

杉浦 衛, 小木曾太郎, 平工誠治: 酵素剤の研究 (30)*¹
韓国消化酵素製剤中の酵素活性について

Mamoru Sugiura, Taro Ogiso, and Seizi Hiraku :
Studies on Enzyme Preparations (30)*¹

On the Enzyme Activity in Korean Enzyme Preparations

Summary

Recently in Korea, a lot of digestive enzyme preparations have been manufactured and used.

The enzyme activities in these preparations, α -amylase, protease, cellulase, lipase, and the disintegration tests, in vitro were investigated.

In pH 6, 9 out of these preparations generally showed the excellent α -amylase activities.

Acid and alkaline protease activities were weak, and lipase activities were low except for two preparations, too.

Cellulase activities were good.

The disintegration of all uncoated tablets was not good.

From the result of the test, it seems that the enzyme activities and disintegration of these preparations are inferior to Japanese preparations.

近年、酵素化学の著しい進展から優秀な各種微生物酵素が開発利用されている。消化酵素についても従来のジアスターゼ（以下ジアス）、パンクレアチン（以下パンク）の時代から微生物産生のアミラーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼなど優れた酵素を配合する総合消化酵素剤へと変化してきた。韓国においてもその傾向は例外ではない。

わが国と極めて類似した食生活を営む韓国においても消化酵素製剤が市販されている。そこで今回これらの韓国の酵素製剤 22 種中に含まれる各種酵素がどの程度の活性を有するかを知るため、 α -アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ活性を測定し、先に報告したわが国の総合消化酵素剤のそれとの比較を行った¹⁾。また in vivo における消化力の一推定法として各製剤の崩壊度試験も併せて行った。

試験法および供試製剤

1. 試験法

1.1. α -アミラーゼ活性

blue-value²⁾法を用いた。すなわち 1% 可溶性澱粉液 5 ml に 0.1M 酢酸緩衝液 3 ml および 0.1% 塩化カルシウム 1 ml を加えて 37°C に予熱する。これに酵素液 1 ml を混和し 37°C にて 30 分間作用させたのち、その 0.2ml をヨード・ヨードカリ混液 (N·HCl 1 ml および 0.2% I₂-2% KI 1 ml を水で 100ml とする) 10ml に加え、その呈色を 660m μ にて比色定量する (OD₁)。空試験は酵素液の代わりに水を使用し同様操作する (OD_{st})。

$$\text{消化された澱粉 mg数/g} = \frac{\text{OD}_0 - \text{OD}_1}{\text{OD}_{st}} \times 50 \times \text{希釈倍数}$$

*¹ 前報 (29) 有馬啓, 杉浦衛, 仲恭寛: 薬剤学投稿中

*² 本実験は韓国薬会からの依頼により行なったものである

1.2. プロテアーゼ活性

Anson 変法³⁾に準じた, 各 pH の 1.5% カゼイン溶液 (pH 3.5 は 0.1M 乳酸緩衝液に溶解後 0.1N 塩酸または水酸化ナトリウムで pH を調整する) 1ml を 37°C に予熱し, これに酵素液 1ml を加え, 37°C で 30 分間反応後, 0.44M トリクロル酢酸 2ml を加えて反応を停止させ, これを 37°C で 20 分放置後ろ過する.

ろ液 1ml をとり, 0.55M 炭酸ナトリウム液 5ml に混和し, これに 5 倍希釈した Folin 試薬 1ml を加え 20 分間 37°C に加温後 660 $m\mu$ にて比色定量する. 別にチロジンをを用いて同様操作し検量線を作成する.

1.3. リパーゼ活性

制酸剤配合の製剤については P-ニトロフェノールエステルを用いる比色法⁴⁾を, 制酸剤を配合しないものについてはアルカリ滴定法⁵⁾である山田, 町田法を準用した.

1.3.1. 比色法

P-ニトロフェノールパルミテート 131.3mg をエタノール 10ml に溶解し, この 1ml を水で全量 100ml とする. その 2ml に M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2ml, 水 5ml を加え 37°C で 10 分間予熱する. これに酵素液 1ml を加え 37°C で 20 分間反応後沸騰水浴中で 5 分加熱, 430 $m\mu$ に吸光度を測定する.

P-ニトロフェノールの検量線は P-ニトロフェノールの 0.1~0.7 $\mu\text{mol/ml}$ の溶液を用いて同様操作し作成する.

1.3.2. 滴定法

オリーブ油乳剤 (オリーブ油 25ml を 2% PVA 117 75ml でホモゲナイズした) 2.5ml, 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2.0ml を 37°C で 10 分間予熱し, これに酵素液 0.5ml を加え 30 分間反応後, アセトンアルコール混液 (1:1) 10ml 0.05N 水酸化ナトリウム 5.0ml を加え, 0.05N 塩酸で逆滴定する. (指示薬フェノールフタレイン)

0.05N NaOH 1ml = パルミチン酸 12.82mg

生成パルミチン酸量/g = $12.82 \times f \times A \times D$

A : 滴定量

f : 0.05N · HCl の factor

D : 希釈倍数

1.4. セルラーゼ活性

セルラーゼ活性はカルボキシメチルセルラーゼ (CMC) 活性^{6),7)}を Sumner 法に準じ測定した.

1% CMC-Na 2ml, pH 4.5 McIlvaine 緩衝液 1.5ml を 37°C で 5 分予熱し, これに酵素液 1ml を加え 37°C で 30 分反応後氷水中で冷却し, この 1ml に Sumner 試薬 1.5ml を加え沸騰水浴中で 10 分加熱後氷水中で冷却, 水 3ml を加えた後 530 $m\mu$ で比色定量する. 別にグルコースを 0, 500, 1000...2000 $\mu\text{g/ml}$ をとり同様操作し, 検量線を作成する.

1.5. ヘミセルラーゼ活性

ヘミセルラーゼ活性はキシラナーゼ活性⁸⁾を Somogyi-Nelson 法に準じ測定した.

1%キシラン溶液 1ml, pH 4.5 の 0.1M 酢酸緩衝液 3ml を 25ml のネスラー管にとり 37°C で 5 分予熱した後酵素液 1ml を加え 37°C で 30 分間反応後ソモギー試薬 2ml を加え沸騰水浴中 20 分間加熱, 流水で冷却後ヒ素モリブデン酸試薬 1ml を加え静かに振り混ぜ, 20 分間室温に放置後水を加え全量 25ml とし, 500 $m\mu$ にて吸光度を測定する. 別に 37°C で 30 分間作用させる操作を省いたもので吸光度 E' を測定する. また, 80°C で

5時間乾燥したキシロースを水にとかしその5ml中にキシロース0.05mg, 0.1mg……0.4mgを含む液を作り同様操作し検量線を作成する。E-E'を求め検量線よりキシロースmg数を求める。

1.6. 崩壊度試験

日局Ⅶの一般試験法の崩壊度試験を用い、錠剤, 糖衣錠, カプセル剤は人工胃液で, enteric coating した錠剤は人工胃液に対する抵抗試験と人工腸液中での崩壊度試験を行った。

2. 供試製剤

これら製剤中に含まれる酵素としては Table I にみられるようにジアス, パンクが最も多いが, 微生物酵素であるバイオジアスターゼ, タカジアスターゼやその他の微生物起源と思われるリパーゼ, セルラーゼ, プロテアーゼなども配合されている。

Table I Prescription Contents of Various Digestive Enzyme Preparations

Pattern	No.	Digestive Enzymes	Mixed Medicine	Dosage
Tablet	1	Pancreatin 75mg, Diastase 20mg	Cal. carbonate ppt. 33mg, Mag.oxide 67mg. Sod. bicarbonate 167mg	2~3 Tab
	2	Polyase. 50mg, Diastase 33mg.	V. B ₁ 1 mg, Sod. bicarbonate 85mg Aluminum hydroxide gel 50mg Lime carbonate 200mg.	3 Tab
	3	Amylase, Inulase, Cellulase, Altase. Pektase, Tryptase, Ereptase, Lipase		1~3 Tab
Sugar Coating Tablet	4	Pancreatin 75mg, Pepsin 75mg Diastase 25mg.	V. B ₁ 2.5mg, Cal. carbonate 20mg Sod bicarbonate 100mg.	2~3 Tab
	5	Polyase 25mg.	V. B ₁ 2.5mg, Berberine hydrochloride 7.5mg.	1~2 Tab
	6	Pancreatin 100mg, Lipase 10mg. Cellulase 40mg, Amylase 60mg, Protease 40mg	Bile pulv. 25mg	1~3 Tab
	7	Protease 300U, Carbohydrate digestive enzyme gel powder 1200U, Saccharify powder 150U, Hemicellulase, Cellulase lipase, Pectin		1~2 Tab
	8	S-amylase 700U, α -Amylase 3500U, Protease 55U, Lipase 13U, Cellulase 25mg, Biodiastase 75mg, Pancreatin	Act. lactic acid bacteria 13mg	2 Tab
	9	Pancreatic Lipase 10w.U, Pancreatic amylase 10w.U, Pancreatic protease 17w.U, Hemicellulase 75mg		1~2 Tab
	10	Cellulase 25mg, Pancreatin 150mg, Lipase 50mg, Protease 50mg, Amylase 100mg	Bile pulv. 25mg	1~2 Cap

Capsule	11	Takadiastase 50mg, Pancreatin 50mg	Cal. carbonate 120mg, Sod. bicarbonate 30mg, Mag. oxide 30mg	2~3 Cap
	12	Amylase 50mg, Protease 100mg, Lipase 50mg, Pancreatine 150mg, Cellulase 50mg		1~2 Cap
Powder	13	Amylase 107mg, Protease 33mg, Lipase 33mg, Diastase 100mg	V. B ₁ 3.3mg, Sod. bicarbonate 727mg, Cal. carbonate 223mg, Mag. carbonate 200mg	1Parc.
	14	Diastase 100mg	V. B ₁ 100mg, Cal. carbonate 150mg, Mag. carbonate 130mg	1Parc.
	15	Diastase 100mg.	Sod. Bicarbonate 634mg, Cal. carbonate 150mg, Mag. carbonate 130mg, Dried aluminium hydroxide gel 270mg	1Parc.
	16	Diastase 67mg, Pepsin 67mg, Pancreatine 100mg, Lipase 33mg	V. B ₁ 0.7mg, V. B ₂ 0.3mg, V. C 7mg	1Parc.
	17	Pancreatine 500mg, Diastase 270mg	Mag. carbonate 170mg, Sod. bicarbonate 670mg	1Parc.
	18	Diastase 100mg	V. B ₁ 100mg, Cal. bicarbonate 327mg, Sod. bicarbonate 10mg	1Parc.
	19	Pancreatine, Diastase	Cal. bicarbonate, Mag. carbonate, V. B ₁	1Parc.
	20	Polyase		0.1~0.3 g
	21	Pancreatine 120mg, Diastase	Sod. bicarbonate 600mg, Mag. oxide 60mg	1 Spoonful
	22	Diastase 100mg	Sod. bicarbonate 500mg, Cal. bicarbonate 347mg	1Parc.

製剤中の酵素処方ではジアスとパンクの配合がかなり多いが、ジアス単独配合の製剤もみられる。わが国で市販されているような各種微生物酵素とパンクなどを配合した総合消化酵素は22剤中7剤程度であった。一方制酸剤の配合された製剤は極めて多く、22剤中に12剤もみられた。これら制酸剤としては速効性の重曹と持続性の炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム、酸化マグネシウムの処方が多くみられ、その他生薬の配合はほとんど全製剤に認められた。したがって処方方面から考察すると、これら製剤は体内で消化と制酸を同時に期待しているものと思われる。

試 験 成 績

試験結果は、各酵素により生成した物質、すなわち α -アミラーゼについては消化された澱粉、プロテアーゼはFolin 試薬呈色物をチロジン量に換算して、リパーゼは生成パルミチン酸を、セルラーゼは生成還元糖をグルコースとして、ヘミセルラーゼ(キシラナーゼ)は生成キシロースのmgをそれぞれ1錠、1カプセルあるいは1包に換算して表わした。

1. α -アミラーゼ作用

食後の胃内の pH は 3~5 になるといわれるので酸性域の pH 3.5 における活性と一般アミラーゼの至適 pH

9)10)

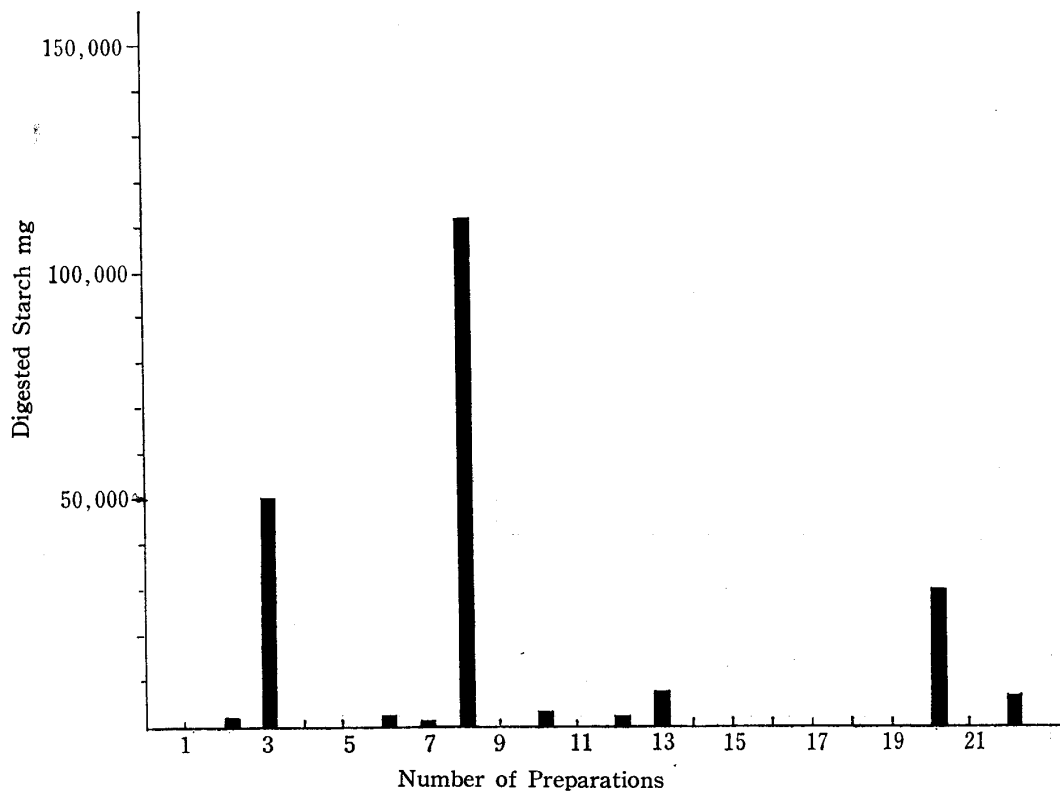


Fig. 1. α -Amylase Activity in 1 Tablet, 1 Parcer or 1 Capsule in pH 3.5

に近い pH 6 での活性を測定した。

1.1. pH 3.5 における α -アミラーゼ活性

一般に pH 3.5 の酸性側の α -アミラーゼ活性は二三の例外を除いて低く Fig.1 にみられるように No. 3, 8, 20, が優れた α -アミラーゼ活性を示した以外はいずれも澱粉消化力は小であった。No. 8 は耐酸性のビオシアスターゼなどを含有しているので pH 3.5 の酵素活性は特に強く、1 回服用量中の α -アミラーゼは 100g 以上の澱粉を消化しうる活性を示した。

1.2. pH 6.0 における α -アミラーゼ活性

pH 6.0 においては各製剤とも Fig.2 に示すように比較的良好な α -アミラーゼ活性が認められた。そのうち No. 3, 6, 8, 9, 13, 20 などが活性大で、特に No. 8, 9 は優れた α -アミラーゼ活性を示した。一方、パンク、シアスなどの配合が明記されているにもかかわらず No. 4, 11, 15, 16, 17, 19 などの製剤中の α -アミラーゼ活性は僅少であった。

これら製剤が α -アミラーゼ活性を有しないのは製剤以後の失活あるいは酵素の量的不足に起因するものと思われる。

1)

先に試験したわが国の製剤が pH 5.0 において 1 錠または 1 カプセルにつき平均約 50g の澱粉を消化しうる活性を示したのに対し、韓国のそれは 10g 以上の澱粉消化の活性を示したのは 22 剤中 9 剤にすぎなかった。

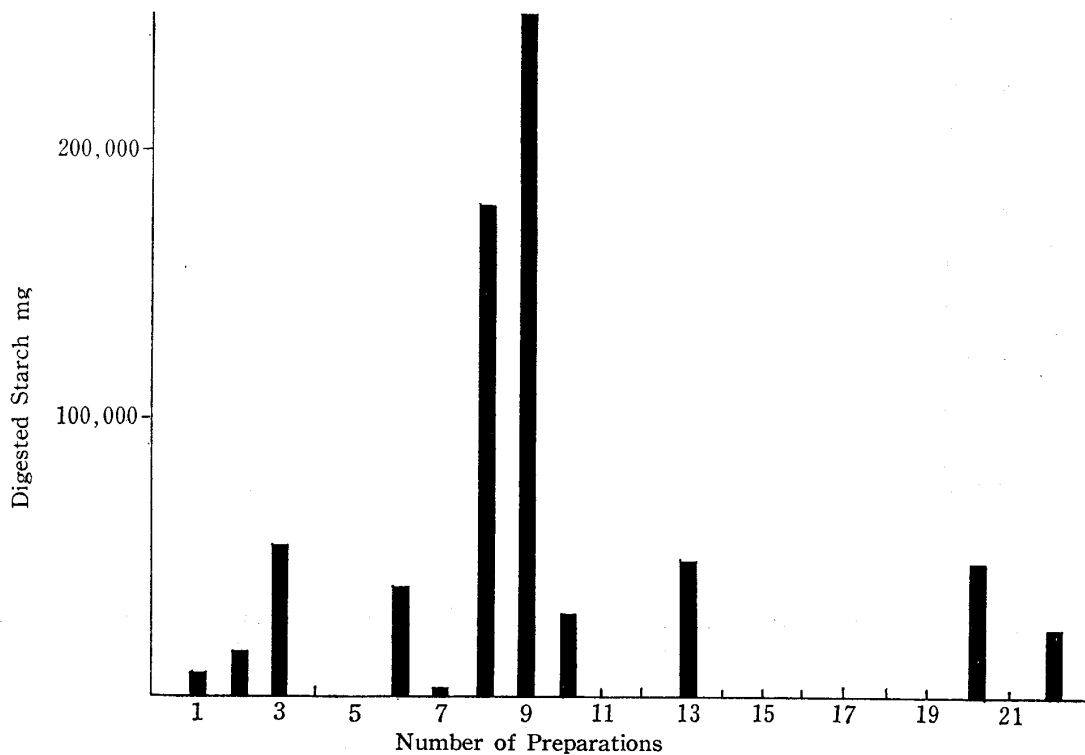


Fig. 2. α -Amylase Activity in 1 Tablet, 1 Parcer or 1 Capsule in pH 6.0

2. プロテアーゼ作用

プロテアーゼは近年動物起源のパンク以外に微生物からの酸性～弱酸性プロテアーゼも工業的規模で生産されており、消化酵素剤中に配合される例も多いので pH 3.5 とパンクなどの至適 pH に近い pH 8 においてその活性を測定した。

2.1. pH 3.5 におけるプロテアーゼ活性

pH 3.5 においてはいずれの製剤も一般にプロテアーゼ活性は弱少であった。そのうち No. 3, 8, 20 は比較的活性を有することが明らかになったが、最高の活性を有する No. 8 も一回量ではチロジンとして数十 mg を生成するのみであった。

わが国においては耐酸性のプロテアーゼを配合するものが多く¹⁾一回量でチロジン 10~180mg 余を生成できるのに対し、韓国のそれは耐酸性のプロテアーゼを配合したものが少ないため酸性域での活性が弱いものと思われる。

2.2. pH 8.0 におけるプロテアーゼ活性

pH 8.0 はパンクの至適 pH に近いので、パンクを配合した製剤はかなりの活性を示した。すなわちパンクを処方した No. 1, 3, 6, 8, 9, 10 などは No. 13 などと共に比較的強いプロテアーゼ活性が認められた。一方 No. 4, 21 など全く活性を持たない製剤もみられた。

わが国の製剤は、pH 8.0 において¹⁾いずれも強いプロテアーゼ作用を示し酵素一回量でチロジンとして 100~2000 mg も生成するのに反し韓国のそれは 160mg 以下の生成量であった。

3. リパーゼ作用

リパーゼ活性は pH 7.0 で測定したが、Fig. 3 に示すように一般にリパーゼ活性は僅少であった。パンクレアチンを含む No. 8, 及び 9 は強いリパーゼ活性を示し 1錠でパルミチン酸をそれぞれ 3,700, 2,300mg 余を生成し

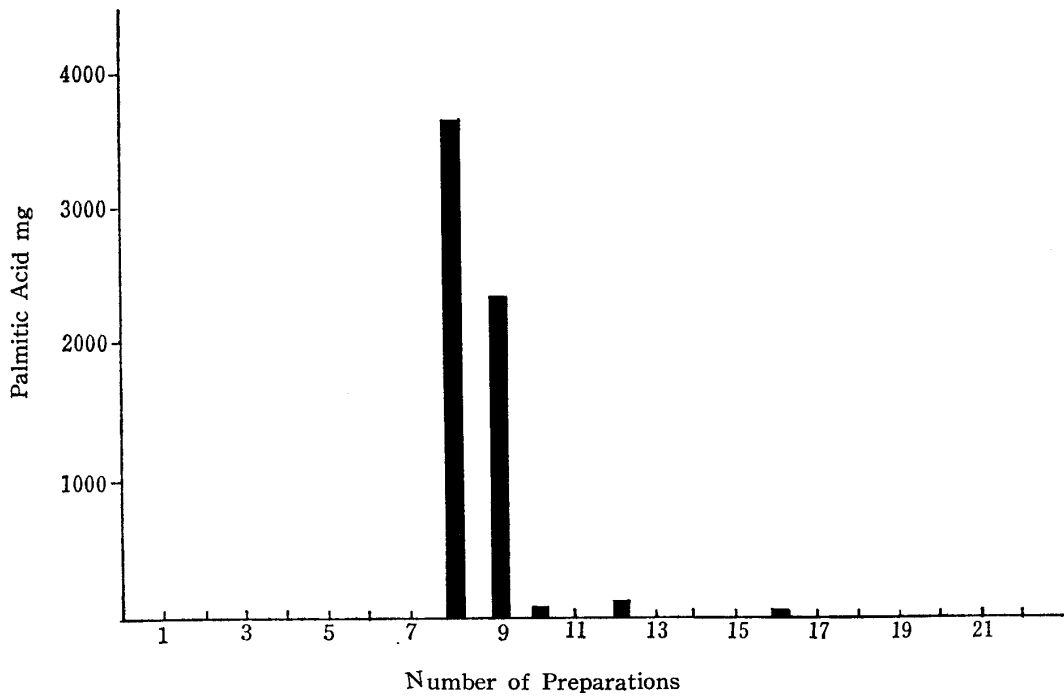


Fig. 3. Lipase Activity in 1 Tablet, 1 Parcer or 1 Capsule in pH 7.0.

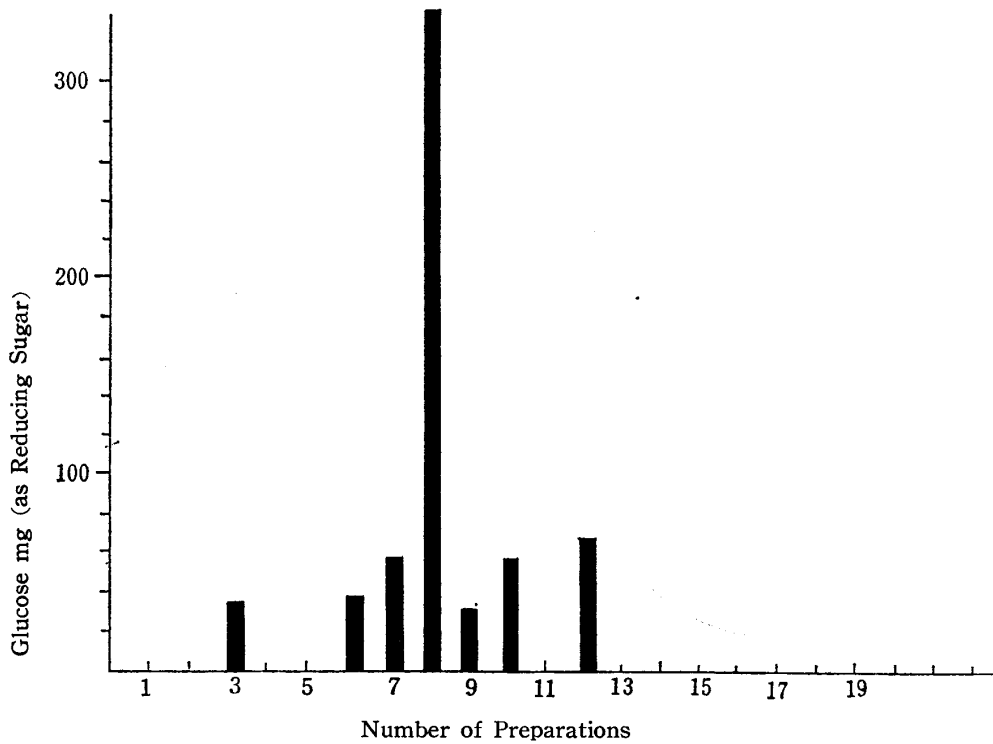


Fig. 4. Cellulase Activity in 1 Tablet, 1 Parcer or 1 Capsule in pH 4.0.

うる酵素活性を示した。その他 No.10, 12, 16 も多少の活性が認められたが、大部分の製剤は活性が弱くリパーゼ活性は零に近かった。わが国の製剤が1回量について100~3000mgの¹⁾パルミチン酸を生成しうるのと好対照である。

4. セルラーゼ作用

セルラーゼ作用はセルラーゼが配合が明記されているものにつきカルボキシメチルセルラーゼ (CMCase) 活性を測定した。

セルラーゼはアミラーゼとの配合により米, 飯などの消化率と糖化量を増加するといわれ¹¹⁾, また野菜の生食の増などにより植物性食品の崩壊作用を促進し, 食品の栄養化の向上を図る目的から, 近年次第に消化酵素剤中にセルラーゼを配合する傾向にある。

韓国の製剤はセルラーゼを配合したものは比較的少なく, 22 剤中 7 剤であったが, その活性は Fig. 4 に示すように比較的良好で 1 回量で数十~数百 mg のグルコースを生成しうる活性を示した。特に No. 8 は優れたセルラーゼ活性が認められ一回量で 700mg 程度のグルコースの生成が可能であった。

5. ヘミセルラーゼ (キシラナーゼ) 作用

植物細胞膜を構成するヘミセルロースは化学的に不明な点が多いが, 植物組織の軟化にはセルラーゼよりヘミセルラーゼが有効であるともいわれ¹²⁾, 現在わが国で市販されているセルラーゼ製剤には強力なヘミセルラーゼを含むものが多い。ヘミセルラーゼはキシラナーゼ, マンナーゼ, アラバナーゼなどを総称したものであるが, この実験

ではセルラーゼ配合剤についてキシラナーゼ活性のみを測定した。その結果を Fig 5 に示したが, セルラーゼ配合剤 7 剤のうちキシラナーゼ活性は 5 剤に認められた。このうち No. 8 は優れたキシラナーゼ活性を示し, 酵素一回量でキシロースとして 1500mg 余を生成し得た。その他 No. 3, 6, 7, 9 も僅かに活性を示したが, No. 10, 12 はほとんど活性が認められなかった。

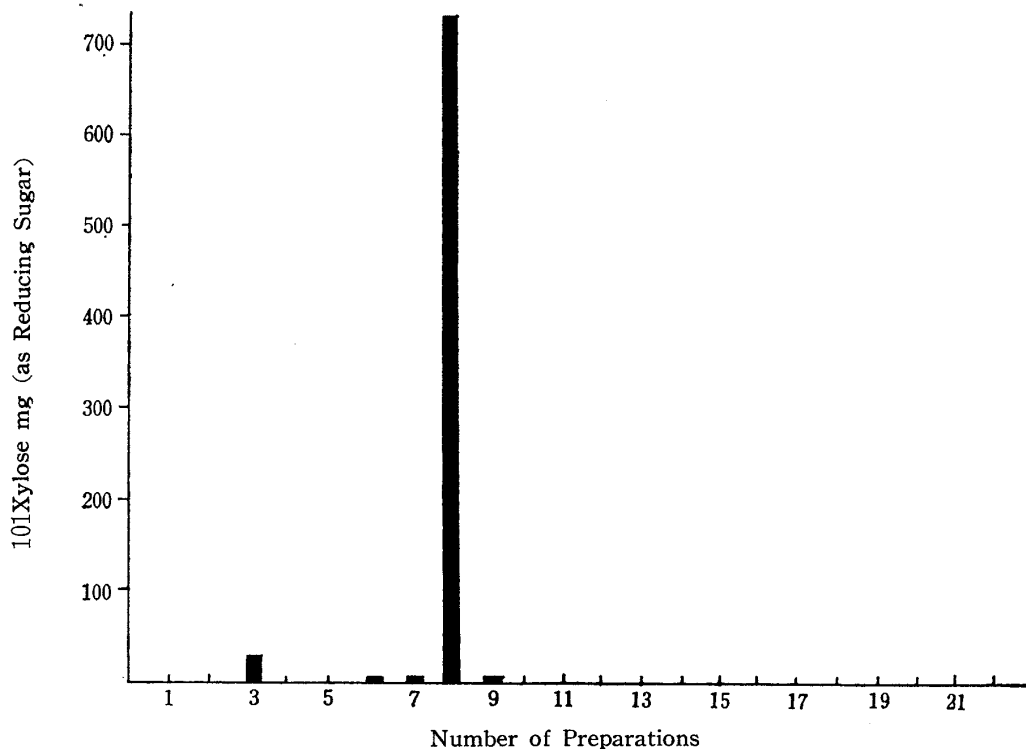


Fig. 5. Xylanase Activity in 1 Tablet, 1 Parcer or 1 Capsule in pH 4.5.

6. 崩壊度試験

酵素作用の発現は当然、錠剤やカプセル剤などの崩壊後に起るので、はたしてこれら製剤が *in vivo* において優れた酵素作用を発揮できるか否かを試験するため、日局 7 に準じ崩壊度試験を行った。

試験の結果、裸錠 3 剤とも、日局一般試験法規定の 30 分以内に崩壊しなかったが、糖衣錠は 6 剤中 4 剤が人工胃液で 90 分以内に崩壊、2 剤が崩壊不能であった。No. 9 は enteric coating した製剤であるが人工腸液で 180 分以上も抵抗崩壊しなかった。カプセル剤は 3 剤中 2 剤が 20 分以内に崩壊し、他 1 剤は崩壊に 46 分を必要とした。

なお、崩壊時間は 6 錠についての平均値である。

総括および結論

消化酵素剤は各種の酵素を配合し、総合的に食品を消化する方向へと発展してきた。韓国においてもわが国などより微生物酵素を輸入して総合消化酵素を製剤化している。そこでその活性を測定することによって韓国消化酵素剤の研究と検討を行った。

これらの製剤中に含まれるアミラーゼはじめ各種酵素の種類、特性などが判然としないので活性と酵素の関連は詳しく究明できないが、 α -アミラーゼ作用は pH 6 において供試製剤の 1/2 近くがおおむね良好な活性を示したが、他の 1/2 は極めて弱い活性を有するにすぎなかった。これは重曹配合アミラーゼ剤のアルカリ変性による失活^{14~17)}も一因と思われる。酸性プロテアーゼ作用は、パンク配合の製剤が多いため活性弱く、また pH 8 におけるプロテアーゼ活性も一般に低く腸内でのプロテアーゼ作用はあまり期待できないように思われる。リパーゼ活性もおおむね低く、僅かに二剤のみが、リパーゼ活性大であった。活性が低いのは、リパーゼは一般に不安定であるので失活などの原因によるものと思われる。なおリパーゼ活性は二種類の方法により測定したのでパルミチオン酸生成量は測定法によって多少差があるものと思われる。

酵素活性の測定の結果 No. 8 の製剤がアミラーゼ、セルラーゼ、リパーゼ活性など極めて強くおおむね優秀な消化酵素剤と考えられる。

わが国の優秀な消化酵素剤は耐酸性アミラーゼ、耐酸性プロテアーゼを処方しており、また制酸剤によるアルカリ変性を防止するため制酸剤をほとんど配合していない。また、剤型的にも耐酸性のアミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼなどを外層に使用し、内層は活性の強いパンクレアチン、アルカリプロテアーゼなどを処方し、しかも腸へ至ってはじめて崩壊するよう内層に enteric coating した錠剤や、内服時の崩壊の不均一を防止するためにカプセル入の顆粒剤が市販されている。これに対し韓国のそれは新しいタイプの製剤がきわめて少ない。したがって酵素活性、崩壊度、剤型などの面より考察すると韓国の消化酵素剤はわが国のそれと比較してなお後進的であり製剤技術の改良など研究の余地が多分にあるものと思われる。

以上の結果から次の結論が得られる。

1. α -アミラーゼ作用は pH 3.5 において 22 剤中 5 剤が、pH 6 においては 22 剤中 9 剤がおおむね優れた活性を示した。
2. プロテアーゼ作用については酸性プロテアーゼ、アルカリ性プロテアーゼ活性とも一般に低かった。
3. リパーゼ作用はリパーゼを配合した 16 剤中 2 剤が優れた活性をあらわした以外いずれも活性は僅少であった。
4. セルラーゼ作用は中程度であったが、ヘミセルラーゼ(キシラナーゼ)活性はやや低かった。セルラーゼ配

合の7剤中1剤が特にすぐれたセルラーゼ, ヘミセルラーゼ活性を示した。

5. 崩壊度試験の結果, 錠剤3剤とも崩壊不良, 糖衣錠は6剤中4剤が, カプセル剤は3剤中2剤が崩壊度おおむね良好であった。

6. 以上の各試験結果から韓国消化酵素剤のうち in vivo において優れた酵素活性を発揮できるのは少数の製剤と思われる。

文 献

- 1) 杉浦, 田中, 棚橋, 小木曾, 加藤: 岐阜薬大紀要, **14**, 57 (1964)
- 2) R. M. Mccread, W. T. Hassied: J. Am. Chem. Soc., **65**, 1154 (1943)
- 3) M. L. Anson: J. Gen. Physiol., **22**, 79 (1938)
- 4) 日本化学会編: 実験化学講座, **24**, 241 (1958) 丸善
- 5) 山田, 町田: 農化, **36**, 860 (1962)
- 6) Sumner. J. B.: J. Biol. Chem., **47**, 5 (1921); J. Biol. Chem., **65**, 393 (1925)
- 7) G. L. Miller, R. Blum, Wiliam E. Glennon, A. L. Burton: Analy. Biochem., **2**, 127 (1960)
- 8) Somogyi. M.: J. Biol. Chem., **160**, 61, 74 (1945)
- 9) Börgstrom et al: J. Clin. Invest., **36**, 152 (1957)
- 10) 飯沼, 遠山: 薬剤学, **21**, 48 (1961)
- 11) 岡崎, 石川: 薬剤学, **24**, 72 (1964)
- 12) 福本: 応用酵素講習会テキスト, P. 18 (1965)
- 13) 外山: 醸協, **10**, 415; **11**, 459 (1963)
- 14) 松原, 栗原: 薬剤学, **13**, 84 (1954)
- 15) 野上: 薬剤学, **15**, 212 (1955)
- 16) 宮道, 杉浦: 薬剤学, **11**, 38 (1952)
- 17) 黒田, 日原: 薬剤学, **18**, 121 (1958)

杉浦衛, 伊藤万蔵, 小木曾太郎, 田中英郎, 佐々木正憲: 酵素剤の研究 (31)*¹

市販酵素剤の酵素蛋白純度*²

Mamoru Sugiura, Manzo Ito, Taro Ogiso, Hidero Tanaka, Masanori Sasaki:

Studies on Enzyme Preparations (XXXI)*¹

Deduction of Protein Purity of Commercial Enzymes.*²

近年酵素化学の発展はめざましいものがあり, 新しい酵素剤が次々と開発されてきている。しかし, これらの酵素剤の酵素蛋白純度はかなり広範囲に分布しているものと思われ, 比較的純度の高いものから極めて純度の低いものまでさまざまである。

*¹ 第30報は本誌

*² 本研究は東海薬学会例会 (1967年2月) にて発表した。