

微生物学的定量法による 7432-S の 体液内濃度測定法に関する検討

木村靖雄・中野雅夫・中本省三・吉田 正
塩野義製薬株式会社研究所*

新規経口セフェム系抗生物質 7432-S の各種体液内濃度を測定するために微生物学的定量法について検討し標準法を設定した。

検定菌に *Escherichia coli* 7437 を、検定培地に Trypto-soy 寒天培地 (栄研) を使用する寒天拡散法によって感度良く測定できた。

7432-S 測定限界は、薄層カップ法と帯培養法で $0.04 \mu\text{g/ml}$ 、ペーパーディスク法と寒天孔平板法で $0.3 \mu\text{g/ml}$ であった。

血漿中濃度測定時の標準希釈系列は、対照ヒト血漿またはコンセーラ等の代用血清を用いることができる。

尿試料は、 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7) で 10 倍以上に希釈し、同緩衝液で調製した標準希釈系列を用いて測定する。

抗菌活性代謝物の検索は、TLC-バイオオートグラフィーにより行なった。この方法では微量代謝物の 7432-S-trans は分離出来ないので、HPLC による検索法が推奨される。7432-S-trans は原化合物の異性体で、抗菌力は約 $1/8$ 低いことと生成が微量であることから本方法による定量値に影響しなかった。

Key words : 7432-S, Body fluids, Bioassay

7432-S は、広範囲のグラム陰性菌および一部のグラム陽性菌に対して強い抗菌力を示した。7432-S の感受性菌に対する MIC 値は低く、多くの場合 $0.1 \sim 0.01 \mu\text{g/ml}$ の低濃度である¹⁾。生体試料の濃度測定は、活性濃度での体内動態を知る上からも MIC 近傍まで測定出来ることが望ましい。この目的に適う検定菌として、*E. coli* 7437 を選びヒト体液内濃度を測定するために各種測定法における至適条件について検討し、標準法を設定した。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

7432-S 標準物質 (塩酸塩, lot. No. 52, 力価 $877.3 \mu\text{g/mg}$) および 7432-S-trans (モノアンモニウム塩, lot. No. F002 力価 $792.5 \mu\text{g/mg}$) は塩野義製薬株式会社研究所で合成された。

2. 検定菌

Escherichia coli 7437, *E. coli* NIHJ JC-2, *Klebsiella pneumoniae* SR 1, *Serratia marcescens* ATCC13880, *Proteus mirabilis* PR 4 を使用した。何

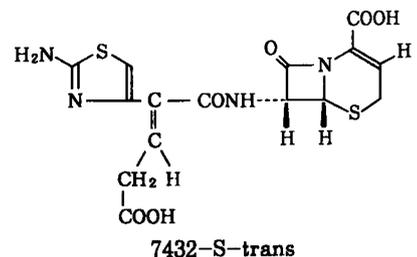
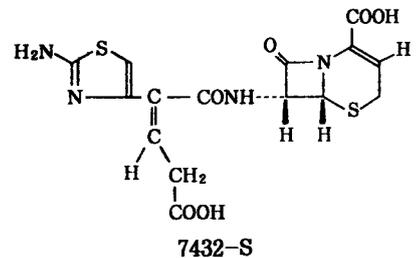


Fig. 1. Structural formula of 7432-S and 7432-S-trans.

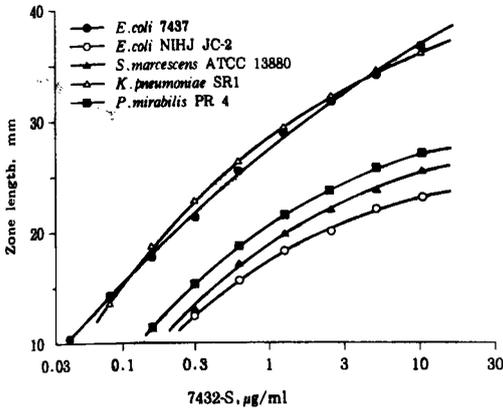


Fig. 2. Standard curves of 7432-S against different test organisms by band-culture method.
Medium: Trypto-soy agar
Diluent: 0.1M Phosphate buffer, pH 7

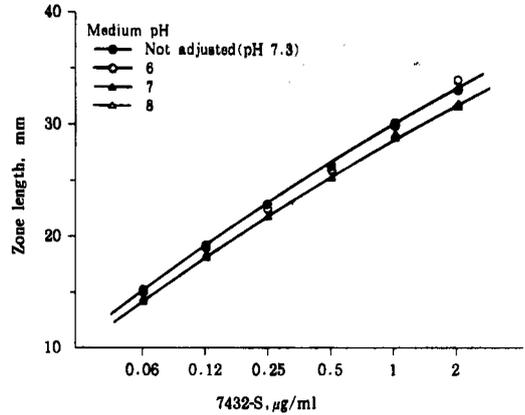


Fig. 4. Influence of medium-pH on band-culture method.
Organism: *Escherichia coli* 7437, 5×10 CFU/ml
Medium: Trypto-soy agar
Diluent: 0.1M Phosphate buffer, pH 7

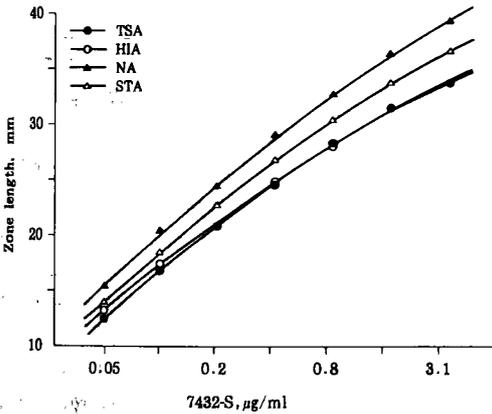


Fig. 3. Standard curves of 7432-S in different media by band-culture method.
Organism: *Escherichia coli* 7437, 5×10 CFU/ml
Diluent: 0.1M Phosphate buffer, pH 7

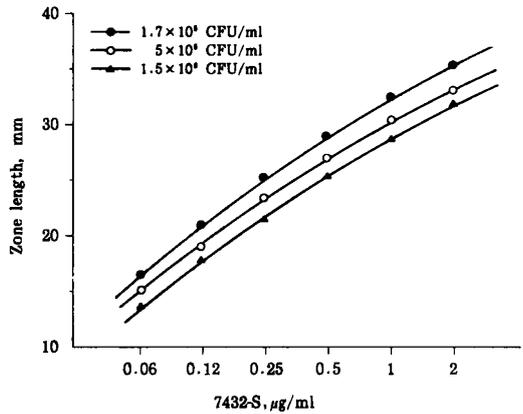


Fig. 5. Influence of inoculum size on band-culture method.
Organism: *Escherichia coli* 7437
Medium: Trypto-soy agar
Diluent: 0.1M Phosphate buffer pH 7

れの検定菌も, trypto-soy agar (TSA, 栄研) に 37℃一晩斜面培養し, 継代後 7 日以内の斜面の菌叢を生理食塩水に懸濁して $OD_{640} \approx 0.3$ の菌懸濁液を調製した。この菌懸濁液 (約 3×10^8 cfu/ml) から培地内に所定の最終菌量を調製した。

3. 検定用培地

TSA (栄研) 培地を処方どおり調製して使用した。ただし, 帯培養法 (Band-culture 法) については,

通常処方の 1/2 濃度に調製して用いた。培地検討には, nutrient agar (NA, 栄研), sensitive test agar (STA, ニッスイ), heart infusion agar (HIA, 栄研) を使用した。培地は滅菌後, 53℃の水浴中で恒温に保ち, 平板作製直前に検定菌を接種した。

4. 測定法

以下の 4 種の方法によって検定した。何れの方法も予備拡散はせずに, 培養温度は 37℃, 培養時間は 18~20

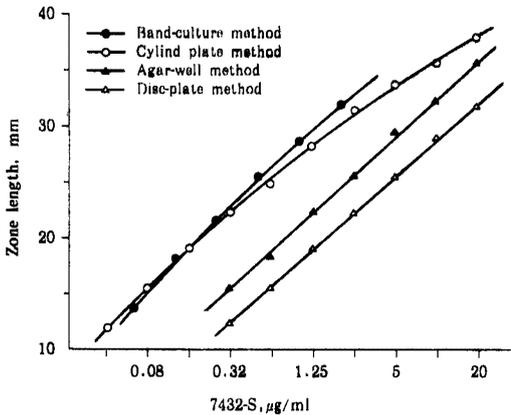


Fig. 6. Standard curves of 7432-S on different method.

Organism : *Escherichia coli* 7437, 1.5×10^8 CFU/ml

Medium : Trypto-soy agar

Diluent : 0.1 M Phosphate buffer, pH 7

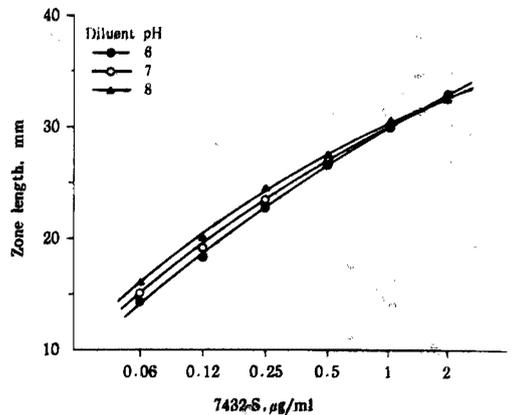


Fig. 7. Influence of diluent-pH on band-culture method.

Organism : *Escherichia coli* 7437, 5×10^8 CFU/ml

Medium : Trypto-soy agar

時間とした。

1) 薄層カップ方法 (Cylinder-plate method) 検定菌を接種した検定培地の 10 ml を自動分注器 (Jencon peristatic dispenser, 英国) で水平台上に直径 9 cm のペトリ皿 (滅菌, ニッスイ, P-シャーレ) に分注し, 寒天平板を作製する。カップ (Cylinder) は, 内径 6 mm, 外径 8 mm のステンレス製を使用した。

標準溶液または試験液は, 0.25~0.30 ml をカップ内に注入した。

2) ペーパーディスク法 (Disc-plate method) 標準溶液または試験液の 0.02 ml を, 定容ピペットで, ペーパーディスク (Whatman AA disc, 径 6 mm) に浸み込ませたのち前項と同様に作製した平板上に置いた。

3) 寒天孔平板法 (Agar-well method)

薄層カップ法に準じて作製した寒天平板に直径 6 mm の孔を作製した。すなわち, 先端に外径 6 mm の薄刃をつけたステンレス円筒シリンダーで平板上に孔を切り, 切りとられた寒天ディスク片を吸引して除去した。標準溶液または試験液の 0.02 ml を定容ピペットで寒天孔に注入した。

方法 1), 2), 3) については, 平板毎に等間隔 4 カ所に検液を配置して, 得られた阻止円径は 0.1 mm まで計測し平均値を求めた。

4) 帯培養法 (Band-culture method)

大久保²⁾等による方法に改良を加えた方法³⁾でおこなった。帯培養法検定板は, 強化ガラス板 (210×150×

7 mm) に巾 5 mm, 深さ 5 mm, 長さ 150 mm の溝 (Band) を等間隔に 20 列設けたものである。各溝には, 検定菌を接種した検定培地の 3 ml を定容分注器を使って分注し, 水平台上で固まらせた。寒天帯当たり 2 カ所に長さ 5 mm の寒天を切り, 吸引して寒天片を除去して寒天孔を作製した。この寒天孔に, 標準溶液または試験液の 0.05 ml を定容ピペットを使って注入した。溶液は, 各寒天列の 2 ケの孔に同一のものを配した。通常, 寒天列の No. 2~7 に標準希釈液を, No. 8~19 に試験液を配した。両端の No. 1 と No. 20 は検液を加えない。各寒天列に検液を注入した後, ガラス板をのせてポリプロピレン薄膜で封じて培養した。阻止像の長さは 0.1 mm まで計測し, 一列毎に平均した。

5. 検量曲線

阻止円の直径, あるいは阻止帯の長さを 0.1 mm まで正確に計測し, その平均値 (Y mm) を求めた。検量曲線は, 標準希釈系列の各濃度 (X μg/ml) の対数と対応する Y の関係を最小自乗法により, 二次式 $Y = a + b \log X + c (\log X)^2$ に近似させる方法⁴⁾で作製した。試験液から得られた実測値 (Y) をこの式に代入して濃度 (X) を求めた。

6. 標準溶液および希釈液の調製

7432-S 標準品を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7) に溶解して, 1000 μg (力価)/ml 溶液を調製した。

標準希釈系列は, 実験毎に同一緩衝液で希釈して 20~0.04 μg/ml (帯培養法については 2~0.06 μg/ml)

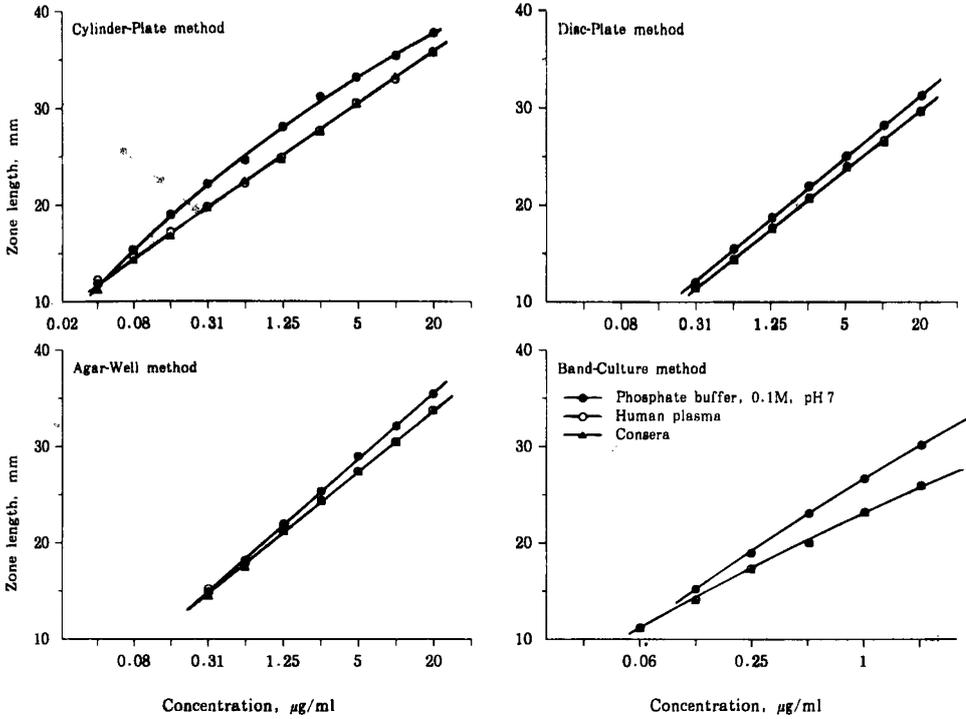


Fig. 8. Standard curves of 7432-S in human plasma.
Organism : *Escherichia coli* 7437
Medium : Trypto-soy agar

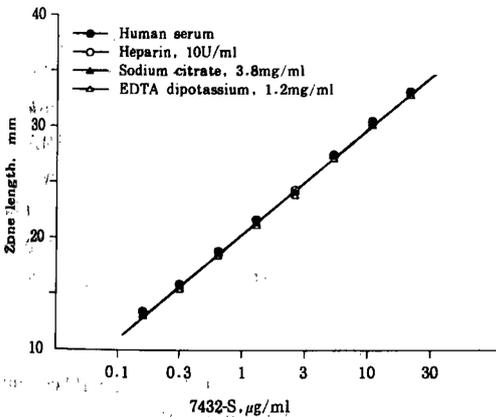


Fig. 9. Influence of anticoagulant on standard curves of 7432-S.
Method : Agar well method
Organism : *Escherichia coli* 7437, 1.5×10^8 CFU/ml
Medium : Trypto-soy agar

を調製した。各種の体液、またはその代用液を希釈液とするときは、まず同緩衝液で標準希釈系列を 50 倍濃度にしてから希釈液に 2% (V/V) 添加し最終濃度になるようにした。血清または血漿は、健康人から得たものをプールして用いた。コンセラ (Consera, 日水製薬) は、処方通りの調製して使用した。尿は健康人数名から集めプールしてもちいた。

7. TLC-Bioautography

薄層クロマトグラフィー (TLC) は 20×20 cm のセルローズプレート (Merck, Cellulose plate 0.1 mm) を 1 cm 巾に切断して用いた。下から 2 cm の位置に、標準溶液または試験体液の 0.003 ml をマイクロピペットでスポットして、室温で約 10 分間風乾した。展開溶媒に 50% n-プロパノールを用いた。室温で上昇法により、溶媒先端が原点から約 15 cm になるまで展開した。展開終了後、約 30 分間室温で風乾した。

検定菌、*E. coli* 7437 を接種した TSA 培地 150 ml を、バイオアッセイディッシュ ($243 \times 243 \times 18$ mm, 住友

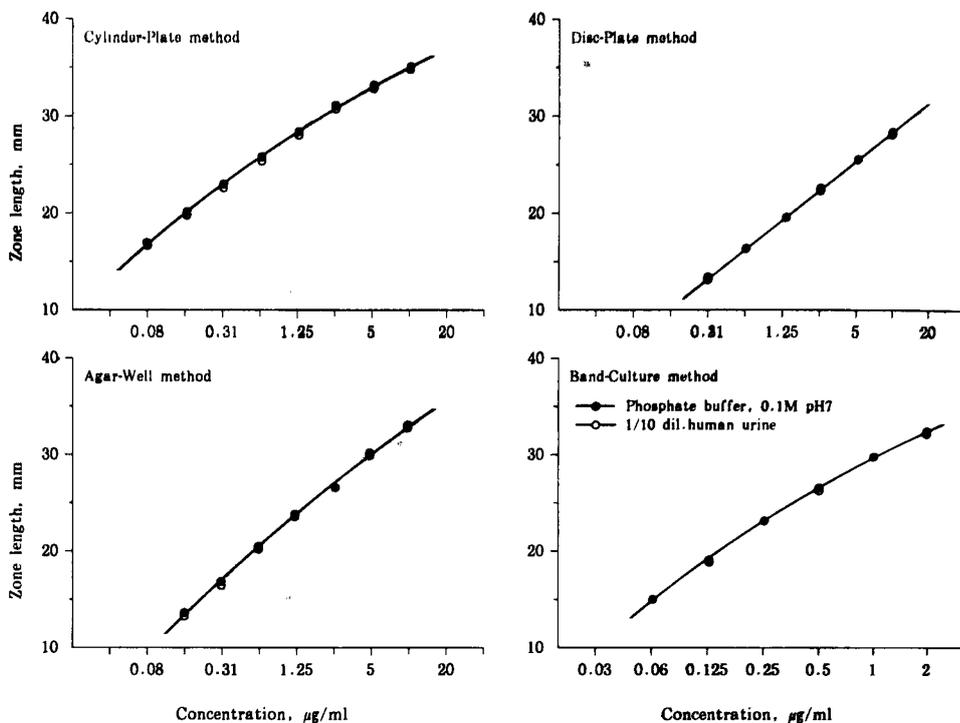


Fig. 10. Standard curves of 7432-S in human urine.

Organism : *Escherichia coli* 7437

Medium : Tryptol-*soy* agar

ベークライト)に分注して水平台上で固まらせ平板を作製した。この平板に、風乾したプレートに密着させ、約20分間室温で拡散させた後、プレートを取り除き37°Cで16~18時間培養しバイオオートグラムを作製した。

II. 実験結果

1. 測定条件に関する検討

1) 検定菌の選択

7432-Sが強い活性を示したグラ陰性菌の中から選んだ *E. coli* 7437, *E. coli* NIHJ JC-2, *S. marcescens* ATCC13880, *K. pneumoniae* SR 1, *P. mirabilis* PR 4の5菌株について7432-Sに対する測定感度を比較した。帯培養法で行なった結果をFig. 2にしめた。*E. coli* 7437は測定感度が最も優れ検量曲線の勾配も大きく直線性に優れていた。*K. pneumoniae* SRIは *E. coli* 7437とほぼ同等の感度を示したが、低濃度域での阻止像が不鮮明であった。他の3菌株での測定感度は、これら2菌株に比べて劣っていた。

以上の結果から、*E. coli* 7437を検定菌として選択し

た。

2) 検定培地の検討

4種類の検定培地について帯培養で比較検討した。Fig. 3にしめすように、最小測定域はいずれの培地においても変わらないが、阻止像の大きさはNAが最も大きく、次いでSTA, HIA, TSAの順となりHIAとTSAは同じ大きさの阻止像を与えた。NA, STAで得られる阻止像は、境界が不鮮明であり低濃度域で二重阻止像を示した。以上のことから、TSA培地が選択された。また、TSA培地のpHを変化させても測定感度は同等であったので処方通りとした(Fig. 4)。

3) 接種菌量の影響

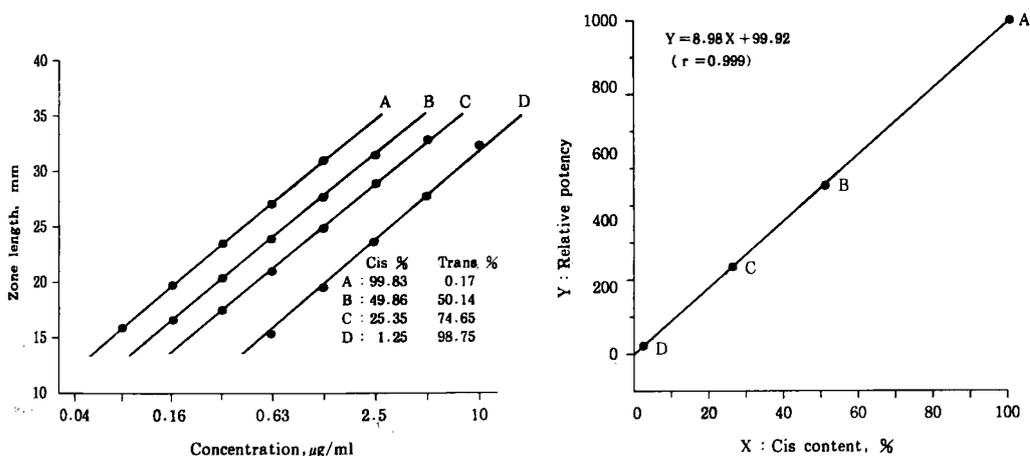
帯培養法で、菌量を 1.7×10^6 から 1.5×10^6 cfu/mlまで変えると、菌量の低下に応じて阻止帯長は増大した(Fig. 5)。しかしながら、菌量の低下とともにコロニーが疎になって阻止像の境界が不鮮明となるため、比較的測定の容易な $0.5 \sim 2 \times 10^6$ cfu/mlが適当である。

2. 測定方法

Fig. 6に4種の方法を用いた時のリン酸緩衝液(pH

Table 1. Agar dilution MIC against bacteria

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)*	
	7432-S	7432-S-trans
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203	0.2	1.56
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Type I	3.13	25
<i>Escherichia coli</i> EC-14	0.05	0.39
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SR 1	0.012	0.1
<i>Proteus mirabilis</i> PR-4	0.025	0.2
<i>Proteus vulgaris</i> CN-329	0.025	0.2
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	0.1	0.78
<i>Haemophilus influenzae</i> SR 3508	0.1	0.78

* Inoculum size, 10^6 CFU/ml

a) Diffusion curve of 7432-S formulations containing different cis/trans ratios.

b) Correlation between relative potency of 7432-S and cis content.

Fig. 11. Comparison of activities of cis and trans of 7432-S.

Test organism: *Escherichia coli* 7437

Assay method: Band-culture method

前記のとおり、

7) 希釈による検量曲線を比較した。測定感度は、カップ法と帯培養法で高く、寒天孔平板法とペーパーディスク法は低かった。各方法における測定感度は、0.04, 0.04, 0.3, 0.3 $\mu\text{g/ml}$ であった。いずれの方法とも広い濃度範囲で検量曲線を作成することができた。

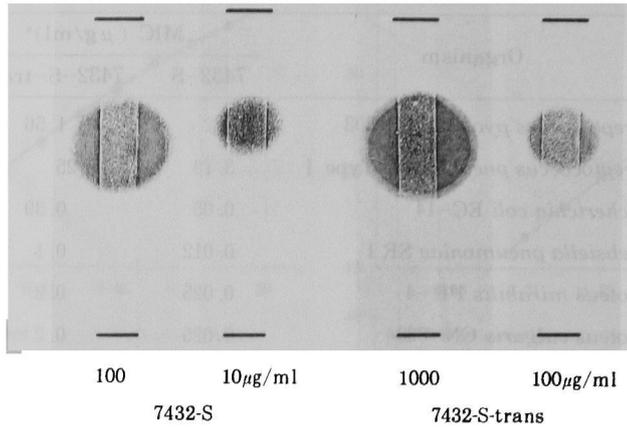
3) 検量曲線におよぼす希釈液、体液の影響

1) 緩衝液のpHの影響

帯培養液で、pH 6, 7, 8, のリン酸緩衝液希釈で作成した検量曲線を比較した (Fig. 7)。阻止帯長はpHが低い程小さい傾向であり、この傾向は低濃度域で顕著にあらわれた。

2) 血清の影響

a) Standard



b) Human urine (after oral administration of 7432-S, 200 mg)

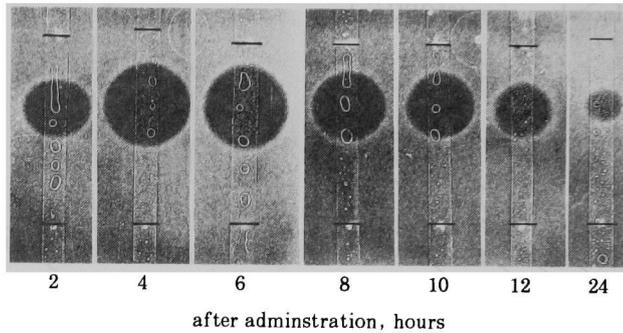


Fig. 12. TLC-Bioautograms of 7432-S.
 TLC plate : Cellulose F (Merck)
 Solvent : 50% n-Propanol
 Organism : *Escherichia coli* 7437

新鮮ヒトプール血清（または血漿）、コンセラを用いたときの検量曲線をリン酸緩衝液でのそれと比較した（Fig. 8）。ヒト血漿での検量曲線を、緩衝液でのそれと比較すると各測定方法ともに低濃度域では近似するが高濃度域で1～4 mm程度の差が認められた。コンセラを用いたときの検量曲線は、いずれの方法でも、ヒト血漿のそれと一致した。

血漿を調製するのに用いる血液抗凝固剤の検量曲線への影響を調べたが、検量曲線は無添加のそれと一致していた（Fig. 9）。

3) 尿の影響

ヒト尿をリン酸緩衝液で10倍に希釈したときの検量曲線を Fig. 10 に示した。いずれの方法においても10倍の希釈をすれば、尿による影響は無く緩衝液での検量

曲線と一致した。

4. 7432-S-trans の抗菌活性と 7432-S 測定への影響

北川等⁵⁾は HPLC 分析の結果から、ヒト尿中に trans 体（7432-S-trans）が約 10% 回収され血清中に 0.1～0.4 μg/ml（100 mg 投与時）検出されたと報告している。7432-S-trans の MIC 値は Table 1 に示すごとく、何れの感受性菌においても 7432-S に比べて 1/8 低い抗菌力をしめた。

7432-S 標準品と、7432-S-trans 標品とから trans 体含有率の異なる 4 種の 7432-S（Fig. 11-a）を用意して、帯培養法で検量曲線を比較すると、trans 含有比が大きくなるにしたがって阻止帯長は短くなった。7432-S 標品 A の活性を 1000 としたときの Fig. 11-a

記載の各 7432-S の比活性 (Y) を平行線検定で算出して、原体 7432-S (cis) の含有率 (X) との相関をみると、Fig. 11-b にしめしたような直線関係が見られ、 $Y=8.98X+99.9$ の回帰式が得られた。この関係式で、 $X=0$ (trans のみ) と $X=100$ (cis のみ) を代入して求められた Y の比率は 0.10 と計算されることから、trans 体の活性は cis 体の 1/10 であり MIC 値からみたと同程度の活性比をしめした。

5. 活性代謝物の検索

7432-S の 200 mg をヒトに経口投与したときの尿について、TLC-Bioautography を行ない活性代謝物を検索した (Fig. 12-b)。いずれの時間においても抗菌像は単一であり、7432-S 標品の Rf 値と一致した。Fig. 12-a にしめすように、7432-S-trans は 7432-S の 1/10 濃度の阻止像の大きさと同程度であり、また 7432-S と同一の Rf 値をしめし、この TLC による方法では両者を分離することは出来なかった。

6. 7432-S の体液内濃度測定法

以上の検討成績から最も普及しているとされる薄層寒天拡散法による標準測定法を次のように設定した。

1) 検定菌

検定菌には *E. coli* 7437 を用い、接種菌液を次のように調製する。

トリプトソイ寒天培養地または普通寒天培地に 37°C、1 夜斜面培養し、冷所保存する。継代培養は 2 ヶ月毎に行なう。使用に際して保存菌株から新鮮斜面をつくる。斜面より菌を液体培地に懸濁して、 $OD_{640}=0.3$ の菌液とし検定培地中に 0.3% 接種する。継代斜面は 7 日間接種菌液の調製に使用出来る。

2) 薄層寒天平板の作成

トリプトソン寒天培地 (栄研, pH 7.3) を処方通りに調製し、約 50°C に保ってから検定菌を接種し、プラスチックシャーレ (直径 9 cm) に 10 ml 注入して固まらせる。

各種の平板拡散法に従った方法が使用出来る。

3) 標準溶液の調製

7432-S 標準品を、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解して、1000 μg (力価)/ml の標準溶液を作る。この標準溶液は用時に調製し、冷所に保存 (0~5°C)、即日に使用する。

標準希釈系列は、緩衝液または、正常血清や代用血清 (コンセラ) で希釈して作成する。

4) 被験試料の調製

血清試料は希釈せずにそのまま測定に供しヒト代用血清で作成した検量線で測定する。

尿中濃度の測定には、尿試料を緩衝液で 10 倍以上に希釈して緩衝液で調製した検量線で測定する。

5) 試料の保存法

7432-S を含む試料は、採取後、すぐに氷冷水または冷蔵庫 (約 4°C) に保存する。翌日以降の測定に際しては、約 -70°C の超低温に凍結保存する。この条件では約 2 ヶ月まで安定である。凍結保存温度が高い場合においては、7432-S-trans の生成が認められるので、-20°C 付近で保存することはさける。

(*ドライアイス) を細かく碎き、小塊を少量ずつエチルアルコール中に加え、約 -70°C 浴をつくる。試料をその中に入れ凍結させるのが良い。

6) 培養条件および判定

37°C、18~20 時間培養後、阻止円の直径を測定する通常の検量線法によって濃度を計算する。

III. 考 察

7432-S は、広範囲のグラム陰性菌および一部のグラム陽性菌に対して強い抗菌力を示す。7432-S の感受性菌に対する MIC 値は、0.1~0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲に分布しているため、MIC 近傍まで測定出来るように、各種の検討を行ない、ヒト体液中濃度測定のための標準的な方法を設定した。

検定菌については、グラム陰性菌 4 菌種 5 菌株について比較検討したところ、*E. coli* 7437 で最も優れた測定感度がえられ、検量線の勾配、直線性においても最も優れていた。*K. pneumoniae* SR1 でも、*E. coli* 7437 と同程度の感度を得るが、検量線が直線性に欠けることに加えて、低濃度域での阻止像の周辺が不鮮明であるために阻止像計測時に誤差が生じやすいと考えられる。

検定培地については、数種の培地について比較検討した。いずれも同程度の感度で、TSA 培地で最も鮮明な阻止像がえられた。NA 培地、STA 培地で得られる阻止像は、TSA 培地よりもやや大きい。阻止像の境界が不鮮明で、低濃度域で二重阻止像を形成した。この現象は、阻止像計測時に誤差を生む一因になると考えられるので、7432-S の検定培地には不適当である。

血清中濃度の測定は、正常血清中に調製した標準希釈系列を用いるのが最も望ましい。しかしながら、市販の代用血清 (コントロール血清) であるコンセラ中に調製した標準希釈系列での検量線が、正常血清中に調製した標準希釈系列での検量線と一致することから正常血清の代わりにコンセラ等の代用血清中に調製しても差し支えない。ただし、代用血清は、メーカーの製造 lot によっては抗菌物質を含有し、阻止像をしめすものもあるので、

使用前に阻止像が検出されないことをチェックする必要がある。

尿中濃度の測定は、尿試料を 0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) で 10 倍以上の希釈をすれば、尿による影響は消失し、同緩衝液中に調製した検量線で測定出来る。尿中濃度は、MIC 値を大きく上回るため原液で測定することはないので 10 倍以上の希釈は差し支えないと考えられる。

この条件での 7432-S の測定感度は、薄層カップ法と帯培養法で $0.04 \mu\text{g/ml}$ 、ペーパーディスク法と寒天孔平板法で $0.3 \mu\text{g/ml}$ で、ほぼ MIC 値近傍まで測定が可能である。

7432-S は、その一部が生体内で代謝を受け 7432-S-trans に変化する。trans 体の抗菌力は、感受性菌に対する MIC でみると、7432-S の 1/8 である。また、検定菌 *E. coli* 7437 に対する検量線で比較すると、その活性比は、MIC 比と同程度の 1/10 であった。trans 体の抗菌活性が 7432-S に比べて低いこと、また、生体内での生成が僅かであることから trans 体の混在による 7432-S 体液内濃度測定値への影響はほとんどないと考えられる。

TLC-Bioautography における尿および血清の抗菌像は単一であり 7432-S 標品の Rf 値と一致した。しかしながら、7432-S とその trans 体は、この TLC による方法では両者を分離出来ない。前述のごとく、7432-S-trans の抗菌活性が 7432-S の 1/10 であることから、

生体内で、10%の trans 体が生成しても阻止像は原体、7432-S の 1/100 濃度と同等になると考えられるので Bioautogram 上に検出されない。

文 献

- 1) 永田 弘, 他: 新規経口セフェム系抗生物質 7432-S の *in vitro* 抗菌作用. *Chemotherapy* 37 (S-1): 701~722, 1989
- 2) 大久保 滉, 岡本文子: 体液組織液中の抗生物質濃度の生物学的微量測定—とくに帯培養法 Band culture Method について—. *日本臨床* 31: 441~447, 1973
- 3) 木村 靖雄, 土肥正善, 吉田 正: 抗生剤の微量—帯培養法の応用—. *Chemotherapy* 25: 449~450, 1977
- 4) 木村 靖雄, 吉田 正: 6050-S の微生物学的定量法における体液内濃度測定法に関する検討. *Chemotherapy* 28 (S-7): 178~188, 1980
- 5) 中島 光好, 他: 新規経口セフェム系抗生物質 7432-S の臨床第 1 相試験. *Chemotherapy* 37 (S-1): 78~109, 1989
- 6) 松浦 昭男, 永山 貴子, 北川 隆康: 高速液体クロマトグラフィーによる cephem 系抗生物質 7432-S およびその代謝物 7432-S-trans のヒト体液内濃度測定法. *Chemotherapy* 37 (S-1) 748~755, 1989

MICROBIOLOGICAL ASSAY METHODS FOR 7432-S CONCENTRATIONS IN BODY FLUIDS

YASUO KIMURA, MASAO NAKANO, SHOUZOU NAKAMOTO
and TADASHI YOSHIDA
Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co. Ltd.
5-12-4, Sagisu, Fukushima-ku, Osaka 553, Japan

We established microbiological assay methods for measuring concentrations of 7432-S in body fluids. The concentrations of 7432-S in serum and urine specimens were determined by cylinderplate, agar-well, disc-plate and band-culture methods using *Escherichia coli* 7437 as a test organism. When the organism was inoculated with 2×10^8 CFU/ml of tryptose agar, the detectable levels of 7432-S were as low as 0.04, 0.3, 0.3 and 0.04 $\mu\text{g/ml}$ respectively, by the abovementioned assay methods. The antibiotic concentrations ($\mu\text{g/ml}$) in logarithm were plotted against the inhibition zone size (mm) for a calibration curve. To determine 7432-S levels in human plasma, sera were employed for diluents of the standard solutions in place of pooled human serum. When the urine specimens were diluted more than 10 times, the standard solution was prepared with 0.1 M phosphate buffer. Since bioautography by cellulose thin-layer chromatography was unable to detect any active metabolite except 7432-S itself in human urine, high performance liquid chromatography is recommended for this purpose. By this method, a trace amount of 7432-S-trans was detected in addition to 7432-S in the urine and plasma samples.

This trans-isomer was eight times less active than 7432-S against a variety of bacteria. Hence this trace metabolite had virtually no influence on the antibacterial activity in body fluids obtained from human subjects given 7432-S.