

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)  
分担研究報告書

(3)食品中ダイオキシン類分析の迅速化・信頼性向上に関する研究  
(3-2)食品中ダイオキシン類分析における高速溶媒抽出法の応用に関する研究  
—植物性食品の迅速抽出への応用—

分担研究者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

**研究要旨**

食品中のダイオキシン類分析方法の迅速化を主たる目的として、高速溶媒抽出法(以下 ASE )について検討を行った。平成 16 年度は植物性食品試料を対象に検討した。国内産乾海苔の粉末を用いて ASE と従来法(アセトン・ヘキサン溶媒振とう法)とのダイオキシン類定量値の比較を行った。ASE を使用した場合の定量値の再現性は従来法とほぼ同様であった。一方、各異性体の定量値は ASE の方が従来法よりも 1.1 ~ 3.2 倍の高値を示し、ASE の抽出効率の方が高いと推察された。また、植物性食品 21 試料における ASE 適用時のダイオキシン類のクリーンアップスパイクの回収率は 45 ~ 116% であり、「食品中のダイオキシン類及びコプラナー PCBs の測定方法暫定ガイドライン」の要求事項(40 ~ 120%)に適合していた。以上の結果から、ASE は植物性食品試料におけるダイオキシン類の迅速かつ精密な抽出方法として使用することが可能と考えられる。

研究協力者

福岡県保健環境研究所

堀 就英、飛石和大、中川礼子、飯田隆雄

**A. 研究目的**

環境中のダイオキシン類は食物連鎖を通じて生物濃縮され、最終的には主に食事を介してヒトへ取り込まれる。耐容一日摂取量、すなわちヒトに対する長期間曝露の許容量は、体重 1 kg あたり 4 pg ( pg (ピコグラム)は一兆分の一グラム)まで、という非常に僅かな量であり、食品汚染に関する分析調査においては、この「極微量」を高い精度で計測することが要求されている。

現在の食品中ダイオキシン類分析の問題点のひとつとして、分析結果を得るまでに長時間を要することが挙げられる。とりわけ抽出操作は煩雑で一度に処理できる試料の数は極めて限られたものとなっており、食品汚染の把握すなわちモニタリングという観点から、迅速で簡便な抽出方法の開発が望まれている。

迅速な分析方法の開発は、健康危機管理という観点からも非常に重要である。環境汚染と食品汚染は密接に関わり、海外では畜産物が汚染飼

料を通じて高濃度に汚染され、社会問題となった。国内においても農作物の汚染報道をきっかけに起こった風評被害は未だ記憶に新しいところである<sup>2)</sup>。最近も個別の事業所からの局所的なダイオキシン汚染等、大規模な食品汚染問題に発展しかねない事例が発生しており<sup>3)</sup>、「食品とダイオキシン」に関わる緊急事態に速やかに対応するため、迅速分析法の確立が待望されている。

そこで本研究では、食品中ダイオキシン類の分析操作、特に抽出操作に着目し、ダイオキシン類の分析方法の効率化・迅速化について検討した。

**B. 研究方法**

**1. 試料**

実験に用いた植物性食品はすべて国内の小売店で購入し、可食部をフードプロセッサーで均一化し、分析試料とした。試験法のバリデーションに用いた乾海苔は粉末に加工し、十分に均一化して用いた。

**2. 抽出**

高速溶媒抽出(以下 ASE )には ASE-300 ( DIONEX 社製)を用いた。抽出条件は以下の

通りである。

抽出セル容量：99 ml、捕集バイアル容量：200 ml、圧力：1,500 psi、加熱時間：7分、静置時間：10分、フラッシュ容積：セル容量の30%、パージ時間：150秒、静置サイクル数：2回、1検体当たりの合計抽出時間：約30分

試料分散剤(珪藻土)は International Sorbent Technology 社製 BULK ISOLUTE SORBENT ISOLUTE HM-Nを同条件で2回洗浄したものをを用いた。

均一化した試料(20g)を200ml容テフロン製遠沈管に正確に量り取り、珪藻土を乾燥試料においては約10g、水分の多い試料では約30g加え、よく混合した。混合物を抽出用セル(99ml)に移し、セルの上端まで珪藻土を加えた後、クリーンアップスパイクを添加し抽出に供した。

アセトン・ヘキサン溶媒振とう抽出は「食品中のダイオキシン類及びコプラナー PCBs の測定方法暫定ガイドライン」(厚生省、1999年)に従って行った。抽出に用いる溶媒量は乾海苔の場合 300ml×2(計600ml)、その他の試料では200ml×2(計400ml)とした。

試料の抽出及び精製操作を図1にまとめた。

### 3. 試薬及び測定装置

ダイオキシン類標準品は Wellington Laboratories 製を、アセトン、*n*-ヘキサン、トルエン、ジクロロメタン、無水硫酸ナトリウムは関東化学(株)製のダイオキシン類分析用を用いた。多層シリカゲルカラム用の各種充填剤は和光純薬(株)製を用いた。活性炭カラムクロマトグラフィーには、活性炭(ナカライテスク社製)をトルエンで約30時間還流洗浄し、無水硫酸ナトリウムに対して0.1%(w/w)になるよう混合したものをを用いた。活性炭シリカゲルカラムには、関東化学社製の活性炭分散シリカゲルを用いた。試料中の PCDDs (7種類)、PCDFs (10種類)、ノンオルトコプラナー PCBs (4種類)の同定・定量には、溶媒除去大容量注入装置(SCLV injection system、SGE社製)を装着した HP 6890GC / Micromass AUTOSPEC ULTIMA 型高分解能ガスクロマトグラフ/質量分析計(以下高分解能 GC/MS)を用いた。モノオルトコプラナー PCBs (8種類)の測定

は高分解能 GC/MS を用いてスプリットレスインジェクション方式で行った。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 迅速分析方法開発のスキーム

我が国における食品中ダイオキシン類分析方法の標準は「食品中のダイオキシン類及びコプラナー PCBs の測定方法暫定ガイドライン」(以下「ガイドライン」)である。ガイドラインでは、野菜・果実等の植物性食品の試験方法として「アセトン・ヘキサン溶媒振とう抽出法」(以下溶媒振とう抽出)が記載されている。またガイドラインに示された以外の手法でも、ガイドラインの要件を満たすことが実証され、分析精度が十分に確保されていれば、これを使用することができる。

溶媒振とう抽出の難点として、①抽出に長時間を要する(計2時間)、②分析一回あたりの試料採取量が多く、抽出に多量の溶媒を必要とする(試料100gに対し400ml)、③使用するガラス器具のサイズが大きく取り扱いが不便である、等が挙げられる。

ガイドラインが要求する検出下限値は0.01~1pg/gである。これらの検出下限を達成するためには、従前の測定機器の感度から考察すると、一回の抽出に概ね100g以上の試料が必要である。これは食品のダイオキシン分析が多く労力、時間を必要とする所以であり、従って測定機器の高感度化は分析操作の迅速・効率化に最も効果的な手段といえる。そこで本研究では、GC/MSに溶媒除去大容量注入装置を装着し、従来の1/5量の20gの食品試料から、従来法と同等またはそれ以上の感度でダイオキシン類を検出・同定できる測定系を用い<sup>4,5)</sup>、迅速抽出法の検討を行うこととした。

今回、食品中ダイオキシン類の新規抽出方法として採り上げた ASE は既に米国公定法 EPA メソッド 3545 に PFE ( Pressurized Fluid Extraction )として環境中の多環芳香族化合物等の抽出方法に採用されている。また土壌や底質のダイオキシン類迅速抽出方法として応用が試みられている<sup>6,7)</sup>。本抽出法の利点は従来法と比較して短時間で溶媒使用量も少なく、自動化が出来るという効率性にある。ASEの食品中ダイオ

キシシン類分析への適用例は国内外で僅かであり<sup>89)</sup>、その適用性を精査した例は殆ど見当たらない。そこで食品試料におけるダイオキシシン類の抽出方法として ASE が使用できるか否か、本年度は植物性食品を対象に検討した。

まず同一の食品試料を ASE と従来法で抽出し、精製以降は共通の操作を行い、定量値を比較した。食品に含まれるダイオキシシン類が試料の内部や表面に強く吸着していると想定した場合、標準品を添加して行う添加回収試験ではその抽出効率を正確に評価することは困難と考えられる。すなわち同等性評価で用いる試料は均質性が高く(液状または粉末状)、多くのダイオキシシン同族体を含有している試料が望ましい。そこで過去の個別食品の汚染調査結果から、植物性食品の中でも比較的ダイオキシシン類の検出頻度の高い乾海苔を試料として選定した。

さらに種々の植物性食品試料において適切なクリーンアップスパイク( CS )の回収率が得られるか検討し本抽出法の妥当性を検討した。

## 2. 抽出条件の検討

環境試料(底質試料等)では ASE で抽出した場合、抽出条件(特に使用する溶媒)により抽出されるダイオキシシン類異性体の組成が異なることが報告されている<sup>10)</sup>。そこで ASE の適用性を検討するにあたり、抽出温度と使用する溶媒について検討を行った。試料は乾海苔粉末 20 g を対象とし、抽出温度は 100 °C と 150 °C、抽出溶媒は *n*-ヘキサン及びアセトンと *n*-ヘキサンを等量混合したもの(以下アセトン・ヘキサン)で比較した(*n* = 1)。

表1にダイオキシシン類定量値、CS 回収率をまとめた。得られた抽出液を濃縮乾固し、残留物の重量を求めたところ、三者に顕著な差は認められなかった。抽出溶媒の極性の違いは、目的成分のみならず夾雑成分(色素、脂肪成分等)の抽出率にも影響を与えるものと考えられる。しかし本実験条件下ではこれらに大差はなく、従って抽出後の硫酸処理や多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおけるエマルジョンの生成や過度の着色等の障害は、いずれの試行においても認められなかった。

三つの抽出条件における定量値と CS 回収率を比較してみると、①抽出温度 150 °C の場合 OCDD 定量値が高い、② 100 °C においてモノオルト PCBs の定量値が高い、③ 100 °C で一部の異性体の CS 回収率が低い(PCB 77 及び 81)、④ 150 °C /ヘキサンにおいてモノオルト PCBs の CS 回収率が低い、等の傾向が認められた。また、150 °C /アセトン・ヘキサンの試行で PCB 126 の定量値が特に高めとなっている。しかし全般的には Total TEQ 値及び平均の CS 回収率は概ね一致した結果となった。

これらの結果より、抽出温度を比較的 CS 回収率の安定した 150 °C に設定し、以下の検討を行うこととした。また抽出溶媒については、一般的に殆どの食品が水分を含んでおり、アセトン・ヘキサンで抽出した際は、抽出液が水相と有機相の二相に分離するため脱水処理操作がやや煩雑となるが、食品試料と抽出溶媒との親和性を考慮し、安定した抽出効率を求めて、アセトン・ヘキサンを採用した。

## 3. ASE と溶媒振とう抽出の比較

ASE と溶媒振とう抽出の繰り返し再現性試験を行った。試行数は各抽出方法について *n* = 4 とし、同回数のブランク試験を並行して実施した。結果を表2に示す。

ダイオキシシン類定量値の相対標準偏差(RSD)は ASE で 1 ~ 37% の範囲であり、振とう抽出では 1 ~ 17% と、ASE でややバラツキが大きかった。ASE で最も RSD の大きいのは TeCDD であるが、検出限界値付近の低濃度であったためバラツキが大きくなったものと考えられる。この TeCDD を除いた場合、RSD は 1 ~ 19% の範囲となり、振とう抽出とよく一致した。

また、各異性体の定量値は ASE の方が振とう抽出よりも全般的に高い傾向を示した。特に高塩素化物になるほど両者の差は顕著となった。これは、①溶媒振とう抽出に対して ASE でブランクの寄与が大きい、②同様に ASE の場合に妨害成分が十分に除去されず測定試料中に残存し、定量の精密性が悪化した、③振とう抽出に対して ASE の抽出効率が高く発揮された、などが原因として考えられる。

そこで両者のブランク試験の結果を比較したところ、検出される異性体は PCB 77 と 118 に限られ、両手法間でこれらのブランク値に顕著な差は認められなかった。また、高分解能 GC/MS におけるクロマトグラム、特にロックマスキングクロマトグラムにおけるベースラインの変動や妨害ピークの出現は ASE 及び溶媒振とう抽出のいずれにおいても認められなかった。

図2は乾海苔試料を従来法で処理して得た高分解能 GC/MS クロマトグラム(上段、A)、及びその抽出残渣を ASE で再抽出して処理した場合のクロマトグラム(下段、B)の一例である。再抽出試料におけるクロマトグラムでは、添加した 13C ラベル OCDD に相当するピーク強度は非常に弱いものであるのに対し、ネイティブ体のピークは極めて明瞭で、従来法による初回抽出に匹敵する強度で検出された。このように再抽出試料においてダイオキシン異性体が観察されたことは、振とう抽出で目的成分が十分に抽出されていなかったことを示唆している。

但し、ASE の定量値が振とう抽出に対して高めになる傾向は、ほうれん草 2 検体及び大豆(粉末) 1 検体を用いて行った追試験では確認できなかった(表 3)。乾海苔試料中のダイオキシン類は比較的強固に試料に吸着しているため、振とう抽出で十分に抽出できなかったものと考えられる。従って乾海苔における事例は ASE の抽出効率が特に高く発揮された結果であり、ガイドラインに記載されている振とう抽出法の適用性を損なうものではないと考えられる。振とう抽出法は食品中の有機化学物質の抽出方法として一般的な手法のひとつであり、抽出効率に優れる加熱還流抽出と比較され、その抽出効率の同等性が示されている<sup>11)</sup>。

#### 4. 種々の植物性食品における CS 回収率

ASE を種々の植物性食品試料(10 種 21 試料)について適用し、ダイオキシン類毒性評価対象物質 29 異性体の CS 回収率を求めた。その結果、回収率は 45 ~ 116% であり、いずれもガイドラインの要求事項である 40 ~ 120% の範囲内であった(表 4)。

#### D. 結論

乾海苔の粉末を共通試料として、ASE と振とう抽出の定量値を比較した、定量値は ASE で高めとなる傾向が認められた。このことは、振とう処理で抽出しにくい試料でも、ASE ではダイオキシン類を高効率に、かつ少量の溶媒で迅速に抽出できることを示唆している。さらに、種々の植物性食品に対して ASE を適用した結果、良好な CS 回収率が得られ、ガイドラインの要求事項を満たしていた。

食品試料の成分組成(含水率、色素の量、脂肪含量等)は多様であるため、多くの種類の食品に当てはまる最適な抽出条件を探索することは容易ではない。従って抽出条件については検討の余地が残されているが、乾海苔を用いた試験で示唆されたように、ASE の優れた抽出効率は、性質の異なる様々な食品試料に対してフレキシブルに対応できるものとして有望である。食品中ダイオキシン類のモニタリング調査を行う上で、短時間(2時間→30分、従来比 1/4)かつ少量の溶媒で(400 ml → 120 ml、従来比 1/3)抽出操作をすることが可能となり、廃液量の削減による環境負荷の軽減面でも、メリットは大きい。今後は動物性試料に対する適用性の確認が必要である。

#### E. 参考文献

- 1) Bernard, A., Fierens, S., The Belgian PCB/dioxin incident: a critical review of health risks evaluations. *Int. J. Toxicol.* **21** (2001) 333-340.
- 2) Watt, J., TV asahi and the dioxin report stir up public anxieties. *Lancet*, **353** (1999) 1337.
- 3) 石黒靖尚、岩本眞二: ダイオキシン類による環境汚染一大牟田川における事例一。第6回福岡県保健環境研究所成果発表会講演要旨集(2001) 1-2.
- 4) Hori, T., Tobiishi, K., Ashizuka, Y., Nakagawa, R., Iida, T., Application of accelerated solvent extraction (ASE) and solvent cut large volume injection (SCLV) system for determination of dioxins in foods. *Organohalogen compounds*, **55** (2002) 95-98.
- 5) Tobiishi, K., Hori, T., Kurokawa, Y.,

Ishiguro, Y., Iida, T., Comparison of solvent cut large volume injection (SCLV) system with conventional technique in dioxins analysis by HRGC-HRMS. *Organohalogen compounds*, **55** (2002) 179-182.

6) Richter, B. E., Ezzell, J. L., Knowles, D. E., Hefler, F., Extraction of polychlorinated-p-dioxins and poly chlorinated dibenzofurans from environmental samples using accelerated solvent extraction (ASE). *Chemosphere*, **34** (1997) 975-987.

7) 岸田真男、山本仁史、服部幸和：高速溶媒抽出を用いた底質中のダイオキシン類の分析、第 12 回環境化学討論会講演要旨集 (2003) 610-611.

8) Hashimoto, S., Shibata, Y., Tanaka, H., Yatsu, A., Morita, M., PCDDs and PCDFs contamination in the northern Pacific area reflected on squid liver tissues. *Organohalogen compounds*, **41** (1999) 413-416.

9) 氏家愛子、長船達也、佐藤信俊：高速溶媒

抽出装置を用いたPCB抽出法の検討. 第 41 回全国衛生化学技術協議会年会講演集 (2004) 74-75.

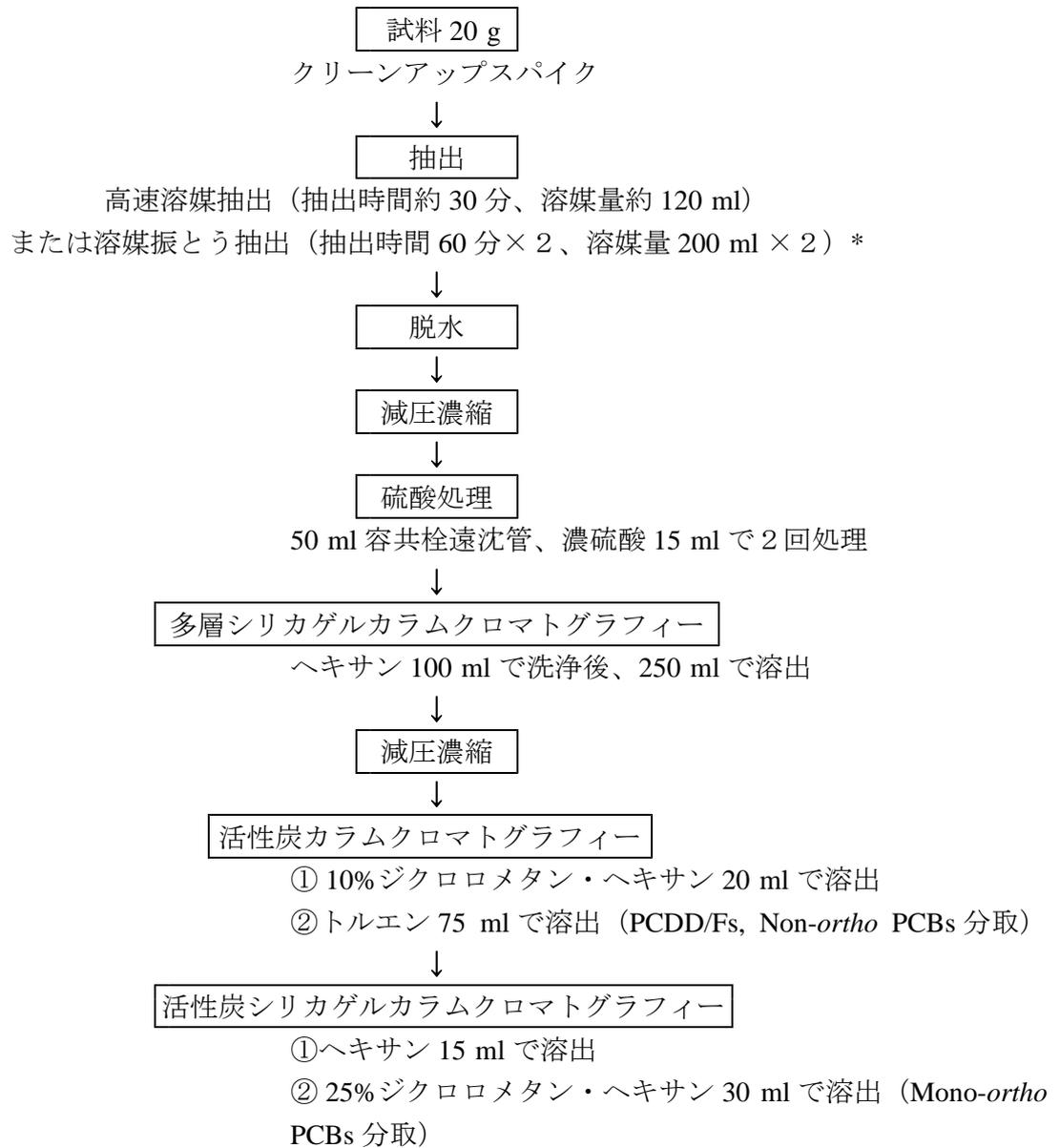
10) 飯村文成、佐々木啓行、津久井公昭、吉岡英俊、佐々木裕子：高速溶媒抽出法を応用したダイオキシン類の簡易迅速分析法の検討. 東京都環境科学研究所年報 (2003) 145-152.

11) 豊田正武、堤 智昭、柳 俊彦、河野洋一、内部博泰、堀 就英、飯田隆雄：野菜中ダイオキシン類測定における振とう抽出法と還流抽出法の比較. *食品衛生学雑誌*, **41** (2000) 316-320.

## F. 研究業績

### 1. 論文発表

1) Hori, T., Tobiishi, K., Ashizuka, Y., Nakagawa, R., Iida, T., Tsutsumi, T., Sasaki, K., Comparison of accelerated solvent extraction and standard shaking extraction for determination of dioxins in foods. *Organohalogen compounds*, **66** (2004) 537-541.



\*溶媒振とう抽出では脱水処理前に吸引ろ過操作を必要とする。

図 1 食品中ダイオキシン類の抽出及び精製フロー

表1 高速溶媒抽出における乾海苔中ダイオキシン類の抽出条件の比較\*

No.		1			2		3	
抽出温度		100℃			150℃		150℃	
抽出溶媒		アセトン・ヘキサン			アセトン・ヘキサン		ヘキサン	
	TEF	検出限界 (pg/g)	定量値 (pg/g)	CS回収率 (%)	定量値 (pg/g)	CS回収率 (%)	定量値 (pg/g)	CS回収率 (%)
2, 3, 7, 8-TeCDD	1	0.01	(0.009)	78	(0.008)	76	0.011	68
1, 2, 3, 7, 8-PeCDD	1	0.01	0.017	85	0.012	86	0.014	87
1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD	0.1	0.02	ND	94	(0.005)	113	(0.012)	103
1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD	0.1	0.02	(0.015)	84	(0.012)	116	(0.017)	111
1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD	0.1	0.02	0.020	96	0.022	114	0.022	109
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD	0.01	0.02	0.31	79	0.34	120	0.35	118
OCDD	0.0001	0.05	1.8	100	2.6	117	2.6	120
2, 3, 7, 8-TeCDF	0.1	0.01	0.037	100	0.043	96	0.030	89
1, 2, 3, 7, 8-PeCDF	0.05	0.01	0.029	85	0.036	83	0.021	82
2, 3, 4, 7, 8-PeCDF	0.5	0.01	0.019	79	0.017	86	0.010	80
1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF	0.1	0.02	0.028	87	(0.019)	93	0.020	91
1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF	0.1	0.02	(0.015)	77	(0.014)	82	0.022	83
1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDF	0.1	0.02	ND	87	ND	97	ND	87
2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF	0.1	0.02	(0.013)	84	(0.016)	89	(0.009)	85
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF	0.01	0.02	0.059	92	0.072	110	0.065	106
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF	0.01	0.02	ND	87	ND	107	ND	104
OCDF	0.0001	0.05	(0.047)	100	0.061	115	(0.048)	117
3, 3', 4, 4'-TeCB(#77)	0.0001	0.1	2.5	34	1.3	82	1.1	75
3, 4, 4', 5-TeCB(#81)	0.0001	0.1	0.40	25	0.15	65	0.16	68
3, 3', 4, 4', 5-PeCB(#126)	0.1	0.1	(0.068)	70	0.32	73	(0.059)	68
3, 3', 4, 4', 5, 5'-HxCB(#169)	0.01	0.1	(0.011)	72	(0.025)	84	(0.012)	82
2, 3, 3', 4, 4'-PeCB(#105)	0.0001	1	(0.26)	81	(0.18)	82	(0.44)	53
2, 3, 4, 4', 5-PeCB(#114)	0.0005	1	8.8	90	4.9	88	4.9	69
2, 3', 4, 4', 5-PeCB(#118)	0.0001	1	(0.48)	86	(0.40)	86	(0.57)	73
2', 3, 4, 4', 5-PeCB(#123)	0.0001	1	4.0	81	2.2	78	2.2	72
2, 3, 3', 4, 4', 5-HxCB(#156)	0.0005	1	(0.45)	66	(0.14)	65	(0.58)	36
2, 3, 3', 4, 4', 5'-HxCB(#157)	0.0005	1	(0.82)	69	(0.27)	69	(0.23)	46
2, 3', 4, 4', 5, 5'-HxCB(#167)	0.00001	1	1.7	69	(0.59)	69	(0.48)	34
2, 3, 3', 4, 4', 5, 5'-HpCB(#189)	0.0001	1	ND	57	ND	57	ND	43

\*カッコ内は検出限界未満の当該ピークを参考値として定量化したもので、Total TEQの算出には加えていない。

表2 乾海苔試料を用いた高速溶媒抽出と振とう抽出のダイオキシン類定量値の比較 (pg/g)\*

化合物	ASE (n = 4)			振とう抽出 (n = 4)			a/b
	範囲	平均 <sup>a</sup>	RSD (%)	範囲	平均 <sup>b</sup>	RSD (%)	
2, 3, 7, 8-TeCDD	0.010 - 0.021	0.016	37	0.013 - 0.017	0.015	12	1.1
1, 2, 3, 7, 8-PeCDD	0.011 - 0.017	0.014	19	(0.009) - 0.013	0.011	17	1.3
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD	0.40 - 0.47	0.44	8	0.18 - 0.19	0.19	1	2.4
OCDD	3.1 - 3.5	3.2	6	0.95 - 1.1	1.0	7	3.2
2, 3, 7, 8-TeCDF	0.029 - 0.038	0.033	11	0.020 - 0.026	0.023	12	1.4
1, 2, 3, 7, 8-PeCDF	0.023 - 0.029	0.027	9	0.017 - 0.023	0.019	15	1.4
2, 3, 4, 7, 8-PeCDF	0.016 - 0.018	0.017	7	(0.009) - 0.012	0.011	13	1.6
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF	0.075 - 0.076	0.075	1	0.033 - 0.041	0.037	10	2.1
OCDF	0.047 - 0.057	0.051	10	0.021 - 0.026	0.023	11	2.2
3, 3', 4, 4'-TeCB(#77)	0.99 - 1.0	1.0	5	0.87 - 0.90	0.88	5	1.1
3, 4, 4', 5-TeCB(#81)	0.15 - 0.17	0.16	2	0.12 - 0.14	0.13	1	1.2
2, 3, 3', 4, 4'-PeCB(#105)	1.7 - 1.9	1.8	3	1.5 - 1.61	1.6	4	1.2
2, 3', 4, 4', 5-PeCB(#118)	4.2 - 4.5	4.4	3	3.6 - 3.9	3.8	3	1.2

\*全ての試行において検出限界未満となった異性体は表示せず、比較していない。

表3 高速溶媒抽出と振とう抽出の同等性に関する追加試験結果 (OCDD濃度、pg/g)\*

試料	ASE	振とう抽出
ほうれん草A	1.9	2.2
ほうれん草B	0.55	0.69
大豆 (粉末)	1.4	1.2

\*表2に示した比較試験で顕著な違いの認められた OCDD 濃度について確認試験を行った。