

## マクロファージを標的とするドラッグデリバリーシステムの構築

丁野 純男

## Development of Drug Delivery Systems for Targeting to Macrophages

Sumio CHONO

Department of Pharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido Pharmaceutical University, 7-1 Katsuraoka-cho, Otaru City 047-0264, Japan

(Received May 2, 2007)

Drug delivery systems (DDS) using liposomes as drug carriers for targeting to macrophages have been developed for the treatment of diseases that macrophages are related to their progress. Initially, DDS for the treatment of atherosclerosis are described. The influence of particle size on the drug delivery to atherosclerotic lesions that macrophages are richly present and antiatherosclerotic effects following intravenous administration of liposomes containing dexamethasone (DXM-liposomes) was investigated in atherogenic mice. Both the drug delivery efficacy of DXM-liposomes (particle size, 200 nm) to atherosclerotic lesions and their antiatherosclerotic effects were greater than those of 70 and 500 nm. These results indicate that there is an optimal particle size for drug delivery to atherosclerotic lesions. DDS for the treatment of respiratory infections are then described. The influence of particle size and surface mannosylation on the drug delivery to alveolar macrophages (AMs) and antibacterial effects following pulmonary administration of liposomes containing ciprofloxacin (CPFX-liposomes) was investigated in rats. The drug delivery efficacy of CPFX-liposomes to AMs was particle size-dependent over the range 100–1000 nm and then became constant at over 1000 nm. These results indicate that the most effective size is 1000 nm. Both the drug delivery efficacy of mannosylated CPFX-liposomes (particle size, 1000 nm) to AMs and their antibacterial effects were significantly greater than those of unmodified CPFX-liposomes. These results indicate that the surface mannosylation is useful method for drug delivery to AMs. This review provides useful information to help in the development of novel pharmaceutical formulations aimed at drug targeting to macrophages.

**Key words**—drug delivery system; targeting; macrophages; liposomes; atherosclerosis; respiratory infections

## 1. はじめに

薬物の体内動態を精密に制御し、作用部位へ望ましい濃度-時間パターンの基に送り込むことにより、治療の最適化を達成することを目的に開発される薬物投与形態をドラッグデリバリーシステム (DDS) と呼ぶ。DDS は、1) 薬物を病変部位へ選択的に送達させる標的指向化 (ターゲティング)、<sup>1-5)</sup> 2) 徐放性製剤などに代表される放出制御、<sup>6-10)</sup> 3) 吸収促進剤などの利用による吸収改善<sup>11-15)</sup> の3つのタイプに大別される。なかでも、ターゲティングはその性質上、薬効の増強や副作用の軽減が大いに期待

される DDS である。上述のように、ターゲティングは薬物を病変部位へ選択的に送達させることを目的とするものであるが、その目的達成のためには、薬物担体 (ドラッグキャリア) を用いることが一般的である。ドラッグキャリアとして広く利用されているものには、リポソーム、<sup>16-18)</sup> エマルジョン、<sup>19,20)</sup> 高分子ミセル、<sup>21)</sup> 水溶性高分子、<sup>22)</sup> リポタンパク質<sup>23,24)</sup> などがある。特に、筆者が本総説で後述するリポソームは脂質二重膜から構成される閉鎖小胞であり、1) 生体由来のリン脂質やコレステロールが主構成成分であるため生体適合性に優れ、<sup>25)</sup> 2) 水溶性及び脂溶性薬物のどちらも封入することが可能、<sup>26,27)</sup> 3) 構成脂質の種類や組成を変更することが可能、<sup>28)</sup> 4) 粒子径を調整することが可能、<sup>29)</sup> 5) 表面電荷を付与することが可能、<sup>29)</sup> 6) 抗体などで表面を修飾することが可能、<sup>30)</sup> 7) 大量生産が可能<sup>31)</sup> など、

北海道薬科大学大学院薬学研究科薬剤学分野 (〒047-0264 小樽市桂岡町 7-1)

e-mail: s-chono@hokuyakudai.ac.jp

本総説は、平成 18 年度日本薬学会北海道支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

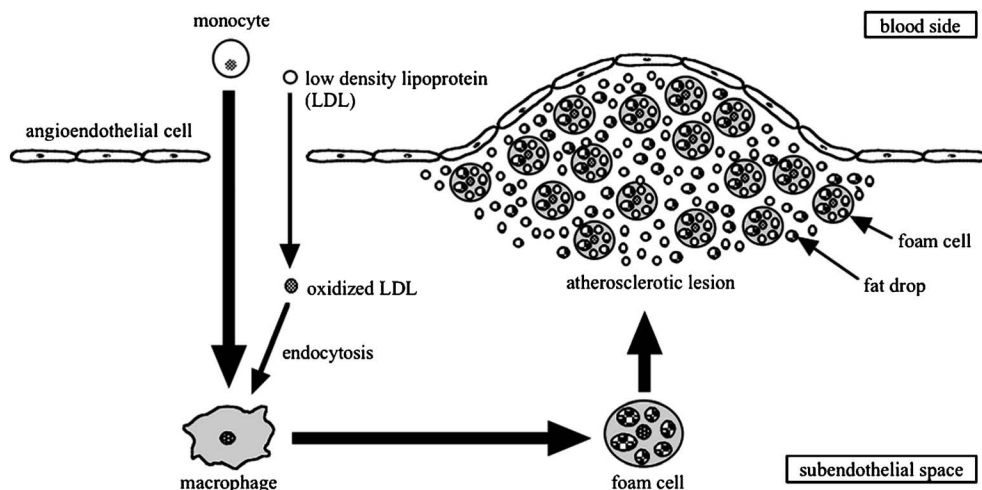


Fig. 1. Progression of Atherosclerosis in Subendothelial Space

様々な特徴や利点を有する。そのため、リポソームは多くの研究者の注目の的であり、最近では遺伝子導入のためのツールとしても広く研究されている。<sup>32-34)</sup> また、これまでに AmBisome<sup>®</sup>、Doxil<sup>®</sup>や Visudyne<sup>®</sup>などのリポソーム製剤が世界各国で市販に至っている。

マクロファージは主に生体防御を担う細胞であり、肝クッパー細胞、脾臓マクロファージや肺胞マクロファージなどが挙げられる。マクロファージは、炎症、肝疾患、動脈硬化や感染症など各種疾患の発症にも深く関与しており、<sup>35-38)</sup> これらの治療を最適化するためには有効な薬物をマクロファージに効率よく送達することが重要である。そのためには薬物のターゲティングが有効であり、その実現と新規 DDS 製剤の開発が望まれる。

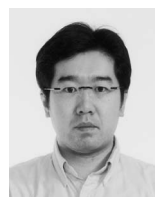
筆者はこれまでに、マクロファージへの薬物のターゲティングを目指し、リポソーム、リピッドエマルジョンやリポタンパク質などをドラッグキャリアの候補として種々の研究を行ってきた。<sup>2,3,5,16,19,23,25,29,39-43)</sup> 本総説論文では、動脈硬化症及び呼吸器感染症の治療を指向したマクロファージを標的とする DDS の構築について、ドラッグキャリアとしてリポソームを用いた研究の成果を論述する。

## 2. 動脈硬化症の治療を指向した DDS

動脈硬化症は大動脈や冠状動脈に好発し、心筋梗塞や脳梗塞など重篤な疾患の引き金となる。現在、動脈硬化症の治療は高脂血症治療薬などによる予防的治療と外科的治療が主流だが、治療効果はかならずしも望ましいものではなく、新規薬物治療システ

ムの開発が望まれている。動脈硬化症の発症には、動脈血管壁でのマクロファージの泡沫化が深く関与しており、その発症過程を Fig. 1 に示す。<sup>37)</sup> すなわち、単球由来のマクロファージが血管内皮下において酸化変性した低密度リポタンパク質を細胞内に取り込み、コレステロールエステルを過剰蓄積した泡沫細胞へ分化する。ついで、泡沫細胞の破綻と脂肪滴の蓄積を経て動脈硬化巣が形成される。抗炎症薬であるデキサメタゾン (DXM) はマクロファージの泡沫化を抑制し、さらに泡沫細胞に蓄積したコレステロールエステルを引き抜く作用も併せ持つため、新しいタイプの抗動脈硬化薬として期待されている。<sup>5,23,44)</sup> したがって、デキサメタゾンを動脈硬化巣のマクロファージ及び泡沫細胞に効率よく送達すれば、より高い治療効果が得られるものと期待される。

筆者らのグループは、動脈硬化症の発症の根源であるリポタンパク質をドラッグキャリアとして応用するという、いわゆる逆転の発想から研究をスタートさせた。DXM とリポタンパク質の複合体を調製し、*in vitro* 及び *in vivo* で抗動脈硬化作用を検討し



丁野純男

北海道薬科大学大学院薬学研究科講師。1974年北海道生まれ。北海道薬科大学薬学部卒業。北海道薬科大学大学院薬学研究科修士・博士課程修了。2003年北海道薬科大学薬学部助手。2007年より現職。現在、米国ノースカロライナ大学チャペルヒル校薬学部留学中。専門はドラッグデリバリーシステム、製剤学、生物薬剤学。

たところ、複合体は DXM 単独に比べ低用量で著効を示した.<sup>5,23,40)</sup> しかし、ヒト由来のリポタンパク質は大量供給が難しく、アナフィラキシーショック等の問題も否定できないことから、人工のドラッグキャリアを設計する方向へ研究をシフトさせた。

ドラッグキャリアを用いる動脈硬化症の治療戦略としては、1) 血中滞留性、2) 血中から動脈硬化巣への血管透過性、3) マクロファージ及び泡沫細胞による取り込みを向上させる必要がある。ドラッグキャリアを小粒子化し、さらにポリエチレングリコールなどで表面修飾して網内系組織への移行を回避させることにより血中滞留性の向上が可能となる。また、動脈硬化巣の周辺は血管内皮細胞間隙が開口していることから、<sup>45)</sup> 血中滞留性を維持できればターゲティング効果が十分に期待できる。しかし、最終標的であるマクロファージ及び泡沫細胞による取り込みを考慮すると、小粒子化やポリエチレングリコール修飾はかならずしも適当ではなく、ドラッグキャリアの粒子径をこれらの細胞に取り込み可能な大きさに調整することや特異的リガンドで表面修飾することが要求される。したがって、動脈硬化巣へのターゲティングを実現するためにはドラッグキャリアの粒子径や特異的リガンドによる表面修飾の有

無が重要な因子となるはずである。このような観点から、本研究ではドラッグキャリアの粒子径に着目し、動脈硬化巣へのターゲティングに及ぼすドラッグキャリアの粒子径の影響をサイジングが容易なりポソームを用いて評価した。以下、本研究の成果を論述する。

DXM 封入りポソーム (DXM-liposomes; 粒子径: 70, 200 又は 500 nm) の動脈硬化マウス (胸部大動脈に動脈硬化巣を形成しているモデル) における体内動態に及ぼす粒子径の影響を *in vivo* で検討した。DXM-liposomes を正常又は動脈硬化マウスに静脈内投与したのちの血中濃度推移及び胸部大動脈への送達効率を Fig. 2 及び Fig. 3 にそれぞれ示す。いずれのマウスにおいても血中からの薬物消失速度は粒子径の増大に依存して増加し、血中滞留性は粒子径に対して逆依存的であった (Fig. 2)。正常マウスではいずれを投与した場合も胸部大動脈への薬物移行はほとんど観察されなかった (Fig. 3 (A))。正常マウスでは血管内皮細胞間隙がタイトなため血管内皮下に移行し難いものと考えられる。一方、動脈硬化マウスでは投与 1 時間後の胸部大動脈への薬物送達効率は粒子径が 200 nm のときに最大であり、これは薬物単独投与の約 4 倍であった

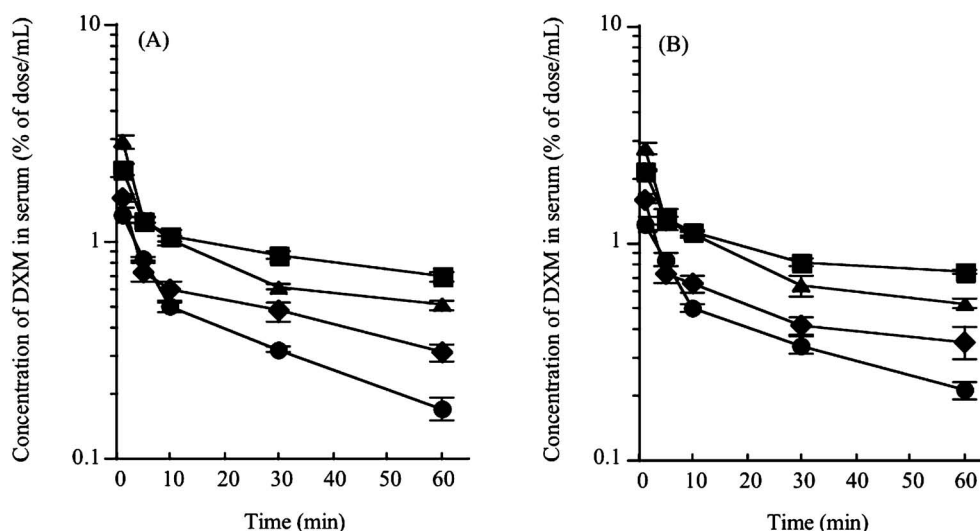


Fig. 2. Time-course of Concentration of DXM in Serum after Intravenous Administration of DXM-liposomes (particle size: 70, 200 and 500 nm) to Normal Mice (A) and Atherogenic Mice (B)

DXM-liposomes were prepared with egg yolk phosphatidylcholine, cholesterol and dicetylphosphate in a lipid molar ratio of 7/2/1 by the hydration method and then adjusted to three different particle sizes by extrusion method. The particle sizes of DXM-liposomes were 69 nm, 202 nm and 519 nm, respectively. DXM concentration and DXM/lipid molar ratio in DXM-liposomes suspension were 1 mg DXM/ml and 0.134 mol DXM/mol total lipids, respectively. Atherogenic mice were prepared by giving atherogenic diet (6 g/day) containing 10% linoleic acid, 1.5% cholesterol, 0.5% cholic acid, and 51.2% sucrose for 14 weeks. DXM-liposomes or free DXM (2.5 mg DXM/kg) were intravenously administered to mice. At each time-point after administration, DXM in serum were determined and concentrations of DXM were calculated. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n=4$ ). Symbols: the particle size of DXM-liposomes are (■): 70 nm, (▲): 200 nm, (●): 500 nm, respectively, (◆): free DXM.

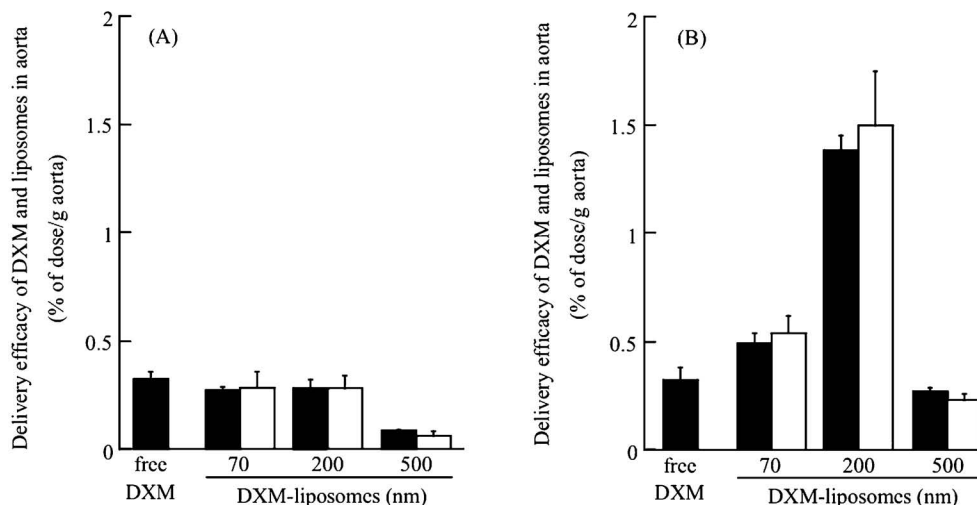


Fig. 3. Delivery Efficacy of DXM and Liposomes in the Aorta at 1 h after Intravenous Administration of DXM-liposomes (particle size: 70, 200 and 500 nm) to Normal Mice (A) and Atherogenic Mice (B)

DXM-liposomes or free DXM (2.5 mg DXM/kg) were intravenously administered to mice. At 1 h after administration, DXM and lipid marker in the aorta were determined and delivery efficacy of DXM and liposomes were calculated. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n=4$ ). Column: (closed), DXM; (open), liposomes. Details about DXM-liposomes and atherogenic mice used in this experiment are the same as those in Fig. 2.

(Fig. 3(B)). このとき、薬物とりポソームの送達効率はよく一致しており (Fig. 3(B)), 薬物がリポソームに封入されたまま動脈硬化巣のマクロファージ及び泡沫細胞に取り込まれていることが示唆された。なお、投与 8 時間後にはいずれの DXM-liposomes も動脈硬化巣からほぼ消失していた。また、詳細は示さないが、粒子径 200 nm の DXM 封入リピッドエマルジョンを同様に投与した場合においても、動脈硬化巣への薬物送達効率は同サイズの DXM-liposomes とよく一致したことから、<sup>19)</sup> ドラッグキャリアがりポソームであるか否かに係わらず、ドラッグキャリアによる動脈硬化巣へのターゲティングには至適粒子径が存在することが示された。

動脈硬化巣における DXM-liposomes の挙動を確認するため、マクロファージ及び泡沫細胞による DXM-liposomes の取り込みに及ぼす粒子径の影響を *in vitro* で検討した。DXM-liposomes をマクロファージ又は泡沫細胞に適用したのちの取り込み効率を Fig. 4 に示す。培養 1 時間後の DXM-liposomes の取り込み効率はいずれの細胞においても粒子径依存적であり、前述の *in vivo* における粒子径非依存的な動脈硬化巣への送達効率とは異なる挙動を示した。この *in vitro* 取り込み挙動に基づき、*in vivo* における動脈硬化巣への送達挙動を以下に考察する。500 nm の DXM-liposomes はマクロファージ及び泡沫細胞に取り込まれ易いが、粒子径が

大き過ぎるために *in vivo* では血管内皮細胞間隙を通過できず、そのため動脈硬化巣への送達効率が低値であったと推察される。一方、200 nm の DXM-liposomes は *in vivo* において血管内皮細胞間隙を通過可能であり、かつ動脈硬化巣のマクロファージ及び泡沫細胞に取り込まれるため、送達効率が高値であったと推察される。また、70 nm の DXM-liposomes は *in vivo* において血管内皮細胞間隙を通過可能であるが、動脈硬化巣のマクロファージ及び泡沫細胞に取り込まれ難いため、送達効率が低値であったと推察される。

DXM-liposomes の動脈硬化マウスにおける抗動脈硬化作用を検討し、体内動態との関係性を評価した。DXM-liposomes を動脈硬化マウスに週 1 回 7 週間に渡り繰り返し静脈内投与 (1 回の投与量: 55  $\mu$ g/kg, 抗炎症薬としての臨床静脈内投与量に相当) したのちの抗動脈硬化作用と上述の体内動態との関係を Fig. 5 に示す。動脈硬化抑制率すなわち抗動脈硬化作用は粒子径が 200 nm のときに最大であり、抗動脈硬化作用は血中滞留性の指標である平均滞留時間 (MRT) よりもむしろ動脈硬化巣への移行速度の指標である取り込みクリアランス ( $CL_{up}$ ) とよく相関した。当初、動脈硬化巣へのターゲティングを実現するためには血中滞留性の向上が必要不可欠であると考えていたが、血中滞留性よりも投与初期における病巣への移行性が薬効を制御するとい

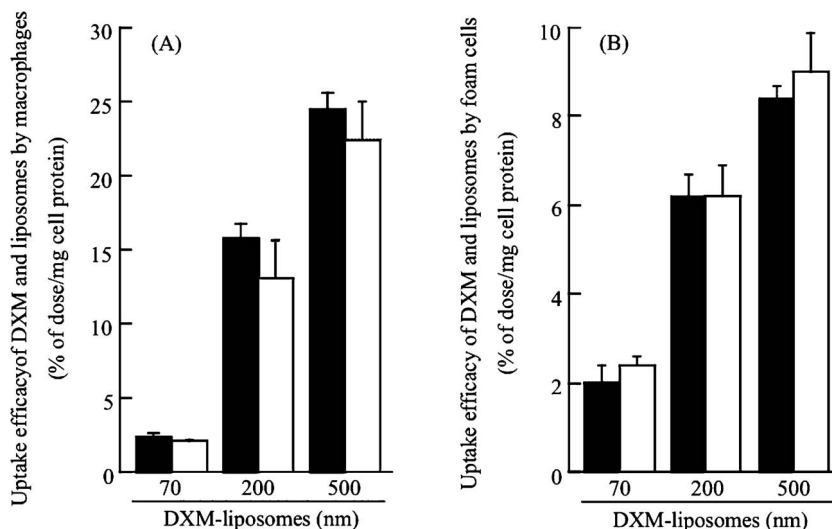


Fig. 4. Uptake Efficacy of DXM and Liposomes by Macrophages (A) and Foam Cells (B) at 1 h after Addition of DXM-liposomes (particle size: 70, 200 and 500 nm)

Macrophages obtained from murine peritoneal cavity and foam cells induced from macrophages by incubation with oxidized low-density lipoprotein were used. DXM-liposomes (25 nmol DXM/ml in medium) were added to cells, followed by incubation for 1 h at 37°C. After incubation, DXM and lipid marker in cells were determined and uptake efficacy of DXM and liposomes were calculated. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n=4$ ). Column: (closeded), DXM; (open), liposomes. Details about DXM-liposomes used in this experiment are the same as those in Fig. 2.

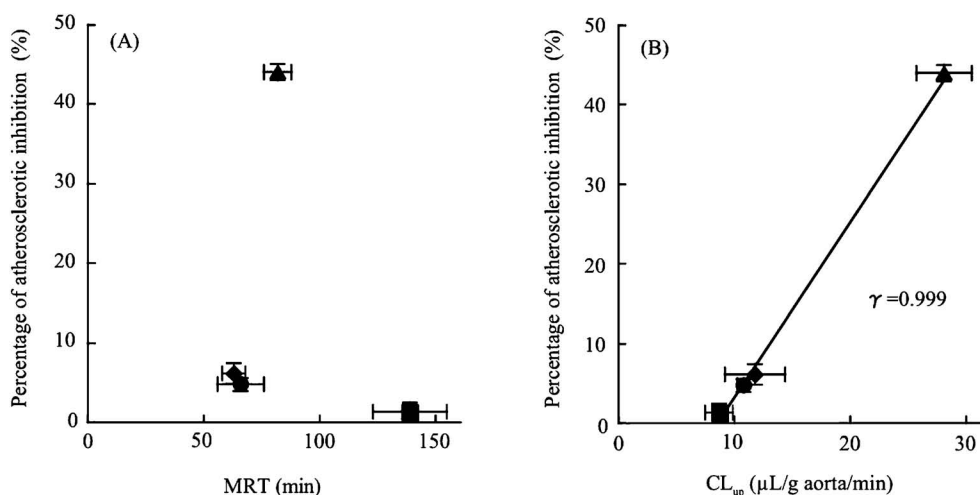


Fig. 5. Relationship between the Pharmacokinetics and Antiatherosclerotic Effect of DXM in Atherogenic Mice

Atherogenic mice were maintained for 14 weeks on an atherogenic diet as described in Fig. 2. DXM-liposomes or free DXM (55  $\mu$ g DXM/kg) were intravenously administered to atherogenic mice once a week from 8 to 14 weeks. After 14 weeks, cholesterol ester level in aorta was determined and percentage of atherosclerotic inhibition was calculated. Mean residence time (MRT) and aortic uptake clearance (CL<sub>up</sub>) of DXM were calculated from data shown in Fig. 2 and 3. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (percentage of atherosclerotic inhibition,  $n=6$ ; MRT and CL<sub>up</sub>,  $n=4$ ). (A): MRT and antiatherosclerotic effect, (B): CL<sub>up</sub> and antiatherosclerotic effect. Symbols: the particle size of DXM-liposomes are (■): 70 nm, (▲): 200 nm; (●): 500 nm, respectively, (◆): free DXM.

う大変興味深い知見が得られた。以上のことから、CL<sub>up</sub>は抗動脈硬化作用を定量的に制御する上で重要なパラメータであることが明らかとなり、このことは病状の進行状況に応じた治療方針の設計も可能であることを示唆している。

以上のように、動脈硬化症の治療にドラッグキャリアを用いるターゲティングが有用であることが示

された。動脈硬化巣へのターゲティングにはドラッグキャリアの粒子径に至適サイズが存在することが示され、さらに抗動脈硬化作用を制御するためには動脈硬化巣への薬物取り込みクリアランスの制御が重要であることが明らかとなった。本研究の成果は、動脈硬化症の治療を指向する新規薬物治療システムの実用化に有用な情報を提供するものであり、

今後の製剤開発の一助となることを期待する。

### 3. 細胞内寄生菌に起因する呼吸器感染症の治療を指向した DDS

肺結核、レジオネラ肺炎やクラミジア肺炎などの呼吸器感染症は、その起因菌が肺胞マクロファージ (AM) の殺菌機構に抵抗して AM 細胞内に寄生するため、重篤かつ難治性の場合が多く、治療が長期に及ぶ場合も少なくない。<sup>46-51)</sup> 特に、肺結核はエイズの流行と関連して増加傾向にあり、世界的に克服すべき呼吸器感染症の 1 つである。AM 内の寄生菌を殺菌するためには、AM 内の抗菌薬濃度を最小発育阻止濃度 (MIC) より高く設定しなければならない。したがって、抗菌薬を AM に効率よく送達すれば、少ない投与量でもより高い治療効果が得られるものと期待される。

現在、抗菌薬は呼吸器感染症の治療において経口投与により用いられている。しかし、経口投与された抗菌薬は血液を介して多くの組織に分布するため、全身性の副作用の発現がしばしば報告されている。<sup>52)</sup> これまでに筆者らのグループは、経口投与に替わる抗菌薬の新規投与ルートとして肺投与の有用性を模索してきた。肺投与は直接肺に薬物を投与するため効率的であり、投与量の減量や副作用の回避が期待される興味深い投与方法である。実際に、筆者らは、細胞内寄生菌に起因する呼吸器感染症の治療に広く用いられているキノロン系抗菌薬のシプロフロキサシン (CPF) をラットに肺投与 (0.2 mg/kg) した場合、臨床での経口投与量 (10 mg/kg) の 1/50 の投与量にも係わらず AM 中濃度の最高値が経口投与時より約 10 倍も高いことを明らかにし、肺投与の有用性を既に報告している。<sup>43)</sup> しかし、多くの抗菌薬はその濃度-時間パターンによっては耐性菌の出現を誘導する危険性があり、抗菌効果のみならず菌の変異防止を考慮するならば肺投与後の AM 内動態を精密に制御することが要求される。

細胞内寄生菌に起因する呼吸器感染症の治療戦略としては、ドラッグキャリアを用いる肺投与製剤化により AM への抗菌薬のターゲティングを実現し、AM 内の抗菌薬濃度を一過性に上昇若しくは長時間持続させることが必要となる。AM は肺胞表面の粘液層に存在し、II 型肺胞上皮細胞が産生するサーファクタント成分であるリン脂質の球状構造体を細

胞内に取り込み、サーファクタント代謝に関与している。<sup>53,54)</sup> それゆえ、同じくリン脂質を主成分とする閉鎖小胞であるリポソームは AM へのターゲティングのためのドラッグキャリアとして有用かもしれない。AM によるリポソームの取り込み特性はほとんど知られていないが、腹腔マクロファージやクッパー細胞のような貪食細胞によるリポソームの取り込みは粒子径に依存することが知られている。<sup>2,3,55)</sup> また、AM の表面にはマンノースレセプター、サーファクタントプロテインレセプターやスカベンジャーレセプターなどの特異的レセプターが発現している。<sup>56-58)</sup> したがって、リポソームを用いて AM へのターゲティングを実現するためにはその粒子径や特異的リガンドによる表面修飾の有無が重要な因子となるはずである。このような観点から、本研究ではリポソームをドラッグキャリアとして選択し、AM への CPF のターゲティングに及ぼす粒子径及び特異的リガンドによる表面修飾の影響を評価した。以下、本研究の成果を論述する。

CPF 封入リポソーム (CPF-liposomes; 粒子径 100, 200, 400, 1000 又は 2000 nm) の AM による取り込みに及ぼす粒子径の影響を *in vitro* 及び *in vivo* にて検討した。CPF-liposomes を培養ラット AM である NR8383 細胞に適用したのちの薬物取り込み効率の推移を Fig. 6(A) に示す。NR8383 細胞による薬物の取り込み効率は、いずれの粒子径においても薬物単独適用に比べ高い値で推移し、適用後 2 時間で平衡となった。製剤間で比較すると、薬物取り込み効率は粒子径の増大に依存して増加し、粒子径 1000 nm 以上で一定となった。これらの CPF-liposomes をラットに MicroSplayer (Penn Century 社) を用いて肺投与したのち 2 時間目における AM 中薬物濃度を Fig. 6(B) に示す。AM 中薬物濃度はいずれの粒子径においても薬物単独投与に比べ高値であった。また、AM 中薬物濃度は *in vitro* と同様に粒子径の増大に依存して増加し、粒子径 1000 nm 以上で一定となった。このように AM へ薬物をターゲティングする上で最も効率的なリポソームの粒子径は 1000 nm であることが明らかとなったため、AM へのターゲティング効果をさらに向上させることを目的に、AM の特異的リガンドであるマンノースで表面修飾した粒子径 1000 nm の CPF-liposomes を調製し、AM による取り込み

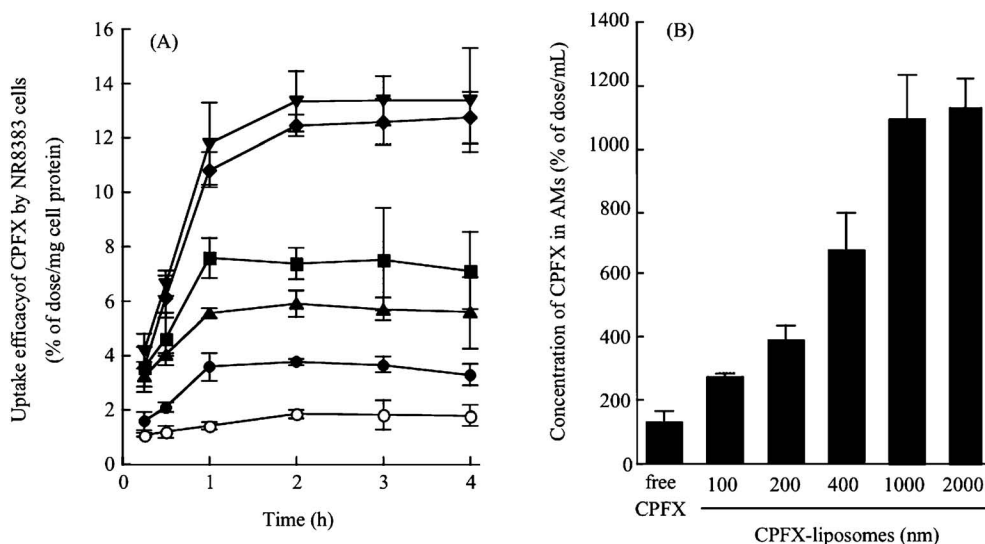


Fig. 6. Uptake Characteristics of CPFX-liposomes (particle size: 100–2000 nm) by NR8383 Cells *in vitro* (A) and AM *in vivo* (B)

CPFEX-liposomes were prepared with hydrogenated soybean phosphatidylcholine, cholesterol and dicetylphosphate in a lipid molar ratio of 7/2/1 by the hydration method and then adjusted to five different particle sizes by extrusion method. The particle sizes of CPFEX-liposomes were 93, 205, 405, 1094 and 2032 nm, respectively. CPFEX concentration and CPFEX/lipid molar ratio in CPFEX-liposomes suspension were 0.8 mg CPFEX/ml and 0.1 mol CPFEX/mol total lipids, respectively. (A): Uptake profiles of CPFEX by NR8383 cells after application of CPFEX-liposomes. CPFEX-liposomes or free CPFEX (100 nmol CPFEX/ml in medium) were added to NR8383 cells, followed by incubation at 37°C. At each time-point after incubation, CPFEX in NR8383 cells was determined and uptake efficacy of CPFEX was calculated. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n=3-7$ ). Symbols: the particle size of CPFEX-liposomes are (●): 100 nm, (▲): 200 nm, (■): 400 nm, (◆): 1000 nm, (▼): 2000 nm, (○): free CPFEX. (B): Concentrations of CPFEX in AM at 2 h after pulmonary administration of CPFEX-liposomes to rats. CPFEX-liposomes or free CPFEX (0.2 mg CPFEX/kg) were administered to rat lungs. At 2 h after administration, CPFEX in AM was determined and concentration of CPFEX was calculated. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n=3-6$ ).

に及ぼす表面修飾の影響を *in vitro* 及び *in vivo* にて検討した。未修飾又はマンノース修飾した CPFEX-liposomes (粒子径 1000 nm) を NR8383 細胞に適用したのちの薬物取り込み効率の推移を Fig. 7(A) に示す。NR8383 細胞による薬物の取り込み効率はマンノース修飾により増大し、いずれも適用後 2 時間で取り込み平衡となった。これらの CPFEX-liposomes をラットに肺投与したのち 2 時間目における AM 中薬物及びリポソーム濃度を Fig. 7(B) に示す。AM 中薬物濃度は *in vitro* と同様にマンノース修飾により有意に増加し、マンノース修飾することでターゲティング効果がさらに向上した。なお、いずれの CPFEX-liposomes においても、薬物とリポソームの濃度がほぼ一致しており、薬物がリポソームに封入されたまま AM に取り込まれていることが確認された。

リポソームによる AM へのターゲティングには粒子径 1000 nm が最も効率的であり、マンノース修飾することでさらにターゲティング効果が向上することが明らかとなった (Fig. 6(B) 及び Fig. 7(B))。しかし、抗菌効果や菌の変異防止を考慮するならば、肺投与後の AM 内での薬物動態の制御

が重要となる。また、副作用の回避を考慮するならば、薬物の血中移行性を把握する必要がある。そこで、CPFEX-liposomes の AM 内及び体内動態を詳細に検討し、併せて AM 内での抗菌効果及び寄生菌に対する変異防止効果を評価した。未修飾又はマンノース修飾した CPFEX-liposomes (粒子径 1000 nm) をラットに肺投与 (0.2 mg/kg, 臨床経口投与量の 1/50) したのちの AM 中及び血中薬物濃度推移を Fig. 8 に示す。AM 中薬物濃度はいずれの CPFEX-liposomes においても薬物単独投与に比べ高い値で推移した (Fig. 8(A))。特に、マンノース修飾においては最高 AM 中濃度が薬物単独投与の約 25 倍と顕著であった (Fig. 8(A))。一方、血中薬物濃度はいずれの CPFEX-liposomes においても薬物単独投与に比べ低い値で推移した (Fig. 8(B))。リポソーム化することで薬物の血中移行性が低下したことは、全身性の副作用の軽減や回避を図る上で極めて重要なことであり、AM による取り込み増大が血中移行性の低下の要因と考えられる。Figure 8(A) に示した AM 中薬物濃度推移と各種薬効パラメータより得られた抗菌効果と寄生菌に対する変異防止効果を Table 1 及び Table 2 に示す。CPFEX のようなキノ

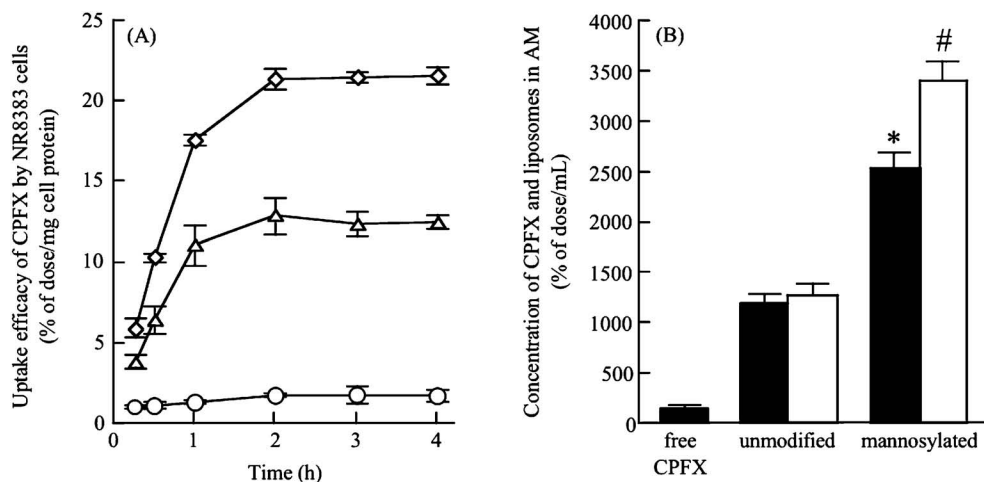


Fig. 7. Uptake Characteristics of Unmodified and Mannosylated CPF-X-liposomes (particle size: 1000 nm) by NR8383 Cells *in vitro* (A) and AM *in vivo* (B)

Unmodified and mannosylated CPF-X-liposomes were prepared with hydrogenated soybean phosphatidylcholine, dioleoyl phosphatidylcholine, cholesterol, dicetylphosphate and 4-aminophenyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside in a lipid molar ratio of 3.5/3.5/2/1/0 or 3.5/3.5/2/1/1 by the hydration method and then adjusted to particle size by extrusion method. The particle sizes of unmodified and mannosylated CPF-X-liposomes were 1015 and 1005 nm, respectively. CPF-X concentration and CPF-X/lipid molar ratio in unmodified or mannosylated CPF-X-liposomes suspension were 0.8 mg CPF-X/ml and 0.1 mol CPF-X/mol total lipids, respectively. (A): Uptake profiles of CPF-X by NR8383 cells after application of unmodified and mannosylated CPF-X-liposomes. Unmodified CPF-X-liposomes, mannosylated CPF-X-liposomes or free CPF-X (100 nmol CPF-X/ml in medium) were added to NR8383 cells, followed by incubation at 37°C. At each time-point after incubation, CPF-X in NR8383 cells was determined and uptake efficacy of CPF-X was calculated. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n=4-5$ ). Symbols: ( $\Delta$ ): unmodified, ( $\diamond$ ): mannosylated, ( $\circ$ ): free CPF-X. (B): Concentrations of CPF-X and liposomes in AM at 2 h after pulmonary administration of unmodified and mannosylated CPF-X-liposomes to rats. Unmodified CPF-X-liposomes, mannosylated CPF-X-liposomes or free CPF-X (0.2 mg CPF-X/kg) were administered to rat lungs. At 2 h after administration, CPF-X and lipid marker in AM was determined and concentration of CPF-X and liposomes was calculated. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n=4$ ). Column: (closed), CPF-X; (open), liposomes. \* $p<0.05$ , # $p<0.05$ , significant difference from concentration of CPF-X and liposomes on administration of unmodified CPF-X-liposomes, respectively.

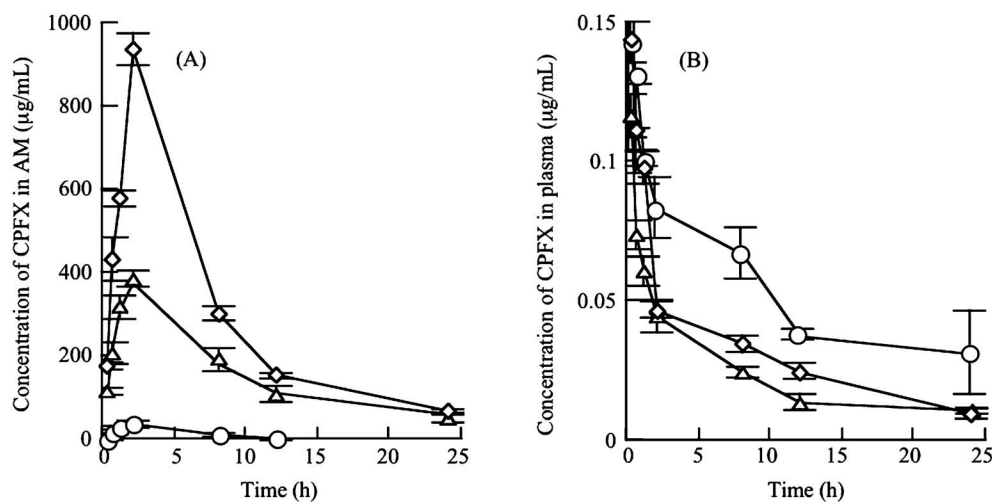


Fig. 8. Time-course of Concentration of CPF-X in AM (A) and Plasma (B) after Pulmonary Administration of Unmodified and Mannosylated CPF-X-liposomes (particle size: 1000 nm) to Rats

Unmodified CPF-X-liposomes, mannosylated CPF-X-liposomes or free CPF-X (0.2 mg CPF-X/kg) were administered to rat lungs. At each time-point after administration, concentration of CPF-X in AM and plasma was determined. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n=4$ ). Symbols: ( $\Delta$ ): unmodified, ( $\diamond$ ): mannosylated, ( $\circ$ ): free CPF-X. Details about unmodified and mannosylated CPF-X-liposomes used in this experiment are the same as those in Fig. 7.

ロン系抗菌薬の抗菌効果はその濃度又は濃度と暴露時間の積に依存するので、最高濃度/MIC比 ( $C_{max}/MIC$ ; 有効値 12 以上) 若しくは濃度時間曲線下面積/MIC 比 ( $AUC/MIC$ ; 有効値 125 h 以

上) を有効値以上にしなければ、十分な治療効果は得られない。<sup>59-65)</sup> 未修飾の CPF-X-liposomes 及び薬物単独では一部の寄生菌に対して  $C_{max}/MIC$  及び  $AUC/MIC$  が有効値以下であった (Table 1). 一



方, マンノース修飾した CPF-X-liposomes においては, いずれの菌に対しても  $C_{max}/MIC$  及び  $AUC/MIC$  が有効値以上であり, 十分な抗菌効果が得られることが示された (Table 1). また,  $MIC$  値の小さい菌種に対しては,  $C_{max}/MIC$  及び  $AUC/MIC$  が有効値を大きく上回っており, 投与量をさらに減量することが可能であろう. 菌の突然変異による耐性化は, 抗菌薬の濃度が  $MIC$  以上であっても変異防止濃度 ( $MPC$ ) を下回った場合に起こり易く, 濃度曲線が  $MPC$  と  $MIC$  の間の濃度域である mutant selection window (通常は  $MPC > MIC$ ) を通過する時間が長い場合にその危険性が増大する.<sup>72)</sup> 通常, 変異防止効果は mutant selection window を通過する時間の 24 時間に対する割合 ( $T_{MSW 0-24 h}$ ; %) で表され, この値は 0% であることが望ましい. 薬物単独投与では  $T_{MSW 0-24 h}$  の値が結核菌に対して 17%, 抗酸菌に対して 34% であ

り, いずれの寄生菌に対しても変異の危険性が示された (Table 2). 一方, 未修飾及びマンノース修飾した CPF-X-liposomes においては, いずれの寄生菌に対しても  $T_{MSW 0-24 h}$  の値が 0% であり, 十分な変異防止効果が認められた (Table 2).

以上のように, CPF-X-liposomes の肺投与は抗菌効果のみならず変異防止の面からも, 薬物単独投与に比べて有用であることが示された. 未修飾の CPF-X-liposomes では一部の寄生菌に対して抗菌効果が得られなかったが, マンノース修飾により AM への薬物のターゲティング効果が向上し, 多くの菌種に対して優れた抗菌効果及び変異防止効果が得られることが明らかとなった. 本研究の成果は, 細胞内寄生菌に起因する呼吸器感染症の治療を指向する新規肺投与型 DDS 製剤の実用化に有用な情報を提供するものであり, 今後の製剤開発の一助となることを期待する.

Table 1. The Antibacterial Effects in AMs following Pulmonary Administration of Free CPF-X, Unmodified and Mannosylated CPF-X-liposomes to Rats

Organism (MIC)	Dosage	AUC/MIC (h)	$C_{max}/MIC$
<i>M. tuberculosis</i> (0.5 µg/ml) <sup>a)</sup>	Mannosylated CPF-X-liposomes	12808	1879
	Unmodified CPF-X-liposomes	8376	779
	Free CPF-X	546	79
<i>M. avium</i> (12.5 µg/ml) <sup>b)</sup>	Mannosylated CPF-X-liposomes	512	75
	Unmodified CPF-X-liposomes	335	31
	Free CPF-X	22(↓)	3(↓)
<i>M. intracellulare</i> (50 µg/ml) <sup>c)</sup>	Mannosylated CPF-X-liposomes	128	19
	Unmodified CPF-X-liposomes	84(↓)	8(↓)
	Free CPF-X	5(↓)	1(↓)
<i>C. pneumoniae</i> (2 µg/ml) <sup>d)</sup>	Mannosylated CPF-X-liposomes	3202	470
	Unmodified CPF-X-liposomes	2094	195
	Free CPF-X	137	20
<i>L. monocytogenes</i> (1 µg/ml) <sup>e)</sup>	Mannosylated CPF-X-liposomes	6404	940
	Unmodified CPF-X-liposomes	4188	389
	Free CPF-X	273	40
<i>L. pneumophila</i> (0.06 µg/ml) <sup>f)</sup>	Mannosylated CPF-X-liposomes	106733	15658
	Unmodified CPF-X-liposomes	69800	6490
	Free CPF-X	4550	660
<i>F. tularensis</i> (0.015 µg/ml) <sup>g)</sup>	Mannosylated CPF-X-liposomes	426933	62633
	Unmodified CPF-X-liposomes	279200	25960
	Free CPF-X	18200	2640
Rifampicin resistant <i>M. tuberculosis</i> (12.5 µg/ml) <sup>h)</sup>	Mannosylated CPF-X-liposomes	512	75
	Unmodified CPF-X-liposomes	335	31
	Free CPF-X	22(↓)	3(↓)

MIC: minimum inhibitory concentration, AUC/MIC: area under the drug concentration-time curve/MIC ratio,  $C_{max}/MIC$ : maximum drug concentration/MIC ratio. The time-course of drug concentration shown in Fig. 8(A) and MIC values were used for calculation of AUC/MIC and  $C_{max}/MIC$ . The MIC values were taken from the literature. a): Ref. 66, b): Ref. 67, c) Ref. 67, d): Ref. 68, e): Ref. 69, f): Ref. 70, g), Ref. 71, h): Ref. 67. Arrows are shown less than effective value.

Table 2. The Mutant Prevention Effects in AMs following Pulmonary Administration of Free CFX, Unmodified and Mannosylated CFX-liposomes to Rats

Organism (MIC, MPC)	Dosage	T <sub>MSW 0-24h</sub> (%)
<i>M. tuberculosis</i> (0.5 µg/ml <sup>a</sup> , 2 µg/ml <sup>b</sup> )	Mannosylated CFX-liposomes	0
	Unmodified CFX-liposomes	0
	Free CFX	17
<i>M. avium</i> (12.5 µg/ml <sup>c</sup> , 40 µg/ml <sup>d</sup> )	Mannosylated CFX-liposomes	0
	Unmodified CFX-liposomes	0
	Free CFX	34

MIC: minimum inhibitory concentration, MPC: mutant prevention concentration, T<sub>MSW 0-24h</sub>: percentage of the time when drug concentrations are inside the mutant selection window during a 24 h period. The time-course of drug concentration shown in Fig. 8 (A), MIC and MPC values were used for calculation of T<sub>MSW 0-24h</sub>. The MIC and MPC values were taken from the literature. a): Ref. 66, b): Ref. 73, c): Ref. 67, d): Ref. 74.

#### 4. 結語

本総説では、動脈硬化症及び呼吸器感染症の治療を指向したマクロファージを標的とする DDS の構築について、ドラッグキャリアとしてリポソームを用いた研究の成果を論述した。動脈硬化症の治療を指向した DDS 研究においては、動脈硬化巣へのターゲティングにはドラッグキャリアの粒子径に至適サイズが存在することが明らかとなり、さらに動脈硬化巣への薬物取り込みクリアランスを制御することで、抗動脈硬化作用を制御可能であることが明らかとなった。動脈硬化症の治療に DDS を応用した研究例はこれまでになく、その有用性を実験的に確認したことは評価に値すると考えている。一方、細胞内寄生菌に起因する呼吸器感染症の治療を指向した DDS 研究においては、マンノース修飾リポソームの肺投与により AM への薬物のターゲティング効果が向上し、多くの菌種に対して優れた抗菌効果及び変異防止効果が得られることが明らかとなった。呼吸器感染症の治療に DDS を応用した研究例はこれまでにいくつか報告されているが、本研究はこれまでにほとんど明らかになっていない AM によるリポソームの取り込み特性のみならず、肺投与という新しい投与ルートの有用性を実験的に確認した点に価値がある。今後の目標としては、動脈硬化症と呼吸器感染症の治療を指向する新規 DDS 製剤の臨床応用はもちろんのこと、肝疾患や炎症などマクロファージがその発症に関与する疾患の治療への DDS の応用研究などが挙げられ、筆者らのグループでは現在これらの研究を精力的に展開している。

**謝辞** 本研究の成果は、北海道薬科大学大学院薬学研究科、森本一洋教授のご指導の下に行われたものです。ここに心からの感謝を申し上げます。本研究の遂行に際し、御指導と御鞭撻を賜りました出口芳春教授（帝京大学薬学部大学院薬学研究科）、関 俊暢准教授（北海道薬科大学大学院薬学研究科）並びに田内義彦博士（榊祥漢堂）に慎んで感謝の意を表します。また、実験にご協力頂きました谷野友治修士並びに日機装機に厚くお礼申し上げます。なお、本研究の一部は、科学研究費補助金、秋山記念生命科学振興財団研究助成金及び北海道薬科大学教育研究奨励金により実施されたものであることを付記いたします。

#### REFERENCES

- Allen T. M., Mumbengegwi D. R., Charrois G. J., *Clin. Cancer Res.*, **11**, 3567-3573 (2005).
- Chono S., Tauchi Y., Morimoto K., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 37-44 (2006).
- Chono S., Tauchi Y., Morimoto K., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **32**, 125-135 (2006).
- Hitzman C. J., Wattenberg L. W., Wiedmann T. S., *J. Pharm. Sci.*, **95**, 1196-1211 (2006).
- Tauchi Y., Takase M., Zushida I., Chono S., Sato J., Ito K., Morimoto K., *J. Pharm. Sci.*, **88**, 709-714 (1999).
- Hitzman C. J., Elmquist W. F., Wiedmann T. S., *J. Pharm. Sci.*, **95**, 1127-1143 (2006).
- Hosseinkhani H., Hosseinkhani M., Khademhosseini A., Kobayashi H., Tabata Y., *Biomaterials*, **27**, 5836-5844 (2006).
- Kasper F. K., Kushibiki T., Kimura Y., Mikos

- A. G., Tabata Y., *J. Control. Release*, **107**, 547–561 (2005).
- 9) Morimoto K., Chono S., Kosai T., Seki T., Tabata Y., *J. Pharm. Pharmacol.*, **57**, 839–844, (2005).
- 10) Wang J., Tabata Y., Morimoto K., *J. Control. Release*, **113**, 31–37, (2006).
- 11) Marttin E., Verhoef J. C., Cullander C., Romeijn S. G., Nagelkerke J. F., Merkus F. W., *Pharm. Res.*, **14**, 631–637 (1997).
- 12) Seki T., Kanbayashi H., Chono S., Tabata Y., Morimoto K., *Int. J. Pharm.* (in press).
- 13) Seki T., Wang A., Yuan D., Saso Y., Hosoya O., Chono S., Morimoto K., *J. Control. Release*, **100**, 181–189 (2004).
- 14) Seki T., Kanbayashi H., Nagao T., Chono S., Tabata Y., Morimoto K., *J. Pharm. Sci.*, **95**, 1393–1401 (2006).
- 15) Yamamoto A., Yamada K., Muramatsu H., Nishinaka A., Okumura S., Okada N., Fujita T., Muranishi S., *Int. J. Pharm.*, **282**, 141–149 (2004).
- 16) Chono S., Morimoto K., *J. Pharm. Pharmacol.*, **58**, 1219–1225 (2006).
- 17) Asai T., Oku N., *Methods Enzymol.*, **391**, 163–176 (2005).
- 18) Nguyen L.T., Atobe K., Barichello J.M., Ishida T., Kiwada H., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 751–757 (2007).
- 19) Chono S., Tauchi Y., Morimoto K., *J. Drug Target.*, **13**, 407–414 (2005).
- 20) Chesnoy S., Durand D., Doucet J., Stolz D.B., Huang L., *Pharm. Res.*, **18**, 1480–1484 (2001).
- 21) Yokoyama M., Opanasopit P., Okano T., Kawano K., Maitani Y., *J. Drug Target.*, **12**, 373–384 (2004).
- 22) Kushibiki T., Tomoshige R., Iwanaga K., Kakemi M., Tabata Y., *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **17**, 645–658 (2006).
- 23) Tauchi Y., Zushida I., Yokota M., Chono S., Sato J., Ito K., Morimoto K., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 466–471 (2000).
- 24) Chen J., Corbin I. R., Li H., Cao W., Glickson J. D., Zheng G., *J. Am. Chem. Soc.* (in press).
- 25) Chono S., Tanino T., Seki T., Morimoto K., *J. Drug Target.*, **14**, 557–566 (2006).
- 26) Oku N., Nojima S., Inoue K., *Biochim. Biophys. Acta*, **595**, 277–290 (1980).
- 27) Adler-Moore J., Proffitt R.T., *J. Antimicrob. Chemother.*, **49**, 21–30 (2002).
- 28) Harashima H., Houg T. M., Ishida T., Manabe Y., Matsuo H., Kiwada H., *Pharm. Res.*, **13**, 1704–1709 (1996).
- 29) Chono S., Tanino T., Seki T., Morimoto K., *J. Pharm. Pharmacol.*, **59**, 75–80 (2007).
- 30) Maruyama K., Takahashi N., Tagawa T., Nagaike K., Iwatsuru M., *FEBS Lett.*, **413**, 177–180 (1997).
- 31) Kikuchi H., *Pharm. Tech. Jpn.*, **19**, 99–110 (2003).
- 32) Futaki S., Masui Y., Nakase I., Sugiura Y., Nakamura T., Kogure K., Harashima H., *J. Gene Med.*, **7**, 1450–1458 (2005).
- 33) Khalil I.A., Kogure K., Futaki S., Harashima H., *J. Biol. Chem.*, **281**, 3544–3551 (2006).
- 34) Li S. D., Huang L., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1082**, 1–8 (2006).
- 35) Hodge-Bell K. C., Lee K. M., Renne R. A., Gideon K. M., Harbo S. J., McKinney W. J., *Inhal. Toxicol.*, **19**, 361–376 (2007).
- 36) Roberts R. A., Ganey P. E., Ju C., Kamendulis L. M., Rusyn I., Klaunig J. E., *Toxicol. Sci.*, 2–15 (2007).
- 37) Ross R., *N. Engl. J. Med.*, **340**, 115–126 (1990).
- 38) McKinney J. D., Honer zu Bentrup K., Munoz-Elias E. J., Miczak A., Chen B., Chan W.T., Swenson D., Sacchettini J. C., Jacobs Jr. W. R., *Nature*, **406**, 735–738 (2000).
- 39) Chono S., Tauchi Y., Sato J., Ito K., Suzuki M., Morimoto K., *Drug Deliv. Syst.*, **14**, 511–515 (1999).
- 40) Tauchi Y., Zushida I., Chono S., Sato J., Ito K., Morimoto K., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 925–929 (2001).
- 41) Tauchi Y., Chono S., Morimoto K., *J. Drug Target.*, **11**, 163–168 (2003).
- 42) Chono S., Tauchi Y., Deguchi Y., Morimoto K., *J. Drug Target.*, **13**, 267–276 (2005).
- 43) Chono S., Tanino T., Seki T., Morimoto K., *Drug Metab. Pharmacokin.*, **22**, 88–95 (2007).
- 44) Makheja A. N., Bloom S., Muesing R., Simon T. M., Bailey J. M., *Atherosclerosis*, **76**, 155–161 (1989).
- 45) Ross R., *N. Engl. J. Med.*, **340**, 115–126

- (1999).
- 46) Perry D. G., Wisniowski P., Daugherty G. L., Downing J., Martin W. J., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **17**, 462–470 (1997).
- 47) Ferrari G., Langen H., Naito M., Pieters J., *Cell*, **14**, 435–447 (1999).
- 48) Harb O. S., Gao L.Y., Abu Kwaik Y., *Environ. Microbiol.*, **2**, 251–265 (2000).
- 49) McKinney J. D., Honerzu Bentrup K., Munoz-Elias E. J., Miczak A., Chen B., Chan W. T., Swenson D., Sacchettini J. C., Jacobs Jr. W. R., Russell D. G., *Nature*, **406**, 735–738 (2000).
- 50) Vazquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J., Kreft J., *Clin. Microbiol. Rev.*, **14**, 584–640 (2001).
- 51) Greub G., Raoult D., *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**, 413–433 (2004).
- 52) Yee D., Valiquette C., Pelletier M., Parisien I., Rocher I., Menzies D., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **167**, 1472–1477 (2003).
- 53) Fehrenbach H., *Respir. Res*, **2**, 33–46 (2001).
- 54) Poelma D. L., Zimmermann L. J., Scholten H. H., Lachmann B., van Iwaarden J. F., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **283**, 648–654 (2002).
- 55) Harashima H., Sakata K., Funato K., Kiwada H., *Pharm. Res.*, **11**, 402–406 (1994).
- 56) Lane K. B., Egan B., Vick S., Abdolrasulnia R., Shepherd V. L., *J. Leukoc. Biol.*, **64**, 345–350 (1998).
- 57) Chronos Z. C., Abdolrasulnia R., Whitsett J. A., Rice W. R., Shepherd V. L., *J. Biol. Chem.*, **271**, 16375–16383 (1996).
- 58) Gronlund J., Vitved L., Lausen M., Skjodt K., Holmskov U., *J. Immunol.*, **165**, 6406–6415 (2000).
- 59) Forrest A., Nix D. E., Ballow C. H., Goss T. F., Birmingham M. C., Schentag J. J., *Chemotherapy*, **37**, 1073–1081 (1993).
- 60) Preston S. L., Drusano G. L., Berman A. L., Fowler C. L., Chow A. T., Dornseif B., Reichl V., Natarajan J., Corrado M., *JAMA*, **279**, 125–129 (1998).
- 61) Blaser J., Stone B. B., Groner M. C., Zinner S. H., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**, 1054–1060 (1987).
- 62) Craig W. A., *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **22**, 89–96 (1995).
- 63) Hyatt J. M., McKinnon P. S., Zimmer G. S., Schentag J. J., *Clin. Pharmacokin.*, **28**, 143–160 (1995).
- 64) Moore R. D., Lietman P. S., Smith C. R., *J. Infect. Dis.*, **155**, 93–99 (2005).
- 65) Toutain P. L., del Castillo J. R., Bousquet-Melou A., *Res. Vet. Sci.*, **73**, 105–114 (2002).
- 66) Onodera Y., Tanaka M., Sato K., *J. Antimicrob. Chemother.*, **47**, 447–450 (2001).
- 67) Tomioka H., Sato K., Kajitani H., Akaki T., Shishido S., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 283–286 (2000).
- 68) Harnett S. J., Fraise A. P., Andrews J. M., Jevons G., Brenwald N. P., Wise R., *J. Antimicrob. Chemother.*, **53**, 783–792 (2004).
- 69) Safdar A., Armstrong D., *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 483–485 (2003).
- 70) Dubois J., St-Pierre C., *J. Antimicrob. Chemother.*, **45**, 41–46 (2000).
- 71) Ikaheimo I., Syrjala H., Karhukorpi J., Schildt R., Koskela M., *J. Antimicrob. Chemother.*, **46**, 287–290 (2000).
- 72) Drlica K., *J. Antimicrob. Chemother.*, **52**, 11–17 (2003).
- 73) Rodriguez J. C., Cebrian L., Lopez M., Ruiz M., Jimenez I., Royo G., *J. Antimicrob. Chemother.*, **53**, 441–444 (2004).
- 74) Rodriguez J. C., Cebrian L., Lopez M., Ruiz M., Royo G., *Int. J. Antimicrob. Agents*, **25**, 221–225 (2005).