

新規エステル型経口セフェム剤, S-1108 の微生物学的定量法による 体液内濃度測定法の検討

中野雅夫・木村靖雄・渡辺芳浩・吉田 正
塩野義製薬株式会社研究所*

新規エステル型経口セフェム剤, S-1108 の微生物学的定量法による体液内濃度測定法について検討した。

S-1108 の体液中濃度は活性体である S-1006 として測定し, 検定菌に *Escherichia coli* 7437, 検定培地に trypto-soy agar (栄研) を使用する寒天平板拡散法によって感度よく測定できる。

S-1006 の帯培養法, 薄層カップ法, 寒天孔平板法およびペーパーディスク法における最少測定可能濃度は, それぞれ 0.01, 0.08, 0.16, 0.16 $\mu\text{g/ml}$ であった。

ヒト血清(血漿)中濃度測定には, ヒトプール血清の代わりにコンセラで調製した標準希釈系列が使用できる。

尿試料は, 0.1M 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溶液を用いる。

帯培養法で求めたヒト血中濃度および尿中濃度は, HPLC 法の結果と良く一致した。血漿および尿中の S-1006 は, -20°C 以下に凍結保存すれば少なくとも 28 日間は安定であった。

key words : S-1108, bioassay, body fluids

S-1108 は塩野義製薬(株)研究所で開発されたエステル型経口用セフェム剤で, 幅広い抗菌スペクトルと強い抗菌力を有している薬剤である¹⁾。S-1108 は経口投与により消化管から吸収されたのち, 酵素的に加水分解を受けて活性体である S-1006 となり体内に移行する²⁾。今回, 著者らは, S-1006 の bioassay 法による体液内濃度測定法について検討し, 標準法を設定するとともに, 体液中における安定性についても検討を加えたのでその成績を報告する。

I. 実験材料と方法

1. 使用薬剤

S-1108 (lot 56, 708, 2 μg 力価/mg) および S-1006 (lot P-79-49, 889, 7 μg 力価/mg) は当社で合成されたものを使用した。

2. 検定菌

Escherichia coli 7437, *E. coli* NIHJ JC-2, *Klebsiella pneumoniae* SR1, *Proteus mirabilis* PR-4, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, および *Staphylococcus aureus* 209 P JC-1 を用いた。

B. subtilis を除き検定菌は, trypto-soy agar (TSA, 栄研) に 37°C 一夜培養した斜面を生理食塩水に懸濁して $A_{640} \approx 0.3$ の菌懸濁液を調製した。*B. subtilis* は日抗基・力価試験法³⁾ に準じて孢子液を調製した。これらの懸濁液 (3×10^8 CFU/ml) を適量接種して, 所定の最終菌量を得た。

3. 検定培地

市販の TSA, nutrient agar (NA, 日水), heart infusion agar (HIA, 日水), sensitivity test agar (STA, 日水) および antibiotic medium No. 2 (AM-2, Difco) を使用した。ただし, 帯培養法については通常処方⁴⁾の1/2濃度に調製して使用した。培地は滅菌後, 50°C 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. 濃度測定法

次に述べる方法を用いて検討した。いずれの方法においても予備拡散は行わず, 培養は 37°C で18~20時間行った。

1) 帯培養法 (band-culture method)

大久保⁴⁾等による方法に改良を加えた方法⁵⁾で行っ

*〒553 大阪市福島区鷺州 5-12-4

た。帯培養検定板は、プラスチック成型品（大きさ：214×155×8 mm，溝：150×5×5 mm，総溝数：20）を使用し，各溝に検定培地の3 mlを自動定容分注器（perimatic dispenser, Jencons, 英国）を使って分注し，水平に固まらせた。各寒天帯の両端から4 cmのところを，5×5 mmの大きさに寒天を切り，吸引により寒天片を除去して寒天孔を設けた。この寒天孔に定容ピペットを使用して，標準溶液および検液の0.05 mlを注入した。各寒天帯の2ヶ所の孔には同一の溶液を配した。通常，寒天帯のNo. 2～7に標準溶液を，No. 8～19に検液を配した。両端のNo. 1およびNo. 20は使用しない。操作終了後，専用の蓋（プラスチック製）を被せ，市販のラップフィルムで密封したのち培養した。

2) 寒天孔平板法 (agar-well method)

検定菌を接種した培地の20 mlを，定容分注器を使用して，角2号シャーレ（栄研）に分注し水平に固まらせた。外径6 mmの円筒型薄刃を使用して平板上に孔を切り，1)と同様にして寒天孔を作った。標準溶液および検液の分注は，定容ピペット（0.02 ml）を用いて行った。

3) 薄層カップ法 (cylinder-plate method)

2)で述べた寒天平板に，内径6 mm，外径8 mmのステンレス製カップ (cylinder) を置き，標準溶液および検液の0.2 mlを注入した。

4) ペーパーディスク法 (disc plate-method)

2)と同様にして作製した寒天平板に，ディスク (Whatman AA disc, 径6 mm) をのせ定容ピペットを用いて，標準溶液および検液の0.02 mlを浸み込ませた。

5. 検量線

阻止円の直径または阻止帯の長さを，0.1 mmまで正確に計測して，その平均値 (Ymm) 求めた。検量線は，標準希釈系列の各濃度 ($X \mu\text{g/ml}$) の対数とYの関係をも最小二乗法により，二次式 $Y = a + b \log X + c (\log X)^2$ に近似させる方法⁹⁾ で作製した。検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

S-1006 標準品を0.1Mリン酸緩衝液 (pH7) で溶解し，1000 μg (力価)/mlの溶液を調製した。この溶液を，各緩衝液，体液およびその希釈液で希釈して，実験の目的に応じた標準希釈系列を調製した。ヒト血清は，健康人から得たものをプールして使用した。コンセラ (日水製薬) は，処方どおりに調製して

使用した。尿は，健康人数名から採尿しプールして使用した。

7. TLC-bioautography

薄層クロマトグラフィー (TLC) は20×20 cmのシリカゲルプレート (60 F₂₅₄, 0.25 mm, Merck) を1 cm巾に切断して用いた。下端から2 cmのところを，標準溶液および検液の0.01 mlをマイクロピペットでスポット後，室温で約10分間風乾した。展開溶媒には，n-butanol : ethanol : water = 4 : 1 : 5 (Top layer) を用いた。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。

E. coli 7437 を 2×10^8 CFU/ml, esterase (Sigma) を10 U/mlとなるように添加したTSAの150 mlを tissue culture plate (245×245×20 mm, Nunc) に分注して水平に固まらせた。この平板に，上記TLCプレートを貼り付け，20分間室温で拡散後プレートを取り除き，37°Cで18～20時間培養してバイオオートグラムとした。

8. Method validation

S-1006 をヒト血清に溶解し，0.03, 0.1, 0.3, 1 および 3 $\mu\text{g/ml}$ の既知濃度溶液に調製した。これをコンセラ調製の標準溶液を使用した帯培養法で測定し linearity, reproducibility および accuracy について調べた。また，S-1006 をヒト尿に添加して，1, 10, 100 および 1000 $\mu\text{g/ml}$ の既知濃度溶液を作り，0.1Mリン酸緩衝液 (pH7) 調製の標準溶液で測定して同様の検討を行った。

9. 各種体液におけるS-1006の安定性

S-1006 を0.1Mリン酸緩衝液 (pH7)，ヒト血漿およびヒト尿に加え，-80°C，-20°C，0°C (氷冷下)，25°C および 37°C における S-1006 の残存濃度を bioassay で測定した。試験濃度は，ヒト尿で 100 $\mu\text{g/ml}$ ，その他は 10 $\mu\text{g/ml}$ とした。

II. 実験結果

1. 測定条件の検討

1) 検定菌の選択

S-1006 が強い抗菌活性を示した6菌株，*E. coli* 7437, *E. coli* NIHJ JC-2, *K. pneumoniae* SR 1, *P. mirabilis* PR-4, *B. subtilis* ATCC6633 および *S. aureus* 209P JC-1 を選び，TSA 上で帯培養法による検量線を比較した (Fig. 1)。

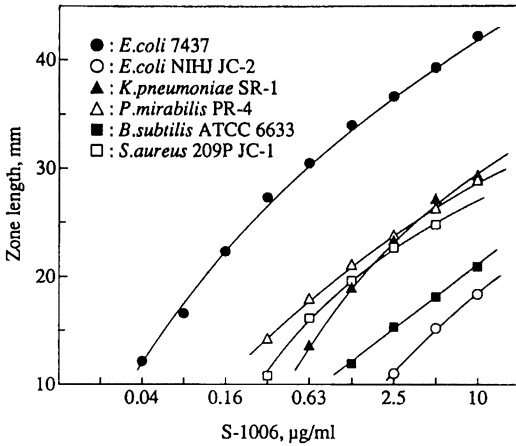
ここで検討した6菌株のうち，*E. coli* 7437 が検出感度，阻止帯長の鮮明度および勾配の点で優れてお

り、検定菌として選定した。

2) 検定培地の検討

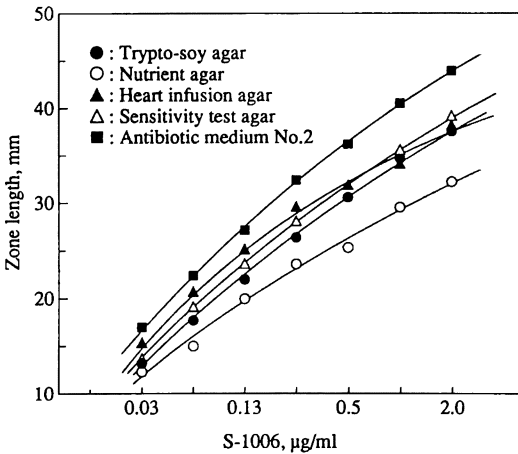
5種類の検定培地について帯培養法によるS-1006の検量線を比較した。

Fig. 2に示すように、阻止帯長の大きさは、AM-2 > HIA > TSA ≈ STA > NAの順となった。比較的感度勾配ともに良好で、最も鮮明な阻止帯長を示した



Medium : Trypto-soy agar
Diluent : 0.1M Phosphate buffer, pH7

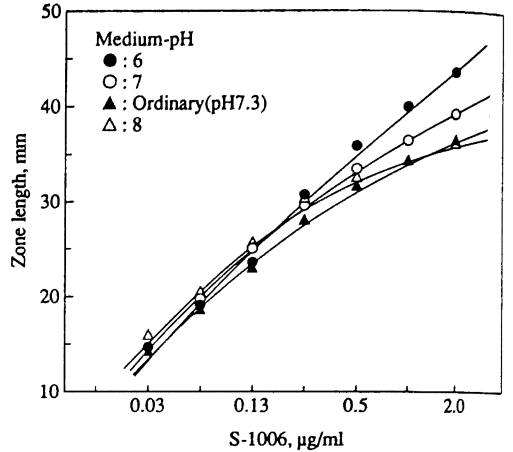
Fig. 1. Standard curves of S-1006 against different test organisms by the band-culture method.



Organism : *E. coli* 7437, 2×10^6 CFU/ml
Diluent : 0.1M Phosphate buffer, pH7

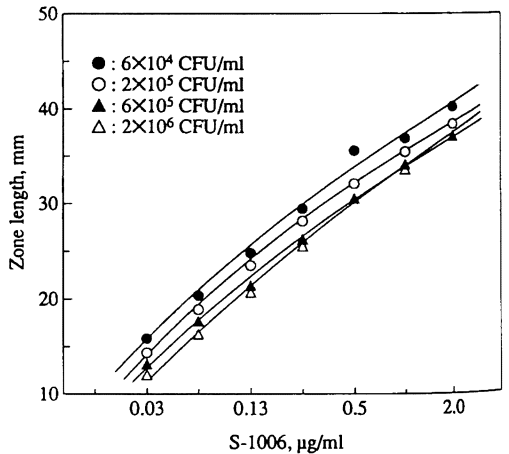
Fig. 2. Standard curves of S-1006 in different assay media by the band-culture method.

TSAを検定培地とした。また、TSAのpHを変化させた時のS-1006の検量線を比較すると、S-1006の高濃度域において、pHが低いほど阻止帯長は大きくなるが測定感度に差はなかった。検定培地のpHは無修正(pH7.3)とした(Fig.3)。



Organism : *E. coli* 7437, 2×10^6 CFU/ml
Medium : Trypto-soy agar
Diluent : 0.1M Phosphate buffer, pH7

Fig. 3. Influence of medium-pH on the standard curve of S-1006 by the band-culture method.



Organism : *E. coli* 7437
Medium : Trypto-soy agar
Diluent : 0.1M Phosphate buffer, pH7

Fig. 4. Influence of inoculum size on the standard curve of S-1006 by the band-culture method.

3) 接種菌量の影響

TSAに *E. coli* 7437 を、 $6 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ CFU/ml の4段階に添加し、帯培養法で接種菌量の影響を調べた (Fig. 4)。

菌量の低下に伴い測定感度は上昇するが、阻止帯長の境界は不明瞭となった。 $6 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ CFU/ml 接種のとき鮮明な阻止帯長が得られた。

2. 測定方法

前項に述べた結果から設定された基礎条件により、4種の測定法を用いた時の0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7) 希釈によるS-1006の検量線を比較した (Fig. 5)。

帯培養法における最少測定可能濃度は、 $0.01 \mu\text{g/ml}$ を示し最も感度に優れていた。他の測定法における検出感度は、薄層カップ法で $0.08 \mu\text{g/ml}$ 、寒天孔平板法およびペーパーディスク法では $0.16 \mu\text{g/ml}$ であった。

3. 検量線におよぼす希釈液の影響

1) 緩衝液 pH の影響

pH 6.0, 7.0 および 8.0 の0.1Mリン酸緩衝液で標準溶液を作製し、帯培養法で希釈液 pH の影響を調べた。

Fig. 6 に示すようにS-1006の低濃度域において、緩衝液のpHが高いほど阻止帯長は大きくなったが、pH 8.0における阻止帯長の境界は、pH 6.0 および 7.0 に比べ不明瞭であった。

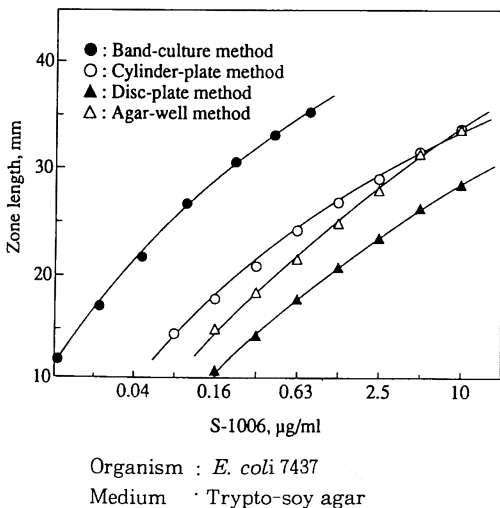


Fig. 5. Standard curves of S-1006 by different assay methods.

2) 血清の影響

ヒトプール血清およびコンセラを用いて検量線を作り、0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7) で作製した検量線と比較した (Fig. 7)。

4種の測定法において血清と緩衝液調製の検量線は、一致しなかった。コンセラを用いたときの検量線は、いずれの方法においても、ヒト血清の検量線と一致した。ヒト血清検量線における最少測定可能濃度は、帯培養法： $0.01 \mu\text{g/ml}$ 、薄層カップ法： $0.04 \mu\text{g/ml}$ 、寒天孔平板法： $0.08 \mu\text{g/ml}$ 、ペーパーディスク法： $0.16 \mu\text{g/ml}$ であった。血漿を得るときに用いる血液抗凝固剤の検量線に及ぼす影響を調べた。それぞれ図に示した濃度で血清に加えた場合、いずれも血清の検量線と一致した (Fig. 8)。

3) 尿の影響

ヒト原尿と0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7) で10倍希釈した時の検量線を Fig. 9 に示す。

原尿および緩衝液の検量線は、寒天孔平板法を除き近似するもの一致しなかった。10倍希釈液および緩衝液の検量線は、いずれの測定法に於いてもほぼ一致した。

4. 活性代謝物の検索

S-1108を健康人に経口投与 (S-1006, 200 mg 力価) した時の尿と血漿試料について、TLC-bioautographyを行い活性代謝物を検索した (Fig. 10 A, B)。いずれの試料においても、S-1006 標品と同じ Rf

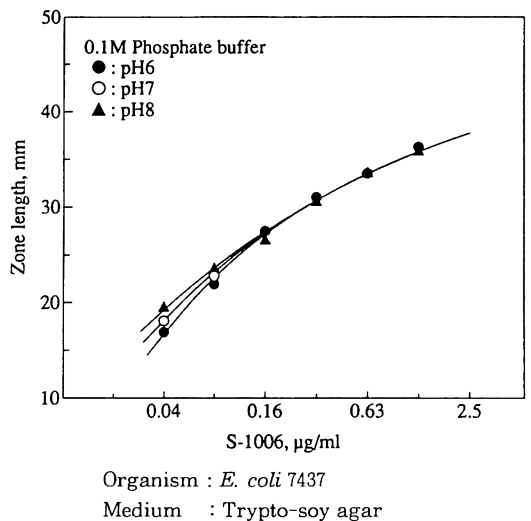


Fig. 6. Influence of diluent-pH on the standard curve of S-1006 by the band-culture method.

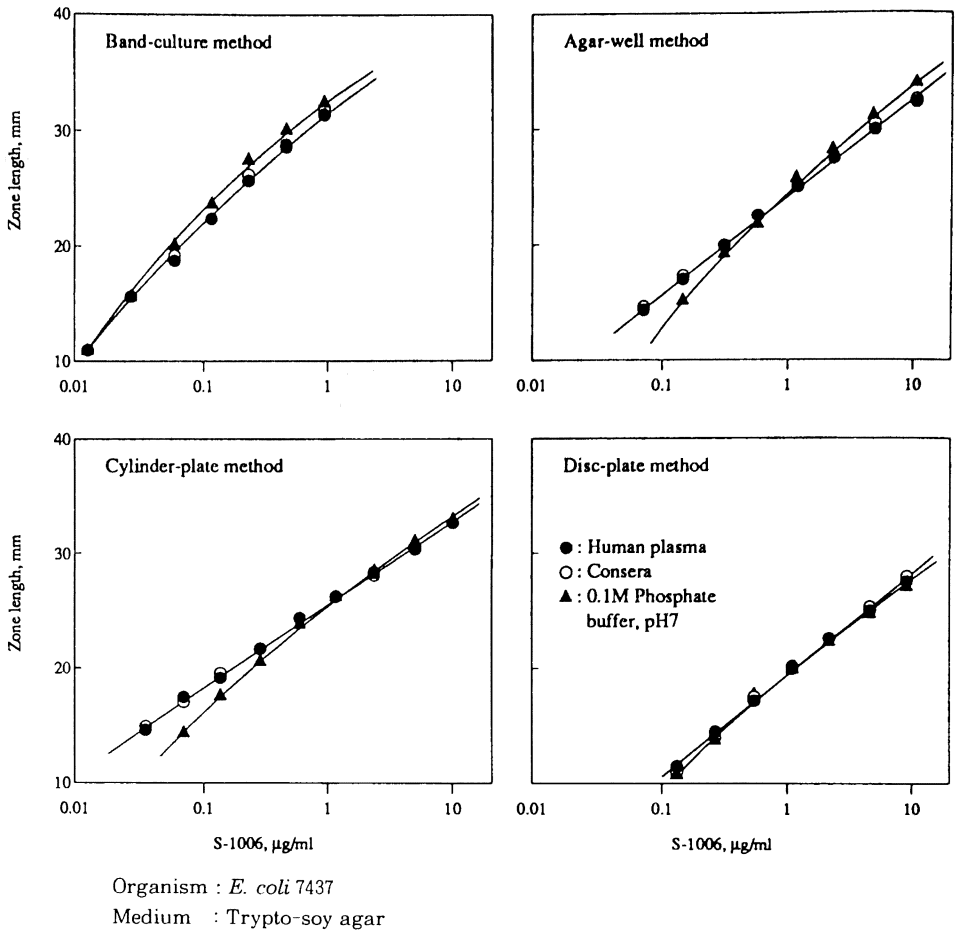


Fig. 7. Standard curves of S-1006 in human plasma by different assay methods.

値を示す単一の抗菌像が得られ、他の活性スポットは認められなかった。

5. Method validation

ヒト血漿および尿で調製した S-1006 の既知濃度溶液を、帯培養法で 5 回繰り返し測定した結果を Table 1 に示す。

S-1006 の設定血中濃度範囲 0.03~3.0 µg/ml における実測値の偏り (% Bias) は 0~16.7%、尿中濃度は 1.0~1000 µg/ml の設定で同様に、0.4~14.4% の範囲内であった。この時の、検量線は Table 2 に示した。コンセラおよび緩衝液調製の検量線は、それぞれよく近似したパラメータを示した。この時の偏りは 0~6.3% を示し、変動係数 (% CV) も 5% 以内であった。

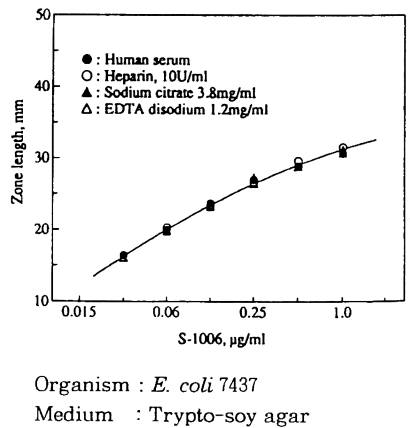


Fig. 8. Influence of anticoagulants on the standard curve of S-1006 by the band-culture method.

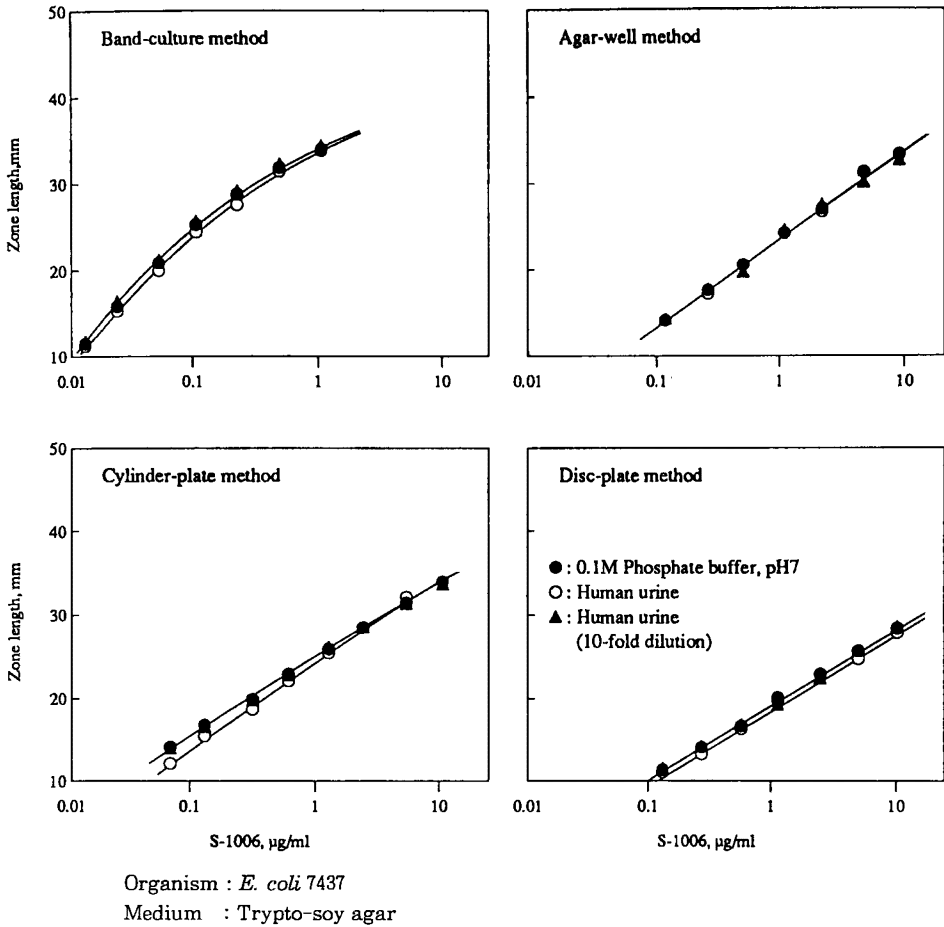


Fig. 9. Standard curves of S-1006 in human urine by different assay methods.

6. 体液中安定性

S-1006 のヒト血漿および尿中保存条件下での安定性を Table 3 に示す。

37°C に 6 時間放置後の S-1006 残存力価は、血漿で 71%、尿で 87% と比較的不安定であったが、25°C 以下の保存であれば、6 時間後でも安定に保たれた。S-1006 は、これらの体液およびリン酸緩衝液中において、-20°C 以下に保存すれば少なくとも 28 日間は安定であった。

7. HPLC 測定値との相関

S-1006 濃度は、bioassay 法の他に HPLC 法⁷⁾ で測定できる。第一相臨床試験⁸⁾ より得られた血漿および尿試料を、帯培養法と HPLC 法で同時に測定し、両者の測定値における相関性について検討した。

Fig.11 に示すように、血漿および尿試料について

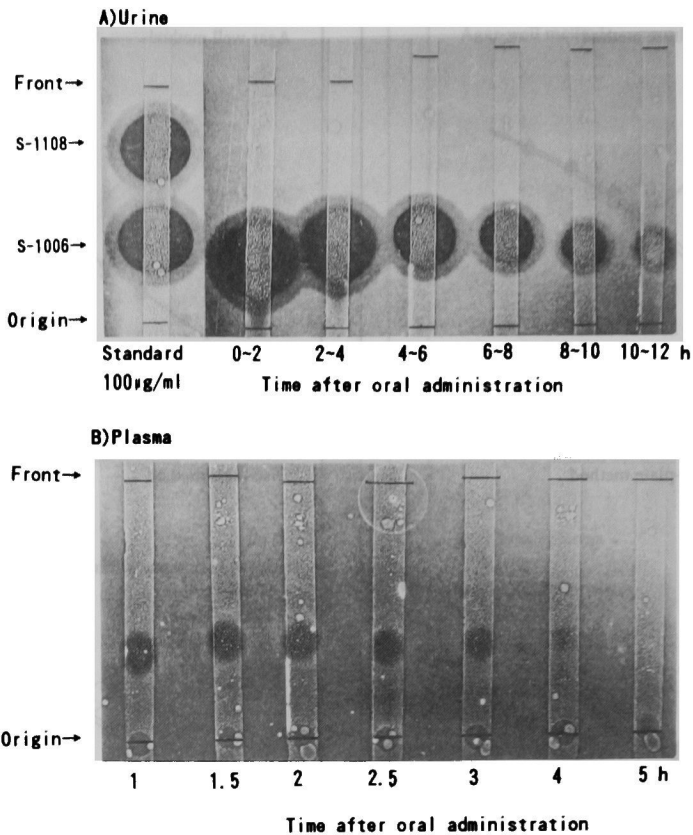
両方法間に良好な相関性が得られた。

III. 考 察

S-1006 の寒天平板拡散法による微生物学的定量法を Table 4 に示した。検定菌として *E. coli* 7437 を用い、検定培地は TSA を使用する。

帯培養法、寒天孔平板法、薄層カップ法およびペーパーディスク法のいずれの測定法においても良好な検量線が得られ、測定感度は帯培養法が最も高く、次いで薄層カップ法、寒天孔平板法、ペーパーディスク法の順となった。

ヒト血中濃度測定における標準希釈系列の調製は、ヒトプール血清の代わりにコンセラを使用しても差し支えない。ただし、コンセラは、製造ロットによっては抗菌活性を有するものもあるため、事前の検査が必



TLC plate : Silica gel 60 F₂₅₄

Solvent : n-Butanol/Ethanol/Water (4 : 1 : 5)

Test organism : *E. coli* 7437

Assay plate : Trypto-soy agar contained 10U/ml of Esterase

Dose : 200mg

Fig.10. TLC-Bioautograms of urine and plasma after oral administration of S-1108 to volunteers.

要である。尿中濃度の測定は、尿試料を 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) で 10倍以上の希釈を行えば、尿成分による検量線への影響は消去され、同緩衝液中に調製した検量線で測定できる。

TLC-bioautography における尿および血漿は単一の抗菌像を示した。これらの抗菌像は S-1006 標品の Rf 値と一致し、他の活性代謝物は認められなかった。このことは、bioassay 法と HPLC の両測定法における、良好な相関性においても証明された。

S-1006 の体液中における安定性を各保存条件下で検討した。血漿および尿中の S-1006 は室温 (25°C) でも比較的安定であるが、これらの試料は採取後、氷

冷下または冷蔵庫 (4°C) 内に保存することが望ましい。測定が翌日以降になる時は、-20°C以下の冷蔵庫内に保存する。この条件下で 28 日間安定に保存出来る。

(試験期間 : 1988年 3月~1991年10月)

文 献

- 1) 小松良英, 永田 弘, 元川清司, 亀田康雄, 野村和秀, 東山伊佐夫, 土肥正善, 吉田 正: 新規エステル型経口セフェム剤, S-1108 の *in vitro* 抗菌作用. *Chemotherapy* 41 (S-1): 77~93, 1993

Table 1. Reproducibility of S-1006 determinations in human plasma and urine by the band-culture method

1) Plasma specimens									
Actual concn ($\mu\text{g/ml}$)	Plasma dilution	Analyzed concentration, $\mu\text{g/ml}$					Mean \pm SD	% Bias	% CV
		Plate 1	2	3	4	5			
3.0	10^{-1}	3.03	2.97	3.07	2.84	3.34	3.05 ± 0.18	1.67	6.03
1.0	10^{-1}	0.95	0.95	0.92	0.97	0.97	0.95 ± 0.02	4.80	2.15
0.3	1	0.25	0.25	0.24	0.24	0.27	0.25 ± 0.01	16.7	4.90
0.1	1	0.09	0.09	0.08	0.09	0.09	0.09 ± 0.00	12.0	0.00
0.03	1	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03 ± 0.00	0.00	0.00
2) Urine specimens									
Actual concn ($\mu\text{g/ml}$)	Urine dilution	Analyzed concentration, $\mu\text{g/ml}$					Mean \pm SD	% Bias	% CV
		Plate 6	7	8	9	10			
1000	10^{-4}	1070	1070	1080	1020	1050	1060 ± 23.9	6.00	2.25
100	10^{-3}	100	112	98.0	98.0	101	102 ± 5.85	2.00	5.73
10	3×10^{-2}	11.1	11.4	10.8	9.90	10.5	10.7 ± 0.58	7.40	5.37
	10^{-2}	10.5	10.6	9.80	10.2	10.4	10.3 ± 0.32	3.00	3.07
	3×10^{-1}	11.4	11.0	11.2	10.9	12.7	11.4 ± 0.73	14.40	6.38
1	10^{-1}	0.98	1.00	1.03	1.01	1.00	1.00 ± 0.02	0.40	1.81

Standard concentration : 0.5~0.016 $\mu\text{g/ml}$ Diluent : 1) Consera, 2) 0.1M phosphate buffer, pH7

Table 2. Regression equation of S-1006 standard curves by the band-culture method

1) Consera										
Plate No.	Standard concentrations, $\mu\text{g/ml}$						Regression equation $Y = a + b \log X + c(\log X)^2$			
	0.50	0.25	0.125	0.063	0.032	0.016	a	b	c	RSD
1	0.511	0.241	0.127	0.062	0.032	0.016	33.57	7.40	-2.45	0.13
2	0.501	0.251	0.124	0.063	0.032	0.014	33.37	7.77	-2.09	0.05
3	0.520	0.237	0.124	0.064	0.032	0.015	33.72	7.48	-2.40	0.21
4	0.513	0.242	0.124	0.063	0.032	0.015	33.17	7.30	-2.42	0.14
5	0.483	0.265	0.124	0.061	0.032	0.015	32.19	5.47	-3.13	0.19
Mean	0.506	0.247	0.125	0.063	0.032	0.015				
\pm SD	0.014	0.011	0.001	0.001	0.000	0.001				
% Bias	1.12	1.12	0.32	0.64	0.00	6.25				
% CV	2.84	4.53	1.08	1.82	0.00	4.71				
2) 0.1M phosphate buffer, pH7										
Plate No.	Standard concentrations, $\mu\text{g/ml}$						Regression equation $Y = a + b \log X + c(\log X)^2$			
	0.50	0.25	0.125	0.063	0.032	0.016	a	b	c	RSD
6	0.488	0.265	0.120	0.062	0.032	0.015	35.34	9.10	-2.09	0.27
7	0.494	0.256	0.123	0.063	0.029	0.016	34.64	7.98	-2.64	0.10
8	0.503	0.249	0.125	0.061	0.032	0.015	35.15	9.62	-2.07	0.13
9	0.507	0.246	0.125	0.062	0.032	0.015	34.81	8.25	-2.42	0.10
10	0.500	0.252	0.123	0.062	0.032	0.015	34.32	7.90	-2.63	0.10
Mean	0.498	0.254	0.123	0.062	0.031	0.015				
\pm SD	0.008	0.007	0.002	0.001	0.001	0.000				
% Bias	0.32	1.44	1.44	1.59	1.89	5.00				
% CV	1.51	2.91	1.66	1.14	4.27	2.94				

Table 3. Stability of S-1006 in human plasma and urine under various conditions

1) Short-term

Specimen	S-1006 ($\mu\text{g/ml}$)	Temp ($^{\circ}\text{C}$)	Remaining activity, %				
			0	1	2	4	6 h
Plasma	10	37	100	95	90	78	71
		25	100	96	96	96	98
		0	100	95	102	98	96
Urine	100	37	100	102	97	87	87
		25	100	105	103	98	98
		0	100	91	95	95	95

2) Long-term

Specimen	S-1006 ($\mu\text{g/ml}$)	Temp ($^{\circ}\text{C}$)	Remaining activity, %			
			0	7	14	28 day
Plasma	10	-20	100	94	100	102
		-80	100	103	89	97
Urine	100	-20	100	98	106	110
		-80	100	106	115	105
0.1M phosphate buffer, pH7	10	-20	100	95	100	97
		-80	100	97	107	103

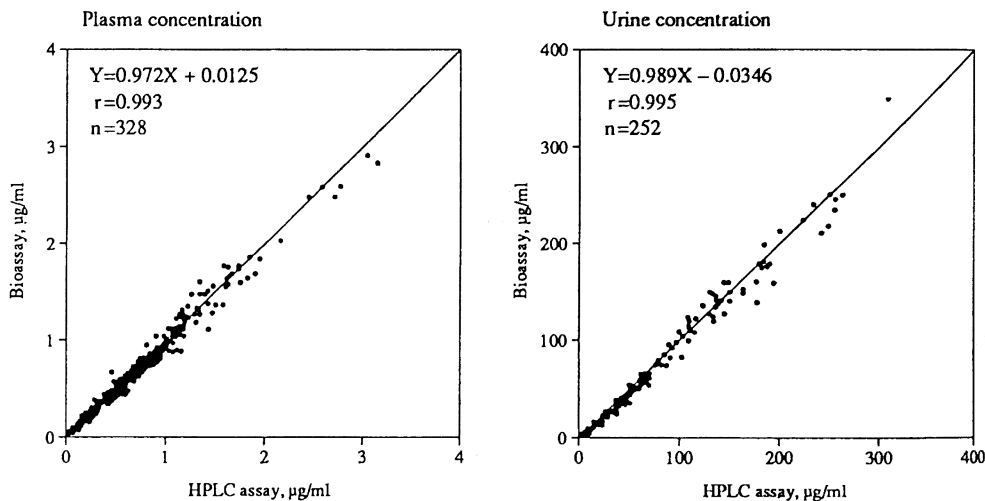


Fig.11. Correlation between S-1006 concentrations obtained by bioassay and HPLC.

- 2) 木村靖雄, 中野雅夫, 中清水弘, 中本省三, 渡辺芳浩, 大坪 龍, 松原尚志, 佐藤誠二, 奈良 博, 吉田 正: 新規エステル型経口セフェム剤, S-1108 の実験動物における体内動態に関する検討. Chemotherapy 41 (S-1): 163~176, 1993
- 3) 厚生省: 日本抗生物質医薬品基準・一般試験法・力価試験法 628~633, 1982
- 4) 大久保 澁, 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
- 5) 木村靖雄, 土肥正善, 吉田 正: 抗生剤の微量定量 - 帯培養法の応用 -. Chemotherapy

Table 4. Standarization of bioassay of S-1006 in biological specimens

Test organism	<i>E. coli</i> 7437	
Inoculum	0.3% of cell suspension, $A_{640}=0.3$ (3×10^8 CFU/ml)	
Medium	trypto-soy agar(Eiken)	
Specimen	plasma	urine*
Standard solution	fresh plasma or consera	0.1M phosphate buffer (pH7.0)
Minimal detectable concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
Band-culture method	0.01	0.01
Agar-well method	0.08	0.16
Cylinder-plate method	0.04	0.08
Disc-plate method	0.16	0.16
Incubation	37°C, 18~20 h	

*The urine specimen is diluted more than 10-fold with phosphate buffer.

25: 449~450, 1977

- 6) 木村靖雄, 吉田 正: 6059-S の微生物学的定量法における体液内濃度測定に関する検討。Chemotherapy 28 (S-7): 178~188, 1980
- 7) 小西雅治, 吾郷友行, 西村理恵子: 高速液体クロマトグラフィーによる S-1006 および関連化合物のヒト血漿中および尿中濃度測定法。Chemotherapy 41 (S-1): 154~162, 1993
- 8) 中島光好, 植松俊彦, 尾熊隆嘉, 吉田 正, 木村靖雄, 小西雅治, 松野 敏, 山本貞雄: 新規エステル型経口セフェム剤, S-1108 の第 I 相臨床試験。Chemotherapy 41 (S-1): 109~125, 1993

Microbiological assay method for S-1108, a new oral cephem antibiotic, in body fluids

Masao Nakano, Yasuo Kimura, Yoshihiro Watanabe and Tadashi Yoshida
Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.
5-12-4, Sagisu, Fukushima-ku, Osaka 553, Japan

Microbiological assay methods were investigated for quantitative determination of S-1108 in body fluids.

S-1108 concentration in body fluids was determined as the concentration of S-1006, the bioactive form of S-1108. The concentrations of S-1006 were assayed by the band-culture, cylinder-plate, agar-well and disc-plate methods using *E. coli* 7437 as the assay organism and trypto-soy agar (Eiken) as the assay medium. The minimal detectable concentrations for these bioassay methods were 0.01, 0.08, 0.16 and 0.16 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

To determine S-1006 levels in human plasma, consera were employed as diluents of the standard solutions instead of pooled human serum. When the urine specimens were diluted more than 10-fold, the standard solution was prepared with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0).

The concentrations of S-1006 in human plasma and urine obtained by the band-culture assay method were in good agreement with those obtained by HPLC analysis.

S-1006 in body fluids was stable at -20°C for at least 28 days.