

農産物中の残留農薬分析に対する 8 種の市販ELISAキットの適用性

上野 達^{*1} 中本 洋^{*2}

ELISA (酵素免疫法) を利用した 8 種の農薬分析キットについて、各種農産物の残留農薬検査への適用性を検討した。残留農薬基準値 (以下、「基準値」と略記) 内の濃度水準における添加回収試験を行った結果、ELISAキット分析による回収率は農薬成分と農産物の組み合わせによって異なった。全体的には回収率が 100%より高めとなる事例が多く認められたが、70%を下回る事例も小数認められた。またELISAキットの測定範囲より農産物の基準値が高い場合にはネギとタマネギの事例を除いては回収率は100%に近く、良好な結果が得られた。これはキットの測定範囲まで抽出液を希釈したことにより、農産物に含まれる妨害成分も同時に希釈されたためと考えられた。ELISAキットのこのような特性を認識するとともに、基準値より十分低い自主規制値を設定すれば、ELISAキットによる残留農薬分析は安全性を確認するためのスクリーニング検査に有効と考えられる。

緒言

近年、短時間で多点分析可能なELISA (酵素免疫法) を利用した分析キットが順次開発されている。ELISA法は抗原抗体反応を利用して定量的に分析する方法であり、基本的に1キットで1成分しか分析できない。しかし通常的气相色谱グラフなどの機器分析より前処理 (精製操作) が簡略化できることから 2 ~ 3 時間で測定結果が得られるとともに、1日に数100点レベルの分析も可能であることが優点として挙げられる。また、ガスクロマトグラフ等と比較して分析機器への初期投資が圧倒的に低いことも利点である。

現在のところELISAキットによる測定可能な農薬は国内メーカー品では十数種類程度と少ないが、その種類は順次増加している。前処理が簡略化できる分、ELISAキットの測定精度には農産物中の多様な成分が影響すると考えられるが、農産物は品目数が多く、ELISAキットへの適用性に関する情報は十分とはいえない。

先行する研究事例として、高度化事業「残留農薬評価のための地域特産作物の分類法及び迅速検出法の開発」¹⁾²⁾などが存在する。同事業では農業環境技術研究所や他県の農業試験場においてもELISAキットと農産物の組み

合わせで適用性等が検討された。農業環境技術研究所ではイミダクロプリド測定キットとリンゴ、キュウリ、なす、レタス、ピーマンの組み合わせで検討し、簡易迅速にほぼ定量的に分析できることを示している³⁾⁴⁾⁵⁾。埼玉県農試ではネギ、ホウレンソウを中心に数種のELISAキットに分析精度や抽出溶媒を検討し、ネギにおいて分析精度がやや低いことを認め、硫化ジアリルが要因と考えられること、メタノール抽出が一般的であることなどを示している⁶⁾。

このように先行する研究事例はいくつか存在するが、県農試での研究事例はいずれもそれぞれの特産農産物を対象とした試験が多く、ダイコン、アスパラガス、ブロッコリー、カボチャなどのような道内における生産量の多い農産物や特産物の検討例は少ない。

本報告では、農産物の残留農薬の出荷前検査への活用を目的に、8種の市販ELISAキットについて、道内で生産量の多い各種農産物への適用性を添加回収試験により検討した。

方法

1. 適用性の検討方法について

本試験では、測定対象農薬が不検出の農産物磨砕物を供試し、農薬標準品を添加した後、ELISAキットの標準的な分析手順に沿って分析した (図1)。添加量から算出される理論値とELISAキットによる測定値の割合である回収率を算出し、ELISAキットの適用性の指標とした (添加回収試験)。同時に、農薬標準品を添加していない試料 (ブランク) についても測定を行った。

2011年9月14日受理

^{*1} 北海道立総合研究機構中央農業試験場, 096-1395 夕張郡長沼町
e-Mail:ueno-tohru@hro.or.jp

^{*2} 同上 (現:同機構上川農業試験場, 078-0397 上川郡比布町)

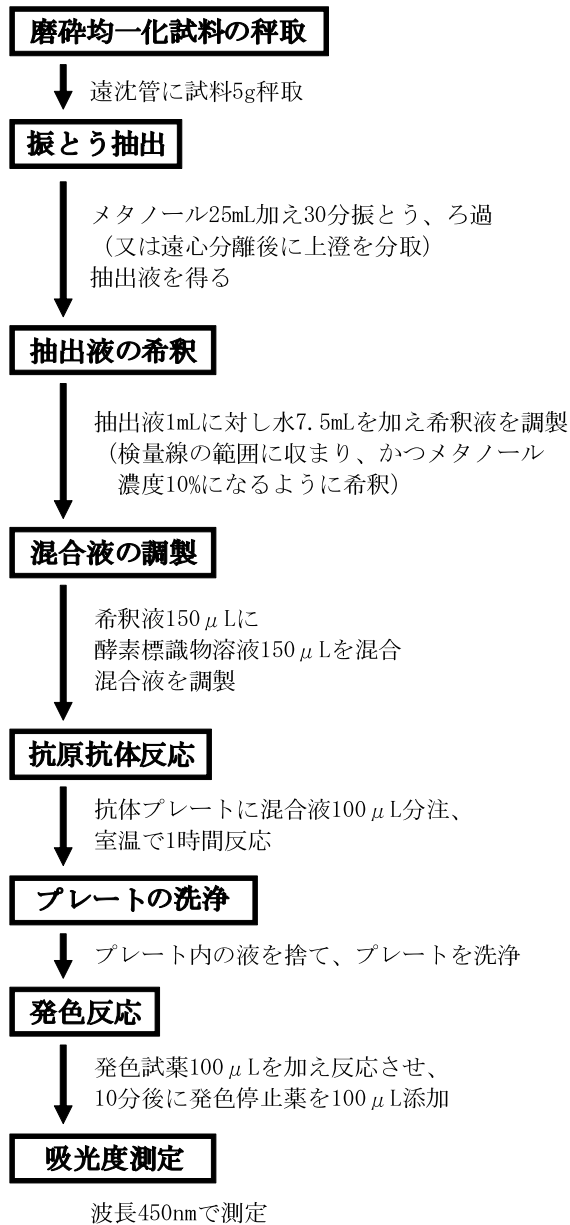


図1 ELISAキットの標準的な分析手順

2. 供試ELISAキット

国内で市販されている農薬分析用のELISAキットはEnviroGard残留農薬キット (SDI社, 米国), RaPIDAssay残留農薬キット (SDI社, 米国), Tube Kit残留農薬キット (Beacon社, 米国) などである。しかしこれらは製造工程の関係から、まとまった数の発注を経なければ製造されない (例えばEnviroGardは全世界から10セット以上の発注で製造を開始する)。そのため本報告においては1セットから購入可能なELISAキット、具体的にはHORIBA SmartAssay (堀場製作所) シリーズを供試した。すなわち同シリーズの内から、アセタミプリド測定キット, マラチオン測定キット, イソキサチオン測定キット, TPN (クロロタロニル) 測定キット,

高感度フェニトロチオン測定キット, イミダクロプリド測定キット, チアメトキサム測定キット, クロチアニジン測定キットを使用した。

3. 供試試薬

水は蒸留水をYamato Millipore WQ500 Auto Pureで精製したものを使用した。メタノールは高速液体クロマトグラフ用 (和光純薬) を使用した。農薬標準品はアセタミプリド, マラチオン, イミダクロプリド, フェニトロチオンは純度98%, イソキサチオン, TPN, チアメトキサム, クロチアニジンは純度99%の試薬 (いずれも和光純薬) を使用した。

4. 分析対象農産物

道内において生産量が多く, かつ収穫から出荷までの時間が短い野菜を中心として以下の作物で試験を行った。ダイコン (根部, 葉部), キャベツ, ハクサイ, コマツナ, ブロccoli, レタス, タマネギ, ネギ, アスパラガス, セルリー, トマト, キュウリ, カボチャ, ホウレンソウ, リンゴ, イチゴ, 玄米。

試料は中央農試で採取したもの (ホウレンソウ, タマネギ), 道内の農家圃場で採取したもの (玄米) および市販品 (その他) を使用した。いずれの試料も -40 で保存し, 試験直前に解凍して使用した。

5. 農薬標準品の添加濃度

磨砕した農産物試料に農薬標準品を添加するにあたって, 添加濃度は原則として各農産物における各農薬の基準値と同程度になるようにした。ただし, 一部の農薬ではさらに低い濃度についても回収率を検討した。また, 農薬標準品を添加する時に用いるメタノール溶液の添加量は0.25mLを超えない範囲とした。

6. ELISAキットの分析方法

分析方法はELISAキット添付の説明書に記載された方法で行った。標準的な分析手順は図1のとおりである。この場合, 試料新鮮物に対する希釈率は51倍となる。添加回収試験時の農薬添加濃度によってはキットの測定範囲を超える場合があるが, その際は抽出液希釈の段階でキットの分析方法に従って測定範囲に入るように希釈操作を行った。また, 抗原抗体反応を阻害させないため, 希釈液中のメタノール含有率は10%となるように調製した。測定の反復数は2反復とし平均値を測定値とした。なお, 各ELISAキットにおける測定可能範囲であるキットの検量線範囲およびこれを標準的な分析手順 (図1) での希釈率で算出した農産物中の測定範囲を表1に示した。

表1 ELISAキットの検量線範囲と農産物中の測定範囲 (51倍希釈時)

測定キット名	キットの検量線範囲(ppb)	農産物中の測定範囲(ppm)
アセタミプリド測定キット	0.3 ~ 4	0.015 ~ 0.2
イソキサチオン測定キット	1 ~ 20	0.05 ~ 1
マラチオン測定キット	15 ~ 250	0.75 ~ 12.5
イミダクロプリド測定キット	2 ~ 100	0.1 ~ 5
TPN測定キット	0.15 ~ 1.5	0.0075 ~ 0.075
高感度フェニトロチオン測定キット	0.15 ~ 2	0.0075 ~ 0.1
チアメトキサム測定キット	0.3 ~ 3	0.015 ~ 0.15
クロチアニジン測定キット	1.5 ~ 15	0.075 ~ 0.75

7. 分析の実施例

以下にイソキサチオン測定キットを用いたハクサイの添加回収試験の実施例を示す。

磨砕均一化したハクサイ5.0gを50mLポリプロピレン製ディスポーザブル遠沈管に秤取し、2 ppmのイソキサチオンメタノール溶液0.25mLを添加し0.1ppm (基準値と同値) の試料を調製した。メタノール25mLを加え密栓をして振とう機で30分間振とう抽出した。遠沈管を遠心分離 (3,000回転, 10分間) して固形物を沈下させた。

抽出液1 mLを試験管に取り水7.5mLを加え、ハクサイ試料の51.4倍希釈液を調製した。

ELISAキット内の酵素標識物は冷蔵庫から取り出した直後に水6 mLを加えて内容物を溶解させ室温で約1時間放置した。ELISAキット内のその他の試薬は抗原抗体反応の開始1時間前に冷蔵庫から取り出し室温に戻した。

希釈液150 μ Lを試験管に取り、酵素標識物の水溶液150 μ Lを加え混合液を調製した。混合液から100 μ Lを取り抗体プレートのウェル (穴) に分注した。室温で約1時間放置し抗原抗体反応を進行させた。

抗体プレートを逆さにして混合液を捨て、これをペーパータオルの上に逆さに置き、ウェル内に残った混合液をペーパータオルに吸収させた。さらに次の洗浄操作を3回繰り返した。すなわち、キットに付属する洗浄液300 μ Lをウェルに分注し、プレートを逆さにして洗浄液を捨てた後、プレートをペーパータオルの上に逆さに置き、ウェル内に残った洗浄液をペーパータオルに吸収させた。

洗浄後、発色試薬100 μ Lをウェル内に分注し、正確に10分後に反応停止薬100 μ Lを加えた。

検量線はイソキサチオン標準品をメタノールおよび水で希釈調製した標準液で作成し、試料と共にマイクロプレートリーダーを用い波長450nmで吸光度を測定した。添加回収試験試料の定量を行ったところ0.119ppmであったため、理論値0.1ppmから回収率は119%と算出された。

結 果

1. 添加回収試験の結果

各キットにおける添加回収試験の結果を以下に述べる。

なお、農薬標準品を添加していない試料 (ブランク) 全てにおいて、測定結果は検出下限未満であった。

(1) アセタミプリド測定キット

農産物中の測定範囲は0.015~0.2ppm (表1) であり、キャベツ、イチゴの基準値はこれより高い5 ppmである。このため、適宜希釈操作を行って分析した。添加濃度で0.05ppmまでの回収率は100%に近かった。測定範囲の下限の0.015ppmでは回収率は100%を下回る傾向であった (表2)。

表2 アセタミプリド測定キットの添加回収試験の結果

作物	基準値	添加濃度	測定値	回収率
	ppm	ppm	ppm	%
キャベツ	5	5	5.28	106
		0.5	0.546	109
		0.015	0.012	77
イチゴ	5	5	4.88	98
		0.5	0.513	103
		0.05	0.05	100
		0.015	0.014	91

(2) イソキサチオン測定キット

供試農産物の基準値は、測定範囲 (0.05~1 ppm) 内である。ハクサイ、イチゴにおける回収率は100%に近かったが、キャベツ、レタス、ホウレンソウでは回収率が160~179%と高い傾向であった (表3)。

表3 イソキサチオン測定キットの添加回収試験の結果

作物	基準値	添加濃度	測定値	回収率
	ppm	ppm	ppm	%
キャベツ	0.1	0.1	0.172	172
ハクサイ	0.1	0.1	0.119	119
レタス	0.1	0.1	0.160	160
ホウレンソウ	0.1	0.1	0.179	179
イチゴ	0.2	0.2	0.203	102

(3) マラチオン測定キット

供試農産物の基準値は、測定範囲 (0.75~12.5ppm) 内である。各農産物の回収率は、カボチャ、アスパラガスでは131,135%と概ね良好であったが、キャベツやホウレンソウなどでは200%を超え、他の農産物も回収率は高めになる傾向がみられた (表4)。

表4 マラチオン測定キットの添加回収試験の結果

作物	基準値	添加濃度	測定値	回収率
	ppm	ppm	ppm	%
キャベツ	2	2	4.13	206
ハクサイ	2	2	5.23	262
コマツナ	2	2	5.91	295
ブロッコリー	5	5	10.1	201
レタス	2	2	3.38	169
タマネギ	8	8	13.3	166
アスパラガス	8	8	10.8	135
セルリー	2	2	4.88	244
カボチャ	8	8	10.5	131
ホウレンソウ	2	2	5.10	255

(4) イミダクロプリド測定キット

供試農産物の基準値は、測定範囲 (0.1~5 ppm) 内である。各農産物における回収率はキャベツ、ハクサイ、キュウリなどでは149~185%と高くなる傾向であったが、レタス、ダイコン葉、ホウレンソウでは56~69%と低くなった。なお、玄米では359%とかなり高かった (表5)。

表5 イミダクロプリド測定キットの添加回収試験の結果

作物	基準値	添加濃度	測定値	回収率
	ppm	ppm	ppm	%
ダイコン根	0.1	0.1	0.185	185
ダイコン葉	5	5	3.12	62
キャベツ	0.5	0.5	0.747	149
ハクサイ	0.5	0.5	0.895	179
レタス	5	5	2.80	56
トマト	1	1	1.59	159
キュウリ	1	1	1.71	171
ホウレンソウ	5	5	3.46	69
玄米	0.2	0.2	0.718	359

(5) TPN測定キット

測定範囲 (0.0075~0.075ppm) は、供試した農産物すべての基準値を下回る。このため、基準値と0.01ppmの2水準の添加で検討した。基準値では多くの農産物で回収率が100%に概ね近かったが、これに比べて0.01ppmでは高くなる傾向であった。なお、ネギでは基準値でも回収率が54%と低かった (表6)。

表6 TPN測定キットの添加回収試験の結果

作物	基準値	添加濃度	測定値	回収率
	ppm	ppm	ppm	%
ダイコン根	0.1	0.1	0.09	89
		0.01	0.013	125
ダイコン葉	2	2	2.00	100
		0.01	0.016	156
キャベツ	2	2	1.78	89
		0.01	0.013	130
ハクサイ	2	2	2.01	100
		0.01	0.017	172
ブロッコリー	5	5	5.84	117
		0.01	0.014	142
レタス	1	1	1.05	105
		0.01	0.013	133
ネギ	5	5	2.72	54
		0.01	0.015	154
アスパラガス	2	2	2.36	118
		0.01	0.015	147
セルリー	10	10	9.38	94
トマト	5	5	5.32	106
		0.01	0.026	255
キュウリ	5	5	5.11	102
		0.01	0.014	138
ホウレンソウ	4	4	3.72	93
		0.01	0.018	182
リンゴ	2	2	2.43	121
		0.01	0.014	137

(6) 高感度フェニトロチオン測定キット

測定範囲 (0.0075~0.1ppm) は、供試した農産物すべての基準値を下回る。各農産物の回収率は128~169%であり、レタス以外では150%を下回った (表7)。

表7 高感度フェニトロチオン測定キットの添加回収試験の結果

作物	基準値	添加濃度	測定値	回収率
	ppm	ppm	ppm	%
ダイコン根	0.2	0.2	0.256	128
ダイコン葉	0.5	0.5	0.710	142
キャベツ	0.5	0.5	0.680	136
ハクサイ	0.5	0.5	0.655	131
レタス	0.2	0.2	0.338	169
トマト	0.2	0.2	0.264	132
キュウリ	0.2	0.2	0.258	129
玄米	0.2	0.2	0.208	104

(7) チアメトキサム測定キット

測定範囲 (0.015~0.15ppm) の下限は、供試した農産物すべての基準値を下回る。各農産物の回収率は118~130%のものが多かったが、タマネギでは174%と高かった (表8)。

表8 チアメトキサム測定キットの添加回収試験の結果

作物	基準値	添加濃度	測定値	回収率
	ppm	ppm	ppm	%
ダイコン根	0.02	0.02	0.026	131
ダイコン葉	2	2	2.61	130
キャベツ	1	1	1.43	143
ハクサイ	1	1	1.35	135
ブロッコリー	2	2	2.87	143
タマネギ	0.02	0.02	0.035	174
レタス	2	2	2.62	131
トマト	0.5	0.5	0.591	118
キュウリ	0.5	0.5	0.600	120
ハウレンソウ	2	2	2.48	124

表9 クロチアニジン測定キットの添加回収試験の結果

作物	基準値	添加濃度	測定値	回収率
	ppm	ppm	ppm	%
ダイコン根	0.1	0.1	0.127	127
ダイコン葉	5	5	6.00	120
キャベツ	0.7	0.7	0.881	126
ハクサイ	0.1	0.1	0.131	131
ブロッコリー	1	1	1.37	137
ネギ	0.7	0.7	1.66	237
レタス	20	20	23.2	116
トマト	3	3	3.94	131
キュウリ	2	2	2.11	106
ハウレンソウ	0.02	0.02	0.07	350
リンゴ	1	1	1.39	139

(8) クロチアニジン測定キット

測定範囲 (0.075 ~ 0.75ppm) の下限は、ハウレンソウ以外の供試農産物の基準値を下回る。ハウレンソウでは基準値が0.02ppmと測定範囲より低かったが、他の農産物と同様に基準値に合わせた添加で試験を行った。キャベツやレタス、キュウリなどでは回収率が106 ~ 137%であったが、測定範囲外のハウレンソウでは350%と極めて高く、また、ネギも237%と高かった (表9)。

2. 反復測定値のばらつき

分析反復間のばらつきは、おおむね実用上十分な程度に小さかった。ただし一般的な機器分析と同様に、測定範囲の下限に近い農薬添加濃度の測定の際には、ばらつきが大きくなる傾向が見られた。

このことについて、横軸に農薬添加濃度 / 測定範囲の下限値の比を、縦軸に分析反復間の変動係数を取ったも

のを図2に示した。

農薬添加濃度が測定範囲の下限値のごく近傍では分析反復間の変動係数は大きいですが、下限値からおおむね3 ~ 4倍程度から急激に変動係数は小さくなり、下限値から5倍の農薬添加濃度では、ほぼ全ての事例で変動係数は10%未満となった。

ただし例外的にネギでは測定範囲の下限値より十分大きな農薬添加濃度でも変動係数が大きくなる場合があった。

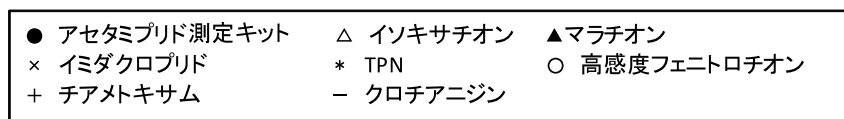
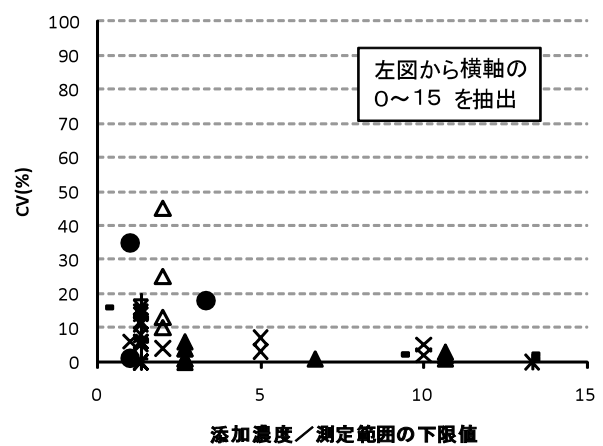
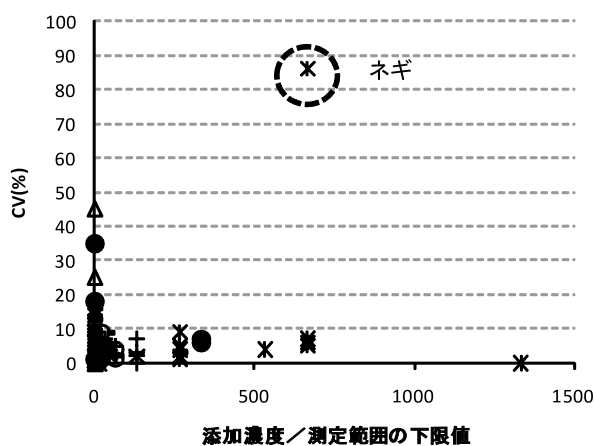


図2 定量下限に対する農薬添加濃度と分析反復間のばらつき

考 察

各ELISAキットの添加回収試験の結果を表10にまとめた。

表10 各ELISAキットの添加回収試験の結果

	アセタミプリド	イソキサチオン	マラチオン	イミダクロプリド	TPN (クロタロニル)	高感度 フェニトロ チオン	チアメトキサム	クロチアニジン
ダイコン根	—	—	—	△	○	○	△	○
ダイコン葉	—	—	—	▼	○	△	○	○
キャベツ	○	△	△	△	○	△	△	○
ハクサイ	—	○	△	△	○	△	△	△
コマツナ	—	—	△	—	—	—	—	—
ブロッコリー	—	—	△	—	○	—	△	△
レタス	—	△	△	▼	○	△	△	○
タマネギ	—	—	△	—	—	—	△	—
ネギ	—	—	—	—	▼	—	—	△
アスパラガス	—	—	△	—	○	—	—	—
セルリー	—	—	△	—	○	—	—	—
トマト	—	—	—	△	○	△	○	△
キュウリ	—	—	—	△	○	○	○	○
カボチャ	—	—	△	—	—	—	—	—
ハウレンソウ	—	△	△	▼	○	—	○	△
リンゴ	—	—	—	—	○	—	—	△
イチゴ	○	○	—	—	—	—	—	—
玄米 (参考)	※	—	—	△	—	○	—	—

添加回収率で表記, △131%以上, ○130~70%, ▼70%未満, —未実施

試験を行ったELISAキットと農産物の組み合わせでは、回収率は100%を超えて農薬添加濃度より高い実測値が得られる場合が多く、本分析法の傾向を示すものと考えられた。この傾向は既往の文献でも報告されており、夾雑物の影響が示唆されている¹⁾²⁾。本報告においては特にマラチオン測定キットは回収率が高くなる傾向が強かった。

アセタミプリド測定キットなどのように農産物中の基準値が高く、比較的高濃度域の試料では回収率が100%に近い値になる場合が多かった。また、TPN測定キットなどのように農産物中の基準値に比較してELISAキットにおける農産物中の測定範囲が低い場合には希釈操作の追加が必要であるが、回収率は100%に近い値になる傾向が認められた。これは希釈することによって農産物由来の夾雑物の濃度が相対的に下がり、分析への影響が低下することによるものと考えられた。

これらのことから、ELISAキットは検査対象農産物の残留農薬が基準値より低いことをチェックするような1次検査としての使用法に適用しやすいと考えられた。ただし、イミダクロプリド測定キットと一部農産物のよ

うに理論値より低い実測値が得られる農産物との組み合わせもみられた。また、農産物別にみるとネギ、タマネギは回収率がやや不良となる傾向がみられたが、他の農産物においては一定の傾向は認められなかった。

以上のように、ELISAキットは簡易迅速な分析法であり、多くの農産物で定量あるいは半定量分析が可能という長所を有する。したがって、本試験で検討したように、信頼性の高い農産物とELISAキットの組み合わせを確認するとともに、基準値より十分低い自主規制値を設定した上でのスクリーニング検査に有効と考えられる。

謝 辞 本論文の校閲をいただいた北海道立総合研究機構農業研究本部中央農業試験場 志賀弘行農業環境部長および同試験場 中津智史研究主幹に御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、独立行政法人農業環境技術研究所 元環境化学分析センター長 石井康雄氏、同研究所有機化学物質研究領域 殷照洙主任研究員、渡邊栄喜主任研究員にはご助言およびELISAの分析指導を頂いた。元埼玉県農林総合研究センター茶業特産研究所 中村幸二所長 (現 社団法人日本植物防疫協会 技

術顧問), 岐阜県農業技術研究所 天野昭子専門研究員,
株式会社ホリバ・バイオテクノロジー (現 堀場製作所)
三宅司郎氏には貴重なご助言を頂いた。併せて御礼申し
上げます。

参考文献

- 1) 環境省 環境技術実証モデル事業 実証技術情報
実証結果一覧 化学物質に関する簡易モニタリング技
術分野 平成16年度 実証番号 040-0401
- 2) 環境省 環境技術実証モデル事業 実証技術情報
実証結果一覧 化学物質に関する簡易モニタリング技
術分野 平成17年度 実証番号 040-0506
- 3) Eiki. Watanabe et al; Evaluation and Valid-
ation of a Commercially Available Enzyme-Linked
Immunosorbent Assay for the Neonicotinoide
Imidacloprid in Agricultural Samples. J. Agric.
Food Chem., 2004, 52, 2756-2762
- 4) Eiki Watanabe et al., Rapid and simple screen-
ing analysis for residue imidacloprid in agricul-
tural products with commercially available
ELISA. Analytical Chimica Acta 521 (2004) 45-51
- 5) 渡邊栄喜ら, ネオニコチノイド系殺虫剤アセタミプ
リド用ELISAキットの性能評価及び農作物中残留分
析への応用, 第28回農薬残留分析研究会 要旨集
p37-41 (2005)
- 6) 成田伊都美, 中村幸二 イムノアッセイ法を利用し
たネギの残留簡易分析法 日本農薬学会講演要旨集
pp103 (2003)

Applicability of 8 Commercially Available ELISA Kits for Analyzing Pesticide Residue in Agricultural Products.

Tohru UENO^{*1} and Hiroshi NAKAMOTO^{*2}

Summary

The applicability of 8 commercially available ELISA kits was evaluated for analyzing pesticide residue in agricultural products. The ELISA kits (“SmartAssay” series) for acetamiprid, isoxathion, malathion, imidacloprid, TPN(chlorothalonil), fenitrothion, thiamethoxiam and clothianidin were provided by HORIBA, Ltd. (Kyoto, Japan). The agricultural products for the evaluation were following; Japanese radish root and its leaf, cabbage, napa cabbage, komatsuna(Japanese mustard spinach), broccoli, lettuce, onion, welsh onion, asparagus, celery, tomato, cucumber, squash, spinach, apple, strawberry and brown rice. The accuracy of the ELISA kits was investigated by performing recovery test. The recovery of the analytes depended on the combination of ELISA kit and agricultural product. Approximately half of the case showed the recovery rate higher than 130%, and only a few case showed the rate lower than 70%. In case of the measuring range of the ELISA kit is sufficiently lower than the maximum residue limit of analyte in agricultural products, the recovery rate were around 100% except for onion and welsh onion. It was supposed to be caused by the decrease of matrix interference by sample dilution. The ELISA kits may be useful for an on-the-spot pesticide residue screening on the condition that the tendency of the kits above are considered.

*1 Hokkaido Research Organization Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido, 069-1395 Japan

e-Mail : ueno-tohru@hro.or.jp

*2 ditto. (Present; Hokkaido Research Organization Kamikawa Agricultural Experiment Station, Pippu, Hokkaido, 078-0397 Japan)