ペプトンの製造に關する化學的研究

第1報 ペプシン作用の試験

佐々木林治郎・津郷友吉・神谷 誠

(東京大學農學部)

Chemical studies on the preparation of peptones

I. Experiments on the action of pepsin

RINJIRO SASAKI, TOMOKICHI TSUGO and MAKOTO KAMIYA

(Faculty of Agriculture, Tokyo University)

I. 緒 言

ペプトンは、各種蛋白質の中間消化産物の名稱であつて、FISCHER¹⁾がいつたように數多のアミノ酸が結合した所謂ペプチドの種々なる混合物とみなされ、一定の化學構造式をもつた單純な物質ではないのである。

したがつてその製法も合成によるものではなく蛋白質を加水分解して調製しているのであるが、普通市販ペプトン (Commercial peptone) とよばれる製品はペプトンの外アルブミン、可溶性基質蛋白質、非蛋白態窒素化合物等を含んでいる。本研究に於てペプトン製品とあるのはこの種の市販ペプトンのように各種窒素化合物の混合物を意味する。

ペプトン製品の調製法には加壓分解によるものと消化酵素を用いるものとがあつて、前者に關しては V. S. SADIKOW^{2,3)} 及奥、久保田兩氏⁴⁾の報告等があり、後者に關してはペプシンの作用に關連して色々の報告があるがカゼインについてはよく調査^{5,6)}されている。

本研究に於ては基質蛋白質としてカゼインの外血液フィブリン及血清蛋白質を用い、これらにペプシンを作用させてペプトン製品を調製する際の消化温度及被消化液 pH の最適條件を決定すること、またこの決定法として操作簡單なフォルモル滴定法が應用できるか否かを調べることを目的とした。なおこの最適條件をもとにして基質蛋白質溶液の濃度、添加酵素量及消化時間等の條件を色々に變化した場合における消化程度の差異を觀察し、最後に實驗室的に調製したペプトン製品と、市販品との比較検討を行つた。

この市販品の分析成績については衛生試験場で行つた報告⁷⁾がある。

II. 實驗方法

(1) 原 料

本實驗に用いた基質蛋白質は次の3種である。

カゼイン：牛乳から得た鹽酸カゼイン。

フィブリン：屠場牛血から分別したフィブリンを50～60°C に低温乾燥して調製した粉末。

血清蛋白質：馬の脱纖維血液から沈澱法によつて血球の部分を除き血清の部分を上記温度に處理した乾燥粉末。

(2) ペプシンとその効力

本實驗に用いた酵素は局方含糖ペプシンと粗製粉末ペプシンとである。

粗製粉末ペプシンは馬胃粘膜を用い、O. HAMMARSTEN の方法⁸⁾ に準じ鹽析法によつて製造したもので、その收量平均は胃の全量に對し 0.42%、胃粘膜重量に對し 1.67% であつた。

効力は GROSS 法⁹⁾によつて測定したが、これはペプシンの 1g が 40°C に於て 1 時間に消化し得る蛋白質の量を以て表わしたものである。

この方法による測定値は粗製ペプシンでは 60、含糖ペプシンでは 12 であつた。

(3) フォルモル滴定法による蛋白質消化量の測定

種々の豫備試験の結果、次のような方法を適當と認めた。

即ち蛋白質 1g をとり、カゼインの場合は一旦苛性ソーダ N/10 溶液に溶かしてから、フィブリン及血清蛋白質の場合はそのまま、鹽酸 1N 溶液及水を以て目的とする pH に調節して全量を約 70～80 cc とし、これにペプシン 1% 溶液を加えてから、種々の條件で消化を行

う。この場合酵素を蛋白質の量に對して 1/e (e=効力) 用いるとすれば蛋白質 1g について含糖ペプシン 0.083g (1/12) であるからその 1% 溶液の量は 8.3 cc となる。

消化後は急冷してから、不溶解物を除くために濾過し濾液を 100 cc に稀釋し、その 20 cc をとつて苛性ソーダ N/10 溶液で中和した後、別に調製しておいた中性フォルマリン 4 cc を加え、再び同溶液を以て滴定しその滴定数を試料 1g についての値に換算してこれをフォルモル滴定値とした。

(4) 窒素定量法による蛋白質消化量の測定

フォルモル滴定法に記したと同じように、消化濾液を 100 cc に稀釋してからその 50 cc をとつて、三鹽化醋酸 30% 溶液を 4.5 cc 加え濾過し、濾液を 100 cc に稀釋しその一定量をとつてケルダール法によつて窒素を定量して消化性窒素を算出し全窒素に對する消化性窒素の%として表わした。

(5) ペプトン製品の窒素分布の定量

ペプトン製品の窒素分布については、WASTENEY & BORSOOK の方法¹⁰⁾に従つて全窒素、不溶性窒素、蛋白態窒素、アルブモース態窒素、ペプトン態窒素及非蛋白態窒素を定量した。

III. 實驗成績

(1) フォルモル滴定法に関する豫備試験

蛋白質溶液についてフォルモル滴定を行う場合には滴定の終點がやゝ不明瞭となる缺點が認められる。よつて消化後に未消化の蛋白質を除いてから滴定を行えばこの缺點を改められることが期待されるのでカゼインについて次の試験を行つた。

i) 蛋白質等電點利用法 消化液に、苛性ソーダ 1 N 溶液を加えて等電點—カゼイン pH 4.6—に於て未消化のカゼインを沈澱させた後 100 cc となしこの濾液 10 cc についてフォルモル滴定を行つた。

その結果滴定の終點はいくらか明瞭となるが滴定値が小さくなるので僅かの差異を比較するには不適當な場合があることを認めた。しかし實驗の一方法として利用できる事はたしかめられた。

ii) 蛋白質沈澱劑利用法 蛋白質沈澱劑を使つて未消化の蛋白質を除くに當つてはその蛋白沈澱がペプトンを凝固せしめないこと及フォルモル滴定に影響のないことを必要とする。

よつて先ず醋酸、三鹽化醋酸、醋酸鉛、タングステン酸ソーダ及鹽化第二水銀等の除蛋白劑を用い市販ペプトン製品及對照として卵アルブミンの 1% 溶液について沈澱反應を調べた所第 1 表のような成績を得た。

第 1 表 蛋白質及ペプトン製品沈澱反應試驗成績

試 藥	濃 度 %	添加量 滴	沈澱の有無				判 定
			1% ペプトン製品溶液に對し	1% アルブミン溶液に對し	添加24時直後	添加24時直後	
醋酸	10	10	—	—	+	+	適
醋酸	30	"	±	—	+	+	
タングステン酸ソーダ	10	"	—	—	+	+	適
醋酸鉛	10	"	++	++			
鹽化第二水銀	3	"	±	+	++	++	不適
三鹽化醋酸	10	"	—	—	++	++	

備考: + は白濁, ++ は沈澱

第 1 表によれば醋酸、タングステン酸ソーダ及三鹽化醋酸が使用の可能性あることが判る。よつて先ず三鹽化醋酸を用いて未消化蛋白質を除いた濾液についてフォルモル滴定試験を行つたが前の等電點利用による方法以上の効果は認められなかつた。

次にタングステン酸ソーダについて試験するために消化液にその 10% 溶液 5 cc を添加しフォルモル滴定を行つたが滴定値がほとんど 0 に近くこれによつて消化量を判定することは困難であつた。

これまでの試験によつて未消化の蛋白質を除いた濾液についてフォルモル滴定を行うには、カゼインについてはその等電點を利用する方法を適當とし、これによつてある程度滴定の終點を明瞭にすることができ、その効果は期待した程ではないので、消化液について不溶解物がある場合に單にこれを除いた濾液についてフォルモル滴定を行つて消化程度を判定しうることを認めたのである。

この場合フェノールフタレインを指示薬とする滴定に於て pH 試験紙の助けによつて一定の pH まで滴定を行えばほぼ正確にその終點を得ることができる。本試験に於てはこの滴定基準を pH 6.4 とすることを適當と認めた。

(2) ペプトン製造最適條件決定試験

i) 消化温度 基質蛋白質 1g をとり pH を 1.8 としペプシンは 1/e g に相當する量を含む酵素液を加え温度を 36, 38, 40, 42, 44 及 46°C に保つて 1 時間作用せしめた後消化液についてフォルモル滴定を行つた。なお對照として酵素液の代りに同量の水を加えたものについて同様の滴定を行つた。

その結果は第 2 表に示すようにカゼイン及血清蛋白質にあつては 40°C、フィブリンでは 42~44°C であつた。

同一條件のもとに消化した溶液の濾液について實施し

第2表 フォルモル滴定法による最適条件決定試験成績

実験順位	供試液 No.	実験条件	フォルモル滴定値 cc		
			カゼイン	フィブリン	血清蛋白質
I. 消化温度 °C	0	—	2.0	1.5	1.5
	1	36	2.8	3.0	4.0
	2	38	4.0	3.0	4.3
	3	40	4.5	3.5	5.0
	4	42	3.5	4.0	4.3
	5	44	3.0	4.0	4.0
	6	46		3.5	
判定			40	42~44	40
II. 被消化液 pH	0	—	2.0	1.5	1.5
	1	1.4	3.0	2.5	4.0
	2	1.6	3.5	3.0	4.1
	3	1.8	4.0	3.5	4.9
	4	2.0	4.0	4.0	4.8
	5	2.2	3.5	3.0	4.5
判定			1.8~2.0	2.0	1.8~2.0
III. 添加酵素量 g	0	—	2.0	1.5	1.5
	1	1/10 e	3.0	2.5	3.5
	2	1/5 e	3.0	3.3	3.8
	3	1/2 e	3.5	3.5	4.0
	4	1/e	4.2	4.5	4.3
	5	2/e	4.5	5.5	5.0
判定					
IV. 消化時間 時間	0	—	2.0	1.5	1.5
	1	1	4.2	4.5	4.0
	2	2	4.5	4.3	4.2
	3	3	4.5	4.5	4.3
	4	5	4.8	5.0	4.5
	5	24	5.0	5.5	4.8
	6	48	7.3	6.5	6.0

たケルダール窒素定量法の結果も亦カゼインで 40°C, フィブリンで 42°C を最適条件とした。

なおこれら3種蛋白質の消化曲線は第1圖に示す通りである。

ii) pH 消化時の温度を前の実験において決定した最適温度とし, pH を 1.4, 1.6, 1.8, 2.0 及 2.2 として酵素量 1/e g を加え1時間作用せしめた後消化液についてフォルモル滴定を行つた。対照試験は前回と同様である。

その結果は第2表及第2圖に見るようカゼイン及血清蛋白質では pH 1.8~2.0 を, フィブリンでは pH 2.0

を最適条件とみなすことができるが, 窒素定量法によるカゼインでは pH 1.8 でフィブリンの場合も pH 1.8 であつた。即ちフィブリンの場合には

両方によつて異なつた結果を示したのであるが, これについては後述の考察の項に於て説明する。

iii) 酵素量 消化時の温度及 pH は前の実験に於て決定した最適条件とし, 酵素量を 1/10e, 1/5e, 1/2e, 1/e 及 2/e g として1時間作用せしめてから前と同様にしてフォルモル滴定を行つた。

その成績によれば第2表及第3圖に見るよう1時間の消化量はいずれも酵素量の増加と共に増加しているが, カゼイン及血清蛋白質が同じ傾向の消化曲線を示しているのに對して血液フィブリンが急昇線を示すことは

この原料が酵素量の少い時は比較的消化し難く量の増加

第1圖

第2圖

第3圖

第4圖

と共に急激に消化を始めることを示している。

iv) 消化時間 消化時の温度及 pH は前回と同様の條件に於て、酵素量を一定即ち 1/e g とし 1, 2, 3, 5, 24 及 48 時間消化を行つた結果、第 2 表及第 4 圖に示すように消化は最初の 3 時間に極めて速に行われることが明かとなつた。

v) 酵素量と時間 酵素量と時間については iii) 及 iv) の實驗によつては適當な條件を決定することができなかつたので、窒素定量法を用いて再検討することとした。即ち酵素量を色々に變え 1 時間から 24~48 時間の消化を行つて全窒素に對する消化性窒素(%)をカゼイン

第 3 表 酵素量と消化時間並に窒素定量法による蛋白質消化量との關係

供試液 No.	實驗條件		消化性窒素 %		
	酵素量 g	消化時間 時間	カゼイン	フィブリン	血清蛋白質
0	—	—	0	0	0
1	1/e	1	26.9	0	23.3
2	"	2	33.9	13.0	29.2
3	"	3	36.0	29.2	"
4	"	5	39.2	45.4	"
5	"	24	32.0	72.7	35.0
6	"	48	82.9	96.3	70.0
1	1/2e	1	0	0	
2	"	2	0	0	
3	"	3	4.9	2.2	
4	"	5	13.0	7.6	
5	"	24	39.2	29.2	
1	2/e	1	39.2	49.0	
2	"	2	60.5	56.3	
3	"	3	63.7	"	
4	"	5	70.0	67.0	
5	"	24	82.0	78.0

第 5 圖

及フィブリンについて定量した。なお酵素液の代りに同量の水を加えたものを對照とした。

これらの成績は第 3 表及第 5 圖に示す通りである。これによると時間と共に消化性窒素(%)も亦増加するがその曲線は次第に緩慢となつて来る。また酵素量を多く用うれば始めの間は消化量も多いが、カゼインの場合については 24 時間以上消化させれば酵素量 2/e と 1/e との間の差は殆んどなくなる。フィブリンの場合には酵素量 1/e で 48 時間作用させた方が適當と認められる。

vi) 酸濃度 この條件は實驗 ii) の pH と大いに関係があるが試みに最適條件の場合における被消化液の鹽酸濃度を計算して見た所、フィブリンで 0.2% 前後、カゼインで 0.3%, 血清蛋白質で 0.3%~0.35% であつて、この事實から消化のための最適酸度は鹽酸濃度として 0.2~0.35% の間にあると認定を下すことができた。

(3) 最適條件によるペプトン製造試驗

これまでの試験は基質蛋白質約 1% 溶液について行つたのであるが、次に原料の濃度を高くした場合の影響を検討すると共にペプトン製品の収量を比較する試験を行つた。

即ち原料 1, 5 及 10 g をとりこれまでに決定した最適條件に於て 48 時間消化を行つてから急冷し濾過又は遠心分離法によつて不溶解物を除いた後 100 cc に水で稀釋しその内から一定量をとりて固形分、全窒素及消化性窒素を定量した。この不溶解性の部分を除いた可溶性の全固形物をペプトン製品重量とし、この固形分及全窒素即ち可溶性窒素から原料に對する収量(%)を算出した。

これらの成績は第 4 表に示す通りである。但しカゼインについては一般には鹽酸のみを用い pH を調節して消化を行つたが、特に原料 5 g をとつたものについては一旦苛性ソーダに溶解後酸を加える場合と直接酸のみを加える場合とを比較検討してみた。

第 4 表によれば原料 1 g を用いた場合が最も良い収量を示し 5 g, 10 g を用いた場合のように濃度が増加するにつれて収量は減じて来るので工業的に製造する場合は 5% 程度が適當とみとめられる。またカゼインについては直接酸を加えるよりも一旦苛性ソーダに溶かしてから酸を加えて pH を調節した方が収量がよくなることが認められた。

最後にフィブリンを原料として 5% 程度の濃度において消化し乾燥ペプトン製品を試製した。即ち原料 100 g をとり鹽酸 1N 溶液と蒸留水とを以て pH 2.0 となし、これにペプシン 12 g (e = 8.3) に相當する酵素液を加

第4表 最適条件によるペプトン収量比較

	原 料		ペプトン製品 の収量		固形分 100 中 の割合 %		
	種類	量 g	ペプシン g	重量 g	百分比 %	全窒素	消化性 窒素
試	カ ゼ イ ン	1	1/e	0.98	100.00	12.80	10.37
		5	5/e	2.70	56.47	13.33	6.67
			NaOH	2.76	60.33	14.44	7.61
			添加	3.67	37.70	12.77	4.39
製	フ イ ブ リ ン	1	1/e	1.09	100.00	14.97	13.46
		5	5/e	5.20	"	13.55	7.50
			10/e	"	"	13.69	9.80
			10	10/e	7.71	69.27	10.97
品	血 清 蛋 白 質	1	1/e	1.05	100.00	12.21	9.63
		5	5/e	5.52	"	10.87	6.52
			10/e	5.72	"	11.01	9.44
			10	10/e	8.25	"	12.33
市 販 品				A	14.23	14.23	
				B	13.33	10.67	

え、40°C に 48 時間消化させてから急冷し、遠心分離によつて不溶解物を除き、苛性ソーダ 1N 溶液を加えて pH 7.0 にしたのち濃縮し、低温真空乾燥して粉末としたのであつて、この時の製品収量は 98% を示した。

この試製乾燥ペプトンを市販品 (A 及 B の 2 種) と分析¹¹⁾比較した所、水分は試製品及市販品 B は共に 10%、市販品 A は 17% であり、粗蛋白は試製品約 70%、市販品 A 73% 及 B 75% を示した。なお試製品の粗脂肪は 1.5%、灰分は 4.5% であつた。

次にこの試製品と市販品とについて窒素の分布を定量して第 5 表に示すような成績を得た。

第 5 表 ペプトン製品窒素分布表

窒素の種類	分 析 値 (g.N)			分析百分比 (%)		
	試製品	市販品 A	市販品 B	試製品	市販品 A	市販品 B
全 窒 素	0.1095	0.1181	0.1212	100.00	100.00	100.00
不 溶 性	0.0090	0.0005	0.0054	8.22	0.42	1.90
蛋 白 態	0.0325	0.0036	0.0228	29.68	3.05	18.30
アルブモース	0.0251	0.0026	—	22.92	2.20	—
ペプトン	0.0165	0.0036	0.0480	15.07	3.05	39.50
非蛋白態	0.0264	0.1078	0.0490	24.11	91.28	40.30

(4) フォルモル滴定法及窒素定量法に関する実験的考察

両者の方法により決定した最適条件は (2) の項に於て既に示したように両者共殆んど一致した成績を現わしている。

ただフィブリンの場合最適 pH がフォルモル滴定法では 2.0、窒素定量法では 1.8 となつてゐるが、窒素定量法によるペプトン製品収量を 1/10e g のペプシンを用いて行つた消化試験成績に照らして見ると pH 1.6 のとき 48.9%、1.8 のとき 51.5%、2.0 のとき 50.7%、2.2 のとき 46.5% と、1.8 と 2.0 との場合の差異は 1% にも満たない。

したがつて窒素定量法による最適 pH を 1.8~2.0 と認定することもでき、かうすればフォルモル滴定法の判定と完全に一致するのである。

以上の結果から蛋白質消化量の比較判定にはフォルモル滴定法で充分であり定量的に消化性窒素を知ろうとするときに始めて窒素定量法を用いれば良いということが断定できる。

IV. 総 括

ペプシンによる蛋白質分解のための最適条件は基質蛋白質の種類によつて相異なるが、3 種の蛋白質について行つた結果によれば最適温度はカゼイン及血清蛋白質では 40°C、フィブリンでは 42°C であつた。また最適 pH はいずれも 1.8~2.0 であり且その場合の鹽酸濃度は 0.2~0.35% を示した。

この条件決定にあつてはフォルモル滴定法を應用し簡単にできることを確めたが、この方法は滴定の終點がやゝ不明瞭であるから、比較實驗に當つては一定の滴定基準 (本實驗に於ては pH 6.4) を設けることを必要とする。この點を除けば操作が簡單で試薬が僅少という點で利用價值が大きい。

最適条件決定に引續いて酵素量と時間の變化に伴う消化程度の變化を追求し更に基質蛋白質溶液の濃度と消化程度の關係をも調査した。この結果蛋白質のペプシンによる消化は最初の 2~3 時間が最も速でありその後 5 時間頃迄は比較的速いが 24 時間または 48 時間後のペプトン生成量の間には大なる差異が認められない。これを工業的に實施する場合は 48 時間程度の消化が適當であろうということ、また基質濃度が増加するにつれて一定時間内におけるペプトンの収量は減少することが確認された。

なおカゼインについては酸のみを添加して pH を調節し消化を行うよりも、一旦アルカリ溶液に溶解してから酸を添加して消化を行う方が分解量を増大する。

最後に本實驗によつて決定した最適条件にもとづいて 3 種の蛋白質からペプトン製品を調製しその窒素化合物について市販品と比較検討を加えた。

(附記) 本研究は文部省科學研究費により遂行されたものである。
(昭 24. 5. 25 受付)

文 献

- 1) 加納清三 (1931): 近世有機化学講義, 下巻; 504.
- 2) V. S. SADIKOW (1925): Chem., Abst. 19; 2730.
- 3) V. S. SADIKOW (1932): Chem., Abst. 26; 1948.
- 4) 奥正己, 久保田嘉一郎 (1944): 農化, 20; 14A.
- 5) 西村資治 (1932): 農化, 8; 1323.
- 6) 大谷武夫 (1939): 實驗酵素化学; 2~11.
- 7) 伊地知廣 (1946): 畜産副生物工業; 1059.
- 8) C. OPPENHEIMER und L. PINCUSSEN (1928): Die Methodik der Fermente; 1048.
- 9) R. H. A. PLIMMER (1933): Practical Organic and Bio-chemistry; 469.
- 10) H. WASTENEY & H. BORSOOK (1924): J. Biol. Chem., 62; 1.
- 11) 東大農学部農藝化学教室 (1948): 農藝化学分析書, 上巻; 149.

Résumé

Several experiments to determine the best condition of the action of pepsin, to make peptone products from milk casein, blood fibrin and serum protein have been performed.

At first, as the result of inspecting the method to compare the degrees of digestion of casein by pepsin, it was recognized that the formol titration method was able to apply and profitable in this experiment for requiring short time and little reagents. The end point of the titration was able to make clear by adjusting the reaction of solution

as pH 6.4.

Then the best condition of temperature and reaction to digest the above mentioned three proteins by pepsin was examined using the formol titration method. It was decided that the optimum temperature was 40°C for casein and serum protein, and 42°C for fibrin. The optimum reaction was pH 1.8~2.0 for all samples.

The effect of different amount of enzyme, reaction period and concentration of protein solution for digestion degrees was investigated. It was found that the hydrolysis of each protein took place rapidly within 2 or 3 hours and then slowly. These was only little difference between the yields of peptone in digestion for 24 and 48 hours. In the practical purpose, it will be profitable to digest for 48 hours.

Next it was ascertained that the yields of peptone in the definite period decreased as the concentration of these protein solutions increased, and that concerned with casein, the amount of digested product increased much more in such substance as adjusted pH with addition of acid after dissolved in alkali solution than with addition of acid only.

At last peptones were prepared from 3 substrates according to the optimum conditions decided in this experiment and were compared with 2 market products about the distribution of nitrogen.

講演要旨

兎尿の防蟲効果に就いて (第1報) 谷中 脩・池田 浩 (農大)

家兎尿が防蟲効果を有する事は古來より喋々され來つたが、いまだこの問題に関する實驗的研究が少いので、著者等は (1) 原尿のまゝに於ける防蟲効果, (2) 稀釋した場合に於ける防蟲効果, (3) 簡單なる加工操作に依りその効果を増大せしむるや否や、以上3點に主眼を置きこれに附隨して藥害の有無を試験せり。

第1試験—未處理原尿に依る赤二十日大根に對する防蟲効果試験。

試験區に原尿を毎日7時に噴霧し18時に試験區、對照區の供試作物に對する「モンシロテフ」の産卵個數を計測せり。本試験に於て試験區は對照區の26.7%の産卵率にて明かに防蟲効果を認めた。

第2試験—未處理尿並に加工尿に依る防蟲効果試験。供試作物、美濃早生大根。

試験區は (1) 未處理尿區, (2) 加工尿區 a (原尿+濃硫酸+水道水), b (原尿+無水醋酸+水道水),

對照區 a' (濃硫酸+水道水), b' (無水醋酸+水道水), c' (テリス劑+水道水), d' (水道水), e' (無處理) に別ち、キスジノミハムシ、コホロギ、ホタルハムシの附着瘡害狀況、藥害の比較試験を行へり。

防蟲効果はテリス劑區 (c') 卅, 原尿+濃硫酸區 (a) 卅, 原尿+醋酸區 (b), 未處理尿區が 卅, 硫酸區 (a') +, 醋酸區 ± となり、藥害は醋酸區 (b'), 硫酸區 (a'), 原尿+醋酸區 (b) が 卅 であつた。

本試験の結果より兎尿は明かに供試昆蟲に對し忌避的防蟲効果を有する事明かである。

以上2實驗を綜合して兎尿はモンシロテフ、キタルハムシ、キスジノミハムシ、コホロギに對し効果を有する事は明かで、從來の俗説が正しい事が、實驗的に證明せられた。然し尿中の何が有効成分として作用するや、又昆蟲に對して如何なる生理障礙を發せさせるやは不明であり、これらは今後の研究にまたねばならぬ。 (昭 23. 11. 13)