牛痘ウィールスによる雞赤血球凝集反應に関する研究

第2報* 赤血球凝集素に対する二三の物理化学的影響について

多 谷 勇

國立予防衛生研究所リケッチャ・ウィールス研究部 (部長 北岡正見)

〔受付: 2月7日1953年〕

Burnet および Stone⁴⁾ は VH が雞赤血球に吸着されるにも拘らず、ウィールス自体は吸着され難いことから、VH とウィールスとは分けられること、VH は水溶性抗原であること、且つ一旦吸着された VH は血球から溶出し難いことを示した。更にまた、VH が Cl. welchii の毒素およびコブラ毒により破壊されることから、磷脂質が重要な要素であろうと推論した。Fisher¹⁰⁾ は protamine および histone によつて牛痘ウィールスの血球凝集が阻止されることから、磷脂質に対する血球の receptor は蛋白質であろうと推論した。Chu⁷⁾ のは、物理化学的性状および免疫学的性状から、VH には易熱性成分のあること、および VH は L、S-抗原とは異なるものであること、また Gillen 等⁷⁾ Briody 等¹¹⁾ は易熱、耐熱両成分の分子の大きさが互に異なることを指摘した。更に Gillen 等⁷⁾ は耐熱性成分がウィールス粒子と密接な関係にあること、且つこれが洗滌を重ねることによつて凝集價が増大することから inhibitor の存在することを仮定し、耐熱性成分は易熱性成分と本質的に異なるものであらうと述べたのに対して、Briody¹¹⁾ は、トリプシンの影響、アルコール-エーテル抽出の影響、磷脂質の含量等の差が両者間にあるとしても、塩化カルシウム、塩化マグネシウムの凝集阻止作用が両者に共通であり、且つ分割遠心による態度等から、両者は同一成分のもので、單に分子の大きさが異なるものであらうと推論した。更に、同氏等¹²⁾ によれば、新鮮な健康海猿血清は抗牛痘ウィールス作用を有するが、VH に対しては何ら作用を示さない。

以上の諸家の成績を綜合すると、VH の性質はかなり明かになって来たが、なお、その本態を推知するためには、幾多の知見が必要である。そこで、先人の成績を追試験討するとともに、VH に対する二三の物理化学的作用を検討したところ、興味ある新知見を得たので、こゝに併せて報告する。

実験方法

すべて第一報に記載した方法に準じた。個々の実験の細部については、それぞれの項に述べてある。

実験成績

1) 血球凝集反應および VH に対する pH の影響について

先づ血球凝集反應を行う場合の pH について検討を行った。型の如く作つた漿尿膜乳剤 (pH 7.25) をそれぞれの pH の緩衝液を 1/10 量加えた生理的食塩水で 0.25 cc 宛の倍数稀釈を行つた。使用した緩衝液は pH 5.6 から 7.2 までは McIlvaine の緩衝液、pH 7.6 から 8.8 までは M/15 磷酸塩緩衝液、あるいはこれに N/10 苛性ナトリウム液を加えたものを使用した。緩衝液は、すべて使用に当つて、ベックマンの硝子電極 pH 計で pH を再検定した。0.3% 赤血球浮游液は、緩衝液を加えない生理的食塩水 (pH 6.0) で作つたが、この終末 pH は 7.0 であつた。稀釈 VH の各試験管につき pH を測定し、更に、これに血球浮游液を加えた後の終末 pH を測定したところ、VH 乳剤の稀釈液では、稀釈度の低いところでは、VH 乳剤の影響をうけて pH に少し変動が見られたが、16 倍以上の稀釈では、対照の緩衝液添加食塩水と同じ pH を示した。血球浮游液を加えた後の終末 pH も、加える前と殆ど同じであつた。凝集反應の結果は第 1 表 (I) に示すように、pH 6.65 から pH 8.2 までの緩衝食塩水を稀釈に用いた場合に最も高い凝集價を示し、それ以下の pH では凝集が次第に悪くなることが分つた。この範囲の pH 域では、血球の自発凝集や溶血は見られなかつたが、pH 5.2 の緩衝食塩水を稀釈液とし

TAGAYA Isamu: Studies on the hemagglutination by vaccinia. II. On the influence of some physicochemical treatments upon vaccinia hemagglutinin. The National Institute of Health of Japan. —Jap. J. of Bact. 8(4): 391-396, 1953.

* 昭和 27 年 1 月傳研、予研集談会発表

第1表 凝集反應および VH に対する pH の影響

(I) 凝集反應の際の漿尿膜乳剤稀釈液の pH と VH 價との関係

緩衝液 pH	10% 緩衝液添加生理的食塩水 pH	VH 價
5.60	5.65	16
6.00	6.00	32
6.40	6.35	32
6.80	6.65	64
7.20	7.10	64
7.60	7.40	64
8.00	8.10	64
8.40	8.10	64
8.80	8.20	64

(II) 漿尿膜乳剤の pH を短時間変えた場合の VH 價の変化

pH	VH 價	PH	VH 價
11.2	32	6.5	512
10.5	64	6.0	256
9.5	256	5.4	256
8.5	512	5.0	128
7.15 (対照)	512	4.5	64

(註) 漿尿膜乳剤を McIlvaine の緩衝液あるいは N/10 苛性ナトリウム溶液で所要の pH にして室温 (20°C) に 1 時間置き、ついで N/10 苛性ナトリウムまたは N/10 塩酸で pH を修正、溶けなかつた沈澱を遠心し、その上清について VH 價を測定した。

(III) 漿尿膜乳剤を酸性にして生ずる沈澱と VH との関係

前処置	分 割	VH 價	
		生	56°C 30分
な し	上 清	16	4
	沈 澱	8	8
56°C 30分加熱	上 清	/	<2
	沈 澱	/	8
対 照		64	32

(註) 漿尿膜乳剤を一部は生のまゝ、一部は 56°C 30 分加熱処置をした後 McIlvaine の緩衝液で pH 5.5 にし、約 20 分室温静置後、遠心分離して上清と沈澱とに分け、上清は N/10 苛性ナトリウム溶液で pH 7.6 に修正、沈澱は磷酸塩緩衝液 10% 添加生理的食塩水 (pH 7.45) に再浮游、不溶性の粗大沈澱塊を遠心除去して、生のまゝ、および 56°C 30 分加熱の後にそれぞれ VH 價を測定した。

て用いた場合には、全試験管 (食塩水対照をも含む) に自発凝集と部分溶血を示し判定は出来なかつた。(第1表I)

次に、VH に対する pH の影響を見るために、漿尿膜乳剤に緩衝液を加えて、その pH を 4.5, 5.0, 5.4, 6.0, 7.15 (対照, pH 無修正), 8.5, 9.5, 10.5, 11.2 に修正し、室温 (20°C) に 1 時間置き、次いで pH を元に戻して凝集價を測定したところ、pH 6.5 から 8.5 までは殆んど影響なく、pH 6.0 および 9.5 になると少し凝集價が低下し、更にそれ以下、またはそれ以上の pH になるとかなり VH がこわれることが分つた。なお、pH を 5.5 に下げた場合に生じた沈澱を遠心分離し、上清と沈澱とに分けて、その各々について凝集價を測定した。即ち、上清は N/10 苛性ナトリウム溶液で 7.6 に修正し、沈澱は原量の M/15 磷酸塩緩衝液 10% 添加生理的食塩水 (pH 7.45) に再浮游 (この時の pH 7.25)、不溶性の粗大沈澱塊を 2,500 r.p.m. 10 分遠心して除いて、それぞれ VH 價を測定した。結果は第1表(III)に示すように、上清の方が VH 價や高く、主として易熱性 VH からなり、沈澱は殆んど耐熱性 VH からなっているようである。このことは、予め 56°C 30 分加熱をしておいた漿尿膜乳剤を酸処置をした場合には、沈澱にのみ VH が認められたことから裏書きされているが、生まのまゝ酸処理をした場合の上清部にも、なお耐熱性 VH が認められたことは、粒子の膠質状態が加熱したものとは異なるため、耐熱性 VH が完全に沈澱部に移行しなかつたことによるものと思われる。(第1表 (II) (III))

2) 加熱による VH の破壊について

加熱による VH の破壊については、既に Chu⁵⁾, Gillen⁷⁾, Briody¹¹⁾ の記載がある。著者の成績も概ねこれと一致している (第2表)。ただし、第3報で述べるように、易熱性、耐熱性両成分の比が一定でなく、従つて、温度および時間に伴う VH 價の減少の割合が各資料について必ずしも一定していないことは注目される。いずれにしても、56°C 以上の加熱により易熱性成分はこわれ、100°C 90 分で耐熱性成分が殆んど完全に破壊されることが認められる。(第2表)

3) 数種の薬物の VH に及ぼす影響について

VH と雞赤血球との結合に影響を興える薬品や、VH を破壊する薬品の有無を検するために、モノ沃度醋酸、靑酸ナトリウム、ナトリウムアジド、塩酸ヒドロキシルアミン、昇汞、マーゼニン (武田, Sodium ethyl-mercuri thiosalicylate)、塩酸チステイン、ホルムアルデヒド、ベンツアルデヒド、過酸化水素、過マンガン酸カリウム、石炭酸、尿素、亜硫酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、チ

第2表 加熱による VH の破壊
(I) 漿尿膜 I 代乳剤, VH 價 512 倍

時間 温度	5分	10	15	20	30
50°C	512	512	512	512	512
56					256
60	256	128	64	32	32
70	64	64	64	64	64

(II) 漿尿膜 6 代乳剤, VH 價 512 倍

時間 温度	1分	3	6	9	15	25
80°C		512	512	256	256	256
90		512	256	256	256	256
100	512	256	128	128		

(III) 漿尿膜 1 代乳剤 VH 價 256 倍

時間 温度	10分	20	40	60	90
100°C	32	32	16	8	2

(註) 加熱は予め温浴中の試験管台に立てて加熱しておいた小試験管 (13mm×100mm) に資料を 0.25cc 宛入れ一定時間後にこの小試験管を取り出して直ちにこれに緩衝液添加生理的食塩水 0.25cc を加え, これを第 1 管として以下倍数希釈を行った。

オ硫酸ナトリウム, ナイトロジェンマスタード (methylbis- β -chloroethyl amine hydrochloride, 以後 MBA と略す), ナイトロジェンマスタード-N-オキサイド (methyl-bis β -chloroethyl amine-N-oxide hydrochloride, 以後 MBO と略す) の VH に対する作用をしらべた。濃度はいずれも 5×10^{-3} ないし 5×10^{-5} モル, または 0.5 ないし 0.05% の割合に漿尿膜乳剤中に混ぜ, 37°C の孵卵器中に 2 時間置いた後に 倍数希釈を行って凝集価をしらべた。第 3 表 (I), (II) に示すように大部分のものは薬液溶液の pH を予め 7.0 ないし 7.2 に修正して置いて, 後に漿尿膜乳剤と混和して VH 價を検定したが, 他はそのまま凝集反応を行い, VH 價の低いもの (塩酸チス테인およびナイトロジェンマスタード) については pH を 7.2 に修正したものにつき再検定した。その成績を要約すると, 大部分のものは, この程度の濃度では, 37°C 2 時間で殆んど有害的に作用しないが, MBA のみは速かに VH を破壊することが分つ

第3表 (I) 数種薬物の VH に及ぼす影響

薬 物	濃 度*	VH 價	濃 度*	VH 價
モノ沃度 醋酸	5×10^{-3} モル	128	5×10^{-3} モル	256
	5×10^{-4} モル	256	5×10^{-4} モル	256
マ ー ニ ン	0.05%	128	0.05%	256
	0.005%	256		
昇 汞	5×10^{-4} モル	128		
	5×10^{-5} モル	128		
青酸ナト リウム	5×10^{-4} モル	128	5×10^{-3} モル	256
			5×10^{-4} モル	256
塩酸チス テイン	5×10^{-4} モル	256	5×10^{-3} モル***	32
	5×10^{-5} モル	256	5×10^{-3} モル**	256
ホルマ リン	0.05%	128		
	0.01%	256		
過酸化 水素	0.5%	256	0.5%	128
	0.05%	256		
ナイトロ ー ジェン マスター ド			2.5×10^{-3} モル***	64
			2.5×10^{-4} モル***	128
			2.5×10^{-3} モル**	<8
ナイトロ ー ジェン マスター ド-N-オ キシアイ ド			2.5×10^{-3} モル**	256
			2.5×10^{-4} モル**	256
対 照		256		256

* 薬液溶液 1.0cc と漿尿膜乳剤 1.0cc とを混和, 37°C 2 時間後に VH 價を測定した。濃度は終末濃度を示す。

** 苛性ナトリウムまたは重炭酸ナトリウム溶液で pH 7.2 に修正

*** pH 修正せず

第3表 (II) 数種薬物の VH に及ぼす影響

薬 物	濃 度	VH 價
亜硫酸ナトリウム*	5×10^{-3} モル	128
硫酸ナトリウム*	5×10^{-3} モル	128
チオ硫酸ナトリウム*	5×10^{-3} モル	128
尿 素*	5×10^{-3} モル	128
塩酸ヒドロキシルアミン*	5×10^{-3} モル	64
ナトリウム, アジド*	5×10^{-3} モル	128
過マンガン酸カリウム	5×10^{-4} モル	128
石 炭 酸	0.25%	64
対 照		128

* pH 7.0 に修正

第4表 ナイトローゼン, マスタード
〔メチルピス, (β-クロロエチル)アミン
塩酸塩〕による VH の不活化

時間 pH	30 分	60 分	120 分
8.2	32	16	2
7.5	32	16	2
7.0	32	16	2
6.5	32	16	2
6.0	32	16	2
5.5	32	32	2
対 照	128	128	128

漿尿膜乳剤 1.5cc と、それぞれの pH に修正した MBA 10^{-2} M 溶液 1.5cc とを混じ 37°C の孵卵器中に置き、これから各時間毎に 0.25cc 宛くみとして VH 価を測定した。

た。しかし、その酸化物である MBAO は、同じ濃度でも何ら破壊作用を示さなかつた。また、塩酸ヒドロキシルアミンも凝集価の著しい低下は認められなかつたが、非常に弱い凝集像を示すことが注目された。MBA の作用は、時間と共に増大し(第4表)、従つてこの作用が主として MBA による VH の破壊、若くは VH の血球との結合基の占有によると考えられる。(第3表(I)(II))

次に、石油エーテル、エチルエーテル、クロロホルム、ベンゾール、醋酸エチル、トルオール、ブタノールの影響をみるために、漿尿膜乳剤にこれらの有機溶媒を乳剤の半量加え、氷と食塩との混合寒剤中に 30 分置き時々振盪し、ついで溶媒を遠心分離して凝集価をしらべた。この濃度および作用時間では殆んど影響がみられなかつたので、更に、この中の石油エーテル、エチルエーテル、クロロホルムについて同様の処置を行い(今回は寒剤中で処置する代りに -12°C の冷凍機の中に置いて 5 分毎に取出して振盪した)。溶媒を遠心分離した後に 2°C の氷室に一夜置き翌日凝集価を測定したところ、石油エーテル処置では、かなり低下したとは云え、尚 VH が残存していたが、エチルエーテルおよびクロロホルム処置では VH が殆んど認められなかつた。なお、石油エーテル処置後残存した VH は、易熱性、耐熱性両成分を含むことも第5表の成績から明かである。(第5表)

4) 保存実験

3) の実験で VH に対し大した害作用を示さかつたモノ沃度醋酸、靑酸ナトリウムを各々 5×10^{-4} モルの割合に、ホルマリンを 0.01%, マーゾニン(武田)を 0.05%

第5表 石油エーテル, エチルエーテル,
クロロホルムの VH に及ぼす影響*

溶 媒	無 処 置	56°C 30 分 加 熱
石 油 エ ー テ ル	32**	16
エ チ ル エ ー テ ル	<2	<2
ク ロ ロ フ ォ ル ム	2	<2
対 照	128	32

(註) * 原乳剤の $\frac{1}{2}$ 量の溶媒を加え -12°C の冷凍機中に置き、時々出して振盪、30 分後に溶媒を分離、2°C の氷室に一夜置いて翌日測定。

** 更に 2°C 4 日後に測定しても同じ値であつた。

の割合に、過酸化水素を約 5×10^{-3} モルの割合に、それぞれ漿尿膜乳剤に混じ、普通の氷使用冷蔵庫に夏期保存し、VH 価の変化を観察した。同時に、対照として無処置の乳剤および 56°C 30 分加熱して易熱性成分を破壊した乳剤についても保存観察した。その成績は第1図に示してあるが、既に2週間後では、対照および靑酸ナトリウム、ホルマリン添加の乳剤は凝集価の低下を示し、過酸化水素、マーゾニン添加のものはこれに次ぎ、モノ沃度醋酸添加または 56°C 30 分加熱処置のものは最もよかつた。この優劣順位は、その後の反復試験成績でも概ね変わらず、11 週後に凝集価を測定した時も、56°C 30 分加熱処置のものが最もよく VH が保存され、次いでモノ沃度醋酸、過酸化水素添加の順であつた。なお、この場合、保存の条件はかなり悪く、夏期のため庫内の温度は概ね 6 ないし 15°C で、日中、扉の開閉の多い時は 25°C 以上に昇ることも少なくなかつたと思われる。しかし保存の条件がかなりよくても、VH が自然に破壊されて行くことは他の場合にも常に経験されている。

以上の成績で注目すべきことは、酵素を一部不活化し得る 56°C 30 分加熱処置または酵素阻害剤であるモノ沃度醋酸添加等により、この VH の破壊がある程度阻止出来ることである。(第一図)

5) 雞赤血球による凝集素の吸着、溶出に関する実験
10% 雞赤血球浮游液に家兎辜丸乳剤を等量混じて 37°C 湯浴中に置き、時間的に VH の減少をしらべた成績を第2図に示した。即ち、最初の 15 分で大部分の VH が血球に吸着され、60 分後には殆んど完全に吸着された。また、VH に対して感受性のある、若くは感受性のない雞の血球の 20% 浮游液で漿尿膜乳剤中の VH を吸

第1図 VH の保存実験

(註) * VH 價は漿尿膜乳剤の稀釈倍数(血球浮液添加前の) 2^x の指数 x であらわした。

第2図 鶏赤血球による VH の吸着

(註) * VH 價は漿尿膜乳剤の稀釈倍数(血球浮液添加前の) 2^x 指数 x であらわした。

第6表 凝集血球および非凝集血球による
VH の吸着

処 置	VH 價
非凝集血球で吸着	64
凝集血球で吸着	8
対 照	128

(註) 漿尿膜2代乳剤 0.4 cc にそれぞれの血球 20%浮液液 0.5 cc を加え 37°C 2時間後血球を遠心分離して上清について VH 價を測定した。対照は漿尿膜乳剤 0.4 cc に食塩水 0.4 cc を加え、同様の操作を行つて後 VH 價を測定した。

着したところ、VH によつて凝集されない雞赤血球には VH は殆んど吸着されないが、VH によつて凝集される雞赤血球は、37°C 2時間で殆んど全部の VH を吸着した。また、一旦吸着された VH を、pH、温度を種々かえて溶出しようとしたが成功しなかつた。(第2図、第6表)

6) 超音波処置の影響

漿尿膜乳剤 5 cc を口径 4 cm の超音波用試験管に入れ、その中に更に、アセトンを入れた口径 2.2 cm の試験管を挿入し、時々固形炭酸をアセトンの中に投入して、振動による漿尿膜乳剤の温度の上昇を防ぐようにし、30分間超音波処置*をした。その際、陽極電圧 220 V、陽極電流 230 mA、高周波電流 540 mA、格子電流 30 ないし 36 mA で、出力 560 KC であつた。このような條件で超音波を作用させても VH 價には何ら変化が見られず、むしろ凝集像が最後の二管に於て、対照の無処置のものに比し、やゝはつきりあらわれたように思われる。

考 按

VH に対する二三の物理化学的影響を検討し、先人の業績を追試確認すると同時に、興味ある新知見を得た。即ち、温度の作用、血球への吸着、溶出に関する点では Chu⁵⁾、Gillen 等⁷⁾、Briody¹¹⁾、Burnet 等⁴⁾の成績と一致する成績を得た。更に VH の安定な pH 域が 5.0 から 9.0 の間で、それ以上または以下になると VH が一部破壊されることを明かにした。この際、低 pH では沈澱が生ずるのであるが、その沈澱部にも、その上清部にも VH が認められた。このことは、VH がかなり蛋白質の性状を有し、蛋白質の等電点附近で沈澱する粒子があることを示すと同時に、他面、pH 4.5 になつても、なお沈澱しない粒子の VH もあることを物語るものである。これらの事實は、VH はレシチン様物質が主体であろうとの Burnet 等⁴⁾の説や、polydisperse であろうとの Briody¹¹⁾の説と 思い 合 せ る と 興 味 深 い ところである。

藥物の影響では、37°C 2時間では、一般に酵素阻害剤として知られているモノ沃度醋酸、青酸ナトリウム、ナトリウムアジド、過酸化水素、昇汞、ホルマリン、ベンツアルデヒド等は、低濃度では殆んど害作用なく、わずかに塩酸ヒドロキシルアミンが稍々有害なように思われた。かえつて、モノ沃度醋酸、過酸化水素を添加した場合に、VH が長期間保存出来たのである。このことは 56°C 30分加熱後に保存した漿尿膜乳剤が最もよく VH

* 超音波発生装置は、細谷教授の御好意により、傳染病研究所細谷研究室のものを使用した。茲に厚く謝意を表する次第である。

を保持し得たことと考へ合せると、VH が自然に破壊されて行くのは、恐らく組織乳剤中に含まれている酵素の作用も、何らかの役割を演じているように考えられる。

著者が今日までにしらべた薬物中では、ナイトロージェン・マスタードが最も破壊作用強く 10^{-2} ないし 7.5×10^{-3} モルの濃度で 37°C 2 時間後に殆んど完全に VH が認められなくなつた。これに反して、ナイトロージェン・マスタード-N-オキサイドは同濃度であるに拘らず、何ら破壊作用が認められなかつた。このことは、本物質がナイトロージェン・マスタードに比し毒性が非常に少いことと対比して興味深い点である。なお、これらの作用の詳細については、別に発表の予定である。

有機溶媒は、大抵のものは約 -6°C 30 分間作用させても VH に対し殆ど破壊作用を示さなかつた。しかし、氷室(2°C)に一夜置いて VH 價を検したところ、石油エーテル、エチルエーテル、クロロホルムの3者の中、石油エーテルのみは軽度の凝集價の低下を起したとは云え、なおよく VH を残存せしめたが、エチルエーテル、クロロホルムは殆ど完全に VH を破壊した。VH は、30 分間相当強力な超音波処置を受けても破壊されなかつた。

以上、先人の業績および著者の成績から、VH の性状はかなり明かにされた。しかし、その本態が何であるかを明かにするためには、なお多くのなすべき研究が残されている。そして、VH が MNI 群のウィールスのように、血球への吸着、溶出による精製または、メタノール沈澱法等による精製が不可能な事實は、VH の本態究明をおくらせている最大原因であろう。著者も、血球に吸着された VH の溶出、あるいはメタノール沈澱法、硫酸ナトリウム沈澱法による VH の精製を試みたが、すべて不成功に終つた。たゞ、pH を低くして生じた沈澱を遠心分離することにより、その上清および沈澱再浮游液のいずれにも VH を証明したことは、精製に対する

一つの手がかりを示すものであるかも知れない。この点については研究中である。

総括並に結論

牛痘ウィールスによる雞赤血球凝集素 (VH) に対する物理化学的影響を検して次の結果を得た。

1) VH は pH 6.0 から 9.0 の間では安定で、それ以上またはそれ以下の pH では速かに一部破壊される。

2) 凝集反応を行う pH は 7.0 から 8.0 の間がよい。

3) VH の易熱性成分は 56°C 30 分で壊れ、耐熱性成分は 100°C 90 分で殆んど完全に壊れる。

4) モノ沃度醋酸、靑酸ナトリウム、ナトリウムアジド、塩酸チステイン、昇汞、マーゾニン(武田)、ホルムアルデヒド、ベンツアルデヒド、過酸化水素、過マンガン酸カリウム、石炭酸、尿素、亜硫酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウムは 5×10^{-3} ないし 5×10^{-5} モル、または 0.5 ないし 0.05% の濃度で、 37°C 2 時間では、殆んど VH を破壊せず、塩酸ヒドロキシルアミンがやゝ凝集價を低下せしめる。

5) メチル・ビス [β -クロロエチル] アミン塩酸塩は 10^{-2} ないし 7.5×10^{-3} モルの濃度で 37°C 2 時間で殆んど完全に VH を破壊するが、メチル・ビス [β -クロロエチル] アミン-N-オキサイド塩酸塩は同濃度でも何ら破壊作用を示さない。

6) 石油エーテル、エチルエーテル、クロロホルム、ベンゾール、醋酸エチル、トルオール、ブタノールは、 -6°C に 30 分作用させただけでは VH に対し破壊作用を示さない。

7) 石油エーテル、エチルエーテル、クロロホルム処置乳剤を 2°C に一夜置くと、石油エーテル以外では殆んど VH は破壊され、石油エーテル処置の場合も VH 價の低下がみられた。

(文献は第3報末尾に一括して載せた)。