

## 4-ピリジンカルボン酸–1,3-ジメチルバルビツール酸発色を用いる簡易型 三流路フローインジェクション分析によるシアン化物イオンの定量

尾崎 成子, 中村 栄子\*

横浜国立大学大学院環境情報研究院 : 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-7

### Determination of Cyanide with 4-Pyridinecarboxylic acid and 1,3-Dimethylbarbituric acid Using Simplified Three-channel Flow Injection Analysis

Shigeo Ozaki and Eiko Nakamura

Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National University,  
79-7 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240-8501, Japan.

A flow injection method for cyanide determination was studied using a compact manifold, which is an all-in-one pump, injector, thermostat and detector. It is based on König reaction of  $\text{ClCN}$  with 4-pyridinecarboxylic acid and 1,3-dimethylbarbituric acid to give blue compound. The absorbance was measured at 605 nm. The chemical factors and FIA variables influencing color development were examined. The constant and maximum absorbance was obtained at a flow rate of  $0.76 \text{ mL min}^{-1}$  and a reaction temperature of  $50^\circ\text{C}$ , when 0.3 M phosphate buffer solution of pH 6 containing chloramine T ( $0.1 \text{ g L}^{-1}$ ) and 4-pyridinecarboxylic acid (0.1 M) – 1,3-dimethylbarbituric acid (0.05 M) mixed solution were used as reagent solutions. Under optimum conditions, with  $100 \mu\text{L}$  sample injection the calibration graph was linear from 0 to  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  of cyanide. The relative standard deviation was 2 % ( $n = 10$ ) at the  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  level. The detection limit and determination limit were  $1.5 \text{ ng mL}^{-1}$  ( $3\sigma$ ) and  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  ( $10\sigma$ ), respectively. The sampling rate was  $20 \text{ h}^{-1}$ . The proposed method enable to determine cyanide at even lower levels ( $< 50 \text{ ng mL}^{-1}$ ) in a shorter measurement time. This method could be applied to aqueous samples such as the extracts from soil.

**Keywords** cyanide determination; 4- pyridinecarboxylic acid, 1,3-dimethylbarbituric acid; flow injection analysis

#### 1. 緒言

水中のシアン化物イオン ( $\text{CN}^-$ ) の定量には König 反応に基づく吸光度法が広く用いられ、排水や土壌溶出液中のシアン化合物の分析の公定法や標準法にも採用されている [1-3]。König 反応では、 $\text{CN}^-$  が塩素化剤クロラミン T と反応して塩化シアンとなり、さらにこれがピリジンあるいは 4-ピリジンカルボン酸と反応してグルタコンアルデヒドを生成し、これと 3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロン (以下ピラゾロンという) あるいはバルビツール酸 (あるいはその誘導体) が縮合して生成する青色化合物の吸光度を測定する。

この発色反応は  $\text{CN}^-$  のフローインジェクション分析 (FIA) にも利用されている [3-17]。何通りかの発色試薬の組み合わせが可能であるが、ピリジンは悪臭があり、また、ピラゾロンは水に不溶なため N, N-ジメチルホルムアミドのような有機溶媒を使用しなくてはならないという欠点がある。それに対して 4-ピリジンカルボン酸のナトリウム塩は水に易溶であり、バルビツール酸誘導体である 1,3-ジメチルバルビツール酸はアルカリ性水溶液に溶ける。いずれの試薬も市販されており、試薬溶液の調製が容易である。

さらに、4-ピリジンカルボン酸–1,3-ジメチルバルビツール酸混合溶液は非常に安定であり、常温で長期間保存でき [18,19]、これを用いた場合は、発色速度、発色強度が大きいことが報告されている [19]。本研究では、発色試薬の組み合わせとして 4-ピリジンカルボン酸–1,3-ジメチルバルビツール酸を選択した。

この発色試薬の組み合わせを用いた方法は既に提案されているが [4,10,15,17]、これらのシステムは UV 分解や蒸留などの前処理ユニットを除いても 4 流路以上の系であり、複数台の送液ポンプ、反応恒温槽、分光光度検出器などで構成される高コストの FIA システムである。それに対して、本研究で用いる FIA 装置は、従来型の FIA システムとは異なり、コンパクトかつ低コストの簡易型 FIA 装置である。小型三連ペリスタポンプは少スペース ( $5 \text{ cm W} \times 4 \text{ cm D} \times 10 \text{ cm H}$ ) に収まるので本体と一体化している。LED、光学フィルターおよびフォトダイオードを使用した小型円筒形吸光検出器 ( $\phi 3 \text{ cm} \times 6 \text{ cm}$ ) は反応コイルとともに恒温槽内に収まる。

FIA 法は 1989 年「フローインジェクション分析通則」(JIS K 0126) として規格化された (2001 年に改正)。この通則

は 2009 年「流れ分析通則」と名称を変えて、連続流れ分析 (CFA) を含めて統合・改正された。流れ分析の JIS 化への強い要望は、流れ分析が広く利用されていることを裏付ける。さらに、アンモニア体窒素、亜硝酸体窒素及び硝酸体窒素、全窒素、リン酸イオン及び全リン、フェノール類、フッ素化合物、クロム (VI)、陰イオン界面活性剤、シアン化合物の 9 物質を分析対象とする「流れ分析法による水質試験方法」の個別規格化が行われた (2011 年)。シアン化合物の流れ分析法を定めた個別 JIS では、CFA に用いる発色法の選択肢として ISO 規格の 4-ピリジンカルボン酸-1,3-ジメチルバルビツール酸法も採用されたが、FIA に用いる発色試薬は 4-ピリジンカルボン酸-ピラゾロンの組み合わせのみである[20]。国際規格である ISO 法との整合化も大きな課題である。

このような動向も踏まえつつ、本研究では、4-ピリジンカルボン酸-1,3-ジメチルバルビツール酸発色を用いた簡易型 FIA 装置による CN の分析条件を詳細に検討することとした。

## 2. 実験

### 2.1 試薬

シアン化カリウム標準溶液 (CN<sup>-</sup>濃度として 100 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) : シアン化カリウム (和光純薬特級) 0.254g を 0.1M 水酸化ナトリウム溶液に溶かして 1L とした。これを適宜 0.1M 水酸化ナトリウム溶液で希釈して使用した。

緩衝液 : リン酸水素二ナトリウム 21.3g を水に溶かして 500mL とした。このリン酸水素二ナトリウム水溶液に、リン酸二水素カリウム 20.4g を水に溶かして 500mL としたリン酸二水素カリウム水溶液を pH6 になるまで加えた (用いたリン酸塩はいずれも純正化学特級)。

クロラミン T 溶液 (10g L<sup>-1</sup>) : クロラミン T 三水和物 (和光純薬特級) 1.24g を水に溶かして 100mL とした。

緩衝液-クロラミン T 混合溶液 : 上記で調製した緩衝液 100mL につきクロラミン T 溶液 (10g L<sup>-1</sup>) 1mL を添加した。

4-ピリジンカルボン酸-1,3-ジメチルバルビツール酸混合溶液 : 4-ピリジンカルボン酸ナトリウム (和光純薬シアン定量用) 14.5g および 1,3-ジメチルバルビツール酸 (東京化成工業 EP) 7.8g を 0.1M 水酸化ナトリウム溶液に溶かして 1L とした。

### 2.2 装置

Fig. 1 に簡易型三流路 FIA 装置のダイアグラムを示す。送液部、サンプル注入部、反応部および検出部が一体化された (株) 小川商会製 OG-FI-300S を使用した。

送液部の三連ペリスタポンプには内径 1.0mm $\times$ 10cm のファームドチューブを用いた。反応コイルは内径 0.5mm のテフロンチューブを用いた。出口に内径 0.25mm $\times$ 1m の背圧コイルを接続した。光路長 1cm のフローセル、白色 LED 光源、フォトダイオード検出器を備えた検出部に 605nm 光学フィルターをセットして吸光度を測定した。

記録計 (パントス製ユニコーダ U-228) を接続して、フローシグナルを記録した。

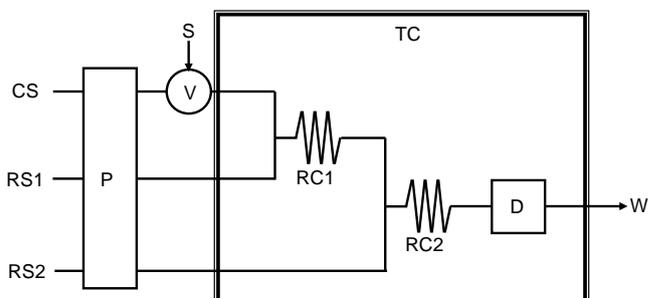


Fig. 1 Flow diagram for cyanide determination

CS: H<sub>2</sub>O; RS1: chloramine T (0.1 g L<sup>-1</sup>) in KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> solution (pH 6.0); RS2: 4-pyridinecarboxylic acid (0.1 M)-1,3-dimethylbarbituric acid (0.05M) mixed solution; P: peristaltic pump (0.76 mL min<sup>-1</sup>); S: sample (100 $\mu$ L); V: six-port injection valve; RC1: reaction coil 1 (0.5 mm i.d.  $\times$  2 m); RC2: reaction coil 2 (0.5 mm i.d.  $\times$  3 m); TC: thermostatic chamber (50 $^{\circ}$ C); D: photometric detector (605 nm); W: waste

### 2.3 分析条件の検討および定量操作

最初に、流量の検討に用いた分析条件は、4-ピリジンカルボン酸-1,3-ジメチルバルビツール酸発色による FIA 法を定めた ISO 規格[4]を参考にした。しかし、ISO 法は 4 流路系であり、本法は 3 流路系であるので、試薬溶液濃度など一部変えたところがある。試薬溶液 1 (RS1) の緩衝液にコハク酸塩緩衝液 (pH 4.3) を用い、コハク酸塩濃度を 0.3 M とした。また、試薬溶液 2 (RS2) の 4-ピリジンカルボン酸および 1,3-ジメチルバルビツール酸の濃度は各 0.1 M とした。反応温度は ISO 法では 65 $^{\circ}$ C であるが、使用した装置は 60 $^{\circ}$ C より高い温度設定ができないため、温度は最高使用温度の 60 $^{\circ}$ C とした。

以後、分析条件を 1 つずつ変えて発色に及ぼす影響を詳細に検討した。

Fig. 1 には検討の結果決定した分析条件を示す。

キャリアー溶液 (CS) を水、RS1 を 0.3 M リン酸塩緩衝液 (pH 6) -クロラミン T (0.1g L<sup>-1</sup>) 混合溶液、RS2 を 4-ピリジンカルボン酸 (0.1 M) -1,3-ジメチルバルビツール酸 (0.05 M) 混合溶液とした。ペリスタポンプ回転数 10 rpm

(流量  $0.76 \text{ mL min}^{-1}$ ) で送液した。サンプルインジェクター ( $100\mu\text{L}$ ) より試料溶液を注入し、まず RS1 と混合、反応コイル 1 (RC1:  $0.5 \text{ mm i.d.} \times 2 \text{ m}$ ) で試料溶液中の CN とクロラミン T を反応させて塩化シアンを生成させた。次いで RS2 と混合、反応コイル 2 (RC2:  $0.5 \text{ mm i.d.} \times 3 \text{ m}$ ) で発色試薬と反応させて、ピリジン環の開環および 1,3-ジメチルバルビツール酸との縮合による青色化合物を生成させた。検出部のフローセルを通して  $605 \text{ nm}$  における吸光度を測定した。混合、反応、吸光度測定は  $50^\circ\text{C}$  で行った。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 流量および反応コイルの長さの影響

あらかじめ求めたペリスタポンプの回転数と流量の関係は良い直線性を示し、流量 ( $\text{mL min}^{-1}$ ) =  $0.076 \times$  毎分回転数 (rpm) であった。ポンプの回転数を  $5 \sim 15 \text{ rpm}$  と変化させたときの吸光度への影響を Fig. 2 に示す。12 rpm まではほぼ一定の吸光度が得られたが、15 rpm では吸光度は低下した。これは、流量が大きいため発色反応が十分に起こらないためと考えられた。よって送液ポンプの回転数を 10rpm、すなわち流量を  $0.76 \text{ mL min}^{-1}$  とした。

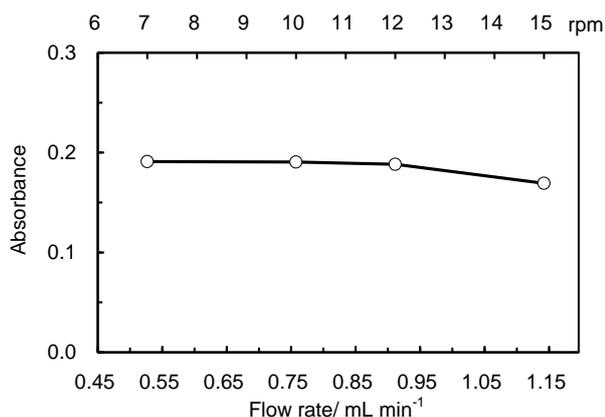


Fig. 2 Effect of flow rate

CN:  $200 \text{ ng mL}^{-1}$ ; CS:  $\text{H}_2\text{O}$ ; RS1: chloramine T ( $0.1 \text{ g L}^{-1}$ ) in  $(\text{CH}_2\text{COOH})_2\text{-NaOH}$  solution (pH4.3); RS2: 4-pyridinecarboxylic acid ( $0.1\text{M}$ )-1,3-dimethylbarbituric acid ( $0.1 \text{ M}$ ) mixed solution; Temperature:  $60^\circ\text{C}$ ; RC1:  $2 \text{ m}$ ; RC2:  $3 \text{ m}$

反応コイルの長さの影響を調べたところ、RC1 の長さが  $1 \text{ m}$  では、発色の低下とピークの割れが観測されたため、RC1 の長さは  $2 \text{ m}$  とした。また RC2 の長さが  $2 \text{ m}$  では、流量を大きくするとピーク (吸光度) が著しく小さくなり、 $15 \text{ rpm}$  ( $1.14 \text{ mL min}^{-1}$ ) のときのピークの高さは  $10 \text{ rpm}$  ( $0.76 \text{ mL min}^{-1}$ ) のときの約 65% まで減少した。よって RC2 の長さは  $3 \text{ m}$  とした。

#### 3.2 温度の影響

反応恒温槽の温度を  $35 \sim 60^\circ\text{C}$  と変化させたときの吸光度への影響を Fig. 3 に示す。 $55^\circ\text{C}$ 、 $60^\circ\text{C}$  で吸光度が減少しているのは、最大発色に達した後、退色が起こっているためと考えられた。 $50^\circ\text{C}$  で最も高い吸光度が得られたので、恒温槽温度  $50^\circ\text{C}$  で分析することとした。

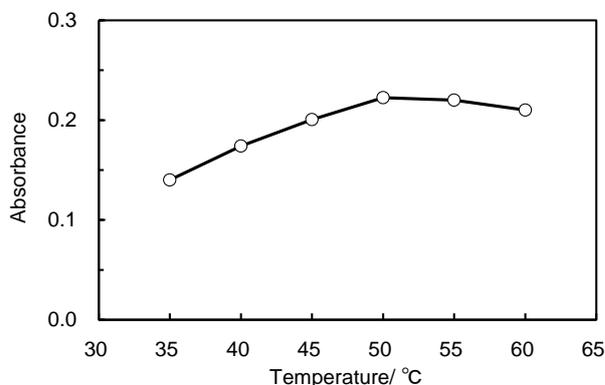


Fig. 3 Effect of reaction temperature

CN:  $200 \text{ ng mL}^{-1}$ ; CS:  $\text{H}_2\text{O}$ ; RS1: chloramine T ( $0.1 \text{ g L}^{-1}$ ) in  $(\text{CH}_2\text{COOH})_2\text{-NaOH}$  solution (pH4.3); RS2: 4-pyridinecarboxylic acid ( $0.1\text{M}$ )-1,3-dimethylbarbituric acid ( $0.1 \text{ M}$ ) mixed solution; P:  $0.76 \text{ mL min}^{-1}$ ; RC1:  $2 \text{ m}$ ; RC2:  $3 \text{ m}$

#### 3.3 緩衝液の pH および濃度の影響

pH の検討には、リン酸 (1+24)  $25 \text{ mL}$  に水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を調整し水で  $50 \text{ mL}$  とした緩衝液を用いた。RS1 の緩衝液の pH を  $4 \sim 7.5$  と変化させたときの吸光度への影響を Fig. 4 に示す。

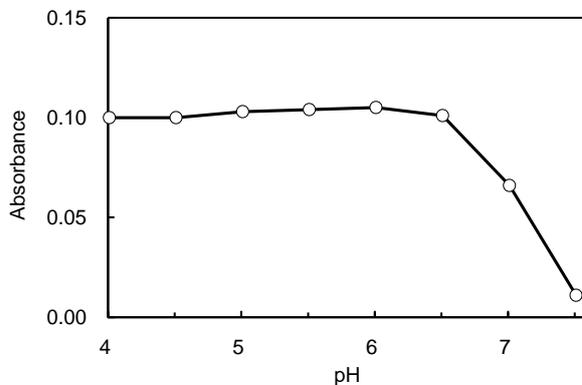


Fig. 4 Effect of buffer solution pH

CN:  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ ; CS:  $\text{H}_2\text{O}$ ; RS1: chloramine T ( $0.1 \text{ g L}^{-1}$ ) in  $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-NaOH}$  solution; RS2: 4-pyridinecarboxylic acid ( $0.1\text{M}$ )-1,3-dimethylbarbituric acid ( $0.1 \text{ M}$ ) mixed solution; Temperature:  $50^\circ\text{C}$ ; P:  $0.76 \text{ mL min}^{-1}$ ; RC1:  $2 \text{ m}$ ; RC2:  $3 \text{ m}$

pH 6.5 以上では吸光度が急激に減少し、アルカリ性では発色がみられなかった。pH が高いと生成した塩化シアンが分解し、発色反応が進まないためと考えられた[21]。pH 4 ~6.5 でほぼ一定の吸光度が得られたので、RS1 の緩衝液の pH を 6 とした。

また、緩衝液の濃度を 0.1~0.3 M と変化させて発色への影響を検討したところ、0.25 M 以上ではほぼ一定の吸光度が得られた。緩衝液濃度 0.1 M では、吸光度は 0.25 M のときの約 60% と低く、緩衝能が十分でなかったと考えられた。よって、RS1 のリン酸二水素カリウム-リン酸水素二ナトリウム緩衝液 (pH 6) は 0.3 M の濃度を用いることとした。

### 3.4 RS2 中の 4-ピリジンカルボン酸および 1,3-ジメチルバルビツール酸濃度の影響

RS2 中の 4-ピリジンカルボン酸濃度を 0.1 M として、1,3-ジメチルバルビツール酸濃度を 0.01~0.1 M と変化させたときの吸光度への影響を Fig. 5 に示す。1,3-ジメチルバルビツール酸濃度が 0.04 M より低いと吸光度は減少したが、0.04 M 以上では一定最大の吸光度が得られた。

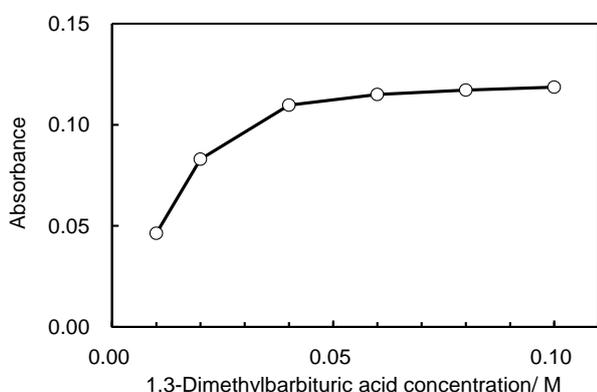


Fig. 5 Effect of 1,3-dimethylbarbituric acid concentration in RS2

CN: 100 ng mL<sup>-1</sup>; CS: H<sub>2</sub>O; RS1: chloramine T (0.1 g L<sup>-1</sup>) in KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> solution (pH 6); RS2: 4-pyridinecarboxylic acid (0.1 M)-1,3-dimethylbarbituric acid mixed solution; Temperature: 50°C; P: 0.76 mL min<sup>-1</sup>; RC1: 2 m; RC2: 3 m

次に RS2 中の 1,3-ジメチルバルビツール酸濃度を 0.05 M として、4-ピリジンカルボン酸濃度を 0.05~0.2 M と変化させて発色への影響を検討したところ、4-ピリジンカルボン酸濃度が 0.1 M より低いと吸光度の減少がみられ、一方、0.1~0.2 M では吸光度はほぼ一定であった。

発色溶液中の 2 つの試薬のいずれもの濃度が発色に大きく影響することは、バッチ法による分析条件の検討結果からも明らかになっている[18,19]。それぞれの発色試薬の濃度が大きくなると反応は速くなる。一方、発色試薬のい

れの濃度が小さくても発色、すなわち青色縮合化合物の生成に時間がかかる。4-ピリジンカルボン酸濃度が 0.1 M より低いとき、また 1,3-ジメチルバルビツール酸濃度が 0.04 M より低いときの吸光度の減少は、青色化合物の生成が遅いことによるものと考えられた。

よって、RS2 の 4-ピリジンカルボン酸濃度を 0.1 M、1,3-ジメチルバルビツール酸濃度を 0.05 M とした。

### 3.5 フローシグナル

検討の結果定めた分析条件で、シアン化カリウム標準溶液をサンプルインジェクターから注入すると、試料注入から約 2 分間にピークシグナルが観測される (Fig. 6 右)。

一方、発色の時間変化を調べたバッチ法での結果は、25°C、約 10 分間で最大発色に達し、2 分間でも吸光度は最大吸光度の約 60% の値を示した[19]。本法では 50°C で反応を行っており、2 分間で得られる吸光度は 25°C のときより高く、反応温度の上昇に伴う吸光度の増加 (Fig. 3) を考慮すると、約 2 分間で 90% 以上発色していると推定される。

### 3.6 検量線

CN 濃度として 4~500 ng mL<sup>-1</sup> のシアン化カリウム標準溶液をサンプルインジェクターから 100 μL 注入して、定めた分析条件で検量線を作成したところ、CN 濃度 (x ng mL<sup>-1</sup>) と吸光度 (y) との間に良好な直線関係が得られ、 $y = 0.0010x + 0.0002$  ( $R^2 = 0.9997$ ) であった。

また、Fig. 6 に示すように、50 ng mL<sup>-1</sup> 以下の低濃度の CN も、記録計の感度を大きくすることによって、濃度と吸光度との間の良好な直線関係が得られ、高感度で定量できることがわかった。

相対標準偏差 ( $n = 10$ ) は 100 ng mL<sup>-1</sup> で 2%、20 ng mL<sup>-1</sup> で 4% であった。検出限界 ( $3\sigma$ ) および定量下限 ( $10\sigma$ ) はそれぞれ 1.5 および 5 ng mL<sup>-1</sup> であった。試料処理速度は 20 h<sup>-1</sup> であった。

JIS[1]に定める吸光度法 (JIS 法) に比べて、1/10 まで低い濃度の CN を同程度の精度で定量できる。

また、JIS 法では最大かつ一定な発色を得るのに 30 分間を必要とするが、本法の FIA 法によれば、約 2 分間の発色を検出すればよいので、分析時間も 1/15 に短縮できる。

### 3.7 土壌溶出量試験への適用

関東ローム土および黒ぼく土からそれぞれ調製された 2 種類の土壌溶出量試験液を用いて、土壌溶出量試験[22,23]に本法を適用した。

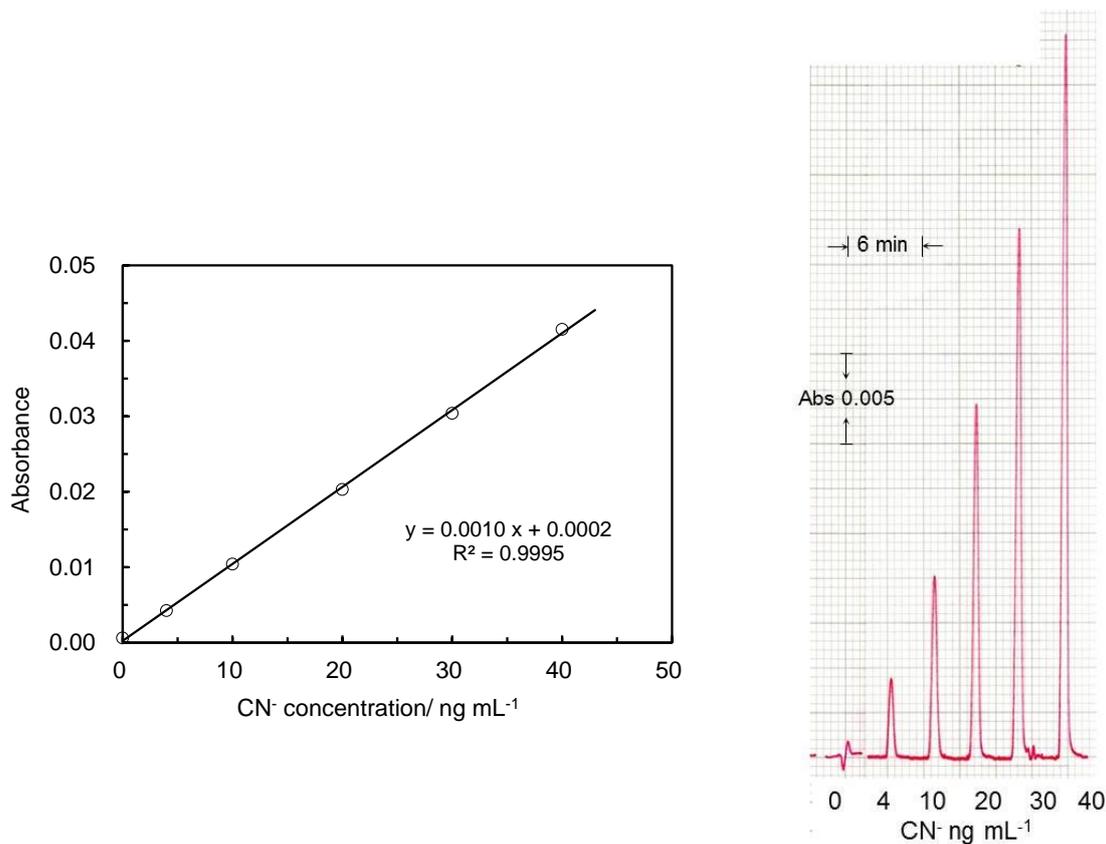


Fig. 6 Calibration curve for cyanide determination in the range of 0-50 ng mL<sup>-1</sup> (left) and typical flow signals (right)

溶出量試験液をリン酸酸性下で加熱蒸留して得られた留出液中の CN<sup>-</sup>を定量して全シアン分析を行ったところ、用いた関東ローム土および黒ぼく土の溶出量試験液から全シアンは不検出であった。また、これら土壌溶出量試験液を用いて添加回収実験を行ったところ、回収率は関東ローム土試験液で 98~104%、黒ぼく土試験液で 94~98%と良好な結果が得られた (Table 1)。

Table 1 Results for recovery test using the water extract from soils

Sample <sup>a)</sup>	Spiked CN <sup>-</sup> / μg	Found CN <sup>-</sup> / μg	Recovery, %
Kanto loam	0.00	n. d.	—
	0.25	0.252	101
	1.00	1.04	104
	5.00	4.89	98
Andosol	0.00	n. d.	—
	0.25	0.237	95
	1.00	0.98	98
	5.00	4.68	94

a) taken at Yokohama National University

#### 4. 結言

4-ピリジンカルボン酸-1,3-ジメチルバルビツール酸発色法を用いた簡易型三流路 FIA による CN<sup>-</sup>の迅速・簡便、かつ高感度定量のための分析条件を確立することができた。本法の土壌溶出量試験液への適用が可能なが示唆され、本法が土壌試験の迅速化・簡便化に有用であると考えられる。

本研究は、環境省環境研究・技術開発推進費（戦略指定）課題 B-0914「土壌無機汚染物質の迅速・低コスト分析システムの開発」によった。

#### 文献

- [1] JIS K 0102, 工場排水試験方法 (2008).
- [2] ISO 6703, Water Quality-Determination of Cyanide- (1984).
- [3] AWWA, WEF, APHA: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 4500-CN<sup>-</sup>, 21st ed. (2005).
- [4] ISO/CD 14403-1, Water quality-Determination of total cyanide and free cyanide using flow analysis-Part 1

- (2008).
- [5] A. Rios, M. D. Luque de Castro, M. Valcarcel: *Talanta*, **31**, 673 (1984).
- [6] Z. Zhu, Z. Fang: *Anal. Chim. Acta*, **198**, 25 (1987).
- [7] A. Tanaka, K. Mashiba, T. Deguchi: *Anal. Chim. Acta*, **214**, 259 (1988).
- [8] E. Figuerola, A. Florido, M. Aguilar, J. de Pablo: *Fresenius J. Anal. Chem.*, **331**, 620 (1988).
- [9] J. A. Sweileh: *Anal. Chim. Acta*, **220**, 65 (1989).
- [10] J. C. L. Meeussen, E. J. M. Temminghoff, M. G. Keizer, I. Novozamsky: *Analyst*, **114**, 959 (1989).
- [11] N. P. Kelada: *J. Wat. Poll. Contr. Fed.*, **61**, 350 (1989).
- [12] G. Schondorf, H. Engelhardt: *Fresenius J. Anal. Chem.*, **333**, 719 (1989).
- [13] P. Marion, M. C. Rouillier, V. Blet, M. N. Pons: *Anal. Chim. Acta*, **238**, 117 (1990).
- [14] V. Kuban: *Anal. Chim. Acta*, **259**, 45 (1992).
- [15] J. C. L. Meeussen, M. G. Keizer, W. D. Lukassen: *Analyst*, **117**, 1009 (1992).
- [16] H. Ma, J. Liu: *Anal. Chim. Acta*, **261**, 247 (1992).
- [17] B. Sun, B. N. Nollar: *Water Res.*, **32**, 3698 (1998).
- [18] 中村栄子, 八木美千子: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 55 (2000).
- [19] 中村栄子, 須永聖子: 工業用水, **529**, 21 (2002).
- [20] JIS K 0170, 流れ分析法による水質試験方法 (2011).
- [21] 中村栄子, 三上智子, 並木博: 工業用水, **238**, 44 (1978).
- [22] 環境庁告示第 46 号, 付表, 平成 3 年.
- [23] 環境省告示第 18 号, 平成 15 年.

(受付 2011 年 4 月 7 日)

(受理 2011 年 5 月 13 日)