

食品関係等調査研究報告

第42号
平成30年

Research Report of Food Products

Vol.42
2018



独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
Food and Agricultural Materials Inspection Center
(Incorporated Administrative Agency)
Saitama, Japan

はじめに

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（FAMIC）は、農林水産省の指示の下、肥料、農薬、飼料、食品等を対象として科学的な検査・分析を行い、農業生産資材の安全性の確保、食品等の品質の改善・表示の適正化等に技術で貢献することを使命としています。

食品表示については、食品表示法に基づく食品表示基準により、食品関連事業者が適切な表示をすることとなっています。FAMICでは、食品表示の真正性の確認のため、市販品等を対象に科学的検査を実施し、検査の結果、表示に疑義が認められた場合には、農林水産省に報告するとともに、表示監視行政機関等からの要請による検査・分析についても対応に努めているところです。

平成29年9月に食品表示基準が一部改正され、これまで一部の加工食品のみに義務付けられていた原料原産地表示について、輸入品以外の全ての加工食品を対象として義務づけられました（経過措置期間：平成34年3月31日まで）。加工食品の原料原産地表示の真正性の確認に対するニーズが高まる中で、食品表示の監視業務を効率的かつ効果的に行うための検査・分析技術が求められています。

このため、FAMICでは、食品表示に関する調査研究分野において、重点化して取り組むべき検査・分析技術を明確化するとともに、研究機関や大学と連携して調査研究に取り組んでおり、その成果を食品表示の監視業務に活用していくこととしています。

今般、平成29年度の調査研究の成果を収録した「食品関係等調査研究報告」第42号を発行することとなりました。本研究報告が食品表示の適正化の一助となることを期待するとともに、関係各位には、成果の活用や検査・分析手法の更なる改良・開発に向けて、引き続き、ご指導、ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

平成30年12月

独立行政法人 農林水産消費安全技術センター

理事長 木村 真人

目 次

ストロンチウム安定同位体比分析による切干大根の原料原産地判別法の開発 井伊 悠介, 後藤 祐之介, 石井 修人, 申 基澈, 陀安 一郎	1
栗加工品の原料原産地判別検査法の検討 後藤 祐之介, 井伊 悠介, 申 基澈, 陀安 一郎	10
DNA 分析による大豆加工品の原料大豆の品種判別法の開発 石原 敏史, 岸根 雅宏, 高嶋 康晴, 豊田 正俊, 澤田 桂子, 井伊 悠介, 小岩 智宏	17
ズワイガニ属 3 種のスクリーニング判別法の開発 足立 静香, 西川 加寿子, 中山 祐輔, 藤原 守, 松岡 猛, 高嶋 康晴	24
水溶性成分の一斉分析によるタマネギの原産地判別の可能性検討 渡邊 彩乃, 寺田 昌市, 岡崎 圭毅	32

ストロンチウム安定同位体比分析による 切干大根の原料原産地判別法の開発

井伊 悠介¹, 後藤 祐之介², 石井 修人³, 申 基澈⁴, 陀安 一郎⁴
Yusuke Ii, Yunosuke Gotou, Shuto Ishii, Ki-Cheol Shin, Ichiro Tayasu

要 約

切干大根の原料大根の産地判別法の検討をストロンチウム安定同位体比分析により行った。産地判別の基準値設定のために78試料の国産の生鮮大根と57試料の外国産（中国産）の切干大根を収集した。生鮮大根から切干大根を製造するための乾燥工程がストロンチウム安定同位体比にほとんど影響を与えないことを確認した後に、収集した生鮮大根や切干大根のストロンチウム安定同位体比を測定し、カーネル密度推定とROC曲線により国産と外国産の判別のための基準値を設定した。ストロンチウム安定同位体比が0.7113以下を国産、0.7113超を外国産とする基準の場合、特異度は99.3%で収集した国産試料は全てが国産と正しく判別され、感度は98.8%で外国産試料は全てが外国産と正しく判別された。

1. はじめに

切干大根（千切大根）の表示にあつては、食品表示法（平成25年法律第70号）に基づき制定された食品表示基準（平成27年内閣府令第10号）により名称、原材料名などの表示の他に、輸入品以外のものにあつては原料原産地名を表示することが義務付けられている。

国産の加工向け大根の出荷量¹⁾は平成26年~平成28年の平均で約277,000トンで、この一部が原料原産地が国産表示の切干大根に用いられている。生産農業所得統計によると、切干大根の農産物産出額は14億円²⁾（平成26年~平成28年の平均）であり、その中で宮崎県が占める額は14億円である²⁾ことから、国産の切干大根のほとんどが宮崎県で生産されていると考えられる。平成26年~平成28年の宮崎県における切干大根の平均の生産量は1,733トンである³⁾。一方で乾燥大根の輸入量⁴⁾は平成26年~平成28年の平均で3,388トンで、この一部が原産国表示が外国の切干大根に用いられていると思われる。また、輸入量の99.9%は中国からのものである。原料原産地表示が日本と原産国表示が中国の製品間では、前者のほうが高価な傾向であることから、原料原産地表示の真正性を客観的に検証する科学的な技術の開発が求められる。

これまで、食品の産地判別のための科学的技術として食品中の元素濃度や、軽元素・重元素の安定同位体比の分析による手法が研究されており（梅干し⁵⁾、牛肉⁶⁾、養殖うなぎ⁷⁾、穀物⁸⁾、しらす干し⁹⁾、りんご¹⁰⁾、湯通し塩蔵わかめ¹¹⁾、小麦¹²⁾、わかめ加工品¹³⁾等）、農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という。）においてもこれらの技術を用いた食品の産地判別法の検討・開発を行っているところである（アスパラガス¹⁴⁾、ニホンウナギ加工品¹⁵⁾、湯通し塩蔵わかめ¹⁶⁾、乾わかめ¹⁷⁾、タケノコ・レンコン・ワラビ・ゼンマイの水煮¹⁸⁾、はちみつ¹⁹⁾²⁰⁾、冷

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター（現）本部

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

⁴ 大学共同利用機関法人 人間文化研究機構 総合地球環境学研究所

凍ほうれんそう²¹⁾、乾しいたけ²²⁾、ネギ²³⁾、りんごジュース²⁴⁾、タマネギ²⁵⁾、かき類²⁶⁾、ショウガ²⁷⁾²⁸⁾、サトイモ²⁸⁾、ゴボウ²⁸⁾²⁹⁾、ニンニク²⁸⁾³⁰⁾、さやえんどう²⁸⁾³¹⁾等)。今回は重元素であるストロンチウムの安定同位体比 ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 、以下「Sr 安定同位体比」という。) 分析による切干大根の原料原産地判別法の検討を行った。

2. 実験方法

2.1 試料

産地判別の基準値設定のためのモデル試料として国産大根と外国産大根を用いた。産地履歴の確かな国産の大根の試料として平成 29 年に収穫された生鮮大根を主に農業協同組合を通じて収集した。1 本の大根を 1 試料とし 78 試料を入手した^(注)。これらの生産道府県は、表 1 のとおりであり、同一道府県の各試料は、異なる市町村や生産者において生育したものを収集した。

外国産大根については、輸入される乾燥大根のほとんどが中国産であることから、外国産大根として中国産大根を用いることにした。また、生鮮大根の入手が困難だったことから、原料大根の原産地表示が中国である、平成 28 年~平成 29 年に購入した市販の切干大根を中国産大根として用いた。1 商品を 1 試料として、57 試料を入手した。製造業者等に確認した結果、原料大根の栽培省は主に雲南省であった(表 1)。

表1 収集した大根の生産地と収集試料数

国産大根			中国産大根					
道府県	収集試料数	割合 (%)	道府県	収集試料数	割合 (%)	省	収集試料数	割合 (%)
北海道	7	9	鳥取	1	1	雲南	41	72
青森	3	4	岡山	4	5	福建	1	2
岩手	3	4	広島	3	4	不明	15	26
秋田	3	4	山口	1	1			
茨城	1	1	徳島	3	4			
群馬	3	4	福岡	2	3			
千葉	3	4	長崎	5	6			
石川	3	4	熊本	3	4			
長野	3	4	大分	3	4			
愛知	3	4	宮崎	15	19			
京都	3	4	鹿児島	3	4			
収集試料数合計 78			収集試料数合計 57					

割合 (%) は各国の合計に対する各道府県、省からの収集試料数の割合である。

2.2 試薬

試料の酸分解には、61 %硝酸 (高純度電子工業用、関東化学)、70 %過塩素酸 (TAMAPURE-AA-100、多摩化学工業)、50 %ふっ化水素酸 (原子吸光分析用、関東化学) を用いた。硝酸の希釈には超純水 (比抵抗値18 MΩ・cm 以上) を用いた。内標準法によるSrの濃度測定のために、標準物質としてSrとInの単元素標準物質 (ともにPlasmaCal、SCP SCIENCE) を用いた。Srを精製

(注) 国産大根の収集は著者以外に農林水産消費安全技術センターの松岡高広、勝藤繁、小川恵吾、佐藤佳代子、野澤慎太郎、今村正彦、琵琶隆史、荒尾祐子、柿本芳久、野村ともみ、伊澤淳修、坪根政文、足立静香が担当した。

するために、Srレジン（Eichrom Technologies）を用いた。測定した大根試料のSr安定同位体比を補正するための標準物質として認証標準物質Strontium Carbonate SRM987（National Institute of Standards and Technology）を用いた。

2.3 装置

2.4.1の大根の乾燥には送風定温乾燥機（FC-610、ADVANTEC）を用いた。Sr濃度の測定には、誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）（820MS、Varian（現Agilent Technologies））を用いた。Sr安定同位体比の測定には高精度分解能ICP-MS（HR-ICP-MS）（ElementXR、Thermo Fisher Scientific）もしくは大学共同利用機関法人人間文化研究機構総合地球環境学研究所（以下「RIHN」という。）所有の二重収束型のマルチコレクターICP-MS（MC-ICP-MS）（Neptune plus、Thermo Fisher Scientific）を用いた。

2.4 試料の前処理

2.4.1 試料の調製

国産大根については、セラミック刃の包丁で細切したもの、もしくは細切し乾燥させたもの（送風定温乾燥機内に65~80℃で一晩静置し、もとの重量の7%以下にした）を次の酸分解に用いることとした。中国産大根については、商品を開封し、無作為に選んだ1片を酸分解に用いた。

2.4.2 酸分解

細切した国産大根は3g、細切・乾燥した国産大根は0.3g、中国産大根は1片をPFA又はPTFEのビーカーに採取し、10mLの61%硝酸を加え、ホットプレート上で120℃で2時間以上加熱した。褐色のガスが発生する激しい反応が収まった後に放冷し、2.5mLの70%過塩素酸を加え、温度を上げながら200~230℃の範囲で加熱した。固形物が認められず、液が透明で、無色または薄い黄色になるまで分解した後に放冷し、0.5mLの50%ふっ化水素酸を加え、80℃で1.5~2時間加熱した。放冷後、ビーカーにふたをせずに、200~230℃で加熱し分解液を乾固した。ビーカーに5mLの1%硝酸を加え、残留物を60~80℃で加熱・溶解し、樹脂製容器に洗い込む操作を3回繰り返し、内標準としてInを5µg/Lになるように加え、1%硝酸で50mLに定容して得られた分解溶液をSr濃度の測定に供した。

2.4.3 Sr濃度の測定

分解溶液をICP-MSにより測定し、Sr濃度を内標準法で求めた。

2.4.4 Srの精製

200~400ngのSrを含む分解溶液をビーカーに採取し、150℃で乾固させた後に、残留物を4mLの8M硝酸で溶解した。Sr安定同位体比測定を阻害するRbを除去する目的でSrレジンを用いた精製を次のとおり行った。0.05M硝酸でコンディショニングしたSrレジンをカラム管に充填し、8M硝酸で洗浄した後に、溶解液を数回に分けて負荷した。3mLの8M硝酸と0.4mLの0.05M硝酸の順で洗浄した後に、2mLの0.05M硝酸によりSrを溶出した。Sr安定同位体比をHR-ICP-MSで測定する場合は、Sr濃度が20ng/mLになるように0.05M硝酸で溶出液を希釈し、測定に用いる試料溶液とした。MC-ICP-MSで測定する場合は、この溶出液を65℃で乾固し、Sr濃度が100~200ng/mLになるように残留物を3%硝酸で溶解し、測定に用いる試料溶液とした。

2.5 Sr 安定同位体比の測定

試料溶液及び試料溶液と同程度の Sr 濃度になるように希釈した SRM987 を HR-ICP-MS もしくは MC-ICP-MS により測定した。測定条件は HR-ICP-MS においては篠崎ら⁸⁾に準じ（データ収集の積算回数は 1500 回⁸⁾とした。サンプルガス流量は 1 分あたり 1.2 L とした）、MC-ICP-MS においては後藤ら²³⁾に準じた（測定サイクル数は 40 もしくは 50 とした）。測定により得られた大根試料や SRM987 の Sr 安定同位体比の補正は篠崎ら⁸⁾に準じ、⁸⁶Sr、⁸⁷Sr について ⁸⁶Kr、⁸⁷Rb によるスペクトル干渉の補正と Exponential law による内部補正を行い、補正後の SRM987 の Sr 安定同位体比を用いて大根試料の Sr 安定同位体比を補正し、結果の解析等にはこの補正後の値を用いた。

2.5.1 分析精度の確認

酸分解から HR-ICP-MS もしくは MC-ICP-MS による測定までの分析精度を確認した。

2.5.2 乾燥工程が Sr 安定同位体比に及ぼす影響の確認

生鮮大根とそれを用いて 2.4.1 の条件で乾燥させた大根を分析し、乾燥工程が Sr 安定同位体比に及ぼす影響を調べた。

2.5.3 モデル試料の分析

産地判別の基準値を設定するために、国産と中国産のモデル試料を HR-ICP-MS もしくは MC-ICP-MS により測定した。

2.6 ROC 曲線による産地判別の基準値の設定

モデル試料の Sr 安定同位体比の測定結果 ($n=135$) から、カーネル密度推定により、国産と中国産大根の Sr 安定同位体比の分布を推定した。測定した Sr 安定同位体比の分布範囲において、Sr 安定同位体比を産地判別の基準値としたカットオフ値を変化させて、特異度（国産試料を国産と正しく判別する確率、%）及び感度（中国産試料を中国産と正しく判別する確率、%）を算出した。偽陽性率（100-特異度）を横軸、感度を縦軸にプロットした Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線から産地判別の基準値（Sr 安定同位体比）を設定した。

3. 結果及び考察

3.1 分析精度の確認

並行分析 ($n=7$) により酸分解から Sr 安定同位体比測定までの分析精度を確認したところ、測定機器が HR-ICP-MS の場合は RSD=0.045 %、MC-ICP-MS では RSD=0.0051 % であり、分析精度は MC-ICP-MS が優れていた。ただし、篠崎ら⁸⁾は HR-ICP-MS での Sr 安定同位体比の日内測定精度を確認し、0.044~0.087 % と報告しており、今回の HR-ICP-MS の分析精度は問題ないと考えられた。

3.2 乾燥工程が Sr 安定同位体比に及ぼす影響の確認

7 本の生鮮大根とそれらを乾燥させたものについて、それぞれ 1 点ずつ Sr 安定同位体比を MC-ICP-MS で測定した結果、生鮮大根と切干大根の平均値間においてはペアの t 検定（有意水準 5 %）では有意差は認められず ($p=0.24$)、乾燥による Sr 安定同位体比への影響は小さいと考え

られた。

3.3 産地判別の基準値設定のためのモデル試料の分析

産地判別の基準値設定のために HR-ICP-MS で 32 試料の国産、8 試料の中国産の大根試料を、MC-ICP-MS で 46 試料の国産、49 試料の中国産の大根試料を測定した。測定結果からの各種統計量を表 2 に、国産と中国産大根の Sr 安定同位体比のヒストグラムを図 1 に示した。平均値±標準偏差は国産大根では 0.7077 ± 0.0013 ($n=78$)、中国産大根では 0.7236 ± 0.0061 ($n=57$) で、国産より中国産大根の Sr 安定同位体比が高い傾向であり、分散が等しくないと仮定した t 検定では、有意水準 5% で平均値に有意差が確認された ($p < 0.01$)。

表2 モデル試料の大根のSr安定同位体比の各種統計量

	国産	中国産
試料数	78	57
平均値	0.7077	0.7236
標準偏差	0.0013	0.0061
RSD (%)	0.18	0.84
最小値	0.7053	0.7128
第1四分位数	0.7067	0.7191
中央値	0.7076	0.7231
第3四分位数	0.7087	0.7268
最大値	0.7107	0.7410

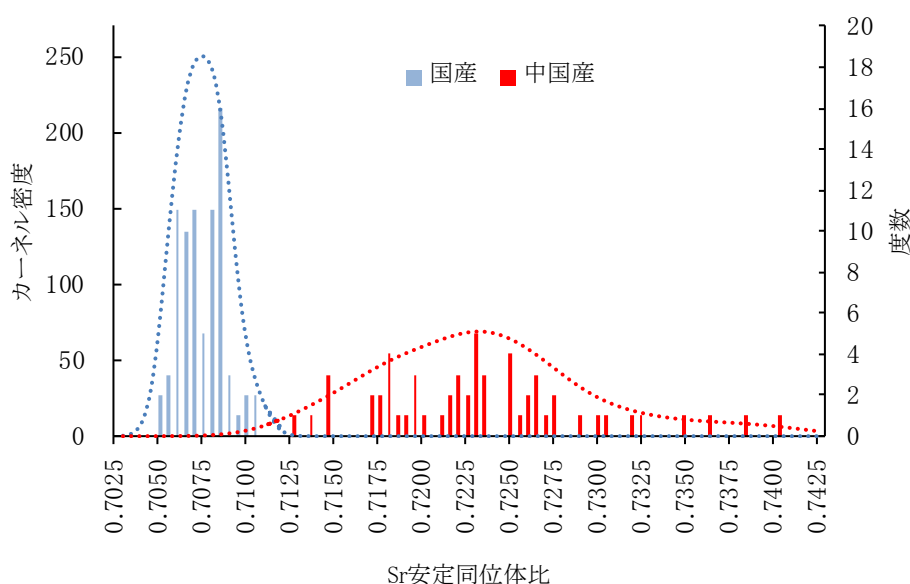


図1 モデル試料の国産と中国産大根のSr安定同位体比の分布

3.4 ROC 曲線による産地判別のための基準となる Sr 安定同位体比の設定

Sr 安定同位体比 (カットオフ値) を変化させ、各値での偽陽性率と感度を求めて ROC 曲線を作成した。偽陽性率 0%、感度 100% の点から一番距離が短い、ROC 曲線上の点の値 (偽陽性率、感度) を与える Sr 安定同位体比を産地判別の基準値とすることとした。この点の値は偽陽性率 0.7% (特異度 99.3%)、感度 98.8% であり (図 2)、対応する Sr 安定同位体比は 0.7113 であった。0.7113 を基準値として、0.7113 以下を国産、0.7113 超を中国産と判別する場合、カーネル密度推定の結果では国産と中国産大根の Sr 安定同位体比の分布で一部重なりが見られたが (図 1

の点線)、モデル試料については国産大根は全て国産と、中国産大根は全て中国産と正しく判別された。

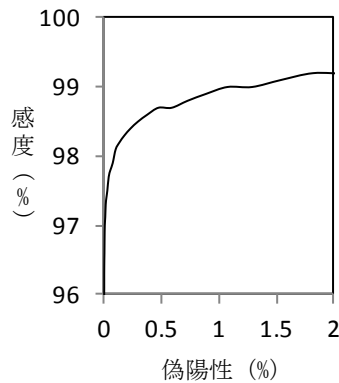


図2 国産と中国産大根判別のためのROC曲線

偽陽性(%)は100-特異度(%)である。偽陽性率0%、感度100%の点から距離が最も短い偽陽性率0.7%(特異度99.3%)、感度98.8%を与えるカットオフ値(Sr安定同位体比)は0.7113であり、これを基準値とした。特異度は国産大根を国産大根と、感度は中国産大根を中国産大根と正しく判別する確率である。

3.5 ふっ化水素酸を用いない酸分解の検討

本検討では大根試料中のケイ酸を、 SiF_4 として揮散させて除去するために、酸分解時にふっ化水素酸を用いたが、使用にあたっては毒物であることから試験者への安全性の考慮や対応したドラフトチャンバーが必要である。よって酸分解時においてふっ化水素酸の使用の有無(各 $n=5$)で大根試料のSr安定同位体比に違い出るかをHR-ICP-MSを用いて調べた結果、等分散と仮定したt検定では、有意水準5%で有意差は認められなかった($p=0.41$)。このことからふっ化水素酸の使用の有無が大根試料のSr安定同位体比に及ぼす影響は小さく、用いない場合でも、用いた場合と同程度の測定結果が得られると考えられた。ただしケイ酸が含まれる試料溶液の測定により、HR-ICP-MS、MC-ICP-MSを含むICP-MSにおいてネプライザーの詰まりやトーチやコーンの損傷のような装置の不具合が生じる可能性があることから、ふっ化水素酸の利用等によるケイ酸の除去を実施しない場合は、この点に注意する必要がある。

3.6 Sr安定同位体比分析による国産と中国産の原産地もしくは原料原産地判別

石田ら¹²⁾は元素分析とSr安定同位体比分析を行い、それぞれの結果を組み合わせた判別式による小麦の産地判別法を報告している。FAMICにおいても、一部の食品の産地判別法の検討において元素分析と安定同位体比分析によりデータ収集を行い²⁰⁾⁻²³⁾²⁶⁾²⁷⁾、得られた測定結果を組み合わせることで元素分析と安定同位体比分析の結果をそれぞれ単独で用いた場合よりも判別精度が向上する場合を確認している²⁰⁾²²⁾²³⁾²⁷⁾。今回の切干大根の原料原産地判別法の検討においては、Sr安定同位体比分析のみで国産と外国(中国)産のモデル試料を正しく判別することができた。

FAMICで検討した各作物等の原産地もしくは原料原産地の産地判別法において、国産と中国産の判別に着目した場合、試料のSr安定同位体比の平均値は国産に比べ中国産が高い傾向であり、Sr安定同位体比分析の結果のみで各作物等ごとに算出した基準値による国産と中国産の試料の判別の正答率は、国産、中国産の順に、例えば冷凍ほうれんそう²¹⁾は、100%($n=57$)、92%($n=37$)、原木栽培乾しいたけ²²⁾は93%($n=55$)、95%($n=22$)、ネギ²³⁾は98.4%($n=64$)、61%($n=38$)、ショウガ²⁷⁾は100%($n=55$)、84%($n=43$)であった。しかし、ゼンマイ(水煮)¹⁸⁾、ハチミツ²⁰⁾は国産と中国産の試料間でSr安定同位体比の分布範囲の重なりが小さくないため、国産試料を国産と正しく判別する観点から基準値を設定した場合、Sr安定同位体比分析のみによる産地判別は困難と考えられる場合もあった。このように作物等によってSr安定同位体比分析による国産と中国産の産地判別への適用可能性は異なる結果となった。

この原因としては検討に用いた作物等が育った各地域の農地土壌のSr安定同位体比の違いが

考えられる。作物の Sr 安定同位体比は、生育した土壌中の作物が吸収できる Sr の安定同位体比を反映する傾向があることから²⁸⁾、日本と中国の各地域の土壌の Sr の違いが反映されたと思われる。質量数 87 の Sr は同じ質量数の Rb のベータ崩壊（半減期 489 億年）によって生じ、年代の古い地質の方が Sr 安定同位体比は高い傾向となる。よって同一国内でも地域間で地質の形成された時代が異なれば、その土壌の Sr 安定同位体比は異なると考えられる。Aoyama ら²⁸⁾は実際に、日本の複数地域の作物の農地土壌の Sr 安定同位体比について調査し、地域間によって Sr 安定同位体比が異なる場合があることを報告している。

本検討で用いた国産試料について、試料数の割合が最も多い宮崎県産大根の Sr 安定同位体比の平均値±標準偏差は 0.7082 ± 0.0009 ($n=15$) で、二番目に多い北海道産大根は 0.7063 ± 0.0009 ($n=7$) であり、Sr 安定同位体比は異なる傾向となった。これらの値は宮崎県と北海道の農地土壌の Sr 安定同位体比の値²⁸⁾と同じ傾向であった。また、ネギの産地判別法の検討²³⁾においては、中国の二つの省で栽培されたネギを用いており、省別の Sr 安定同位体比（平均値±標準偏差、最小値~最大値）は 0.7071 ± 0.0013 、 $0.7051 \sim 0.7098$ ($n=11$) と 0.7109 ± 0.0013 、 $0.7083 \sim 0.7127$ ($n=37$) であり、省によって異なる傾向であった。これらのことから、原産地や原料原産地の判別対象となる作物等については、日本と中国のそれぞれの地域で生育したかにより Sr 安定同位体比分析の産地判別への適用可能性が変わると考えられた。

本検討も含めて、FAMIC が産地判別の検討のために測定した国産試料（RIHN 所有の MC-ICP-MS により測定した試料も含む）¹⁸⁾²⁰⁾²¹⁾²³⁾²⁵⁾²⁷⁾²⁸⁾ ($n=802$ 、47 都道府県)の各作物等（タケノコ・レンコン・ワラビ・ゼンマイ水煮、はちみつ、冷凍ほうれんそう、ネギ、タマネギ、ショウガ、サトイモ、ゴボウ、ニンニク、サヤエンドウ）ごとの Sr 安定同位体比の平均値の範囲は $0.7073 \sim 0.7094$ で、RSD の範囲は $0.08 \sim 0.24$ %であった（タマネギ²⁵⁾の国産試料の RSD は不明であるが、国産試料の各 Sr 安定同位体比について、最大値と最小値の差は 0.0060 であった。）。一方で、今回の結果から中国の雲南省で栽培される大根の Sr 安定同位体比 (0.7238 ± 0.0050 、 $n=41$) はこれらに比べ高い傾向にあるので、国産と中国産の作物等の産地判別の検討では、中国産の作物等が雲南省における大根と同じ地域で栽培されているならば、Sr 安定同位体比分析の利用が有効と考えられた。

4. まとめ

切干大根の原料原産地判別法を Sr 安定同位体比分析により検討した。その結果、Sr 安定同位体比 0.7113 を原料原産地判別の基準値にしたところ（陽性尤度比は 136）、収集した全ての大根試料（国産 78 試料、中国産 57 試料）の産地を正しく判別することができた。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、国産大根の収集にご協力いただいた農業協同組合、切干大根の生産量についてご教示いただいた日本かんぶつ協会の皆様に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 農林水産省、作物統計（だいこん都道府県別の用途別出荷量）（平成 26 年~平成 28 年産）
- 2) 農林水産省、生産農業所得統計（農産物産出額の順位と構成比）（平成 26 年~平成 28 年）

- 3) 日本かんぶつ協会調べ
- 4) 財務省、貿易統計（乾燥野菜のうちのだいこん）
- 5) 井上博道, 梅宮善章, 中村ゆり: ウメ干しの仁の微量元素濃度による日本産と中国産の判別, 日本土壌肥科学雑誌, **76**(6), 875-880(2005)
- 6) 中下留美子, 鈴木彌生子, 赤松史一, 小原和仁, 伊永隆史: 安定同位体比解析による国産・豪州産・米国産牛肉の産地判別の可能性, 日本食品科学工学会誌, **55**(4), 191-193(2008)
- 7) 中下留美子, 鈴木彌生子, 一宮孝博, 伊永隆史: 生元素安定同位体比解析による養殖ウナギの産地判別の可能性, 日本食品科学工学会誌, **56**(9), 495-497(2009)
- 8) 篠崎美由起, 有山薫, 川崎晃, 平田岳史: 単一検出器型高分解能誘導結合プラズマ質量分析装置を用いる穀物のストロンチウムと鉛の同位体比分析, 分析化学, **59**(11), 1003-1011(2010)
- 9) 小泉鏡子, 中下留美子, 鈴木彌生子: 安定同位体比分析によるしらす干しの原料原産地判別の可能性, 日本食品科学工学会誌, **58**(6), 259-262(2011)
- 10) 鈴木彌生子, 中下留美子, 河邊亮, 北井亜希子, 富山眞吾: 炭素・酸素安定同位体比分析による青森県産および中国産リンゴの産地判別の可能性, 日本食品科学工学会誌, **59**(2), 69-75(2012)
- 11) 鈴木彌生子, 國分敦子, 絵面智宏, 中山和美: 炭素・窒素・酸素安定同位体比分析による湯通し塩蔵ワカメの産地判別の可能性, 日本食品科学工学会誌, **60**(1), 1-10(2013)
- 12) 石田悦基, 中村健治, 有山薫, 川崎晃: 微量元素濃度及び重元素同位体比を利用する小麦の産地判別, 分析化学, **63**(3), 255-261(2014)
- 13) 絵面智宏, 國分敦子, 阿部洋俊, 濱田真子, 加藤栄一, 鈴木彌生子: わかめの加工による微量元素組成変動と産地判別の可能性, 日本食品科学工学会誌, **62**(10), 484-491(2015)
- 14) 服部賢志, 船木紀夫, 法邑雄司: 無機元素分析によるアスパラガスの産地判別, 日本食品科学工学会誌, **56**(2), 108-113(2009)
- 15) 服部賢志, 木村康晴, 高嶋康晴, 法邑雄司: 無機元素分析によるニホンウナギ加工品の原産地判別, 日本水産学会誌, **75**(5), 844-848(2009)
- 16) 諸橋保, 青山恵介, 浪越充司, 木村康晴, 服部賢志: 元素分析による湯通し塩蔵わかめの原料原産地判別, 日本水産学会誌, **77**(2), 243-245(2011)
- 17) Hiraoka, H.; Morita, S.; Gotou, Y.; Hattori, S.; Ishikawa, T.; Okano, K.: Confirming the authenticity of the geographical origin of Naruto dried wakame *Undaria pinnatifida* using stable nitrogen isotope ratios, *Fisheries Science*, **80**(3), 635-642(2014)
- 18) 伊澤淳修, 青山恵介, 申基澈, 中野孝教: ストロンチウム安定同位体比によるタケノコ等野菜の水煮加工品の原料原産地判別法の検討, 農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告, **38**, 6-15(2014)
- 19) 一色摩耶, 中村哲, 鈴木彌生子: 多元素同時分析によるアカシアはちみつの原料原産地判別, 日本食品科学工学会誌, **62**(5), 257-262(2015)
- 20) 豊田正俊, 箱田晃子, 石井修人, 鈴木彌生子: はちみつのストロンチウム安定同位体比分析による原料原産地判別法の検討, 農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告, **41**, 22-30(2017)
- 21) 森田先恵, 伊澤淳修, 申基澈, 中野孝教: 元素分析及びストロンチウム安定同位体比分析による冷凍ほうれんそうの原料原産地判別法の検討, 農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告, **39**, 31-37(2015)

- 22) 石井修人, 箱田晃子: 原木栽培乾しいたけの元素分析とストロンチウム安定同位体比分析の組み合わせによる原料原産地判別法の検討, 農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告, **40**, 9-16(2017)
- 23) 後藤祐之介, 伊澤淳修, 申基澈, 中野孝教: ネギのストロンチウム安定同位体比分析による原産地判別法の検討, 農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告, **40**, 17-24(2017)
- 24) 渡邊彩乃, 寺田昌市: 炭素・酸素安定同位体比分析によるりんごジュースの原料りんごの原産地判別法の検討, 農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告, **40**, 25-32(2017)
- 25) Hiraoka, H.; Morita, S.; Izawa, A.; Aoyama, K.; Shin, K.C.; Nakano, T.: Tracing the geographical origin of onions by strontium isotope ratio and strontium content, *Analytical Sciences*, **32**(7), 781-788(2016)
- 26) 小岩智宏, 伊澤淳修, 後藤祐之介: かき類の元素分析及び軽元素安定同位体比分析による原産地判別法の検討, 農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告, **41**, 15-21(2017)
- 27) 松野和久, 井伊悠介, 寺田昌市, 太田民久, 申基澈, 陀安一郎: ショウガの元素分析及びストロンチウム安定同位体比分析による原産地判別法の検討, 農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告, **41**, 8-14(2017)
- 28) Aoyama, K.; Nakano, T.; Shin, K.C.; Izawa, A.; Morita, S.: Variation of strontium stable isotope ratios and origins of strontium in Japanese vegetables and comparison with Chinese vegetables, *Food Chemistry*, **237**, 1186-1195(2017)
- 29) 船木紀夫, 服部賢志, 木村康晴, 佐藤耕一, 塚田政範, 津村明宏, 佐野雅敏、豊田正俊、小塚健志、門倉雅史、法邑雄司: 無機元素分析によるゴボウの原産国判別, 日本食品科学工学会誌, **57**(2), 70-77(2010)
- 30) 門倉雅史, 有山薫: 無機分析によるニンニクの原産国判別法の開発, 農林水産消費安全技術センター調査研究報告, **31**, 1-7(2007)
- 31) 服部賢志, 木村康晴, 船木紀夫, 法邑雄司: 無機元素組成によるさやえんどうの産地判別, 日本食品科学工学会誌, **56**(10), 529-532(2009)

栗加工品の原料原産地判別検査法の検討

後藤 祐之介¹, 井伊 悠介², 申 基澈³, 陀安 一郎³

Yunosuke Gotou, Yusuke Ii, Ki-Cheol Shin, Ichiro Tayasu

要 約

原料栗が国産（日本産）及び外国産（韓国産及び中国産）の栗加工品について、ストロンチウム（Sr）安定同位体比を利用した原料原産地判別法を検討した。生鮮栗（国産 68 点、外国産 21 点）、栗加工品（原料栗が国産のもの 21 点、原料栗が外国産のもの 27 点）を収集し Sr 安定同位体比を測定した。甘露煮の加工工程で栗の Sr 安定同位体比は加工に用いた糖液の Sr 安定同位体比に影響される傾向があった。また、生鮮栗試料と栗加工品試料間に有意な差がみられたため、栗加工品試料を用いて Sr 安定同位体比による判別モデル及び Sr 安定同位体比と Sr 濃度による判別モデルを検討したが、いずれの判別モデルも十分な判別精度は得られなかった。

1. はじめに

食品表示法（平成 25 年法律第 70 号）に基づき定められた食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）には、食品を販売する際に表示しなければならない表示事項やその表示の方法が規定されており、一般用加工食品にあつては、「名称」、「原材料名」等の表示が義務付けられている。さらに、平成 29 年 9 月 1 日からは、輸入品以外の加工食品においては、重量割合が最も高い原材料の原産地について、「国産品にあつては国産である旨を、輸入品にあつては、原産国名を表示する。」ことが義務付けられた（経過措置期間：平成 34 年 3 月 31 日まで）。

国内で製造されている栗の加工品としては主に甘露煮等の缶瓶詰があり、2015 年の生産量は 8,443 トン¹⁾である。原料の生鮮栗については、国内の生産量が 11,800 トン²⁾に対して、加工用途で輸入された生鮮栗は 3,649 トン³⁾であり、輸入国の内訳は、韓国産 73 %、中国産 26 %である。また、栗加工品としての輸入量は 2,066 トン³⁾あり、そのうち中国産は 75 %を占めている。原料の生鮮栗については国産と外国産で 2 倍程度の価格差⁴⁾があることから栗加工品の原料栗の原産地（原料原産地）の偽装が懸念され、原料原産地を客観的に検証する判別技術が望まれている。

食品における原産地に関する科学的検証法は、元素分析、軽元素安定同位体比分析及び Sr 安定同位体比分析を利用した方法が報告されている⁵⁾⁻⁷⁾。これらの方法は、土壌や水質等の生育環境の違いがそこで栽培された農産物の元素濃度や安定同位体比に影響を与えることを利用した原産地判別法であるが、農産物加工品及び水産物加工品の原料原産地判別にも利用できることが報告されている⁸⁾⁻¹⁰⁾。そこで、栗加工品のうち国内生産量の多い甘露煮等を対象として、Sr 安定同位体比分析による栗加工品の原料原産地判別法について加工工程における Sr 安定同位体比の変動をふまえて検討を行った。

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター（現）本部

³ 大学共同利用機関法人 人間文化研究機構 総合地球環境学研究所

2. 実験方法

2.1 試料

試料は、平成 29 年 4 月から平成 29 年 12 月にかけて生鮮栗（国産 68 点、韓国産 10 点、中国産 11 点）、甘露煮（原料栗が国産のもの 15 点、韓国産のもの 11 点、中国産のもの 7 点）、渋皮煮（原料栗が国産のもの 6 点、韓国産のもの 4 点、中国産のもの 5 点）を入手した。栗加工品試料は製造業者、流通事業者などから加工後の製品を入手し、生鮮栗試料は出荷量の割合を参考に農業協同組合などから入手するとともに、一部については栗加工品の製造業者から原料の生鮮栗を試料として入手した。

2.2 試薬

試料の酸分解には、61 %硝酸（高純度電子工業用、関東化学）、70 %過塩素酸（TAMAPURE-AA-100、多摩化学工業）、50 %ふっ化水素酸（原子吸光分析用、関東化学）を用いた。硝酸の希釈には超純水（比抵抗値 $18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上）を用いた。内標準法によるSrの濃度測定のために、標準物質としてSrとInの単元素標準物質（ともにPlasmaCal、SCP SCIENCE）を用いた。Srを精製するために、Srレジン（Eichrom Technologies）を用いた。測定した試料のSr安定同位体比を補正するための標準物質として認証標準物質Strontium Carbonate SRM987（National Institute of Standards and Technology）を用いた。

2.3 装置

Sr濃度の測定には、誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）（820MS、Varian（現 Agilent Technologies））を用いた。Sr安定同位体比の測定は、大学共同利用機関法人人間文化研究機構総合地球環境学研究所が所有する二重収束型マルチコレクター誘導結合プラズマ質量分析装置（MC-ICP-MS）（Neptune Plus、Thermo Fisher Scientific）を用いた。

2.4 試料調製

試料 1 点につき、果肉部分の 1 個をランダムに抜き取り用いた。生鮮試料については外皮（鬼皮）及び内皮（渋皮）を剥皮し、栗加工品試料については渋皮煮は渋皮を削り取り甘露煮は表面に付いた糖液を水道水で洗い流した。超純水で表面を洗浄した後にポリエチレン製袋に入れハンマーで叩いて粉碎試料とした。

2.5 酸分解

粉碎試料約 5 g を採取した樹脂製ヒータブルビーカーに 61 %硝酸を 10 mL 加え、樹脂製時計皿でふたをし、 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ のホットプレート上で加熱した。褐色のガスが発生する激しい反応が収まった後に放冷し、70 %過塩素酸を 2.5 mL 加え、徐々に温度を上げながら $180\sim 230\text{ }^{\circ}\text{C}$ の範囲で加熱し、分解液が透明かつ無色または薄い黄色になるまで分解した。その後放冷し、48 %フッ化水素酸を 2 mL 加え、 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 程度で 40 分加温した。次に時計皿を外し、約 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ で加熱して乾固した。ビーカーに 1 %硝酸を 5 mL 程度加え、ビーカー内の残留物をホットプレート上で加熱・溶解し、50 mL 容樹脂製全量フラスコに移す操作を 3 回繰り返し、内標準として In を $5\text{ }\mu\text{g/L}$ になるように加え、1 %硝酸で定容後、Sr濃度測定用試料溶液とした。試料は全て 2 点併行で分析した。

2.6 Sr の精製

Sr 安定同位体比測定を阻害する Rb を除去する目的で Sr レジンをを用いた精製を行った。Sr レジンをカラム管に充填し、8 M 硝酸でコンディショニングを行った。次に Sr 濃度測定用試料溶液 (Sr が 400 ng 含まれる量) を 200 °C 程度で蒸発乾固し、残留物を 8 M 硝酸 6 mL に溶解し、Sr レジンカラムに負荷した。8 M 硝酸 3 mL を添加して Sr レジンカラムを洗浄した後、0.05 M 硝酸 2 mL で Sr を溶出させた。この溶出液を 65 °C 程度で蒸発乾固させ、残留物を 3 %硝酸 2 mL に溶解し、これを Sr 安定同位体比測定用試料溶液とした。

2.7 測定

ICP-MS を用いて内標準法 (内標準 : In) により Sr 濃度を表 1 の測定条件で測定した。また、MC-ICP-MS を用いて Sr 安定同位体比を表 2 の測定条件で測定した。

表 1 ICP-MS の測定条件

RFパワー	1.3 kW
プラズマガスフロー	15.5 L/min
補助ガスフロー	1.5 L/min
ネブライザーガスフロー	0.95 L/min
ポンプ速度	0.08 rps

表 2 MC-ICP-MS の測定条件

RFパワー	1.2 kw
プラズマガスフロー	15 L/min
補助ガスフロー	0.7-0.8 L/min
ネブライザーガスフロー	0.85 L/min
ネブライザー (吸入量)	PFA (100 μ L/min)
検出器配置 m/z (cup)	83(L3), 84(L2), 85(L1), 86(C), 87(H1), 88(H2)
測定ブロック数	1
測定サイクル数	40

2.8 加工工程による Sr 安定同位体比への影響の確認

甘露煮等の栗加工品は、国内の製造業者が外国産の生鮮栗を用いて製造した国内加工品や、国産の生鮮栗を輸出し加工工程の一部を国外で行った一部国外加工品など、原料の原産国と製品の加工国が異なる場合がある。このような製品における加工工程での Sr 安定同位体比の変化を把握するために、生鮮栗 2 産地 (長野県産、韓国産) と Sr 安定同位体比が異なる 2 種類の水 (I : $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr} = 0.7174$ 、II : $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr} = 0.7039$) を用いて次のとおり甘露煮模擬試料を作製した。生鮮栗 5 個の外皮及び内皮を剥皮し、水 200 mL とともにポリエチレン製袋に入れた。1 時間後、表 3 の加熱処理 1 の条件で水煮を行い、その後 50 %砂糖溶液 100 mL に移し替えて加熱処理 2 の条件で糖液煮を行って模擬試料を作製した。

表 3 甘露煮模擬試料の作製条件

	温度 (°C)	時間 (分)
加熱処理1	20~60	10
	60	20
	60~100	20
加熱処理2	~100	10
	100	20

2.9 判別モデルの構築

2.9.1 Sr 安定同位体比による判別

測定した Sr 安定同位体比の分布範囲において、Sr 安定同位体比を産地判別の基準値としたカットオフ値を変化させて、国産試料を国産と正しく判別する確率 (特異度) 及び外国産試料を外

国産と正しく判別する確率（感度）を算出し、偽陽性率（100－特異度）を横軸、感度を縦軸にプロットした Receiver Operating Characteristic（ROC）曲線から基準値を設定した。

2.9.2 Sr 安定同位体比と Sr 濃度による判別

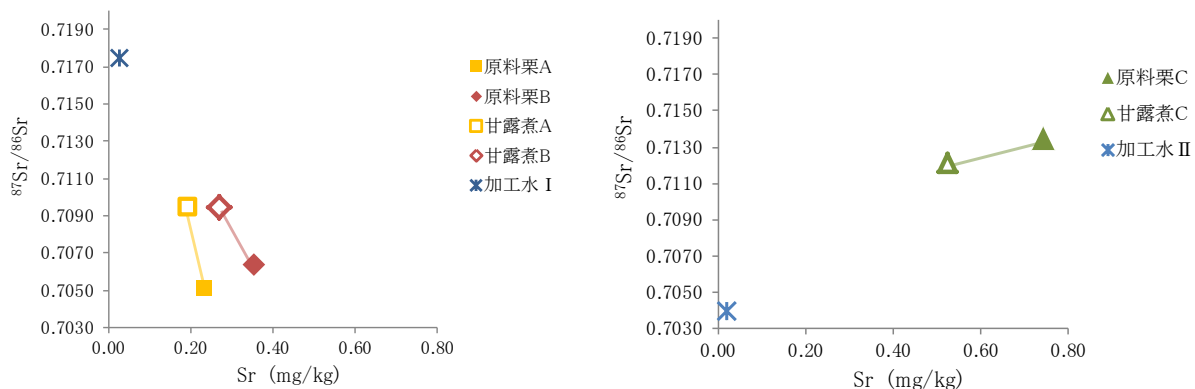
2.7 で得られたデータのうち、栗加工品試料を判別モデルの構築に用いた。各試料 2 点併行で分析した結果から、ランダムに 1 点選択した Sr 安定同位体比と Sr 濃度を説明変数として、線形判別分析により判別モデルを構築した。線形判別分析は R 3.4.1 の MASS パッケージを使用した。解析は中村ら⁷⁾の方法に従った。構築した判別モデルの未知試料に対する的中率は、判別モデル構築用試料を用いた Leave-one-out cross validation（LOOCV）により確認した。

3. 結果及び考察

3.1 加工工程による Sr 安定同位体比への影響の確認

生鮮栗を Sr 安定同位体比 ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) の異なる水で加工した甘露煮試料とその原料栗の $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ と Sr 濃度を測定した。国産生鮮栗を $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ の高い水 I で加工した甘露煮試料 A、B とその原料栗 A、B の $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ と Sr 濃度を図 1 (a) に、韓国産生鮮栗を $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ の低い水 II で加工した甘露煮試料 C とその原料栗 C の $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ と Sr 濃度を図 1 (b) に示した。甘露煮試料の $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ は、全ての模擬試料において原料栗と加工水の間の値を示した。Sr 濃度については、全ての模擬試料において原料栗の値より減少する傾向がみられた。

甘露煮試料の $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ は、原料栗の $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ から加工に用いた水の $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ に近づく傾向がみられ、これは加工工程（水煮・糖液煮）による影響と考えられた。この結果から栗の産地と加工地が異なる場合、甘露煮の Sr 安定同位体比は加工地の水の影響を受けて生鮮栗の値から変動する可能性があると考えられた。



(a) 水 I ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr} = 0.7174$) を用いた試料 ($n = 5$) (b) 水 II ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr} = 0.7039$) を用いた試料 ($n = 5$)

図 1 甘露煮試料とその原料栗の $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ と Sr 濃度

3.2 Sr 安定同位体比

今回収集した試料の $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ を品目別に表 4 に示した。生鮮栗、栗加工品ともに原料栗の産地が国産の試料より外国産の試料の方が有意に高い傾向がみられた。また、国産の試料、外国産の試料ともに生鮮栗試料と栗加工品試料間に t 検定で有意な差 ($p < 0.05$) がみられたことから、判別モデルの検討に生鮮栗試料は用いないこととした。

表 4 生鮮栗試料と栗加工品試料の $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$

原料栗の産地	試料形態	試料数(n)	平均値	最大値	最小値	標準偏差
国産	生鮮栗	68	0.7077	0.7117	0.7050	0.0016
	栗加工品	21	0.7089	0.7134	0.7061	0.0019
外国産	生鮮栗	21	0.7116	0.7205	0.7064	0.0032
	栗加工品	27	0.7139	0.7207	0.7103	0.0024

3.3 Sr 安定同位体比による判別の検討

収集した栗加工品試料について原料栗の産地別の $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ を図 2 に示した。

$^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ の ROC 曲線において偽陽性率が最小で感度が最大となる値を産地判別の基準とした。判別基準値は $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ で 0.7110 となり (図 3)、収集試料の $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ が 0.7110 以上なら外国産、0.7110 未満なら国産と判定した。判別モデル構築用試料の的中率は、国産試料 90.5% (19/21)、外国産試料 96.3% (26/27) となったが、国産試料と外国産試料の $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ の分布に一部重なりがあり十分な判別結果は得られなかった。

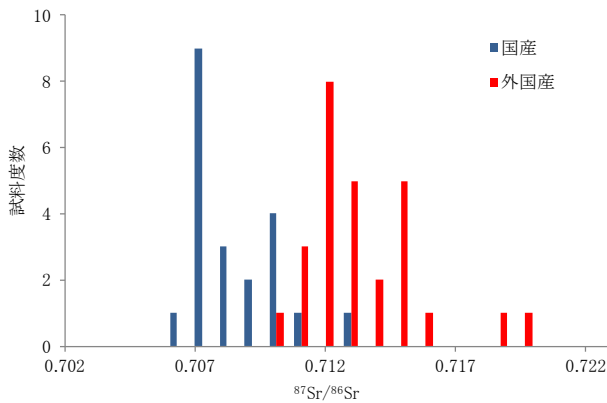


図 2 栗加工品試料の $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ のヒストグラム

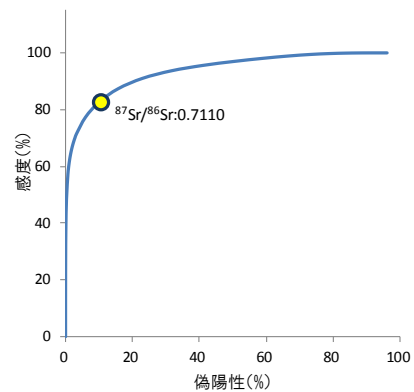


図 3 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 判別の ROC 曲線

3.4 Sr 安定同位体比と Sr 濃度による判別の検討

栗加工品試料の Sr 濃度を表 5 に $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ と Sr 濃度の関係を図 4 に示した。原料栗が国産の試料と外国産の試料の Sr 濃度に有意な差はなく、国産試料の分布範囲に外国産試料がほぼ重なっている。

表 5 栗加工品試料の Sr 濃度 (mg/kg)

原料栗の産地	試料数(n)	平均値	標準偏差
国産	21	0.68	0.55
外国産	27	0.84	0.50

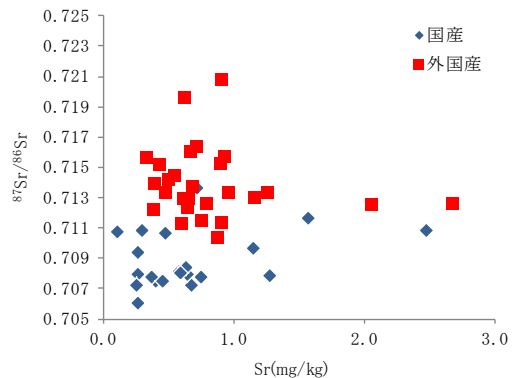


図 4 栗加工品試料の $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ と Sr 濃度の散布図

栗加工品試料について、 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ と Sr 濃度を変数として、線型判別分析により判別モデルを構築した。LOOCV により得られた判別モデルの判別得点のヒストグラムを図 5 に示した。判別得点が正の場合は国産、負の場合は外国産と判別した。

判別モデル構築用試料の的中率は、国産 85.7 % (18/21)、外国産 85.2 % (23/27) となり、十分な判別精度は得られなかった。このため、原産地判別の検査法として用いるのは困難と考えられた。

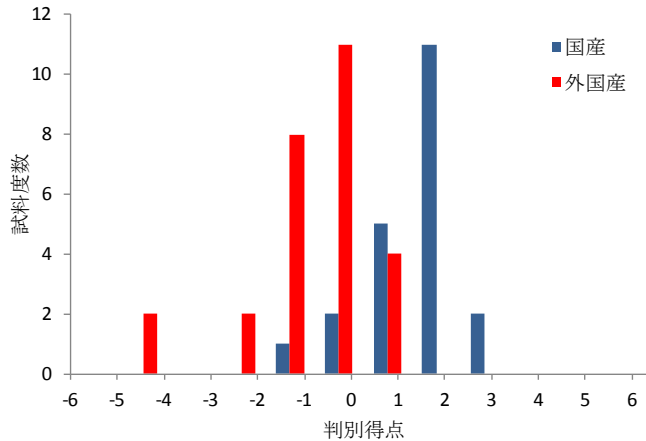


図 5 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ と Sr 濃度による判別得点のヒストグラム

4. まとめ

本研究では、 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ を利用した栗加工品の原料原産地判別法を検討した。その結果、判別モデル構築用試料の的中率は、 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ による判別モデルでは国産試料 90.5 %、外国産試料 96.3 %、 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ と Sr 濃度による判別モデルでは国産 85.7 %、外国産 85.2 % となり、いずれの判別モデルも十分な判別精度は得られなかった。

また、甘露煮の加工工程で栗の $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ は変動し加工に用いた水の値に近づく傾向が確認された。今後、甘露煮など加工品の原料原産地判別の精度を向上させるため、水煮等の加工影響を軽減させる前処理法や新たな判別技術の開発が望まれる。

文 献

- 1) 2015年缶詰協会資料
- 2) 農林水産省作物統計
- 3) 財務省貿易統計
- 4) 東京都中央卸売市場年報 (平成28年)
- 5) Ariyama, K.; Aoyama, Y.; Mochizuki, A.; Homura, Y.; Kadokura, M.; Yasui, A.: Determination of the geographic origin of onions between three main production areas in Japan and other countries by mineral composition, *J. Agric. Food Chem.*, **55**(2), 347-354(2007)
- 6) 門倉雅史, 法邑雄司, 渡邊裕之, 堀田博, 鈴木忠直, 安井明美: 無機元素組成によるカボチャの原産地判定技術, *日本食品科学工学会誌*, **57** (2), 78-84 (2010)
- 7) 中村哲, 法邑雄司, 豊田正俊: ゴボウの原産地判別の試料調製法の再検討, *農林水産消費安*

- 全技術センター調査研究報告, **37**, 1-10 (2013)
- 8) 伊澤淳修, 青山恵介, 申基澈, 中野孝教: ストロンチウム安定同位体比によるタケノコ等野菜の水煮加工品の原料原産地判別法の検討, 農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告, **38**, 6-15 (2014)
- 9) 諸橋保, 青山恵介, 浪越充司, 木村康晴, 服部賢志: 元素分析による湯通し塩蔵わかめの原料原産地判別, 日本水産学会誌, **77** (2), 243-245 (2011)
- 10) Hiraoka, H.; Morita, S.; Gotou, Y.; Hattori, S.; Ishikawa, T.; Okano K.: Confirming the authenticity of the geographical origin of Naruto dried wakame *Undaria pinnatifida* using stable nitrogen isotope ratios, *Fisheries Science*, **80**(3), 635-642(2014)

DNA 分析による大豆加工品の原料大豆の品種判別法の開発

石原 敏史¹, 岸根 雅宏², 高嶋 康晴³, 豊田 正俊¹, 澤田 桂子¹,
井伊 悠介⁴, 小岩 智宏⁴

Toshifumi Ishihara, Masahiro Kishine, Yasuharu Takashima, Masatoshi Toyoda, Keiko Sawada,
Yusuke Ii, Tomohiro Koiwa

要 約

大豆加工品における原料大豆の品種判別を可能とするため、品種特異的な塩基の挿入又は欠失をターゲットとして、Tetra-Primer ARMS-PCR 法によるフクユタカ、ユキシズカ等の検査用プライマーの開発を行った。またフクユタカ検査用プライマーについては、検査における偽陽性の発生を防止するため、大豆加工品における異品種の混入が、生産・流通段階や製造段階における少量の混入か否かを判別する手法の検討を行った。キャピラリー電気泳動装置による電気泳動結果の解析を行うことにより、少量の混入か否かを判別することが可能となり、表示された品種以外の品種の混入の有無を判別する検査法を開発することができた。

1. はじめに

食品表示法（平成 25 年法律第 70 号）に基づく食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）第 7 条により、使用した原材料が特色のあるものである旨を表示する場合又は製品の名称が特色のある原材料を使用した旨を示すものである場合は、その割合が 100%である場合を除き、その重量の割合を表示することが義務づけられており、品種名のみを表示する場合は、その品種の使用割合が 100 % でなければならないとされている。使用した大豆の品種表示のある商品は、通常の商品と比較して値段が高いため、表示が偽装される懸念があるが、それを確認する検査法は確立していなかった。そこで、原料大豆の品種名が表示された大豆加工品について、表示された品種以外の品種（以下「異品種」という。）が混入されているか否かを判別するための検査法の開発を行った。また、一般的に DNA 分析は高感度であることから、生産・流通段階や製造段階における少量の異品種の混入でも検知してしまい「陽性」と判定される恐れがある。そのため、原料大豆の生産・流通段階や大豆加工品の製造段階における少量の異品種の混入の可能性が高いか否かの判定を行うための検討を行った。

2. 実験方法

2.1 試料の収集

大豆の各品種の遺伝子型の確認等を行うことを目的に、判別対象 13 品種（ユキホマレ、リュウホウ、タチナガハ、フクユタカ、エンレイ、ミヤギシロメ、ユキシズカ、スズマル、納豆小

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

² 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 食品分析研究領域

³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部（現）神戸センター

⁴ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター（現）本部

粒、里のほほえみ、ナカセンナリ、タマホマレ及び丹波黒) について道府県の農業試験場等から原種又は原々種の収集を行った。収集した大豆の種子 1 粒ずつから DNA を抽出して、各品種の標準 DNA 溶液を作製し、開発した検査用プライマーの性能等の確認に使用した。

2.2 モデル試料の製造

大豆加工品への適用検討等を行うことを目的に、異品種の混入率(重量比)の異なる大豆加工品のモデル試料を製造した。また、混入した大豆の品種の違いによる影響を確認するため、異なる大豆の品種を混入させた大豆加工品のモデル試料を製造した。異品種の混入率の異なるモデル試料は、フクユタカを原料品種として、異品種(エンレイ)を種子の重量比で混入率 5%、10%及び 20%となるように加えて、豆乳、おから、豆腐及び油揚げを製造した。混入した大豆の品種の違いによる影響を確認するためのモデル試料は、フクユタカを原料品種として、エンレイ、ユキシズカ、ミヤギシロメ及びタチナガハをそれぞれ種子の重量比で混入率 5%となるように加え豆乳及び豆腐を製造した。

2.3 DNA 抽出

2.3.1 大豆の種子からの DNA 抽出

大豆の種子 1 粒からの DNA 抽出は GM quicker (ニッポンジーン) を使用し、「100 mg ダイズ種子粉砕試料からの DNA 抽出プロトコール」を一部改変して行った。まず、大豆 1 粒をチャック付きポリエチレン袋にとり、滅菌水を加え冷暗所で一昼夜静置した後、滅菌水を取り除きハンマーで細かく粉砕したものを 100~150 mg を 2.0 mL チューブに採取し、1200 µL の GE1 Buffer および 8 µL の RNase A をそれぞれ添加した後、ボルテックスミキサーにて 30 秒間かくはんし 5 分間室温で静置した。続いて、150 µL の GE2 Buffer を添加し、10~12 回チューブを激しく転倒させ良くかくはんした後、5 分間水冷した。次に遠心機を用いて 13000 ×g、4 °C で 5 分間遠心を行った後、上澄み 800 µL を新しい 2.0 mL チューブに移し、300 µL の GE3 Buffer 及び 300 µL のイソプロパノールを添加し、10~12 回チューブを激しく転倒させ、良く混和した。この混合液を 650 µL ずつ Spin Column に移し、遠心機を用いて 13000 ×g、4 °C で 30 秒間遠心した後、通過液を廃棄する操作を繰り返し、混合液全量を Spin Column に移した。次に Spin Column に 600 µL の GW Buffer を添加し、遠心機を用いて 13000 ×g、4 °C で 60 秒間遠心した後、通過液を廃棄し、Spin Column を新しい 1.5 mL チューブに移した。Spin Column に 50 µL の TE(pH8.0)を滴下した後、3 分間室温で静置し、遠心機を用いて 13000 ×g、4 °C で 60 秒間遠心して通過液を回収し DNA 溶液とした。抽出した DNA 溶液は 260 nm の吸光度を測定し、1 O.D. 260 nm を 50 ng/µL DNA 溶液として DNA 濃度を算出し、滅菌水で 2.5 ng/µL になるように希釈して PCR 用の希釈 DNA 溶液を調製した。分光光度計は NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

2.3.2 大豆加工品からの DNA 抽出

製造したモデル試料からの DNA 抽出は、「JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 第 3 版」の「DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A」により行った。豆乳及びおからはそのまま 1 g を DNA 抽出に供した。豆腐及び油揚げは等量の滅菌水を加えてホモジナイザーを用いて細かく粉砕したものを 1 g を DNA 抽出に供した。抽出した DNA 溶液は 260 nm の吸光度を測定し、1 O.D. 260 nm を 50 ng/µL DNA 溶液として DNA 濃度を算出し、滅菌水で 2.5 ng/µL になるように希釈して PCR 用の希釈 DNA 溶液を調製した。分光光度計

は NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

2.4 PCR

PCR 反応液の組成は、0.02 units の DNA ポリメラーゼ KOD FX Neo (TOYOBO)、1 × Buffer for KOD FX Neo (2.0mM Mg²⁺ plus)、0.2 mmol/L dNTP Mixture 及び品種ごとのプライマーセット (表 1 参照) を含む反応液に、希釈 DNA 溶液を 2.0 μL 加え、滅菌水で全量を 10μL とした。PCR はサーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。PCR の温度サイクルは、最初の熱変性として 94 °C で 2 分、次に (1) 熱変性として 98 °C で 4 秒、(2) アニーリングとして 66 °C で 30 秒、(3) 伸長反応として 68 °C で 15 秒の (1) ~ (3) を 1 サイクルとして 30 サイクル、最後に伸長反応として 68 °C で 2 分反応させた。

2.5 キャピラリー電気泳動装置による電気泳動

PCR により得られた PCR 産物は、キャピラリー電気泳動装置 QIAxcel Advanced System (QIAGEN) により電気泳動を行った。カートリッジは QIAxcel DNA Screening Kit を使用し、Alignment Marker として QX Alignment Marker 15 bp/500 bp を使用し、分子量マーカーとして QX DNA Size Marker 25–500 bp を使用した。得られた電気泳動結果から異品種特異的バンドのピーク強度 (Height) を共通バンド、品種特異的バンド及び異品種特異的バンドのピーク強度 (Height) の合計で割ったピーク強度比を求め、解析に用いた。

3. 結果及び考察

3.1 検査用プライマーの開発

品種特異的な塩基の挿入又は欠失 (以下「InDel」という。) をターゲットとして、表示品種か異品種かを 1 回の PCR で判別するため、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 (以下「農研機構」という。) との共同研究により、Tetra-Primer ARMS-PCR 法¹⁾による検査用プライマーの開発を行った。なお、検査用プライマーの設計に必要な多型情報や配列に関する情報は、農研機構次世代作物開発研究センターで取得されたものを試料提供契約により入手した。

Tetra-Primer ARMS-PCR 法では、2 つのプライマー対を使用することで、2 つの異なる一塩基多型 (SNP) に由来する長さの異なる DNA 断片を同時に増幅することが可能であり、得られた DNA 断片の長さからそれぞれの多型の有無を確認することができる。これを応用し、今回の検査用プライマーでは品種特異的な InDel の有無により、長さの異なる DNA 断片が増幅するように設計を行った (図 1)。品種特異的な InDel をはさむように Outer Primer (図 1 黄色の矢印) を設計し、InDel の有無により選択的にアニーリングするように Inner Primer (図 1 水色と赤色の矢印) を設計することにより、表示品種と異品種で異なる長さのバンドが増幅するよう設計を行った (表 1)。これにより、品種にかかわらず増幅する共通バンド、表示品種のみで増幅する表示品種特異的バンド、異品種のみで増幅する異品種特異的バンドの 3 種が増幅することになり、異品種特異的バンドの有無により異品種の混入の有無を確認することができる。

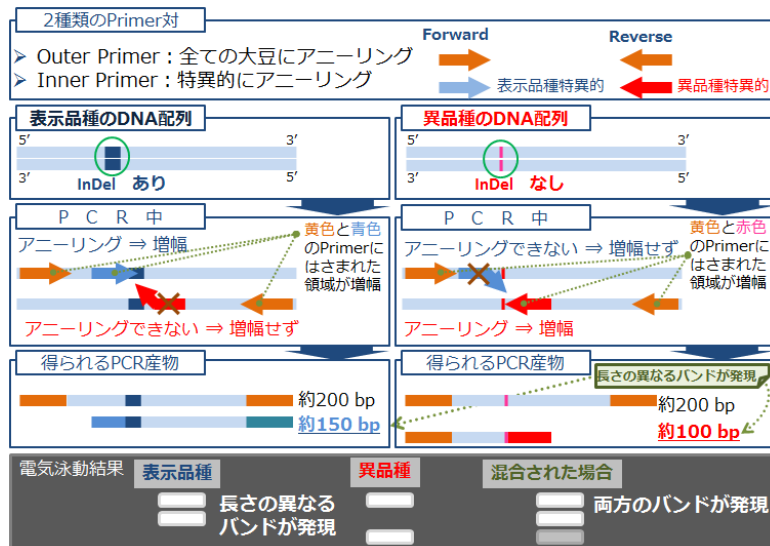


図1 Tetra-Primer ARMS-PCR法 模式図

表1 開発した検査用プライマー

Marker	Primer Name	Type	配列 (5'→3')	終濃度 (μM)	増幅長 (bp)
フクユタカ 検査用プライマー	FU-OF2	Outer F	GCACGCCGATGTCATGTTC	0.25	186/185 148 89
	FU-ORk2	Outer R	AAAACCAAGTTCAATCTCCGGCAGTGTTA	0.25	
	FU-IFk2	Inner F	AACCTTTTGATATTTCTTTTGCTGTTAG	0.25	
	FU-IRk1	Inner R	AAGTCAAATTAGTAAGCCCACACTT	0.25	
ユキシヅカ 検査用プライマー	YS-OF	Outer F	GCTGGATGCACAACCATTGAC	0.25	180/179 135 88
	YS-ORk1	Outer R	GCACTTACTTCGTTTATTGGCGGTG	0.25	
	YS-IFk3	Inner F	CCAAACTCAAACCTTCTCCAACAA	0.25	
	YS-IRk1	Inner R	AGGAAGTCAAGGTGGTAATGTG	0.25	
ナカセンナリ 検査用プライマー	NA-OFk1	Outer F	CCTTCAGCCCTTTTGACCACCA	0.25	186/179 147 83
	NA-ORk1	Outer R	AAGGGAGACAGGATAGATAAACATCAGAAG	0.25	
	NA-IF3	Inner F	AACCATTTTCTATACAGGTGGTACAAATACC	0.25	
	NA-IRk1	Inner R	CACCTTTGGGGTTCCAGTTGT	0.25	
ユキホマレ 検査用プライマー	YK-OF	Outer F	GATCACTCCTCCTCCTCTCA	0.2	199/187 147 84
	YK-OR2	Outer R	CGTGGAGAAGCTTGTGGGAGA	0.25	
	YK-IF2	Inner F	CTTCTTCCTCACATGACCCTCCA	0.25	
	YK-IR	Inner R	TCGGGAGGTGGGAGGAGGA	0.2	
タチナガハ ユキシヅカ 検査用プライマー	TCYS-OFk3	Outer F	GAATATTTTCAGGTGAAATGCTCGCAACAG	0.375	192/188 148 90
	TCYS-ORk3	Outer R	TGGTGATGTACATATATCTATAATTGTGAACCGTC	0.625	
	TCYS-IFk2	Inner F	TTTTGGAGTTGAGAGTATGCCATGTTTG	0.25	
	TCYS-IRk2	Inner R	TTTTTCTATACCTTCTTAAGAGTGGAGCAAAGCA	0.5	

※ 終濃度欄はPCR時の1 tubeあたりの各Primerの終濃度
増幅長欄は上段: 共通バンド、中段: 表示品種特異的のバンド、下段: 異品種特異的のバンド

3.2 開発した検査用プライマーによる電気泳動結果

開発した検査用プライマーによる電気泳動結果は図2のとおり。設計したとおり対象品種と異品種で異なるバンドパターンとなった。

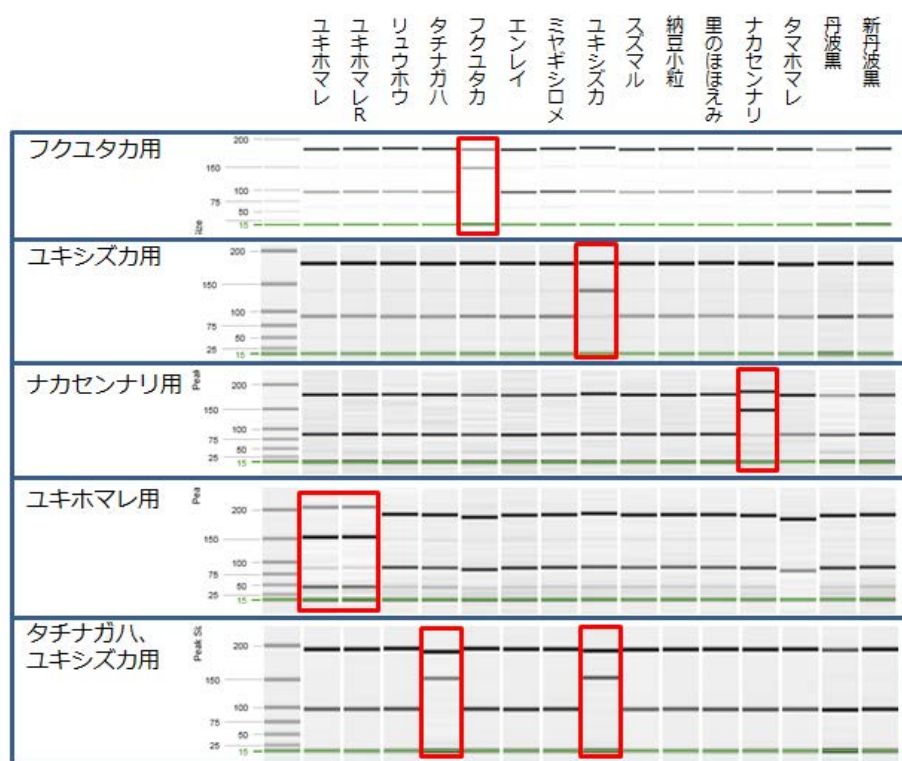


図2 キャピラリー電気泳動装置による電気泳動結果

赤枠は検査対象品種のバンドパターン

共通バンド（最上段のバンド）、品種特異的バンド（上から2段目のバンド）、異品種特異的バンド（上から3段目のバンド）、Alignment Marker（最下段の緑色のバンド）、Size Marker（一番左のレーン）

3.3 大豆加工品の検査への適用検討

検査における偽陽性の発生を防止するため、大豆加工品における異品種の混入が、生産・流通段階や製造段階における少量の混入か否かを判別する手法の検討を行った。具体的には、フクユタカ検査用プライマーについて、フクユタカとエンレイの原種から抽出した DNA 溶液を用いて異品種の混入率（0～50%）の異なる DNA 溶液を作製し、ピーク強度比と異品種の混入率の相関について確認を行った。また、大豆加工品の検査へ適用するため、モデル試料を用いて品目間差の確認及び混入した大豆の品種の違いによる影響の確認を行った。

3.3.1 ピーク強度比と異品種の混入率の相関

異品種の混入率（0～50%）が異なる DNA 溶液による電気泳動結果は図3のとおり。得られたデータから異品種特異的バンドのピーク強度比を求め、異品種混入率との相関を求めた（図3）。異品種の混入率の増加（赤矢印）に伴い、異品種特異的バンドのピーク強度比も大きくなる（青矢印）ことが分かった。これは今回の反応系が競合的 PCR の一種であることから、PCR 初期の指数増加期における PCR 生成物は、初期鋳型量の割合（異品種の DNA 量/全ての DNA 量）を反映して増幅されるため、異品種の DNA に由来する PCR 産物も、初期鋳型量の割合を反映するためであると考えられる。このことから、PCR の結果を解析することにより得られる異品種特異的バンドのピーク強度比を指標とすることで、異品種の混入が少量の混入か否かを判別することが可能である事が示唆された。

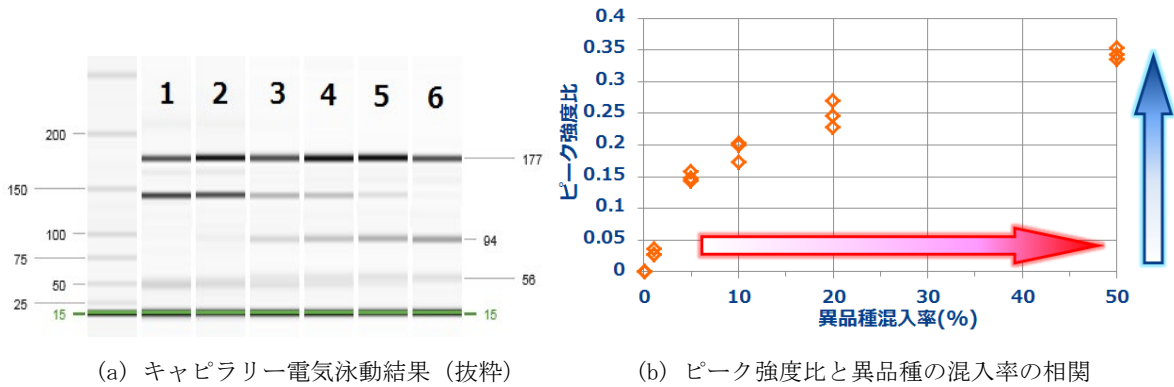


図3 ピーク強度比と異品種の混入率の相関
 異品種混入率：1: 0%, 2: 1%, 3: 5%, 4: 10%, 5: 20%, 6: 50% ((b)は各4点のPCR結果をプロット)

3.3.2 モデル試料による大豆加工品の品目間差の確認

ピーク強度比について、異品種の混入率の異なるモデル試料により、大豆加工品の品目間差の確認を行った。各混入率及び各品目について8点の試料を分析した結果は図4のとおり。品目に関わらず異品種の混入率が増加するとピーク強度比も増加する傾向があり、また、大豆加工品の品目間でも混入率が同程度ならばピーク強度比も同程度であった。以上のことから、今回確認を行った品目では、加工工程の違い等によるピーク強度比への影響は大きくないと考えられた。

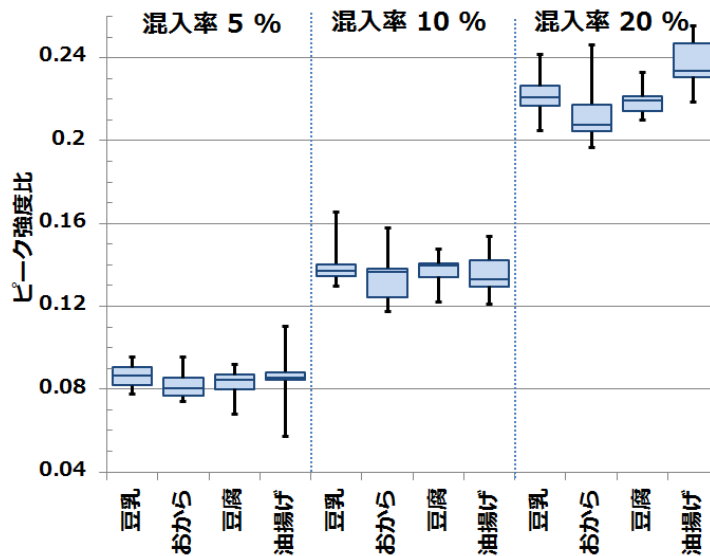


図4 大豆加工品の品目間差の確認結果 (箱ひげ図、N=各8点)

3.3.3 混入した大豆の品種の違いによる影響の確認

混入した大豆の品種の違いによるピーク強度比の比較は図5のとおり。異品種を5%混入したモデル試料のピーク強度比には混入した大豆の品種の違いによる大きな差はみられなかった。これらのモデル試料のピーク強度比と混入率10%のモデル試料を比較した場合、両者には大きな差があることから、混入した品種によらずピーク強度比により少量の混入か否かを判別することが可能であることが示唆された。

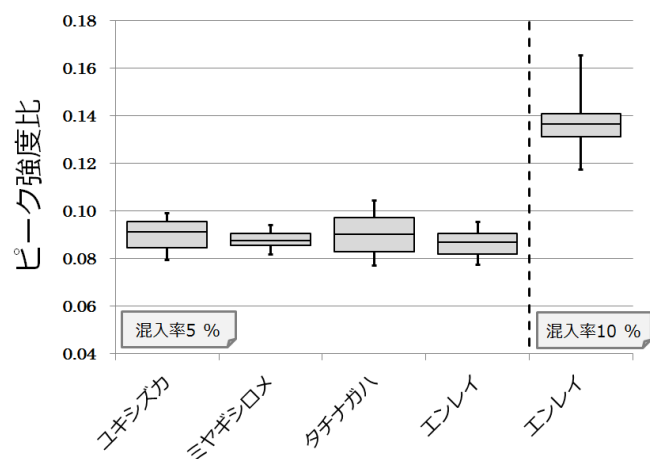


図5 混入した大豆の品種の違いによるピーク強度比の変化（箱ひげ図、N=各8点）

4. まとめ

品種名が表示された大豆加工品について、異品種が使用されているか否かを判別するため、農研機構との共同研究により、Tetra-Primer ARMS-PCR 法による検査用プライマーの開発を行った。その結果、豆乳や豆腐等、複数の品種が混ぜられる可能性がある加工品についても、異品種が混入しているか否かを、一度の PCR により判別することが可能な検査用プライマーを開発することができた。また、一般的に DNA 分析は高感度であることから、生産・流通段階や製造段階における少量の混入でも「陽性」と判定される恐れがあるため、フクユタカ検査用プライマーについて、加工食品の検査への適用検討を行った。その結果、豆乳や豆腐等の品目や混入された異品種の品種によらず、異品種の混入率の増加に伴いピーク強度比も増加することから、異品種のピーク強度比を指標とすることで生産・流通段階や製造段階における少量の混入の可能性が高いか否かを判別できることが示唆された。このことから、PCR の結果を解析することにより得られる異品種のピーク強度比を指標として判定を行うことにより、偽陽性の発生の防止に貢献できることが示唆された。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、検査用プライマーの設計に必要な多型情報や配列に関する情報をご提供くださいました農研機構次世代作物開発研究センター畑作物形質評価ユニットの加賀秋人先生、並びに大豆の原種及び原々種をご提供くださいました道府県の農業試験場等の皆様に心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Ye, S.; Dhillon, S.; Ke, X.; Collins, A. R.; Day, I. N. M.: An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.*, **29**(17), e88(2001)
- 2) Newton, C. R.; Graham, A.; Heptinstall, L. E.; Powell, S. J.; Summers, C.; Kalsheker, N.; Smith, J. C.; Markham, A. F.: Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.*, **17**(7), 2503-2516(1989)

ズワイガニ属 3 種のスクリーニング判別法の開発

足立 静香¹, 西川 加寿子¹, 中山 祐輔¹, 藤原 守¹, 松岡 猛¹, 高嶋 康晴²
Adachi Shizuka, Kazuko Nishikawa, Yusuke Nakayama, Mamoru Fujihara, Takeshi Matsuoka,
Yasuharu Takashima

要 約

農林水産消費安全技術センター（FAMIC）では、ズワイガニ属の名称（種名）表示の真正性の確認のため、ミトコンドリアDNAのCO I 領域内の約560塩基の配列を解析するDNAシークエンス法により種を判別している。DNAシークエンス法は、得られたDNA塩基配列とDNAデータバンクに登録されているDNA塩基配列情報との相同性を検索することにより、広範な種の判定が可能であるが、分析操作が煩雑であり試薬も高額であることから、多検体の検査を短時間で行うには不向きである。そのため、ズワイガニ・オオズワイガニ検出用プライマー対、及びオオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用プライマー対を作製し、PCR産物の有無により国内で流通している主要なズワイガニ属であるズワイガニ、オオズワイガニ及びベニズワイガニの3種を判別する安価で簡便なスクリーニング判別法を確立した。

1. はじめに

食品に関する表示は、食品表示法（平成 25 年法律第 70 号）に基づく食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）において、一般用生鮮食品にあつては「名称」及び「原産地」を、一般用加工食品にあつては、「名称」、「原材料名」等を表示することが義務付けられている。

国内で主に流通するズワイガニ属の種には、ズワイガニ（*Chionoecetes opilio*）、オオズワイガニ（*C. bairdi*）、ベニズワイガニ（*C. japonicus*）の 3 種があり、一般に学名からズワイガニはオピリオ種、オオズワイガニはバルダイ種と称されることもある。ズワイガニは、日本海、鮭子以北の太平洋、オホーツク海、ベーリング海、アラスカ沿岸、北アメリカ沿岸に生息し、雄は松葉ガニ、越前ガニ、雌はセイコガニ、コウバコガニ等の地域ブランド、地方名が多くみられる¹⁾³⁾。オオズワイガニは、北海道の一部でも漁獲されるが、主にベーリング海で漁獲され、*C. opilio* とともに「ズワイガニ」として市場流通していることが多い。そして、ベニズワイガニは、ズワイガニの約 4 倍の国内漁獲量があり⁴⁾、安価であることからグラタン、コロッケ等の加工原料となることが多い。魚介類は、種により品質や価格に違いがある場合が多く、種名は消費者の商品選択に重要な情報であることから、平成 19 年に水産庁より「魚介類の名称のガイドライン」（現 食品表示基準Q&A別添（消費者庁 平成 27 年 3 月））⁵⁾が示され、魚介類の正確な名称の表記が求められることとなった。この中で、ズワイガニとベニズワイガニについては、それぞれ標準和名での記載が示されている。しかし、ズワイガニ属 3 種はそれぞれ形態的に近似している上、脚部・腹部などの部位単位やむき身で販売される、あるいは、グラタン・、コロッケ等の加工原料として使用される場合には、目視で種を判別することは容易ではない。過去には、ベニズワイガニを使用しているにもかかわらず、「ズワイガニ使用」

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部（現）神戸センター

と記載された事例が報告されている。このため、名称（種名）表示の真正性の確認を行う科学的な判別分析法が必要とされ、FAMIC では現在、ミトコンドリア DNA の cytochrome *c* oxidase subunit I (CO I) の遺伝子領域内の約 560 塩基の配列を解析する DNA シークエンス法により種を判別している。しかし、DNA シークエンス法は、分析操作が煩雑であり試薬も高額であることから、多検体の検査を簡便、かつ安価に行うスクリーニング法の開発が望まれた。FAMIC では、甲殻類（タラバガニ、アブラガニ、ハナサキガニ及びイバラガニモドキ）のスクリーニング判別法として、ミトコンドリア DNA の 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 遺伝子領域の一部をポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction ; PCR) により増幅し、当該 PCR 産物を制限酵素により種間で異なる長さの DNA 断片に切断する制限酵素断片長多型法 (Restriction Fragment Length Polymorphism ; RFLP) により行っている。今回、さらに短時間で判別するために制限酵素による処理を要さない、異なる 2 種のプライマー対による PCR の結果からズワイガニ属 3 種を判別するスクリーニング判別法の検討を行った。

2. 実験方法

2.1 試料

ズワイガニ属カニ加工品は、ほぐし身、むき身、寿司、缶詰、かに玉、お茶漬、スープ類、サンドイッチ、天井、冷凍食品（コロケ、グラタン・ドリア及びカニチャーハン）を国内各地の一般小売店で購入した。試料は、ほぐし身（フレック状）のものは 1 商品につき 1 点、棒肉のものは 1 商品から 3 点を上限に無作為に選出し、85 商品 174 点を実験に供した。

スクリーニング判別用プライマー対の確認のために、ズワイガニ属 3 種以外の甲殻類として、国立研究開発法人 水産研究・教育機構 中央水産研究所から入手したタラバガニ 3 点、アブラガニ 3 点、ハナサキガニ 3 点、イバラガニモドキ 2 点、ケガニ 3 点、クリガニ 3 点、トゲクリガニ 3 点を実験に供した。

2.2 DNA 抽出

DNA シークエンス法には、カニ肉片の表面を避けた内部の組織から 10~25 mg を採取し、DNA を抽出した。スクリーニング判別法には、通常は試料を洗浄せずに DNA シークエンス法と同様に操作し DNA を抽出した。試料を洗浄する場合は、カニ肉片の表面を避けた内部の組織を採取し、組織に含まれる水分を産業用ワイパーで吸水後、滅菌水中で洗浄する工程を 1 回又は 2 回行った後、再度水分を産業用ワイパーで吸水したものから 10~25 mg を採取し、DNA を抽出した。DNA 抽出には、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用い、製品プロトコールに従った。

2.3 塩基配列解析

塩基配列決定は、ダイレクトシークエンス法によって行った。PCR 反応液は、0.5 Units DNA ポリメラーゼ *TaKaRa Ex Taq*[®] Hot Start Version (以下「*Ex Taq*[®] HS」; タカラバイオ) を含み、最終濃度が 1× *Ex Taq* Buffer (*Ex Taq*[®] HS 添付試薬)、0.2 mmol/L dNTP Mixture (*Ex Taq*[®] HS 添付試薬)、各 0.25 μmol/L プライマー対 (フォワードプライマー LCO1490 : GGTCAACAAATCATAA AGATATTGG 及びリバースプライマー HCO2198 : TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA)⁶⁾ となるように混合し、2.0 μL の抽出 DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を 20 μL とした。PCR の温度条件は、最初の熱変性として 94 °C・1 分の後、熱変性 94 °C・20 秒、アニーリング 50 °C・20 秒、伸長反応 72 °C・40 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル後、最後の伸長反応を 72 °C・7 分で行った。

PCR 産物の精製には、illustra™ ExoProStar™ (GE Healthcare UK) を用いた。1.0 μL の ExonucleaseI、1.0 μL の Alkaline Phosphatase 及び 3.0 μL の滅菌水を混合後に、PCR 後の反応液 5.0 μL を加え、37 °C で 15 分間処理した後、80 °C で 15 分間加熱し、酵素を不活性化した。

サイクルシーケンシング反応には、BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。反応液は、BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix 2.0 μL、BigDye™ sequencing buffer (5×) 3.0 μL に、最終濃度が 3.0 pmol/L となるように LCO1490 プライマー又は HCO2198 プライマーを混合し、これに精製後に約 2.5 ng/μL に調製した PCR 産物 2.0 μL を加え、滅菌水で全量を 20 μL とした。PCR の温度条件は、最初の熱変性として 94 °C・1 分の後、熱変性 94 °C・20 秒、アニーリング 50 °C・15 秒、伸長反応 60 °C・4 分を 1 サイクルとして 25 サイクルで行った。

塩基配列決定にかかる PCR は、サーマルサイクラー GeneAmp® PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

サイクルシーケンシング後の余剰な蛍光色素の除去は、エタノール沈殿により行い、エタノールが完全に気化してから、Hi-Di Formamide (Thermo Fisher Scientific) を 20 μL 添加し、95 °C で 2 分間加熱後、4 °C に冷却した溶液から、DNA シークエンサーにより塩基配列を決定した。DNA シークエンサーは、Applied Biosystems™ 3130xl ジェネティックアナライザ (Thermo Fisher Scientific) を用いた。DNA 塩基配列の解析には、遺伝子情報処理システム Genetix ver.12.1 (ゼネティックス) を用いた。解析した DNA 塩基配列は、プライマー部分と DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録されているズワイガニ (Accession No. AB211151)、オオズワイガニ (Accession No. AB211155 又は DQ882047)、ベニズワイガニ (Accession No. AB211160) と比較し、相同性の高いものを当該種と判定した。

2.4 ズワイガニ・オオズワイガニ検出用プライマー対、及びオオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用プライマー対の設計並びに PCR 条件

プライマーは、DDBJ に登録されているズワイガニ (Accession No. AB211151)、オオズワイガニ (Accession No. AB211155)、ベニズワイガニ (Accession No. AB211160) の CO I 遺伝子領域を比較して設計した (表 1、図 1)。プライマーは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) が提供している Primer-BLAST を用いて設計し、脱塩処理したオリゴ DNA をユーロフィンジェノミクス株式会社で合成した。PCR 反応液は、0.5 Units の DNA ポリメラーゼ HiDi Taq DNA polymerase (マイポルス バイオテック) を含み、最終濃度が 1× HiDi reaction buffer (DNA ポリメラーゼ添付品)、0.2 mmol/L dNTP Mixture (東洋紡又は Thermo Fisher Scientific)、ズワイガニ・オオズワイガニ検出

表 1 スクリーニング判別用プライマーの配列

プライマー対	プライマー名	向き	配列(5'→3')*	増幅長	増幅部分
ズワイガニ・ オオズワイガニ 検出用プライマー	COI-F215G	F	ACTGCCTCCTTCTTTAACACT <u>G</u> CTA	171 bp	ミトコンドリアDNAの COI遺伝子領域の一部
	COI-R385A	R	GCTCCTAAAATAGAGGAAACT <u>A</u> CA		
オオズワイガニ・ ベニズワイガニ 検出用プライマー	COI-F270	F	GGAAGTGGATGGACTGTTTACCC	263 bp	
	COI-R532G	R	AAAAGTATGGTGATTGCT <u>G</u> CG		

* 下線部は、ミスマッチ配列

ズワイガニ属 3 種のスクリーニング判別法の開発

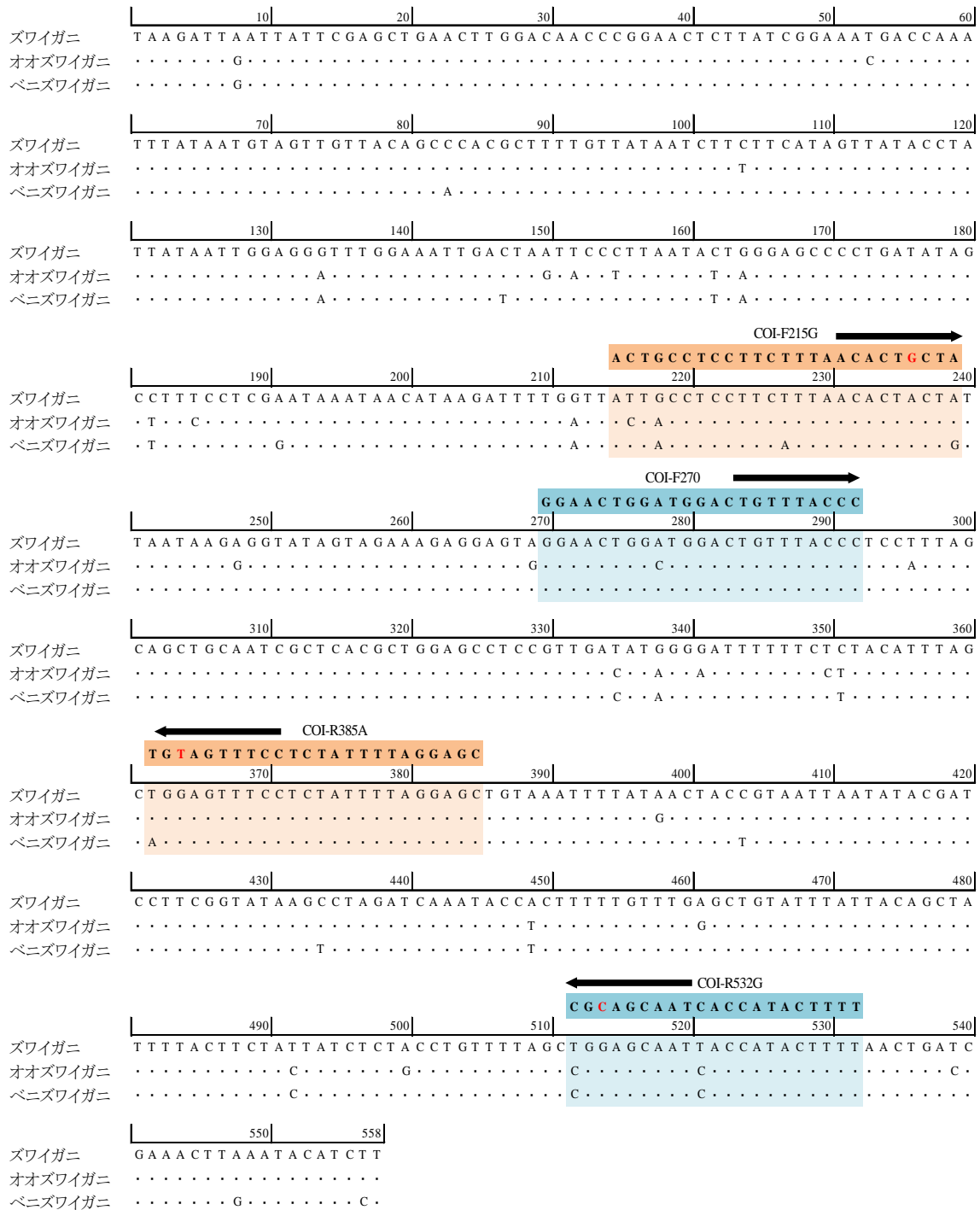


図 1 ズワイガニ属 3 種の CO I 遺伝子領域の塩基配列

ズワイガニ属 3 種（ズワイガニ (Accession No. AB211151)、オオズワイガニ (Accession No. AB211155) 及びベニズワイガニ (Accession No. AB211160)) における CO I プライマー対 (LCO1490 及び HCO2198) に対応した PCR 産物の塩基配列 (558 塩基) である。

オオズワイガニ及びベニズワイガニについては、ズワイガニと共通の塩基は「・」で示し、異なる部分はその塩基名を記載した。また、ズワイガニ・オオズワイガニ検出用プライマー対 (CO I -F215G 及び CO I -R385A) の領域を朱色で、オオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用プライマー対 (CO I -F270 及び CO I -R532G) の領域を青色で囲んで示した。なお、各プライマー領域の上部にプライマー配列を記し、赤字はミスマッチ配列を示す。

用プライマー対においては各 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、オオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用プライマー対においては各 0.1 $\mu\text{mol/L}$ となるように混合し、1.0 μL の抽出 DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を 10.0 μL とした。PCR の温度条件は、最初の熱変性として 95 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分の後、熱変性 95 $^{\circ}\text{C}$ ・15 秒、アニーリング 59 $^{\circ}\text{C}$ ・10 秒、伸長反応 72 $^{\circ}\text{C}$ ・30 秒を 1 サイクルとして 35 サイクルで行った。PCR は、サーマルサイクラー GeneAmp[®] PCR System 9700、Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) 及び TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[®] Gradient (タカラバイオ) を用いた。

ゲル電気泳動は、エチジウムブロマイド (10 mg/mL) (ニッポンジーン) を 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 含む 2.0 % (w/v) アガロースゲル (Agarose S (ニッポンジーン)) を用い、泳動緩衝液は、1× TAE 緩衝液 (ニッポンジーン) を用いた。PCR 反応液のアガロールゲルへの添加量は、2.5 μL とした。

3. 結果及び考察

3.1 ミトコンドリア DNA の CO I 遺伝子領域の DNA 塩基配列比較によるズワイガニ属カニ加工品の種の判定

試料 174 点全てにおいて、CO I プライマー対 (LCO1490-HCO2198) を用いた PCR で約 700 bp の増幅産物が得られた。得られた産物から、プライマー配列及びそれに続く約 50 bp の DNA 塩基配列を除いた CO I 遺伝子領域 558 bp の配列を決定した。この配列と、ズワイガニ (Accession No. AB211151)、オオズワイガニ (Accession No. AB211155)、ベニズワイガニ (Accession No. AB211160) との相同性を比較し、種の判定を行った結果、試料 174 点は、ズワイガニ 129 点、オオズワイガニ 13 点、及びベニズワイガニ 32 点であった。図 1 に種の判定に使用した領域の DNA 塩基配列を示す。このうち判定した種の配列と相違が認められた試料は、ズワイガニ 129 点中 17 点、オオズワイガニ 13 点中 7 点、ベニズワイガニ 32 点中 9 点であり、いずれも 1 塩基の相違であった。それ以外の試料は、判定した種の配列と 100% 一致した。なお、ズワイガニ (Accession No. AB211151)、オオズワイガニ (Accession No. AB211155) 及びベニズワイガニ (Accession No. AB211160) の相同性は、それぞれズワイガニ/オオズワイガニで 94.4 % (527 bp/558 bp)、ズワイガニ/ベニズワイガニで 95.7 % (534 bp/558 bp)、オオズワイガニ/ベニズワイガニで 95.2 % (531 bp/558 bp) である。表 2 にズワイガニ属カニ加工品の判別結果及び判別した種の DNA 塩基配列と相違の見られた試料数、相違の見られた塩基及び当該変異のあった試料数を示した。

3.2 スクリーニング判別用プライマーの設計

ズワイガニ・オオズワイガニ検出用プライマー対 (CO I -F215G-CO I -R385A) は、3' 末端においてズワイガニ (Accession No. AB211151) 及びオオズワイガニ (Accession No. AB211155) の塩基が同一であり、ベニズワイガニに対して変異の認められる領域に設計した (表 1)。このとき、目的外の種の鋳型 DNA とのミスアニーリングを減ずるために、フォワードプライマー CO I -F215G は、3' 末端から 4 番目の塩基を本来の「A」と異なる配列「G」に置換した mismatch プライマーとした。同様に、リバースプライマー CO I -R385A は、3' 末端から 3 番目の塩基を本来の「C」と異なる配列「A」に置換した mismatch プライマーとした。

オオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用プライマー対 (CO I -F270-CO I -R532G) は、リバースプライマーについて、3' 末端がオオズワイガニ (Accession No. AB211155) 及びベニズワイガニ (Accession No. AB211160) の塩基が同一であり、ズワイガニに対して変異の認められる領域に設計した (表 1)。また、リバースプライマー CO I -R532G は、3' 末端から 3 番目の塩基を本来の「C」と異なる配列「G」に置換した mismatch プライマーとした。

表 2 ズワイガニ属カニ加工品 174 点の判別結果及び判別した種の DNA 塩基配列と相違の見られた試料数、その塩基及び変異のあった試料数

種名 (Accession No.) /試料	判別結果	相違の見られた試料数	相違の見られた位置*									
			11	17	77	117	125	137	152	164	185	
ズワイガニ (AB211151)			T	A	T	A	A	T	T	G	T	
オオズワイガニ (AB211155)			T	A	T	A	A	T	A	A	C	
ベニズワイガニ (AB211160)			T	A	T	A	A	T	T	A	T	
ズワイガニ加工品	129	17		G(2)	C(1)		G(1)		C(1)	A(3)		
オオズワイガニ加工品	13	7										
ベニズワイガニ加工品	32	9	C(2)	G(1)		G(1)		C(1)			C(1)	

種名 (Accession No.) /試料	相違の見られた位置*										
	236**	239**	287***	296	302	335	359	398	494	500	549
ズワイガニ (AB211151)	A	A	T	T	A	T	A	A	A	A	A
オオズワイガニ (AB211155)	A	A	T	A	A	C	A	G	A	G	A
ベニズワイガニ (AB211160)	A	G	T	T	A	C	A	A	A	A	A
ズワイガニ加工品	G(1)		C(1)		G(1)		G(3)		G(1)	G(2)	
オオズワイガニ加工品						T(2)		A(4)			T(1)
ベニズワイガニ加工品		A(1)		A(1)						T(1)	

* 比較したミトコンドリア DNA の CO I 遺伝子領域 (558 bp) の最初の塩基を 1 とした場合の位置 (図 1 に対応)

** ズワイガニ・オオズワイガニ検出用フォワードプライマー CO I -F215G の配列内の置換

*** オオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用フォワードプライマー CO I -F270 の配列内の置換

試料 174 点の決定した 558 bp の塩基配列について、設計したプライマー配列部分を比較したところ、ズワイガニ・オオズワイガニ検出用フォワードプライマーCO I -F215G 内に 2 点 (ズワイガニ及びベニズワイガニ)、オオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用フォワードプライマーCO I -F270 内に 1 点 (ズワイガニ) において、塩基配列の相違が見られた (表 2)。

3.3 スクリーニング判別用プライマーによる増幅及び判別

設計したスクリーニング判別用プライマーを用いて、種の判定を行った試料 174 点の PCR を行った。PCR 結果の典型的なゲル電気泳動写真を図 2 に、また、PCR 増幅の組合せによるズワイガニ属 3 種の判別を表 3 に示す。ズワイガニ・オオズワイガニ検出用プライマー対において、プライマー配列部分に塩基配列の相違が見られた試料を含む全てのズワイガニ、及び全てのオオズワイガニ試料で増幅が認められた。また、オオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用プライマー対において、全てのオオズワイガニ及びベニズワイガニ試料で増幅が見られた。一方、ズワイガニ・オオズワイガニ検出用プライマー対において、ベニズワイガニ試料 32 点中 29 点 (プライマー配

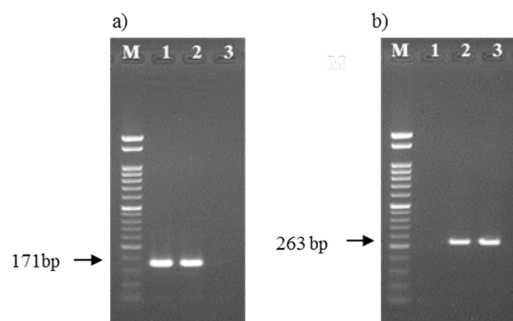


図 2 スクリーニング判別用プライマーによる PCR の結果

a) ズワイガニ・オオズワイガニ検出用プライマー対による PCR の結果 b)オオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用プライマー対による PCR の結果 1: ズワイガニ、2: オオズワイガニ、3: ベニズワイガニ、M: One STEP Ladder50

表 3 スクリーニング判別用プライマーによるズワイガニ属 3 種の判別

種名 (学名)	ズワイガニ・オオズワイガニ検出用プライマー対*	オオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用プライマー対*
ズワイガニ (<i>Chionoecetes opilio</i>)	+	-
オオズワイガニ (<i>C. bairdi</i>)	+	+
ベニズワイガニ (<i>C. japonicus</i>)	-	+
増幅長	171 bp	263 bp

* +; 検出、-; 非検出

表4 ズワイガニ・オオズワイガニ検出用プライマー対による PCR の結果

種名	試料の洗浄なし		
	分析数	増幅	増幅せず
ズワイガニ	129	129	0
オオズワイガニ	13	13	0
ベニズワイガニ	32	3(3)*	29

* 括弧内は、増幅した試料のうち、極薄い増幅であった試料数。

表5 オオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用プライマー対による PCR の結果

種名	試料の洗浄なし			試料の洗浄あり		
	分析数	増幅	増幅せず	分析数	増幅	増幅せず
ズワイガニ	129	57(40)*	72	9**	4(3)*	5
オオズワイガニ	13	13	0	—	—	—
ベニズワイガニ	32	32	0	—	—	—

* 括弧内は、増幅した試料のうち、極薄い増幅であった試料数

** 試料の洗浄なしで増幅した 57 点のうち、極薄い増幅であった 40 点以外から抜き出した試料を供試した。

列部分に塩基配列の相違が見られた試料を含む) で増幅が見られず、3 点で増幅が見られた。この 3 点は、オオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用プライマー対での増幅バンドの強度に比べて、通常増幅バンドの強度の 1/10 以下程度の薄さであった。また、オオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用プライマー対において、ズワイガニ試料 129 点中 72 点(プライマー配列部分に塩基配列の相違が見られた試料を含む)において増幅が見られず、57 点において増幅が見られた。この 57 点中 40 点は、ズワイガニ・オオズワイガニ検出用プライマー対での増幅バンドの強度に比べて極めて薄かったが、17 点は同等のバンド強度であり、判別に支障があった。表 4 にズワイガニ・オオズワイガニ検出用プライマー対による PCR の結果を、表 5 にオオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用プライマー対による PCR の結果を示す。

また、検査対象のズワイガニ属 3 種以外による増幅の有無を確認するために、タラバガニ 3 点、アブラガニ 3 点、ハナサキガニ 3 点、イバラガニモドキ 2 点、ケガニ 3 点、クリガニ 3 点、トゲクリガニ 3 点を供試した。全ての試料において、ズワイガニ・オオズワイガニ検出用プライマー対、オオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用プライマー対ともに増幅は認められず、ズワイガニ属 3 種に特異的なプライマー対であることが分かった(データ未掲載)。以上から、DNA シークエンス法により判別した種と作製したスクリーニング判別用プライマーを用いて判別した結果を比較すると、ズワイガニ 129 点に対して 72 点、オオズワイガニ 13 点に対して 13 点、ベニズワイガニ 32 点に対して 29 点において判別種が一致した。

3.4 スクリーニング判別におけるサンプリング試料の洗浄の影響

カニ加工品は、漁獲直後に種の選別を行わず、同一の釜等で茹でる場合がある、という実態がある。そのため、試料自体に他種ズワイガニ属のコンタミネーションが疑われ、今回作製したスクリーニング判別用プライマーにおいて異種を検出することが考えられた。オオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用プライマー対におけるズワイガニ試料で増幅の見られた 57 点のうち、判別に影響のあった 17 点から 9 点を任意に抽出し、その試料肉片を 1 回又は 2 回洗浄した後 DNA を抽出し、スクリーニング判別に供した。その結果を図 3 に示す。9 点中 8 点において洗浄前、洗浄後で増幅バンドの強度に差が認められ、そのうち 3 点は極めて薄く、5 点は増幅が認められなかった。1 点については、増幅バンドの強度に差が見られなかった(表 5)。以上から、スクリーニ

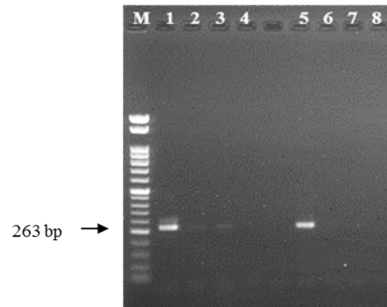


図3 DNA抽出における試料洗浄工程による比較

プライマー：オオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用プライマー対

1：ズワイガニ加工品A（未洗浄） 2：ズワイガニ加工品A（試料中の水分を吸水） 3：ズワイガニ加工品A（1回洗浄）
4：ズワイガニ加工品A（2回洗浄） 5：ズワイガニ加工品B（未洗浄） 6：ズワイガニ加工品B（試料中の水分を吸水）
7：ズワイガニ加工品B（1回洗浄） 8：ズワイガニ加工品B（2回洗浄） M：One STEP Ladder50

ング判別には、試料由来の他種ズワイガニ属のコンタミネーションの可能性を排除するため、試料の肉片を1回程度洗浄することが有効であると示唆された。

4. まとめ

国内で流通している主要なズワイガニ属であるズワイガニ、オオズワイガニ及びベニズワイガニを使用した加工品の原材料に使用されている種を迅速・簡便にスクリーニング判別するために、ズワイガニ・オオズワイガニ検出用プライマー対、及びオオズワイガニ・ベニズワイガニ検出用プライマー対を作製した。DNA シークエンス法により判別した種と作製したスクリーニング判別プライマーを用いて判別した結果を比較すると、ズワイガニ 129 点に対して 72 点、オオズワイガニ 13 点に対して 13 点、ベニズワイガニ 32 点に対して 29 点において判別種が一致した。また、サンプリング時に試料の肉片を1回程度洗浄することにより、試料に含まれる他種ズワイガニ属のコンタミネーションを排除できることが示唆され、さらに DNA シークエンス法による種判別結果と本スクリーニング判別法による種判別の結果が一致するものと考えられた。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、試料をご提供くださいました国立研究開発法人 水産研究・教育機構 中央水産研究所 柳本 卓氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 社団法人 日本水産資源保護協会「わが国の水産業 かに」
- 2) 和英英和総合水産辞典 四訂初版（株式会社成山堂書店）
- 3) 食品総合事典（丸善株式会社）
- 4) 農林水産省「平成28年漁業・養殖業生産統計」
- 5) 消費者庁 食品表示基準Q&A別添「魚介類の名称のガイドライン」（平成27年3月）
- 6) Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R.: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **3**, 294-299(1994).

水溶性成分の一斉分析によるタマネギの原産地判別の可能性検討

渡邊 彩乃¹, 寺田 昌市¹, 岡崎 圭毅²

Ayano Watanabe, Shouichi Terada, Keiki Okazaki

要 約

国産及び外国産（中国産、米国産、ニュージーランド産）のタマネギを試料として、水溶性成分（糖・有機酸・アミノ酸など）の一斉分析による原産地判別の可能性を検討した。ガスクロマトグラフ質量分析装置（GC/MS）を用いた分析により得られた 53 成分のピーク面積の相対値を多変量解析に用いた。

主成分分析の結果、中国産の成分組成には国産とは異なる傾向があることが示唆された。国産－中国産の判別モデルの的中率は国産試料で 90.5 %、中国産試料で 86.7 % となり、いずれも 80 % 以上の的中率であった。これにより、品目や産地の組合せによっては、本手法が原産地判別の新たな指標となる可能性を示すことができた。

1. はじめに

食品表示法（平成 25 年法律第 70 号）に基づき定められた食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）には、食品を販売する際に表示しなければならない表示事項やその表示の方法が規定されており、生鮮食品においては原産地を表示することが義務付けられている。

国産と外国産の間に価格差がある、国産と外国産の流通時期が明確に分かれていない、外国産の輸入量が多いなどの流通実態にある食品にあっては、外国産を国産と偽装表示されることが懸念されることから、科学的な原産地の判別技術が求められてきた。

農林水産消費安全技術センター（FAMIC）では、食品における原産地の判別技術として、元素分析、軽元素安定同位体比分析及び Sr 安定同位体比分析を主に利用している^{1)–3)}。これらの方法は、土壌や水等の生育環境の違いがそこで栽培された農産物の元素濃度や安定同位体比に影響を与えることを利用した原産地判別法である。ただし、これらの技術は分析装置が高価であり、前処理が煩雑な上、品目により適否があるなどの問題点がある。このため、判別可能品目の拡大や判別確度の向上、分析の効率化・迅速化など、原産地判別技術の課題に対応するためには、新たな判別指標を見いだすことが重要である。

近年、「代謝物の網羅的解析」を意味するメタボロミクスという分析手法が著しく発展しており、基礎研究や医療分野などでの応用研究が多数報告されている。一方、メタボロミクスのターゲットである代謝物は、食品の味や色といった品質に関わる含有成分でもあることから、食品分野への応用も可能であり、実際に品質評価や貯蔵技術の向上などの目的に用いられている^{4)–6)}。

メタボロミクスの手法による食品の原産地判別の可能性を検討した報告としては、キャベツの韓国産－中国産の判別⁷⁾やトマト濃縮果汁のイタリア産－中国産の判別⁸⁾などがある。また、

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

² 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター

国産を対象としたものとして、生薬のトウキ⁹⁾及びセンキュウ¹⁰⁾ (いずれも国産-中国産) についての報告がある。食品ではリンゴ¹¹⁾ (国産-ニュージーランド産) について報告があるが、現状では知見は多くない。

食品の含有成分の変動要因は、例えば農産物の場合には品種、生育環境 (栽培法、土壌の性質、気象条件、環境ストレス)、収穫後の環境 (貯蔵、輸送) など多様であり、これらの変動要因には、従来の原産地の判別技術における変動要因とは異なる部分もある。この変動要因の異なる部分が原産地により違う場合、原産地により成分組成に差が生じるため、メタボロミクスの手法が原産地判別の新たな指標となる可能性がある。

そこで本研究では、メタボロミクスの手法による食品の原産地判別の可能性を検討するため、多くの生物種に共通して含まれる一次代謝物である低分子の水溶性成分 (糖・有機酸・アミノ酸など) を対象として、GC/MS による一斉分析を行い、得られたデータを用いた多変量解析 (主成分分析及び判別分析) により、原産地による成分組成の違いについて検討した。

本研究では試料としてタマネギを用いることとした。タマネギについては、すでに元素分析による原産地判別法が確立されているものの¹²⁾、2015年時点で生鮮野菜の中で最も輸入量が多く¹³⁾原産地の偽装が懸念される品目であること、また元素分析の前段階での選別 (スクリーニング) や複数の分析法を組み合わせた判別などの様々な活用方法が考えられることから、本研究での検討対象とした。また、その活用方法によっては必ずしも100%に近い的中率が必要とは限らないことから、本研究での的中率の目標値を80%に設定した。

2. 実験方法

2.1 試料

タマネギ試料は、小売店、商社等から入手した国産21点 (北海道産11点、兵庫県産8点、佐賀県産2点)、外国産20点 (中国産15点、米国産3点、ニュージーランド産2点) を使用した。

2.2 水溶性成分一斉分析

2.2.1 試料調製

タマネギ試料1個の上端及び基部各1cmを除去し、外皮を剥いて除去した。残りの部分を超純水で洗浄した後、縦に8等分したうちの1個を凍結させた。その後、真空凍結乾燥機により十分に乾燥させた後、粉砕機 (マルチビーズショッカー: 安井器械) で粉砕した。

2.2.2 抽出・誘導体化・機器測定

抽出・誘導体化・機器測定は佐々野ら¹⁴⁾の方法を参考に行った。

粉砕試料約10mgを2mL容チューブに採取し、抽出溶媒 (80%アセトニトリル水溶液) 及び内部標準物質 (リビートル) を添加後に37℃で30分間攪拌した。その後、遠心分離 (20000×g、4℃、5min) を行い、上清を抽出液とした。

誘導体化は固相カートリッジ (Presh-SPE AOS: アイスティサイエンス) を用いて手動で行った。抽出液100μLを固相カートリッジに添加後、80%アセトニトリル水溶液、アセトニトリルを順に添加し、洗浄と脱水を行った。この操作により、有機酸及びアミノ酸類を固相カートリッジに保持させた。その後、アセトニトリルで20倍希釈した抽出液100μLを添加し、アセトニトリルで脱水させることで糖類を固相カートリッジに保持させた。次に、固相カートリ

ッジに 20%メトキシアミン塩酸塩ピリジン溶液 5 μL を添加し、続いて *N*-メチル-*N*-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド (MSTFA) (GLサイエンス) 25 μL を添加して水溶性成分をトリメチルシリル誘導体化させた。その後、固相カートリッジにヘキサンを添加して誘導体化した成分を溶出させ、測定サンプルとした。

機器測定は GC/MS (GCMS-QP2010 ultra : 島津製作所) を使用した。注入量は 1 μL とし、導入はスプリットレスで行った。GC カラムは InertCap 5MS/NP ProGuard (35 m : GLサイエンス) を使用し、昇温条件は 80 $^{\circ}\text{C}$ で 2 min 保持後、15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温、330 $^{\circ}\text{C}$ で 6 min 保持とした。マススペクトルは m/z スキャンレンジ 85-500、イベント時間 0.05 秒で記録した。保持時間の補正には *n*-アルカン標準液 (炭化水素混合試料 ヘキサン溶液 C9-C40 : GLサイエンス) を用いた。

2.2.3 解析

GC/MS 分析により得られた水溶性成分由来のピークは、アメリカ国立標準技術研究所 (NIST) より無料で配布されているソフトウェア AMDIS¹⁵⁾により同定した。また、未同定ピークのうち試料由来と考えられるもの (全ての試料で面積値の算出が可能であり、ブランクにおける面積値が一定以下のもの) についても、その後の解析に用いた。各化合物に由来するピーク面積値は、化合物ごとに適切な質量数 (m/z) を選択し、シングルイオンクロマトグラムで算出した。得られた値は、内部標準であるリピトールの面積値で除した相対値に変換した。

2.3 多変量解析

主成分分析及び判別分析による判別モデル構築は、R 3.5.0 を用いて行った。判別分析は、線形カーネルのサポートベクターマシン (SVM) で行い、e1071 パッケージを使用した。解析は中村ら¹⁶⁾の方法に従った。構築した判別モデルの未知試料に対する的中率は、判別モデル構築用の試料を用いた Leave-one-out cross validation (LOOCV) により確認した。判別分析における標準不確かさは、各試料について異なる 2 日間に測定を行った計 2 回 (1 日あたり 1 回) の測定値の標準偏差を 3 倍した値を用いた。

3. 結果及び考察

3.1 成分の同定

国産 21 点、外国産 20 点 (中国産 15 点、米国産 3 点、ニュージーランド産 2 点) のタマネギ試料について、固相カートリッジを用いた誘導体化後に GC/MS 分析を行った。31 成分の同定を行うとともに、未同定ピークのうち試料由来と考えられるもの 22 成分を選出し、計 53 成分をその後の解析に用いた。成分の内訳を表 1 に示す。

表1 GC/MS分析で検出した53成分の内訳

分類	アミノ酸など		有機酸など	糖など	未同定
成分数	21		5	5	22
成分名	L-アラニン	L-セリン	クエン酸	フルクトース	
	L-アスパラギン	L-トレオニン	フマル酸	グルコース	
	L-アスパラギン酸	L-トリプトファン	リンゴ酸	myo-イノシトール	
	L-グルタミン酸	L-チロシン	ピペコリン酸	ラフィノース	
	L-グルタミン	L-バリン	リン酸	スクロース	
	L-ヒスチジン	4-アミノ酪酸			
	L-イソロイシン	β-アラニン			
	L-ロイシン	グリシン			
	L-リジン	ピログルタミン酸			
	L-フェニルアラニン	スベリルグリシン			
	L-プロリン				

3.2 主成分分析

53成分のピーク面積の相対値を説明変数として主成分分析を行った。第1主成分と第2主成分のスコアプロットを図1に示す。第1主成分（寄与率31.8%）では国産と外国産の間の差異は見られなかった。第2主成分（寄与率11.8%）のスコアは、中国産の大部分で国産よりも低い値を示す傾向があり、中国産タマネギの成分組成には国産とは異なる傾向があることが示唆された。ただし、中国産のうち1点は国産側の高い値を示し、中国国内でのばらつきが大きい結果となった。また、米国産及びニュージーランド産は国産の範囲内のスコアであった。

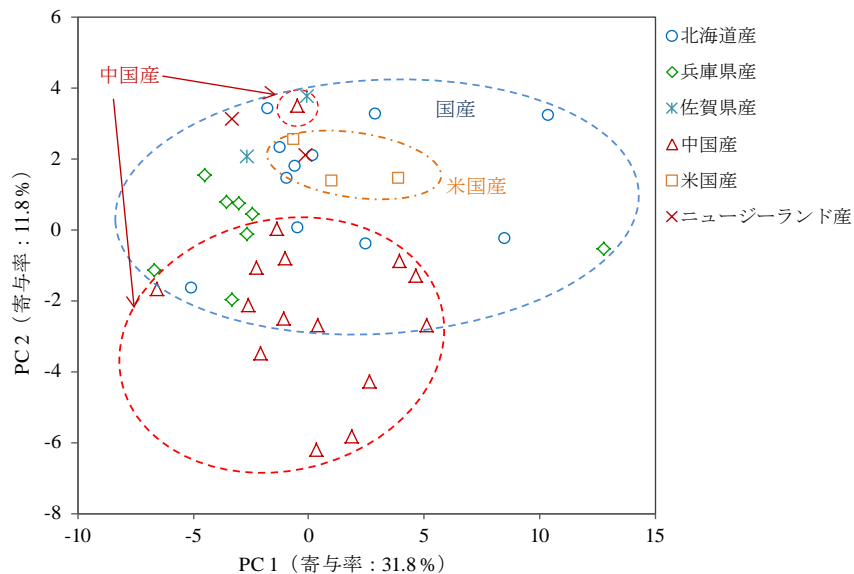


図1 主成分分析のスコアプロット
横軸：第1主成分 縦軸：第2主成分

タマネギは、主な作型として春まき栽培と秋まき栽培があり、日本では大きく分けて北海道では春まき栽培、本州や九州などでは秋まき栽培が行われており、それぞれの作型にあった品種を生産している¹⁷⁾。同様に、中国国内においても地域によって作型が異なり、甘粛省では春まき栽培、山東省では秋まき栽培が主に行われている¹⁸⁾。そこで、中国産の第2主成分スコアのばらつきは作型の違いによるものではないかと予想した。図1のうち中国産のスコアを生産された省別（甘粛省産11点、山東省産3点、省不明1点）にプロットしたものを図2に示す。予想に反して、第2主成分スコアの最大値と最小値はともに甘粛省産であり、中国国内でのばらつきの要因は生産された省及び作型の違いによるものではなく、甘粛省内でのばらつきによ

るものであった。

一方、タマネギの保管期間に着目して、甘粛省産の試料の入手時期と第2主成分スコアとの関連を調べた結果、甘粛省産タマネギの主な収穫時期である9月～10月に入手した試料は、それ以降に入手した試料と比較して第2主成分のスコアが高い傾向があった(図2)。このことから、中国国内(甘粛省内)での成分組成のばらつきは、収穫後の貯蔵・保管の期間やその状態の違いと関連している可能性が示唆された。また、今後、本手法により生鮮野菜の産地判別の可能性を検討する際には、作型(収穫時期)や貯蔵などの生産及び流通の実態を十分に考慮して試料を入手することが重要であると考えられる。

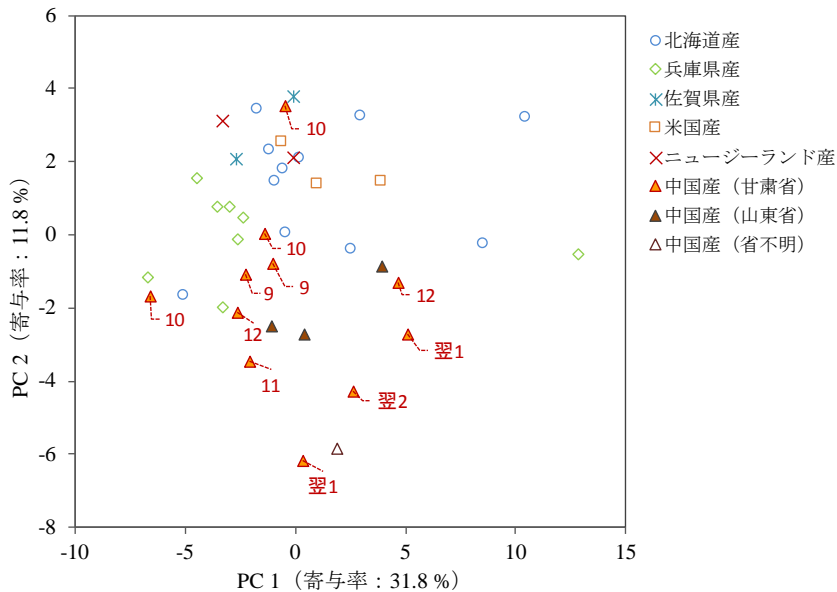


図2 主成分分析のスコアプロット(中国産の省別)

横軸：第1主成分 縦軸：第2主成分

中国産(甘粛省)に付した数字は、試料を入手した月を表す
(数字のみの試料は2013年、「翌」が付してある試料は2014年)

3.3 判別分析

国産21点、外国産20点(中国産15点、米国産3点、ニュージーランド産2点)の全試料を用いて国産-外国産の判別モデルを構築した結果、最適な判別モデルとして、4成分(L-セリン、L-アスパラギン酸、4-アミノ酪酸、未同定1成分)を説明変数とする判別モデルが得られた。この判別モデルにおいて、判別得点が正の場合には国産と判別し、判別得点が負の場合には外国産と判別した場合、国産試料21点のうち19点(90.5%)を国産と正しく判別し、外国産試料20点のうち15点(75.0%)を外国産と正しく判別した。なお、外国産の誤判別(計5点)の国別の内訳は、中国産4点、ニュージーランド産1点であった。この判別モデルでは、外国産試料の的中率が80%未満となり、目標値に届かなかった。特に、2017年時点で輸入量全体の87.9%を占める¹⁹⁾中国産試料の的中率は73.3%(11/15)であり、中国産の誤判別が多い結果であった。

そこで、主成分分析において中国産の成分組成が国産と異なる傾向が見られたことをふまえて、外国産試料のうち米国産及びニュージーランド産の試料を除き、国産21点、中国産15点の試料を用いて国産-中国産判別モデルを構築することにより、中国産試料の的中率の向上を

試みた。その結果、最適な判別モデルとして、4成分（ピペコリン酸、L-アスパラギン酸、4-アミノ酪酸、フルクトース）を説明変数とする判別モデルが得られた。この4成分のうち、L-アスパラギン酸及び4-アミノ酪酸は国産－外国産判別モデルと共通して選択された成分であり、残りの2成分は国産－外国産判別モデルとは異なる成分であった。LOOCVにより得られた国産－中国産判別モデルの判別得点のヒストグラムを図3に示す。また、この判別モデルの説明変数として使用された4成分の箱ひげ図を図4に示す。この判別モデルにおいて、判別得点が正の場合には国産と判別し、判別得点が負の場合には中国産と判別した場合、国産試料21点のうち19点（90.5%）を国産と正しく判別し、中国産試料15点のうち13点（86.7%）を中国産と正しく判別した。なお、国産－中国産判別モデルに米国産及びニュージーランド産試料をあてはめた場合の判別得点は全5点（米国産3点、ニュージーランド産2点）で正の値となり、全試料で国産と判別された。

構築した2種類の判別モデルの的中率は、国産試料については同等であったが、外国産試料については、国産－外国産判別モデルでの的中率75.0%（15/20）に対し、外国産を中国産のみに限定した国産－中国産判別モデルでは86.7%（13/15）と向上した。以上より、判別の対象を外国産全体にするのではなく中国産のみに限定することで、国産及び中国産の両方での的中率が80%以上となり、判別の可能性が見いだされた。中国産は米国産及びニュージーランド産に比べて輸入量が非常に多いことから、外国産を中国産のみに限定しても実用性は高いと考えられる。

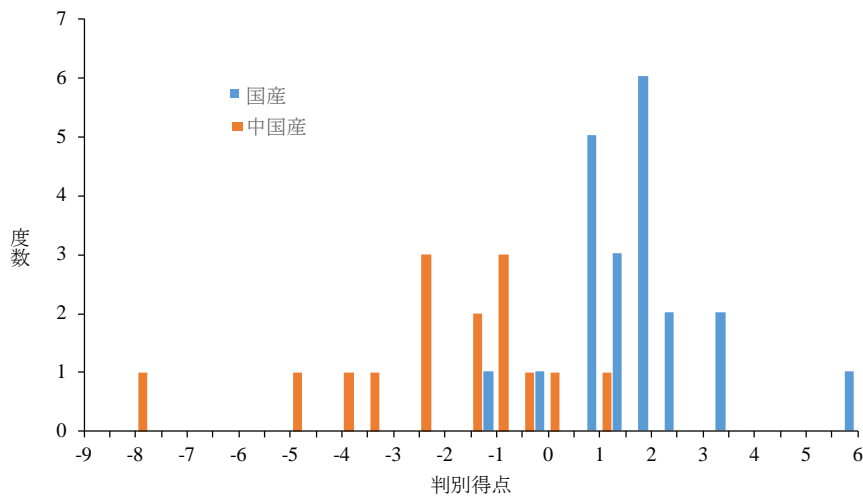


図3 国産－中国産の判別モデルの判別得点のヒストグラム

4. まとめ

国産21点、外国産20点（中国産15点、米国産3点、ニュージーランド産2点）のタマネギ試料を用いて水溶性成分の一斉分析を行い、原産地判別の可能性を検討した。GC/MSの分析により得られた53成分のピーク面積の相対値を多変量解析に用いた。

主成分分析の結果、第2主成分のスコアが中国産の大部分で国産よりも低い値を示す傾向があり、中国産の成分組成には国産とは異なる傾向があることが示唆された。外国産試料を中国産に限定して構築した国産－中国産の判別モデルの的中率は、国産試料で90.5%（19/21）、中

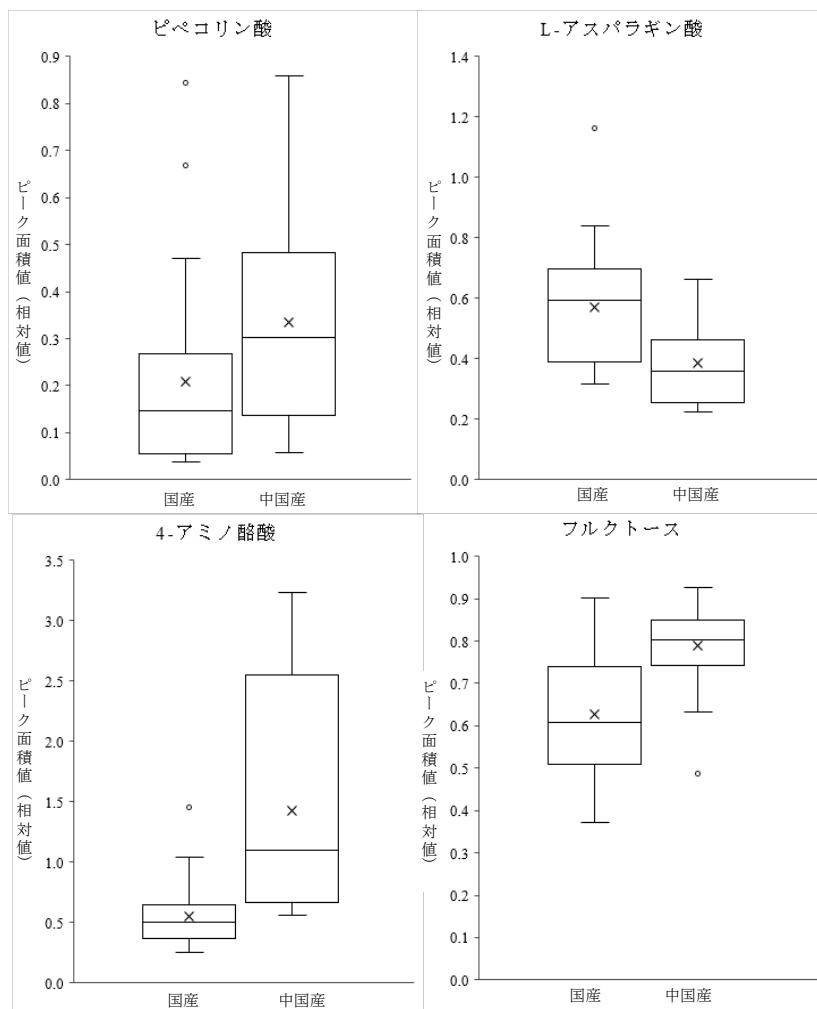


図4 国産－中国産判別モデルに使用された4成分の箱ひげ図

国産：n=21 中国産：n=15, 図中の×印は平均値を表す

国産試料で86.7% (13/15) となった。

これにより、品目や産地の組合せによっては、本手法が原産地判別の新たな指標となる可能性を示すことができた。今後、本手法が原産地判別のより有効な指標となる品目や産地が見いだされることに期待する。ただし、本手法の実用化に向けて確認及び改善すべき事項は、国産・外国産それぞれの中での成分組成の多様性が大きいと予想されること、産地以外の要因（一例として、試料の鮮度や保管状態など）による変動の影響があると予想されること、分析法の不確かさについて品質管理試料による補正等が必要と考えられることなど、多数あることから、これらについても慎重に検討する必要があると考えられる。

文 献

- 1) 船木紀夫, 服部賢志, 木村康晴, 佐藤耕一, 塚田政範, 津村明宏, 佐野雅敏, 豊田正俊, 小塚健志, 門倉雅史, 法邑雄司: 無機元素分析によるゴボウの原産国判別, 日本食品科学工学会誌, **57**(2),70-77 (2010)
- 2) 鈴木彌生子, 中下留美子, 河邊亮, 北井亜希子, 富山眞吾: 炭素・酸素安定同位体比分析に

- よる青森県産および中国産リンゴの産地判別の可能性, 日本食品科学工学会誌, **59**(2), 69-75(2012)
- 3) Aoyama, K.; Nakano, T.; Shin, K. C.; Izawa, A.; Morita, S.: Variation of strontium stable isotope ratios and origins of strontium in Japanese vegetables and comparison with Chinese vegetables, *Food Chem.*, **237**,1186-1195 (2017)
 - 4) Pongsuwan, W.; Fukusaki, E.; Bamba, T.; Yonetani, T.; Yamahara, T.; Kobayashi, A.: Prediction of Japanese Green Tea Ranking by Gas Chromatography/Mass Spectrometry-Based Hydrophilic Metabolite Fingerprinting. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 231–236 (2007)
 - 5) Okazaki, K.; Kimura, Y.; Sugiyama, K.; Kami, D.; Nakamura, T.; Oka, N.: Discovering metabolic indices for early detection of squash (*Cucurbita maxima*) storage quality using GC-MS-based metabolite profiling. *Food Chem.*, **196**, 1150–1155 (2016)
 - 6) 及川 彰: メタボロミクスの農業・食品分野への応用, 化学と生物, **51**(9), 615-621 (2013)
 - 7) Kim, J.; Jung, Y.; Song, B.; Bong, Y.; Ryu, D.H.; Lee, K.; Hwang, G.: Discrimination of cabbage (*Brassica rapa ssp. pekinensis*) cultivars grown in different geographical areas using ¹H NMR-based metabolomics. *Food Chem.*, **137**, 68–75 (2013)
 - 8) Consonni, R.; Cagliani, L. R.; Stocchero, M.; Porretta, S.: Triple Concentrated Tomato Paste: Discrimination between Italian and Chinese Products. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 4506–4513 (2009)
 - 9) Kobayashi, S.; Putri, S. P.; Yamamoto, Y.; Donghyo, K.; Bamba, T.; Fukusaki, E.: Gas chromatography–mass spectrometry based metabolic profiling for the identification of discrimination markers of *Angelicae Radix* and its application to gas chromatography–flame ionization detector system. *J. Biosci. Bioeng.*, **114**(2), 232-236(2012)
 - 10) Kobayashi, S.; Nagasawa, S.; Yamamoto, Y.; Donghyo, K.; Bamba, T.; Fukusaki, E.: Metabolic profiling and identification of the genetic varieties and agricultural origin of *Cnidium officinale* and *Ligusticum chuanxiong*. *J. Biosci. Bioeng.*, **114**(1), 86-91 (2012).
 - 11) Tomita, S.; Nemoto, T.; Matsuo, Y.; Shoji, T.; Tanaka, F.; Nakagawa, H.; Ono, H.; Kikuchi, J.; Ohnishi-Kameyama, M.; Sekiyama, Y.: A NMR-based, non-targeted multistep metabolic profiling revealed L-rhamnitol as a metabolite that characterised apples from different geographic origins. *Food Chem.*, **174**, 163-172(2015)
 - 12) 有山薫, 門倉雅史: 無機分析によるタマネギの原産国(日本ー外国)判別法の開発, 農林水産消費安全技術センター調査研究報告, **32**, 1-5 (2008)
 - 13) 野菜の生産量の推移・生鮮野菜の輸入量の推移(野菜ブック), 独立行政法人農畜産業振興機構, 2018-9-7, <<https://www.alic.go.jp/content/000138418.pdf>>
 - 14) 佐々野僚一, 大崎秀介, 古野正浩, 福崎英一郎: 固相誘導体化を用いた低濃度のアミノ酸および有機酸と高濃度の糖類を含む試料の一斉分析法の開発, つくば, 第 65 回質量分析総合討論会講演要旨集, p. 63 (2017)
 - 15) AMDIS Download Page : 2018-08-10 <<https://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/downloads/>>
 - 16) 中村哲, 法邑雄司, 豊田正俊: ゴボウの原産地判別の試料調製法の再検討, 農林水産消費安全技術センター調査研究報告, **37**, 1-10(2013)
 - 17) 大西忠男, 田中静幸: 「タマネギの作業便利帳」, 一般社団法人農山漁村文化協会 (2012)
 - 18) 主要国の野菜の生産動向等(月報野菜情報 2015年6月), 独立行政法人農畜産業振興機構, 2018-10-5, <<https://vegetable.alic.go.jp/yasaijoho/kaigaijoho/1506/kaigaijoho01.html>>

19) 財務省 貿易統計

**農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告
第42号**

平成30年12月発行

発行： 独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
〒330-9731 埼玉県さいたま市中央区新都心2-1
さいたま新都心合同庁舎検査棟
電話： 050 - 3797 - 1851
FAX： 048 - 600 - 2373
印刷： 名取印刷工業株式会社