ジフテリア毒素の生体に及ぼす影響

第1報 ジフテリア毒素の生体侵襲時における2, 3の酵素系の動態

上 林 久 雄

大阪学芸大学衛生学研究室 (指導, 榊原栄一博士)

〔受付: 8月22日・1957年〕

緒 言

ジフテリア毒素(以下D毒素と略称)が感受性宿主に対して微量で著しい毒性を発揮することは、ジフテリア症の毒素症状として周知の事実であるが、その作用機作に関しては今日なお明かにされていない。古くより実験的ジフテリア症において、皮膚壊死、副腎出血、心筋変性、肺肝の出血及び変性、漿膜よりの滲出等が認められていたが¹⁾、これらの変化がいかなる作用機作によって発現するものであるか今日なお不明な点が多い。しかしながら、D毒素が微量で宿主に激的な作用を呈することは、何等かの経路によって感受性宿主の代謝系乃至は組織細胞の酵素系と関連性のあることが予想された。

Cross and Holmes²⁾ はジフテリア中毒家兎において乳酸やグルコースの注射による肝臓グリコーゲン量の減少又は消失を認め、Dawson and Holmes³⁾ はジフテリア中毒動物の肝内グリコーゲン合成能の低下現象を観察すると共に、肝臓の病理組織学的変化の発現に伴い糖代謝異常を来すことを明かにした。このような代謝過程における物質代謝異常解明への努力と共に、一方D毒素の作用機作を酵素阻害の立場より追及せんとする試みが行われた。すなわち、Peter and Cunningham⁴⁾ は種々の呼吸、解糖、並びに若干の脱水素酵素に対するD毒素の作用を検討したが、*in vitro* の実験では明かな阻害効果を認めずとし、又 Pinchot and Bloom⁵⁾ は実験的ジフテリア中毒動物の筋肉内磷酸クレアチン量の減少を観察し、このことは組織の酸素利用の変調によるのか、或いは磷酸結合と酸化反応とのカップリングにおける障害ではなからうかと述べ、更に最近、岡本⁶⁾ はジフテリア毒素感作動物の各種臓器においては組織呼吸の低下していることを報告している。近時 Pappenheimer^{7, 8)} 一派はこのようなD毒素の生体作用機作についてD毒素産生と培地中の鉄量及び産生ホルフィリン量の定量的観察の結果、D毒素は菌の鉄ホルフィリン呼吸酵素の蛋白部分に

あたるのであらうと考え、おそらくこの蛋白はジフテリア菌の Cytochrom b であらうと推定し⁹⁾、従つてD毒素の毒作用も感受性動物の組織細胞における Cytochrom b 又はこれに関連した酵素合成過程において阻害的に働くために起るのであらうとの仮説を提唱した。その後 Pappenheimer 等¹⁰⁾ は昆虫変態過を応用してD毒素の Cytochrom 系酵素への作用を検討して上述の仮説を再確認したが、一方 Lepow¹¹⁾ はD毒素と鉄ホルフィリンとの間には分光化学的に特異的な結合を認めないと述べている。

上述したように、D毒素の生体への作用機作は極めて複雑であつて未だ決定的な知見が得られないようである。著者はD毒素の生体障碍の第一段階として糖代謝に関連性のある終末呼吸系 T. C. A. サイクルの酵素系や、これと共転してアミノ酸合成に重要なアミノ基転位酵素(Transaminase)に対するD毒素の影響を検討して若干の成績を得たので以下報告する。

実験方法

1. 実験に用いたジフテリア毒素

(1) 供試菌株

大阪医科大学山中教授より分与された *Corynebacterium diphtheriae* P. W. No. 8 Tront Harvard 株を型の如く Loeffler 培地に継代培養し、実験前に常に新しく移植して使用した。

(2) 毒素産生培地

D毒素産生培地は古来色々で使用されているが、本実験には主として Taylor¹²⁾ の豚胃消化培地、10%ペプト

KANBAYASHI Hisao: The influences of diphtheria toxin on the living organism. Report 1 The movements of some enzyme systems on the diphtheria toxin invasion. The Hygienic Laboratory of the the Osaka University of the Liberal Arts and Education. —Jap. J. of Bact., 12 (12) 873-878, 1957.

ン水に水飴及び Mueller II. III. を夫々 Mueller の方法で添加した堀氏等の培地¹³⁾、又半合成培地である尾崎氏改良の P. L. O. 培地等¹⁴⁾を使用した。これらの培地はいづれも Mueller の方法により $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , 及び CaCl_2 で除鉄し、ほぼ毒素産生至適鉄量とし、200ml の D 型コルベン又は 500ml の Fernbach のコルベンに入れ、pH8.0 に調整使用した。なお鉄量の測定は $\alpha\alpha'$ -Dipyridyl による比色法¹⁵⁾を Colman 型分光光電比色計を用いて行つた。

(3) 培養条件

Loeffler 培地で継代した P. W. 菌 1 白金耳を液体培地に接種し、48 時間培養後その菌膜一白金耳を毒素産生用培地液面に接種、34~35°C で 7 日間静置培養し、ジフテリア菌純培養であることを確認した後、型の通り濾紙にて菌体を取り去りその濾液を粗毒素液とした。

2. 毒素価の測定

標準抗毒素血清を用いて充分習熟した手技により Flocculation Test を行い、Lf 価を測定した。又 M. L. D. は体重 250gr 前後の健康雄海狗を用いて型の通り測定し、又均一系 NA 2 雄マウスを使用して LD_{50} を算出した。

3. 毒素精製法

細谷宮田氏法による硫酸飽和法¹⁶⁾を応用して可及的に精製純化した。

4. T. C. A. サイクルの酸化酵素作用の測定

均一系 NA 2 雄マウスの肝 10% homogenate を粗酵素材料とし、コハク酸、フマル酸、焦性ブドウ酸、クエン酸の各 Na 塩の 10^{-1}M 溶液 (pH 7.0) を基質として Warburg Manometry により酸素吸収量 (QO_2) を算出し各々の酵素活性度を測定した。その反応系は第一表に示す通りである。

第 1 表 T.C.A. サイクル酸化酵素反応系

主室	粗酵素材料 (10% ホモジネート)	0.5ml
	M/15 磷酸緩衝液 (pH, 7.2)	0.5ml
	基質 (各 M/10 Na 塩溶液)	0.5ml
側室	蒸溜水又は D 毒素液 (pH 7.0 の醋酸緩衝液) 溶解	0.5ml
副室	20% 苛性カリ溶液	0.3ml
全量		2.3ml

註: 温度 37.5°C
振盪回数 120/分
温度平衡時間 15 分

5. アミノ基転位酵素作用の測定

アミノ基転位酵素の内、アスパラギン酸- α ケトグル

タル酸 Transaminase 作用を Awapora¹⁷⁾ の方法や Feldmann and Gunsalus¹⁸⁾ が大腸菌を用いて行つた方法を応用して測定した。すなわち、均一系 NA 2 雄マウスの肝 homogenate を粗酵素として、 20^{-1}M アスパラギン酸、 20^{-1}M α -ケトグルタル酸と共に反応させ、反応後生成したグルタミン酸を 80% フェノールを溶媒とする一次元ペーパークロマトグラフにより展開検出し、更に Nafton 氏法¹⁹⁾によりニンヒドリン顯色グルタミン酸の spot を 70% アセトンで浸出抽出し、この液を分光光電光度計の 630m μ で比色定量して生成グルタミン酸量より酸素活性を検討した。

第 2 表 アスパラギン酸- α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ反応系

粗酵素材料 (10% ホモジネート)	0.5ml
蒸溜水又は毒素液 (pH 7.0 醋酸緩衝液溶解)	0.1ml
M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.4)	0.3ml
<hr/>	
37.0°C 30分 反振盪反応後	
下記を添加	
M/20 アスパラギン酸 (Na 塩溶液)	0.5ml
M/20 α -ケトグルタル酸 (Na 塩溶液)	0.5ml
M/10 磷酸緩衝液 (pH 8.0)	0.1ml
<hr/>	
全量	2.0ml

37.0°C 1 時間振盪反応
↓
エタノールで反応停止
↓
上清を遠心分離により分ける
↓
この 0.01ml をペーパー・クロマトに展開
↓
グルタミン酸の検出
↓
Nafton 法による比色定量

実験成績

1. 供試毒素

上述した培養条件及び精製法で得られた D 毒素の内、M. L. D. = $2 \times 10^{-4}\text{ml}$, Lf = 78/ml, Kf = 8, 体重 20gr 前後の均一系 NA 2 雄マウスに対する LD_{50} は $1.8 \times 10^{-3}\text{ml}$ であつた。尚、この毒素は精製最終段階において pH 7.0 醋酸緩衝液で D 毒素蛋白を溶解して使用した。

2. T. C. A. サイクルの酸化酵素系に及ぼす D 毒素の影響

第 1 表に示した反応系にて、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、焦性ブドウ酸各酸化酵素の活性度を D 毒素添加群と非添加群に分け、Warburg Manometry により時間的

に観察したところ, 第3表, 第4表のような結果を得た。

第3表 コハク酸, フマル酸酸化酵素に及ぼすD毒素の影響

第4表 リンゴ酸, 焦性ブドウ酸酸化酵素に及ぼすD毒素の影響

この表で明かなように, $Lf=78/ml$ の精製D毒素を *in vitro* で添加するも, 各酸化酵素に対する阻害は左程大きいとは思われず, 又第5表のように QO_2 を算出して比較検討したところ, T. C. A. サイクルのコハク酸, フマル酸, リンゴ酸, 焦性ブドウ酸各酸化酵素に対するD毒素の阻害率は *in vitro* で略々18%以下であることが認められた。

第5表 T.C.A. サイクル各酸化酵素に対するD毒素の阻害率

基 質	実 験 群	QO_2 (μl)	阻 害 率
コ ハ ク 酸	対 照	5.10	17.1
	D毒素添加	4.23	
フ マ ル 酸	対 照	4.51	7.1
	D毒素添加	4.29	
リ ン ゴ 酸	対 照	5.58	14.6
	D毒素添加	4.77	
焦性ブドウ酸	対 照	2.36	9.8
	D毒素添加	2.13	

次に均一系 NA2雄マウス (体重20gr 前後) の尾静脈よりD毒素の LD_{50} の $1/3$ 量を注射し, *in vivo* においてD毒素がこれらの酸化酵素に如何なる影響を与えるかを検討した。すなわち, マウスにD毒素注射後, 3時

間, 6時間, 9時間, 12時間, 18時間, 21時間, 24時間経過させ, 各々の時間毎にマウスを断頭斃死させ, その各々の肝臓の10%homogenate をコハク酸酸化酵素, 焦性ブドウ酸酸化酵素の粗酵素材料として Warburg Manometry により酸素吸収量を測定してその活性度を比較検討したところ, 第6表, 第7表に示すように, D毒素注射後18時間を境としてコハク酸, 焦性ブドウ酸両酸化酵素共にその活性度の著しい低下を認めた。

第6表 D毒素注射マウス肝のコハク酸酸化酵素活性の変化

	QO_2 (μl)
正常マウス肝 (対照)	5.08
正常マウス肝 + $1/3 LD_{50}$ 量D毒素	4.14
$1/3 LD_{50}$ 量D毒素注射3時間後のマウス肝	4.02
〃 6時間	3.99
〃 9時間	3.70
〃 12時間	3.63
〃 18時間	2.12
〃 21時間	2.01
〃 24時間	1.87

第7表 D毒素注射マウス肝の焦性ブドウ酸酸化酵素活性の変化

	QO_2 (μl)
正常マウス肝 (対照)	2.41
正常マウス肝 + $1/3 LD_{50}$ 量D毒素	2.07
$1/3 LD_{50}$ 量D毒素注射3時間後のマウス肝	2.02
〃 6時間	2.00
〃 9時間	1.97
〃 12時間	1.95
〃 18時間	1.00
〃 21時間	0.87
〃 24時間	0.73

以上の成績より, T. C. A. サイクルの酸化酵素に対してD毒素は *in vitro* には著明な阻害現象を示さないが, *in vivo* において一定の潜伏期の後に顕著な酵素阻害を示すことが明かにされた。

3. アスパルギン酸- α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼに及ぼすD毒素の影響。

T. C. A. サイクルに関連しては, 主体アミノ酸合成に重要な役割を演ずるトランスアミナーゼに及ぼすD毒素の影響を検討するためにアスパルギン酸- α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼに対するD毒素の態度を実験した。第2表に示した反応系により最終遠沈上

清0.01ml を正確にとり ペーパークロマトグラフィーで展開してグルタミン酸の検出を行い、トランスアミナーゼの活性を観察した。

**第8表 アスパラギン酸- α -ケトグルタル酸
トランスアミナーゼに及ぼすD毒素の影響**
(ペーパー・クロマトグラフィーによる生成
グルタミン酸及びアスパラギン酸の検出)

		グルタミン 酸 (Rf= 0.173)	アスパラギ ン酸 (Rf= 0.142)
対 照	基質のみ	—	+
	酵素 (10%肝ホモジネート)	—	—
	対照 (D毒素添加せず)	+	—
反応系に $1/3$ LD ₅₀ 量D毒素添加		+	—
$1/3$ LD ₅₀ 量D毒素注射 3時間後		+	—
" 6時間後		+	—
" 9時間 "		+	—
" 15時間 "		±	+
" 18時間 "		±	+
" 21時間 "		±	+
" 24時間 "		±	+

註：+はニンヒドリン顯色の著明なもの
±はニンヒドリン顯色不鮮明なもの
—はニンヒドリンで顯色しないもの

第8表に示したように反応系に毒素液を添加するも対照と同じくグルタミン酸のみが検出され、本酵素系を *in vitro* で阻害していないように思われた。更に $1/3$ LD₅₀量のD毒素を均一系 NA 2 雄マウスに注射して各時間毎のマウス肝を酵素材料としてトランスアミナーゼの活性を調べると、前述の酸化酵素へのD毒素の影響を *in vivo* で認めたように、注射後15乃至18時間後にはグルタミン酸を明瞭に検出し得ず、アスパラギン酸のみ検出された。これによつて始めてD毒素が本酵素に阻害的に作用していることが認められる。

この事を一層確めるため Nafton の方法でグルタミン酸のニンヒドリン顯色斑点を70%アセトンで振盪抽出し抽出液を光電分光光度計で比色定量したところ、第9表に示す成績を得た。

この表で明かなように、*in vitro* の場合生成グルタミン酸の減少率は17.3%であつたが、*in vivo* の場合、すなわちD毒素注射15乃至18時間におけるグルタミン酸の減少率は約30%であることを知り、明かにトランスアミナーゼの活性低下を認めた。

以上の成績のようにアスパラギン酸- α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼに対するD毒素の影響は、T.

C. Aサイクルの酸化酵素の場合と同じく *in vitro* では直接の阻害は認められないが、*in vivo* の実験、すなわち、D毒素を生体に侵襲させた後、略々15乃至18時間後において同トランスアミナーゼに対して阻害的に作用することが明かにされた。

このように、D毒素の生体酵素系に対する阻害は一定の潜伏期を経て始ることを想定することが出来た。

**第9表 アスパラギン酸- α -ケトグルタル酸ト
ランスアミナーゼに及ぼすD毒素の影響**
(生成グルタミン酸の減少率及び定量値)

	グルタミ ン酸減少 率 (%)	グルタミ ン酸量 (μ M)
対照 (反応系にD毒素添加せず) 1	0	22.1
対照 (") 2	0	22.6
対照 (") 3	0	21.9
反応系に $1/3$ LD ₅₀ 量D毒素添加	17.3	18.4
$1/3$ LD ₅₀ 量D毒素注射後 5時間	19.2	17.9
" 10時間	19.8	17.8
" 15時間	32.1	15.0
" 18時間	30.5	15.4
" 21時間	39.3	13.4
" 24時間	40.9	13.1

註：各実験例はマウス2〜3匹の平均値を示す。

考 察

D毒素の生体への作用機作に関する研究は病理組織学的な方面に重点が置かれ、生体代謝系、ことに酵素系に対するものは比較的乏しい様であるが所謂ジフテリア中毒症状が心筋、骨格筋等多糖類の分布の多い所を中心として現われる点から、従来より糖代謝系乃至はそれに関連した酵素系に関する研究がみられる。これに関しては Holmes^{2,3)}, Cunningham⁴⁾, Pinchot⁵⁾ 等の研究があり且つそれらは興味ある点も多いが、いずれもD毒素がこれら酵素系に影響のあることが認められていない。又 Pappenheimer⁶⁾ 一派の Cytochrom b 酵素に対するD毒素障碍説も仮説の範囲を出ず、今日なおD毒素の生体酵素阻害は疑問説されている現状である。このことは近時蛋白質化学が著しく進歩したにもかかわらず、D毒素の毒性基の化学構造に関して決定的な知見が得られていないことに関連性があるように思われる。この点については Freeman²⁰⁾, Brown²¹⁾ 等はD毒素のフォルムアルデヒドによるトキシソイド化の研究より毒素の毒性基をチロジン基と推定し、又平出等²²⁾は蛇毒の毒性構造と同じくD毒素も Disulfide(-S-S-)基を有してをり、所謂Thiol

型 (SH) 酵素阻害のあることを主張しているが、もしこのように毒性構造が明確化されているならば、D毒素の酵素系への作用も更に一段と理論的且つ劃一的に明かにされるであろう。

著者は細胞内終末呼吸系の T. C. A. サイクルのコハク酸、フマル酸、リンゴ酸、焦性ブドウ酸各酸化酵素およびアミノ酸合成に重要で且つ神経系の代謝に関係深い²³⁾ トランスアミナーゼ系の内、アスパラギン酸- α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼにおよぼすD毒素の影響を検討した結果、均一系 NA 2 雄マウスの10%肝ホモチネートを酵素材料としての実験にては、*in vitro* で直接顕著な阻害効果 (前者では18%以下、後者では約17%の阻害率) を得られなかったが、同系マウスに $Lf=78$ /ml, LD_{50} 量の $1/2$ 量のD毒素を注射して各時間毎の肝ホモチネートを粗酵素として各々の酵素活性をしらべると、注射後15乃至18時間を経て著しい酵素活性の低下を認めた。(前者では50%以上、後者では30%以上の阻害率) これらの成績は先人が認めているようにD毒素は *in vitro* にて明かな影響を見られなかった事実と一致すると思われるが、同時にこの実験の範囲内にてはD毒素がSH酵素といわれるコハク酸、リンゴ酸酸化酵素を特異的に阻害しなかったことからD毒素の毒性構造は-S-S-基と断定しがたいように思われる。更に *in vitro* で変化なく $1/2 LD_{50}$ 量のD毒素注射18時間後よりの肝臓酵素活性の低下現象を来したことは Pillemer²⁴⁾ による破傷風毒素の研究に見られるように、毒素がそのまま毒作用を示すのではなく、これらのD毒素がいわば Pro-toxin といふべきものでこれが生体内で何らかの変化をうけて毒性物質となり、この物質が充分生成されて毒性を発揮する迄の時間が所謂潜伏期となるのであろうか。前述した Peter 等もこのような見解を示しているが、この点については今後の研究に待ちたい。又 Seyle²⁵⁾ の適応症候反応や、榊原²⁶⁾、谷村²⁷⁾、久成等²⁸⁾ による蛇毒や鉛等の stressor の生体反応の研究、又榊原、北江²⁹⁾ のアナフィラキシーと生体反応の実験成績とを併せ考えると、このようなD毒素の一定潜伏期後の生体への毒性発揮はD毒素と Stress 反応の問題に関連するものとして極めて興味深い。一方アスパラギン酸- α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼに対するD毒素の影響について検討したのであるが、本酵素系は Green³⁰⁾、Gunsalus³¹⁾、Schlenk³²⁾、Awapora³³⁾ 等により研究され、この酵素の助酵素がピリドキサルリン酸であることが明かにされ、更に最近 Snell³²⁾ によれば同酵素がピリドキサルリン酸と Cu^{++} , Fe^{++} , Ni^{++} , Al^{++} 等との金属キレート化合物

物であろうと論ぜられており、先に谷村が蛇毒、とくにハブ毒が榊原のシステイン鉄キレート化合物に配位子となることより考え、*in vivo* におけるD毒素のトランスアミナーゼ阻害もキレート結合の立場より検討すべき可能性の存することと思われるが、この点も又後日を期したい。

結 論

(1) Taylor の培地, 10%ペプトン水飴培地, P. L. O. 培地に P. W. No. 8 菌を培養し、更に細谷、宮田法、硫酸沈澱法を利用して可及的精製されたD毒素を得た。

(2) このD毒素は $Lf=75\sim78$ /ml, $Kf=8'$ M. L. D. $=2\times10^{-4}$ ml, 体重20gr 前後の均一系 NA 2 雄マウスに対する $LD_{50}=1.8\times10^{-3}$ ml であった。

(3) このD毒素を使用して T. C. A. サイクルのコハク酸、フマル酸、リンゴ酸、焦性ブドウ酸の各酸化酵素におよぼす影響を Warburg Manometry により検討した結果、その阻害率は18%以下で顕著な阻害効果を見なかった。

(4) このD毒素の $1/2 LD_{50}$ 量を均一系 NA 2 雄マウスに注射して、各時間毎にマウス肝のコハク酸、焦性ブドウ酸酸化酵素活性を検討したところ、注射18時間後より50%以上の酵素活性の低下を見た。

(5) アスパラギン酸- α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼに対する同毒素の影響を検討したところ、D毒素は同酵素系に対して *in vitro* では17%, *in vivo* にては注射15乃至18時間後より30%以上の酵素活性の低下を来すことを認めた。

(6) これらの成績よりD毒素の生体に対する潜伏期およびD毒素と生体反応との関連性の一部を把握したがこれらについては次報において更に詳しく報告する。

撰筆するに当り、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜った榊原博士に対して満腔の謝意を表する。

文 献

- 1) 曾良忠雄：生物科学, 3, 15, 1951.
- 2) Cross, M. C. A., Holmes, E.: Brit. J. Exp. path., 18, 370, 1937.
- 3) Dawson, C. R., Holmes, E.: Ibid., 20, 357, 1939.
- 4) Peters, B. A., Cunningham, R. N.: Biochem. J., 3, 219, 1941.
- 5) Pinchot, G. B., Bloom, W. L.: J. Biol. Chem., 9, 184, 1950.

- 6) 岡本栄之助：耳鼻咽喉科臨床，48，143，1955.
- 7) Pappenheimer, A. M., : J. Biol. Chem., 167 256, 1947.
- 8) Pappenheimer, A. M., : Ibid., 171, 701, 1947
- 9) Pappenheimer, A.M., : Hedee, E. D. : Ibid., 180, 597, 1949.
- 10) Pappenheimer, A. M., William, C. M. : J. Gene. physiol., 35, 727, 1952.
- 11) Lepow, I. H. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 80, 529, 1952.
- 12) 伝研編：細菌実習提要，丸善，1954.
- 13) 堀和弘，菅沼和子：日本細菌学雑誌，10，5,1955
- 14) 尾崎彌之助：大阪女医雑誌，1，4，1951.
- 14) 江上編：標準生化学実験法，文光堂，1953.
- 16) 伊藤時哉：医学と生物学，20，228，1951.
- 17) Awapora, J. B. Seal. : J. Biol. Chem., 194, 497, 1952.
- 18) Feldmann, L., Gunsalus., : Ibid, 187, 821, 1950.
- 19) Nafton, : Nature, 161, 963, 1948.
- 20) Holden, H. F., Freeman, H. : Aust. J. Exp. Biol Med. Scin., 8, 189, 1931.
- 21) Brown, A. E., : J. Am. Chem. Soc., 68, 1011 1946.
- 22) 平出順三郎：SH の進歩，医学書院，1954.
- 23) 中 脩三：神経化学，医学書院，1954.
- 24) Pillemer, L. R. G., et al., : J. Exp. Med., 88, 205, 1948.
- 25) Seyle, H., : 適応症候群（田多井訳），医歯薬出版，1953.
- 26) 榑原栄一：労働科学，4，49，1955.
- 27) 谷村久康：十全医学会雑誌，58，811，1956.
- 28) 久成正生：鉄鋼労働衛生，5，2，1956.
- 29) 榑原栄一，北江 博：第28回日本細菌学会発表.
- 30) Green, D. E., : J. Biol. Chem., 16, 559,1945
- 31) Schlenk, F., Snell. E. Ibid. 157, 425, 1945.
- 32) Snell, E. E., : J. Am. Chem. Soc., 74, 979, 1952.