

マウスの実験的緑膿菌感染症に於ける化学療法剤の評価

小林 富二 男

興和株式会社東京研究所

(昭和 45 年 12 月 28 日受付)

抗緑膿菌作用を有する化学療法剤の *in vivo* における効果判定の基礎的研究は比較的少ない。従来, *in vivo* での薬剤効果判定には, 実験的緑膿菌感染症として, 火傷マウスに菌を感染させる法¹⁾, モルモット足趾部皮下接種による方法²⁾, マウス腹腔内感染による方法³⁾, マウス静脈内接種により腎盂腎炎を起させる方法^{4, 5)}, Cortison 投与マウスに緑膿菌を感染させ敗血症を起させる方法⁶⁾, などが報告されている。しかし, これらの実験的感染症では, Cortison 投与の場合を除いて感染成立に多量の菌量接種を必要とし, 治療効果の顕著な薬剤についての比較は容易であるが, 薬剤開発のため多くの化合物の効果を比較検討する場合には判定が不明確になるきらいがある。

本報では患者分離緑膿菌の中から薬剤に感受性で, マウスに強毒な株を選択し, さらにムチン併用によつて比較的少量の接種菌量で, 実験的緑膿菌感染症を成立することを明らかにしたので, 化学療法剤の *in vivo* 効果判定法としてその応用を試みた。

実験材料および方法

供試菌株: 都内数カ所の病院から分与された 60 株の患者分離菌中から強毒株を選択した。これらの菌株は 0.8% 普通寒天高層培地に穿刺して保存し, 用いたのぞんで普通寒天平板に分離し, 正常な集落を実験に供した。

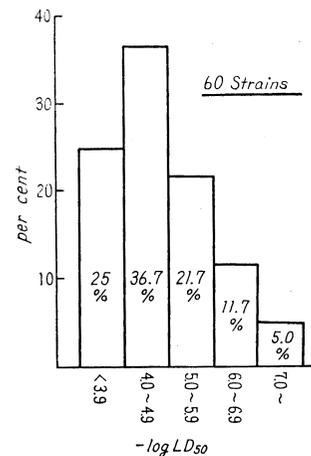
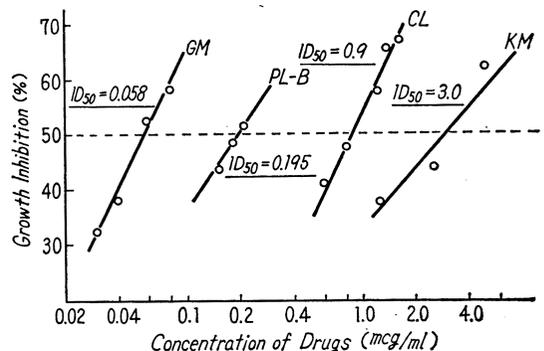
供試動物: 日本クレア株式会社から供給された ICR-JCL 系 4 週齢雄マウス (体重 18~20 g) を使用した。これらの動物は室温 24±2°C, 湿度 60±10% の環境下で飼育し, 飼料は日本クレア製の固型飼料 (CA-1) を与えた。

マウスに対する毒力測定: 被検菌は普通寒天平板から 1 白金耳を取り, ハートインフュージョンブイオン (以下, HI ブイオン) に接種したのち, 37°C 18 時間前培養し, 次にこの菌液の 1 滴を L 字管に分注した HI ブイオンに接種, 12 時間 Monod 式振盪器で培養した。この培養菌液を 10 倍系例に希釈し, ムチンを最終濃度 4% になるように加え, マウス腹腔内に 0.4 ml 接種した。ムチンは Wilson Laboratories の Granular mucin 1701 W-type を使用した。毒力はマウスの 72 時間後の生死をもつて判定した。

ED₅₀ および LD₅₀ の算出: VAN DER WAERDEN 法⁷⁾ と一部プロビット法により算出した。

薬剤の 50% 発育阻止濃度の測定: Monod 式振盪器を使用し, TREFFERS の方法⁸⁾にしたがって測定した。培地は HI ブイオンを用い, 菌の濁度は Spectronic 20 (Shimadzu, Bausch & Lomb 製) を使用した。

供試薬剤: 抗生物質は市販品の硫酸カナマイシン (KM), 硫酸ポリミキシン (PL-B), 硫酸ゲンタシン (GM) およびメタンスルホン酸コリスチン (CL) を使用した。

Fig. 1 Virulence of *P. aeruginosa* on miceFig. 2 Growth Inhibitory Activity of Antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* Strain (NC-5)

実験成績

1. 強毒株の選択

患者分離緑膿菌 60 株について、前記培養菌液を 1 群 5 匹のマウス腹腔内に接種し、毒力を測定した。その結果は Fig. 1 に示すように LD₅₀ 値が 10^{-4.0}~10^{-4.9} のものは 36.7%(22 株) で最も多く 10⁻⁷ 以上の LD₅₀ 値を示す強毒株は 5%(3 株) 認められたにすぎなかつた。

Table 1. Alteration of ED₅₀ of kanamycin according to difference of inoculum size on experimental infection with *P. aeruginosa* in mice

| Challenge dose (Viable cells/mouse) | ED ₅₀ (mg/kg) | Standard error | Ratio |
|-------------------------------------|--------------------------|----------------|-------|
| 2.0×10 ⁸ | 8.84 | 1.16 | 1.0 |
| 2.0×10 ⁴ | 16.50 | 1.18 | 1.9 |
| 2.0×10 ⁵ | 35.40 | 1.23 | 4.0 |

Note ; *P. aeruginosa* strain (NC-5) was inoculated intraperitoneally in ICR-JCL mice and antibiotic was given intraperitoneally at 2 hours after inoculation.

ED₅₀ was calculated by VAN DER WAERDEN method.

Table 2. Alteration of ED₅₀ of polymyxin B according to difference of inoculum size on experimental infection with *P. aeruginosa* in mice

| Challenge dose (Viable cells/mouse) | ED ₅₀ (mg/kg) | Standard error | Ratio |
|-------------------------------------|--------------------------|----------------|-------|
| 1.1×10 ⁸ | 0.96 | 1.24 | 1.0 |
| 1.1×10 ⁴ | 1.68 | 1.14 | 1.8 |
| 1.1×10 ⁵ | 4.12 | 1.20 | 4.3 |

Note ; *P. aeruginosa* strain (NC-5) was inoculated intraperitoneally in ICR-JCL mice and antibiotic was given intraperitoneally at 2 hours after inoculation.

ED₅₀ was calculated by VAN DER WAERDEN method.

Table 3. Alteration of ED₅₀ of kanamycin according to difference of administration time after cell inoculation on experimental infection with *P. aeruginosa* in mice

| Administration time | ED ₅₀ (mg/kg) | Standard error | Ratio |
|---------------------|--------------------------|----------------|-------|
| 30 minutes | 12.30 | 1.23 | 1.0 |
| 2 hours | 16.50 | 1.18 | 1.3 |
| 4 hours | 11.60 | 1.23 | 0.9 |

Note ; Mice were inoculated intraperitoneally with 2.0×10⁴ cells of *P. aeruginosa* strain (NC-5) in 4% gastric mucin.

Antibiotic was given intraperitoneally.

ED₅₀ was calculated by VAN DER WAERDEN method.

さらにこれらの 3 株の中から薬剤感受性の最も高い強毒株として Nc-5 株を選択して以後の実験にこれを用いた。本菌は日赤中央病院耳鼻科において、中耳炎患者から分離された株で、マウスに対する LD₅₀ は 200 個/マウス

Table 4. Alteration of ED₅₀ polymyxin B according to difference of injection time after cell inoculation on experimental *P. aeruginosa* infection in mice

| Injection time | ED ₅₀ (mg/kg) | Standard error | Ratio |
|----------------|--------------------------|----------------|-------|
| 30 minutes | 1.57 | 1.15 | 1.0 |
| 2 hours | 1.68 | 1.14 | 1.1 |
| 4 hours | 2.92 | 1.24 | 1.9 |

Note ; Mice were inoculated intraperitoneally with 1.1×10⁴ cells of *P. aeruginosa* strain (NC-5) in 4% gastric mucin.

Antibiotic was given intraperitoneally.

ED₅₀ was calculated by VAN DER WAERDEN method.

Table 5. Alteration of ED₅₀ of kanamycin according to difference of administration route on experimental infection with *P. aeruginosa* in mice

| Administration route | ED ₅₀ (mg/kg) | Standard error | Ratio |
|----------------------|--------------------------|----------------|-------|
| intraperitoneally | 19.0 | 1.26 | 1.0 |
| intramuscularly | 75.9 | 1.16 | 4.0 |
| subcutaneously | 81.3 | 1.18 | 4.3 |

Note ; Mice were inoculated intraperitoneally with 1.2×10⁴ cells of *P. aeruginosa* strain (NC-5) in 4% gastric mucin.

Antibiotic was given at 2 hours after inoculation.

ED₅₀ was calculated by VAN DER WAERDEN method.

Table 6. Alteration of ED₅₀ of polymyxin B according to difference of administration route on experimental infection with *P. aeruginosa* of mice

| Administration route | ED ₅₀ (mg/kg) | Standard error | Ratio |
|----------------------|--------------------------|----------------|-------|
| intraperitoneally | 1.68 | 1.14 | 1.0 |
| intramuscularly | 10.9 | 1.26 | 6.5 |
| subcutaneously | 7.18 | 1.18 | 4.3 |

Note ; Mice were inoculated intraperitoneally with 1.1×10⁴ cells of *P. aeruginosa* strain (NC-5) in 4% gastric mucin.

Antibiotic was administered at 2 hours after inoculation.

ED₅₀ was calculated by VAN DER WAERDEN method.

ス接種に相当した。本菌に対する KM, GM, PL-B, CL の 50% 発育阻止濃度は Fig. 2 に示すとおり、それぞれ 3.0 mcg/ml, 0.058 mcg/ml, 0.195 mcg/ml, 0.9 mcg/ml であった。

2. 接種菌量の相違による ED₅₀ の変動

先の成績から強毒株 (Nc-5) を感染菌として用い、マウスへの接種菌量の相違と化学療法剤の治療効果との関係を検討した。化学療法剤として KM および PL-B を用い、薬剤は菌接種 2 時間後に腹腔内投与した。マウスは 1 群 4 匹を使用した。

KM の場合、Table 1 に示すように、10⁸ 個接種で ED₅₀ 値は 8.84 mg/kg を示し、10⁴ 個接種では 16.50 mg/kg で 10⁸ 個接種の値にくらべて約 2 倍であり、10⁵ 個接種では 35.40 mg/kg と 10⁴ 個接種の約 2 倍の値が得られた。PL-B の場合も KM の場合と同様に、10⁸ 個接種群での PL-B の ED₅₀ を 1 とすると、10⁴ 個接種ではほぼ 2 倍、10⁵ 個接種ではほぼ 4 倍の値を示した (Table 2)。すなわち、KM の場合も PL-B の場合も接種菌量の 10 倍増加にともなつて、その ED₅₀ 値が約 2 倍ずつ増加する傾向が認められた。

3. 薬剤投与時間の相違による ED₅₀ の変動

接種菌量は一定 (10⁴ 個) とし、菌接種後 30 分、2 時間および 4 時間に薬剤投与を行なう 3 群に分けて、薬剤投与時間の相違による ED₅₀ の変動を検討した。その成績は Table 3, 4 に示した。KM の ED₅₀ は薬剤投与時間の相違によつて大きな変動はみられず、菌接種後 30 分薬剤投与でも 4 時間後投与でもあまり著しい差はみられなかった。PL-B では、30 分投与群と 2 時間投与群との間に ED₅₀ の差をほとんど認めなかったが、4 時間投与群では、30 分および 2 時間投与群の 2 倍の ED₅₀ を示し、薬剤の種類によつて薬剤投与時間が、ED₅₀ 値に影響を与える場合がみられた。

4. 薬剤投与部位の相違による ED₅₀ の変動

菌接種量を一定 (10⁴ 個) にし、菌接種 2 時間後に薬剤をマウス腹腔内、筋肉内および皮下に投与した場合の ED₅₀ 値を KM および PL-B で検討し、Table 5, 6 にその成績を示した。KM および PL-B とともに腹腔内薬剤投与の ED₅₀ 値が、筋肉内および皮下投与より 4 倍から 6 倍優れた成績を示した。

5. 実験誤差と再現性

上述の実験成績から抗緑膿菌作用を有する化学療法剤の *in vivo* 効果判定法として次の条件を設定した。動物は ICR 系 4 週齢の雄マウスを 1 群 10 匹用い、緑膿菌の強毒株 (Nc-5 株) を 4% ムチンと併用して腹腔内に 10 ML D (約 2×10⁴ 個/マウス相当) 接種し、菌接種 2 時間後に薬剤を腹腔内投与してマウスの生死を観察する。

Table 7. Therapeutic effects of kanamycin

| Experiments | EE ₅₀ (mg/kg) | Confidence limit (P=0.05) | Standard error |
|-------------|--------------------------|---------------------------|----------------|
| I | 26.8 | 18.3-38.3 | 1.20 |
| II | 20.3 | 14.4-28.6 | 1.19 |
| III | 23.3 | 14.6-37.3 | 1.27 |
| IV | 19.0 | 11.9-30.8 | 1.28 |
| V | 16.5 | 11.9-23.9 | 1.18 |
| VI | 19.0 | 12.0-30.1 | 1.26 |
| Mean | 20.8 | 13.9-31.2 | 1.23 |

Note; Mice were inoculated intraperitoneally with about 10⁴ cells of *P. aeruginosa* (NC-5) in 4% gastric mucin.

Antibiotic was given intraperitoneally at 2 hours after inoculation.

ED₅₀ was calculated by VAN DER WAERDEN method.

Table 8. Therapeutic effects of polymyxin B

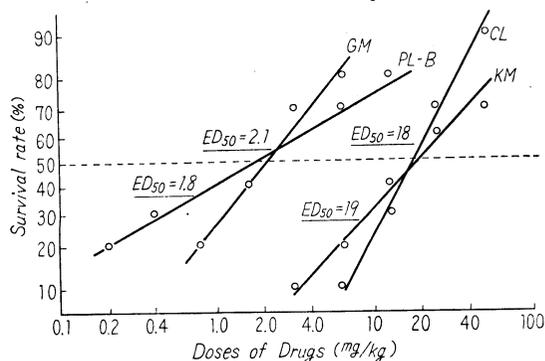
| Experiments | ED ₅₀ (mg/kg) | Confidence limit (P=0.05) | Standard error |
|-------------|--------------------------|---------------------------|----------------|
| I | 1.46 | 1.04-2.05 | 1.19 |
| II | 1.80 | 1.05-2.46 | 1.25 |
| III | 1.92 | 1.38-2.72 | 1.18 |
| IV | 2.37 | 1.41-3.98 | 1.30 |
| V | 1.68 | 1.03-2.17 | 1.14 |
| VI | 2.06 | 1.63-2.61 | 1.13 |
| Mean | 1.88 | 1.32-2.69 | 1.20 |

Note; Mice were inoculated intraperitoneally with about 10⁴ cells of *P. aeruginosa* (NC-5) in 4% gastric mucin.

Antibiotic was given intraperitoneally at 2 hours after inoculation.

ED₅₀ was calculated by VAN DER WAERDEN method.

Fig. 3 Therapeutic Effects of Antibiotics in Mice Infected with *Pseudomonas aeruginosa* (NC-5)



この際、薬剤の濃度間隔は log 2 の等比級数とする。以上の条件で KM および PL-B の治療効果を各 6 回

Table 9. Therapeutic effects of various antibiotics on experimental infection with *P. aeruginosa* in mice

| Antibiotics | ED ₅₀ (mg/kg) | LD ₅₀ (mg/kg) | Ratio (LD ₅₀ /ED ₅₀) |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| Kanamycin | 19.0 | 1410 | 74.2 |
| Polymyxin B | 1.8 | 20.76 | 11.5 |
| Colistin | 18.0 | 299.3 | 16.6 |
| Gentamicin | 2.1 | 427.6 | 203.6 |

Note ; Mice were inoculated intraperitoneally with 10⁴ cells of *P. aeruginosa* strain (NC-5) in 4% gastric mucin.

Antibiotics were given at 2 hours after inoculation.

にわたり測定し、実験誤差とデータの再現性について検討した。その成績は Table 7 および Table 8 に示すように、KM および PL-B とともに、ED₅₀ 値はかなり再現性が認められた。両者の実験を総合した 12 回の実験成績から計算された標準偏差の平均は 1.21 であつて、この値を本実験条件での推定標準偏差とすると、p=0.05 における推定信頼限界は $\log ED_{50} \pm 1.96 \log 1.21$ で計算される。

すなわち信頼限界は ED₅₀ 値の約 1.5 倍から 1/1.5 倍の値を取ると推定される。実験精度を高めるためには標準偏差を小さくする必要があるが、標準偏差(σ)は次の式で計算されるので、

$$\sigma^2 = V_m, \quad V_m = d^2 \sum \frac{h(1-h)}{n-1}$$

V_m : 分散

d : 投与薬剤の濃度間隔

n : 動物数

h : 実測生存率

この式から明らかなように投与薬剤の濃度間隔を小さくするか実験動物数を増せば、さらに精度の高いデータが期待できよう。

6. 各種化学療法剤への応用

前項で設定した実験条件で KM, GM, PL-B および CL の効果を測定すると、Fig. 3 に示すように ED₅₀ は KM 19.0 mg/kg, GM 2.1 mg/kg, PL-B 1.8 mg/kg, CL 18.0 mg/kg の値が得られた。次に 1 群 10 匹のマウスについてこれら薬剤の腹腔内投与による LD₅₀ を測定し、LD₅₀/ED₅₀ 比を求めると Table 9 に示すとおり KM 74.2, GM 203.6, PL-B 11.5, CL 16.6 の値が得られ、化学療法剤の基礎的評価が可能である。本実験で設定した方法は抗緑膿菌作用を有する新規化学療法剤の開発にも利用出来るものと思われる。

考 察

化学療法剤の効果を実験的感染症を用いて測定する場

合、まず出来るだけ少量の接種菌量で動物に感染症を成立させる必要がある。

そのため接種菌の条件として動物に強力な毒力を有すること、さらに加えて化学療法剤に感受性であることが必要である。本実験ではこの点に関して 60 株の緑膿菌について、薬剤感受性とマウスに対する毒力を検討し、適当な菌株を選択した。またこの菌株とムチンとの併用によつて、ムチン無添加の場合の 1/1,000 以下の菌量でマウスを敗血症死させることが出来た。Cortison 投与マウスは緑膿菌感染に対する抵抗力が減弱することが知られている⁹⁾。MILLICAN¹⁰⁾ はマウスにあらかじめ Cortison を投与したのち緑膿菌を接種し Cortison 非投与群の 1/10 から 1/100 の接種菌量でマウスを敗血症死させることを示しているが、本実験における菌とムチン併用効果は MILLICAN の Cortison 処置による効果を上廻る成績であり、きわめて少量の菌量でマウスに実験的緑膿菌感染症を成立させることができた。

化学療法剤の *in vivo* 効果判定実験に影響をおよぼすと考えられる因子には、先に述べた接種菌の毒力と薬剤感受性の他に、供試動物の接種菌に対する感受性、接種菌量、薬剤投与開始時間と薬剤投与方法、動物の飼育条件、判定日数などがあげられる。これらの因子を出来る限り一定にすることが、本実験の精度を高め再現性あるデータを得るために必要であると思われる。接種菌の毒力と薬剤感受性は常に一定に保持させることは困難で、特に緑膿菌は集落の解離が高率に起こることが知られており、解離した集落型により、バクテリオファージ感受性¹¹⁾、ピオシン感受性¹²⁾、薬剤感受性¹³⁾などに差異のあることが報告されている。供試動物の接種菌に対する感受性は緑膿菌とマウスの場合、ICR 系マウスは ddN 系および CF #1 系マウスに比して死亡時間のばらつきが若干少なかった。感染実験においては近交系および SPF 動物を使用することが動物の固体差を少なくする意味で雑系より適当であると思われる。次に接種菌量は実験目的によつて適当に選択することが望ましいが、菌量を減少させると薬剤の治療効果は高まるが、無処置群に生存例がみられることがあり、逆に多量の菌接種を行なうと実験感度と治療効果が低下をきたす傾向がみられる。本実験では 10 MLD が、いちおう適当と考えている。

薬剤投与時間は薬剤の種類によつて治療効果に影響を与える場合とあまり影響を与えない場合がみられたが、実験規模と実験の行ない易さから菌接種後 2 時間と定めた。薬剤投与時間や投与方法は吸収排泄の問題など投与する薬剤の性質や実験目的によつて適当な方法を選択することが望ましいが、腹腔内薬剤投与方法が最も優れた治療効果が期待出来る。なお実験に際しては当然のこと

ながら既知化学療法剤との同時実験が推奨される。

結 論

マウスの実験的緑膿菌感染症を化学療法剤の *in vivo* 効果判定に応用するため種々の検討を行なった結果、次の成績を得た。

1. 患者分離緑膿菌 60 株の中から薬剤感受性およびマウスに対する毒力の点で、感染治療実験に適した菌株を選択した。

2. *In vivo* における化学療法剤の効果判定のモデル実験として次の方法を設定した。

ICR 系の 4 週齢雄マウスを 1 群 10 匹使用し、緑膿菌の強毒株 (Nc-5) をマウス腹腔内に 4% ムチンとともに 10 MLD (約 10^4 個/マウス) 接種し、菌接種 2 時間目に被検薬剤を腹腔内投与し、マウスの生死をもつて薬剤の治療効果を判定する。なおこの際、被検薬剤の投与濃度間隔は $\log 2$ の等比級数とし、既知薬剤との比較を行なう。

3. 上記条件で接種菌量を 1 MLD, 10 MLD, 100 MLD と変えることによつて、KM および PL-B の ED_{50} 値はほぼ 1:2:4 の割合で増大した。

4. 薬剤によつて、薬剤投与時間の差が ED_{50} 値に影響を及ぼす場合とあまり影響を及ぼさない場合が認められた。

5. KM, PL-B とも腹腔内、皮下および筋肉内投与の内では、腹腔内投与が最も優れた治療効果を示した。

6. 本実験で設定した実験条件における被検薬剤の ED_{50} 測定 の 推定標準偏差は 1.21 であつた。

7. マウス実験的緑膿菌感染症に対する各種化学療法剤の治療効果を測定すると、KM 19.0 mg/kg, GM 2.1 mg/kg, PL-B 1.8 mg/kg, CL 18.0 mg/kg の ED_{50} 値を示し、 LD_{50}/ED_{50} 比は KM 74.2, GM 203.6, PL-B 11.5, CL 16.6 の値が得られた。

謝 辞

終りに臨み、本実験を通じ御懇篤な御教示と御鞭撻を賜つた都立衛生研究所細菌部、善養寺浩部長、並びに静岡薬科大学、三淵一二教授に深謝致します。また本研究の発表を許可された上司の方々、並びに実験に協力された研究室の諸氏に厚く御礼申し上げます。

なお本論文の要旨は、第 15 回日本化学療法学会東日

本支部総会 (昭 43 年 11 月東京) において発表した。

文 献

- 1) JONES, R. J. & LOWBURY, E. J.: Prophylaxis and therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infection with carbenicillin and with gentamicin. *British Med. J.* 8, 79~82, 1967
- 2) 中沢昭三, 金森政人, 堀田章代, 三好知子, 目片勇: 緑膿菌に対する実験的 化学療法。 *Jap. J. Antibiotics* 21: 84~87, 1968
- 3) WEISTEIN, M. J.: Gentamicin, a new broad-spectrum antibiotic complex. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1~8, 1963
- 4) FITZ PATRICK, F. K. & BLANDZINSKI, J.: Pyelonephritis in the mouse. III. Therapeutic experiments. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 127, 1180~1185, 1968
- 5) FRUTADO, D. & GORRILL, R. H.: *In vivo* effectiveness of the antibiotic colistin in preventing growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Path. Bact.* 96, 65~75, 1968
- 6) MILLICAN, R. C., RUST, J. & VERDER, E.: Experimental chemotherapy of *Pseudomonas* infection. 1. Production of fatal infections in cortisone-treated mice. *Antibiotics Ann.* 1956/1957, 486~493, 1957
- 7) VAN DER WAERDEN, B. L.: Wirksamkeits und Konzentrationsbestimmung durch Tierversuche. *Naunynschmiedler's Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 195, 385~412, 1940
- 8) TREFFERS, H. P.: The linear representation of dosage response curves in microbial-antibiotic assay. *J. Bact.* 72, 108~114, 1956
- 9) 岡崎俊朔: Cortisone 過剰投与の細菌感染に対する抵抗力におよぼす影響。 *日大医学雑誌* 18: 1392~1402, 1959
- 10) MILLICAN, R. C.: *Pseudomonas aeruginosa* infection and its effects in non-radiation stress. *Laboratory Animal Care* 13, 11~11, 1963
- 11) SUIRE, A.: Recherches sur la dissociation spontanée des *Pseudomonas*. *Ann. Inst. Pasteur* 94, 351~360, 1958
- 12) 塩野谷 博, 本間 遜: 緑膿菌集落の解離。 *日本細菌学雑誌* 23: 332~342, 1968
- 13) ZIERDT, C. H. & SCHMIDT, P. J.: Dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bact.* 87, 1003~1010, 1964

EVALUATION OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS
ON EXPERIMENTAL INFECTION WITH *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA IN MICE

FUJIO KOBAYASHI

Tokyo Research Laboratories, Kowa Co., Ltd.

In order to establish the procedure for evaluating the effect of chemotherapeutic agents against the infection with *Pseudomonas aeruginosa*, a selection of suitable strain was made among 60 strains by determining their virulence in mice and drug sensitivities. Various experiments were made in the several condition and experimental error and reproducibility of data were discussed. It was found that therapeutic effect varied according to variation of inoculum size of the test strain, and difference of administration route of the agents. By way of the procedure to be set for evaluating the effect of chemotherapeutic agents *in vivo*, ED₅₀ of various chemotherapeutic agents was obtained at 19.0 mg/kg in kanamycin, 1.8 mg/kg in polymyxin B, 18.0 mg/kg in colistin and 2.1 mg/kg in gentamicin respectively.