

土壌残留ヘプタクロルの かぼちゃ作付け前土壌診断 ガイドライン

本成果は以下の事業で実施した研究成果をとりまとめ、平成 28 年度北海道農業試験会議において指導参考事項として技術普及に移された内容をダイジェストしたものです。

事業名	農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（実用技術開発ステージ）現場ニーズ対応型 課題番号 26074C 平成 26～28 年度
研究課題名	安全・安心なかぼちゃ生産に向けた土壌残留ヘプタクロル類診断技術の開発
技術成果名	安全・安心なかぼちゃ生産に向けた土壌残留ヘプタクロル類の作付け前診断手法
担当	地方独立行政法人北海道立総合研究機構 中央農業試験場 ホクレン農業協同組合連合会 農業総合研究所 十勝農業協同組合連合会 農産化学研究所 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 農業環境変動研究センター 合同会社カーバンクル・バイオサイエンテック 北海道農政部生産振興局技術普及課

はじめに

食品衛生法にポジティブリスト制度が 2006 年に導入されると、市場に流通したかぼちゃ果実から残留基準値（0.03ppm）を超えるヘプタクロルが検出される事案が発生しました。これは 30 年以上前に施用され土壌中に残留していたヘプタクロルがかぼちゃに吸収され、果実に移行したものであると考えられました。現在、北海道では生産者組織が中心となりかぼちゃ果実の出荷前検査を 10ha につき 1 点の割合で行っていますが、出荷前検査においてかぼちゃ果実のヘプタクロル濃度が残留基準値を超過した場合、当該ほ場のかぼちゃ果実は全量廃棄されています。

そこで、ヘプタクロルに対するかぼちゃ作付け前の土壌診断方法を確立するため、農林水産業・食品産業科学技術推進事業（実用技術開発ステージ）の下で、研究課題名「安全・安心なかぼちゃ生産に向けた土壌残留ヘプタクロル類診断技術の開発」（平成 26～28 年度）が行われました。この研究では、かぼちゃ果実が残留基準値を超過する土壌のヘプタクロル濃度を明らかにし、ほ場からの土壌サンプルの採取方法および ELISA キットを用いた土壌中ヘプタクロルの分析法を開発しました。本ガイドラインはその研究成果を基に、かぼちゃ作付け前土壌診断の手順をまとめたものです。

本ガイドラインは、かぼちゃ生産に取り組んでいる地域の生産者グループ、JA等の生産者団体、技術指導機関、行政、分析機関を対象にまとめております。本成果を安心・安全なかぼちゃ生産のために活用頂ければ幸いです。

ヘプタクロルとは？

1957 年度に農薬登録され、1972 年度の農薬登録失効まで殺虫剤として用いられ、「〇〇ヘプタ乳剤」、「〇〇ヘプタ粉剤」、「〇〇粒剤ヘプタ」および「〇〇ヘプタ複合△号（ヘプタクロル複合肥料）」等の商品名で販売されていました。登録作物としては、水稻（苗代を含む）、麦類、ばれいしょ、豆類、ねぎ類およびてんさい等があり、北海道内において幅広い作物に用いられたことが想定されました。現在、ヘプタクロルは残留性有機汚染物質（POPs）^{注1）}に指定されており、法律により製造および使用が禁止されています。

また、ヘプタクロルは環境中でヘプタクロルエポキシドに代謝されるため、残留基準値はヘプタクロルとヘプタクロルエポキシドをヘプタクロルに換算したものの含量として設定されています。

注1）「POPs」とは、環境中で分解されにくく、生物体内に蓄積しやすく、地球上で長距離を移動して遠い国の環境にも影響を及ぼす恐れがあり、一旦環境中に放出されると人体に有害な影響を及ぼしかねない化学物質（環境省：残留性有機汚染物質、Persistent Organic Pollutants）。

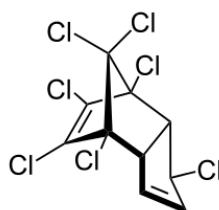
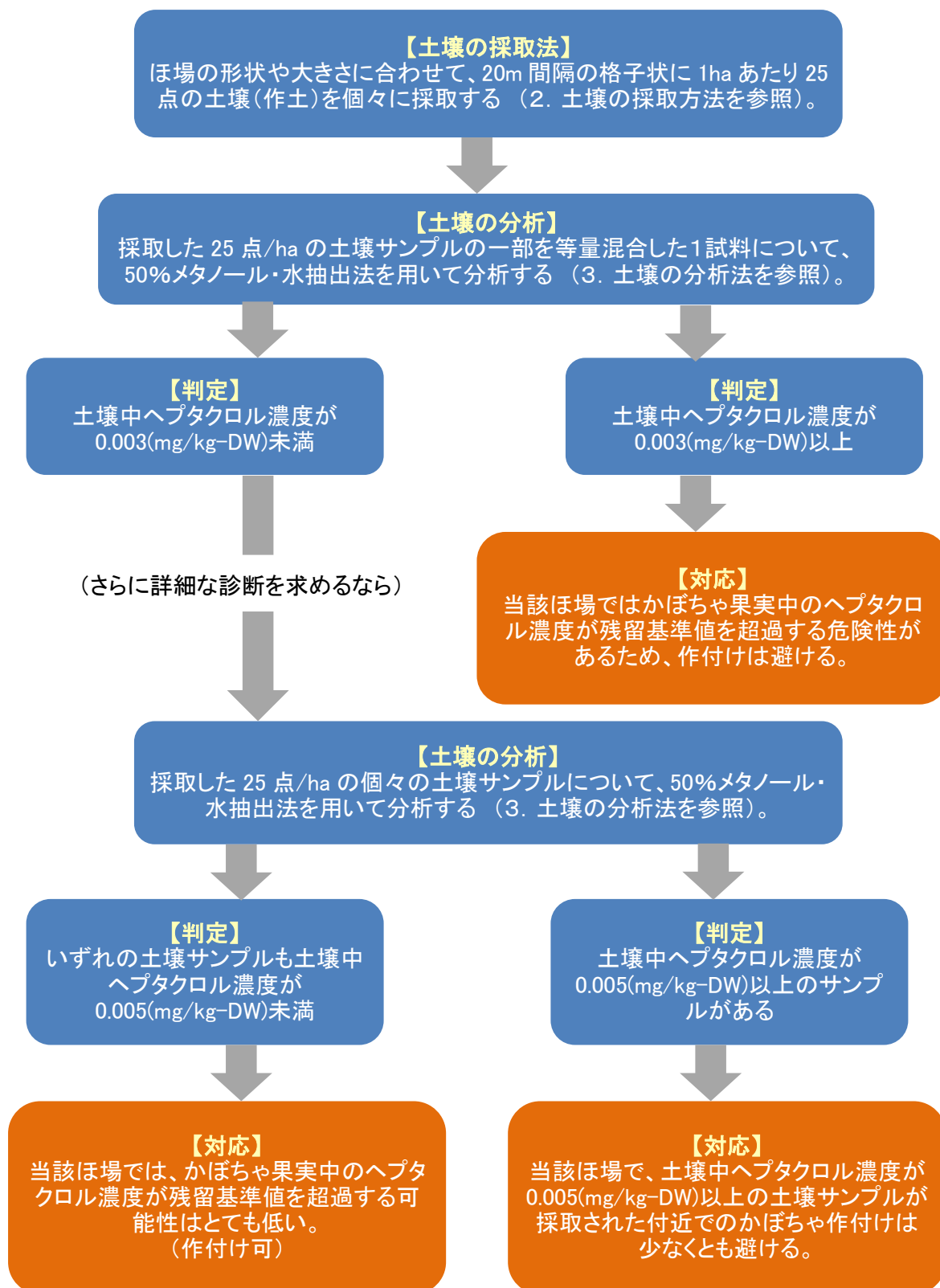


図1 ヘプタクロル構造式

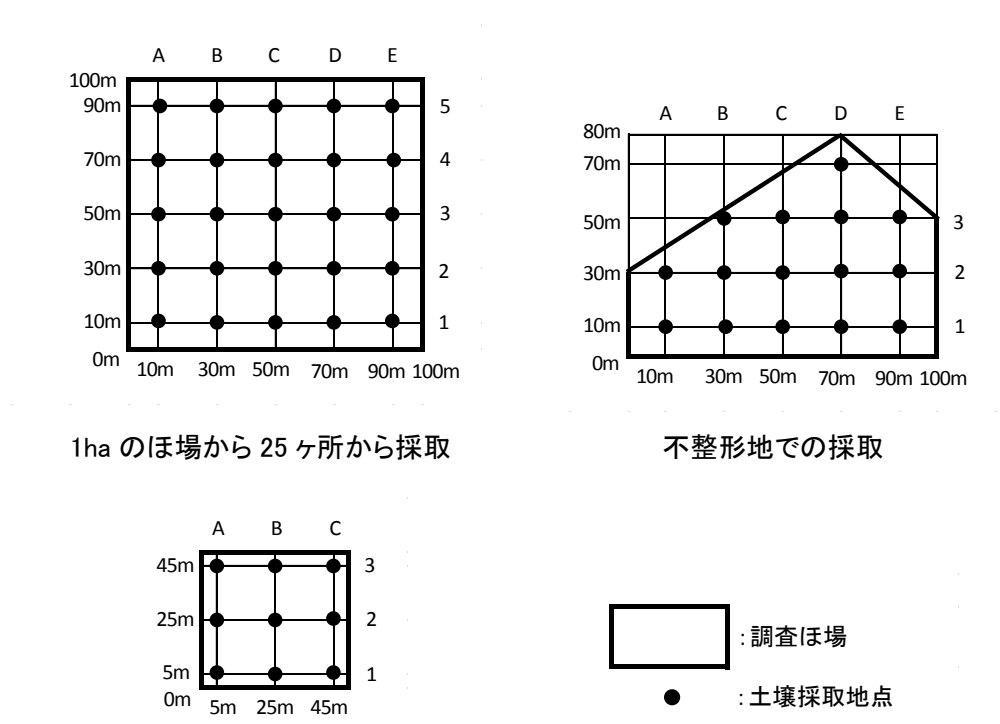
1. ヘプタクロルの土壌診断方法



2. 土壌の採取法

ほ場の形状や大きさに合わせて、20m 間隔の格子状に 1ha あたり 25 点の土壌（作土）を移植
 ごとや採土器を用いて個々に 100g 程度ビニール袋に採取します（図 2）。採取した土壌は風乾し、
 2mm のふるいで篩別後、分析に供します。なお、個々の土壌サンプルも分析する場合は、ほ場の
 どの地点から、どの土壌サンプルを採取したかを記録します。各土壌サンプルにも識別名 A-1,
 B-1・・・などを付けます。

必要とするもの：ビニール袋、マジック、移植ごと（採土器）



0.25ha のほ場から 9ヶ所の採取

図 2 ほ場からの土壌の採取例

3．土壌の分析法

ここでは、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）および ELISA キットを用いたヘプタクロル分析法の概要を記載します。GC-MS は高価な機器であり、専門の分析機関でなければ対応できません。しかし、ELISA キットを用いることにより、生物化学分析に慣れた人がいれば一般的な実験室設備でも比較的安価に定量分析が可能なものになりました。なお、GC-MS による分析方法の詳細については参考文献をご覧ください、ELISA キットについては製造元の合同会社カーバンクル・バイオサイエンテックにお問い合わせ下さい。

1）機器（GC-MS）分析法

（1）抽出および前処理方法

●10mL 試験管 液－液分配法

土壌試料（乾土 8 g 相当）
↓
抽出
↓メタノール／水（50：50）40mL を加える
↓
振とう（25℃、120rpm、24h）
↓
遠心分離（3000rpm、10～15min）
↓
ガラス容器に移す
↓
抽出液を 5mL 分取
↓
液－液分配（10mL 試験管）
↓NaCl 0.5g、水 2mL、ヘキサン 2mL を加える
↓
振とう（手振り、0.5min）
↓
ヘキサン層を分取（10mL 試験管）
↓
ヘキサン 2mL を加える
↓
振とう（手振り、0.5min）
↓
ヘキサン層を分取
↓
脱水
↓無水硫酸ナトリウム 2g を加える
↓
振とう（手振り、0.5min）
↓
ヘキサン層を分取
↓
濃縮乾固（N₂、40℃）
↓
1mL のデカンで定容
↓
測定（GC-MS）

●ケイソウ土カラム法

土壌試料（乾土 8 g 相当）
↓
抽出
↓メタノール／水（50：50）40mL を加える
↓
振とう（25℃、120rpm、24h）
↓
遠心分離（3000rpm、10min）
↓
ガラス容器に移す
↓
多孔性ケイソウ土カラム
↓ 負荷：抽出液 5mL
↓ 保持：20 min
↓ 溶出：ヘキササン 100 mL
↓
減圧濃縮、窒素気流下乾固
↓
1mL のデカンで定容
↓
測定（GC-MS）

（２）測定条件

GC-MS：HP6890-5975N、Agilent Technologies

<カラム>ENV-8ms、内径 0.25mm×長さ 30m、皮膜 0.25 μ m

<オープン温度>120℃→10℃/min→180℃→5℃/min→300℃（10min）

<注入口温度>250℃；<キャリアーガス>ヘリウム、1mL/min

<MS Source 温度>230℃；<MS Quad 温度>150℃；<Aux 温度>280℃

<測定イオン>ヘプタクロル 372、374m/z、ヘプタクロルエポキシド 355、357m/z

*ガスクロマトグラフ-電子捕獲型検出器（GC-ECD）を用いる場合は、GC-MS による定量値と同等の結果が得られることを確認後に使用します。なお、ガスクロマトグラフ条件は各機関で設定した条件を採用してください。

（３）参考文献

上田祐子、本田克久 2012. 土壌中ディルドリンの超音波抽出法の検討. 環境化学、vol.22、No2、65-72.

Seike et al 2012. Relationship between uptake in cucumber fruits and methanol-water extractable residue in soil. J.Pestic.Sci.37(3)、252-257.

2) ELISA 法

(1) 抽出および前処理方法

↓
土壌試料 (乾土 8 g 相当)
↓
抽出
↓ メタノール／水 (50 : 50) 40mL を加える
↓
振とう (25℃、120rpm、24h)
↓
遠心分離 (3000rpm、10min)
↓
ガラス容器に移す
↓
グラファイトカーボン (GC) 粉末 (150mg／15mL 遠心管)
↓ 添加：抽出液 5mL
↓
攪拌 (ボルテックス、30 s)
↓
遠心分離 (3500rpm、1min)
↓
上澄み廃棄
↓
↓ 添加：メタノール／水 (50 : 50) 5mL
↓
攪拌 (ボルテックス、30 s)
↓
遠心分離 (3500rpm、1min)
↓
空の 6mL 容カラムへの移し換え
↓ 添加：メタノール／水 (50 : 50) 2mL
↓ 移し換え：懸濁液をつくり空の 6mL 容カラムへ
↓
↓ 添加：メタノール／水 (50 : 50) 2mL
↓ 移し換え：懸濁液をつくり空の 6mL 容カラムへ
↓ 上記を 2 回繰り返す
↓
サンプルを吸着した GC 粉末を移し換えたカラム
↓ 添加：メタノール／水 (50 : 50) 2mL
↓ 乾燥：加圧 (シリンジを用いて空気 60mL 程度)
↓ 添加：E-HyCu 粉末 250mg
↓ 添加：アセトニトリル 2mL
↓
カラムにキャップをして攪拌 (ボルテックス、30 s)
↓
カラムのキャップを外す
↓
↓ 溶出：アセトニトリル 2mL
↓ 溶出：アセトニトリル 2mL
↓ 溶出：アセトニトリル 1mL
↓
窒素気流下、濃縮乾固
↓
↓ 添加：DMSO 0.125mL
↓ 添加：水 0.375mL
↓
試料精製液

(2) 測定方法

抗原固相化マイクロプレート

↓ 添加：試料精製液 (n=2)、標準溶液、ブランク (DMSO) 20 μ L/well、

↓ 添加：酵素標識抗体溶液 80 μ L/well

↓

反応 (室温、1h)

↓

マイクロプレートの洗浄 (300 μ L $\times$ 3 回)

↓

発色液 100 μ L/well

↓

反応 (室温、15min)

↓

発色停止液 100 μ L/well

↓

吸光度測定 (450nm)

(3) 測定に必要な主な機器類

- ・ボルテックスミキサー (30 千円～)
- ・卓上遠心機 (200 千円～)
- ・ドライサーモバス (～100 千円)
- ・マイクロプレート洗浄機 (250 千円～)
- ・マイクロプレートリーダー (500 千円～)
- ・その他、マイクロピペット、架台等ライフサイエンス分析に係る一般的な器具類

(4) 留意事項

- ・本法を行うにあたって、実験操作にはある程度の練度が必要です。特に前処理における試料の移し替えや発色操作でのピペット扱い等は測定値に影響を与えるので、多量の試料を扱う前に操作を習熟することが望まれます。
- ・96 穴プレートで測定する場合、測定 2 反復、ブランク各列 1 点、標準液 5 濃度だと一度に測定可能なのは 35 点 (試料) となります (目安)。
- ・本法は分析キット化 (前処理～ELISA による測定まで) されており、以下で受注生産しているので必要な場合は問い合わせてください。なお、前処理方法については変更される可能性があるため、問い合わせ時に確認してください。

合同会社カーバンクル・バイオサイエンテック

電話：075-748-1915 FAX：075-748-1915

E-mail：cbst_cbst@me.com

(5) 参考文献

「免疫測定法 基礎から先端まで」(生物化学的測定研究会、講談社)

4 . Q and A

Q1 : 土壌を採取する深さに指定はありますか？

A1 : 土壌は深さに関係なく作土から採取して下さい。ヘプタクロルは施用されてから 30 年以上経過しており、その間の耕起作業によって作土中で十分に攪拌されていると考えられます。また、土壌への吸着性が強いいため、雨水等による作土から下層土への流出は少ないと考えられます。

Q2 : ほ場からヘプタクロルが検出された場合、どの位の期間かぼちゃの作付けを避けるべきですか？

A2 : ほ場からヘプタクロルが検出された場合、現状の基準値では当分の間（数十年単位）で作付けは避けるべきだと考えられます。しかし、どの程度の期間が経過すれば、十分にヘプタクロルが分解するかは明らかにはなっていません。

Q3 : 土壌にどの程度ヘプタクロルが残留しているとかぼちゃ果実のヘプタクロル濃度は残留基準値を超過してしまうのですか？

A3 : 土壌に 0.005mg/kg-DW より高濃度にヘプタクロルが残留していると、かぼちゃ果実が残留基準値（0.03mg/kg-FW）（=ppm）を超過する可能性が高いと考えられます。

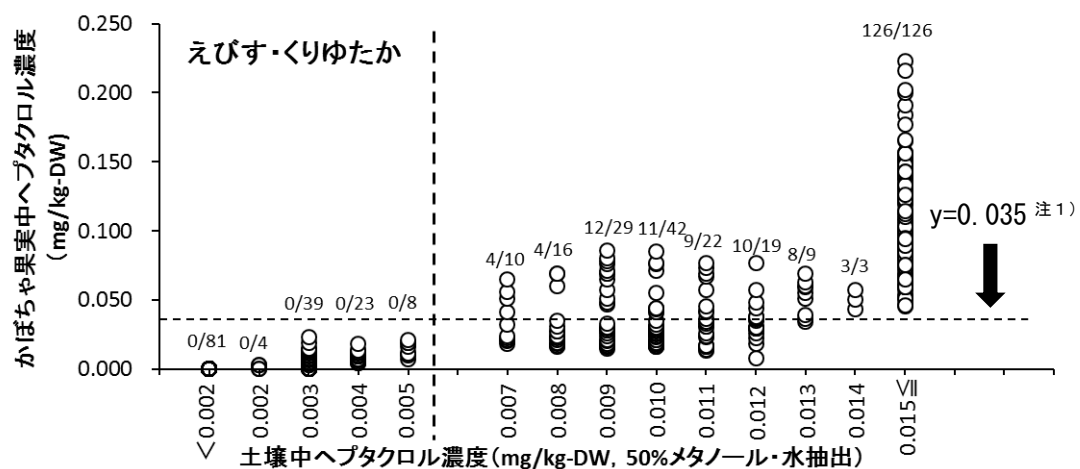


図 3 土壌とかぼちゃ果実のヘプタクロル濃度の関係

注 1) かぼちゃ果実の基準値は 0.03mg/kg-FW(ppm) で、下 3 桁目を四捨五入して基準値超過を判断。

注 2) 図の○の上の数字は、「基準値を超過したサンプル数／総サンプル数」。

Q4 : ヘプタクロルを吸収しづらいかぼちゃの品種はありませんか？

A4 : ヘプタクロル低吸収品種として「TC2A (ほっとけ栗たん)」という品種が存在します。今回の試験では、「TC2A」は「えびす」と「くりゆたか」に対して 6 割程度のヘプタクロル吸収性を示していますが、ばらつきの大きいことも事実です。

Q5 : 採取する土壌の数が 1ha あたり 25 点は多過ぎると思いますが？

A5 : ほ場内で局所的にヘプタクロルが残留し高濃度となっている場合があるため、ほ場内のヘプタクロルの濃度分布を適正に評価するに 25 点/ha の土壌採取が必要と考えています。

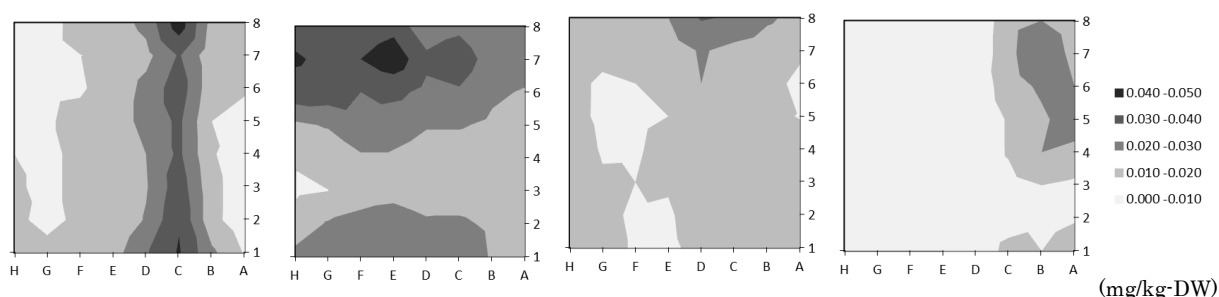


図 4 ほ場内の土壌に残留するヘプタクロル濃度分布

Q6 : 混合サンプルの分析値が 0.003mg/kg-DW 以上では、どうしてかぼちゃ作付けを避ける必要があるのですか？

A6 : 試験の結果から、混合サンプルの分析値が 0.003mg/kg-DW 以上の場合は、当該ほ場での土壌中ヘプタクロルの最大濃度が 0.005mg/kg-DW (Q3 を参照) を超過する可能性が極めて高いと考えられました。つまり、混合サンプルの分析値が 0.003mg/kg-DW 以上では、当該ほ場で生産されたかぼちゃ果実の一部からは残留基準値を超過するヘプタクロルが検出される可能性が高いためです。

Q7 : 混合サンプルの分析値が 0.003mg/kg-DW 未満でも、当該ほ場でかぼちゃ果実のヘプタクロル濃度が残留基準値を超過する可能性があるのですか？

A7 : 混合サンプルの分析値が 0.003mg/kg-DW 未満であっても、当該ほ場でかぼちゃ果実のヘプタクロル濃度が残留基準値を超過する危険性は否定できません。混合サンプルの分析値のみでは、残留基準値を超過しないという判断はできないため、精確な診断が必要な場合は個々のサンプルを分析して下さい。

Q8 : 50%メタノール・水抽出法を用いてヘプタクロルを分析していますが、従来の方法とは何が異なるのですか？

A8 : 従来の分析法は、土壌中に残留するヘプタクロルの全量を分析しています。一方、50%メタノール・水抽出法では土壌中に残留するヘプタクロルの中で、かぼちゃに吸収されやすい状態のものを選択的に抽出しています。

Q9 : かぼちゃの残留基準値が変わった場合はどうなりますか？

A9 : この土壌診断法は平成 28 年度現在のかぼちゃ果実中の残留基準値（0.03ppm）を前提に組み立てています。基準値が変更になった場合は、判定を行う土壌中の診断値（p.2 参照）も変わりますので、その場合は、本ガイドラインを改訂し改めて公表します

本ガイドラインに関する問い合わせ先

地方独立行政法人北海道立総合研究機構

中央農業試験場 農業環境部環境保全グループ

電話 : 0123-89-2582 E-mail : central-agri@hro.or.jp

なお、ELISA 法キットについては以下にお問い合わせ下さい。

合同会社カーバンクル・バイオサイエンテック

電話 : 075-748-1915 FAX : 075-748-1915

E-mail : cbst_cbst@me.com