 37,89)。可能是不同的亞種 (subspecies) 與不同的牙周狀況有關，包括牙齦炎和牙周炎 (132)。

(5) *Selenomonas spp.*

Selenomonas 為革蘭氏陰性桿菌，絕對厭氧，不產芽胞，具運動性。傳統上，此屬下有兩個種：*S. ruminantium*，生存於牛的瘤胃 (rumen)；*S. sputigena*，發現於人類口腔。Moore 等人在 1987 年以 DNA 雜交 (hybridization) 再分出五個新種 (88)。以下分別敘述：

S. sputigena：細胞通常彎曲，1.0 μ m 寬，3-6 μ m 長。新月狀，具有側鞭毛，鞭毛位於彎曲的內側中央部份。具運動性，呈滾動的運動形態。在血液瓊脂平板上的菌落，在培養的兩天內，會由針尖大小長到直徑 0.5 mm，顏色由白到半透明。較老的菌落，中央會鼓起，呈乳酪色，直徑 3-4 mm。*S. sputigena* 發酵 9-19 種醣類，是 *Selenomonas spp.* 中唯一具有 phosphatase 的種。*S. sputigena* 必須生長在含血的瓊脂平板及厭氧環境。在新鮮的液體培養基中 (如 BHI)，補充 L-Cysteine (0.5 mg/ml) 和 sodium bicarbonate (1 mg/ml) 可得到良好生長。*S. sputigena* 生長緩慢，在血液瓊脂平板上須 3-4 天的時間，才能達到對數初期。

S. noxia: 細胞呈新月狀, 寬 1.1 μm , 長 1.1-3.2 μm , 為 *Selenomonas* 最小的種。在 Leifson flagellum 染色法下, 呈現位在彎曲內側中央到兩端的側鞭毛。在血液瓊脂平板上, 菌落為針尖大小到 0.5 mm, 圓形, 平滑, 半透明, 光亮, 無色到黃色。 *S. noxia* 可醱酵醣類, 因此在培養基中加入 glucose, fructose 和 fumarate 會長得較好。它會還原 nutral red, 但不會還原 resazurin。L-Cystein 和 Sodium bicarbonate 有助於生長。 *S. noxia* 分離自牙周炎或牙齦炎病患的牙齦間隙, 及靠近牙周炎患部的牙齦上牙菌斑。

S. flueggeii: 細胞呈彎月形, 1.0-1.3 μm 寬, 3.8-13.9 μm 長。在 Leifson flagellum 染色法下, 呈現位於彎曲內側中央到兩端的側鞭毛。在血液瓊脂平板上, 菌落為針尖大小到 0.5 mm, 圓形, 不透明, 白色光亮, 平滑。 *S. flueggeii* 以醱酵醣類作為能量來源。 Nutral red 還原力弱, 不還原 resazurin, 產氣量由中到大量。 *S. flueggeii* 最初是由牙周炎病人, 牙齦炎病人的牙齦分離出來。

S. diana: 細胞呈新月型, 1.1 μm 寬, 3.2-11.6 μm 長, 側鞭毛, 菌落在血液瓊脂平板上很小, 圓形, 扁平, 透明, 光滑, 灰白色。 *S. diana* 醱酵醣類, 不還原 nutral red 及 resazurin, 不產氣體。 *S. diana* 是中度牙周炎病人牙齦溝及青年型牙周炎患部的牙齦上牙菌斑分離出。在牙齦中, 此菌並無正比關係 (91), 而在牙齦炎中, *S. diana* 在疾病部位和正常部位的數目並無太大差異 (90)。

S. artemidis: 細胞呈彎月形, 1.3-1.7 μm 寬, 3.3-7.2 μm 長, 具側鞭毛。在血液瓊脂平板上, 菌落由針尖大小到直徑 0.5 mm, 圓形, 扁平, 半透明, 平滑光亮, 無色。 *S. artemidis* 可微弱還原 nutral red, 不還原 resazurin。不產氣, 醱酵醣類。 *S. artemidis* 是從牙齦炎和牙周炎病患的牙齦中分離出 (90)。

Selenomonas spp. 由於不易培養, 使得研究困難。在六個種之中, 以 *S. flueggeii* 和 *S. noxia* 在牙周炎所扮演的角色最重要 (6)。 *Selenomonas spp.* 除發現於牙齦外, 也曾一些重症病患的血液培養中發現, 可能的原因是消化道黏膜被破壞和壞死腫瘤組織形成厭氧環境, 但是否由牙周感染進入血液循環, 則尚待研究 (102)。

(6) *Campylobacter recta* & *Campylobacter curva*

C. recta:

革蘭氏陰性，非發酵性，運動性桿菌。細胞小而直，不分枝，0.5 μm 寬，2-4 μm 長，兩端圓形。具有端鞭毛 (polar flagellum)，能快速運動。不產芽胞。在電子顯微鏡下，細胞內膜和外膜通是直而平行的，相隔約 20 nm。沒有明顯的 peptidoglycan 細胞壁層。在外膜表面覆蓋一層六角形，緻密的巨分子次單元，每個次單元約直徑 17 nm (70)。在血液瓊脂平板上的菌落為半透明，大致有三種形態：圓弧狀，直徑約 1 mm；或是凹陷瓊脂平板約直徑 5 mm；或是擴散成 5 mm 直徑大小的菌落。*C. recta* 發酵醣類，因此培養基中加醣類並不會促進生長。在液體培養基中，加入 formate 和 fumarate 可促進生長。*C. recta* 是以氫和 formate 作為能量來源，formate 會被氧化而產生氫氣和二氧化碳。Fumarate 則被還原成 succinate。*C. recta* 是在人類牙齦溝中發現的 (140)。

C. curva :

革蘭氏陰性，非發酵性，運動性桿菌。細胞呈弧形，彎曲，約 0.5-1 μm 寬，2-6 μm 長，但也有螺旋形和直線形的菌體。具有端鞭毛，能作疾速運動。菌落的形態與 *C. recta* 相似，生長條件與生化代謝亦與 *C. recta* 相同，因此很難以生化反應來區分這兩種。但 *C. curva* 能生存於下列藥物中：Jarvis green (0.1 g/L), basic fuchsin (0.032 g/L), oxgall (10 g/L), safranin (0.5 g/L), azure II (0.025 g/L), penicillin (16 $\mu\text{g/L}$), 或 polymixin B (4 $\mu\text{g/L}$), 而 *C. recta* 無法生長，可藉以區別。(142)

C. curva 自人類血液培養及根管中分離出(142)。

C. curva 和 *C. recta* 原與 *W. succinogen* 同屬於 *Wolinella* 屬 (140,142) 但依據 23s rRNA 的組態，發現原 *W. curva* 和 *W. recta* 的 23s rRNA 不同於一般革蘭氏陰性菌 (139)，而較接近 *Campylobacter* (148)，因而這兩個種重新分類到 *Campylobacter* 屬 (138)。*C. curva* 和 *C. recta* 並非絕對厭氧菌，而是微厭氧菌 (microanaerophile)。可由細胞膜含有 cytochrome，及質子轉移受氯化物抑制而證實 (52)。它們在 *Brucella* 培養液中，可生長在 4-10% 以上的氧氣環境中；在 *Brucella* 瓊脂培養基上則可生長於 2-8% 氧氣含量的環境中。21% 以上的氧氣會抑制生長。在厭氧環境中，若沒有供給 fumarate 和 nitrate 作為電子接受者，

一樣無法生長。不過, Asparagine, Aspartate 和 malate 也可作為電子接受者(51)。

C. recta 和其牙周炎病原菌有一些有趣的交互作用: *C. recta* 會產生 protohaem, 可刺激 *P. gingivalis* 和 *P. intermedium* 的生長 (50); *C. recta*, *F. nucleatum*, 和 *Bacteroides forsythus* 三者一起時, 與快速進行性牙周炎有關 (38,136)。

(7)*Centipeda periodontii*

革蘭氏陰性, 絕對厭氧, 運動性桿菌。細胞體長, 彎曲如蛇狀, 通常有三道或以上的彎曲, 兩端為圓形。細胞的彎曲數及程度, 依菌株而異, 但經反覆培養後, 彎曲程度會減少。細胞大小約 0.65 μm 寬, 4-17 μm 長。而較老的細胞則更長, 反覆培養後, 會形鍊狀。*C. periodontii* 具周鞭毛, 細胞越長則鞭毛越多。*C. periodontii* 在電子顯微鏡下, 顯示典型的革蘭氏陰性菌的細胞壁結構, 細胞內膜平滑, 直接與 peptidoglycan 接觸, 外膜不規則, 有波浪狀輪廓。類核體 (nucleoid) 散佈於細胞質內, 內有桿狀而緻密的包涵體 (inclusion)。*C. periodontii* 的鞭毛具有不尋常的基體 (basal body) 結構。它是由五個環(三個在遠端, 兩個在近端)連接一個桿狀中心。基體長度約和細胞壁寬度相等, 約 29nm (16)。此外, 鞭毛會纏繞於細胞體周圍 (84)。

在血液瓊脂平板上, 菌落呈扁平, 透明, 不規則。次培養後轉為灰色, 表面有細緻顆粒。菌落擴散相當快, 三天內可涵蓋整個平板表面 (149)。*C. periodontii* 是絕對厭氧, 生長於複合培養基 (complex media) 如 BHI, Brucella。發酵醣類有 fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannitol, melibiose, raffinose, sorbitol 和 sucrose。發酵終產物主要是 propionic acid。不具 catalase, oxidase, urease, 不產 H_2S , indole。可還原 nitrate, 可利用 o-nitro-phenyl- β -D-galactopyranoside。不溶血。

C. periodontii 分離自成人型牙周炎和青年型牙周炎病患患部, 健康部位尚未發現有該菌存在, 而正常個體也未檢出此菌。(71,154)。Chan 和 Chien 在近期更進一步進行血清學的研究, 除了證實 *C. periodontii*, 和牙周炎有統計學上的關連性, 且同時也發現檢出有 *C. periodontii* 的患者, 血液中的抗 *C. periodontii*

抗體較健康者和牙齦炎患者的抗體效價高出許多，更加強此菌在牙菌病病原的地位。

C. periodontii 的脂多醣體 (lipopolysaccharide) 有相當強的免疫活性，可活化老鼠的 splenocyte，刺激老鼠周邊巨噬細胞分泌間白素-1 (interleukin-1) (64)。 *C. periodontii* 的細胞抽出物，有抑制免疫系統的能力，但不是所有菌株都具有這個能力。 *C. periodontii* 的細胞抽出物可抑制人類 B-,T- 淋巴球，單核球和 erythrocytes 對 mitogen 的活化，但多形核球不受影響 (132)。

第七節 Salicylanilide 衍生物

酚類 (phenol) 和帶有酚類官能基 (phenolic group) 的化合物，早已被知道具有抗黴菌的作用 (101,21)。在這為數甚多的酚類化合物中，最常被用來治療黴菌感染的是 phenylmercuric nitrate, cresol, m-cresyl acetate, benzoic acid, p-hydroxybenzoic acid, salicylic acid 等。Salicylic acid, 眾所周知，是阿司匹靈前驅物。當 salicylic acid 與 aniline 進行縮合反應 (condensation) 之後的產物，即是 salicylanilide。由於兩個 phenolic group 的化合物，也具有抗黴菌效果(19)，因此 salicylanilide 也經實驗具有抑制黴菌的作用：也能抑制 *Candida albicans* (100), *Trichophyton*, *Achorion* (96) 等黴菌。Salicylanilide 作成 2% 軟膏，毒性低，不會對皮膚造成傷害 (107)，臨床上用來治療黏液膜 (mucous membrane) 的黴菌病 (mycosis)(107)。Salicylanilide 不但可以抑制黴菌，在實驗中，它對 *Staphylococcus aureus* 也有抑制作用 (100)。為了加強 salicylanilide 的抗菌效力，發展了大批的鹵化衍生物 (halogenated derivative)，而其中的確有些比 salicylanilide 更具抗黴菌及抗細菌的能力(96)。在這些 salicylanilide 鹵化衍生物中，TBS, 3,4',5-tribromosalicylanilide 是當中著名的一個。TBS 最初被用來當消毒肥皂的成份，另外許多工業產品中也都有它 (67)，但後來發現 TBS 會使一些人導致光照皮膚炎 (photodermatitis)(41,97)，美國 FDA 禁用此類鹵化衍生物 (98)。藥化專家因而轉而尋求新的 salicylanilide 的其他衍生物，以期能得到使用更安全且具更強的抗微生物作用。

目前，salicylanilide 衍生物被使用的最多的是在獸醫界。1966 年，oxyclozanide

被發現可對抗牛羊肝吸蟲 (*Fasciola hepatica*) (17)後, 就發展出一大堆抗吸蟲藥. 這些抗吸蟲藥都有 salicylanilide 的結構, 並擁有共同的作用模式, 藥動力 (pharmacokinetics) 和毒性. 目前, 最常被用的是 oxyclozanide, brotianide, rafoxanide 和 closantel (83).

所有的 salicylanilide 都有抑制牛羊肝吸蟲的能力 (4), 有些則尚可對抗許多噬血線蟲 (haematophagous nematodes)(40,144). 有些還可對抗節肢動物 (144,40).

Salicylanilide 的作用機制, 一般認為是作為氧化磷酸化的去伴合劑 (oxidative phosphorylation uncoupler)(144,59). 在呼吸鏈中的氧化磷酸化反應與 ATP 的合成反應, 是同時作用的, 將這種成對關係破壞的物質, 即是去伴合劑 (uncoupler). 由於 salicylanilide 是親脂性的 (lipophilic), 所以它能插入脂質雙層 (lipid bilayer) 中, 使得質子 (proton) 能大量流出膜外, 即所謂的 protonophore. 在正常電子傳遞鏈傳遞電子時, 會有大量質子累積, 造成質子濃度梯度, 質子濃度梯度的能量轉移給 ATPase 以合成 ATP. Salicylanilide 破壞質子濃度梯度, 使 ATP 無法合成, 因而電子傳遞鏈氧化磷酸化所得的能量無法配合 ATP 的合成. 此外, salicylanilide 也被發現有抑制 succinate dehydrogenase 的活性和抑制 fumarate reductase 的活性(35).

Salicylanilide 衍生物除了作為驅蟲藥, 抗真菌, 抗細菌藥外, 另外還有應用於實驗上的用途. Salicylanilide 作為一種 protonophore, 可破壞細胞膜內的離子濃度, 而離子濃度則是細胞膜上運送各種離子甚至胺基酸的能量來源. 因此, 常被應用在膜電位變化或離子, 胺基酸的運輸之研究 (58,86,15). 其中, 最著名的是 TCSA, 3,3',4',5'-tetrachlorosalicylanilide. 另一研究上的應用, 是 salicylanilide 鹵化衍生物, 用以誘發產生光過敏, 以研究光過敏的機制, TCSA 及前述的 TBS 均常被使用 (18,151,143).

第二章 動機與目的

Salicylanilide 的衍生物具有許多生物活性，例如，抗寄生蟲 (83)，抗黴菌 (150)，抗軟體動物 (94) 還有利膽劑 (124)。這些不同作用，來自於官能基的改變 (152)。但這些作用中，迄今實際運用的卻只有少數，其中最常應用的是抗寄生蟲藥，用在牛、羊等家畜的寄生蟲感染。Closantol，即是非常有效的抗牛羊肝吸蟲的藥 (12)。而在醫學上，則作為抗黴菌藥。其他一些是特殊運用，如在加拿大，曾用以毒殺湖中的八目鰻 (152)；p-oxyphenylsalicylamide 用在 *Pseudomonas aeruginosa* 的選擇性培養基 (124)。

由於 salicylanilide 衍生物有抗菌作用，因此有學者即著手測試不同官能基衍生物的抗菌效果，以期能開發出新的抗菌藥，以應付抗藥性菌株的出現 (152)。其中，3,3',4',5- tetrachlorosalicylanilide 能有效抑制革蘭氏陰性菌和革蘭氏陽性菌 (44)。但是這些能有效抑菌的藥物中，有些毒性相當強，例如，5,2'-dichloro-4'-nitrosalicylanilide 和 salicyl-3'-nitroanilide 能有效地抑制 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa*, 和 *S. aureus*(29)，但在 500 mg/kg 的劑量時，足以殺死一隻老鼠 (45)。另外，也曾經發生過因 closantel 過量而導致一名孩童失明的例子 (20)。因此，如何在殺菌與毒性之間取得平衡，也是研究的重點之一。

既然 salicylanilide 能抗菌，因此就有學者想藉 salicylanilide 衍生物來抗牙斑的形成。3,5,4'-tribromosalicylanilide 被發現能有效地抑制 *A. viscosus*, *A. naeshundii*, *S. mutans*, 和 *S. sanguis* 等牙菌斑形成的啓始細菌；Dibromsalicil 也有非常強的抗 *A. viscosus* 的能力 (42)。Katz 等人實際運於動物實驗，也證實 3,5-dibromo-3'-trifluoromethylsalicylanilide 有抑制牙菌斑的形成 (60)。5-(alkylsulfonyl)salicylanilides 具有抗牙菌斑的潛力 (26)。

Baquero 在 1992 年的調查，發現由於抗生素的使用，使得與人類接觸的細菌，逐漸朝向具有抗生素耐受性 (13)。特別是 β -lactam 的抗生素，常須要伴隨 β -lactamase 抑制劑才有作用。因此新的抗菌藥物的研發，可說是刻不容緩。Salicylanilide 對細菌而言，要發展出耐受性是比對抗生素還慢 (96,106)。同時，只要藉由改變官能基及其位置，就可以開發出對抗不同細菌的藥物。因此 salicylanilide 是相當值得開發成一種新藥物，以因應日漸增加的抗生素耐受性細

菌. 本實驗的目的有二: 第一, 我們篩檢 22 種 salicylanilide 衍生物是否有抑制牙菌斑形成的能力, 亦即是否有能力抑制 *Streptococcus* 與牙菌斑形成有關的細菌. 第二, 我們要測試此類藥物能否抑制牙周炎病原.

第三章 材料與方法

一. 培養基

1. BHI 瓊脂

Brain-Heart Infusion 0.037 g/ml

Agar 0.015g/ml

滅菌後，待冷卻至 48°C 時，加入血晶質溶液 1%，綿羊血 5%，均勻混合後，分裝至培養皿。

2. BHI 培養液

BHI 0.037g/ml

Yeast extract 0.005g/ml

Resazurin 0.4%

Cysteine-HCl·H₂O 0.5mg/ml

Hemin solution 1%

混合後分裝至試管，滅菌。

3. Trypticase soy 瓊脂

Trypticase soy 0.03g/ml

Yeast extract 0.01g/ml

Bacto-agar 0.015g/ml

滅菌後，分裝至培養皿。

4. Trypticase soy 培養液

Trypticase soy 0.03g/ml

Yeast extract 0.01g/ml

混合後分裝至試管，滅菌。

5. Trypticase soy hemin 培養液

Trypticase soy	0.03g/ml
Yeast extract	0.01g/ml
Hemin solution	1%

混合後分裝至試管，滅菌。

6. Trypticase soy 血液瓊脂

Trypticase soy	0.03g/ml
Yeast extract	0.01g/ml
Agar	0.015g/ml

滅菌後，加入綿羊血 5%，血晶質溶液 1%，混合後分裝至培養皿。

7. Formate/fumarate BHI 瓊脂

Brain-Heart Infusion	0.037 g/ml
Agar	0.015g/ml
Sodium formate	0.2%
Sodium fumarate	0.3%

滅菌後，待冷卻至 48°C 時，加入血晶質溶液 1%，綿羊血 5%，均勻混合後，分裝至培養皿。

8. Formate/fumarate BHI 斜面 (slant) / 培養液

BHI	0.037g/ml
Yeast extract	0.005g/ml
Sodium formate	0.2%
Sodium fumarate	0.3%
Resazurin	0.4%
Cysteine-HCl·H ₂ O	0.5mg/ml
Hemin solution	1%
Agar	1.5%

加熱後分裝至試管，滅菌；待冷卻至 48°C 時，加入綿血 5%，傾斜置放，冷卻凝固後，加入 formate/fumarate BHI broth.

9. FEA-*Fusobacterium* selection medium

Brucella agar	0.043g/ml
Na ₂ HPO ₄	5mg/ml
KH ₂ PO ₄	1mg/ml
MgSO ₄	0.1mg/ml
Hemin solution	1%
Polysorbate	1%

滅菌後，待冷卻至 48°C 時，加入 vancomycin (終濃度 5μg/ml), neomycin (終濃度 5μg/ml), erythromycin (終濃度 5μg/ml), egg yolk suspension 2.5%.

10. *Porphyromonas gingivalis* selective medium

Columbia agar	0.95%
Agar	0.65%

滅菌後，冷卻至 48°C 後，加入綿羊血 5%，血晶質溶液 1%，colistin sulfate (終濃度 10μg/ml), nalidixic acid (終濃度 15μg/ml), bacitracin (終濃度 10μg/ml), 分裝至培養皿。

11. TSBV 瓊脂

Trypticase soy	0.03g/ml
Agar	0.015g/ml

滅菌後，冷卻至 48°C 時，加入馬血清 10%，bacitracin (終濃度 75μg/ml), vancomycin (終濃度 5μg/ml), 分裝至培養皿。

12. Mitis-Salivaris 瓊脂

Peptone	1%
Agar	1.5%
Sucrose	5%
Trypan blue	75μg/ml
Crystal violet	0.8μg/ml
Potassium tellurite	10μg/ml

二. 待測藥物

1. ZYC-8000 4-methoxy-N-(4-methoxy-phenyl)-benzamide
2. ZYC-8001 4-methoxy-N-(3-methoxy-phenyl)-benzamide
3. ZYC-8003 N-(2,4-dimethoxy-phenyl)-2-methoxy-benzamide
4. ZYC-8004 N-(3,5-dimethoxy-phenyl)-2-methoxy-benzamide
5. ZYC-8005 N-(2,5-dimethoxy-phenyl)-2-methoxy-benzamide
6. ZYC-8006 N-(2,4-dimethoxy-phenyl)-3-methoxy-benzamide
7. ZYC-8007 N-(3,5-dimethoxy-phenyl)-3-methoxy-benzamide
8. ZYC-8008 N-(2,5-dimethoxy-phenyl)-3-methoxy-benzamide
9. ZYC-8009 3-methoxy-N-(4-methoxy-phenyl)-benzamide
10. ZYC-8010 3-methoxy-N-(3-methoxy-phenyl)-benzamide
11. ZYC-8011 3-methoxy-N-(2-methoxy-phenyl)-benzamide
12. ZYC-8012 N-(2,5-dimethoxy-phenyl)-4-methoxy-benzamide
13. ZYC-8013 N-(3,5-dimethoxy-phenyl)-4-methoxy-benzamide
14. ZYC-8014 N-(2,4-dimethoxy-phenyl)-4-methoxy-benzamide
15. ZYC-8015 3-methoxy-N-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-benzamide
16. ZYC-8016 4-methoxy-N-(2,3,4-trimethoxy-phenyl)-benzamide
17. ZYC-8017 2-methoxy-N-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-benzamide
27. ZYC-8027 2-hydroxy-5-nitro-benzoic acid methyl ester
29. ZYC-8029 5-(2,5-dimethoxy-benzylamino)-2-hydroxy-benzoic acid methyl ester
30. ZYC-8030 2-hydroxy-5-(2,5-dimethoxy-benzoylamino)-benzoic acid methyl ester
31. ZYC-8031 2,5-dihydroxy-benzoic acid methyl ester
32. ZYC-8032 2,5-dimethoxybenzoic acid 4-hydroxy-3-methoxycarboxy-phenoxy ester

22 種藥物之結構式於圖-11.

三. 受測細菌

1. *Streptococcus sanguis* ATCC 25175
2. *Streptococcus mutans* ATCC 10556
3. *Selenomonas artemidis* ATCC 43528

4. *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351
5. *Centipeda periodontii* ATCC 35019
6. *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277
7. *Prevotella intermedia* group A ATCC 25611
8. *Prevotella intermedia* group B ATCC 33563
9. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b ATCC 29522
10. *Campylobacter curva* ATCC 35224

四. 細菌培養

保存之 *S. sanguis* ATCC 25175, *S. mutans* ATCC 10556, *S. artemidis* ATCC 43528, *F. nucleatum* VPI 5351, *C. periodontii* ATCC 35019, *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. intermedia* group A ATCC 25611, *P. intermedia* group B ATCC 33563, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522, 及 *C. curva* ATCC 35224 等 10 種菌種從 -80°C 冰箱取出, 待融解後, 取 $100\mu\text{l}$ 菌液滴於新鮮的 BHI 血液瓊脂上, 每種細菌培養兩片, 因此用去 $200\mu\text{l}$. 剩餘 $800\mu\text{l}$ 菌液培養新鮮的 BHI 培養液 (BHI broth) 5 ml. 瓊脂平板和培養液分別培養於厭氧培養箱 (義興 YH5959, 台灣), 在氫氣 5%, 二氧化碳 10%, 氮氣 85% 的氣體條件下, 37°C 培養 5-7 天. 經鑑定無誤後, 每 5-7 天次培養於 BHI 血液瓊脂平板和 BHI 培養液, 維持細菌生長.

五. 細菌鑑定

S. sanguis ATCC 25175 和 *S. mutans* ATCC 10556: 分別培養於 BHI blood agar 和 Mitis-Salivaris agar 選擇性培養基, 觀察溶血性和菌落形態, 配合相位差顯鏡 (phase contrast microscope, Nikon UFX-II) 直接鏡檢.

S. artemidis ATCC 43528: 培養於 BHI 培養液, 相位差顯微鏡直接觀察其形態和運動形態.

F. nucleatum VPI 5351: 培養於 BHI 血液瓊脂平板和 FEA-*Fusobacterium* 選擇性培養基, 並配合相位差顯微鏡觀察形態.

C. periodontii ATCC 35019: 培養於 BHI 血液瓊脂, 將菌液沿培養中央劃一直線, 觀察其擴散運動, 顯微鏡下的形態是主要依據.

P. gingivalis ATCC33277: 培養於 BHI 血液瓊脂 和 *Porphyromonas gingivalis* 選擇性培養基. 在培養 5-7 日後, 觀察菌落顏色, 並觀察菌落在 UV 燈下是否有紅色螢光. 顯微鏡鏡檢同樣需要.

P. intermedius ATCC 335623 及 ATCC 25611: 培養於 BHI 血液瓊脂, 5-7 日後觀察菌落顏色和菌落在 UV 燈下的顏色, 配合顯微鏡觀察.

A. actinomycetemcomitans ATCC 29522: 培養於 BHI 血液瓊脂 和 TSBV 瓊脂. 顯微鏡觀察形態.

C. curva ATCC35224: 培養於 BHI 血液瓊脂, 顯微鏡觀察其形態及運動方式.

六. 待測藥物處理

所有待測藥物均以 10 mg/ml 濃度溶解於 Dimethylsulfoxide (DMSO) 中.

七. 測試前的細菌培養

所測細菌均以適當接種量培養於 BHI 培養液中, 以確保 24 小時後能達到對數期.

八. 藥物測試

測試藥物時, *S. mutans* ATCC 25175 和 *S. snguis* ATCC10556 以 Trypticase soy 培養液培養. 牙周炎病原菌因營養需求而用 Trypticase soy hemin 培養液. 細菌分成組: 實驗組及對照組. 實驗組: 在每管 2ml 的培養液中, 加入 20 μ l 的待測藥物, 使終濃度為 100 μ g/ml. 加入對數期中的菌液, 接種量和培養時間依細菌而異, 表列於表-1. 待測藥物共 22 種, 每一種藥物測兩次, 所以共需要 44 管 培養液. 對照組: 於 2 ml 培養液 中加入菌液, 接種量和培養時間同表-1. 加 20 μ l DMSO, 不加藥物. 此外, 還要有一組空白對照組: 2ml 培養液 中加入藥物 20 μ l, 不加細菌. 三組經培養於 37°C 後, 各取 200 μ l 的菌液於 96 孔微量平板 (microplate) 內, 以比色機 (DYNATECH MR4000) 讀取其 O.D.590 的吸光值.

九. 細菌外表觀察

為比較細菌在藥物影響下之形態是否有所不同，實驗組及對照組均以相差顯微鏡直接觀察。培養液中的細菌，以接種環取一接種環的量，塗抹於載玻片上，塗開後蓋上蓋玻片，不須染色，直接置於顯微鏡下觀察並照相。

十. 50%抑制率之最低抑制濃度測定

Salicylanilide 衍生物由 100 $\mu\text{g/ml}$ 兩倍稀釋，依次為 50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 等四個濃度。細菌在 salicylanilide 衍生物 100 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度下，被抑制 50%者，以同樣方法測試 50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 等四種濃度，以求其 50%抑制率的最低濃度。

第四章 結果

一. 細菌培養

S. sanguis ATCC25175, *S. mutans* ATCC10556, *S. artemidis* ATCC43528, *F. nucleatum* VPI5351, *C. periodontii* ATCC35019, *P. gingivalis* ATCC33277, *P. intermedius* group A ATCC25611, *P. intermedius* group B ATCC33563, *A. actinomycetemcomitans* ATCC29522, 及 *C. curva* ATCC35224 等 10 種細菌從 80°C 冰箱取出後, 在適當培養條件下, 可達到對數初期. 為確定細菌的正確性及純度, 必須經過鑑定過程, 以確知菌種有無他菌污染.

各菌鑑定結果如下:

(1) *S. sanguis* ATCC25175

S. sanguis ATCC25175 菌種以一接種環 (loop) 的量, 即可在 BHI 血液瓊脂和 BHI 培養液經隔夜培養而達到對數初期. 在 BHI 血液瓊脂上的菌落初期如針尖大小, 顏色為灰色或綠色, α -溶血. 從 BHI 血液瓊脂上取一單一菌落, 再培養於 Mitis-Salivaris agar, 隔夜培養後, 菌落會產生一種聚合物黏在平板上, 這是 *S. sanguis* 在 Mitis-Salivaris 瓊脂上的特性. 在相位差顯微鏡下, *S. sanguis* 細胞呈卵圓型. 偶有桿狀, 排列成鏈狀 (圖-1). 由於 *S. sanguis* 係屬兼性厭氧細菌, 因此可培養於一般培養箱, 二氧化碳 (5%) 培養箱和厭氧培養箱.

(2) *S. mutans* ATCC 10556

從 *S. mutans* ATCC 10556 菌種中取一接種環的量, 經隔夜培養於 BHI 培養液和 BHI 血液瓊脂, 即可達到對數初期. 在 BHI 血液瓊脂上, 可見直徑 0.5-1 mm 的菌落, α -溶血或 γ -溶血. 培養於 Mitis-Salivaris 瓊脂時, 因有 sucrose 的存在, *S. mutans* 會製造細胞外多醣體, 使得菌落變成白色不透明而且表面粗糙, 不同於其他 *Streptococcus* 的特徵. 在相位差顯微鏡下, 可見 *S. mutans* ATCC 10556 細胞呈卵圓狀, 有者呈桿狀, 排成短鏈狀, 大小約 0.5-0.75 mm, 略小於 *S. sanguis* (圖-2), *S. mutans* 為兼性厭氧, 但在厭氧環境或有 5-10% 二氧化碳下生長最佳, 一般環境下生長不佳.

(3) *S. artemidis* ATCC 43528

保存菌液 100 μ l 接種於 BHI 血液瓊脂, 800 μ l 接種於 BHI 培養液中. 經 4-7

日的厭氧培養後，可生長到對數期。*S. artemidis* ATCC 43528 在 BHI 血液瓊脂上的菌落，在初期時(1-3 日)非常小，約如針尖。4-7 日後，菌落逐漸變大，白色不透明，圓弧光滑。*S. artemidis* 目前並無適用的選擇性培養基，但因具運動性且細胞形狀極其特殊，可用相位差顯微鏡直接觀察，為輔助鑑定：細胞為桿狀，彎曲如彎月狀(圖-3)。*S. artemidis* 細胞大小，在 *Selenomonas* 中，直徑是最大的(1.5 μ m)，長度不一，整體而言，是 *Selenomonas* 中體型較大者。運動性為標準的 *Selenomonas* 的運動方式：由於是單側鞭毛，使細胞循直線前進，與 *C. periodontii* 不特定方向或 *C. curva* 的快速運動不同。*S. artemidis* 運動時，大部份細胞以垂直於水平面的角度運動，如同「站著」運動。*S. artemidis* 是極挑剔的絕對厭氧細菌，培養時均須新鮮培養基，方可順利培養。

(4)*F. nucleatum* VPI 5351

F. nucleatum VPI 5351 菌種 100 μ l 接種於 BHI 血液瓊脂 及 FEA-*Fusobacterium* 選擇性培養基，800 μ l 接種於 BHI 培養液中。37°C 厭氧培養約 2-4 日後，瓊脂平板上可見圓形，透明，圓弧光滑的菌落。選擇性培養基對 *F. nucleatum* 並無抑制現象，但另一種選擇性培養基 -- CVE 培養基，對 *F. nucleatum* 有抑制性，但因形成紫色菌落，較方便辨認。在相位差顯微鏡下，可見兩端尖狀，中央稍微膨大的細胞體，不具運動性，有些細胞在細胞內可見到幾個類似核的物質(圖-4)。*F. nucleatum* 極易於顯微鏡下確認，生化反應 indole(+), MUG(-)，可證實是 *F. nucleatum*。

(5)*C. periodontii* ATCC 35019

C. periodontii ATCC 35019 菌種 800 μ l 接種於 BHI 培養液，約 2-3 日即達到對數期。在 BHI 血液瓊脂上，約 2-3 日可看見正在擴散中的菌落。單一菌落為扁平，灰色，直徑約 2 mm，不溶血。在相位差顯微鏡下，可見蛇形的螺旋狀桿菌，一般細胞體約有 2-3 道彎曲(圖-5)，具運動性。培養於培養液中的，有者可見周鞭毛，但培養於瓊脂平板上的，無法看見鞭毛。由於 *C. periodontii* 極特殊的形態，幾乎可由顯微鏡觀察，即可確認。初期培養的 *C. periodontii* ATCC 35019 運動性相當強，但在幾次的次培養後，運動性會逐漸消失。

(6)*P. gingivalis* ATCC 33277

P. gingivalis ATCC 33277 的生長相當緩慢，通常保存菌液 100 μ l 接種於 BHI

血液瓊脂上，約需一周或以上的時間才會長出菌落。在 BHI 培養液者較快，約 4-5 日。較年輕的菌落為淡黃色，但隨菌落的老化，顏色轉為深褐色，甚至最後變為黑色，尤其是在含已溶血的血液瓊脂平板上，是典型的產黑色素細菌。 *P. gingivalis* 的黑色菌落，在短波長 UV 光下不會產生螢光，藉以與其他產黑色素細菌區分。顯鏡微下的細胞形態為短小桿菌，或是球桿菌，無運動性（圖-6）。由於 *P. gingivalis* 不發酵醣類，因此培養基中的醣類無作用，但如加入 trypticase soy 等蛋白質則可促進生長。

(7) *Prevotella intermedius* ATCC 25611 及 ATCC 33563

P. intermedius ATCC 25611 及 ATCC 33563 的保存菌液 100 μ l 接種於 BHI 血液瓊脂上，約 4-7 日可長出菌落。菌落在初期時（4-7 日）是灰色到黃色，透明，圓弧光滑，隨培養時間的增加，會轉變成暗褐色，到了晚期（7 日以後）會變成黑色。在短波長 UV 燈下，菌落有磚紅色螢光，再加上 MUG(-)，可確認無誤。顯微鏡下為無運動性，細絲狀桿菌，或球桿菌（圖-7,8）。Group A 和 group B 的鑑定，則須藉免疫螢光法。

(8) *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522

A. actinomycetemcomitans ATCC 29522 保存菌液 100 μ l 接種於 BHI 血液瓊脂及 TSBV 瓊脂上，前者培養於厭氧培養箱，後者培養於二氧化碳(10%)培養箱。約 3-4 日後，可長出菌落。菌落小，約 1mm，無色到灰色，透明，圓形，圓弧光滑，不溶血。TSBV 瓊脂上的菌落，呈白色，半透明，由於不是初分離的菌種，因此無法觀察到 *A. actinomycetemcomitans* 典型的菌落上的星形條紋。TSBV 瓊脂含有 bacitracin 和 vancomycin，可抑制其他細菌，且 TSBV 瓊脂不含綿羊血，因此極易與 *A. actinomycetemcomitans* 混淆的 *Hemophilus* 無法生長，因其須要 X-因子和 V-因子。相位差顯微鏡下，*A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522 細胞非常小，呈球桿菌狀，不具運動性（圖-9）。培養於培養液中，加入 sodium bicarbonate (1mg/ml)，可促進生長。在培養液中，菌落給終沉澱在底部。

(9) *C. curva* ATCC 35224

C. curva ATCC 35224 的保存菌液 100 μ l 接種於 formate/fumarate BHI 血液瓊脂上，約 2-3 日可長出菌落。菌落細小，直徑約 0.5-1 mm，無色到灰色，透明，不溶血。在相位差顯微鏡下，細胞呈細小桿狀，彎曲，有者呈螺旋狀（圖-10）。具運

動性，往往於一直線兩端反覆來回振盪，是 *C. curva* 和 *C. recta* 的運動特徵。老化的細胞則不易觀到運動性。*C. curva* ATCC 35224 培養在培養液中，若能加入含綿羊血 (5%) 的瓊脂，可生長得更好。菌落在培養液中，往往凝結成團狀，沉澱於底部。

二. 藥物感受性試驗

本實驗係比較加藥和不加藥的細菌生長濃度，以了解藥物對細菌抑制力強弱。我們以吸光值代表細菌濃度，然而，培養液本身就有吸光值；加入藥物後，有些藥物如 ZYC-8006, ZYC-8008 等會使吸光值增加。因此，必須要有一組只有藥物而無細菌的培養液，作為空白對照組。實驗組培養後所測得的吸光值，減去該藥物空白對照組的吸光值，即代表某細菌在此藥物影響下的濃度。當然，不加藥物的對照組，也必須減去其空白對照組的吸光值，才能代表此菌在沒有藥物影響，正常的生長濃度。實驗組的吸光值，除以對照值的吸光值，即是存活百分比 (survival percentage)。反之，即是抑制百分比 (inhibitory percentage)。

$$\text{抑制百分比} = 100\% - \frac{\text{實驗組 O.D. 值} - \text{空白對照組 O.D. 值}}{\text{控制組 O.D. 值} - \text{空白對照組 O.D. 值}} \times 100\%$$

S. sanguis ATCC 25175, *S. mutans* ATCC 10556, *S. artemidis* ATCC 43528, *F. nucleatum* VPI 5351, *C. periodontii* ATCC 35019, *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. intermedium* group A ATCC 25611, *P. intermedium* group B ATCC 33563, *A. actinomycetemcomitans* serotype b ATCC 29522 及 *C. curva* ATCC 35224 等口腔細菌受 22 種 salicylanilide 衍生物的抑制百分比及吸光值列於表-2 至表-11。表-12 總結十種細菌受 22 種 salicylanilide 衍生物抑制百分比。

十種口腔細菌當中，*S. sanguis* ATCC 25175 和 *S. mutans* ATCC 10556 這兩種參與形成牙菌斑及造成齲齒的革蘭氏陽性，兼性厭氧菌，不會被這 22 種 salicylanilide 衍生物所抑制。在牙周炎病原菌中，22 種 salicylanilide 衍生物所造成的影響不一，但可明顯看出 *F. nucleatum* VPI 5351 和 *P. intermedium* Group B

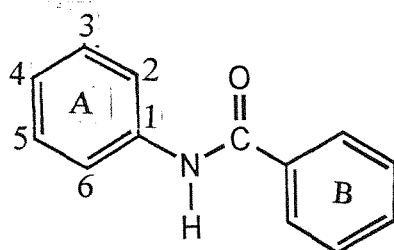
ATCC 33563 對 salicylanilide 衍生物有相當強的感受性. 22 種 salicylanilide 衍生物中, 以 ZYC-8006 最具抑菌效果, 幾乎可完全抑制 *F.nucleatum* ATCC VPI 5351 和 *P.intermedius* Group B ATCC 33563 另外, ZYC-8007 和 ZYC-8013 也有不錯的效果.

為了解這 22 種 salicylanilide 衍生物的最低抑制濃度, 我們將這 22 種 salicylanilide 衍生物由 100 $\mu\text{g/ml}$ 兩倍稀釋, 依次稀釋為 50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 等四個濃度. 我們以 50%抑制率為標準, 大於 50%以上抑制率者, 我們視藥物在此濃度下有制菌效力. 因此, 我們選擇有抑制效力的最低濃度作為最低抑制濃度. 結果表列於表-13. 毫無疑問的, ZYC-8006 對 *F.nucleatum* VPI 5351 和 *P.intermedius* Group B ATCC 33563 有最低的抑制濃度, 分別是 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 和 6.25 $\mu\text{g/ml}$.

由於結果顯示 *F. nucleatum* ATCC VPI 5351 對這 22 種藥物有較高的感受性, 因此我們比較了 *F. nucleatum* VPI 5351 在有藥物和沒有藥物的細胞形態是否有所不同. 結果顯示, 在這 22 種藥物中, 沒有一種對 *F. nucleatum* VPI 5351 形態有明顯的影響, 因為細菌的細胞體並沒有因加入藥物而改變形態, 只能看出細菌數量明顯變少 (圖.12-23).

第五章 討論

本實驗所測試的 22 種 salicylanilide 衍生物 (圖-11), 大致可分成三類: 1. ZYC-8000 到 ZYC8017, 取代基為 methoxy group. 2. ZYC-8027 和 ZYC-8031, 只有一個苯環. 3. ZYC-8029, ZYC8030, 和 ZYC-8032, 具有 hydroxy group 和 methoxycarboxy group. 在第一類中, 又可歸納出 2 個 methoxy group (ZYC-8000, ZYC-8001, ZYC-8009, ZYC-8010 和 ZYC-8011), 3 個 methoxy group (ZYC-8003 ~ ZYC-8008, ZYC-8012 ~ ZYC-8014) 及 4 個 methoxy group (ZYC-8015 ~ ZYC-8017). 首先, 我們可發現, 具有兩個 methoxy group 及具有四個 methoxy group 這兩組效果不佳. 而具有三個 methoxy group 的這一組則又因取代基位置不同而效果也各異. 這一組我們也分別就兩個苯環上取代基位置來討論.



就 B 環而言, 在鄰位 (para-) (ZYC-8003, ZYC-804, ZYC-8005) 和對位 (ortho-) (ZYC-8012, ZYC-8013, ZYC-8014) 的效果不佳, 而在間位 (meta-) (ZYC-8006, ZYC-8007, ZYC-8008) 效果較佳, 尤其是 ZYC-8006, 幾乎可完抑制 *F. nucleatum* VPI 5351 和 *P. intermedium* Group B ATCC 33563. 就 A 環來看, 有 [2-,4-], [3-,5-] 和 [2-,5-] 三種形式, 可是三種形式中的每一種, 並沒有一致性的效果. 以 [2-,4-] 這一種形式為例, ZYC-8006 效果佳, 而 ZYC-8003 和 ZYC-8014 的效果則差之 ZYC-8006 甚遠. 因此, 在第一類的藥物中, B 環上的間位對抑制細菌的能力相當重要, 而 A 環相對來說就較不重要. 在 Singh 的 5-chloro-3'-nitro-4'-substituted salicylanilides 研究中, 認為 A 環上 2-, 4- 位置是重要的 (123), 和本實驗結果相似. 但和 Singh 不同的是, Singh 認為較高的電子密

度較有抑菌效果，但我們的結果顯示，四個 methoxyl group 的抑制效低於三個 methoxy group。這可能與位置有關，因為 Singh 係在同一位置上置換不同的官能基，而我們的實驗則是在不同位置的相同官能。Salicylanilide 若在對位或鄰位接上 methyl group，methoxy group 或是 nitro group 可增加其抑制細菌的能力 (28)，但我們的實驗結果，在間位上置換成 methoxy group，似乎較具抑制細菌的能力。可能是因為在 B 環上的間位的 methoxy group 使其親脂性較佳之故。

在第二類中，ZYC-8027 較 ZYC-8031 的效果好，兩者在結構上的差別，僅同一位置上不同官能基，ZYC-8027 是 nitro group，而 ZYC-8031 是 hydroxy group。Nitro group 是拉電子基 (electron-withdrawing)，而 hydroxy group 是推電子基 (electron-donating)。拉電子基對抗菌活性較有幫助。

在第三類中，三個藥物各有作用，ZYC-8029 ZYC-8030 可抑制 *P. intermedius*，對 *F. nucleatum* 效果差，而 ZYC-8032 則反之。這可能是因能是細菌對這三種藥物的吸收能力不同或是有其他途徑會特別抑制細菌。特別是 ZYC-8032，因結構式與其他的 salicylanilide 衍生物差異較大，由 amino 變成 ester。其化學性質可能改變相當大，抑制細菌的機制可能就有不同。

總括而言，22 種 salicylanilide 衍生物，對革蘭氏陽性的牙菌斑形成菌不具抑制效果。對革蘭氏陰性，厭氧性的牙周炎病原菌，部份有抑制效果，特別是 ZYC-8006。

影響這些衍生物的抗菌效果的因素，從本實驗的結果推論，應該是取代基的陰電性和取代基所在位置及其所形成的立體結構。許多實驗的結果，都是陰電性強的取代基效果較好，例如 Ozawa 發現苯環上間位有鹵素的話，效果會增加，而且有 $F > Cl > Br > I$ 的規律 (99)。拉電子基的 acyl group 也比推電子基的 alkyl group 效果好 (26)。可能的原因是取代基的陰電性強，則有拉電子的驅勢，容易使質子解離，而 salicylanilide 的作用即是破壞質子的濃度梯度。拉電子基可能有助於這項作用。而然，這些取代基在化合物上的位置也相當重要，例如單一個拉電子基位在苯環上靠近羧基的鄰位，有穩定電子的能力，產生較大的陰電性；但若兩個拉電子基分別在兩個苯環的相對位置上，就可能互相抵消陰電性。有關結構方面的研究，目前有專家正在進行研究 (99)。其次，藥物本身的親脂性也是不可忽略的一項因素，因為 Clark 在 5-(alkylsulfonyl)salicylanilide 的實驗中，發

現 alkyl group 碳鏈長度與抑制效果有正比關係 (26). 綜合以上因素的結論, 未來可以在 ZYC-8006 的現有的 methoxyl group 置換成 trifluoromethoxyl group, 以增加其拉電子基, 或是置換成 fluorophenyl group, 以增加其碳鏈及親脂性, 或可大幅提高抗菌效力. 不過, 在設法加強 salicylanilide 衍生物抗菌效力的前題下, 也必須考慮到毒性, 以及藥物在人體組織內代謝和分解等問題.

實驗結果顯示, 在相位差顯微鏡下, 細菌之細胞體並沒有因 salicylanilide 衍生物的加入, 而使形態有所改變. 最主要的原因, 是 salicylanilide 衍生物只抑制能量的合成, 而不會破壞細胞壁, 因此細胞形態沒有變形. 再者, 細菌細胞壁一旦遭受破壞, 細菌會因無法抵抗液體的滲透壓而脹大, 爆裂而死亡. 因此, 即使細菌細胞壁被破壞, 也無法觀察到. 除非將細菌培養在高張溶液中, 但高張溶液對培養不易的厭氧菌是一大挑戰, 未來有待克服. 至於 salicylanilide 衍生物是否會改變細胞內部結構, 或是細胞壁上超顯微結構, 是未來的課題之一, 這必須靠穿透式及掃描式兩種電子顯微鏡才能解答.

在 10 種受測試的口腔細菌中, *S. sanguis* ATCC 25175 及 *S. mutans* ATCC 10556 是對 22 種 salicylanilide 衍生物感受性最差的兩種細菌. 它們都是兼性厭氧性細菌. 也就是說, 它們有兩種途徑可合成 ATP: 無氧呼吸作用 (anaerobic respiration) 和 發酵作用 (fermentation). 可能是無氧呼吸作用的途徑受 salicylanilide 衍生物抑制, 但它們仍可循發酵作用而合成 ATP. *S. mutans* ATCC 10556 對二氧化碳的需求量較 *S. sanguis* ATCC 25175 高, 顯示 *S. mutans* ATCC 10556 比 *S. sanguis* ATCC 25175 更依賴無氧呼吸作用, 因為它利用二氧化碳作碳源進行無氧呼吸作用, 這可說明為什麼 *S. mutans* 對 22 種 salicylanilide 衍生物感受性較 *S. sanguis* ATCC 25175 高. 而在牙周炎病原菌中, *F. nucleatum* VPI 5351, *P. intermedius* Group B ATCC 33563 的感受性最高, *P. intermedius* Group A ATCC35611 及 *Campylobacter curva* ATCC 35224 次之, 其餘較差. 我們嘗試從能量的製造解釋: *F. nucleatum* 和 *C. curva* 均不能分解醣類, 前者能量來源來自胺基酸的分解, 後者來自 formate 和氫. *P. intermedius* 雖然可中度分解醣類, 但胺基酸還是能量主要來源. *F. nucleatum*, *P. intermedius* 和 *C. curva* 在 salicylanilide 衍生物影響下, 無氧呼吸作用的 ATP 合成受阻, 又無法發酵醣類

以產生 ATP, 因此無法繼續生長. 而 *P. intermedius* Group A 可能醱酵糖類的能力較 Group B 好, 因此感受性較 Group B 差. 但這仍不足以解釋 *F. nucleatum* VPI 5351 和 *P. intermedius* Group B ATCC 33563 有如此高的感受性, 必定有另一機制造成這項結果. 前面提到, *P. intermedius* 雖然可中度分解糖類, 但胺基酸還是能量主要來源, aspartate 是主要的胺基酸. Aspartate 經由 oxaloacetate, malate 和 fumarate 的過程, 最後變成 succinate. 在 fumarate 轉變成 succinate 的過程中, 須有電子傳遞鏈中的 cytochrome *b* 或 cytochrome *c* 參與. *F. nucleatum* 和 *P. intermedius* 具有 cytochrome *b*, 而 *C. curva* 具有 cytochrome *b* 及 cytochrome *c*, 而 *P. gingivalis* 具有 cytochrome *c*. 本實驗所測試的 salicylanilide 衍生物可能具有抑制 cytochrome *b* 的能力, 但不影響 cytochrome *c*. 因此, *F. nucleatum* VPI 5351 和 *P. intermedius* Group B ATCC 33563 對藥物的感受性最高, 而 *C. curva* ATCC 35224 則較次之. 同時也能解釋 *P. gingivalis* ATCC 33277 同樣不能醱酵糖類, 但被抑制的程度卻不如 *F. nucleatum* VPI 5351. 當然這是我們的初步推論, 目前也沒有相關的研究可供參考. 未來可以從細菌體中純化不同的 cytochrome, 在活體外測試這 22 種 salicylanilide 是否可抑制 cytochrome 的活性. 至於是否另有其他機制如造成 DNA 突變, 或抑制 DNA 合成, 或是破壞某些酵素, 則有待更進一步的研究, 如 Ames test, 或 DNA 上是否有這類藥物的鍵結物. 更進一步的, 可以誘導細菌突變, 找出有耐受性的突變種, 看看是何種蛋白突變, 以找出此類藥物可能抑制的蛋白.

Corpet 認為, 一個良好的抗生素效力測試模式, 須符合三個要件: 方便 (包括數據讀取, 統計, 費用及時間), 靈敏和可信(80). 本實驗由於採用培養稀釋法, 較瓊脂稀釋法省時, 省事, 省錢. Weler (153)認為培養液稀釋法雖然方便, 但缺點是某些挑別性細菌在此系統中生長不良. 幸運地, 本實驗的十種受測細菌都能良好地生長於培養液中, 因此並無此點顧慮. 此外, 有些細菌並不適用瓊脂稀釋法: *F. nucleatum* 在一些藥物感受性試驗所用的培養基如 Wilkins-Chargrin 瓊脂, trypticase soy 瓊脂 等根本無法生長; *C. periodontii* 在濃度太低時, 也無法生長於瓊脂上. 此類細菌顯然非用培養稀釋法不可. 靈敏度是培養液稀釋法較弱的一項, 原因是比色計無法辨別細菌死活, 但本實驗掌握了適當的接種量 (避免死菌太多) 及細菌培養時間 (恰好到達對數期), 可克服上述缺點, 而使靈敏度大幅提高. 在

可信度方面，本實驗每一種藥物抑制每一種細菌，均測試兩次，因此可信度高；同時每一次測試均重覆三次，再現性相當高。因此，本實驗建立了一個可信，方便，靈敏的抗生素效力測試模式。

以往，salicylanilide 衍生物的測試，以黴菌居多(99)；在細菌方面，抑制 G(+) 細菌的效果往往較抑制 G(-) 細菌效果佳(26,99)。然而，牙周炎病原以 G(-) 細菌為主。因此，之前所發表的 salicylanilide 衍生物並不適用於牙周炎的治療上。本實驗結果提供了設計 G(-) 細菌抑制劑的一條可行路徑及方向。而我們也希望一方面不斷設計不同的 salicylanilide 衍生物，以找出具最強的抗菌活性的模式，一方面我們也希望進一步進行細胞毒性試驗，以及將 salicylanilide 衍生物實際應用到動物試驗上，期盼未來能實際運用牙周炎的預防及治療。

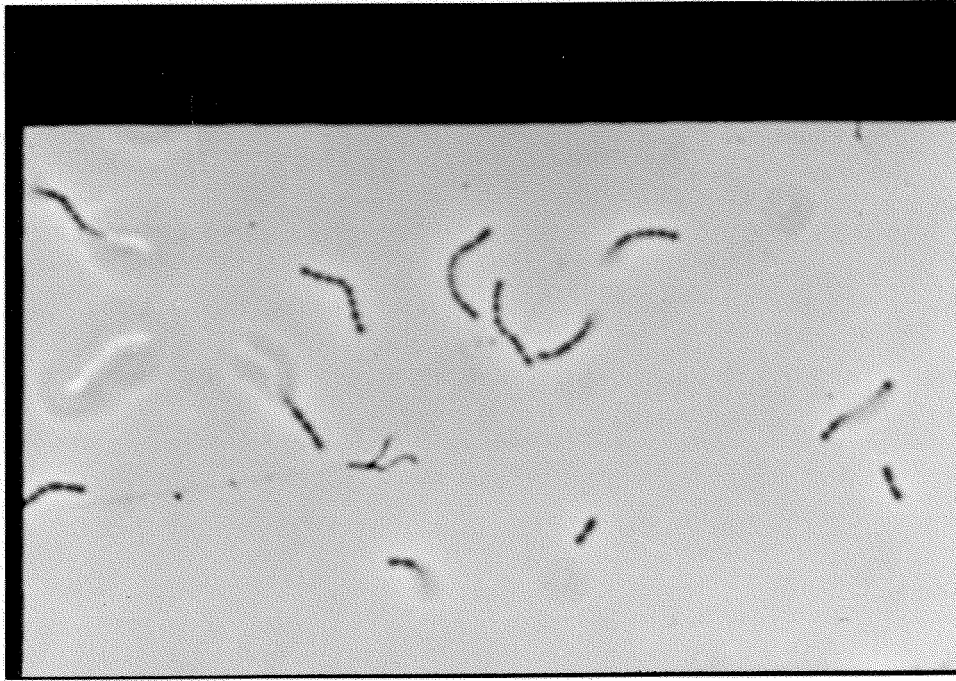


圖-1. *Streptococcus sanguis* ATCC 25175 培養於 BHI 培養液中，經過隔夜培養後，以接種環沾取菌液，直接塗抹於載玻上，蓋上蓋玻片，置於相位差顯微鏡下觀察。圖中排列成鍊狀即是 *S. sanguis* ATCC 25175。



圖-2. *Streptococcus mutans* ATCC 10556 培養於 BHI 培養液中，經過隔夜培養後，以接種環沾取菌液，直接塗抹於載玻上，蓋上蓋玻片，置於相位差顯微鏡下觀察。圖中排列成鍊狀即是 *S. mutans* ATCC 10556。

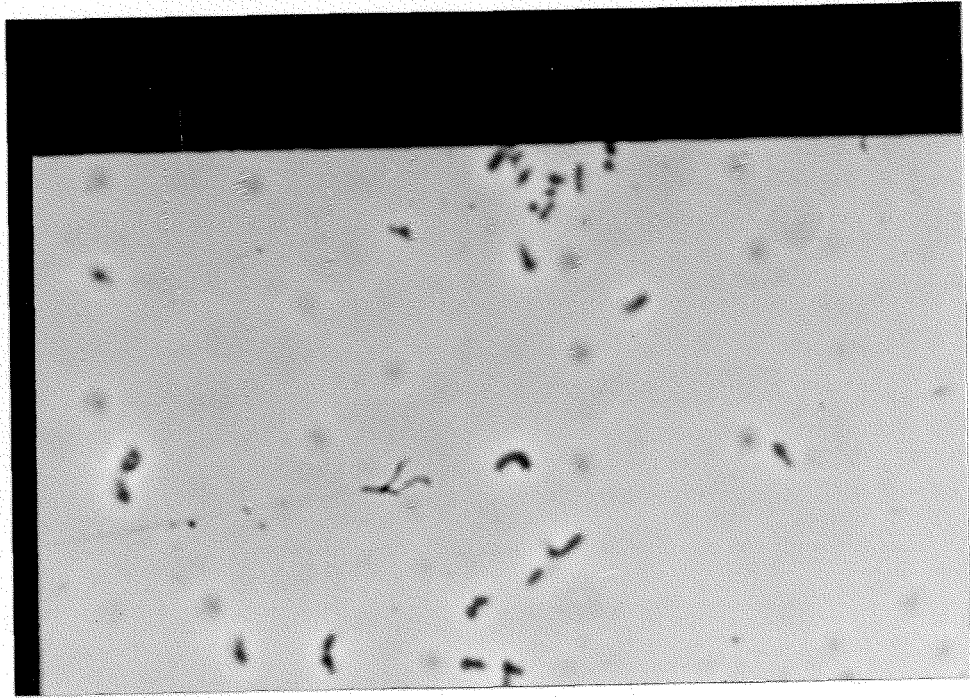


圖-3. *Selenomonas artemidis* ATCC 43528 培養於 BHI 培養液中，經過四日培養後，以接種環沾取菌液，直接塗抹於載玻上，蓋上蓋玻片，置於相位差顯微鏡下觀察。圖中彎月狀即是典型的 *S. artemidis* ATCC 43528，其餘因細菌位於不同相位，而無法呈現彎月狀。

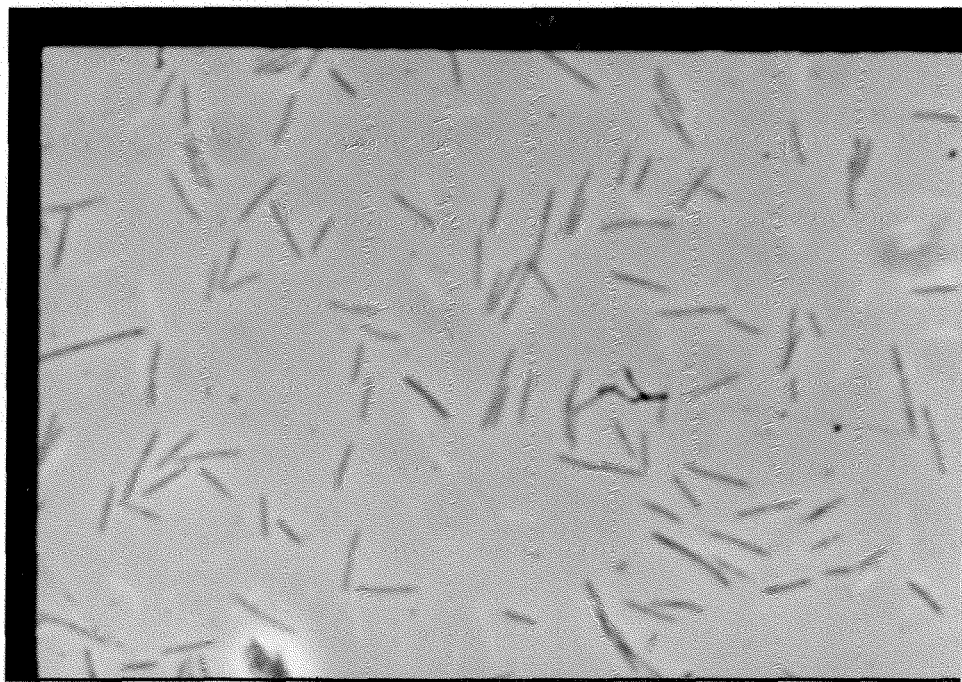


圖-4. *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351 培養於 BHI 培養液中，經過三日培養後，以接種環沾取菌液，直接塗抹於載玻上，蓋上蓋玻片，置於相位差顯微鏡下觀察。圖中細，直，兩端尖狀者即是 *F. nucleatum* VPI 5351。

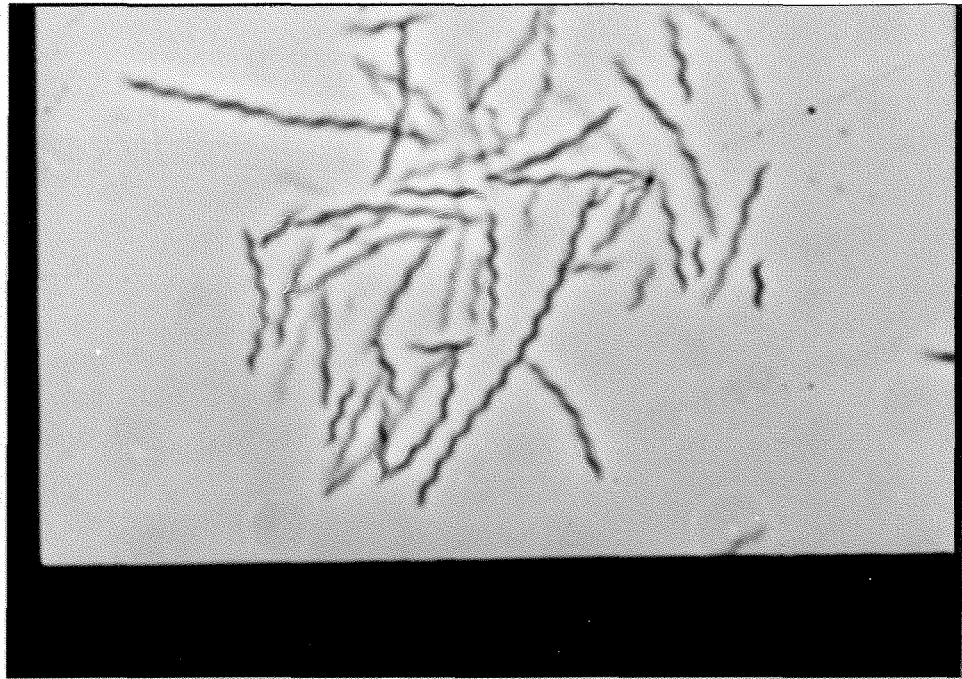


圖-5. *Centipeda periodontii* ATCC 35019 培養於 BHI 培養液中，經過三日培養後，以接種環沾取菌液，直接塗抹於載玻上，蓋上蓋玻片，置於相位差顯微鏡下觀察。圖中螺旋狀者即是 *C. periodontii* ATCC 35019。

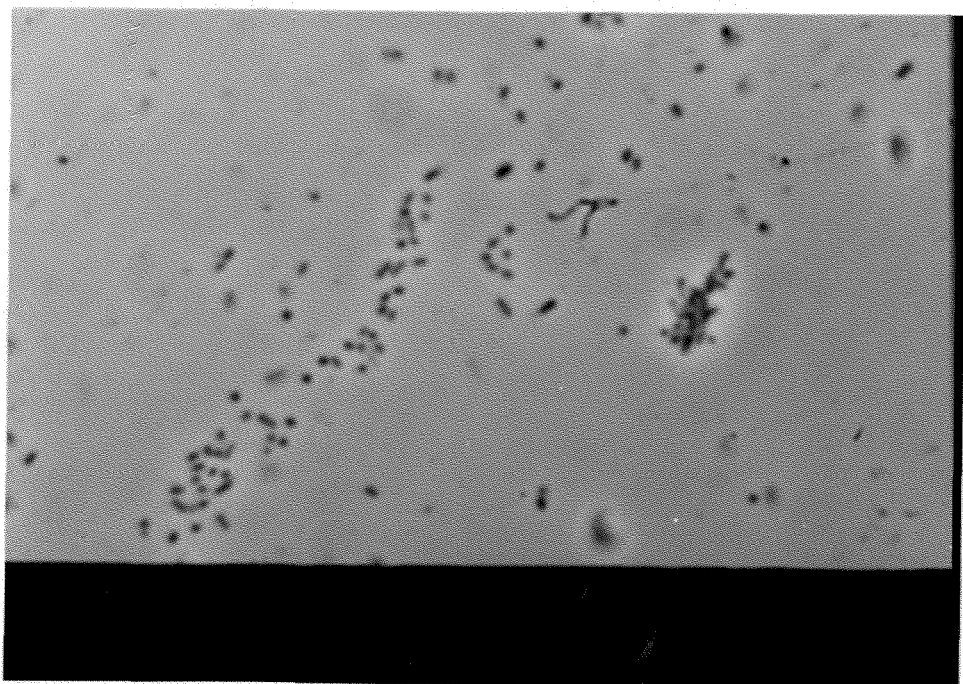


圖-6. *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 培養於 BHI 培養液中，經過六日培養後，以接種環沾取菌液，直接塗抹於載玻上，蓋上蓋玻片，置於相位差顯微鏡下觀察。圖中短桿菌即是 *P. gingivalis* ATCC 33277。

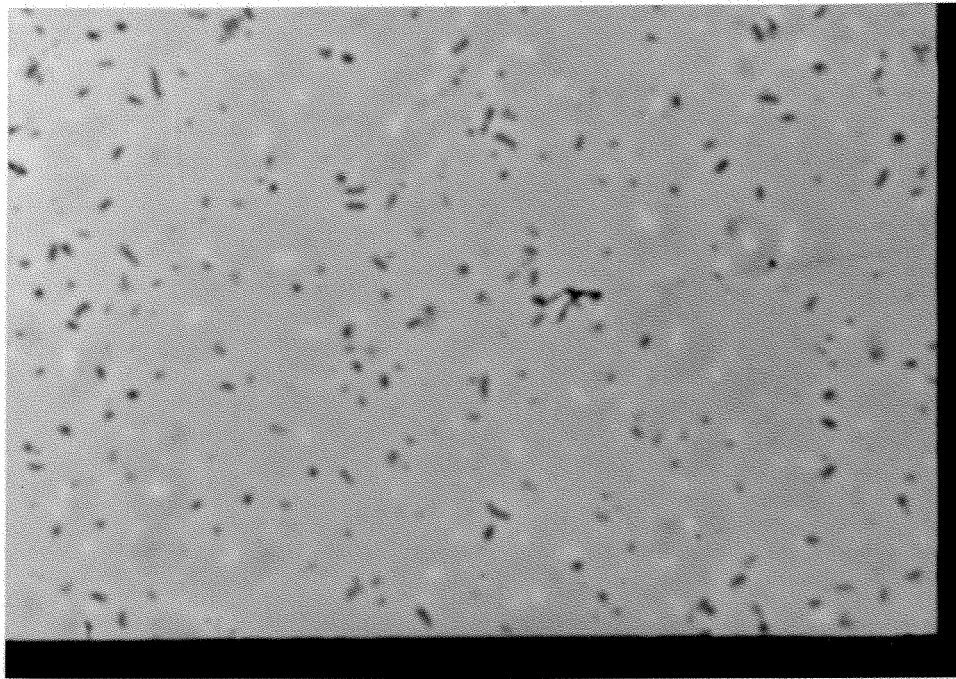


圖-7. *Prevotella intermedius* Group A ATCC 25611 培養於 BHI 培養液中，經過六日培養後，以接種環沾取菌液，直接塗抹於載玻上，蓋上蓋玻片，置於相位差顯微鏡下觀察。圖中長短不一的桿菌即是 *P. intermedius* Group A ATCC 25611。

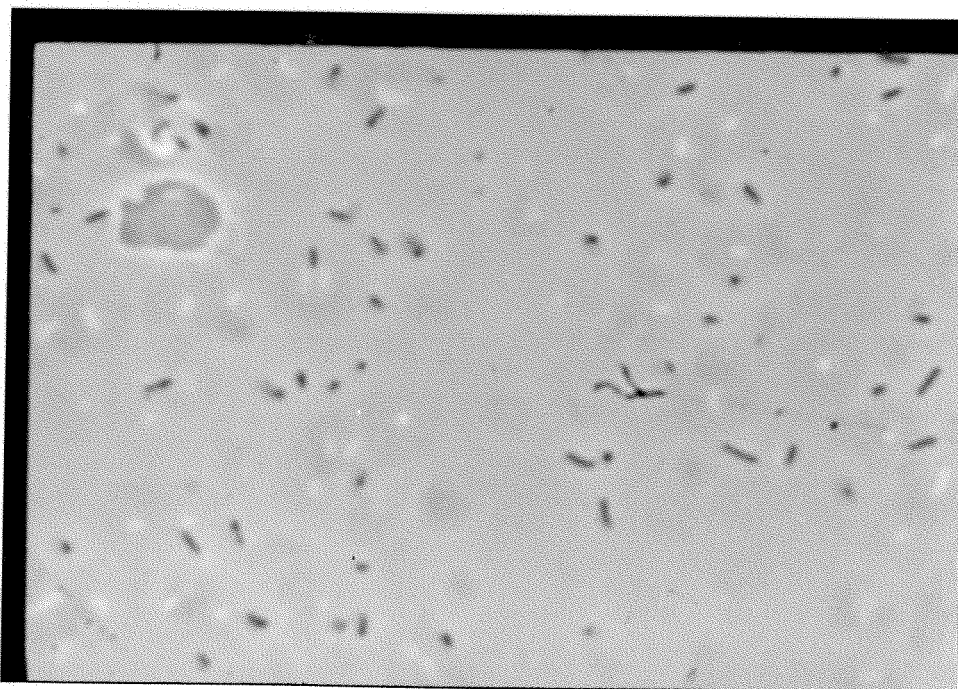


圖-8. *Prevotella intermedius* Group B ATCC 33563 培養於 BHI 培養液中，經過六日培養後，以接種環沾取菌液，直接塗抹於載玻上，蓋上蓋玻片，置於相位差顯微鏡下觀察。

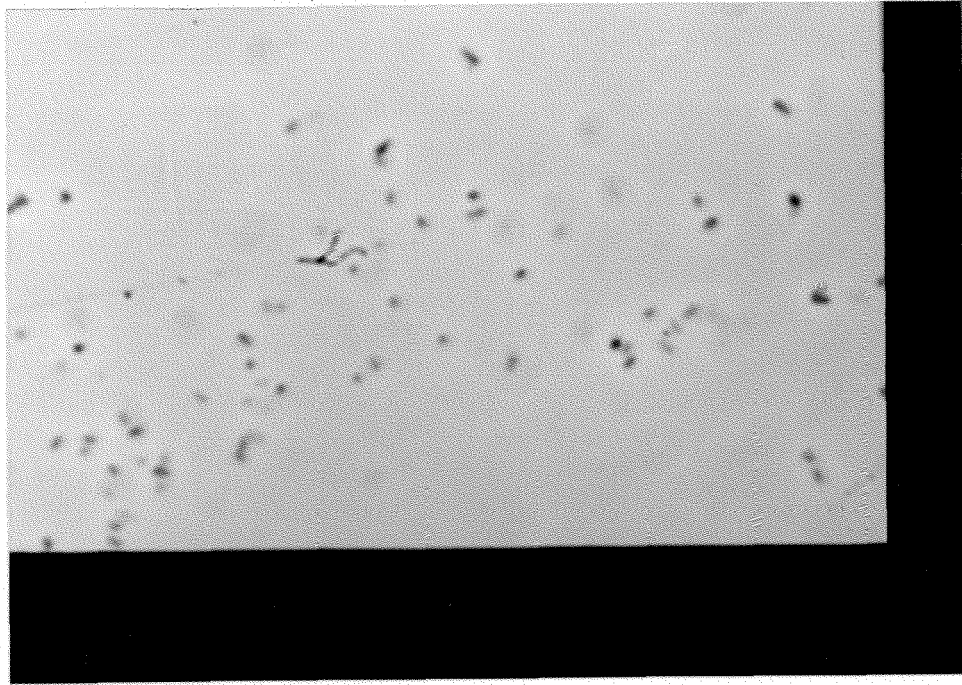


圖-9. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 29522 培養於 BHI 培養液中，經過四日培養後，以接種環沾取菌液，直接塗抹於載玻上，蓋上蓋玻片，置於相位差顯微鏡下觀察。圖中短桿菌即是 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522.

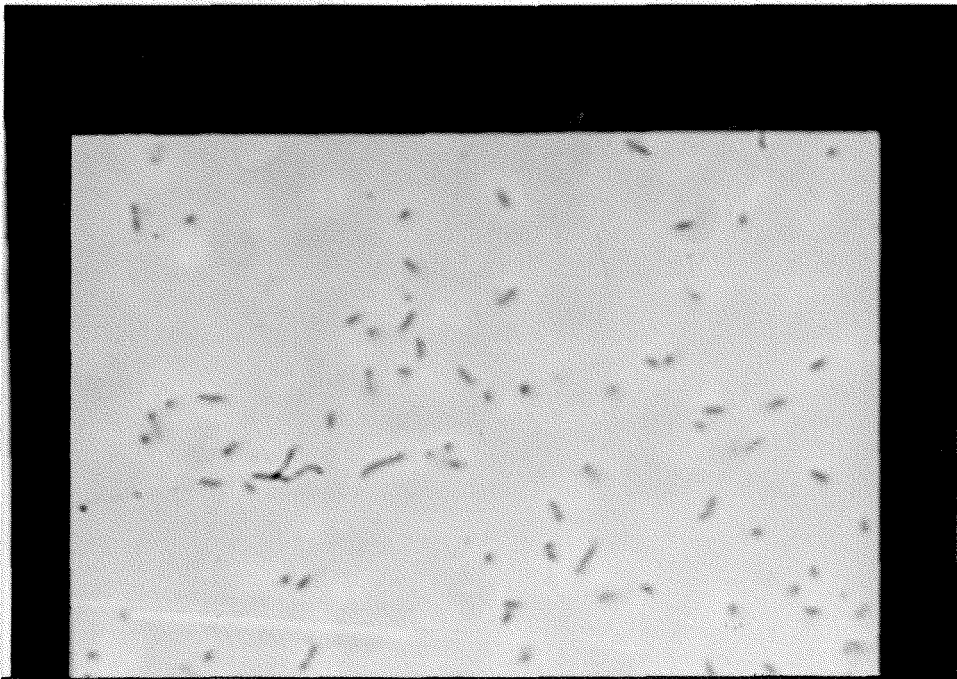
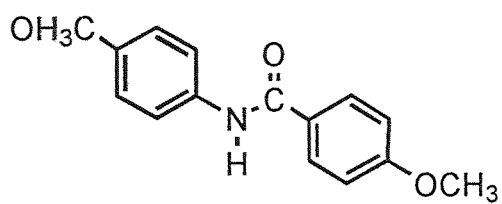
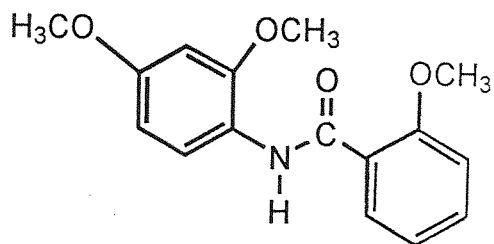


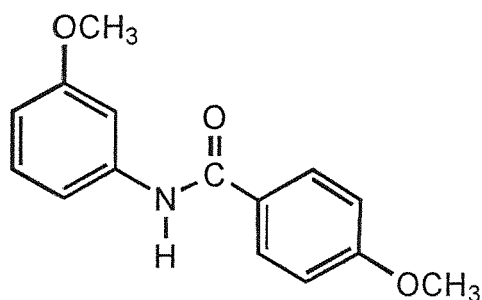
圖-10. *Campylobacter curva* ATCC 35224 培養於 BHI 培養液中，經過四日培養後，以接種環沾取菌液，直接塗抹於載玻上，蓋上蓋玻片，置於相位差顯微鏡下觀察。圖中細小，略呈彎曲之桿菌即是 *C. curva* ATCC 33524.



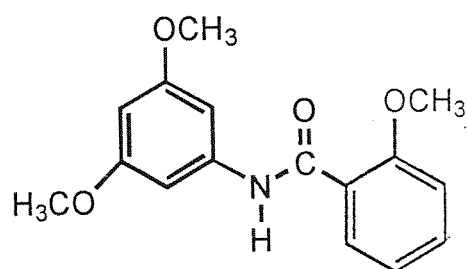
YZC-8000



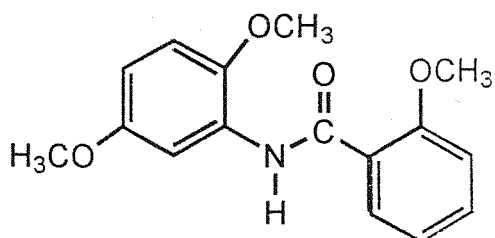
YZC-8003



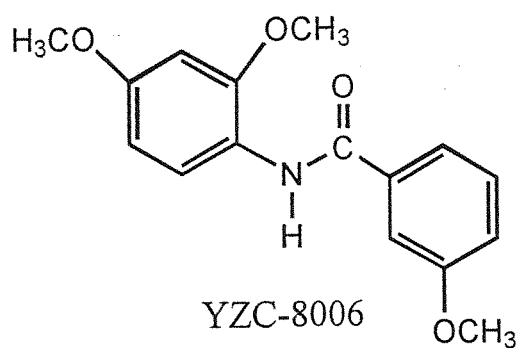
YZC-8001



YZC-8004



YZC-8005



YZC-8006

圖-11. 本實驗所測試的 22 種 salicylanilide 衍生物之結構式 (I).

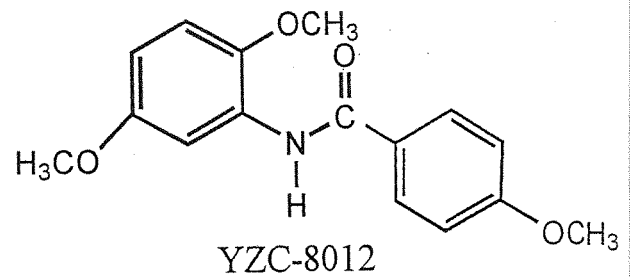
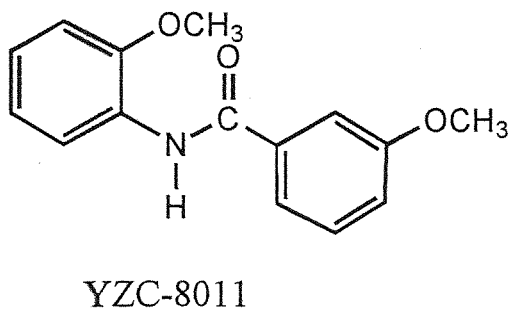
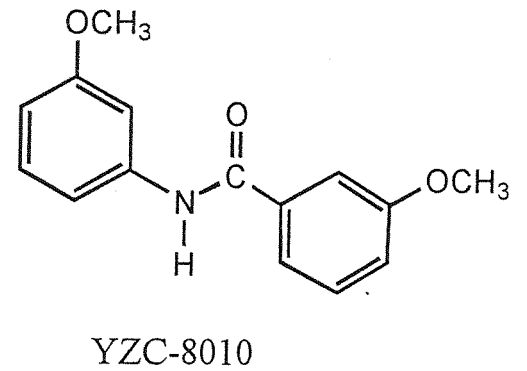
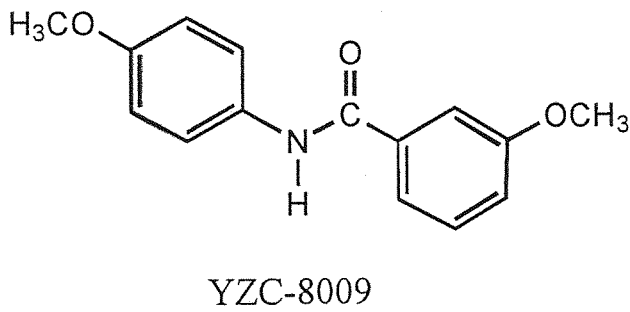
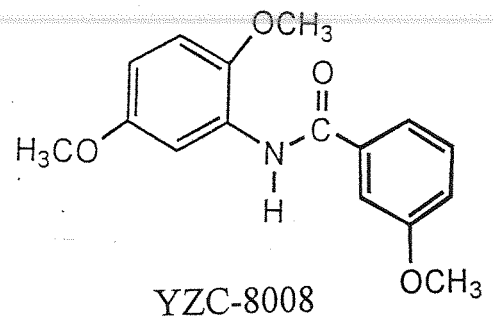
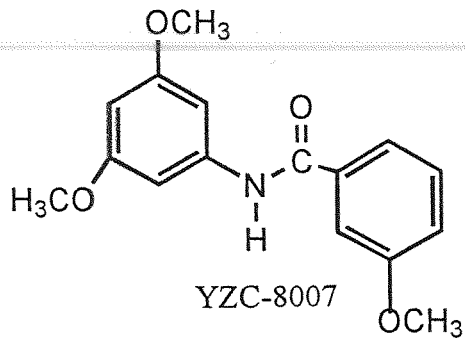


圖-11. 本實驗所測試的 22 種 salicylanilide 衍生物之結構式 (II).

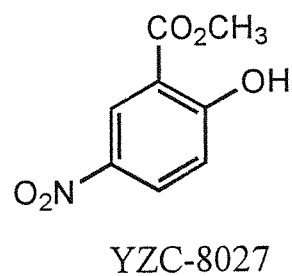
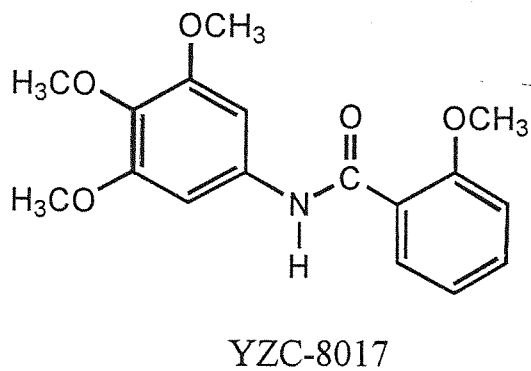
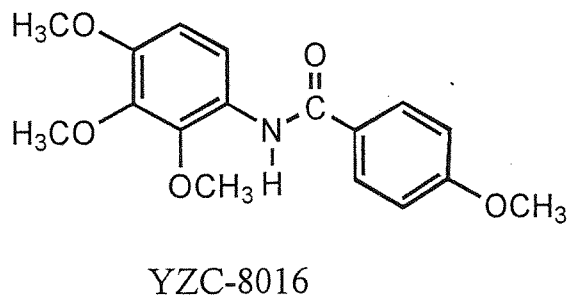
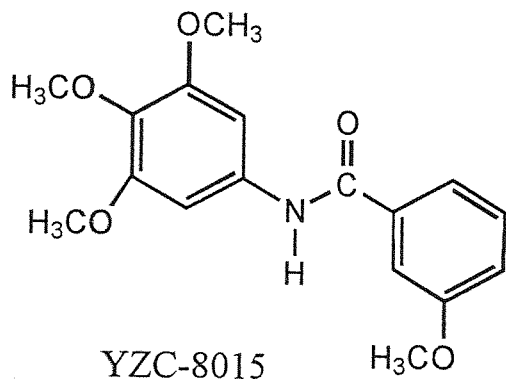
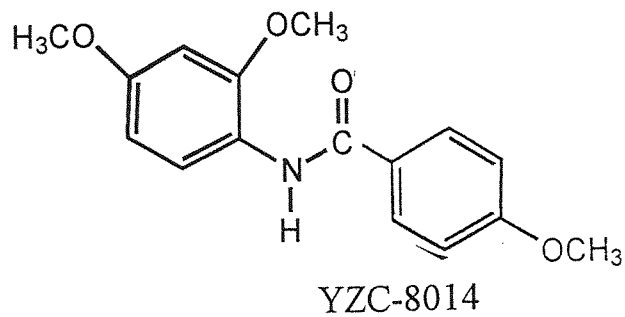
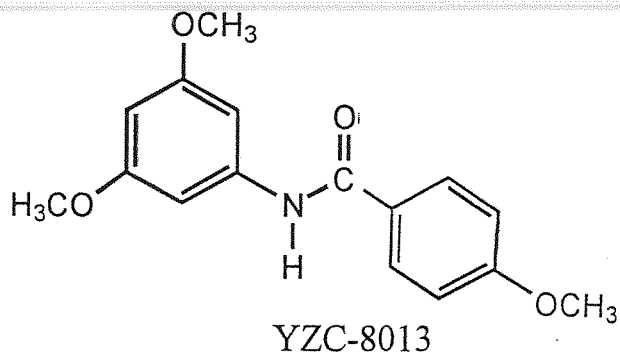


圖-11. 本實驗所測試的 22 種 salicylanilide 衍生物之結構式 (III).

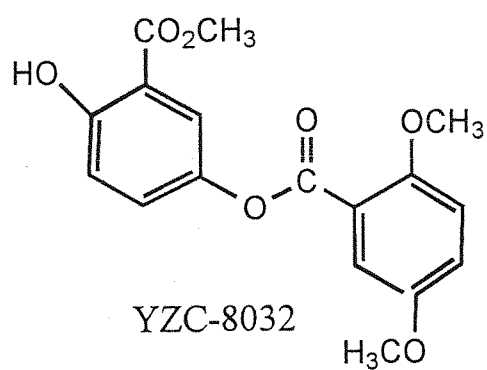
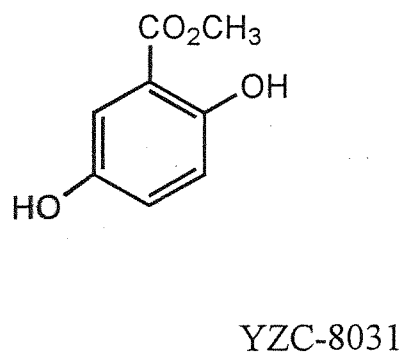
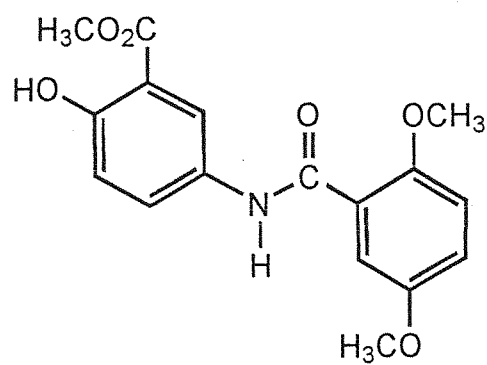
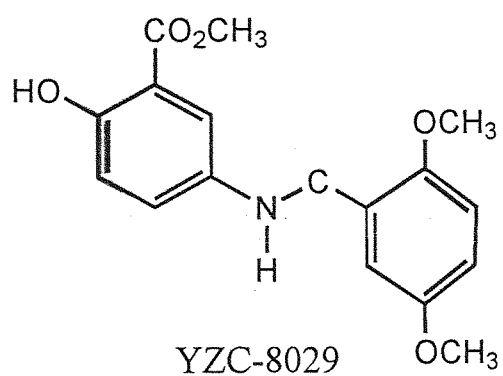


圖-11. 本實驗所測試的 22 種 salicylanilide 衍生物之結構式 (IV).

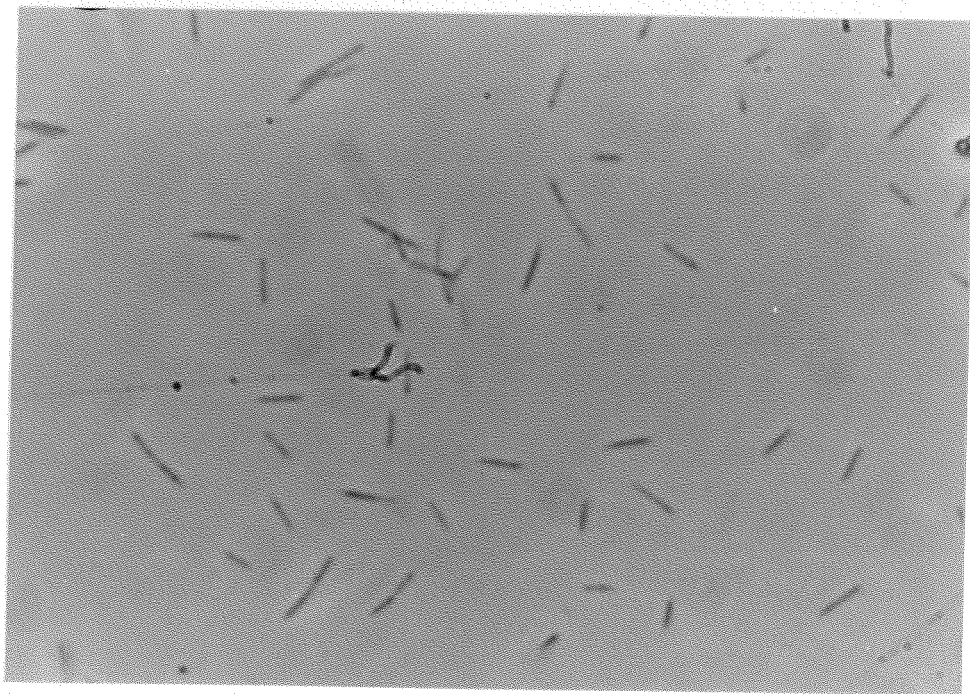
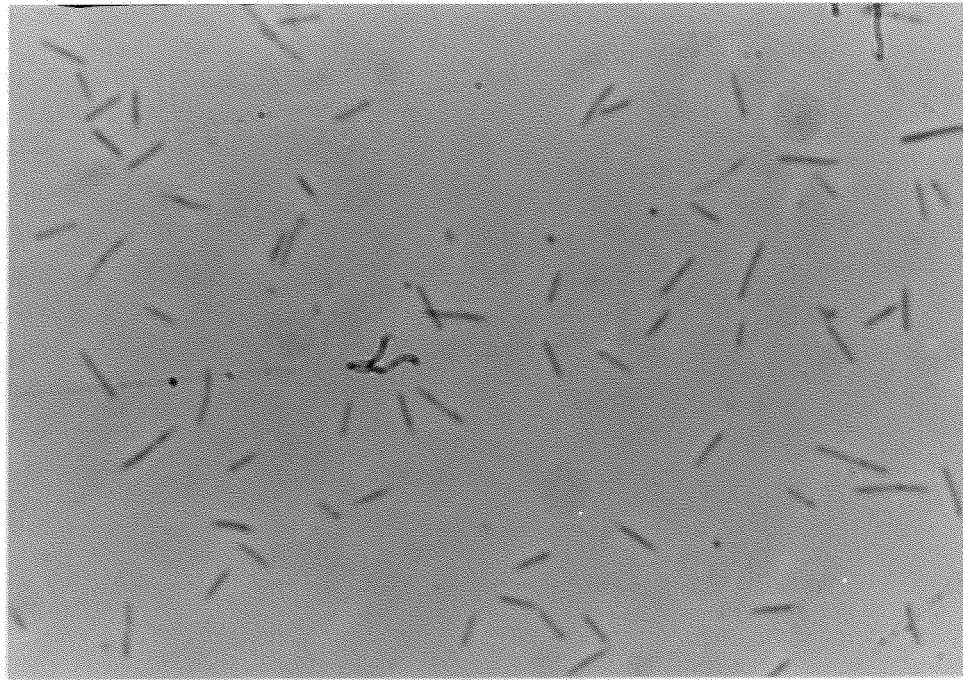


圖-12. *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351 在含 salicylanilide 衍生物及不含 salicylanilide 衍生物之條件下，細胞形態之比較。實驗組細菌在含 salicylanilide 衍生物 100 μ g/ml 的培養液中培養後，以接種環沾取菌液，於相位差顯微鏡下觀察，並與控制組之細菌比較。上圖為控制組，下圖為 ZYC-8000 處理。

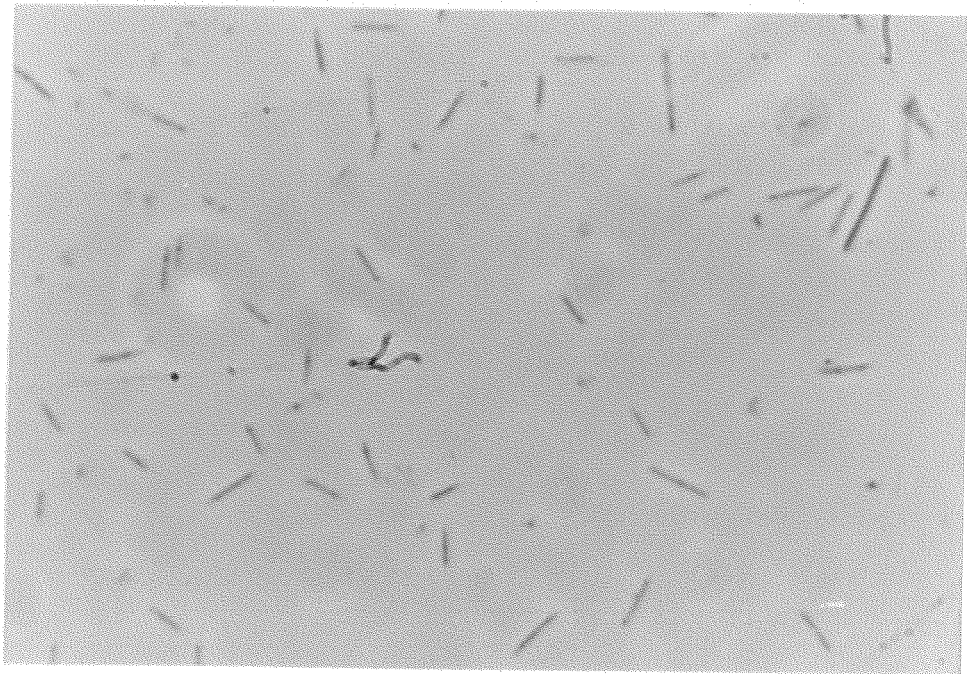
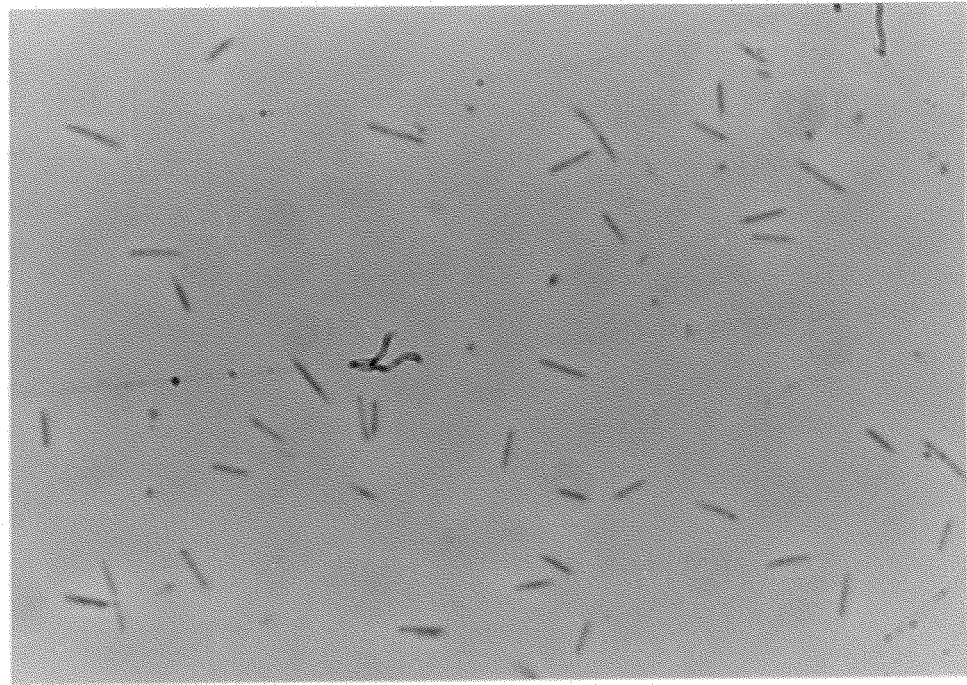


圖-13. *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351 在含 salicylanilide 衍生物及不含 salicylanilide 衍生物之條件下，細胞形態之比較。實驗組細菌在含 salicylanilide 衍生物 100 μ g/ml 的培養液中培養後，以接種環沾取菌液，於相位差顯微鏡下觀察，並與控制組之細菌比較。上圖為 ZYC-8001 處理，下圖為 ZYC-8003 處理。

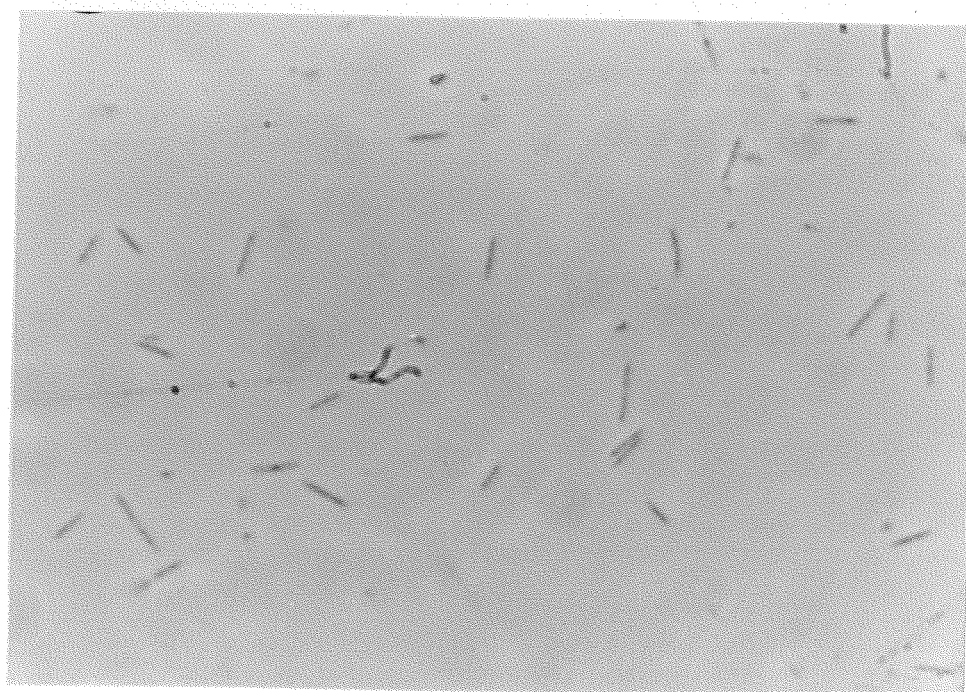
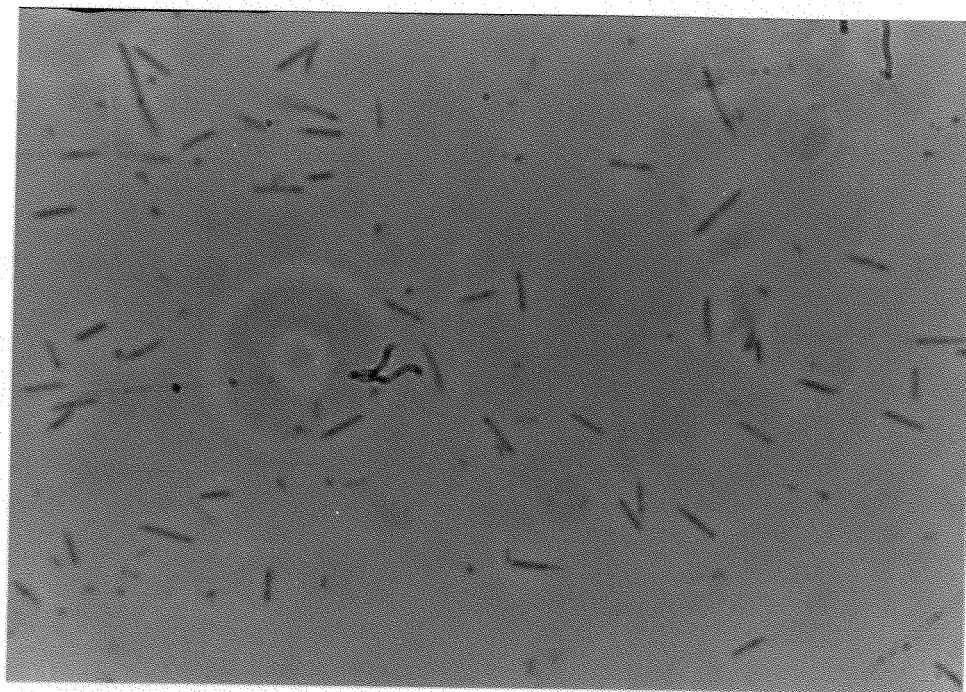


圖-14. *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351 在含 salicylanilide 衍生物及不含 salicylanilide 衍生物之條件下，細胞形態之比較。實驗組細菌在含 salicylanilide 衍生物 100 μ g/ml 的培養液中培養後，以接種環沾取菌液，於相位差顯微鏡下觀察，並與控制組之細菌比較。上圖為 ZYC-8004 處理，下圖為 ZYC-8005 處理。

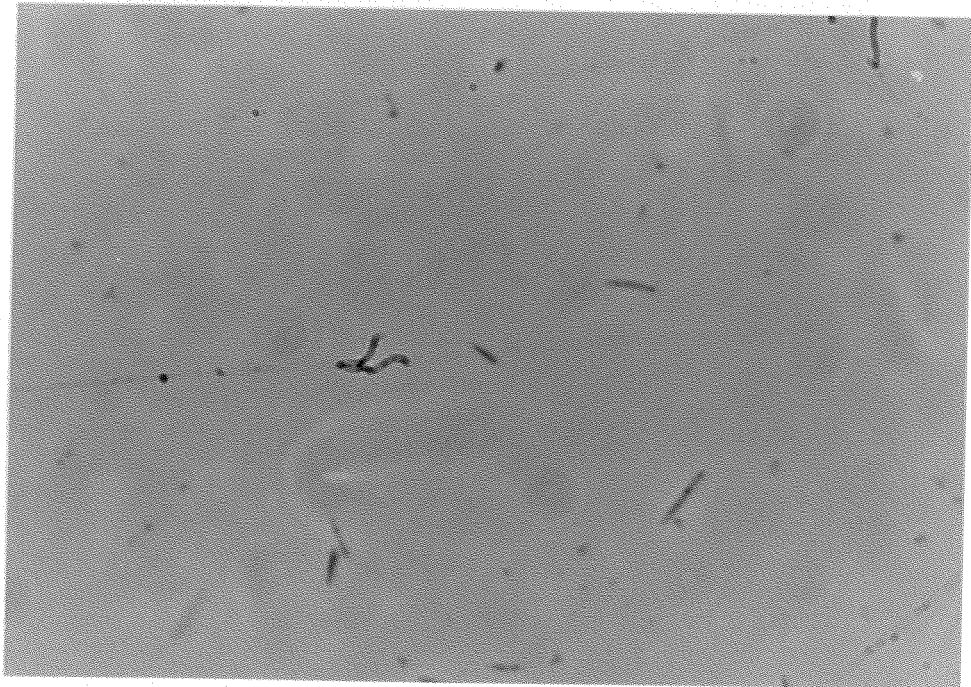


圖-15. *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351 在含 salicylanilide 衍生物及不含 salicylanilide 衍生物之條件下，細胞形態之比較。實驗組細菌在含 salicylanilide 衍生物 100 μ g/ml 的培養液中培養後，以接種環沾取菌液，於相位差顯微鏡下觀察，並與控制組之細菌比較。上圖為 ZYC-8006 處理，下圖為 ZYC-8007 處理。

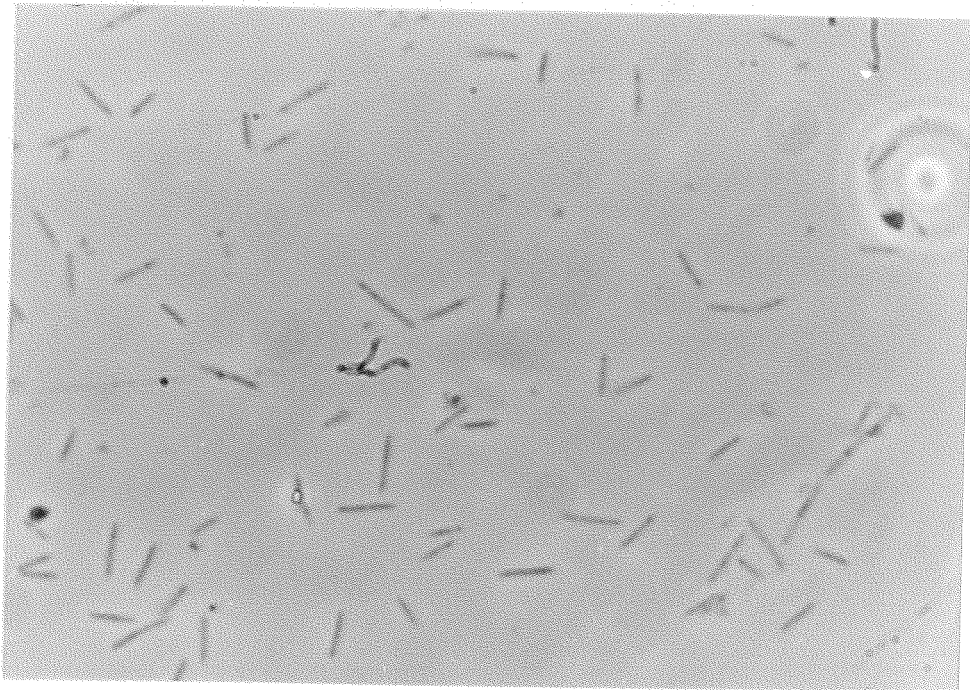
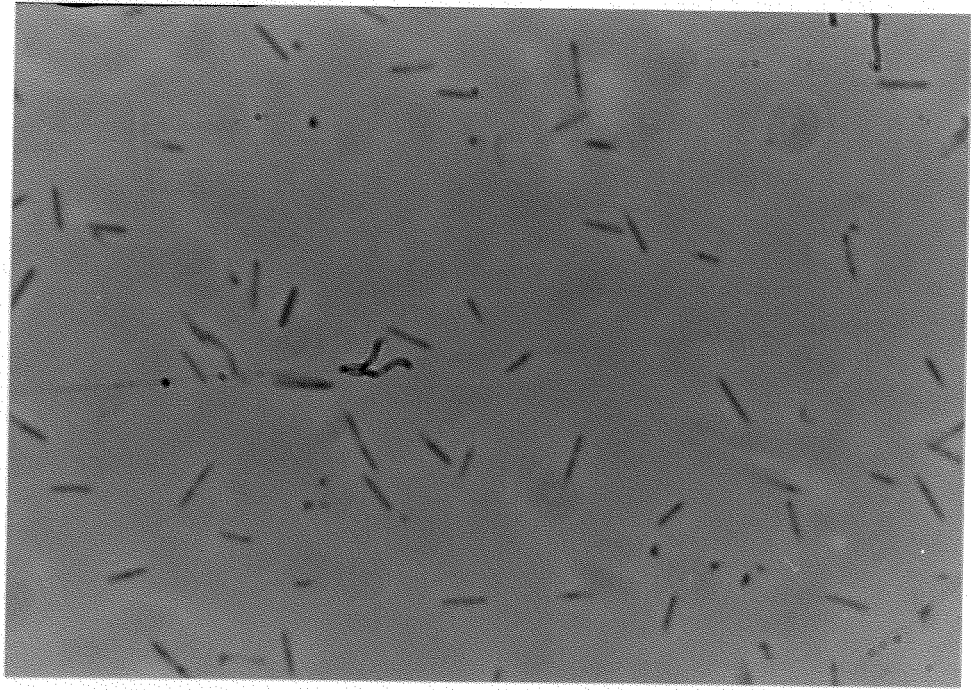


圖-16. *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351 在含 salicylanilide 衍生物及不含 salicylanilide 衍生物之條件下，細胞形態之比較。實驗組細菌在含 salicylanilide 衍生物 100 μ g/ml 的培養液中培養後，以接種環沾取菌液，於相位差顯微鏡下觀察，並與控制組之細菌比較。上圖為 ZYC-8008 處理，下圖為 ZYC-8009 處理。

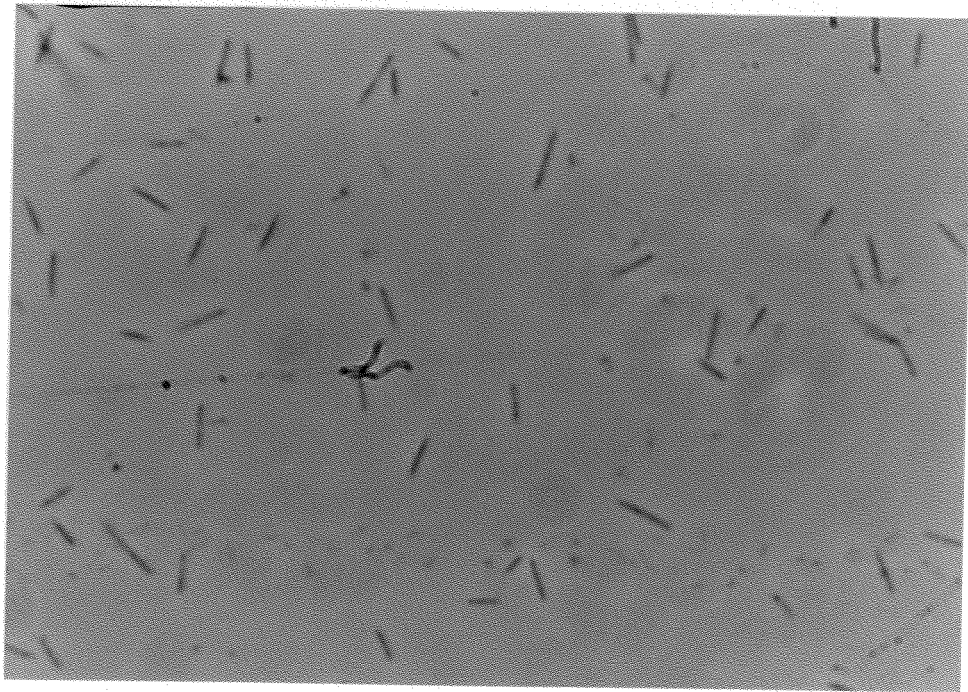
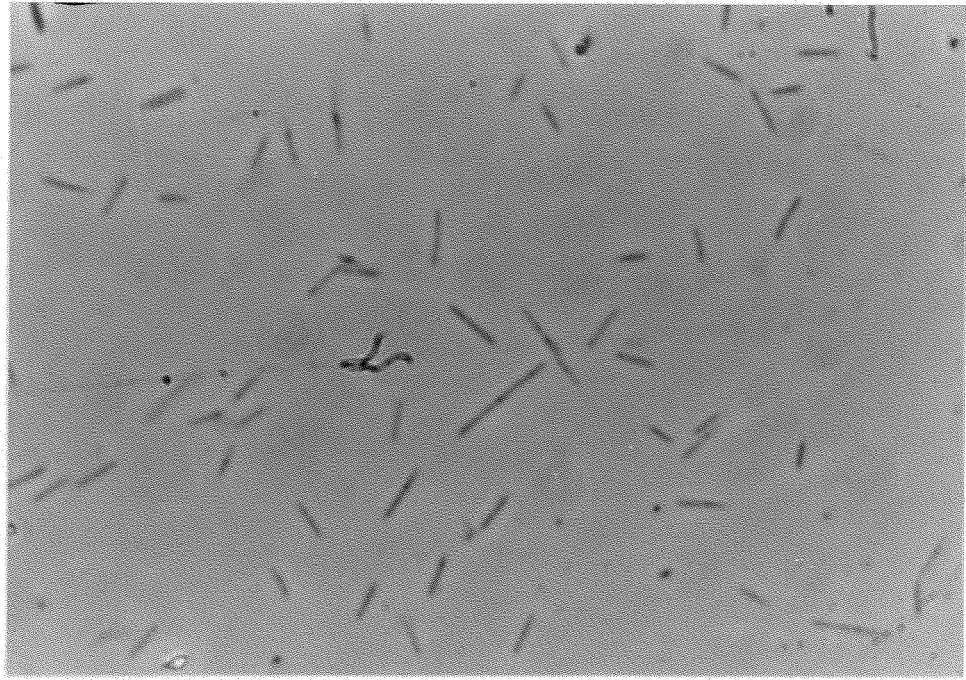


圖-17. *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351 在含 salicylanilide 衍生物及不含 salicylanilide 衍生物之條件下，細胞形態之比較。實驗組細菌在含 salicylanilide 衍生物 100 μ g/ml 的培養液中培養後，以接種環沾取菌液，於相位差顯微鏡下觀察，並與控制組之細菌比較。上圖為 ZYC-8010 處理，下圖為 ZYC-8011 處理。

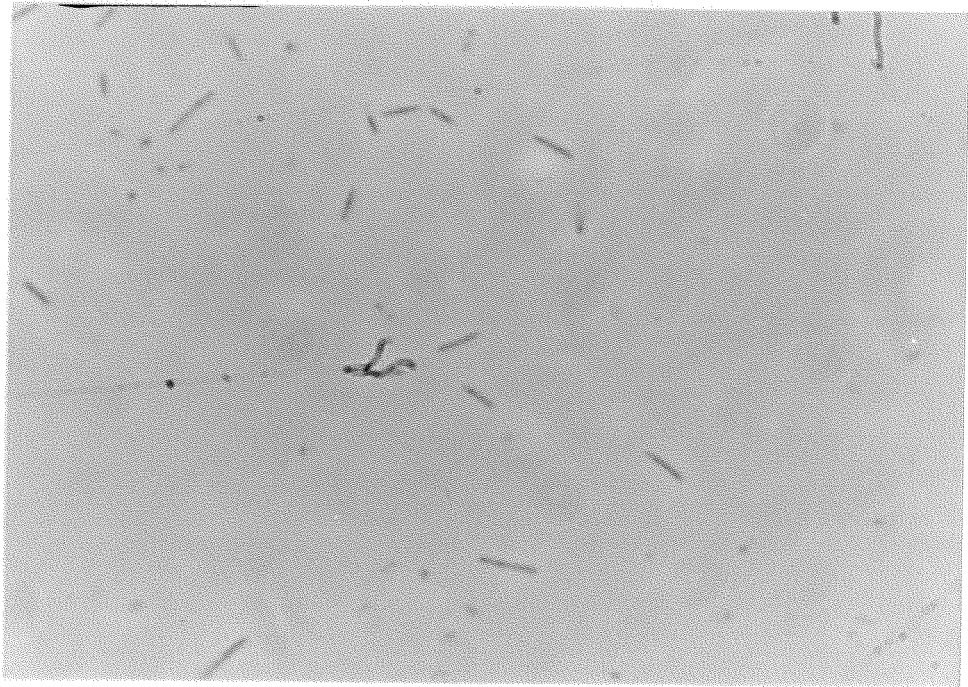
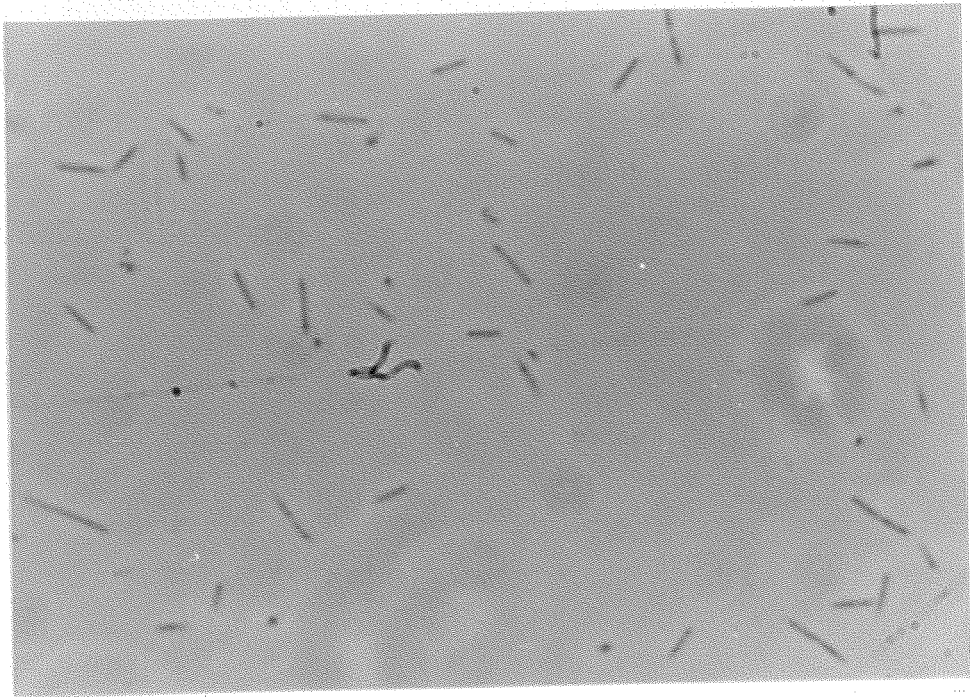


圖-18. *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351 在含 salicylanilide 衍生物及不含 salicylanilide 衍生物之條件下，細胞形態之比較。實驗組細菌在含 salicylanilide 衍生物 100 μ g/ml 的培養液中培養後，以接種環沾取菌液，於相位差顯微鏡下觀察，並與控制組之細菌比較。上圖為 ZYC-8012 處理，下圖為 ZYC-8013 處理。

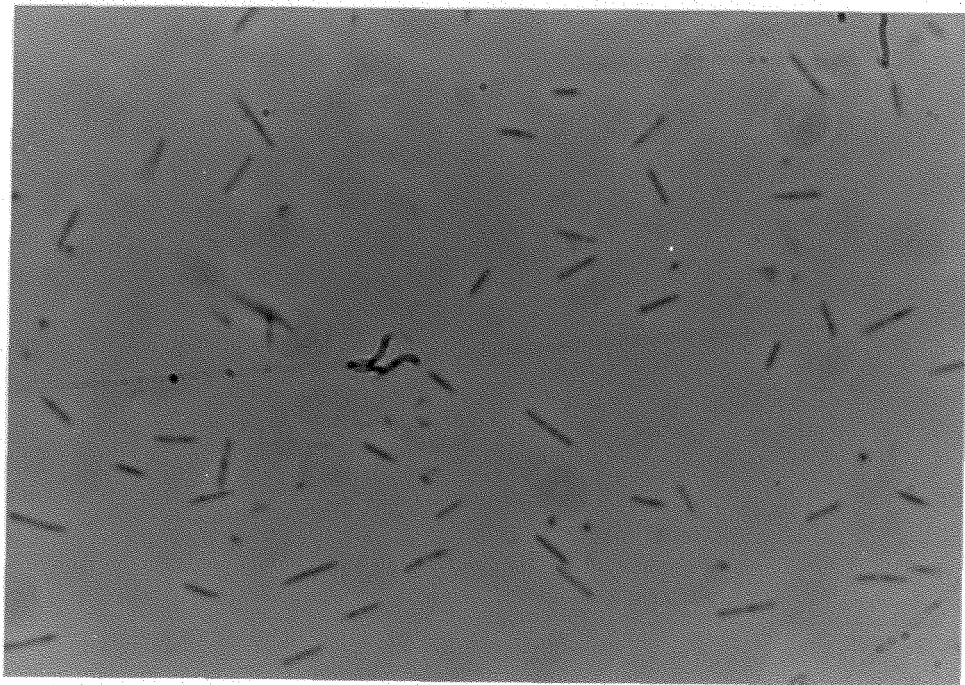
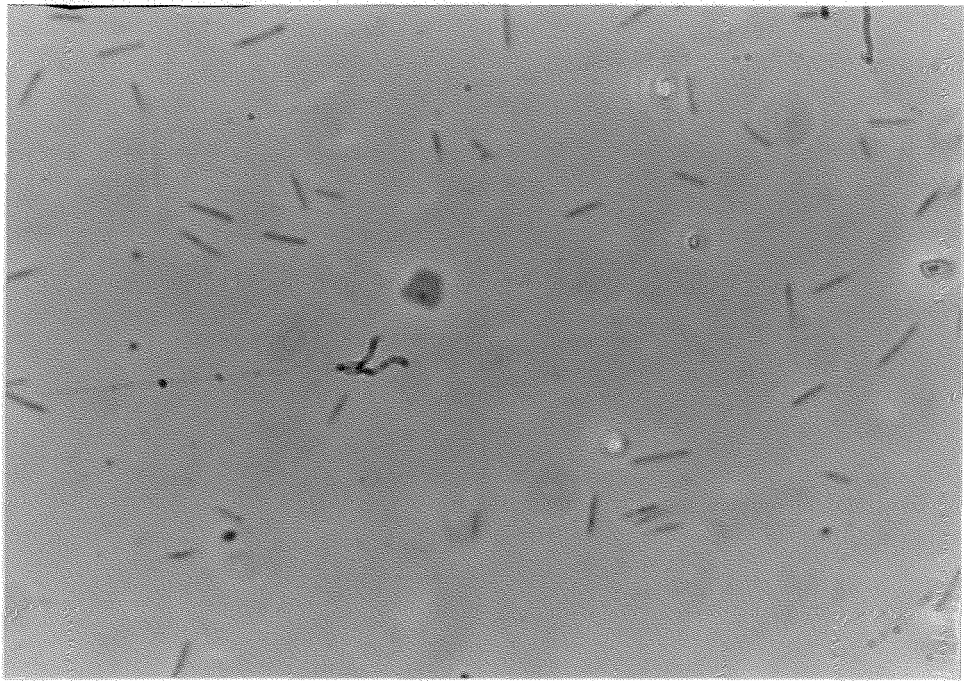


圖-19. *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351 在含 salicylanilide 衍生物及不含 salicylanilide 衍生物之條件下，細胞形態之比較。實驗組細菌在含 salicylanilide 衍生物 100 μ g/ml 的培養液中培養後，以接種環沾取菌液，於相位差顯微鏡下觀察，並與控制組之細菌比較。上圖為 ZYC-8014 處理，下圖為 ZYC-8015 處理。

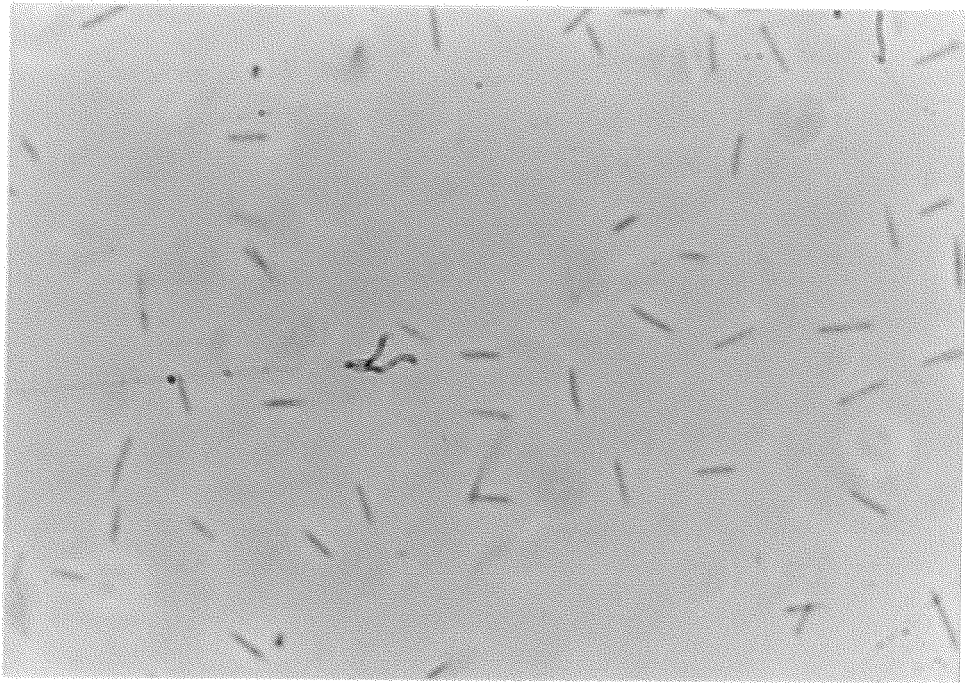
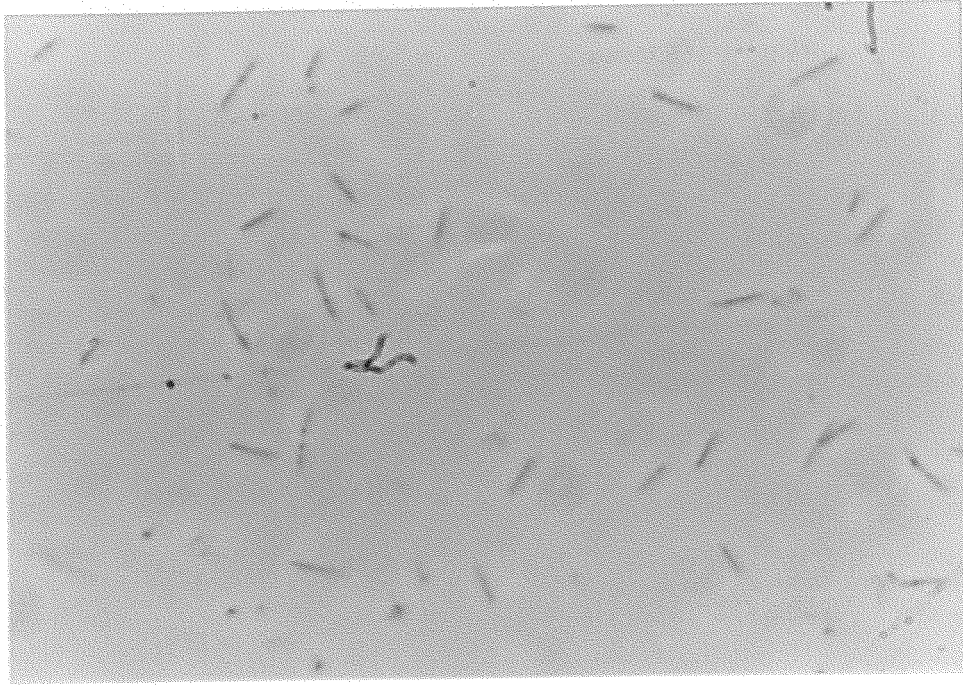


圖-20. *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351 在含 salicylanilide 衍生物及不含 salicylanilide 衍生物之條件下，細胞形態之比較。實驗組細菌在含 salicylanilide 衍生物 100 μ g/ml 的培養液中培養後，以接種環沾取菌液，於相位差顯微鏡下觀察，並與控制組之細菌比較。上圖為 ZYC-8016 處理，下圖為 ZYC-8017 處理。

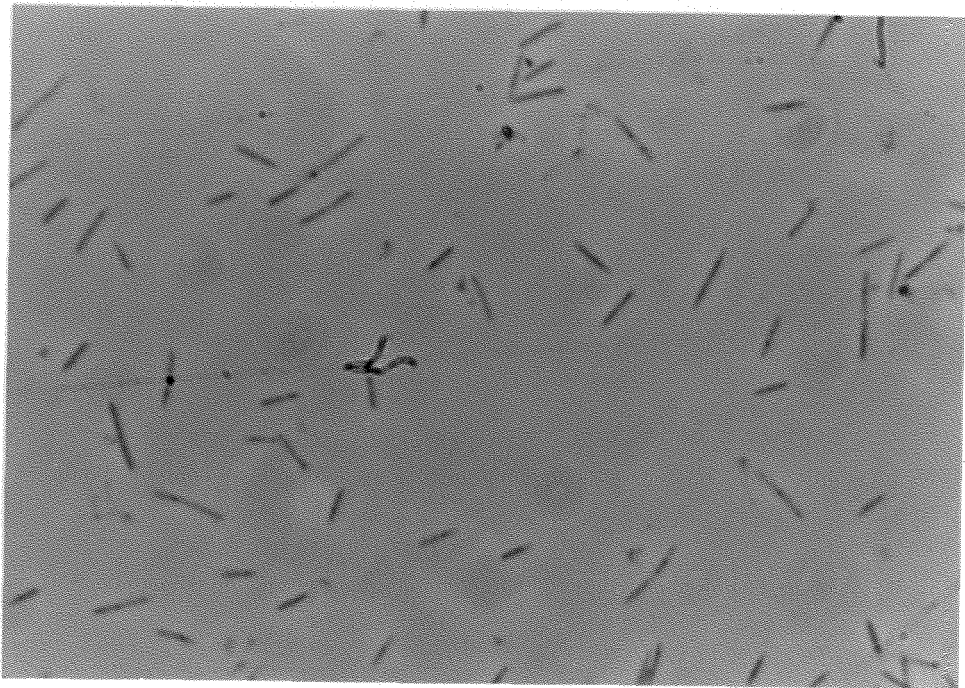
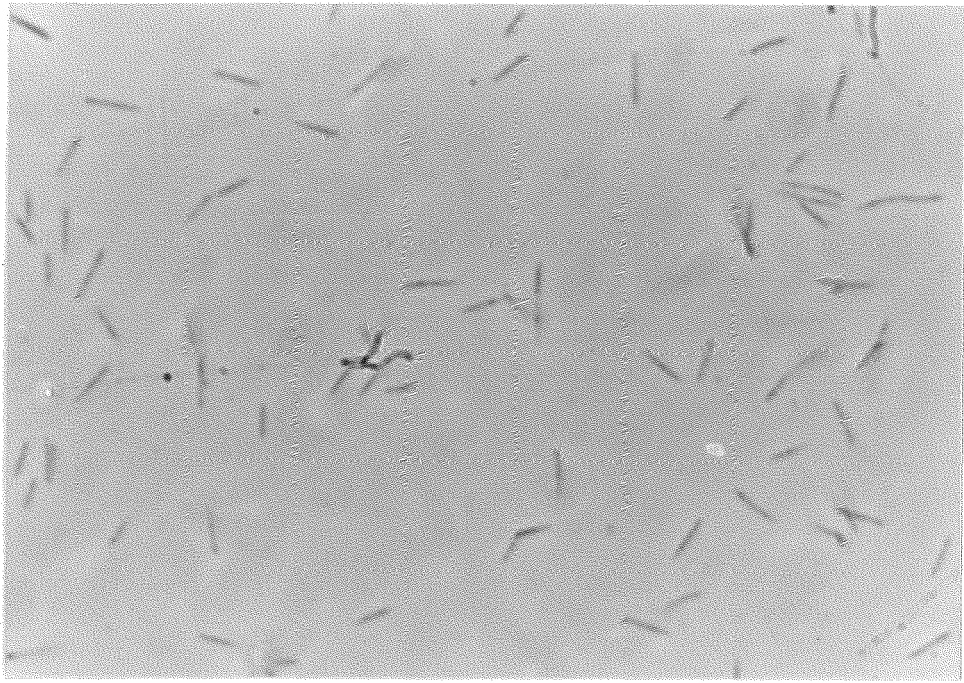


圖-21. *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351 在含 salicylanilide 衍生物及不含 salicylanilide 衍生物之條件下，細胞形態之比較。實驗組細菌在含 salicylanilide 衍生物 100 μ g/ml 的培養液中培養後，以接種環沾取菌液，於相位差顯微鏡下觀察，並與控制組之細菌比較。上圖為 ZYC-8027 處理，下圖為 ZYC-8029 處理。

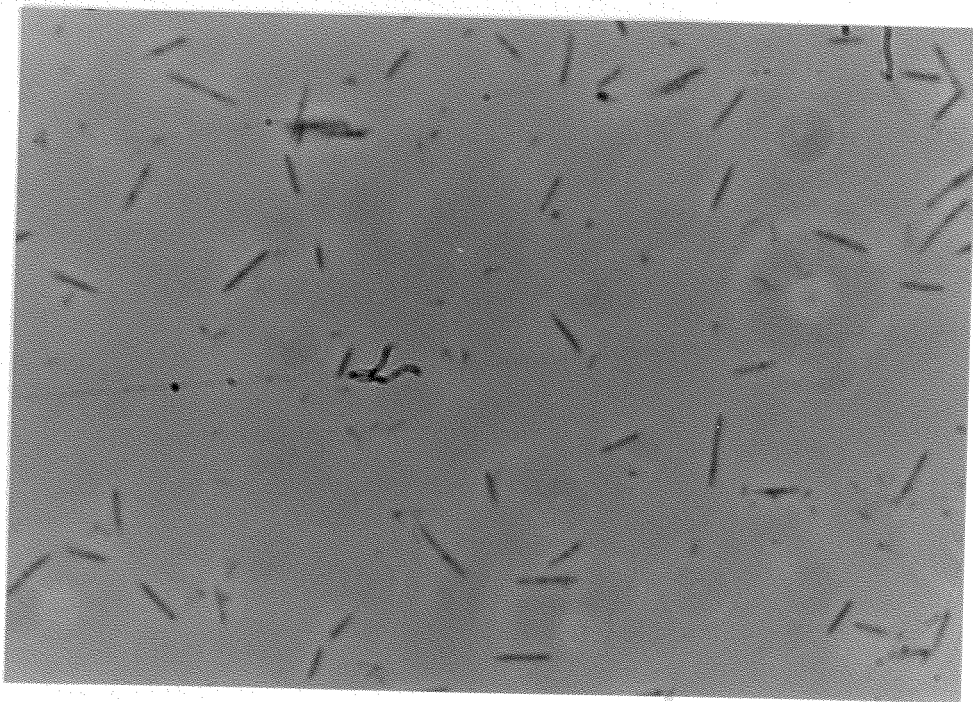
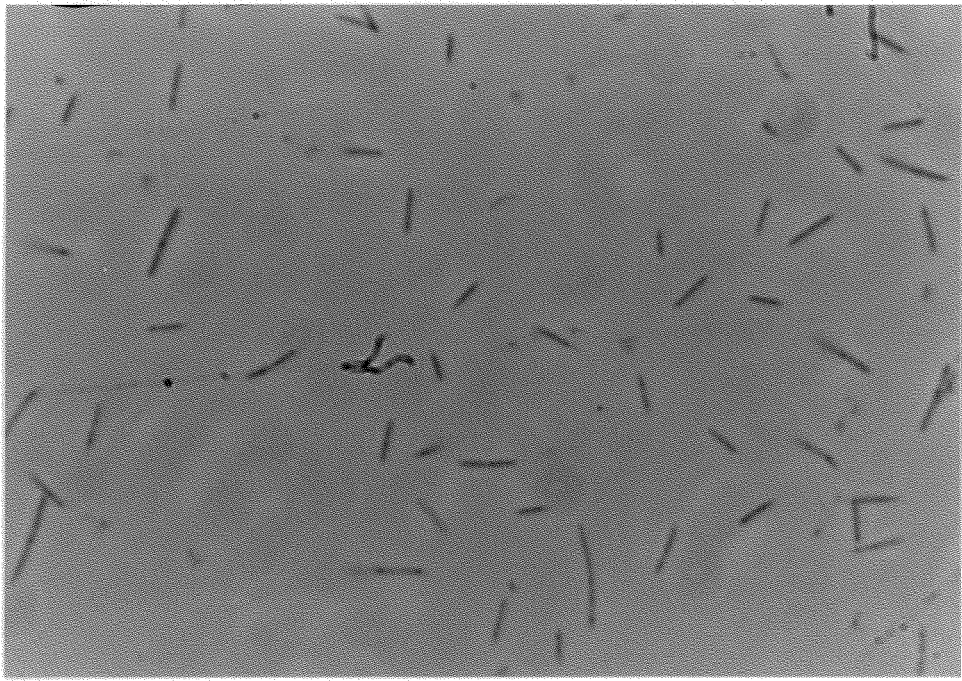


圖-22. *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351 在含 salicylanilide 衍生物及不含 salicylanilide 衍生物之條件下，細胞形態之比較。實驗組細菌在含 salicylanilide 衍生物 100 μ g/ml 的培養液中培養後，以接種環沾取菌液，於相位差顯微鏡下觀察，並與控制組之細菌比較。上圖為 ZYC-8030 處理，下圖為 ZYC-8031 處理。

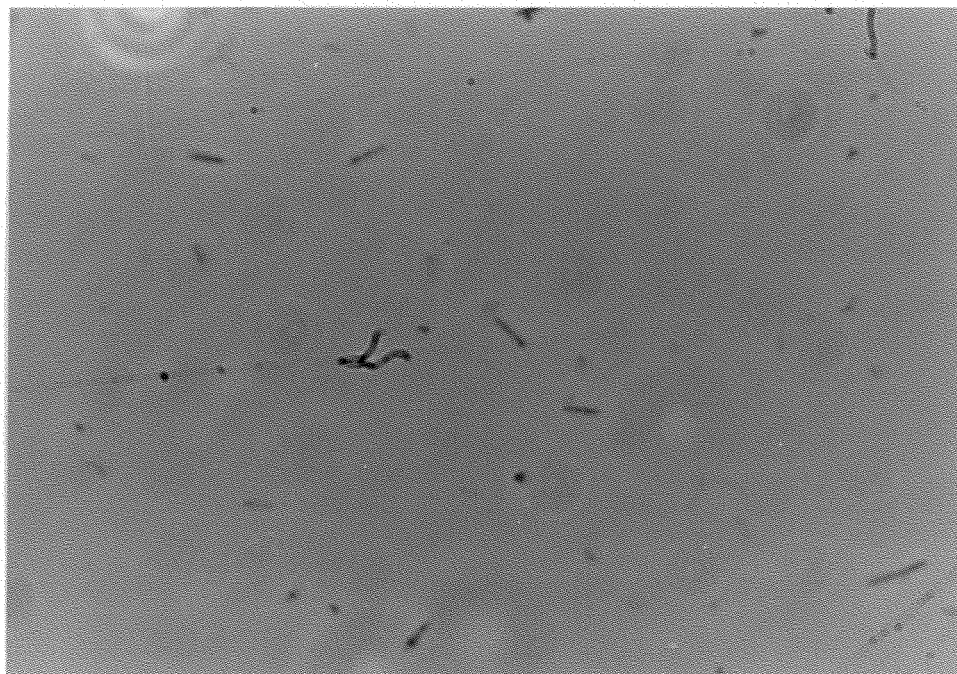


圖-23. *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351 在含 salicylanilide 衍生物及不含 salicylanilide 衍生物之條件下，細胞形態之比較。實驗組細菌在含 salicylanilide 衍生物 100 μ g/ml 的培養液中培養後，以接種環沾取菌液，於相位差顯微鏡下觀察，並與控制組之細菌比較。圖為 ZYC-8032 處理。

表-1. 各細菌測試前及測試時之培養時間及接種濃度. 所有細菌均以表中之量接種於 2 ml 的培養液中. 在培養時間之後, 細菌的生長可達到對數初期. 表中 O.D.590 之 O.D. 值為培養前之接種量.

細菌	<i>S.sang</i> <i>-uis</i> ATCC 25175	<i>S.muta</i> <i>-ns</i> ATCC 10556	<i>S.arte</i> <i>-midis</i> ATCC 43528	<i>F.nucl</i> <i>-eatum</i> VPI 5351	<i>C.peri-</i> <i>odontii</i> ATCC 35019	<i>P.gingi</i> <i>-valis</i> ATCC 33277	<i>P.inter</i> <i>-mediu</i> <i>-s A</i> ATCC 25611	<i>P.inter</i> <i>-mediu</i> <i>-s B</i> ATCC 33563	<i>A.actin</i> <i>-omyce</i> <i>-temc</i> <i>-omita</i> <i>-ns</i> ATCC 29522	<i>C.curv</i> <i>-a</i> ATCC 35224
培養 時間	8 h	8 h	24h	20h	24h	24h	24h	24h	48h	48h
接種 濃度	5 μ l	5 μ l	100 μ l	100 μ l	50 μ l	500 μ l	300 μ l	100 μ l	200 μ l	200 μ l
O.D. 值	0.080	0.080	0.100	0.100	0.100	0.152	0.140	0.100	0.100	0.090

表-2. *Streptococcus sanguis* ATCC 25175 受藥物影響下之 O.D. 值及抑制百分比. *S. sanguis* ATCC 25175 以 O.D.590 = 0.080 之接種量, 培養於含有 100 µg/ml salicylanilide 衍生物的 trypticase soy 培養液中, 培養 8 小時後, 取 200µl 菌液於 96 孔微量平板中, 以比色機測 O.D. 590 之吸光值. 所得吸光值減去空白對照組 O.D. 值, 即是表中所示之 O.D. 值. 再除以對照組 O.D. 值, 即為細菌之存活百分比. 以 100% 減去存活百分比, 即可得表中所示之抑制百分比.

藥物	O.D 值	抑制 %
8000	0.417 ± 0.001	0%
8001	0.418 ± 0.003	0%
8003	0.420 ± 0.001	0%
8004	0.407 ± 0.007	2%
8005	0.418 ± 0.020	0%
8006	0.296 ± 0.085	29%
8007	0.420 ± 0.002	0%
8008	0.412 ± 0.002	1%
8009	0.411 ± 0.027	1%
8010	0.388 ± 0.001	7%
8011	0.419 ± 0.002	0%
8012	0.418 ± 0.001	0%
8013	0.420 ± 0.001	0%
8014	0.418 ± 0.001	0%
8015	0.416 ± 0.001	0%
8016	0.420 ± 0.002	0%
8017	0.417 ± 0.002	0%
8027	0.415 ± 0.002	1%
8029	0.386 ± 0.002	7%
8030	0.409 ± 0.001	2%
8031	0.416 ± 0.007	0%
8032	0.326 ± 0.001	12%
控制組	0.417 ± 0.008	0%

表-3. *Streptococcus mutans* ATCC 10556 受藥物影響下之 O.D.值及抑制百分比。
S. mutans ATCC 10556 以 O.D.590 = 0.080 之接種量，培養於含有 100 µg/ml salicylanilide 衍生物的 trypticase soy 培養液中，培養 8 小時後，取 200µl 菌液於 96 孔微量平板中，以比色機測 O.D 590 之吸光值。所得吸光值減去空白對照組 O.D.值，即是表中所示之 O.D. 值。再除以對照組 O.D. 值，即為細菌之存活百分比。以 100%減去存活百分比，即可得表中所示之抑制百分比。

藥物	O.D.值	抑制 %
8000	0.417 ± 0.001	7%
8001	0.413 ± 0.001	8%
8003	0.414 ± 0.001	8%
8004	0.410 ± 0.001	9%
8005	0.449 ± 0.001	0%
8006	0.280 ± 0.007	38%
8007	0.420 ± 0.001	7%
8008	0.364 ± 0.003	19%
8009	0.389 ± 0.001	14%
8010	0.396 ± 0.001	12%
8011	0.401 ± 0.002	11%
8012	0.430 ± 0.001	5%
8013	0.411 ± 0.001	9%
8014	0.412 ± 0.003	9%
8015	0.430 ± 0.001	5%
8016	0.424 ± 0.001	6%
8017	0.399 ± 0.001	11%
8027	0.427 ± 0.001	5%
8029	0.233 ± 0.002	48%
8030	0.410 ± 0.002	9%
8031	0.412 ± 0.003	8%
8032	0.377 ± 0.002	16%
控制組	0.450 ± 0.004	0%

表-4. *Selenomonas artemidis* ATCC 43528 受藥物影響下之 O.D.值及抑制百分比。
S. artemidis ATCC 43528 以 O.D.590 = 0.100 之接種量，培養於含有 100 µg/ml salicylanilide 衍生物的 trypticase soy hemin 培養液中，培養 24 小時後，取 200µl 菌液於 96 孔微量平板中，以比色機測 O.D 590 之吸光值。所得吸光值減去空白對照組 O.D.值，即是表中所示之 O.D. 值。再除以對照組 O.D. 值，即為細菌之存活百分比。以 100%減去存活百分比，即可得表中所示之抑制百分比。

藥物	O.D.值	抑制 %
8000	0.271 ± 0.001	5%
8001	0.250 ± 0.005	12%
8003	0.283 ± 0.003	1%
8004	0.241 ± 0.003	16%
8005	0.268 ± 0.040	6%
8006	0.123 ± 0.009	57%
8007	0.232 ± 0.001	19%
8008	0.233 ± 0.005	18%
8009	0.286 ± 0.009	0%
8010	0.386 ± 0.001	0%
8011	0.276 ± 0.008	3%
8012	0.270 ± 0.000	5%
8013	0.263 ± 0.002	8%
8014	0.251 ± 0.002	12%
8015	0.285 ± 0.001	0%
8016	0.285 ± 0.002	0%
8017	0.274 ± 0.007	4%
8027	0.285 ± 0.001	0%
8029	0.287 ± 0.002	0%
8030	0.278 ± 0.002	3%
8031	0.283 ± 0.003	1%
8032	0.288 ± 0.003	0%
控制組	0.285 ± 0.002	0%

表-5. *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351 受藥物影響下之 O.D. 值及抑制百分比. *F. nucleatum* VPI 5351 以 O.D.590 = 0.100 之接種量, 培養於含有 100 µg/ml salicylanilide 衍生物的 trypticase soy hemin 培養液中, 培養 24 小時後, 取 200µl 菌液於 96 孔微量平板中, 以比色機測 O.D 590 之吸光值. 所得吸光值減去空白對照組 O.D. 值, 即是表中所示之 O.D. 值. 再除以對照組 O.D. 值, 即為細菌之存活百分比. 以 100% 減去存活百分比, 即可得表中所示之抑制百分比.

藥物	O.D. 值	控制組
8000	0.367 ± 0.008	29%
8001	0.311 ± 0.002	39%
8003	0.294 ± 0.002	43%
8004	0.409 ± 0.001	20%
8005	0.235 ± 0.001	54%
8006	0.002 ± 0.000	95.4%
8007	0.008 ± 0.001	85%
8008	0.322 ± 0.009	37.5%
8009	0.449 ± 0.001	13%
8010	0.328 ± 0.002	36%
8011	0.302 ± 0.001	41%
8012	0.169 ± 0.001	27%
8013	0.104 ± 0.001	80%
8014	0.287 ± 0.001	46%
8015	0.367 ± 0.001	29%
8016	0.294 ± 0.001	43%
8017	0.373 ± 0.004	28%
8027	0.273 ± 0.004	43%
8029	0.453 ± 0.001	12%
8030	0.446 ± 0.003	13%
8031	0.436 ± 0.001	15%
8032	0.141 ± 0.001	73%
控制組	0.514 ± 0.001	0%

表-6. *Centipeda periodontii* ATCC 35019 受藥物影響下之 O.D.值及抑制百分比. *C. periodontii* ATCC 35019 以 O.D.590 = 0.100 之接種量, 培養於含有 100 µg/ml salicylanilide 衍生物的 trypticase soy hemin 培養液中, 培養 24 小時後, 取 200µl 菌液於 96 孔微量平板中, 以比色機測 O.D 590 之吸光值. 所得吸光值減去空白對照組 O.D.值, 即是表中所示之 O.D. 值. 再除以對照組 O.D. 值, 即為細菌之存活百分比. 以 100%減去存活百分比, 即可得表中所示之抑制百分比.

藥物	O.D.值	抑制 %
8000	0.475 ± 0.001	20%
8001	0.483 ± 0.010	19%
8003	0.452 ± 0.002	24%
8004	0.516 ± 0.001	14%
8005	0.439 ± 0.008	26%
8006	0.353 ± 0.004	41%
8007	0.524 ± 0.002	12%
8008	0.344 ± 0.001	42%
8009	0.493 ± 0.001	17%
8010	0.384 ± 0.006	36%
8011	0.492 ± 0.001	17%
8012	0.480 ± 0.002	19%
8013	0.460 ± 0.001	23%
8014	0.409 ± 0.002	31%
8015	0.445 ± 0.004	25%
8016	0.547 ± 0.001	8%
8017	0.505 ± 0.001	15%
8027	0.400 ± 0.001	33%
8029	0.534 ± 0.003	10%
8030	0.407 ± 0.003	32%
8031	0.545 ± 0.005	8%
8032	0.378 ± 0.003	37%
控制組	0.596 ± 0.002	0%

表-7. *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 受藥物影響下之 O.D.值及抑制百分比. *P. gingivalis* ATCC 33277 以 O.D.590 = 0.150 之接種量, 培養於含有 100 $\mu\text{g/ml}$ salicylanilide 衍生物的 trypticase soy hemin 培養液中, 培養 24 小時後, 取 200 μl 菌液於 96 孔微量平板中, 以比色機測 O.D 590 之吸光值. 所得吸光值減去空白對照組 O.D.值, 即是表中所示之 O.D. 值. 再除以對照組 O.D. 值, 即為細菌之存活百分比. 以 100%減去存活百分比, 即可得表中所示之抑制百分比.

藥物	O.D 值	抑制 %
8000	0.235 \pm 0.001	54%
8001	0.423 \pm 0.001	15%
8003	0.455 \pm 0.001	10%
8004	0.407 \pm 0.001	20%
8005	0.371 \pm 0.001	27%
8006	0.254 \pm 0.005	50%
8007	0.300 \pm 0.001	41%
8008	0.262 \pm 0.001	44%
8009	0.490 \pm 0.035	4%
8010	0.447 \pm 0.002	12%
8011	0.465 \pm 0.001	8%
8012	0.422 \pm 0.014	17%
8013	0.390 \pm 0.000	23%
8014	0.460 \pm 0.002	8%
8015	0.455 \pm 0.001	10%
8016	0.351 \pm 0.002	31%
8017	0.459 \pm 0.002	10%
8027	0.448 \pm 0.001	12%
8029	0.388 \pm 0.002	25%
8030	0.453 \pm 0.018	11%
8031	0.456 \pm 0.001	10%
8032	0.471 \pm 0.001	7%
控制組	0.507 \pm 0.002	0%

表-8. *Prevotella intermidius* Group A ATCC 25611 受藥物影響下之 O.D.值及抑制百分比. *P. intermidius* Group A ATCC 25611 以 O.D.590 = 0.140 之接種量, 培養於含有 100 µg/ml salicylanilide 衍生物的 trypticase soy hemin 培養液中, 培養 24 小時後, 取 200µl 菌液於 96 孔微量平板中, 以比色機測 O.D 590 之吸光值. 所得吸光值減去空白對照組 O.D.值, 即是表中所示之 O.D. 值. 再除以對照組 O.D. 值, 即為細菌之存活百分比. 以 100%減去存活百分比, 即可得表中所示之抑制百分比.

藥物	O.D.值	抑制 %
8000	0.619 ± 0.005	19%
8001	0.571 ± 0.001	25%
8003	0.536 ± 0.001	30%
8004	0.473 ± 0.001	38%
8005	0.452 ± 0.001	41%
8006	0.217 ± 0.002	72%
8007	0.393 ± 0.001	68%
8008	0.518 ± 0.002	32%
8009	0.753 ± 0.002	1%
8010	0.525 ± 0.002	31%
8011	0.468 ± 0.008	39%
8012	0.270 ± 0.003	65%
8013	0.497 ± 0.001	35%
8014	0.551 ± 0.009	28%
8015	0.526 ± 0.001	31%
8016	0.571 ± 0.002	25%
8017	0.502 ± 0.004	34%
8027	0.550 ± 0.003	28%
8029	0.699 ± 0.004	8%
8030	0.439 ± 0.003	42%
8031	0.224 ± 0.002	71%
8032	0.335 ± 0.007	56%
控制組	0.763 ± 0.001	0%

表-9. *Prevotella intermedia* Group B ATCC 33563 受藥物影響下之 O.D.值及抑制百分比. *P. intermedia* Group B ATCC 33563 以 O.D.590 = 0.100 之接種量, 培養於含有 100 µg/ml salicylanilide 衍生物的 trypticase soy hemin 培養液中, 培養 24 小時後, 取 200µl 菌液於 96 孔微量平板中, 以比色機測 O.D 590 之吸光值. 所得吸光值減去空白對照組 O.D.值, 即是表中所示之 O.D. 值. 再除以對照組 O.D. 值, 即為細菌之存活百分比. 以 100%減去存活百分比, 即可得表中所示之抑制百分比.

藥物	O.D.值	抑制組
8000	0.486 ± 0.001	54%
8001	0.223 ± 0.002	75%
8003	0.333 ± 0.005	63%
8004	0.175 ± 0.001	80%
8005	0.155 ± 0.001	83%
8006	0.004 ± 0.008	95.4%
8007	0.158 ± 0.001	82%
8008	0.293 ± 0.002	67%
8009	0.679 ± 0.004	24%
8010	0.356 ± 0.001	60%
8011	0.204 ± 0.002	77%
8012	0.128 ± 0.001	86%
8013	0.155 ± 0.000	83%
8014	0.491 ± 0.009	45%
8015	0.597 ± 0.002	34%
8016	0.607 ± 0.010	32%
8017	0.624 ± 0.001	31%
8027	0.286 ± 0.007	68%
8029	0.147 ± 0.001	84%
8030	0.357 ± 0.009	60%
8031	0.663 ± 0.004	26%
8032	0.572 ± 0.001	36%
控制組	0.899 ± 0.002	0%

表-10. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b ATCC 29522 受藥物影響下之 O.D. 值及抑制百分比. *A. actinomycetemcomitans* serotype b ATCC 29522 O.D.₅₉₀ = 0.100 之接種量, 培養於含有 100 µg/ml salicylanilide 衍生物的 trypticase soy hemin 培養液中, 培養 48 小時後, 取 200µl 菌液於 96 孔微量平板中, 以比色機測 O.D. 590 之吸光值. 所得吸光值減去空白對照組 O.D. 值, 即是表中所示之 O.D. 值. 再除以對照組 O.D. 值, 即為細菌之存活百分比. 以 100% 減去存活百分比, 即可得表中所示之抑制百分比.

藥物	O.D. 值	抑制 %
8000	0.095 ± 0.009	26%
8001	0.081 ± 0.009	37%
8003	0.126 ± 0.006	2%
8004	0.130 ± 0.004	0%
8005	0.122 ± 0.021	5%
8006	0.069 ± 0.001	46%
8007	0.110 ± 0.005	14.5%
8008	0.027 ± 0.023	79%
8009	0.129 ± 0.010	0%
8010	0.077 ± 0.005	40%
8011	0.083 ± 0.003	35%
8012	0.091 ± 0.003	29%
8013	0.105 ± 0.002	18%
8014	0.101 ± 0.003	21%
8015	0.130 ± 0.013	0%
8016	0.114 ± 0.006	11%
8017	0.111 ± 0.006	14.5%
8027	0.012 ± 0.004	91%
8029	0.127 ± 0.004	0%
8030	0.131 ± 0.010	0%
8031	0.114 ± 0.004	14%
8032	0.129 ± 0.019	0%
控制組	0.128 ± 0.001	0%

表-11. *Curva curva* ATCC 35224 受藥物影響下之 O.D.值及抑制百分比. *C. curva* ATCC 35224 以 O.D.590 = 0.090 之接種量, 培養於含有 100 µg/ml salicylanilide 衍生物的 trypticase soy hemin 培養液中, 培養 48 小時後, 取 200µl 菌液於 96 孔微量平板中, 以比色機測 O.D 590 之吸光值. 所得吸光值減去空白對照組 O.D.值, 即是表中所示之 O.D. 值. 再除以對照組 O.D. 值, 即為細菌之存活百分比. 以 100%減去存活百分比, 即可得表中所示之抑制百分比.

藥物	O.D 值	抑制 %
8000	0.084 ± 0.008	87%
8001	0.148 ± 0.013	60%
8003	0.227 ± 0.012	39%
8004	0.208 ± 0.024	44%
8005	0.233 ± 0.016	37%
8006	0.264 ± 0.015	29%
8007	0.268 ± 0.007	28%
8008	0.287 ± 0.005	23%
8009	0.185 ± 0.031	50%
8010	0.172 ± 0.018	34%
8011	0.145 ± 0.010	61%
8012	0.266 ± 0.018	29%
8013	0.182 ± 0.016	51%
8014	0.147 ± 0.011	61%
8015	0.207 ± 0.008	44.5%
8016	0.224 ± 0.002	40%
8017	0.163 ± 0.003	56%
8027	0.143 ± 0.016	61%
8029	0.207 ± 0.027	44%
8030	0.271 ± 0.004	27%
8031	0.213 ± 0.007	43%
8032	0.155 ± 0.003	42%
控制組	0.372 ± 0.005	0%

表-12. 22 種 salicylanilide 衍生物對 *Streptococcus sanguis* ATCC 25175, *Streptococcus mutans* ATCC 10556, *Selenomonas artemidis* ATCC 43528, *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351, *Centipeda periodontii* ATCC 35019, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedius* group A ATCC 25611, *Prevotella intermedius* group B ATCC 33563, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b ATCC 29522 及 *Campylobacter curva* ATCC 35224 等 10 種細菌的抑制百分比。

	<i>S.sang</i> -uis ATCC 25175	<i>S.muta</i> -ns ATCC 10556	<i>S.arte</i> midis ATCC 43528	<i>C.peri</i> odontii ATCC 35019	<i>F.nucl</i> eatum VPI 5351	<i>P.gingi</i> valis ATCC 33277	<i>P.inter</i> medius A ATCC 25611	<i>P.inter</i> medius B ATCC 33563	<i>A.actin</i> omycet emcom itans ATCC 29522	<i>C.curv</i> a ATCC 35224
8000	0	7	5	20	29	34	19	46	26	87
8001	0	8	12	19	39	15	25	75	37	60
8003	0	8	1	24	43	10	30	63	2	39
8004	2	9	16	14	20	20	38	80	0	44
8005	0	0	6	26	54	27	41	83	5	37
8006	29	38	57	41	95.4	50	72	95.4	46	29
8007	0	7	19	12	85	41	48	82	14.5	28
8008	1	19	18	42	37.5	44	32	67	79	23
8009	1	14	0	17	13	4	1	24	0	50
8010	7	12	0	36	36	12	31	60	40	54
8011	0	11	3	17	41	8	39	77	35	61
8012	0	5	5	19	67	17	64.6	86	29	29
8013	0	9	8	23	80	23	35	83	18	51
8014	0	9	12	31	44	8	28	45	21	61
8015	0	5	0	25	29	10	31	34	0	44.5
8016	0	6	0	8	43	31	25	32	11	40
8017	0	11	4	15	28	10	34	31	13.5	56
8027	1	5	0	33	47	12	28	68	91	61
8029	7	48	0	10	12	25	8	84	0	44
8030	2	9	3	32	13	11	42	60	0	27
8031	0	8	1	8	15	10	7	36	14	43
8032	22	16	0	37	73	7	56	36	0	58

表-13. 22 種 salicylanilide 衍生物對 *Streptococcus sanguis* ATCC 25175, *Streptococcus mutans* ATCC 10556, *Selenomonas artemidis* ATCC 43528, *Fusobacterium nucleatum* VPI 5351, *Centipeda periodontii* ATCC 35019, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermidius* group A ATCC 25611, *Prevotella intermidius* group B ATCC 33563, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b ATCC 29522 及 *Campylobacter curva* ATCC 35224 等 10 種細菌 50%抑制率之最低抑制濃度 (MIC: µg/ml).

藥物	細菌									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
8000	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	50
8001	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	25	>100	50
8003	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	6.25	>100	>100
8004	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	25	>100	>100
8005	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	12.5	>100	>100
8006	>100	>100	50	12.5	>100	50	25	<6.25	>100	>100
8007	>100	>100	>100	25	>100	>100	>100	25	>100	>100
8008	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	25	50	>100
8009	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	50
8010	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	50	>100	50
8011	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	25	>100	>100
8012	>100	>100	>100	25	>100	>100	50	25	>100	>100
8013	>100	>100	>100	50	>100	>100	>100	>100	>100	50
8014	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	50
8015	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
8016	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	50	>100	>100
8017	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	50
8027	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	50	25	50
8029	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	50	>100	>100
8030	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	50	>100	>100
8031	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
8032	>100	>100	>100	50	>100	>100	25	>100	>100	50

1, 代表 *S. sanguis* ATCC 25175; 2, 代表 *S. mutans* ATCC 10556; 3, 代表 *S. artemidis* ATCC 43528; 4, 代表 *F. nucleatum* VPI 5351; 5, 代表 *C. periodontii* ATCC 35019; 6, 代表 *P.gingivalis* ATCC 33277; 7, 代表 *P.intermidius* group A ATCC 25611; 8, 代表 *P.intermidius* group B ATCC 33563; 9, 代表 *A.actinomycetemcomitans* serotype b ATCC 29522; 10, 代表 *C.curva* ATCC 35224.

參考文獻

1. Alaluusua, S.; Asikainen, S.(1988). Detection and distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in primary dentition. J. Periodontol. 59, 504-507.
2. Alaluusua, S.; Asikainen, S.; Lai, C-H.(1991). Intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Periodontol. 62, 207-210.
3. Alaluusua, S.; Saarela, M.; Jousimies-Somer, H.; Asikainen, S.(1993). Ribotyping shows intrafamilial similarity in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates. Oral Microbiol. Immunol. 8, 225-229.
4. Armour, J.(1983). In Pharmacological Basis of Large Animal Medicine, eds J. A. Bogom, P. Lees and A.T. Yoxall, p.174 Oxford: Blackwell Scientific Publications.
5. Asikainen, S.(1986). Subgingival microflora in a relation to clinical conditions in juvenile periodontitis. Proc. Finn. Dent. Soc. 82, Suppl.XIII.
6. Asikainen, S.; Alaluusua, S.(1993). Bacteriology of dental infections. Euro. Heart J. 14(Suppl. K), 43-50.
7. Asikainen, S.; Alaluusua, S.; Kari, K.; Kleemola-Kujala, E.(1986). Subgingival microflora and periodontal conditions in healthy teenagers. J. Periodontol. 57, 505-509.
8. Asikainen, S.; Alaluusua, S.; Saxen, L.(1991). Recovery of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from teeth, tongue, and saliva. J. Periodontol. 62, 203-206.
9. Asikainen, S.; Jousimies-Somer, H.; Kanervo, A.; Summanen, P.(1987). Certain bacterial species and morphotypes in localized juvenile periodontitis and matched controls. J. Periodontol. 58, 224-229.
10. Asikainen, S.; Lai, C-H.; Alaluusua, S.; Slots, J.(1991). Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. Oral Microbiol. Immunol. 6, 115-118.
11. Baehi, P.; Tsai, C-C.; McArthur W.P.; Hammond, B.J.; Taichman, N.S.(1979). Detection of leukotoxic activity of a plaque-derived gram-negative microorganism. Infect. Immun. 24, 233-243.
12. Bager, I.A.; Hall, E.; Dash, K.M.(1991). Local eradication of *Haemochus*

- contortus* using closantel. *Austra. Veter. J.* 68, 347-348.
13. Baquero, F.; Reg, M.(1992). Resistance of anaerobic bacteria to antimicrobial agent in Spain. *Euro. J. Microbiol. Infec. Dise.* 11, 1016-1020.
 14. Bass, C.C.; Johns, I.M.(1915). *Alveolodental pyrohea*. Philadelphia: W.B. Saunders Co..
 15. Bennekou, P.(1988). Steady-state and transient membrane potentials in human red cells determined by protonophore-mediated pH changes. *J. Membrane Biol.* 106, 41-46.
 16. Berthold, P.; Males, B.M.; Dougherty, P.A.; Lai, C-H.; Listgarten, M.A.(1988) Ultrastructure of the flagellar basal body complex of *Centipeda periodontii*. *J. Ultra. Mole. Stru. Res.* 99, 150-155.
 17. Broome, A.; Jones, W.G.M.(1966). A new drug for the treatment of fascioliasis in sheep and cattle. *Nature.* 210, 744.
 18. Brown, W.R.; Shiviji, G.M.; Furkawa, R.D.; Ramsay, C.A.(1987). Studies of the action spectrum for induction of photosensitivity to tetrachlorosalicylanilide in mice. *Photo-dermatol.* 4, 196-200.
 19. Burgger, A.(1970) *Medicine Chemistry*. 3ed, part I: 603-609.
 20. Button, C.; Jerett, I.; Alexander, P.; Mizow, W.(1987). Blindness in kids associated with overdosage of closantel. *Austra. veter. J.* 64, 226.
 21. Campbell, A.H., in *Experimental Chemotherapy*, R. J. Schnitzer and F. Hawking, eds., Vol.III, Academic Press, New York, 1964, p461.
 22. Carlsson, J.(1967). Presence of various types of non-hemolytic *Streptococci* in dental plaque and in other sites of the oral cavity in man. *Odontol. Revy* 18, 55-74.3.
 23. Carlsson, J.(1968). Plaque formation and streptococcal colonization on teeth. *Odontol. Revy.* 19, suppl. 14.
 24. Carranza, F.A., Jr.(1990). *Clinical Periodontology*, 7th Ed., p.236. W.B. Saunders Co., Philadelphia, U.S.A.
 25. Chaia, G.; Chiari, L.; Da Silva, D.C.; Guerrero, J.(1981). Pilot trials on the treatment of *Dermatobia hominis* infections in cattle with closantel. *Am. J. Veter. Res.* 42, 1240.
 26. Clark, M.T.; Coburn, R.A.; Evans, R.T.; Genco, R.J.(1986). 5-(Alkylsulfonyl) salicylanilides as potential dental antiplaque agents. *J. Med. Chem.* 29, 25-29.

27. Corpet, D.E.(1993). Current status of models for testing antibiotic residues. *Veter. Human Toxicolo.* 35 (Suppl. 1), 37-46.
28. Culter, C.W.; Kalmer, J.R.; Genco, C.A.(1995). Pathogenic strategies of the oral anaerobe: *Porphyromonas gingivalis*. *Trends in Microbiol.* 3, 45-50.
29. Daidone, G.; Maggio, B.; Schillaci, D.(1990). Salicylanilide and its heterocyclic analogues. A comparative study of their antimicrobial activity. *Pharmazie* 45(6), 441-442.
30. Daws, C.; Jenkins, G.W.; Tonge, C.H.(1963). The nomenclature of the integuments of teeth. *British Dent. J.* 115,65-68.
31. DeMello, F.J.; Leonard, M.S.(1979). *Eikenella corrodens*: A new pathogen. *Oral Surg.* 47, 402-404.
32. Deporter, D.A.; Brown, D.J.(1982). Fine structural observations on the mechanisms of loss of attachment during experimental periodontal disease in the rat. *J. Periodon. Res.* 15, 304.
33. DiRenzo, J.; Sixou, M.; McKay, T.(1992). Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genetic variants in LJP families. *Inter. Ass. Dent. Res. Glasgow, U.K.; Abstr. No. 730.*
34. Dobell, C.(1960). Antony van Leeuwenhoek and his little animals.
35. Duwell, D.; Metzger, H.(1973). *J. Med. Chem.* 16, 433.
36. Dzink, J.L.; Sheenan, M.T.; Socransky, S.S.(1990). Proposal of three subspecies of *Fusobacterium nucleatum* Knorr 1992: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* subsp. nov., comb. nov.; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* subsp. nov., nom. rev. comb. nov.; and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii* subsp. nov., nom. rev., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 74-78.
37. Dzink, J.L.; Socransky, S.S.; Haffajee.(1988). The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 15, 316-323.
38. Dzink, J.L.; Tanner, A.C.R.; Haffajee, A.D.; Socransky, S.S.(1985). Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J. Clin. Periodontol.* 12, 648-659.
39. Ebersole, J.L.; Kornman, K.S.(1991). Systemic antibody responses to oral microorganisms in the cynomolgus monkey: development of methodology and

- longitudinal responses during ligature-induced disease. Res. Immunol. 142, 829-839.
40. Egerton, J.R.; Yakstis, J.J.; Campbell, W.C. (1970). The efficacy of rafoxanide(3,4-diodo-3'-chloro-4'-(p-chlorohpenoxy))salicylanilide against *Haemonchus contortus* in sheep Res. Veter. Sci. 11, 382.
 41. Epstein, S.; Enta, T.(1965). Photoallergic contact dermatitis. J. Am. Med. Assoc. 194, 1016.
 42. Evans, R.T.; Baker, P.J.; Coburn, R.A.; Fischman, S.L.; Genco, R.J.(1977). *In vitro* antiplaque effects of antiseptic phenols. J.Periodontol. 156-162.
 43. Gharbia, S.E.; Shah, H.N.(1992). *Fusobacterium nucleatum* subsp. *fusiforme* subsp. nov. and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *animalis* subsp. nov. as additional subspecies within *Fusobacterium nucleatum*. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 296-298
 44. Gen, G.J.; Russell, J.B.(1991). Effect of monensin and a protonophore on protein degradation, peptide accumulation and deamination by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. J. Ani. Sci. 69, 2196-2203.
 45. Ghazi, I.M.; Mohamed, Z.A.; Ismail, S.A.; Kamal, A.(1986). Antibacterial effect and toxicity of synthesized salicylanilide derivatives. Zentralblatt fur Mikrobiologie 141(3), 225-232.
 46. Gibbons, R.J.; Kapsimalis, B.; Socransky, S.S.(1964). The source of salivary bacteria. Archives of Oral Biol. 9, 101-103.
 47. Gibbons, R.J.; MacDonald, J.B.(1961). Degradative of collagenous substrates by *Bacteroides melaninogenicus*. J. Bacteriol. 81, 614-621.
 48. Gibbons, R. J.; van Houte, J.(1973). On the formation of dental plaque. J. Periodontol. 6, 347-360.
 49. Goldstein, E.J.; Tarenzi, L.A.; Agyare, E.O.; Berger, J.(1983). Prevalence of *Eikenella corrodens* in dental plaque. J. Clin. Microbiol. 17, 636-639.
 50. Grenier, D.; Maryland, D.(1987). Selected characteristics of pathogenic and non-pathogenic strain of *Bacteroides gingivalis*. J. Clin. Microbiol. 25, 138-140.
 51. Han, Y.H.; Smibert, R.M.; Krieg, N.R.(1991). *Wolinella recta*, *Wolinella curva*, *Bacteroides ureolyticus* and *Bacteroides gracilis* are microphilic, not anaerobes. Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 218-222.

52. Han, Y.H.; Smibert, R.M.; Krieg, N.R.(1992). Cytochrome composition and Oxygen-dependent respiration-driven proton translocation in *Wolinella curva*, *Wolinella recta*, *Bacteroides ureolyticus*, and *Bacteroides gracilis*. *Can. J. Microbiol.* 38, 104-110.
53. Hausmann, E.(1974). Potential pathways for bone resorption in human periodontal disease. *J. Periodontol.* 45, 338.
54. Hirschfeld, I.(1932). Hypertrophic gingivitis; its clinical aspect. *J. Am. Dent. Assoc.* 19, 799.
55. Holdeman, L.V.R.; Kelly, R.W.; Moore, W.E.C.(1984). Genus I. *Bacteroides* Castellani and Chalmers. 1919.959, p604-631. In N.R.Krieg and J.G.Holt (ed), *Bergey's manual of systemic bacteriology*. The William and Wilkind Co., Baltimore.
56. Holts, S.C.; Ebersole, J.; Felton, J.; Brunsvold, M.; Kormmam, K.S.(1988). Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science* 239, 55-57.
57. Johnson, J.L.; Holdeman, L.V.(1985). *Bacteroides intermedius* comb. nov. and descriptions of *Bactroides corporis* sp. nov. and *Bacteroides levii* sp. nov.. *Int. J. Syst. Microbiol.* 33, 15-25.
58. Kakinuma, Y., Igarashi, K.(1988). Active Potassium extrusion regulated by intracellular pH in *Streptococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* 263, 14166-14170.
59. Kane, H.J.; Behm, C.A.; Bryant, C.(1980). In programme and abstracts, 25th Conference of the Australian Society for Parasitology, May 1980, 23, Adelaide, South Australia 1980.
60. Katz, S.; Park, K.C.(1976). Enhancement of the antiplaque value of antibacterial agents through enamel-conditioning method: II. Acquisition of antiplaque properties by treated enamel. *J. Dent. Res.* 55, 1084-1087.
61. Kenny, E.B.; Ash, M.M., Jr.(1969). Oxidation reduction potential of developing plaque, periodontal pockets and gingival sulci. *J. Periodontol.* 40, 630-633.
62. Kesavalu, L.; Holt, S.C.; Ebersole, J.L.(1992). Proteases of *Porphyromonas gingivalis*: comparison of *in vitro* and *in vivo* functions. *J. Dent. Res.* 71.
63. Koenoenen, E.(1993). Pigmented *Prevotella* species in the periodontally healthy oral cavity. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 6, 201-206.

64. Kolceguchi, S.; Tsutsui, O.; Kato, K.; Matsumura, T.(1990). Isolation and characterization of lipopolysaccharides from *Centipeda periodontii* ATCC 35019. *Oral Microbiol. Immun.* 5, 108-112.
65. Kornman, K.S.; Loesche, W.(1979). The subgingival microbial flora during pregnancy. *J. Periodon. Res.* 15, 111-122.
66. Komman, K.S.; Loesche, W.J.(1980). The subgingival microbial flora during pregnancy. *J. Periodon. Res.* 15, 111-112.
67. Kopkins, S.J.(1965). Brominated salicylanilides as antibacterial agents. *Manufacturing Chemist and Aerosol News.* 63.
68. Krasse, B.(1954). The proportional distribution of *Streptococci salivarius* and other *Streptococci* in various parts of the mouth. *Odontol. Revy* 5, 203-211.4. Lindhe, J.;
69. Labbe, S.; Grenier, D.(1995). Characterization of the human immunoglobulin G Fc-binding activity in *Prevotella intermedia*. *Infec. Immun.* 63, 2785-2789.
70. Lai, C-H.; Listgarten, M.A.; Tanner, A.C.R.; Socransky, S.S.(1981). Ultrastructures of *Bacteroides gracilis*, *Campylobacter concisus*, *Wolinella recta*, and *Eikenella corrodens*, all from humans with periodontal disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31, 465-475.
71. Lai, C-H.; Males, B.M.; Dougherty, P.A.; Berthold, P.; Listgarten, M.A.(1983). *Centipeda periodontii* gen. nov., sp. nov. from human periodontal lesions. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33, 628-635.
72. Larto, D.; Stahl, S.S.; Brown, R, Jr.(1969). The effect of a prescribed method of toothbrushing on the fluctuation of marginal gingivitis. *J. Periodontol.* 40, 142.
73. Lenox, J.A.; Kopczyk, R.A.(1973). A clinical system for scoring a patient's oral hygiene performance. *J. Am. Dent. Assoc.* 86, 849.
74. Lindhe, J.; Nyman, S.(1975). The effect of plaque control elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease. *J. Clin. Periodontol.* 11, 504-514.
75. Listgarten, M.A.(1984). Subgingival microbiological differences between periodontally healthy sites and diseased sites prior to and after treatment. *Inter. J. Perio. Rest. Dent.* 4, 27-34.
76. Listgarten, M.A.; Hellden, L.(1978). Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in human. *J. Clin. Periodontol.* 5, 115-132.

77. Loe, H.; Silnes, J. (1983). Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalance and severity. *Acta Odontologica Scandinavica* 21, 533-551.
78. Loe, H.; Theilade, E.; Jensen, S.B. (1965). Experimental gingivitis in man. *J. Periodontol.* 36, 177-187.
79. Loesche, W.J. (1990). Rationale for the use of antimicrobial agents in periodontal disease. *Int. J. Technol. Assess. Health. Care.* 6, 403-417.
80. Loesche, W.J. (1993). Bacterial mediators in periodontal disease. *Clin. Infec. Dise.* 16 (Suppl. 4), S203-210.
81. Loesche, W.L.; Syed, S.A. (1980). The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J. Periodontol.* 53, 223-230.
82. Loesche, W.J.; Syed, S.A.; Schmidt, E.; Morrison, E.C. (1985). Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. *J. Periosontol.* 56, 447-456.
83. McKellar, Q.A.; Kinabo, L.D.B. (1991). The pharmacology of flukicidal drugs. *Brit. Venter. J.* 147, 306-321.
84. Males, B.M.; Berthold, P.; Dougherty, P.A.; Listgarten, M.A. (1994). Helical flagellation in *Centipeda periodontii*, a gram negative, anaerobic bacillus from periodontitis lesions. *J. Gen. Microbiol.* 130(Pt 1), 185-191.
85. Mandell, R.L.; Scransky, S.S. (1981). A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. *J. Periodontol.* 52, 593-598.
86. McLeod, R.A.; Wisse, G.A.; Stejskal, F.L. (1988). Sensitivity of some marine bacteria, a moderate halophile, and *Escherichia coli* to uncoupler at alkaline pH. *J. Bacteriol.* 170, 4330-4337.
87. Meitner, S.W. (1979). Identification of inflamed gingival surface. *J. Clin. Periodontol.* 6, 93.
88. Miller, W.D. (1973). *Microorganism of the human mouth.* Basel, Switzerland: S. Karger.
88. Moore, L.V.J.; Johnson, J.L.; Moore, W.E.C. (1987). *Selenomonas noxia*, sp. nov., *Selenomonas flueggei* sp. nov., *Selenomonas infelix* sp. nov., *Selenomonas dianae* sp. nov., *Selenomonas artemidis* sp. nov. from the human gingival crevice. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 271-280.
89. Moore, W.E.C. (1987). Microbiology of periodontal disease. *J. Perio. Res.* 22, 335-

341.

90. Moore, W.E.C.; Holdeman, L.V.; Cato, E.P.; Smibert, R.M.; Burmeister, J.A.; Palcanis, K.G.; Ranney, R.R.(1985). Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect. Immun.* 48, 507-519.
91. Moore, W.E.C.; Holdeman, L.V.; Smibert, R.M.; Good, I.J.; Burmeister, J.A.; Palcanis, K.G.; Ranney, R.R.(1982). Bacteriology of experimental gingivitis in young adult human. *Infect. Immun.* 38, 651-667.
92. Murrah, V.A.(1985). Diabetes mellitus and associated oral manifestations: a review. *J. Oral Pathol.* 14, 271.
93. Murray, P.A.; Winkerler, J.R.;Sadkowski, L.;Kornman, K.S.(1988). Microbiology of HIV-associated gingivitis and periodontitis. In Robertson P.B. and Greenspan J.S., editors: Perspectives on oral manifestations of AIDS, diagnosis and management of HIV- associated infections, Litteton, M.A., P.S.G. Publishing Co.
94. Nawwar, G.A.; Abdelrazek, F.M.; Swellam, R.H.(1991). Cinnamoylnitile-, pyran-, and pyranopyranzloe-derivatives containing the salicylanilide moiety with anticipated molluscicidal activity. *Arch. der Phar.* 324, 875-877.
95. Newman, M.G.; Scransky, S.S.(1977). Predominant cultivable microbiota in periodontosis. *J. Periodon. Res.* 12, 120-128.
96. Ozakaki, K.; Oshima, S.; Kitamura, N.(1952). Comperative pharmacokinetic disposition of closantel in fungus. *J. Pharm. Soc. Jpn.* 72, 1039.
97. Osmundsen, P.E.(1969). Contact photoallergic contact dermatitis. *J.Am. Med. Assoc.* 194, 1016.
98. O-T-C Topical antimicrobial products and drug and cosmetic products. *Fed. Reg.* 39 No. 179: 3 3102, 1974.
99. Ozawa, I.; Kuwahara, M.; Takagaki, T.(1984). Synthesis and antimicrobial activity of salicylanilide derivative II. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 305-312.
100. Prokovich, N.N.(1961). The synthesis and study of the antimicrobial activity of salicylanilides containing a quinoline residue. ref: C.A. 55, 25047f. *Vrachebone Delo* 1.
101. Rich, S. in *Plant Pathology, an Advanced Treatise*, J. G. Horsfall and A.E.Dimond, eds., Vol.II, Academic Press, New York, 1960, p553.

102. Pomeroy, C.; Shanholtzer, C.J.; Peterson, L.S.(1987). *Selenomonas bacteriaemia* -- Case report and review of the literature. *Brit. Soci. Stud. Infec.*
103. Ritchey, T.W.; Lamster, J.B.; Picozzi, A.(1983). In "The effect of TBS and AN-10 on developing gingivitis for dental research. Cincinnati, Abstr. in *J. Dent. Res.* 62, 199.
104. Riviere, G.R.; Wagoner, M.A. Baker-Zaner, S.A.(1991). Identification of spirochetes related to *Treponema pallidum* in necrotizing ulcerative gingivitis and chronic periodontitis. *N. Engl. J. Med.* 325, 539-543.
105. Rodenburg, J.P.; van Winkelhoff, A.J.; Winkel, E.G.; Goene, R.J.; Abbas F.; de Graaff, J.(1990). Occurrence of *Bacteroides gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. *J. Clin. Periodontol.* 17,392-399.
106. Rotmistrov, M.M.; Mikhnov'ska, N.D.; Baisheva, V.G.; Kulik, G.B. *Visn. Kiiv's'k Univ.* N. 5, Ser. Biol. N. 1, 69 (1962); ref.: *C. A.* 60, 9642e (1964).
107. Rotmistrov, M.N.; Mikhnovskaya, N.D.; Kulik, G.V.; Potoskii, I.I.; Kornienko, Z.A.(1962). Sintez, isuchenie ostroi toksichnosti i protivogel'mintoi aktivnosti salitsilanilinov, soderzhashchikh ostatok khinolina. SU144787 (Feb.15, 1962); *C.A.* 57, 8667h.
108. Saarela, M.; Asikainen, S.; Alaluusa, S.; Pyhaelae, L.; Lai, C-H.; Jousimies-Somer, H.(1992). Frequency and stability of mono/polyinfection by *actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype a,b,c,d, or e. *Oral Microbiol. Immunol.* 7,277-279.
109. Saarela, M.; Asikainen, S.; Jousimies-Somer, H.; Asikainen, T.; von Troil-Linden, B.; Alaluusua, S.; (1993). Hybridization patterns of *Actinobacillus actinobycetemcomitans* serotype a-e detected with an rRNA gene probe. *Oral Microbiol. Immun.* 8, 111-115.
110. Saarela, M.; von Troil-Linden, B.; Torkko, H.; Stucki, A.M.; Alaluusua, S.; Jousimies-Somer, H.; Asikainen, S.(1993). Transmission of oral bacterial species between spouses. *Oral Microbiol. Immunol.* 8, 349-359.
111. Saarela, M.; von Troil-Linden B.; Torkko, H.; Stucki, A-H.; Alaluusua, S.; Jousimies-Somer, H.; Asikainen, S.(1993) Transmission of oral bacterial species between spouses. *Oral Microbiol. Immunol.* 8, 349-354

112. Saglie, R.; Carranza, F.A.; Newman, M.G.; Cheng, L.; Lewin, K.L.(1982). Identification of tissue-invading bacteria in human periodontal disease. *J. Periodon.Res.* 17, 452-455.
113. Saglie, R.; Newman, M.G.; Carranza, F.A., Jr.(1982). Scanning electron microscopy of the interaction of leukocytes and bacteria in human periodontitis. *J. Periodontol.* 53, 752.
114. Saxen, L.(1980). Heredity of juvenile periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 7, 276.
115. Schroeder, H.E.(1970). Quantitative parameters of early human gingival inflammation. *Arch. Oral Biol.* 15, 383.
116. Schroeder, H.E.; Graf de Beer, M.; Attstrom, R.(1975). Initial gingivitis in dogs. *J. Periodon. Res.* 10, 128.
117. Serio, F.G.;Siegel, M.A.(1991). Periodontal disease: A review. *Curtis* 47(1),55-62.
118. Seymour, G.J.; Dockrell, H.M.; Greenspan, J.S. (1978). Enzyme differentiation of lymphocyte subpopulations in sections of human lymph nodes, tonsils, and periodontal disease. *Clin. Exp. Immunol.* 32, 169.
119. Seymour, G.J.; Powell, R.W.; Davies, W.J.R.(1979). Conversion of a stable T-cells lesion to a progressive B- cell lesion in the pathogenesis. *J. Clin. Periodontol.* 6, 267.
120. Shah, H.N.; Bonnett, R.; Matten, B.; Williams, R.A.D.(1979). The porphyrin pigmentation of subspecies of *Bacteroides melaninogenicus*. *Biochem. J.* 180, 45-50.
121. Shah, H.N.; Collins, M.D.(1988). Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides endodontalis* in a new genus: *Porphyromonas*. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 38, 128-131.
122. Shenker, B.J.; Berthod, P.; Dougherty, P.; Porter, K.K.(1987). Immunosuppressive effects of *Centipeda periodontii*: selective cytotoxicity for lymphocytes and monocytes. *Infect. Immun.* 2332-2340.
123. Singh, H.; Singh, A.K.; Sharma, S.; Iyer, R.N.(1977). Synthesis of 5-chloro-3'-nitro-4'-substituted salicylanilides, a new series of anthelmintic and antimicrobial agents. *J. Med. Chem.* 16, 826-829.
124. Siroidski, E.R.(1990). *Pseudomonas* APS nutrient medium for the isolation and

identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*.

Laboratorrwe Delo 8, 65-67.

125. Slots, J.(1976). The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. Scan. J. Dent. Res. 84, 1-10.
126. Slots, J.(1979).The subgingival microflora and periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 6, 351-382.
127. Slots, J.; Bragd, L.; Wikstroem, M.; Dahlen G.(1986). The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. J. Clin. Periodontol. 13, 570-577.
128. Slots, J.; Feik, D.; Rams, T.(1980). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides intermedius* in human periodontitis: age relationship and mutual association. J. Clin. Periodontol. 17, 659-662.
129. Slots, J.; Genco, R.J.(1984). Microbial pathogenicity. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: Virulence factors in colonization, survival and tissue destruction. J. Dent. Res. 63, 412-421.
130. Slots, J.; Listgarten, M.A.(1988). *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 15, 85-93.
131. Slots, J.; Reynolds, H.S.; Genco, R.J.(1980). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. Infec. Immun. 29, 1013-1020.
132. Slots, J.; Taubman, M.A.(1992). Contemporary Oral Microbiology and Immunology. Ed: Reinhardt, R.W. Mosby-Year Book, Inc. Micccouri, U.S.A.
133. Socransky, S.S.(1977).Microbiology of periodontal disease -- Present status and future consideration. J. Periodontol. 48, 497-504.
134. Socransky, S.S.(1979).Critria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 6, 16-21.
135. Socransky, S.S.; Hafajee, A.D.(1991). Microbial mechanisms in the pathogenesis of destrunctive periodontal disease: a critical assessment. J. Periodon. Res. 26, 195-212.

136. Socransky, S.S.; Haffajee, A.D.; Dzink, J.L.(1988). Relationships of subgingival micromial complexes to clinical features at the sampled site. *J. Clin. Periodontol.* 15, 440-444.
137. Sonju, T.; Glantz, P.O.(1975). Chemical composition of salivary integuments formed *in vivo* on solids with some established surface characteristic. *Archive of Oral Biol.* 20,687-691.
138. Summanen, P.(1993). Recent taxonomic changes for anaerobic gram-positive and selected gram-negative organisms. *Clin. Infec. Disease* 16, Suppl. 4, S168-S174.
139. Sundry, G.J.; Gillespie, M.J.; Motley, S.T.; Zambon, J.J.(1991). Atypical structure of the 23s ribosomal RNA molecule in certain oral bacteria. *J. Dent. Res.* 70, 961-965.
140. Tanner, A.C.R.; Badger, S.; Lai, C-H.; Listgarten, M.A.; Visconti, R.A.; Scransky, S.S.(1981). *Wolinella* gen. nov., *Wolinella succinogenes* (*Vibrio succinogenes* Wolin et al.) comb. nov., and Discription of *Bacteroides gracilis* sp. nov., *Wolinella recta* sp. nov., *Campylobacter concisus* sp. nov., and *Eikenella corrodens* from humans with periodontal disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31, 432-445.
141. Tanner, A.C.R.; Haffer, C.; Bratthall, G.T.; Viscontii, R.A.; Socransky, S.S.(1979). A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J. Clin. Periodontol.* 6, 278-287.
142. Tanner, A.C.R.; Listgarten, M.A.; Ebersole, J.L.(1984). *Wolinella curva* sp. nov.: " *Vibrio succinogenes* " of human origin. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 275-282.
143. Tokura, Y.; Yagi, H.; Ihoda, H.; Takigawa, M.(1994). Evaluation of ultraviolet-A protection by sunscreen agents using a mouse model of contact photoallergy. *J. Dermatol. Sci.* 7, 39-44.
144. van den Bossche, H.I.; Verhouvern, H.; van Parijs, O.; Lauwers, H.; Thienpoint, D.(1979). Closantel, a new antiparasitic hydrogen ionophore. *Archives Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* 87, 851.
145. van Houte, J.; Gibbons, R.J.; Banghart, S.B.(1970). Aderence as a determinant of the presence of *Streptococcus salivaius* and *Streptococcus sanguis* on the human tooth surface. *Archives of Oral Biol.* 15, 1025-1034.
146. van Houte, J.; Gibbons, R.J.; Pulkkinen, A.J.(1971). Aderence as an ecological

- determinant for *Streptococci* in the human mouth. Archives of Oral Biol. 16, 1131-1141.
147. van Steenberghe, J.J.M.; Petit, M.D.A.; van der Velden, U.; de Graaff, J.(1992). Transmission of *Porphyromonas gingivalis* between spouses. Am. Ass. Den. Res. Boston, U.S.A., Abstr. No.890.
148. Vandamme, P.; Falsen, E., Rossau, R.; Hoste, B.; Seger, P.; Tytgat, R.; DeLay, J.(1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: remediation of genetic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 88-103.
149. Vandepitte, J.; de Greest, H.; Jousten, P.(1977). Subacute bacterial endocarditis due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Report of a case with a review of the literature. J. Clin. Pathol. 30, 842-846.
150. Vidor, E.; Viret, M.; Isoard, P.(1986). Viability damage of *Aspergillus flavus* spores by an antifungal aerosol. Mykosen. 29. 401-406.
151. Vohr, H.W.; Homey, B.; Schuppe, H.C.; Kind, P.(1994). Detection of photoreactivity demonstrated in a modified local lymph node assay in mice. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 10, 57-64.
152. Waisser, K.; Kubicova, L.(1993). Biological effects of substances similar to salicylanilides, 3-aryl-2-H,4-H benz(e)(1,3) oxazine-2,4-diones and thiosalicylanilides. Ceskoslovenska faracie. 42, 218-222.
153. Wexler, H.M.(1993). Susceptibility testing of anaerobic bacteria -- the state of the art. Clin. Infect. Dis. 16(Suppl. 4), S328-333.
154. You, C.; Chein, R.(1995). The association of *Centipeda periodontii* with adult periodontitis. Chin. Dent. J. 14(3), 133-139.
155. Zambon, J.(1985). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 12, 1-20.
156. Zambon, J.; Slots, J.; Genco, R.J. (1983). Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. Infect. Immun. 41, 19-27.

《 授 權 書 》

本人所撰(著) 八十四 學年度第一 學期

中山醫 學院 大學

醫學 研究所 碩 士學位論文(論文名稱: Salicylamine 衍生物抗口腔微生物 之研究)

之提要 同意 不同意 開放供學術利用。

姓名: 吳重進

立書人: 地址: 高縣鳳山市自由路53巷12號

身分證統一編號: 5121508203 聯絡電話: 0912 946-7579

中華民國 85 年 2 月 29 日