

## Cefodizime(THR-221)の生体内濃度測定法

佐川久美子・三宅美行・羽原千恵子・大谷敏夫  
石田直文・松島英司・丸中照義  
大鵬薬品工業株式会社開発研究所

出口浩一・深山成美・西村由紀子  
東京総合臨床検査センター研究部

Cefodizime(THR-221)の生体内濃度測定法について検討した。検定菌として *Escherichia coli* JCM 6255, 検定用培地として Nutrient agar(Difco), あるいは, 検定菌として *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, 検定用培地として DST agar(Oxoid)を使用した薄層カップ法またはディスク法により測定が可能であった。

ヒト血漿中の濃度測定においては, ヒト血漿またはヒト血清を用いて作成した検量線で定量することが好ましい。さらに, 尿, 胆汁, 糞およびその他の生体内濃度測定には, 0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で希釈して作成した検量線による定量が可能であった。Bioassay法の薄層カップ法による測定下限は, 血漿の場合, *E. coli* JCM 6255で0.05  $\mu\text{g/ml}$ , *K. pneumoniae* ATCC 10031で0.025  $\mu\text{g/ml}$ , リン酸緩衝液の場合, 両株とも0.025  $\mu\text{g/ml}$ であった。

Bioassay法で求めた血漿中, 尿中濃度は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法の結果と高い相関性を示した。THR-221は各種の生体内試料中でも,  $-20^{\circ}\text{C}$ に凍結保存すれば少なくとも3週間は安定であった。

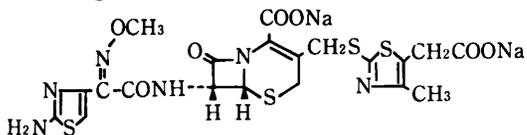
Cefodizime(THR-221)は西ドイツ Hoechst 社とフランス Roussel Uclaf 社で合成・開発された注射用セフェム系抗生物質であり, 構造式は Fig. 1 に示すとおりである。本剤は広域抗菌スペクトラムを有し, 特に *in vivo*での効果が優れているのが特徴である<sup>1,2)</sup>。THR-221の吸収・排泄ならびに体内分布を解析するためには微生物学的定量法が必要となってくる。本報では微生物学的定量法に関する諸条件を検討し, 標準的な生体内濃度測定法を設定するとともに, 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による定量法との相関ならびに体液中での安定性についても検討したので, その結果を報告する。

## I. 実験材料および方法

## 1. 使用薬剤

Cefodizime(THR-221; Lot L029, 力価897  $\mu\text{g/mg}$ )はヘキスト AG で合成されたものを使用した。

Fig. 1 Chemical structure of THR-221



## 2. 検定菌

*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* JCM 6255, *Escherichia coli* NIHJ, *Escherichia coli* ATCC 27166, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031を用いた。

## 3. 感受性測定

THR-221に対する最小発育阻止濃度(MIC)を日本化学療法学会 MIC 測定標準法<sup>3)</sup>に従って測定した。測定用培地は Mueller-Hinton agar(Difco)を用い, 接種菌量は  $10^8$ ,  $10^6$  cells/ml, 培養は  $37^{\circ}\text{C}$ , 18時間行った。

## 4. 検定用培地

市販の Heart infusion agar(HIA, 栄研), Nutrient agar(NA, Difco), Trypticase soy agar(TSA, BBL), Mueller-Hinton agar(MHA, Difco), Sensitivity test agar(STA, 日水製薬)および DST agar(DST, Oxoid)を処方どおり調製し, 使用した。

## 5. 菌液調製

$-80^{\circ}\text{C}$ 保存の菌液を Trypticase soy broth(TSB, BBL)に1ないし2白金耳接種して,  $37^{\circ}\text{C}$ にて18~20時間培養し, 分光光度計を用いて透過率  $T=20\sim22\%$  ( $\lambda=660\text{ nm}$ )になるように TSBで調製後, 検定用培地に0.5~1%接種した。

## 6. 検定方法

試験菌を接種した検定用培地10 mlを直径90 mmのプラスチックシャーレに流し込み、水平台上で固定させた。寒天平板上に4個のステンレスカップ(内径×外径×高さ=6×8×10 mm)を立てて、標準希釈液または検定液を0.3 ml加えて37℃にて18~20時間培養し、阻止帯の直径を測定した。

ペーパーディスクを用いる場合には、上述した方法で作製した寒天平板に、直径8 mmのペーパーディスク(厚手、東洋濾紙株式会社)に80  $\mu$ lの標準希釈液または検定液をしみこませた後、1シャーレにつき4枚のペーパーディスクを張りつけて培養した。

## 7. 標準溶液および希釈液

THR-221を滅菌蒸留水に溶解し、0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)にて標準希釈系列を調製して用いた。また、血漿、血清試料測定用標準希釈液としては、滅菌蒸留水に溶解したTHR-221をヒト血漿、ヒト血清(日本生物材料センター)、Moni-Trol I(American Dade)およびConse-ra(日本製薬)を用いて標準希釈系列を調製した。

8. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法<sup>4)</sup>

血漿、血清試料0.5 mlは内部標準物質(3,5-ジニトロ安息香酸, 2.5  $\mu$ g/ml)を含むメタノール2.0 mlで除タンパク(5℃, 30分間)後、遠心分離(5℃, 3,000 r.p.m., 15分間)を行い、次に上清液を約0.5 mlまで濃縮し、その20  $\mu$ lをHPLC分析に供した。尿試料1.0 mlおよび胆汁試料0.5 mlはそれぞれ内部標準物質(25  $\mu$ g/ml)を含む0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)4.0 mlおよび1.0 mlで希釈後、HAフィルター(マイレックス, 0.45  $\mu$ m)で濾過し、その20  $\mu$ lをHPLC分析に供した。糞試料は全量を練り合わせた後、その1 gをエタノールと1%リン酸緩衝液

(pH 6.0)を2対1の割合に混合した溶液4.0 mlでホモジナイズし、遠心分離(5℃, 3,000 r.p.m., 15分間)を行った。次に上清液約1.5 mlをHVフィルター(マイレックス, 0.45  $\mu$ m)で濾過し、濾液0.5 mlを内部標準物質(25  $\mu$ g/ml)を含む0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)0.5 mlで希釈後、その20  $\mu$ lをHPLC分析に供した。

検量線用の標準液は0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)で調製し、以下の条件で測定した。

カラム: Radial Pak NOVA C<sub>18</sub> (4  $\mu$ m), 100 × 8 mm i.d. (Waters 社製)

カラム温度: 室温

移動相: 5 mM 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウムおよび2%酢酸を含むアセトニトリル/水(20/80, v/v)溶液

流速: 2.0 ml/min

検出器: UV-264 nm, 0.02または0.04 a.u.f.s.

装置: 島津 LC-4 A 型高速液体クロマトグラフ

この条件下での測定下限は血漿、血清試料の場合は0.1  $\mu$ g/ml, 尿、胆汁、糞試料の場合は0.5  $\mu$ g/ml(g)であった。

## II. 実験結果ならびに考察

## 1. 検定菌種の選択および測定方法

*S. aureus* ATCC 6538 P, *M. luteus* ATCC 9341, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* JCM 6255, NIHJ, ATCC 27166 および *K. pneumoniae* ATCC 10031のTHR-221に対するMICの結果をTable 1に示す。これら7株のなかで感受性の高かった菌株として、グラム陽性菌から *M. luteus* ATCC 9341, グラム陰性菌から *E. coli* JCM 6255および *K. pneumoniae* ATCC 10031の3株を選び、それらの検量

Table 1 Susceptibility of test organisms to THR-221

Test organism	MIC ( $\mu$ g/ml)	
	10 <sup>8</sup> cells/ml	10 <sup>6</sup> cells/ml
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	6.25	3.13
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	0.39	0.20
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	25	6.25
<i>E. coli</i> JCM 6255	0.006	≤0.0015
<i>E. coli</i> NIHJ	0.10	0.025
<i>E. coli</i> ATCC 27166	0.05	0.05
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	0.05	0.013

Method: Agar dilution method

Medium: Mueller-Hinton agar (Difco)

Incubation: 18 h at 37°C

線を比較検討した。結果を Fig. 2 に示す。*M. luteus* ATCC 9341では若干感度が悪かった。*E. coli* JCM 6255および*K. pneumoniae* ATCC 10031の両株においては低濃度まで測定可能であった。*K. pneumoniae* ATCC 10031においては検量線の傾きが大きかったが、*E. coli* JCM 6255の阻止帯が鮮明で判定しやすかったことから、以下の検討は主として*E. coli* JCM 6255について行った。

*E. coli* JCM 6255を用いて、0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で調製した標準希釈溶液(25~0.025  $\mu\text{g/ml}$ )による薄層カップ法およびディスク法における検量線を求めた(Fig. 3)。両者とも良好な検量線が得られたことから、両測定法を適宜使い分けることにした。

## 2. 検定培地の検討

*E. coli* JCM 6255を検定菌として、薄層カップ法におけるHIA, NA, TSA, MHAおよびSTAの5種類の検定培地を用いて検量線を作成し、比較検討した。測定結果をFig. 4に示す。STA培地において、阻止帯は最も大きかったが鮮明ではなかった。NA培地を用いた場合に最も鮮明な阻止帯が得られ、検量線の傾きも大きく直線性も良好であったので、培地はNAを用いることにした。

## 3. 接種菌量の影響

*E. coli* JCM 6255をNA培地に接種するときの菌量を0.5, 1および2%としたときの検量線をFig. 5に示す。接種菌量は阻止帯の鮮明さに影響を与えなかったが、2%接種すると若干感度が悪くなった。従って、接種菌量は0.5~1%が適当であると考えられた。

## 4. 予備拡散時間の検討

0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で調製した標準希釈溶液を用いて、予備拡散を4℃にて0, 1および2時間と行ったときの検量線をFig. 6に示す。阻止帯はいずれも鮮明であったが、予備拡散時間の延長によりその直径は増大し、検量線の傾きも大きくなったことから、2時間の予備拡散を行うことにした。

## 5. 希釈液のpHの影響

pH 6.0, 7.0および8.0の0.1 M リン酸緩衝液で調製した標準希釈溶液に対するそれぞれの検量線を求め、希釈液のpHの影響を検討した。Fig. 7に示すように、いずれのpHでも鮮明な阻止帯が得られ、検量線もよく一致していることから、希釈液のpHが標準希釈溶液の活性に影響を与えていないことがわかった。THR-221はpH 6~7において最も安定であること、培地のpHがpH 7付近であることから、pH 7.0のリン酸緩衝液を選んだ。

Fig. 2 Standard curves of THR-221 on various test organisms by cup-plate method

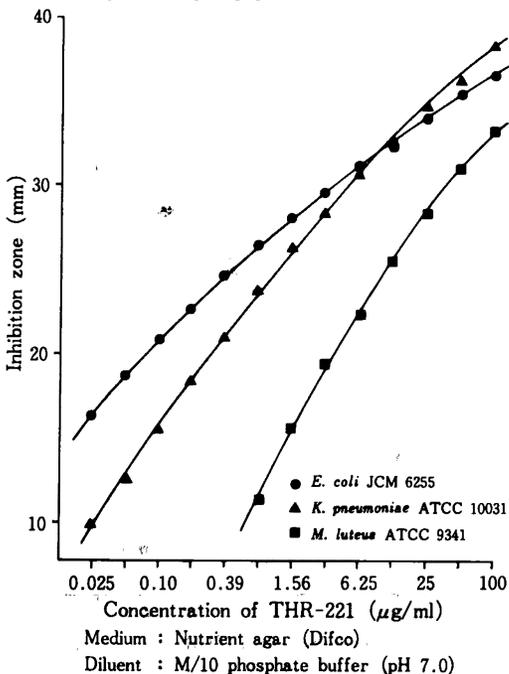


Fig. 3 Standard curves of THR-221 by cup-plate method and disc-plate method

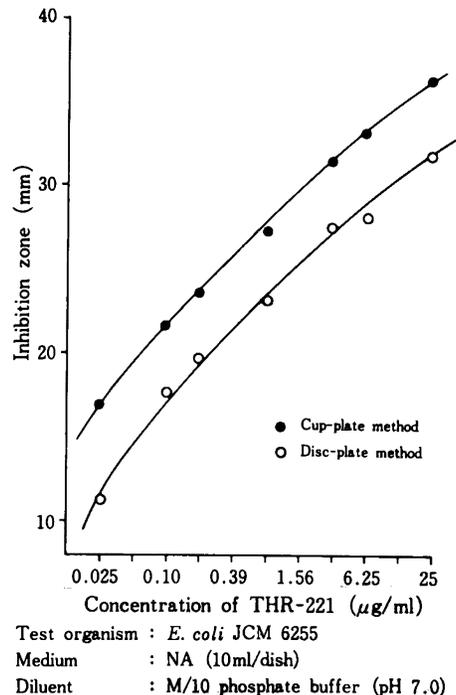
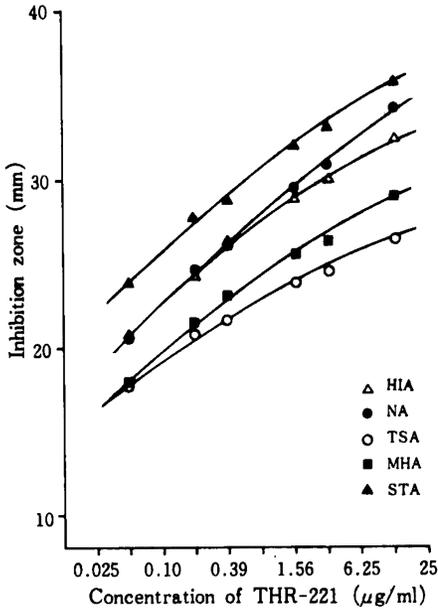
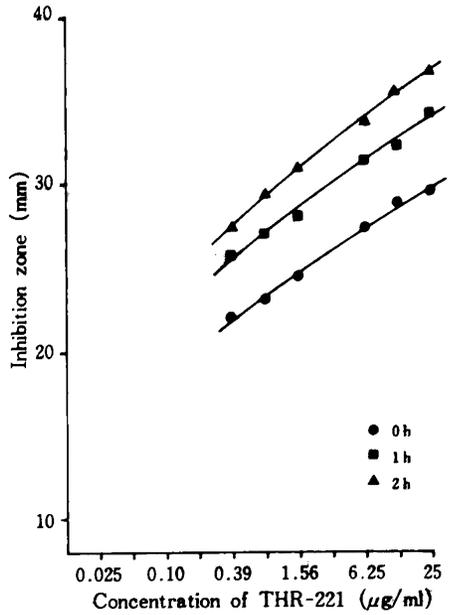


Fig. 4 Standard curves of THR-221 on various media



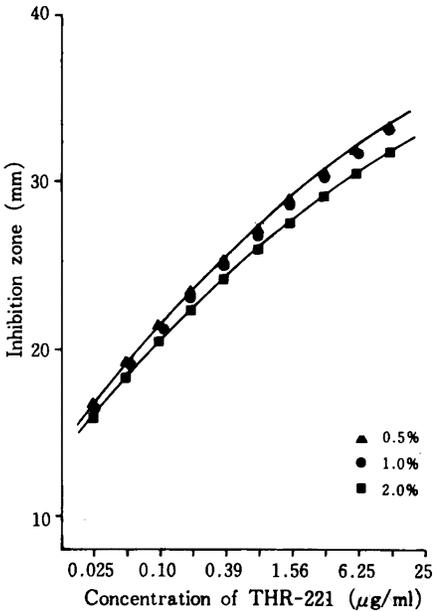
Test organism : *E. coli* JCM 6255  
 Medium : 7 ml/dish  
 Diluent : M/10 phosphate buffer (pH 7.0)

Fig. 6 Effect of prediffusion time on standard curve of THR-221



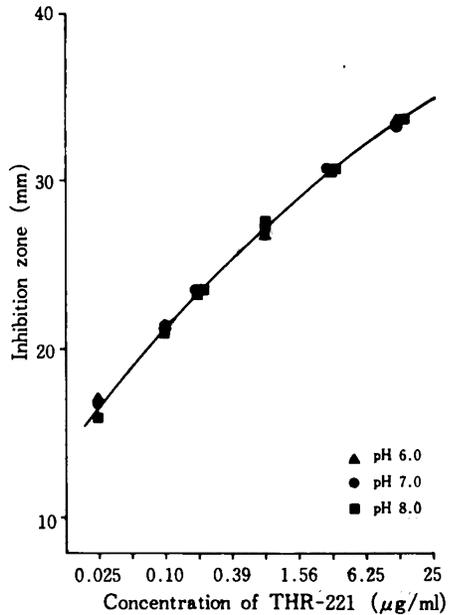
Test organism : *E. coli* JCM 6255  
 Medium : HIA (7 ml/dish)  
 Diluent : M/10 phosphate buffer (pH 7.0)

Fig. 5 Effect of inoculum size on standard curve of THR-221



Test organism : *E. coli* JCM 6255  
 Medium : NA (10ml/dish)  
 Diluent : M/10 phosphate buffer (pH 7.0)

Fig. 7 Standard curves of THR-221 at various pH of phosphate buffer



Test organism : *E. coli* JCM 6255  
 Medium : NA (10ml/dish)  
 Diluent : M/10 phosphate buffer

## 6. 血漿および血清の影響

Moni-Trol I, Consera, ヒト血清, ヒト血漿および0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で調製した5種類の標準希釈溶液を用いて, 薄層カップ法による検量線を作成した。

Moni-Trol I ではロットにより不鮮明な二重阻止帯を形成することがあり, 再現性のよい検量線を得ることは困難であった。Consera ではロット間において差が認められ, 適当でないと考えられた。しかし, これらを使用する場合には, ヒト血漿または血清の検量線と差がないことを確認したロットを使用するのであれば, 測定は可能であると考えられた。

Fig. 8 に示すように, ヒト血清, ヒト血漿および0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)の3種の検量線を比較すると, 前二者の阻止帯はリン酸緩衝液の阻止帯に比して小さく, 同一阻止帯を得るには4~8倍高い濃度が必要であった。これは Cefotetan<sup>4)</sup>, Ceftriaxone<sup>5)</sup>と同様に, THR-221の蛋白結合率が高いためである<sup>6)</sup>と考えられる。ヒト血清の阻止帯はヒト血漿の阻止帯よりもやや小さかったが, 健康な成人の血清を用いて薬剤の添加回収試験を行ったところ, ヒト血清, ヒト血漿のいずれを用いても測定誤差の範囲と考えられる定量値を得ることが可能であった。

以上の結果より, 血漿, 血清試料の定量については,

ヒト血清またはヒト血漿を用いて作成した検量線を使用することにした。

## 7. 尿および胆汁の影響

尿においては, 原液の尿および0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で10倍希釈した尿を用いて作成した検量線で尿の影響を検討した。Fig. 9 に示す結果より, 原液では低濃度領域を除いてその阻止帯は小さく, 0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)と同等の阻止帯を得るためには約2倍の濃度が必要であった。一方, 10倍希釈した尿の検量線は0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)のそれぞれとほぼ一致した。

胆汁についても尿と同様に実験を行った。胆汁でも, 原液では0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)より小さい阻止帯を示したが, 10倍希釈することによって同等の阻止帯を得ることができた(Fig. 10)。

これらの結果から, 尿, 胆汁試料の測定については0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)を用いて作成した検量線を使用し, 試料は0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で10倍以上の希釈を行えば測定可能であった。

## 8. 糞の影響

新鮮な糞20 g をエタノールと1%リン酸緩衝液(pH 6.0)を2対1の割合に混合した溶液100 ml で抽出し, ホモジネート後3000 r.p.m., 10分間遠心し, そのホモジ

Fig. 8 Effect of diluents on standard curve of THR-221

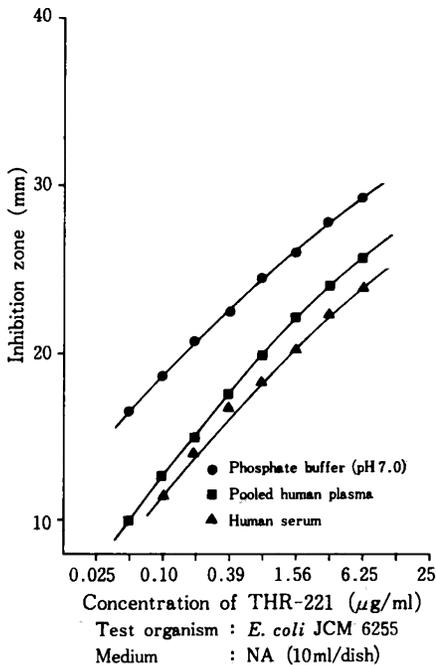


Fig. 9 Effect of human urine on standard curve of THR-221

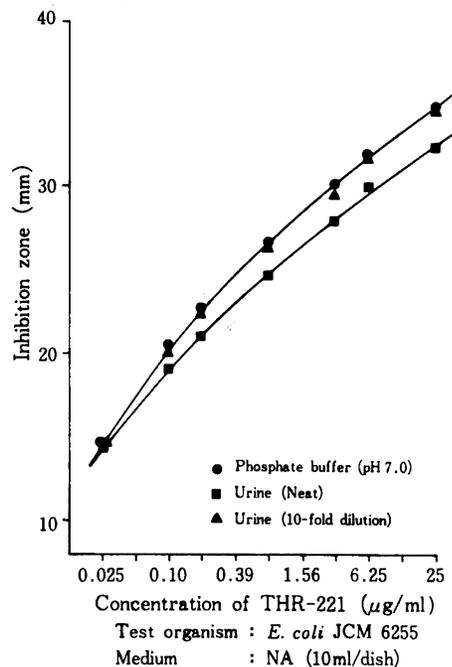


Fig. 10 Effect of human bile on standard curve of THR-221

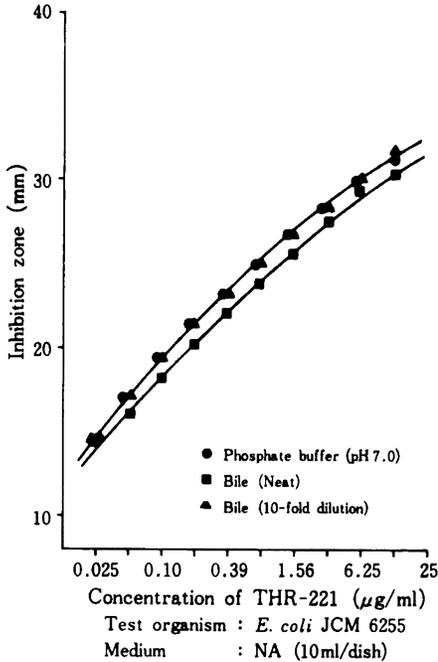
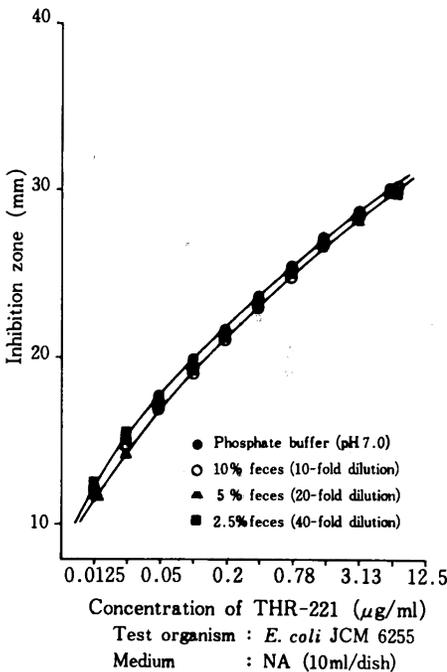


Fig. 11 Effect of human feces on standard curve of THR-221



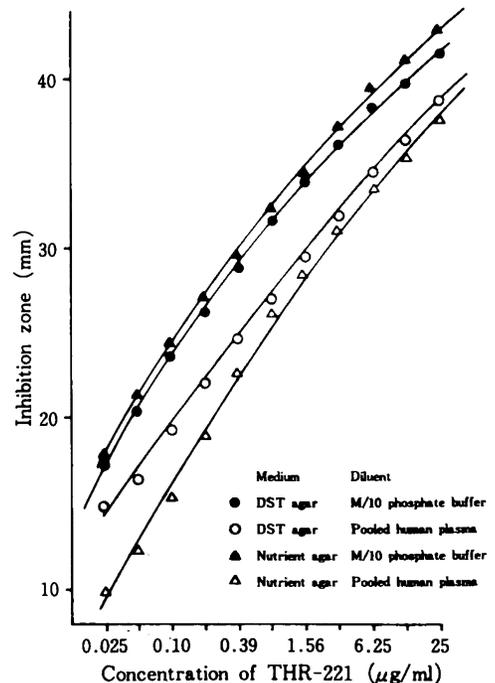
ネート上清液を糞試料として使用した。この試料を0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で希釈した10%, 5%, 2.5% ホモジネート上清液を用いて作成した検量線により糞の影響を検討した。Fig. 11に示す結果より、糞ホモジネート上清液の阻止帯は0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)の阻止帯と比較してほとんど差がみとめられなかったが、5%, 2.5% ホモジネート上清液を用いた方が10% ホモジネート上清液を用いたときよりも阻止帯の判定が容易であった。

以上のことから考えて、糞のホモジネート上清の場合、リン酸緩衝液で5%以内に(20倍以上)希釈した方が好ましいと考えられた。

#### 9. 検定菌 *K. pneumoniae* ATCC 10031の検討

Fig. 2に示した THR-221の検定菌の検討結果より、検量線の傾きが大きかったことから、*K. pneumoniae* ATCC 10031について検定菌としての検討を加えた。*K. pneumoniae* ATCC 10031の場合においても良好な検量線が得られた。さらに、DST培地を用いれば、0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)とヒト血漿の検量線の差が小さかったことから、組織試料等の測定においてその定量値への影響が小さいだろうと推察された(Fig. 12)。そこで、5種類の組織試料に THR-221を添加し、*E. coli* JCM 6255,

Fig. 12 Standard curves of THR-221 by cup-plate method using *K. pneumoniae* ATCC 10031



*K. pneumoniae* ATCC 10031を検定菌として定量を行った。Table 2に示す結果より、両検定菌ともほぼ同じ定量値を示しており、THR-221の検定菌として適当であると考えられた。

#### 10. HPLC法とBioassay法の相関関係

THR-221をイヌに静脈内投与(15 mg/kg)し、経時的に採取した血漿および尿試料中のTHR-221濃度を、*E. coli* JCM 6255を検定菌とした薄層カップ法およびHPLC法で測定した。その相関図をFig. 13に示す。血漿試料96検体、尿試料24検体についての相関係数 $r$ はそれぞれ $r = 0.977$ ,  $r = 0.991$ であり、高い相関関係が得られた。

#### 11. THR-221の生体中での安定性

THR-221のヒト血漿、尿およびリン酸緩衝液中における $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $5^{\circ}\text{C}$ および室温下での安定性についてHPLC法により検討した。その結果をFig. 14に示す。ヒト血漿中でのTHR-221は $-20^{\circ}\text{C}$ の保存条件下では3週間、 $5^{\circ}\text{C}$ の保存条件下では1週間、室温の保存条件下では1日間安定であった。ヒト尿中でのTHR-221は $-20^{\circ}\text{C}$ および $5^{\circ}\text{C}$ の保存条件下では5週間、室温の保存条件下では3日間安定であった。また、リン酸緩衝液中でのTHR-221は $-20^{\circ}\text{C}$ および $5^{\circ}\text{C}$ の保存条件下では3週間、室温の保存条件下では1日間安定であった。さらに、ヒト胆汁および糞ホモジネート液での安定性について検討した結果、胆汁中での安定性は尿中での安定性とほぼ同様の

Table 2 Effect of tissues on the recovery of THR-221 using *E. coli* JCM 6255 and *K. pneumoniae* ATCC 10031 as test organisms

Tissue	Actual concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		<i>E. coli</i> JCM 6255	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031
Human myometrium	18.31	18.00 ( 98.31)	17.95 ( 98.03)
	0.92	0.88 ( 95.65)	0.96 (104.35)
Human endometrium	18.31	17.38 ( 94.92)	19.24 (105.08)
	0.92	0.88 ( 95.65)	0.92 (100.00)
Human serosa	18.31	17.26 ( 94.27)	18.76 (102.46)
	0.92	0.85 ( 92.39)	0.91 ( 98.91)
Mouse liver	18.31	17.38 ( 94.92)	18.76 (102.46)
	0.92	0.98 (106.52)	0.97 (105.43)
Mouse spleen	18.31	17.62 ( 96.23)	18.53 (101.20)
	0.92	0.87 ( 94.57)	0.92 (100.00)

( ) : % recovery

Fig. 13 Correlation between THR-221 concentrations obtained from bioassay and HPLC

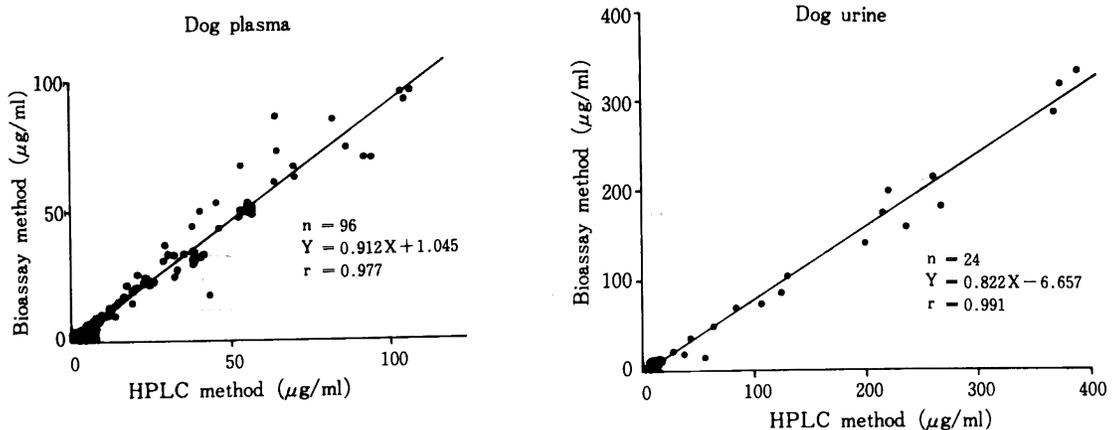
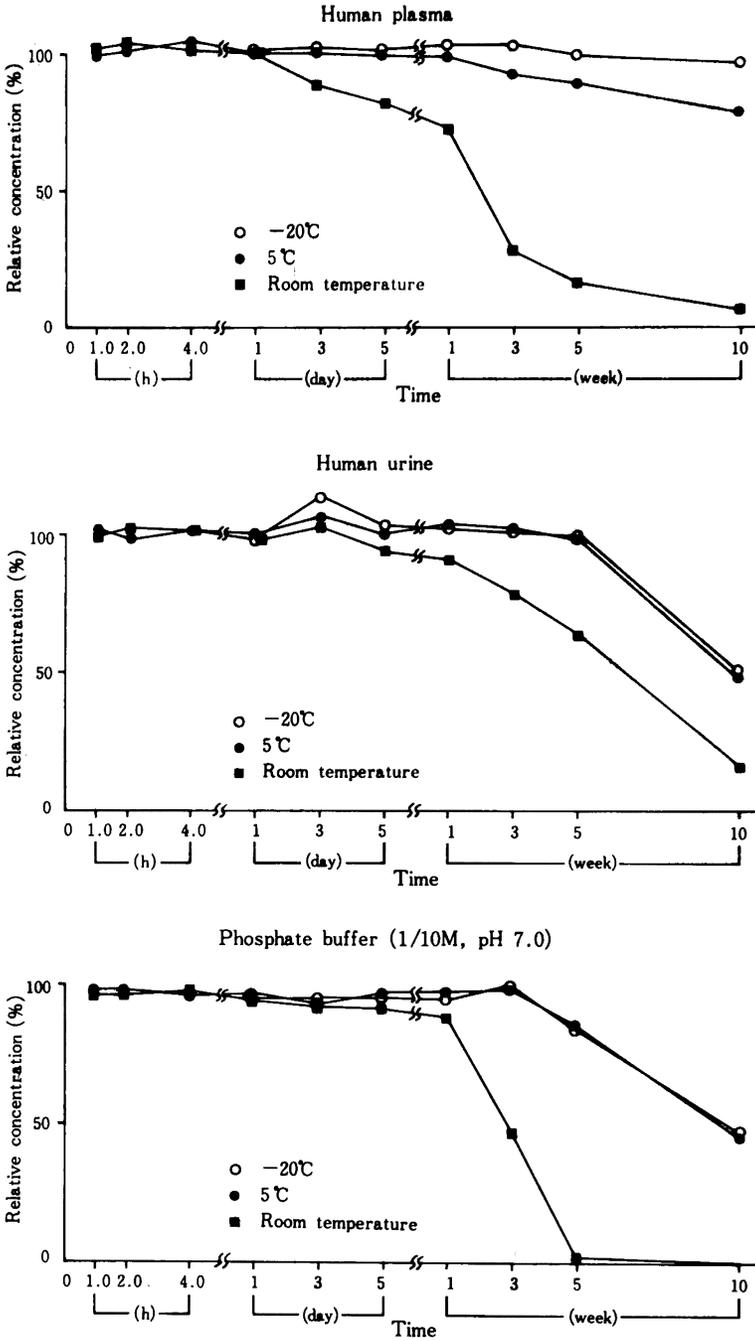


Fig. 14 Stability of THR-221 in human plasma, urine and phosphate buffer (1/10M, pH 7.0)



結果が得られ、糞ホモジネート液においては5℃および室温の保存条件下で24時間まで安定であった。

### Ⅲ. 結 論

以上の検討の結果から、微生物学的定量法によるTHR-221の生体内濃度測定法としては次の方法が適している。

#### 1. 検定菌

*E. coli* JCM 6255あるいは*K. pneumoniae* ATCC 10031が適している。

#### 2. 測定用培地

*E. coli* JCM 6255を用いるときにはNutrient agar (Difco)を、*K. pneumoniae* ATCC 10031を用いるときにはDST agar (Oxoid)を10 mlの薄層にして使用する。

#### 3. 接種菌液および接種菌量

両菌株ともTrypticase soy broth (TSB, BBL)に1ないし2白金耳接種し、18~20時間培養した菌液をTSBでT=20~22% ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ )に調製し、0.5~1%接種する。

#### 4. 測定方法

薄層カップ法、ディスク法のいずれでも測定可能である。

#### 5. 予備拡散

4℃にて2時間程度の予備拡散を行う。

#### 6. 検体の希釈

尿、胆汁試料の場合は0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で10倍以上に希釈し、血漿、血清試料についてはヒト血清またはヒト血漿を用いて希釈を行う。

#### 7. 検量線の作成

THR-221を滅菌蒸留水に溶解したものを尿、胆汁試料の場合には0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)にて調製した標準希釈溶液を、血漿、血清試料の場合にはヒト血清またはヒト血漿にて調製した標準希釈溶液を用いて検量線を作成する。

#### 8. 培養条件

37℃で18~20時間培養する。

#### 9. その他

本微生物学的測定法はHPLC法と高い相関関係を示す。また、THR-221は-20℃で保存すれば少なくとも3週間は安定である。

### 文 献

- 1) KAZUHIRO KASAI, AKIYOSHI TSUJI, SHUICHI MIYAZAKI, SACHIKO GOTO, KAZUMI FUJIMOTO, SHINJI MASUYOSHI and SUSUMU ARAI : *in vitro* antibacterial activity and  $\beta$ -lactamase stability of cefodizime, a new cephalosporin antibiotic. *Japan. J. Antibiotics* 37 : 1294~1305, 1984
- 2) KAZUHIRO KASAI, AKIYOSHI TSUJI, SHUICHI MIYAZAKI, SACHIKO GOTO, KAZUMI FUJIMOTO, SHINJI MASUYOSHI and SUSUMU ARAI : *in vivo* antibacterial activity of cefodizime, a new cephalosporin antibiotic. *Japan. J. Antibiotics* 37 : 1306~1312, 1984
- 3) 日本化学療法学会 MIC 測定法改訂委員会 : 最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について。 *Chemotherapy* 29 : 76~79, 1981
- 4) T. MARUNAKA, E. MATSUSHIMA and M. MANIWA : Determination of cefodizime in biological materials by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 420 : 329~339, 1987
- 5) 小宮正行, 菊地康博, 立花章男, 矢野邦一郎 : Cefotetan (YM 09330)の微生物学的定量法による体内濃度測定法。 *Chemotherapy* 30(S-1) : 98~105, 1982
- 6) 大島純子, 瀧井裕子, 鬼塚光子, 有沢幹雄, 丸山博巳 : Ceftriaxone (Ro 13-9904)の生体内濃度測定法。 *Chemotherapy* 32(S-7) : 170~177, 1984
- 7) 吉田昌彦, 松下 仁, 黒川恭子, 丸伝 章, 川口安郎 : Cefodizime (THR-221)の蛋白結合に関する研究。 *Chemotherapy* 投稿中

## BIOASSAY METHODS FOR CEFODIZIME CONCENTRATIONS IN BODY FLUIDS

KUMIKO SAKAWA, YOSHIYUKI MIYAKE, CHIEKO HANEHARA, TOSIHO OTANI,  
NAOBUMI ISHIDA, EUI MATSUSHIMA and TERUYOSHI MARUNAKA  
Biological Research Laboratory, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.

KOICHI DEGUCHI, SHIGEMI FUKAYAMA and YUKIKO NISHIMURA  
Research Department, Tokyo Clinical Research Center, Tokyo

We established microbiological assay methods for the quantitative determination of cefodizime (THR-221) in body fluids. Suitable assays were thin layer cup or disc-plate methods using *Escherichia coli* JCM 6255 as a test organism in nutrient agar medium. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 strain was also used in a cup-plate method with DST agar medium. For the quantitative determination of THR-221 in human plasma, pooled human plasma and human serum were suitable as diluent of the standard solution of THR-221. For the quantitative determination of the drug in human urine, bile, feces and other body fluids, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) was suitable as diluent of the standard solution. The determination limits, by the cup-plate methods using *E. coli* JCM 6255 and *K. pneumoniae* ATCC 10031, were 0.05 and 0.025  $\mu\text{g/ml}$ , respectively, when the standard solution was prepared with pooled human plasma. When the standard solution was prepared with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0), the determination limit was 0.025  $\mu\text{g/ml}$ . The concentrations of THR-221 determined by this bioassay method in plasma and urine samples obtained after intravenous administration of THR-221 to dogs agreed well with those measured by high performance liquid chromatography. THR-221 was stable in body fluids at  $-20^{\circ}\text{C}$  for at least three weeks.