

TA-058 の体液内濃度測定法

I. 微生物学的定量法

谷 佳 都・前 澤 功・佐久間由光・石井 信男

吉田 弘嗣・山口東太郎

田辺製薬株式会社微生物研究所

市川 元一・伊藤 道久・江原 俊子・井上 雅資

石川 勉

田辺製薬株式会社分析化学研究所

TA-058 の体液内濃度は *E. coli* ATCC 27166, *M. luteus* ATCC 9341 および *B. subtilis* ATCC 6633 を検定菌とした薄層カップ法, 薄層ディスク法およびアガーウェル法で測定可能であり, 試料の濃度および量などの条件に応じて最適なものを選んで使うことが出来る。測定培地を pH 6.0 に調整すると, 鮮明で大きな阻止円が得られ, 測定感度は高い方からカップ法, アガーウェル法そしてディスク法の順であった。

TA-058 をヒトまたは各種動物の血清および胆汁で溶解して測定すると阻止円径が M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いた場合より小さくなったが, 試料をリン酸緩衝液で 5 倍以上に希釈すればそれらの影響は消失するのでリン酸緩衝液で作成した検量線を標準として濃度を求めることが出来た。またこれらの TA-058 試料は採取後すみやかに測定する事が望ましく, 冷蔵庫保存 (5°C) では 1 日目から活性が低下した。しかし, 冷凍庫保存 (-20°C) すれば少なくとも 7 日間は安定であった。ヒト尿中の TA-058 は安定であり, バイオアッセイによる測定に影響しないので, リン酸緩衝液の検量線より濃度を求める事が出来た。

結 言

半合成ペニシリン TA-058 の吸収, 排泄および体内分布を知るために, 体液内濃度測定法を検討し, 本報ではバイオアッセイによる測定について報告する。

実験材料および方法

1. 使用薬剤

TA-058 (891 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 力価, 分析用標準) および Amoxicillin (AMPC, 874 $\mu\text{g}/\text{mg}$, LEON) を用いた。

2. 検定菌

E. coli ATCC 27166, *M. luteus* ATCC 9341 および *B. subtilis* ATCC 6633 を用いた。

3. 測定用培地

市販のハートインフュージョン寒天培地 (HIA, 栄研), トリプトソイ寒天培地 (TSA, 栄研) および普通寒天培地 (NA, 栄研) ならびに日本抗生物質医薬品基準 (日抗基) 一般試験法¹⁾ 記載の *M. luteus* ATCC 9341 用培地 (JA) および *E. coli* ATCC 27166 用培地 (ECM: ペプトン 1.5%, 寒天末 1.5%) を用いた。

4. 検定菌液の調製と測定用培地への接種

(a) *E. coli* ATCC 27166

NA 斜面で 37°C, 16~18 時間培養した菌体を生理食塩液に浮遊させて調製した菌懸濁液 (約 10^8 cells/ml) を測定用培地に 0.1% の割合で接種した。

(b) *M. luteus* ATCC 9341

日抗基一般試験法¹⁾ に準じて調製した菌懸濁液 (約 10^9 cells/ml) を測定用培地に 0.01% の割合で接種した。

(c) *B. subtilis* ATCC 6633

日抗基一般試験法¹⁾ に準じて調製した孢子懸濁液 (約 10^9 cells/ml) を測定用培地に 0.01% の割合で接種した。

5. 測定方法

薄層カップ法, 薄層ディスク法およびアガーウェル法について検討した。前二法は検定菌を接種した測定用培地 (*E. coli* ATCC 27166 および *B. subtilis* ATCC 6633 : 10ml, *M. luteus* ATCC 9341 : 5 ml) を直径 90mm のプラスチックシャーレに流し, 固化させて使用した。カップは内径 6mm, 外径 8mm, 高さ 10mm のステンレス製を用い, ペーパーディスクは東洋製作所製の直

径 8 mm (厚手) を用いた。アガーウェル法はバイオアッセイ缶 (W 366×D 266×H 30 mm, 東洋測器) に検定菌を接種した培地 300 ml を流し、水平に固化させた後、直径 8 mm の孔を穿孔して用いた。定量試料の液量は 300 μ l/カップ、50 μ l/ディスクおよび 100 μ l/孔とし、37°C で 18~20 時間培養した。カップ法およびディスク法では 1 検体についてシャーレ 5 枚を用いた 5 個の阻止円径の平均値、アガーウェル法では標準液および検体液を同一平板で測定し、4 個の阻止円径の平均値から濃度を求めた。TA-058 濃度はすべて μ g (力価)/ml で示した。

6. 標準溶液および希釈液

M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0)、各種動物のプール血清、ヒト胆汁、健康成人プール血清、ヒト尿、Moni Trol I (ミドリ十字)、Ortho 血清 (ORTHO DIAG-NOSTICS) および Consera (日本製薬) について検討した。

実験結果

I 測定条件に関する検討

1. 検定菌の選定

TA-058 のバイオアッセイに用いる検定菌として測定感度の高い菌株を選び、TA-058 および TA-058 試料中に分解物として混在すると推定される AMPC に対する各菌株の抗菌活性 (MIC) を Table 1 に示した。*E. coli* ATCC 27166 は TA-058 の MIC が AMPC よりも低く、試料中の TA-058 を他の 2 株よりも正確に分別定量することが可能であり、*M. luteus* ATCC 9341 は最も測定感度が高く微量定量に適し、また、*B. subtilis* ATCC 6633 は孢子懸濁液として扱いやすいので検定菌として選定した。

2. 測定用培地の選定

(a) *E. coli* ATCC 27166 を検定菌とした場合

カップ法により、HIA, TSA, NA および ECM での TA-058 の阻止円径を比較し、Fig. 1 (A) に示した。ECM が TA-058 の低濃度で阻止円が大きく、明瞭であ

った。NA は阻止円が明瞭であったが検量線の傾きがなだらかで精度が悪く、HIA および TSA は阻止円が小さく不鮮明であった。これらの点から、ECM を *E. coli* ATCC 27166 用の測定用培地とした。TA-058 の検量線作成における精度を 5 個の阻止円径の平均値に対するそれぞれの標準偏差値の比から求めた変動係数 (％: 標準偏差値/平均値×100) で表わすと、ECM を用いた場合には 0.05~1.25 ％であった。

(b) *M. luteus* ATCC 9341 を検定菌とした場合

HIA, TSA, NA および JA について、カップ法により TA-058 の阻止円径を比較し、Fig. 1 (B) に示した。HIA および TSA では菌の生育が良く、TA-058 の阻止円径が大きくかつ明瞭であった。しかし、HIA は菌の発育にロット差が見られ、TSA は安定していた。NA および JA は前二者に比べてやや阻止円が小さかった。これらの点から、TSA を *M. luteus* ATCC 9341 用の測定用培地とした。TSA を用いた場合の変動係数は 0.92~3.14 ％であった。

(c) *B. subtilis* ATCC 6633 を検定菌とした場合

M. luteus ATCC 9341 と同様の各培地につきカップ法により TA-058 の阻止円を比較したが、HIA および TSA で良好な成績を得た。*M. luteus* ATCC 9341 と共通に使用出来る利点から、TSA を *B. subtilis* ATCC 6633 用の測定用培地とした。TSA を用いた場合の変動係数は 0.73~2.06 ％であった。

3. 培地 pH の影響

カップ法により *E. coli* ATCC 27166 および *M. luteus* ATCC 9341 を検定菌として pH 6.0, 7.0 および 8.0 に調整したそれぞれの測定用培地における TA-058 の検量線を比較した。Fig. 2 に示した如く、いずれを検定菌とした場合も pH 6.0 で阻止円が大きくなったことから、いずれの検定菌でも pH 6.0 に調整した培地を用いることにした。

4. 接種菌量の影響

測定用培地に接種する菌量を変えてカップ法により検量線を比較した。Fig. 3 に示したように、*E. coli* AT

Table 1 Antibacterial activities of TA-058 and AMPC against test organisms

Test organism	MIC (μ g/ml)	
	TA-058	AMPC
<i>E. coli</i> ATCC 27166	0.1	0.39
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	0.0125	0.0032
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.39	0.05

Medium : Heart infusion agar

Inoculum size : 10^6 cells/ml

Fig. 1 Effect of assay media on standard curves of TA-058
 Method : Cylinder-agar plate method
 Diluent : M/15 Phosphate buffer (pH 7.0)

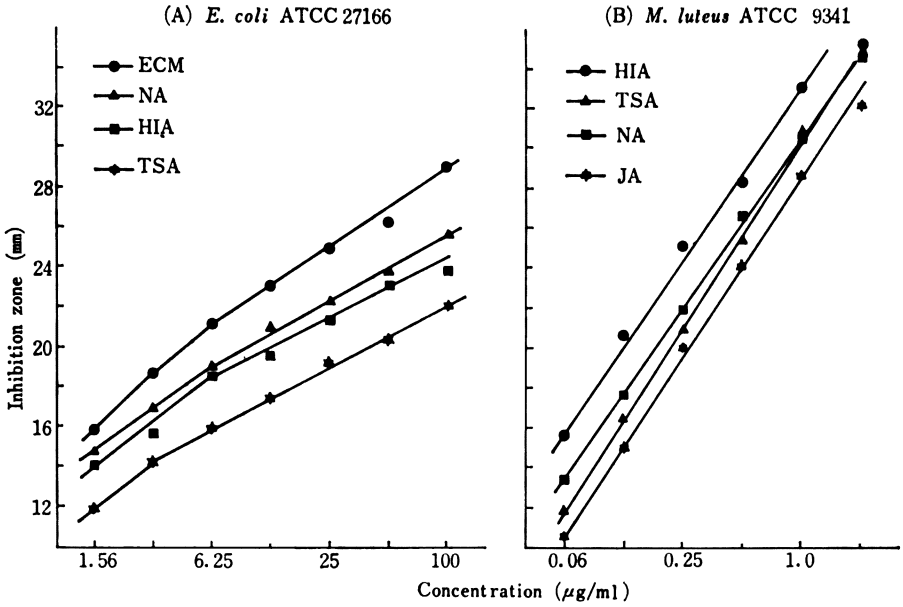


Fig. 2 Effect of medium-pH on standard curves of TA-058
 Method : Cylinder-agar plate method
 Diluent : M/15 Phosphate buffer
 Medium : *E. coli* ATCC 27166, ECM ; *M. luteus* ATCC 9341, TSA

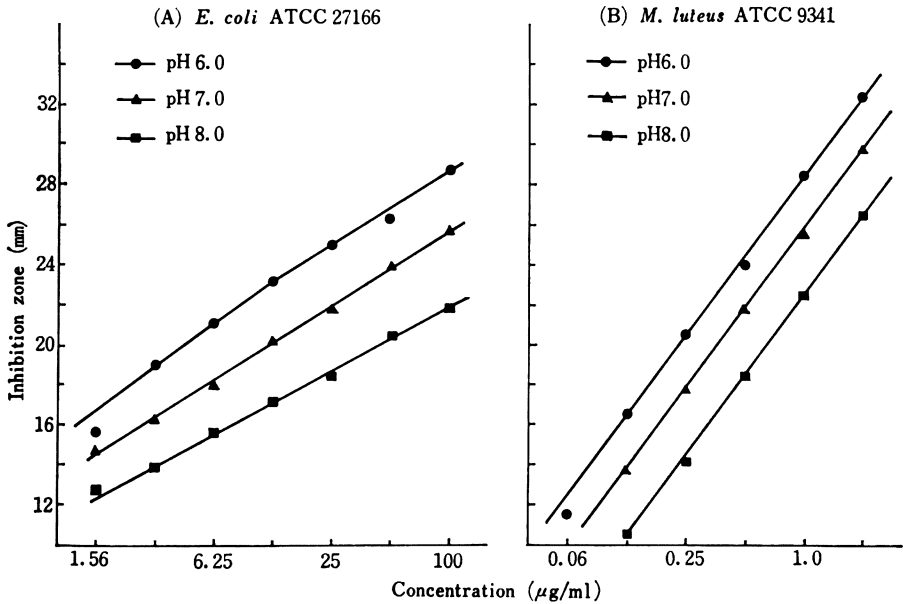


Fig. 3 Effect of inoculum size on standard curves of TA-058

Method : Cylinder-agar plate method

Diluent : M/15 Phosphate buffer

Medium : *E. coli* ATCC 27166, ECM ; *M. luteus* ATCC 9341, TSA

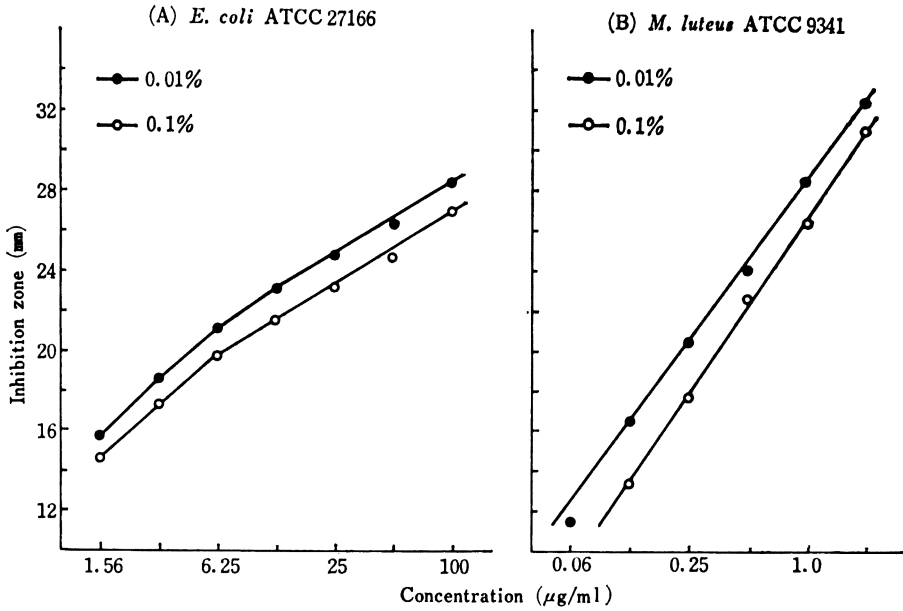
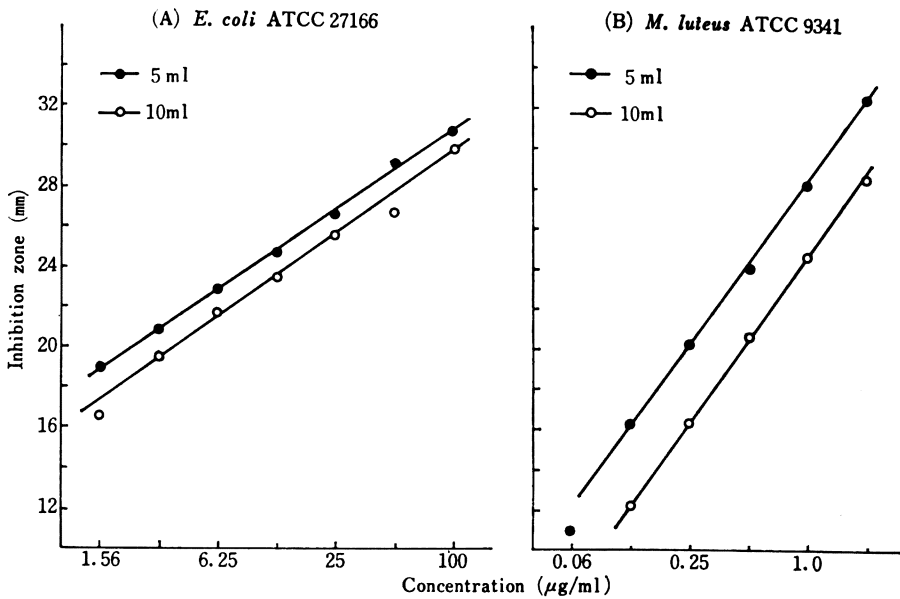


Fig. 4 Effect of medium-volume on standard curves of TA-058

Method : Cylinder-agar plate method

Diluent : M/15 Phosphate buffer

Medium : *E. coli* ATCC 27166, ECM ; *M. luteus* ATCC 9341, TSA



CC 27166 および *M. luteus* ATCC 9341 とともに検量線が菌量の影響を受けた。しかし、阻止円の明瞭さなどから、*E. coli* ATCC 27166 は 0.1% 接種（最終菌量： 10^8 cells/ml）、*M. luteus* ATCC 9341 および *B. subtilis* ATCC 6633 は 0.01% 接種（いずれも最終菌量： 10^8 cells/ml）が適当であり、以下の実験はいずれもそれらの割合で用いた。

5. 培地量の影響

シャーレ 1 枚当り培地量を 5 ml および 10 ml とし、カップ法により検量線と比較した。Fig. 4 (A) に示したように *E. coli* ATCC 27166 は培地量 5 ml で阻止円は大きいシャレ間にバラツキがあり、10 ml ではバラツキが少なくなった。*M. luteus* ATCC 9341 は Fig. 4 (B) に示したように培地量 5 ml で明瞭かつ大きな阻止円を示し、測定感度が高かった。*B. subtilis* ATCC 6633 は *E. coli* ATCC 27166 と同様の成績であった。したがって以下の実験では *E. coli* ATCC 27166、*B. subtilis* ATCC 6633 は培地量を 10 ml とし、*M. luteus* ATCC 9341 は 5 ml とした。

II 濃度測定におよぼす諸因子の影響

1. 市販凍結乾燥血清の影響

TA-058 を市販の各種標準血清に溶解して、カップ法により検量線を検討した。Fig. 5 (A) に示したように *E. coli* ATCC 27166 を検定菌とした場合、Ortho 血清はリン酸緩衝液と比較して阻止円は小さくなったがほぼ平行した検量線を示し、Moni Trol I では阻止円が小さく低濃度域ではリン酸緩衝液の阻止円との差が大きくなり、Consera では TA-058 の阻止円が著しく小さくなった。*M. luteus* ATCC 9341 を検定菌とした場合、Fig. 5 (B) に示したように Ortho 血清および Consera では *E. coli* ATCC 27166 と同様の傾向を示し、Moni Trol I は菌の発育を阻害し、検量線が得られなかった。

2. ヒト（プール）血清の影響

薄層カップ法、薄層ディスク法およびアガーウェル法により、各検定菌でヒト（プール）血清による検量線を検討した結果をそれぞれ Fig. 6, 7 および 8 に示した。

(a) カップ法

カップ法では Fig. 6 に示したように、*E. coli* ATCC 27166 および *M. luteus* ATCC 9341 を検定菌とした場合、TA-058 の検量線はヒト（プール）血清の影響を受け、リン酸緩衝液のそれに比較して阻止円は小さくなり、特に低濃度域でその影響が大きく現われたが、リン酸緩衝液で 5 倍に希釈した血清を用いると検量線はリン

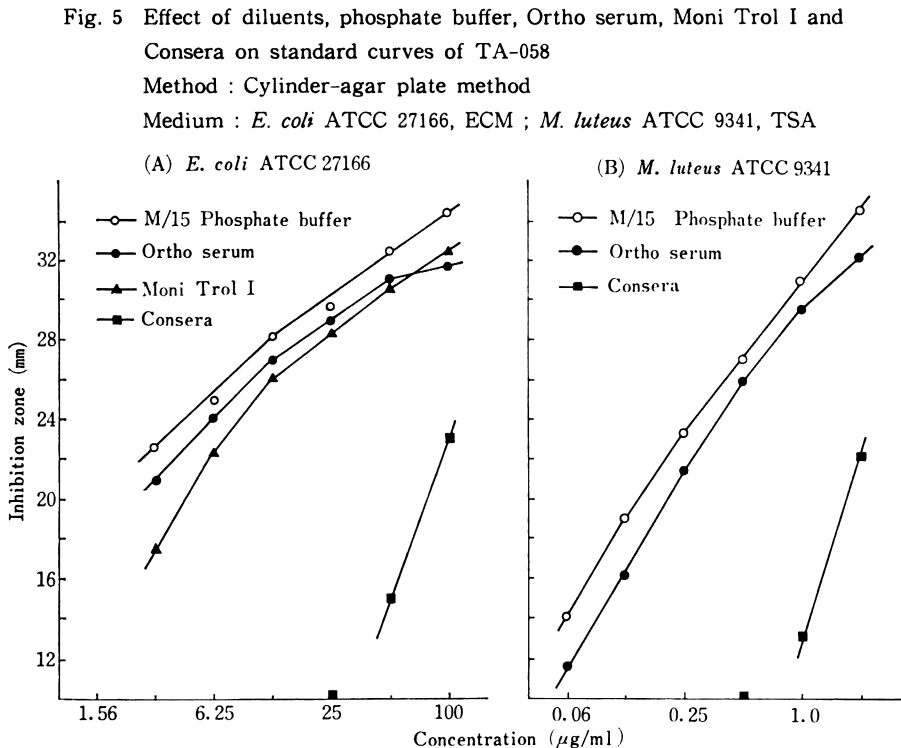


Fig. 6 Effect of diluents, phosphate buffer and human serum on standard curves of TA-058 for Cylinder-agar plate method
Medium : *E. coli* ATCC 27166, ECM ; *M. luteus* ATCC 9341, TSA ;
B. subtilis ATCC 6633, TSA

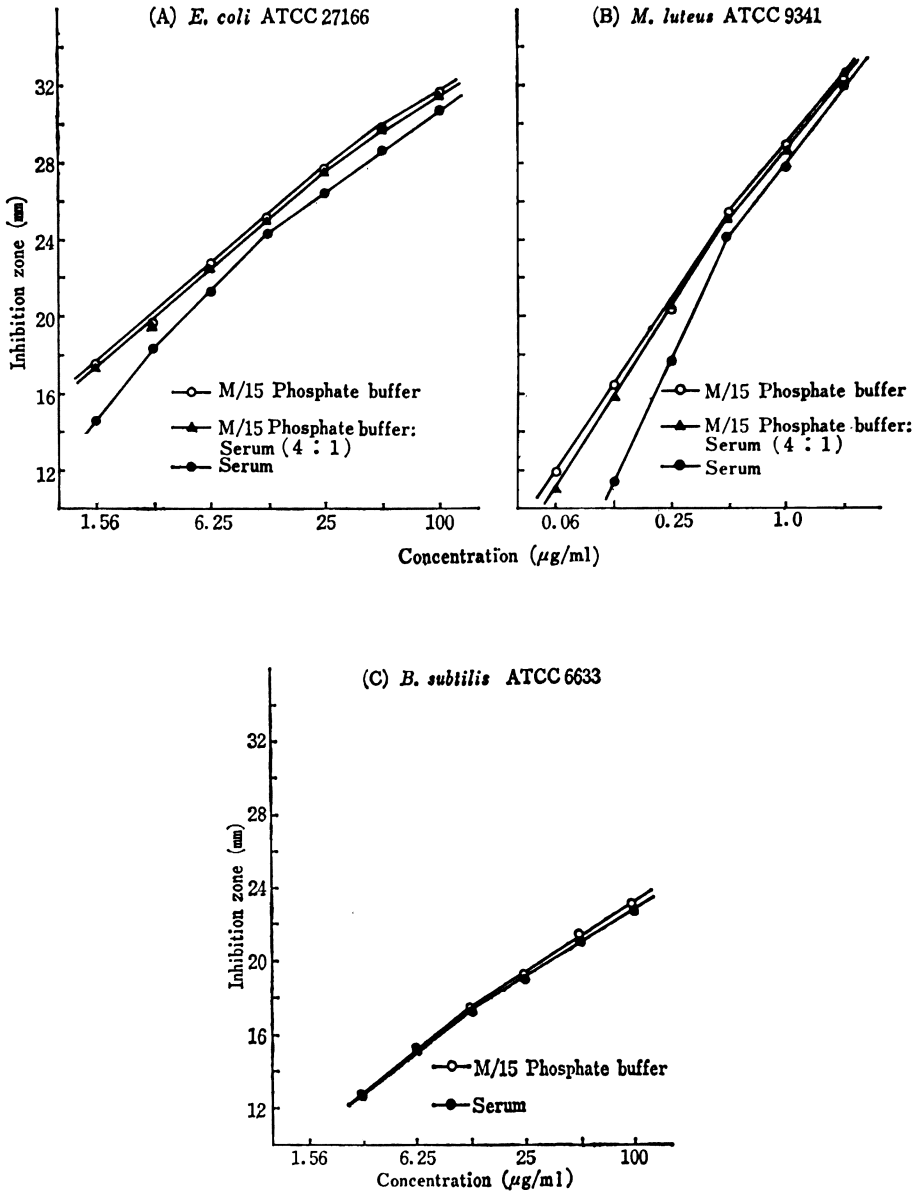


Fig. 7 Effect of diluents, phosphate buffer and human serum on standard curves of TA-058 for paper disc method

Medium : *E. coli* ATCC 27166, ECM ; *M. luteus* ATCC 9341, TSA

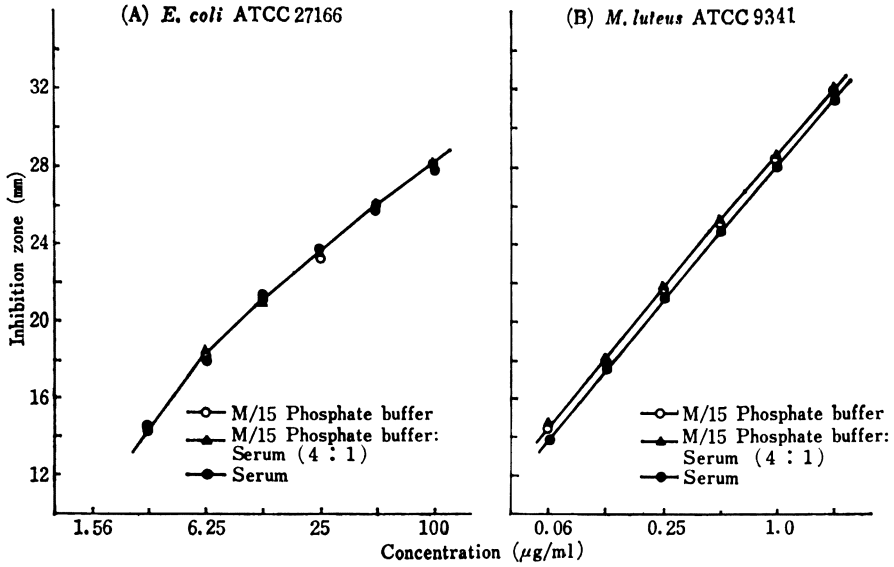


Fig. 8 Effect of diluents, phosphate buffer and human serum on standard curves of TA-058 for agar well method

Medium : *E. coli* ATCC 27166, ECM ; *M. luteus* ATCC 9341, TSA

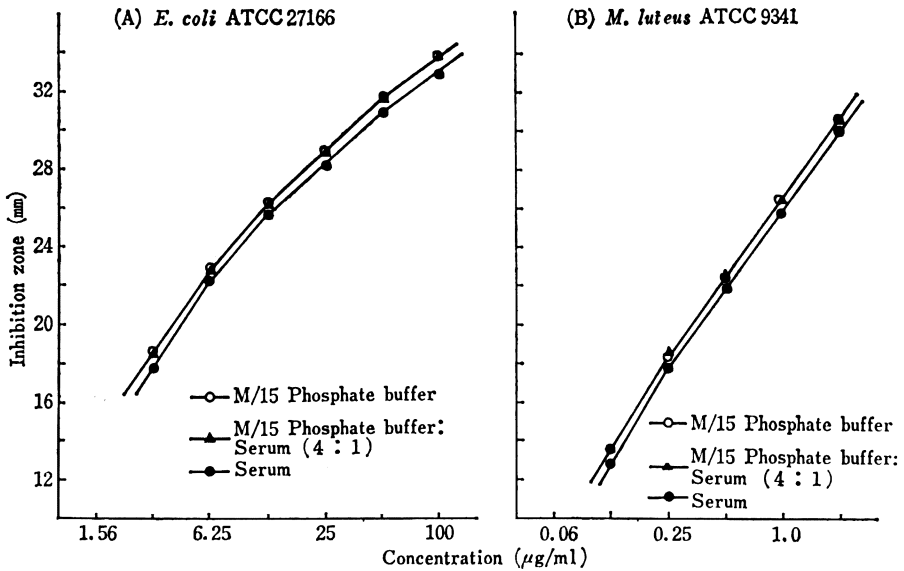


Fig. 9 Effect of diluents, phosphate buffer and mouse serum on standard curves of TA-058

Method : Cylinder-agar plate method

Medium : *E. coli* ATCC 27166, ECM ; *M. luteus* ATCC 9341, TSA

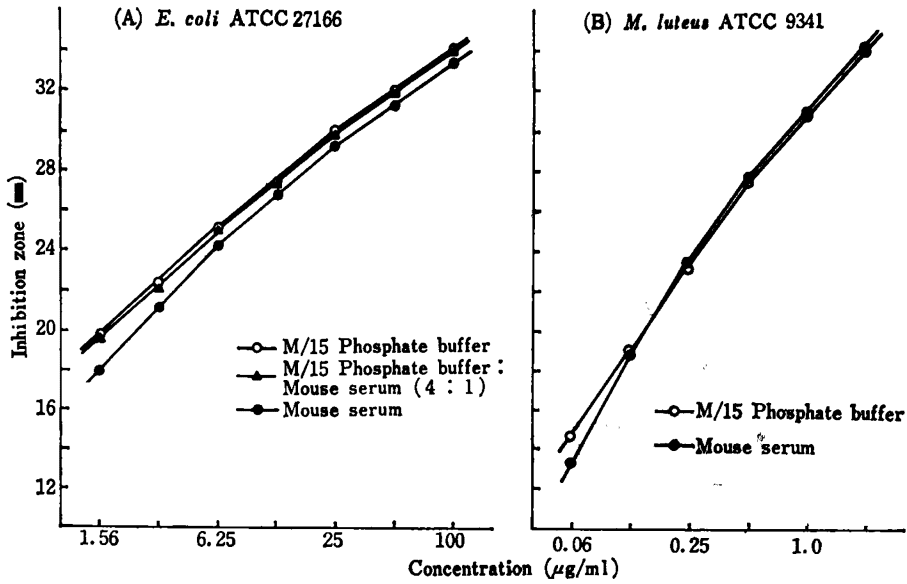


Fig. 10 Effect of diluents, phosphate buffer and rat serum on standard curves of TA-058

Method : Cylinder-agar plate method

Medium : *E. coli* ATCC 27166, ECM ; *M. luteus* ATCC 9341, TSA

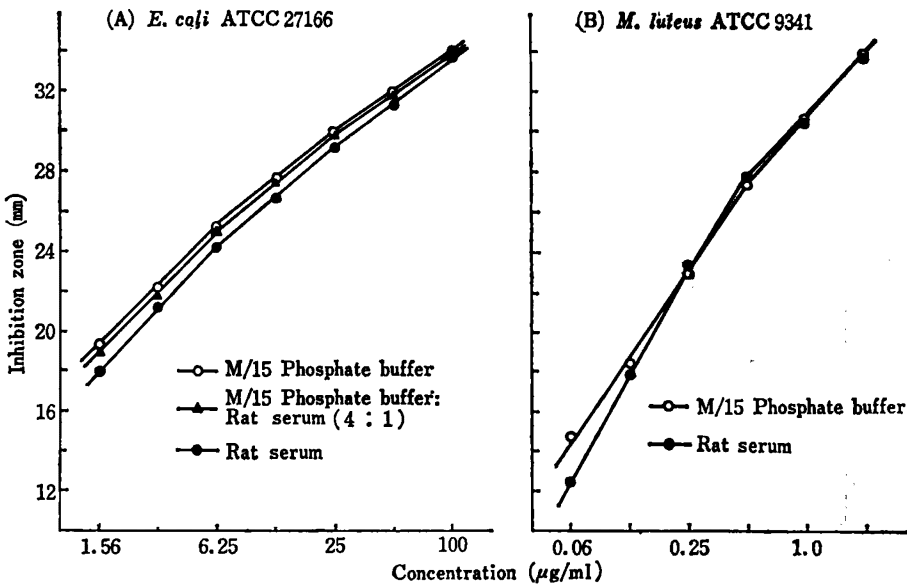


Fig. 11 Effect of diluents, phosphate buffer and human urine on standard curves of TA-058
 Method : Cylinder-agar plate method
 Medium : *E. coli* ATCC 27166, ECM ; *B. subtilis* ATCC 6633, TSA

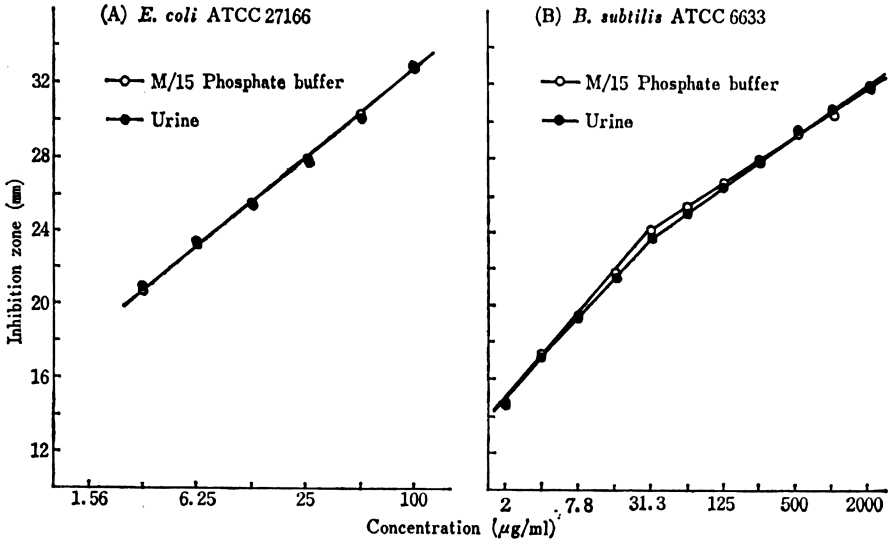
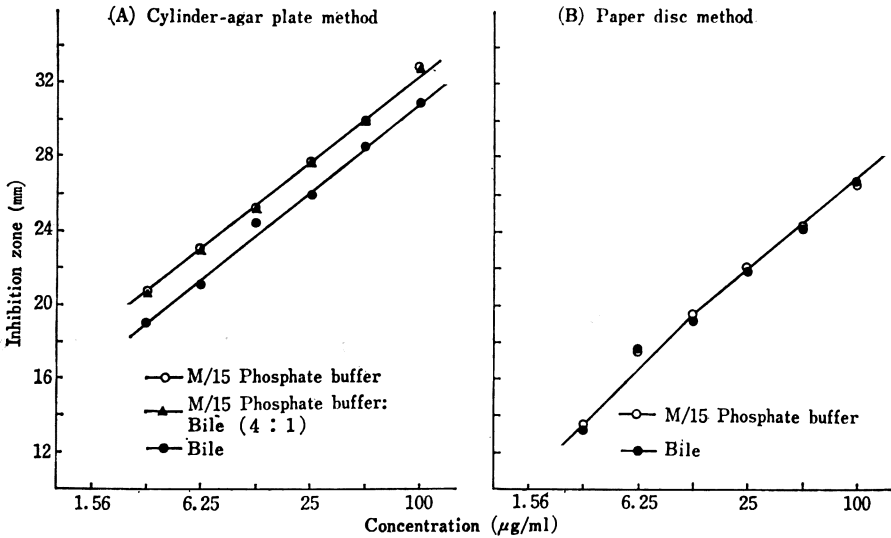


Fig. 12 Effect of diluents, phosphate buffer and human bile on standard curves of TA-058
 Medium : *E. coli* ATCC 27166, ECM



酸緩衝液のそれに近似した。*B. subtilis* ATCC 6633 を検定菌とした場合、ヒト（プール）血清での検量線はリン酸緩衝液でのそれに近似し、特に低濃度ではほぼ同じ径を示した。

(b) ディスク法

ディスク法では Fig. 7 に示したように、*E. coli* ATCC 27166 を検定菌とした場合、TA-058 の検量線はヒト（プール）血清の影響を受けず、*M. luteus* ATCC 9341 の場合はリン酸緩衝液に比べて阻止円が小さくなったが検量線は平行し、リン酸緩衝液で5倍希釈した血清での検量線はリン酸緩衝液のそれに一致した。ディスク法による検量線の変動係数は *E. coli* ATCC 27166 の場合には0.58~1.48%、*M. luteus* ATCC 9341 の場合には0.15~3.32%であった。

(c) アガーウェル法

アガーウェル法では Fig. 8 に示したように *E. coli* ATCC 27166 および *M. luteus* ATCC 9341 のいずれの場合も TA-058 の検量線はヒト（プール）血清の影響を受けて阻止円は小さくなったが、リン酸緩衝液で5倍希釈した血清の検量線はリン酸緩衝液のそれに一致した。

アガーウェル法による検量線の変動係数は、*E. coli* ATCC 27166 の場合には0.25~0.51%、*M. luteus* ATCC 9341 の場合には0.56~1.56%であった。

3. 動物血清の影響

マウスおよびラット血清を用いて希釈した TA-058 の検量線をカップ法により検討した。Fig. 9 に示した如く、マウス血清を用いた検量線は *E. coli* ATCC 27166 を検定菌とした場合、リン酸緩衝液のそれより阻止円は小さくなったがリン酸緩衝液で5倍に希釈したマウス血清の検量線はリン酸緩衝液のそれにほぼ近似し、*M. luteus* ATCC 9341 を検定菌とした場合にはリン酸緩衝液のそれと低濃度域でわずかな差が見られたがほぼ近似していた。ラット血清を用いた検量線は Fig. 10 に示した如く、両検定菌ともマウス血清を用いた結果と同じ傾向を示した。

4. ヒト尿の影響

カップ法により、ヒト尿を用いて希釈した TA-058 の検量線を検討した。*E. coli* ATCC 27166 を検定菌とした場合、Fig. 11 (A) に示したようにヒト尿を用いた検量線はリン酸緩衝液のそれとよく一致した。*B. subtilis*

Fig. 13 Stability of TA-058 in human serum and urine

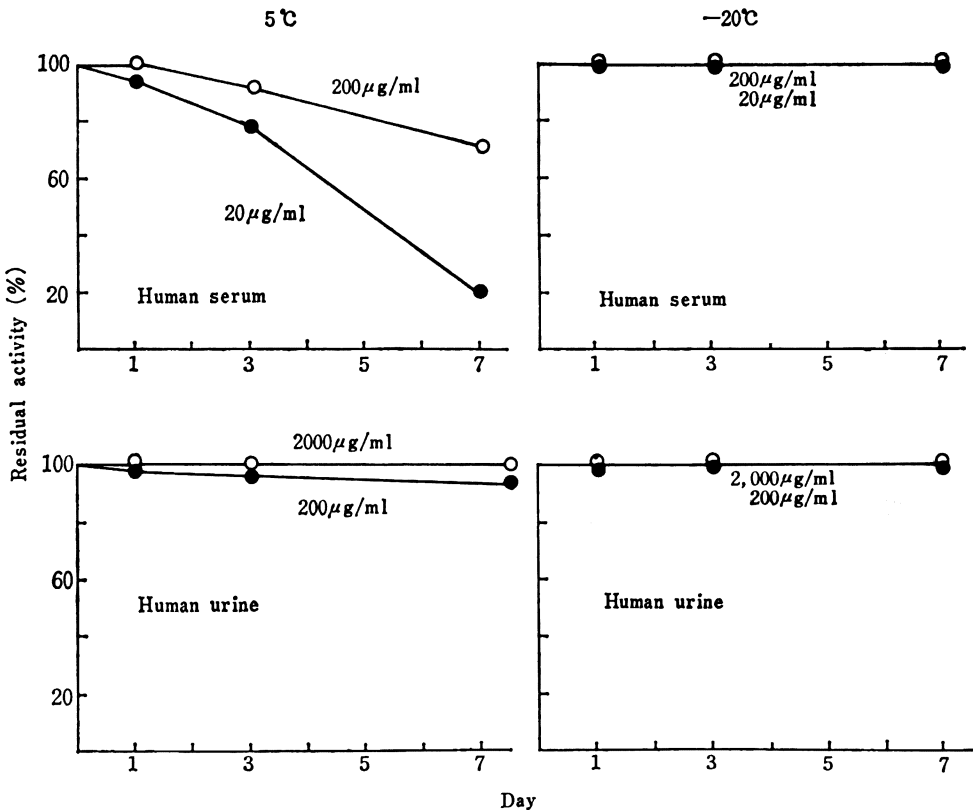
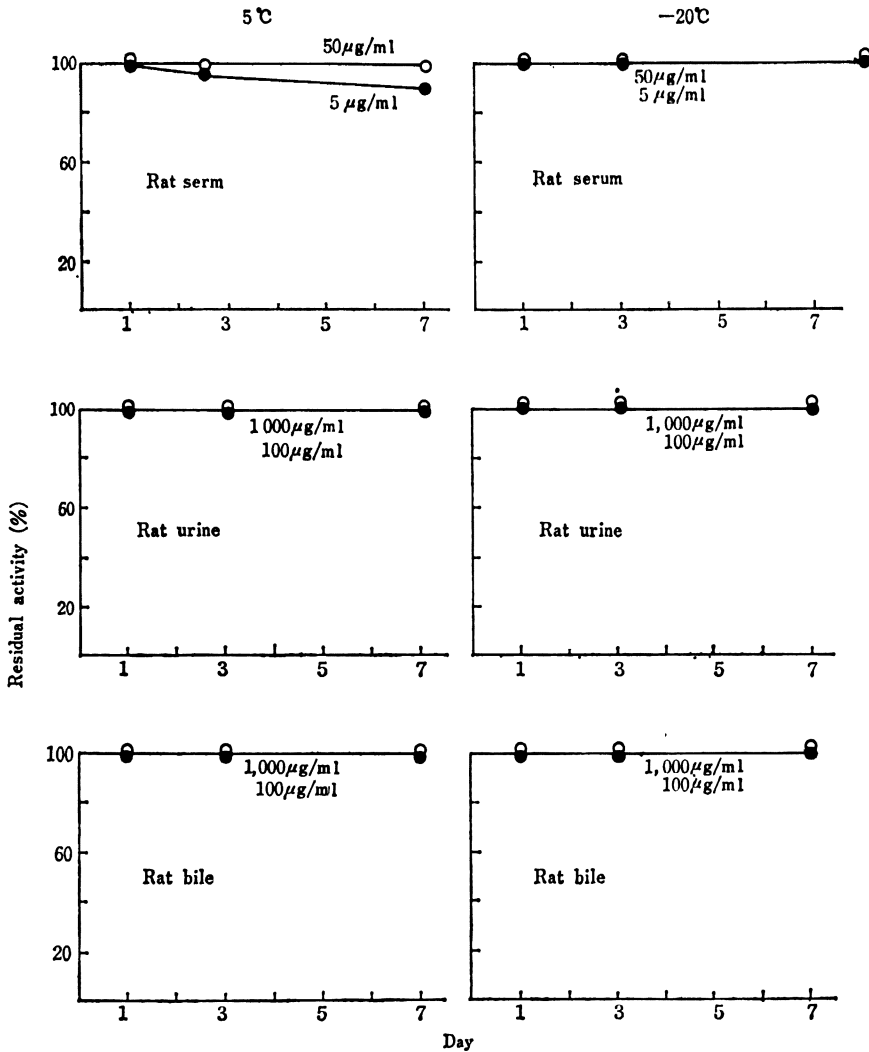


Fig. 14 Stability of TA-058 in rat serum, urine and bile



ATCC 6633 を検定菌とした場合には、Fig. 11 (B) に示した如くその検量線はリン酸緩衝液のそれにほぼ一致し、検量線は 2 相性を示すが $2 \mu\text{g/ml}$ から $2,000 \mu\text{g/ml}$ の広い濃度域で直線的であり、尿試料のように高濃度の TA-058 を含む試料の濃度測定には *B. subtilis* ATCC 6633 を用いたカップ法が適していると思われた。

5. ヒト胆汁の影響

E. coli ATCC 27166 を検定菌として、ヒト胆汁で希釈した TA-058 の検量線をカップ法およびディスク法で検討した。カップ法では Fig. 12 (A) に示した如く、ヒト胆汁の検量線は阻止円が小さくなったがリン酸緩衝液で 5 倍希釈した胆汁の検量線はリン酸緩衝液のそれとほぼ一致した。ディスク法では Fig. 12 (B) に示した如く、

胆汁の検量線はリン酸緩衝液のそれとよく一致した。

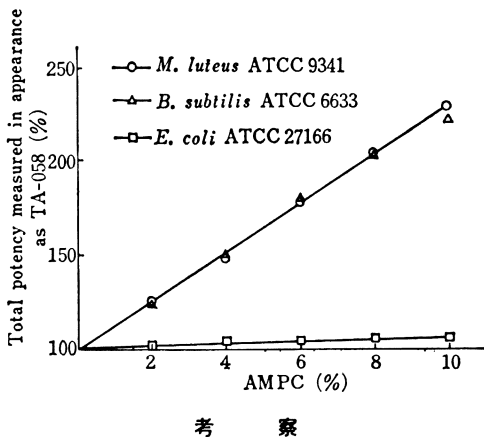
6. TA-058 の体液中安定性

一定濃度になるように TA-058 をヒトまたはラットの血清、尿および胆汁に加えてそれぞれ冷蔵庫 (5°C) および冷凍庫 (-20°C) に保存し、経日的に残存活性を測定した。Fig. 13 に示したように、ヒト (プール) 血清では冷蔵庫保存で活性が低下したがヒト尿では比較的安定であった。冷凍庫保存では 7 日間活性の低下が認められなかった。TA-058 をラット血清、尿および胆汁に加えて保存した場合の安定性を Fig. 14 に示した。冷蔵庫保存 (5°C) の血清では活性低下を示したが、尿および胆汁では冷凍庫保存と同様にほとんど低下を認めなかった。

7. アモキシシリン (AMPC) の影響

TA-058 を投与したヒト尿中には、活性分解物として AMPC の生成が認められている²⁾。Table 1 に示した如く *M. luteus* ATCC 9341 および *B. subtilis* ATCC 6633 に対する AMPC の MIC は TA-058 のそれよりも小さいので試料中に AMPC が混在すると、その影響を受けて実際の TA-058 濃度よりも高い測定値が得られると考えられる。そこで、AMPC の影響を見るため TA-058 の一定量に、その 2~10% に相当する量の AMPC を添加したリン酸緩衝液の試料を調製し、TA-058 としての見掛け上の活性を測定した。この結果 (Fig. 15) AMPC を 8% 添加した場合、*M. luteus* ATCC 9341 および *B. subtilis* ATCC 6633 による測定値は約 2 倍となり、両試験菌に対する AMPC の影響は非常に大きい事が分った。しかし、*E. coli* ATCC 27166 を試験菌とした場合は、AMPC の添加量が 10% になってもその影響はわずかであった。

Fig. 15 Influence of AMPC on measurement of TA-058 concentration



考 察

TA-058 の体液内濃度は検定菌として *E. coli* ATCC 27166, *M. luteus* ATCC 9341 および *B. subtilis* ATCC 6633 を用いた薄層カップ法、薄層ディスク法およびアガーウェル法で測定出来るが、同一検定菌で比較した測定感度は Fig. 6, 7 および 8 で示したように、高いものからカップ法、アガーウェル法そしてディスク法の順であった。またそれぞれの方法で用いられる測定試料量は 300 μ l/カップ、50 μ l/ディスクおよび 100 μ l/孔で試料量の少ないものを測定する利点からはディスク法、アガーウェル法そしてカップ法の順に適していた。

定量における TA-058 の標準希釈液として各種の血清を検討したが、TA-058 の抗菌活性は市販の各種標準血清により不活化される傾向を示し、ヒト新鮮プール血清

ではその作用は軽減されたものの低濃度域ではやはり強く影響を受けた。したがって、一般的には TA-058 の血清濃度は同種血清希釈による検量線から求める方が好ましいと考えられるが、リン酸緩衝液で 5 倍希釈した血清を用いた TA-058 検量線はリン酸緩衝液のそれに近似することから、血清試料をリン酸緩衝液で 5 倍以上に希釈した場合にはリン酸緩衝液による検量線を標準として濃度を求めてさしつかえない。また、*E. coli* ATCC 27166 を検定菌としたディスク法では血清の影響が少ないのでリン酸緩衝液の検量線より濃度を求めることが出来る。TA-058 は胆汁によっても血清と同様な影響を受けたが、リン酸緩衝液で 5 倍希釈した胆汁での濃度はその影響は消失し、また尿中ではほとんど影響を受けないので 5 倍以上に希釈された胆汁中濃度および尿中濃度はリン酸緩衝液の検量線を標準として求めてさしつかえないと思われた。

血清中の TA-058 は冷蔵庫 (5°C) 保存で抗菌活性が低下し、バイオアッセイにおいても血清および胆汁試料中の TA-058 は影響を受けやすい事が明らかになった。血清および胆汁は採取後時間が経過するにしたがいアルカリ性に変化するので、TA-058 は両試料中で分解を受け、濃度変化を生ずると考えられる。

E. coli ATCC 27166 は AMPC の影響を受ける事なく TA-058 を分別測定できるので検定菌としてすぐれており、例えばカップ法によるヒト血清中 TA-058 の濃度測定結果は高速液体クロマトグラフィの結果と相関係数 $r=0.987$ で高い相関性が確認されている³⁾。

TA-058 を投与した各種試料中の AMPC はバイオオートグラフィにより検出したが、ラット各種体液および臓器ホモジネートにおいて認められず⁴⁾、ヒトに投与した血清中にもほとんど認められなかった。しかし 4 時間後の尿で約 2%、6 時間後の尿で約 2.5% が検出された²⁾。したがって、TA-058 が生体内で AMPC に分解する量はきわめて少なく、バイオアッセイにはそれほど影響を与えないと考えられた。

以上の検討結果からバイオアッセイによる TA-058 の体液内濃度測定法を次のように設定した。

1) 検定菌と測定培地

E. coli ATCC 27166 : ペプトン (Difco) 1.5%, 寒天末 1.5%, pH 6.0

M. luteus ATCC 9341 : トリプトソイ寒天培地 (栄研), pH 6.0

B. subtilis ATCC 6633 : トリプトソイ寒天培地 (栄研), pH 6.0

2) 接種菌量 (最終菌量)

E. coli ATCC 27166 : 10^6 cells/ml

M. luteus ATCC 9341 : 10⁵ cells/ml

37°C, 16~20 時間

B. subtilis ATCC 6633 : 10⁵ cells/ml

文 献

3) 測定方法

上記それぞれの検定菌を用いた薄層カップ法, 薄層ディスク法およびアガーウェル法で測定出来る。

4) TA-058 標準液

M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) で調製する。

5) 試料の希釈

M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いて希釈する。

6) 試料の処理

血清および胆汁などの採取後の放置によりアルカリ性 (pH 8 以上) に変化する試料は採取後すみやかに測定するかまたは, -20°C 以下に凍結保存すれば7日間は活性低下をきたさない。

7) 培養条件

1) 薬業時報社: 日本抗生物質医薬品基準解説。482頁, 1974

2) SHISHIDO, H.; K. MATSUMOTO, Y. UZUKA, T. NAGATAKE, M. YAMAMOTO, Y. SAKUMA & T. YAMAGUCHI: Phase I Clinical Study of TA-058. Current Chemotherapy and Immunotherapy (Proceedings of the 12th ICC), Vol. 1: 329~331, 1981

3) 柳田 正, 他: TA-058 の体液内濃度測定法 II 高速液体クロマトグラフ法。Chemotherapy 32 (S-2): 112~118, 1984

4) 山口東太郎, 他: 実験動物におけるTA-058 の体内動態。Chemotherapy 32(S-2): 119~132, 1984

ASSAY METHODS OF TA-058 CONCENTRATIONS IN BODY FLUIDS

I. MICROBIOLOGICAL ASSAY METHOD

KATO TANI, ISAO MAEZAWA, YOSHIMITSU SAKUMA, NOBUO ISHII,
HIROTSUGU YOSHIDA and TOUTARO YAMAGUCHI
Microbiological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

MOTOICHI ICHIKAWA, MICHIHISA ITOH, TOSHIKO EHARA,
MASASHI INOUE and TSUTOMU ISHIKAWA
Analytical Chemistry Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

The concentrations of TA-058 in the body fluids were determined by the cylinder-plate assay, the disc-plate assay and the agar well assay methods using *E. coli* ATCC 27166, *M. luteus* ATCC 9341 and *B. subtilis* ATCC 6633. The most suitable method may be chosen depending on the sample concentration and volume. The clear and large inhibitory zones were obtained by adjusting the pH of assay medium to 6.0. The cylinder-plate method was most sensitive, which was followed by the agar well and the disc-plate methods in the sensitivity.

The inhibitory zone diameters of TA-058 in human or various animal serum and bile were found to be smaller than those of in M/15 phosphate buffer. However, when the specimens were diluted over 5-fold with the phosphate buffer, the potency of TA-058 was completely recovered. Thus, the concentrations of TA-058 could be determined by using standard curves which were prepared with the same body fluids or the phosphate buffer as a diluent. Since the potency of TA-058 in the serum and bile decreased by the preservation in a refrigerator (5°C) for one day, the potency in these specimens desire to determine rapidly. The potency of TA-058 in the body fluid was, however, stable at -20°C for 7 days. TA-058 was also stable in human urine and did not affect the inhibitory zone diameter.