

食品関係等調査研究報告

第43号

令和元年

Research Report of Food Products

Vol. 43

2019



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、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30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43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。

令和元年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 木内 岳志

目 次

元素分析によるネギの原産地判別マニュアルの検証 中村 哲	1
サトイモの原産地判別検査法の開発 高嶋 康晴, 小岩 智宏, 豊田 正俊, 山川 義正, 寺田 昌市, 渡邊 彩乃, 中村 哲..	1 2
元素分析及びストロンチウム安定同位体比分析によるオクラの原産地判別検査法の開発 後藤 祐之介, 小岩 智宏, 申 基澈, 陀安 一郎	2 0
新たな統計解析手法による原産地・原料原産地判別マニュアルの見直し 山川 義正, 中村 哲	2 7
DNA 分析における分析時間短縮についての検討 澤田 桂子, 豊田 正俊, 高嶋 康晴	3 4
[他誌掲載論文]	
デジタル PCR を用いたダイズ及びその加工品の定量的品種判別法の開発.....	4 5

元素分析によるネギの原産地判別マニュアルの検証

中村 哲

Satoru Nakamura

要 約

元素分析によるネギの原産地判別において、主に Na の濃度分布が過去の開発時に使用した試料と検査試料で異なっており、その影響で誤判別を引き起こしている可能性があると考えられたため、その原因を確認した。その結果、標本抽出におけるかたより（選択バイアス）である可能性が高いと判明した。選択バイアスが発生している条件下における判別モデルの修正方法として半教師付き分類と教師付き分類の組合せを採用し、過去の開発時に使用した試料及び検査試料の両方に対して適切に判別できる判別モデルを構築した。

1. はじめに

元素分析によるネギの原産地判別については有山（Ariyama）ら^{1)~3)}から報告され、一色ら⁴⁾から再検証の結果が報告されている。しかしながら、検査試料として購入した市販のネギの元素濃度分布を確認すると、判別モデルに使用した試料の元素濃度分布と異なる例が見られた。特に問題となっていた元素として Na がある。ネギの Na の Mg 濃度比の常用対数の分布を図 1 に示す。図 1 には、乾燥試料中 Mg 濃度を 1000 mg/kg としたときの乾燥試料中 Na 濃度換算の結果も示している。従来原産地判別で用いられてきた判別分析やサポートベクターマシンといった教師付き分類（教師あり学習）は、検査試料の分布が国産の分布と外国産の分布の混合分布として表現可能であることを前提としている。一方、図 1 を見ると、Na の Mg 濃度比の常用対数が -0.5（乾燥試料中 Na 濃度換算で約 300 mg/kg）以上の領域は混合分布による再現が不可能であり、前提条件を満たしていない。そのため、検査において誤判別を起こしている可能性が否定できなかった。

母集団と標本集団の分布のずれを発生させるかたより（バイアス）の原因を大別すると、選択バイアス（標本選択バイアス）、情報バイアス及び交絡バイアスの 3 種類となる⁵⁾。選択バイアスは標本抽出におけるかたよりであり、多変量解析における共変量シフトと呼ばれるものも同種の問題である⁶⁾。情報バイアスは標本の情報を得る際に発生するかたよりであり、化学分析においては分析時の未知の不確かさが存在する場合に発生する可能性がある。交絡バイアスは実験計画における問題の一種で、目的変数と説明変数の間に関連性があるときに両者に影響する未知の要因が存在することにより発生するかたよりである。このうち、交絡バイアスについては原産地判別にはほぼ無関係であることから、選択バイアスか情報バイアスのいずれかが原因となる。

選択バイアスが原因の場合、教師付き分類のみで対応することは困難であり、別の方法を採用する必要がある。報告されている方法としては、標本に重み付けをする方法⁶⁾、半教師付き分類（半教師あり学習）による方法⁸⁾等が挙げられるが、いずれの方法もラベル（原産地判別の場合、国産、外国産等）のある標本だけでなく、ラベルのない未知標本も用いることになる。食品の原産地判別において選択バイアスを議論した報告はほとんど見られないが、選択バイアスの発生頻

度については"rather frequently"と表現している例もあり⁷⁾、食品の原産地判別においても発生している可能性は否定できない。一方、情報バイアスが原因の場合、分析方法の修正か未知の不確かさの補正のいずれかが必要となる。情報バイアスについては分析化学における基本的な問題として、食品の原産地判別においても頻繁に議論されている。

本研究では、元素分析によるネギの原産地判別において発生していた分布のかたよりの原因を確認するとともに、判別モデルの修正を行ったので報告する。

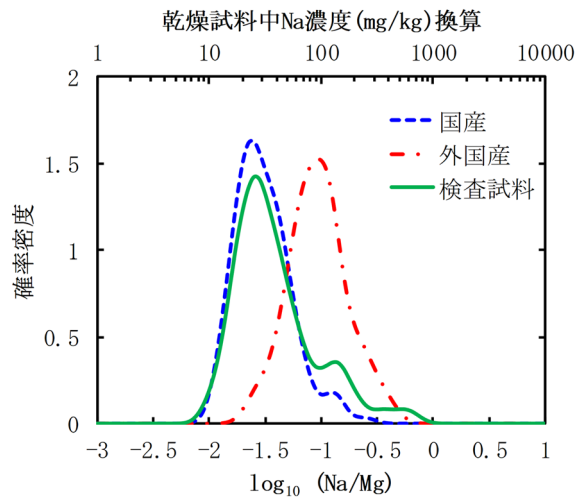


図 1 ネギ試料の Na の Mg 濃度比の常用対数の分布
データの詳細は 2.2.1 参照

2. 実験方法

2.1 元素分析の検証

2.1.1 試料

市販の群馬県産と表示された同一ロットのネギ 22 個体を使用した。

2.1.2 試薬

実験に使用した水は、超純水製造装置 (Milli-Q Integral 3、メルクミリポア) で製造した超純水 (比抵抗値 $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上) を用いた。試料の酸分解には、61%硝酸 (高純度電子工業用、関東化学) 及び 70%過塩素酸 (TAMAPURE-AA-100、多摩化学工業) を用いた。元素濃度測定用の検量線用混合標準溶液は、単元素標準溶液 (メルク、シグマアルドリッチ及び AccuStandard) を適宜希釈して調製した。また、In の単元素標準溶液を内標準溶液として希釈調製し、検量線用混合標準溶液及び試料溶液に添加した。

2.1.3 装置

試料粉碎時の Na 汚染の検証には、セラミック刃のミキサー (B-400 : 日本ビュッヒ) を用いた。元素濃度の測定には、誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) (Agilent 7500cx : Agilent Technologies) 及び誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-OES) (iCAP 6300 : Thermo Fisher Scientific) を使用した。

2.1.4 試料粉碎時のNa汚染の検証

試料粉碎時のNaの汚染を検証するため、ミキサーに超純水約50 mLを加え、混合したものを回収し、超純水で50 mLに定容したものをICP-OES分析に供した。本操作は4点併行で実施した。

また、これとは別に、ネギ2個体について超純水で表面を洗浄後、セラミック包丁で基部から1~10 cmの部位を採取し、更に縦に4分割して2個体分の対角を採取する縮分を行った。一方は等量の超純水を添加してミキサーで粉碎し、酸分解及び固形分測定に供した。もう一方は凍結乾燥し、ハンマーで粉碎したものを酸分解に供した。

2.1.5 試料調製

試料10個体については超純水で表面を洗浄後、セラミック包丁で基部、基部から0~1 cm及び基部から1~10 cmの3点の部位に分割し、更に基部から1~10 cmの部位については表面に付いた傷のある部位とそれ以外の部位に分割した。各部位について凍結乾燥し、ハンマーで粉碎して10個体分を混合したものを酸分解に供した。

時間経過に伴うNaの濃度変動を確認するため、試料5個体については購入当日に、別の試料5個体については購入から21日冷蔵保存した後で、超純水で表面を洗浄後、セラミック包丁で基部から1~4 cm、4~7 cm及び7~10 cmの各部位を採取した。各個体、各部位について凍結乾燥し、ハンマーで粉碎したものを酸分解に供した。

2.1.6 酸分解

乾燥試料約0.5 g又は粉碎試料約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℃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180~230℃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。その後時計皿を外し、約230℃で加熱して乾固した。ビーカーに1%硝酸を5~10 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、乾燥試料は50 mL容、粉碎試料は25 mL容の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 µg/Lになるように加え、1%硝酸で定容後、元素濃度測定用試料溶液とした。時間経過に伴うNaの濃度変動確認試料は1点で、ミキサーで粉碎した試料は3点併行で、それ以外の試料は2点併行で分析した。

2.1.7 固形分測定

粉碎試料約5 gをアルミ箔容器に採取して、恒温乾燥器を用いて70℃で24時間乾燥し、乾燥前後の重量差により、粉碎試料中の固形分含有量を求めた。固形分含有量は、各元素の粉碎試料中濃度から乾燥重量あたりの濃度（以下「乾燥試料中濃度」という。）を求めるのに用いた。固形分測定は3点併行で実施した。

2.1.8 機器測定

ICP-MSを用いて内標準法によりMn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Rb、Mo、Cd、Cs、La、Ce及びTlの13元素の元素濃度を測定した。また、ICP-OESを用いて検量線法によりNa、Mg、P、K、Ca、Sr及びBaの7元素の元素濃度を測定した。

2.2 選択バイアスへの対応

2.2.1 データ

Ariyama らの収集したネギ 101 試料（国産 65 試料、外国産 36 試料）³⁾、平成 25 年度に収集したネギ 45 試料（国産 33 試料、外国産 12 試料、一部は一色ら⁴⁾と共通）及び平成 27 年度に収集したネギ 72 試料（国産 46 試料、外国産 26 試料）並びに農林水産消費安全技術センターが平成 22 年度から平成 25 年度に分析した検査試料 398 試料の 20 元素（Na、Mg、P、K、Ca、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Rb、Sr、Mo、Cd、Cs、Ba、La、Ce、Tl）の濃度の結果を用いた。ただし、La 及び Ce については半教師付き分類及び教師付き分類の計算には使用しなかった。また教師付き分類の実施に当たっては、検査試料 398 試料のうち 144 試料のデータをランダムに抽出し、検査試料以外のデータと組み合わせた。

なお、平成 22 年度から平成 24 年度までの検査試料の結果については各元素の Mg 濃度比のデータ、平成 25 年度の検査試料の結果については各元素の粉碎試料中濃度のデータのみであり、乾燥試料中濃度のデータは存在しなかったが、半教師付き分類及び教師付き分類の計算に用いた変数は各元素の Mg 濃度比の常用対数であるため、以降の計算への影響はほとんど無視できる。Horwitz 式の修正式¹⁰⁾による標準不確かさの計算に当たっては、検査試料以外のデータから得た乾燥試料中 Mg 濃度の分布から得た乱数又は粉碎試料の固形分を 5 % に固定した場合の値を用いた。

2.2.2 半教師付き分類

半教師付き分類の解析は Grandvalet ら¹¹⁾が報告したエントロピー最小化の概念を人工ニューラルネットワークに応用した方法を採用した。ラベルのある標本から計算される交差エントロピー

$$-y_i \cdot \ln p_i - (1 - y_i) \cdot \ln (1 - p_i) \quad \dots \text{(式 1)}$$

y_i : 試料 i のラベル (0 又は 1)
 p_i : 試料 i のラベルの予測値

及びラベルのない未知標本から計算されるエントロピー

$$-p_i \cdot \ln p_i - (1 - p_i) \cdot \ln (1 - p_i) \quad \dots \text{(式 2)}$$

の総和を計算した後、その総和（実際には L_1 正則化項及び L_2 正則化項を追加）を最小化することで判別モデルの係数の最適化を行った。

なお、Grandvalet らはロジスティック回帰及びカーネルロジスティック回帰に適用しているが、本研究では中間層（隠れ層）が 1 層の人工ニューラルネットワークに適用した。中間層の活性化関数には ReLU¹²⁾を使用した。また、Grandvalet らはエントロピーの総和にラグランジュ係数を掛けて正則化を行っているが、本研究では係数を使用しなかった。

式 2 は式 1 の y_i を p_i に置換したものとなっているが、これは試料のラベルの代わりに試料の事後確率を使用したと解釈することが可能である。実際、出力層の活性化関数をシグモイド関数

$$1 / \{1 + \exp(-x)\} \quad \dots \text{(式 3)}$$

としたとき、 p_i は平均 0.5、分散 1^2 の正規分布及び平均 -0.5、分散 1^2 の正規分布の 2 種類の分布に対する、事前確率を 0.5 (50 %) としたときの事後確率となっている。一方、本研究で使用した未知標本は大半が国産と考えられ、事前確率は 0.5 (50 %) と大きく異なっている。そこで、

式1の y_i に対応している p_i の代わりに、事前確率の値を p_0 としてシグモイド関数の x を $\ln \{p_0/(1-p_0)\}$ だけずらした値（ずらす方向は場合による。）を使用することにより、事後確率の値が適切な値になるよう補正を行った。 p_0 はパラメータの一種として扱い、判別結果から推定される事前確率の値と p_0 がおおむね一致するまで繰り返し計算を行った。

カーネル密度推定の結果を安定なものにするため、判別得点は出力層の結果そのものではなく、出力層の活性化関数を適用しない値とした。また、ReLU は負の値を 0 にする性質があることから、そのまま使用すると判別得点が特定の値に集中し、カーネル密度推定の結果が不安定なものになる。そのため、ある1つの中間層に ReLU を適用しない状態で判別得点の計算を行う操作を全ての中間層に対して行い、その中から判別結果に影響しない結果となる特定の順序統計量を採用した。

以上の計算に当たっては、Leave-one-out cross-validation (LOOCV) を行った。その他の解析については中村ら¹³⁾の方法に準じたが、判別得点の不確かさの計算にはモンテカルロ法を採用するとともに、カーネル密度推定のバンド幅の計算は Sheather & Jones の Direct Plug-in 法¹⁴⁾に変更し、モンテカルロ法の試行回数分バンド幅の計算を繰り返した後、その中央値を採用した。また、カーネル密度推定に当たっては、モンテカルロ法による判別得点の出力結果全てを用いて計算を行った。モンテカルロ法の試行回数は 2000 とした。

計算には R 3.5.1 (<https://www.r-project.org/>) を使用した。

2.2.3 教師付き分類

解析は中村ら¹³⁾の方法に準じたが、判別得点の不確かさの計算にはモンテカルロ法を採用するとともに、カーネル密度推定のバンド幅の計算は Sheather & Jones の Direct plug-in 法¹⁴⁾に変更し、モンテカルロ法の試行回数分バンド幅の計算を繰り返した後、その中央値を採用した。また、カーネル密度推定に当たっては、原産地（検査試料にあつては表示産地）の出荷量に応じた重みを付け、モンテカルロ法による判別得点の出力結果全てを用いて計算を行った。モンテカルロ法の試行回数は 3500 とした。

計算には R 3.5.1 を使用し、中間層（1層）の活性化関数が ReLU の人工ニューラルネットワーク、R のパッケージ MASS 7.3-50 に同封された lda 関数による線形判別分析（LDA）及び qda 関数による二次判別分析（QDA）、e1071 1.7-0 に同封された svm 関数によるサポートベクターマシン（SVM、線形カーネル及びガウシアンカーネルを適用）並びに nnet 7.3-12 に同封された multinom 関数によるロジスティック回帰で解析した。

3. 結果及び考察

3.1 元素分析の検証

試料粉碎時の Na の汚染を検証した結果、ミキサーからは最大で 13 mg/kg 相当（乾燥試料中濃度換算）の Na が抽出された。検出限界は 10 mg/kg なので、分析結果に多少の影響を与える可能性がある結果となった。ただ、判別で問題となっているのは国産及び外国産のいずれの分布からも再現困難となっている 300 mg/kg 以上のものであり、ミキサーによる粉碎の判別結果への影響は小さいと考えられた。また、ミキサーで粉碎した試料の乾燥試料中 Na 濃度は 15.6 mg/kg、凍結乾燥した試料の乾燥試料中 Na 濃度は 15.2 mg/kg であり、ほとんど差はなかった。

ネギの部位別の元素濃度の結果を表 1 に示す。FAMIC のネギの原産地判別検査における試料採取部位は基部から 1~10 cm であるが、傷の有無によって特に La 及び Ce の濃度が大きく異なっ

表1 ネギの部位別元素濃度(乾燥試料中、mg/kg)

元素	部位				検出限界 実測値
	基部	0~1 cm	1~10 cm		
			傷	傷以外	
Na	254	29.3	11.2	12.9	2
Mg	2049	1178	857	1020	2
P	5272	3290	2045	2577	4
K	15284	11200	9823	13936	141
Ca	6377	4191	8426	3616	8
Mn	11.6	6.88	8.54	8.04	0.004
Fe	106	17.0	22.3	13.8	2
Co	0.0511	0.0178	0.0361	0.0178	0.0002
Ni	0.278	0.191	0.221	0.155	0.002
Cu	8.39	3.83	1.36	2.88	0.04
Zn	24.8	20.0	16.3	17.8	0.2
Rb	6.03	4.05	3.59	5.12	0.006
Sr	23.5	14.7	26.6	12.5	0.05
Mo	0.266	0.132	0.187	0.147	0.001
Cd	0.120	0.0715	0.112	0.0595	0.0002
Cs	0.00775	0.00209	0.00276	0.00236	0.00003
Ba	4.91	3.05	5.96	2.94	0.05
La	0.0203	0.00128	0.00657	0.00076	0.00006
Ce	0.0357	0.0014	0.0087	0.0005	0.0001
Tl	0.0145	0.0084	0.0110	0.00734	0.00004

ていた。La は国内の土壤中に 16.5 mg/kg、Ce は 30.2 mg/kg (いずれも中央値) 程度含まれており¹⁵⁾、ネギと比較して高濃度であることから、傷に付着した土壌の影響を受けやすいものと考えられた。なお、有山ら¹⁶⁾も La 及び Ce が土壌の影響を受けると報告しているが、今回の結果ほど顕著な差は出ていない。一方、Na を含むその他の元素については傷の有無による濃度差が小さかった。Na は Na₂O 換算で国内の土壤中に 2.16 % (中央値、Na として 16000 mg/kg) 程度含まれており¹⁵⁾、ネギ本体と比較すると高濃度であるが、Na 塩が水溶性であることから土壌の影響は超純水で洗浄することで十分低減できているものと考えられた。有山ら¹⁶⁾も、Na については土壌の影響が小さいと報告している。La 及び Ce 以外の元素は傷の有無により多少の影響はあるものの、傷のある部位の量は少なく、試料調製に伴いほぼ平均化されることから、傷の影響は小さいと考えられた。一方、La 及び Ce は産地よりも傷の有無に左右されてしまい、また、分析の品質管理においても問題を生じていることから、判別には適さないと判断した。

Na は基部付近に高濃度に含まれるため、時間経過に伴い上部に移動する可能性がないか確認した。その結果を表 2 に示す。部位間による差はいずれの個体でもほとんど見られないことから、保管期間を要因 1、個体間を要因 2、部位を残差とした 2 段完全枝分かれ実験と考へ、Na 濃度の常用対数に対して分散分析により確認したが、3 週間の保管前後で有意な差は見られなかった ($p = 0.162$)。仮に影響があったとしても図 1 のような分布を再現するほどのものではないと考えられた。

その他の分析上の問題、例えば標準溶液の調製ミスのような問題についても考察したが、図 1 のような分布は検査年度 (2.2.1 で使用しなかった平成 26 年度以降を含む。) や試験室にほぼ関係なく生じており、また、図 1 の低濃度領域の分布は国産の分布と一致していることから、元素分析における影響だけでは図 1 のような分布を再現するのは困難であり、情報バイアスによる分布への影響は小さいと考えられた。

表2 ネギの時間経過に伴うNa濃度の変動(乾燥試料中、mg/kg)

部位	購入直後					3週間保管				
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
1~4 cm	14.8	10.7	16.5	17.2	14.9	16.3	13.8	22.1	16.3	39.5
4~7 cm	13.2	9.4	15.0	15.9	17.1	17.0	13.9	21.0	14.5	35.1
7~10 cm	14.2	10.6	16.0	15.8	15.7	16.4	13.9	21.9	13.4	31.4

3.2 選択バイアスへの対応

3.1 では Na の選択バイアスが問題の主要因であると結論付けたが、Na を除く元素で判別モデルを構築しても図2のようになり、検査試料の判別得点分布が国産の判別得点分布と外国産の判別得点分布の混合分布として表現できなかつた。これは、Na 以外の元素も選択バイアスの影響を受けていることを示唆している。また、選択バイアスの影響を受けている元素を除外すると、判別精度が実用レベルに到達しなくなるという問題もある。

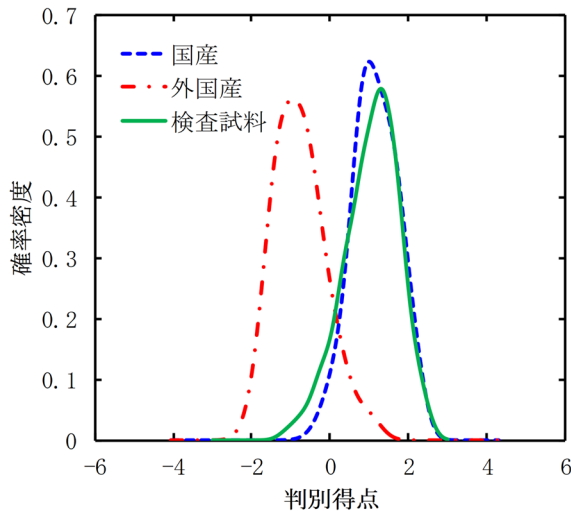


図2 Na を除外したネギの教師付き分類の結果

選択バイアスにより誤判別が起きる原理を図3に示す。図3では、未知標本の分布が陰性試料の分布と比較してy軸方向にずれたものになっている。図3には人工ニューラルネットワークで判別した結果も掲載されているが、判別得点が0となる線が未知標本の分布上に引かれている。ただ、図3を見る限り、未知標本は陽性試料の分布より陰性試料の分布に近いことから、本来は全て陰性として判別されるべきものである。

2.2.2 の半教師付き分類を図3のデータに適用した結果を図4に示す。図3と異なり、未知標本が全て陰性側に判別されており、選択バイアスによる影響を低減できていることが分かる。なお、事前確率を0.5 (50%) のままとすると図5のようになるが、図3は本来 $x=0$ で判別されるように設計されたデータであり、図4と比較するとやや不安定な結果となっている。

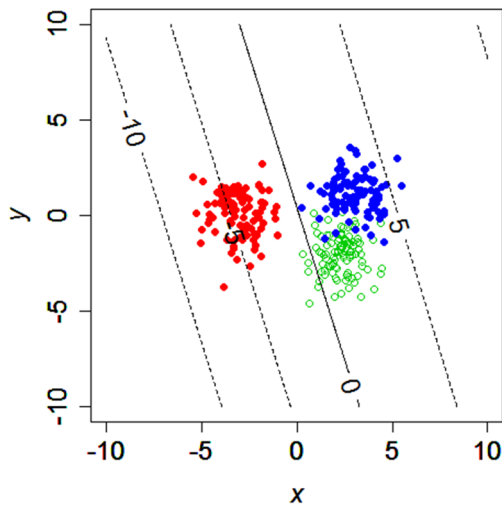


図 3 選択バイアスが存在するデータに教師付き分類を適用した例

青：陰性、赤：陽性、緑：未知標本（以下同じ）
線上の値は判別得点

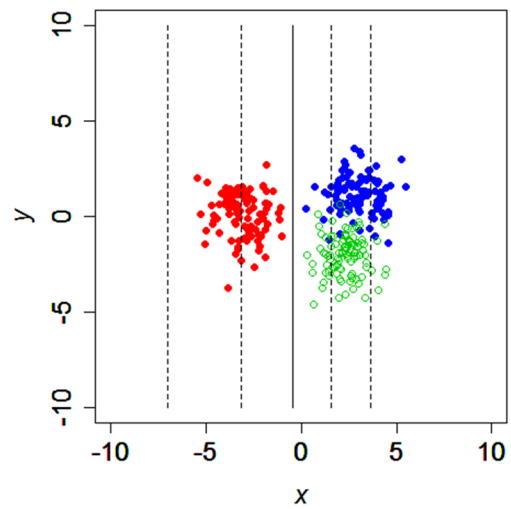


図 4 選択バイアスが存在するデータに半教師付き分類を適用した例

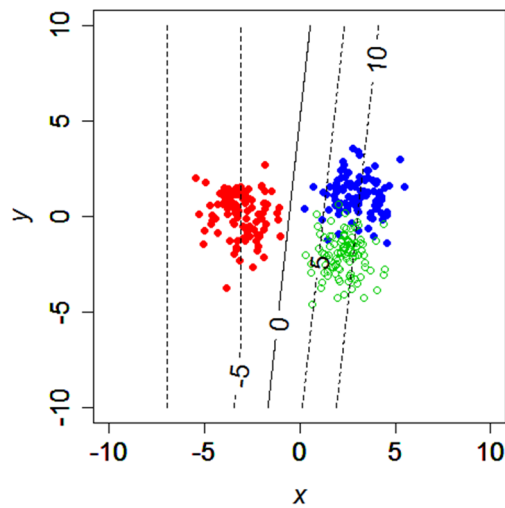


図 5 事前確率 p_0 を 0.5 としたときの半教師付き分類

2.2.2 の半教師付き分類をネギのデータに適用した結果を図 6 に示す。外国産の事前確率 p_0 は 0.004~0.011 (0.4~1.1%) に収束しており、また、検査試料（未知標本）の判別得点の分布は国産の判別得点の分布と一致していることから、検査試料の大半は国産と考えられた。ただ、図 6 の判別モデルについて、判別得点が正の場合に国産、負の場合に外国産としたとき、国産試料の 100.0% (144/144)、外国産試料の 78.4% (58/74) を正しく判別し、検査試料の 98.3% (391/398) を国産と判別したが、2.2.2 の半教師付き分類を判別モデルとしてそのまま使用するには不十分と考えられた。そこで、検査試料の大半は国産と考えられることから、検査試料を検査試料以外の国産試料と同数含める形で教師付き分類を行った。ただし、全ての検査試料を含めると標本数のかたよりによる別の選択バイアスが発生する可能性があることから、検査試料の一部のみを使用することにより選択バイアスの影響を最小化した。

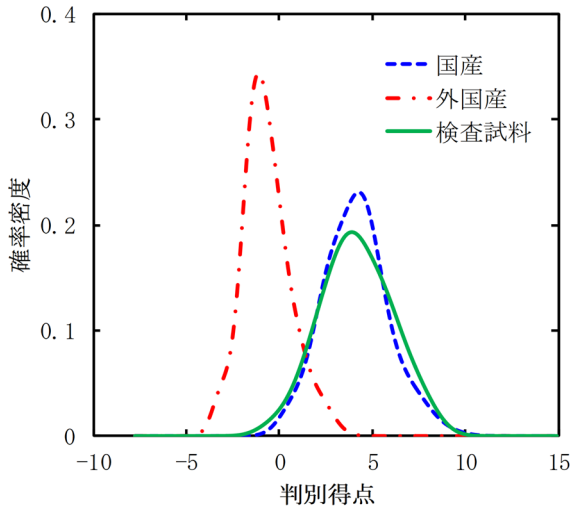


図 6 ネギの半教師付き分類の結果

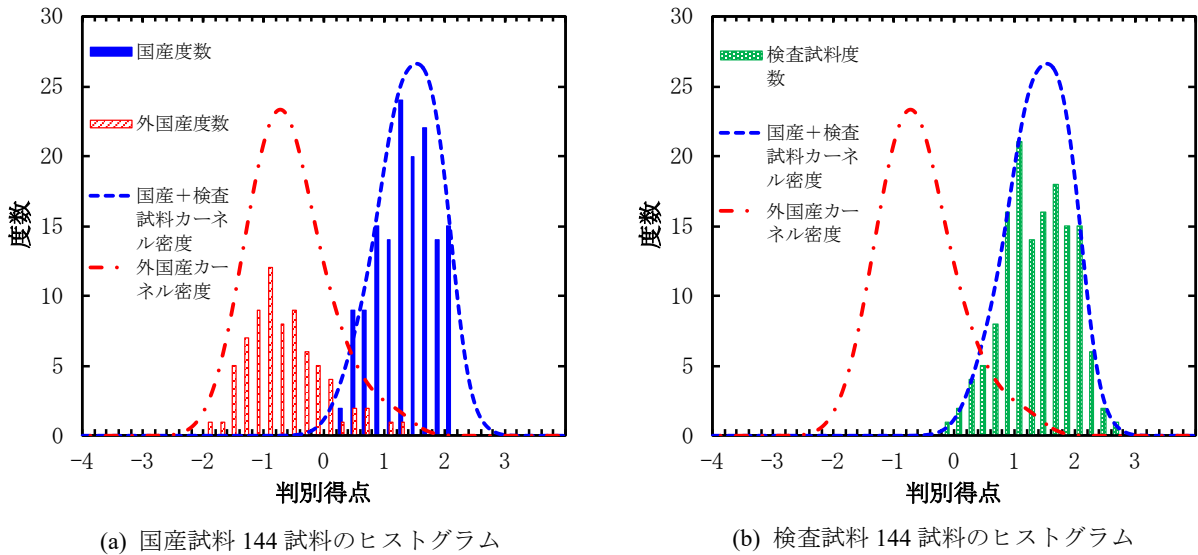


図 7 検査試料を含めたネギの教師付き分類の結果

2.2.3 の教師付き分類をネギのデータに適用した結果を図 7 に示す。図 7 の判別モデルについて、判別得点が正の場合に国産、負の場合に外国産としたとき、国産試料の 100.0 % (144/144)、外国産試料の 85.1 % (63/74) を正しく判別し、検査試料の 99.3 % (143/144) を国産と判別した。また、2.2.3 の教師付き分類に含めなかった検査試料 254 試料については、99.6 % (253/254) を国産と判別した。検査試料の判別得点の分布は国産試料の判別得点の分布とおおむね一致する結果となっており、半教師付き分類により得た事前確率 p_0 の推定値と比較しても問題のない結果となった。これにより、過去の開発時に使用した試料及び検査試料の両方に対して適切に判別できる判別モデルを構築することができた。

Na が高濃度となる検査試料の表示産地には海沿いの都道府県が多いといった傾向が見られたものの、ネギにおいて選択バイアスの原因が何かを確定することは困難であった。ただ、原産地判別全般において選択バイアスが発生する原因は複数考えられる。例えば、以下のようなものが挙げられる。

- ・各都道府県の出荷量等に応じた収集数とした場合に、市町村レベルの出荷量等の調査が不可能であることが原因で、特定の市町村からの収集に偏ってしまう
- ・原産地が確かな試料を収集する際、収集難易度の問題（収集のしやすさ、収集に協力的でない業者等の存在）により、収集先が偏ってしまう
- ・気象状況や天変地異によって年変動や季節変動が生じる
- ・畜産物では飼料原料の入手先（原産地）や飼料の組成が年によって変わる可能性があり、その影響で年変動が生じる

標本抽出の段階でこれらの問題に対処しようとする、原産地の確かさが失われたり原産地判別法の開発が著しく遅れたりするといった別の問題が発生するが、これらの問題はトレードオフの関係にある。そのため、標本抽出を是正するよりも、開発段階又は検査段階においてラベルのある標本とラベルのない未知標本の両方を収集しておき、半教師付き分類を用いて解析を行うといった手順の方が有効と考えられる。半教師付き分類の元々の目的は、ラベルのある標本の収集の困難さやコストの高さに対応するために未知標本を活用するというものであり¹⁰⁾、選択バイアスへの対応以外の面でもメリットがある。ただし、教師付き分類と比較するとまだ一般的ではなく、統計解析のハードルが上がるという欠点もある。また、本研究で使用した未知標本は大半が国産と考えられる検査品に偏っているが、このようなデータセットは半教師付き分類との相性が悪いという問題もある。これらの問題への対処は今後の課題と思われる。

文 献

- 1) 有山薫, 堀田博, 安井明美: ネギの産地判別のための無機元素測定法の確立と予備的検討, 分析化学, **52**(11), 969-978 (2003)
- 2) Ariyama, K.; Horita, H., Yasui, A.: Chemometric Techniques on Inorganic Elements Composition for the Determination of the Geographic Origin of Welsh Onions. *Anal. Sci.*, **20**, 871-877 (2004).
- 3) Ariyama, K.; Horita, H., Yasui, A.: Application of Inorganic Element Ratios to Chemometrics for Determination of the Geographic Origin of Welsh Onions. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5803-5809 (2004).
- 4) 一色摩耶, 箱田晃子, 寺田昌市: ネギの原産地判別法の再検討, 農林水産消費安全技術センター調査研究報告, **38**, 1-5 (2014)
- 5) 対馬栄輝: 研究デザインと統計解析の基礎, 理学療法学, **44**(6), 463-469 (2017)
- 6) 杉山将, 山田誠, ドウ・プレシ マーティヌス・クリストフェル, リウ ソン: 非定常環境下での学習: 共変量シフト適応, クラスバランス変化適応, 変化検知, 日本統計学会誌, **44**(1), 113-136 (2014)
- 7) Huang, J., Smola, A. J., Gretton, A., Borgwardt, K. M., Schölkopf, B.: Correcting Sample Selection Bias by Unlabeled Data. *Adv. Neural Inf. Process. Syst.*, **19**, 601-608 (2007)
- 8) Yamada, M., Sugiyama, M., Matsui, T.: Semi-supervised Speaker Identification under Covariate Shift. *Signal Processing*, **90**(8), 2353-2361 (2010)
- 9) 藤野昭典, 上田修功, 永田昌明: ラベルありデータの選択バイアスに頑健な半教師あり学習, 情報処理学会研究報告, **2010-MPS-80**(8), 1-6 (2010)
- 10) Thompson, M.: Recent Trends in Inter-laboratory Precision at ppb and Sub-ppb Concentrations in Relation to Fitness for Purpose Criteria in Proficiency Testing. *Analyst*, **125**, 385-386 (2000)

- 11) Grandvalet, Y., Bengio, Y.: Semi-supervised Learning by Entropy Minimization. *Adv. Neural Inf. Process. Syst.*, **17**, 529-536 (2005)
- 12) Glorot, X., Bordes, A., Bengio, Y.: Deep Sparse Rectifier Neural Networks. *JMLR Workshop Conf. Proc.*, **15**, 315-323 (2011)
- 13) 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)
- 14) Sheather, S. J., Jones, M. C.: A Reliable Data-Based Bandwidth Selection Method for Kernel Density Estimation. *J. Royal Stat. Soc. Ser. B*, **53**(3), 683-690 (1991)
- 15) 海と陸の地球化学図, 国立研究開発法人産業技術総合研究所, 2019-06-06, <<https://gbank.gsj.jp/geochemmap/setumei/setumei-heikin.htm>>
- 16) Zhu, X.: Semi-Supervised Learning Literature Survey, University of Wisconsin-Madison, 2019-06-06, <http://pages.cs.wisc.edu/~jerryzhu/pub/ssl_survey.pdf>

サトイモの原産地判別法の開発

高嶋 康晴¹、小岩 智宏²、豊田 正俊²、山川 義正²、寺田 昌市²、渡邊 彩乃²、中村 哲²
Yasuharu Takashima, Tomohiro Koiwa, Masatoshi Toyoda, Yoshimasa Yamakawa, Shoichi Terada,
Ayano Watanabe, Satoru Nakamura

要 約

平成 22 年に開発した元素分析によるサトイモ原産地判別法の判別精度の向上のために、元素分析に加え、軽元素（炭素及び酸素）安定同位体比分析及びストロンチウム安定同位体比（ $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 、以下「Sr 安定同位体比」という。）分析を対象に、各分析法単独又は組合せによる産地判別の精度向上の可能性について検討を実施した。各分析法単独での判別精度は低く、産地判別は困難であるが、元素分析と Sr 安定同位体比分析等、複数の分析法を組み合わせることで、判別精度を向上させることが可能となった。

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義務表示事項、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」の表示が義務付けられている。

平成 29 年のサトイモの国内出荷量は約 97,000 トン¹⁾であるのに対し、生鮮サトイモの輸入量は約 4,000 トン²⁾であり、その全てが中国産である。平成 29 年の東京都中央卸売市場では、中国産サトイモはほぼ一定の価格で取引されており、国産サトイモの 6~7 割程度（夏期以外）から 5 割以下程度（夏期）の価格で取引されている³⁾。この価格差のため、産地偽装が懸念され、サトイモの原産地表示の真正性を客観的に検証する科学的技術の開発が求められ、平成 20~21 年度には、農林水産省の委託プロジェクト研究「食品・農産物の表示の信頼性確保と機能性解析のための基盤技術の開発」の中で、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所及び食品総合研究所（現 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜花き研究部門及び食品研究部門）と共同で、元素分析によりサトイモの原産地表示の真正性を確認する方法を開発し⁴⁾、平成 22 年に独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という。）において判別検査法として整理し、検査に活用してきた。しかしながら、産地判別法については、主要産地の変遷、環境要因の変動、新品種の導入等により、判別検査法作成から長期間が経過すると判別検査法に使用した判別モデル試料と、現在、流通している商品に乖離がみられることがあるため、サトイモ原産地判別法においても、由来の確かな試料を再収集し、判別モデルの信頼性を確認することが望まれていた。近年、産地判別には元素分析⁵⁾だけでなく、軽元素安定同位体比分析⁷⁾及び重元素安定同位体比分析⁸⁾での判別法開発への適用がみられ、FAMIC においても元素分析、軽元素安定同位体比分析及び重元素安定同位体比分析について単独又は複数の分析法について検討されている^{9)~11)}。

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

本研究では、元素分析のほか、軽元素（炭素及び酸素）安定同位体比分析及び Sr 安定同位体比分析を用い、単独又は複数の分析の組合せによる産地判別の可能性について検討した。

2. 実験方法

2.1 試料

サトイモ (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) のうち、子芋用品種（子芋及び孫芋を食用とする品種）を対象とし、国産試料は、各県の出荷量¹⁾の割合を参考に農業協同組合など生産者団体を通じて 79 点^(注)、外国産試料は、輸入量²⁾を参考に輸入業者などから中国産 55 点（山東省産 54 点、浙江省産 1 点）を収集し、国産試料 74 点及び中国産試料 30 点を判別モデルの構築に用いた（表 1）。

表 1 収集試料の内訳

国産試料			外国産（中国産）試料		
県名	試料数	判別モデル構築に用いた試料数	省名	試料数	判別モデル構築に用いた試料数
愛媛	13	13	山東	54	29
宮崎	10	10	浙江	1	1
千葉	8	8			
埼玉	6	6			
鹿児島	4	4			
神奈川	4	4			
福岡	4	4			
熊本	3	3			
新潟	3	3			
愛知	3	3			
茨城	5	3			
福井	3	3			
岐阜	3	3			
栃木	3	2			
静岡	3	2			
群馬	3	2			
兵庫	1	1			
計	79	74	計	55	30

2.2 試薬

実験に使用した水は、超純水製造装置（Milli-Q Element A10又はIntegral3、ともにメルクミリポア）で製造した超純水（比抵抗値 18 MΩ・cm以上）を用いた。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）を用いた。各元素の検量線用混合標準溶液には単元素標準溶液（Na、Mg、P、Ca、Mn、Fe、Ni、Cu、Zn、Rb、Sr、Cd及びBa、ICP分析用）を適宜希釈して調製した。また、Inを内標準溶液として、検量線用混合標準溶液及び試料溶液に添加した。Sr安定同位体比測定において、Srを精製・濃縮するためにSrレジン（粒径50-100 μm、Eichrom Technologies）を用いた。

Sr安定同位体比測定用の標準溶液は、NIST（アメリカ国立標準技術研究所）の認証標準物質 Strontium Carbonate SRM987を溶解し、適宜希釈して調製した。

(注) 国産試料の収集は、FAMIC 上田恵理子、龍口久子、小玉光男、田口真希、伊澤淳修、坪根政文、荒尾祐子が担当した。

2.3 装置

元素濃度の測定には、誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS)、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-OES) 及び二重収束型高分解能誘導結合プラズマ質量分析装置 (HR-ICP-MS) を用いた。軽元素安定同位体比測定用の試料調製には、真空凍結乾燥器を用いた。炭素安定同位体比の測定には、元素分析/同位体比質量分析計 (EA/IRMS)、酸素安定同位体比の測定には熱分解型元素分析計/同位体比質量分析計 (TCEA/IRMS) を用いた。Sr安定同位体比の測定には、HR-ICP-MSを用いた (表2)。

表2 使用装置一覧

装置名	機種名	メーカー名
ICP-MS	820MS	Varian (現Agilent Technologies)
	7500cx	Agilent Technologies
ICP-OES	725-ES	Varian (現Agilent Technologies)
	Agilent5100	Agilent Technologies
	iCAP 6300	Thermo Fisher Scientific
HR-ICP-MS	ELEMENT2	Thermo Fisher Scientific
	ELEMENT XR	
真空凍結乾燥器	DRZ350WB	ADVANTEC
	FDU-1200	EYELA
EA/IRMS	Iso Prime EA/PyrOH	Elementar
TCEA/IRMS	(TCEA) TCEA	Thermo Fisher Scientific
	(IRMS) Delta V advantage	

2.4 分析

2.4.1 試料調製

セラミック製包丁で外皮をむき、試料を超純水でよく洗浄した上で、概ね5 mm以下の厚さに薄切りし、二重にした樹脂製袋に入れた後、粒径5 mm以上の粒が残らない程度までハンマーで試料を粉砕した (以下「粉砕試料」という。)。粉砕試料を一部採取し、凍結乾燥したものを軽元素安定同位体比測定用試料とした。

2.4.2 水分測定

粉砕試料約3 gをアルミ箔容器に採取し、恒温乾燥器を用いて70 °Cで24時間乾燥し、前後の重量差により水分含有量を求めた。

2.4.3 酸分解

粉砕試料約2 gを樹脂製ヒータブルビーカーに採取し、61 %硝酸を10 mL加え、樹脂製時計皿でふたをし、ホットプレート上で120 °Cに加熱した。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200 °Cまで加温し、分解液が透明、かつ無色又は薄い黄色になるまで分解した。その後、約230 °Cで加熱して分解液を蒸発・乾固した。ビーカーに1 %硝酸を10 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10 µg/Lとなるように加え、1 %硝酸で定容後、元素濃度測定用試料溶液とした。各試料について2点併行で実施した。

2.4.4 Srの精製

Srの精製は石井ら¹¹⁾の方法に従った。すなわち、Srレジンを0.05 M硝酸に懸濁させ、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。元素濃度測定用試料溶液を濃度調整した上でコンディショニング後のSrレジんに負荷した。8 M硝酸3 mLを加えてSrレジンを洗浄後、0.05 M硝酸を2 mLを加えてSrを溶出させ、溶出液をSr安定同位体比測定用試料溶液とした。

2.4.5 元素濃度、Sr安定同位体比の測定

元素濃度は、ICP-OESを用いて、検量線法によりNa、Mg、P、Ca、Mn、Zn、Fe、Cu、Sr及びBaを測定し、ICP-MS又はHR-ICP-MSを用いて、内標準法（内標準：¹¹⁵In）によりNi、Rb及びCdを測定した。

Sr安定同位体比は、HR-ICP-MSを用いて、exponential lawによる内部補正法⁸⁾に従い測定した。

2.4.6 炭素及び酸素安定同位体比の測定

炭素安定同位体比は、粉碎試料をスズ製カプセルに採取し包み込んだ後、EA/IRMSにより測定した。酸素安定同位体比は、粉碎試料を銀製カプセルに採取し包み込んだ後、TCEA/IRMSにより測定した。試料はそれぞれ2点併行で分析した。

2.5 判別モデルの構築

判別モデルの構築は、中村ら⁹⁾の方法に準じた。元素分析について、測定した粉碎試料中の元素濃度から、Mg に対する濃度比の常用対数を説明変数として、線形判別分析（LDA）、二次判別分析（QDA）、サポートベクターマシン（SVM）及び人工ニューラルネットワーク（ANN）により判別モデルを構築した。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。また、説明変数に炭素安定同位体比及び Sr 安定同位体比を加えた場合についても、同様に判別モデルの構築及び的中率の確認を行った。

3. 結果及び考察

3.1 元素濃度の測定結果と判別の検討

判別モデルに使用した国産試料（N=74）と外国産試料（N=30）の粉碎試料中元素濃度の各種統計量を表3に示す。

表 3.1 粉碎試料中元素濃度（国産試料）の各種統計量

	国産 (N = 74) (mg / kg)											ICP-MS 又はHR-ICP-MS		
	ICP-OES										Ni	Rb	Cd	
	Na	Mg	P	Fe	Ca	Mn	Cu	Zn	Sr	Ba				
平均値	10.3	198	547	4.2	131	2.9	1.3	3.4	0.63	0.41	0.21	3.3	4.2×10 ⁻²	
標準偏差	19.9	53	184	1.8	100	2.8	0.5	2.3	0.56	0.59	0.24	2.2	4.3×10 ⁻²	
最大値	116	345	1067	10.7	620	14.9	2.3	14.5	3.25	2.78	1.27	10.7	22.5×10 ⁻²	
第3四分位数	7.1	237	667	5.2	136	3.1	1.6	3.4	0.88	0.46	0.24	4.6	6.0×10 ⁻²	
中央値	4.1	203	520	4.0	103	1.8	1.3	2.9	0.44	0.17	0.14	3.0	2.9×10 ⁻²	
第1四分位数	3.0*	158	435	3.2	76	1.3	1.0	2.4	0.26	0.07	0.09	1.6	1.2×10 ⁻²	
最小値	3.0*	28	63	0.5*	20	0.4	0.5*	0.5	0.10	0.04*	0.03*	0.3	0.3×10 ^{-2*}	

* 検出下限以下の場合は検出下限値を最小値として取り扱った

表 3.2 粉砕試料中元素濃度（外国産試料）の各種統計量

	外国産 (N = 30) (mg / kg)										ICP-MS 又はHR-ICP-MS		
	ICP-OES										Ni	Rb	Cd
	Na	Mg	P	Fe	Ca	Mn	Zn	Cu	Sr	Ba			
平均値	7.8	185	602	3.4	114	3.8	3.0	1.4	0.66	0.37	0.67	3.5	4.2×10 ⁻²
標準偏差	3.8	38	142	1.0	37	2.7	0.8	0.4	0.35	0.59	0.42	6.2	2.7×10 ⁻²
最大値	20.3	255	926	5.8	198	10.5	4.8	2.3	1.47	3.25	1.60	35.5	9.9×10 ⁻²
第3四分位数	9.3	205	708	4.0	144	5.6	3.4	1.6	0.94	0.32	0.88	3.4	5.9×10 ⁻²
中央値	7.3	185	605	3.5	105	2.3	3.0	1.4	0.54	0.20	0.59	2.3	4.0×10 ⁻²
第1四分位数	5.5	164	483	2.9	88	1.7	2.6	1.1	0.39	0.15	0.34	1.4	2.3×10 ⁻²
最小値	3.0	105	371	1.5	62	1.2	1.7	0.5*	0.23	0.04*	0.13	0.3	0.3×10 ^{-2*}

* 検出下限以下の場合は検出下限値を最小値として取り扱った

国産-外国産の判別モデルとして説明変数に 8 元素(Na、Mg、P、Mn、Ni、Cu、Rb、及び Ba)を用いる判別モデルが得られた。このモデルを元に LOOCV により得られた判別得点のヒストグラムを図 1 に示す。判別得点が正の場合を国産と判別するとき、モデル構築用試料のうち国産試料の 95.9 % (71 / 74)、外国産試料の 80.0 % (24 / 30) を正しく判別した。国産試料の的中率が低く、国産表示の市販品を検査するには、元素分析単独では判別精度が不十分であることが明らかとなった。

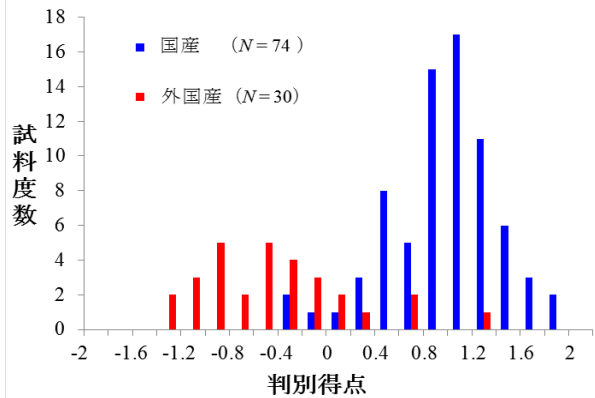


図 1 元素濃度の判別モデルによる国産と外国産のヒストグラム

3.2 炭素及び酸素安定同位体比の測定結果と判別の検討

炭素及び酸素安定同位体比の各種統計量を表 4 に示す。酸素安定同位体比については、事前検討として収集試料からランダムに選択した試料（国産 (N=29) と外国産 (N=34)）を用いて比較したところ、有意差があるとはいえなかった ($p > 0.05$) (図 2) ため、それ以上の検討を実施しなかった。

炭素安定同位体比については事前検討で有意な差が見られたため、元素濃度による判別モデルに使用した試料（国産 (N=74)、外国産 (N=30)）を用いて比較したところ有意差がみられた ($p < 0.01$) (図 2)。ヒストグラムを図 3 に示す。国産、外国産の分布が重なり、炭素安定同位体比単独での判別は困難であることが明らかとなった。

表 4 国産及び外国産の炭素及び酸素安定同位体比の各種統計量

	炭素安定同位体比		酸素安定同位体比	
	国産 (N = 74)	外国産 (N = 30)	国産 (N = 29)	外国産 (N = 34)
平均 (‰)	-26.99	-26.26	23.5	23.4
標準偏差 (‰)	0.78	1.02	1.4	1.6
最大値 (‰)	-24.99	-23.52	26.6	27.6
第 3 四分位 (‰)	-26.40	-25.65	24.4	24.4
中央値 (‰)	-26.94	-26.19	23.2	23.4
第 1 四分位 (‰)	-27.42	-27.12	22.5	22.4
最小値 (‰)	-29.14	-27.82	20.2	20.3
p 値	0.0012		0.9301	

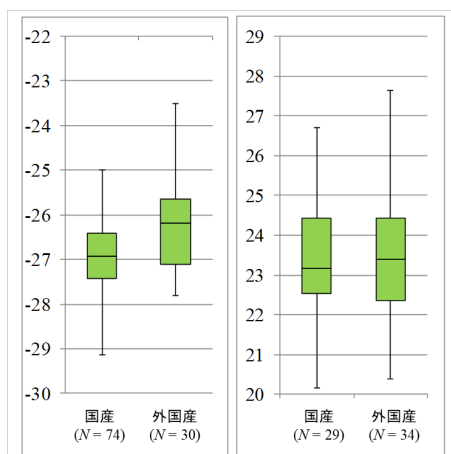


図 2 国産と外国産の炭素(左)及び酸素(右)安定同位体比の箱ひげ図

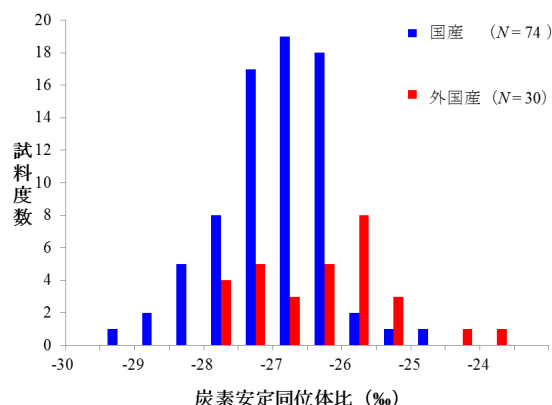


図 3 炭素安定同位体比の判別モデルによる国産と外国産のヒストグラム

3.3 Sr 安定同位体比の測定結果と判別の検討

元素濃度による判別モデルに使用した国産試料 (N=74) と外国産試料 (N=30) の Sr 安定同位体比の各種統計量を表 5 に示す。国産と外国産間で有意な差が見られた ($p < 0.001$)。国産、外国産の Sr 安定同位体比のヒストグラムを示す (図 4)。Sr 安定同位体比が 0.7110 以下を国産と判別するとき、モデル構築用試料のうち国産試料の 98.6% (73/74)、外国産試料の 70.0% (21/30) を正しく判別した。ただし、HR-ICP-MS の測定誤差等を考慮すると、Sr 安定同位体比分析単独での判別は困難であると考えられた。

表 5 国産と外国産の Sr 安定同位体比の各種統計量

	国産 (N = 74)	外国産 (N = 30)
平均値	0.7082	0.7124
標準偏差	0.0014	0.0025
最大値	0.7115	0.7214
第3四分位数	0.7091	0.7135
中央値	0.7084	0.7120
第1四分位数	0.7074	0.7108
最小値	0.7041	0.7072
p 値	< 0.001	

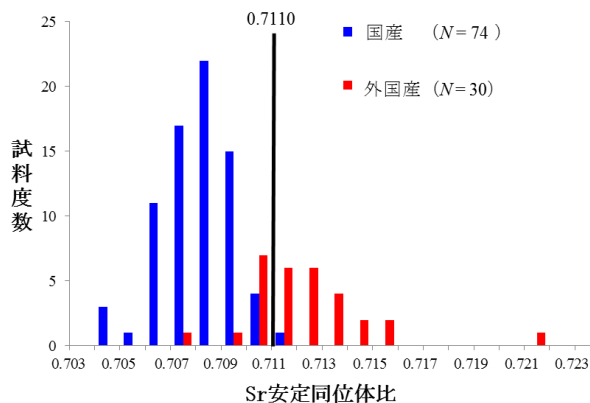


図 4 Sr 安定同位体比の判別モデルによる国産と外国産のヒストグラム

3.4 元素濃度と Sr 安定同位体比の組合せ

元素分析と Sr 安定同位体比分析の組合せについて検討したところ、9 元素 (Na、Mg、P、Ca、Fe、Ni、Rb、Cd 及び Ba) 及び Sr 安定同位体比の組合せによる国産と外国産の判別モデルが得られた。このモデルを元に LOOCV により得られた判別得点のヒストグラムを図 5 に示す。判別得点が正の場合を国産と判別するとき、モデル構築用試料のうち国産試料の 98.6% (73/74)、外国産試料の 86.7% (26/30) を正しく判別し、元素分析及び Sr 安定同位体比分析それぞれ単独の分析による判別に比べ判別精度の向上がみられた。

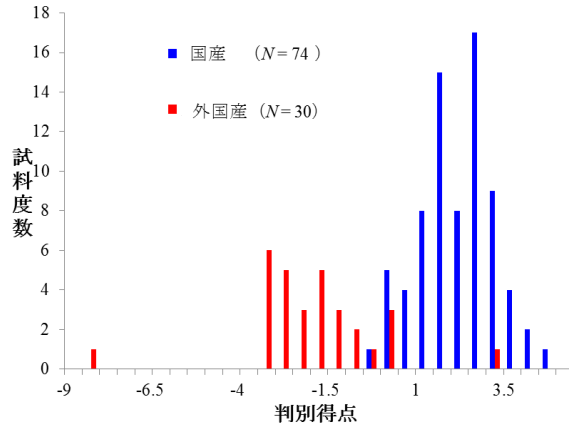


図5 元素濃度とSr安定同位体比を組み合わせた判別モデルにおける国産と外国産のヒストグラム

3.5 炭素安定同位体比とSr安定同位体比の組合せ

炭素安定同位体比とSr安定同位体比の組合せによる国産と外国産の判別モデルが得られた。このモデルを元に LOOCV により得られた判別得点のヒストグラムを図6に示す。判別得点が正の場合を国産と判別するとき、モデル構築用試料のうち国産試料の100% (74 / 74)、外国産試料の80.0% (24 / 30) を正しく判別し、炭素安定同位体比及びSr安定同位体比それぞれ単独の分析による判別に比べ判別精度の向上がみられた。

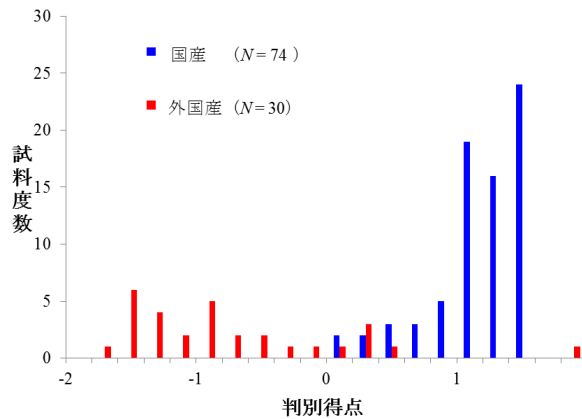


図6 炭素安定同位体比とSr安定同位体比を組み合わせた判別モデルにおける国産と外国産のヒストグラム

3.6 複数の検査法を組み合わせた判別

元素濃度、炭素安定同位体比、Sr安定同位体比の単独の判別モデルに対して、3.4及び3.5のように元素濃度又は炭素安定同位体比とSr安定同位体比の組合せによる判別モデルでは、国産又は外国産的中率が向上し、複数の分析法を組み合わせることで判別精度が向上する結果が得られた。一方、複数の分析法を組み合わせることで、検査に要する時間・費用は増大することになるため、検査の目的を考慮して分析法を選択する必要がある。

4. まとめ

FAMIC では元素分析に基づくサトイモ原産地判別法による検査を実施してきたが、判別検査法の作成から長期間が経過したことから、判別モデルを再構築することが望まれていた。新たに軽元素（炭素及び酸素）安定同位体比分析及び Sr 安定同位体比分析を行い、各分析法単独又は組合せによる判別精度の向上について検討を実施した。各分析法単独では判別精度の高い産地判別は困難であったが、元素濃度と Sr 安定同位体比、Sr 安定同位体比と炭素安定同位体比を組み合わせることで、判別精度を向上させることが可能であった。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、ご協力やご助言をいただきました農業協同組合、商社、輸入業者ほかの皆様にご心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) 平成 29 年産野菜生産出荷統計，農林水産省（2017）
- 2) 平成 29 年貿易統計、財務省（2017）
- 3) 東京都中央卸売市場業務部普及課編：「東京都中央卸売市場年報:平成 29 年農産物編」、東京都（2017）
- 4) 「安全で信頼性、機能性が高い食品・農産物供給のための評価・管理技術の開発」（食品・農産物の表示の信頼性確保と機能性解析のための基盤技術の開発）[信頼性（第 2/3 編）] プロジェクト研究成果シリーズ 492，農林水産省農林水産技術会議事務局，p. 36（2013）
- 5) Nakamura, S.; Suzuki, T.; Horita, H.; Nakano, A.: Detection of falsely labeled taro in Japan by elemental analysis: improvement of discrimination ability using a sampling plan, *Food Sci. Technol. Res.*, **18**(5), 723–733(2012)
- 6) 有山薫，堀田博，安井明美：ネギの産地判別のための無機元素測定法の確立と予備的検討，*分析化学*，**52**（11），969-978（2003）
- 7) 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）
- 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) 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食品関係等調査研究報告*，**37**，1-10（2013）
- 10) 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）
- 11) 石井修人，箱田晃子：原木栽培乾しいたけの元素分析及び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）

元素分析及びストロンチウム安定同位体比分析による オクラの原産地判別検査法の開発

後藤 祐之介¹, 小岩 智宏², 申 基澈³, 陀安 一郎³

Yunosuke Gotou, Tomohiro Koiwa, Ki-Cheol Shin, Ichiro Tayasu

要 約

生鮮オクラの原産地判別法の検討を元素分析及びストロンチウム安定同位体比 ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 、以下「Sr 安定同位体比」という。) 分析により行った。国産のオクラ 63 試料及び外国産のオクラ 81 試料 (フィリピン産 45 試料、タイ産 36 試料) を収集し、17 元素の濃度及び Sr 安定同位体比を測定した。国産と外国産の判別モデルを元素濃度と Sr 安定同位体比を用いて構築した。偽陽性率 (国産品を誤って陽性と判別する確率) が最小となる値を基準値とした場合の判別率 (中率は、元素濃度による判別モデルでは国産 100 %、外国産 67.9 %であった。元素濃度と Sr 安定同位体比を組み合わせた判別モデルでは国産 100 %、外国産 88.9 %となり、元素濃度単独で構築した判別モデルと比較して判別精度が向上する結果が得られた。

1. はじめに

一般用生鮮食品としてのオクラの表示にあつては、食品表示法 (平成 25 年法律第 70 号) に基づく食品表示基準 (平成 27 年内閣府令第 10 号 (平成 27 年 4 月 1 日施行)) において、名称及び原産地の表示が義務付けられ、原産地については原則、国産品にあつては都道府県名を、輸入品にあつては原産国名を表示しなければならない。

平成 26 年のオクラの国内出荷量は約 11,000 トン¹⁾であるのに対し、生鮮オクラの輸入量は約 6000 トン²⁾である。外国産生鮮オクラの主な輸入先は、フィリピン (総輸入量の 63 %)、次いでタイ (同 37 %) である。平成 26 年の東京都中央卸売市場のオクラの月別入荷実績³⁾では、4 月～6 月、10 月～12 月は国産品と輸入品の両方が入荷されている。一方、オクラの価格は、国産品と輸入品の間に約 1.5 倍の差があるため、産地偽装が懸念され、原産地表示の真正性を確認するための科学的手法が必要である。食品における原産地に関する科学的検証法は、元素分析や安定同位体比分析を利用した方法が報告されている^{4) -11)}。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、複数の分析法を組み合わせることで判別精度を向上させる手法も報告されている^{12) -15)}。

そこで、Sr 安定同位体比分析と元素分析との組み合わせによる国産と外国産 (フィリピン産及びタイ産) のオクラの判別法を検討したので報告する。

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

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

収集試料の内訳を表1に示した。国産試料については都道府県別の生産量¹⁾ (平成22、24、26年の平均)の割合に応じて63点を収集し、外国産試料については国ごとの輸入量²⁾ (平成25~27年の平均)の割合に応じて81点(フィリピン産45点、タイ産36点)を収集した。

表1 収集試料の内訳

	原産地	試料数	生産割合(%)
国産	鹿児島	17	39.4
	高知	7	16.1
	沖縄	4	9.8
	熊本	3	6.3
	宮崎	3	5.0
	福岡	3	4.5
	徳島	3	3.7
	群馬	3	2.5
	香川	3	2.1
	秋田	4	0.9
	新潟	3	0.7
	愛知	4	0.6
	東京	3	0.5
	大阪	3	0.4
	計	63	92.4
	外国産	フィリピン産	45
タイ産		36	38.9
計		81	100

2.2 試薬

実験に使用した水は、超純水製造装置(Milli-Q Element A10、メルクミリポア)で製造した超純水(比抵抗値18 MΩ・cm以上)である。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)、48%フッ化水素酸(Ultrapur-100、関東化学)を用いた。元素濃度測定用の検量線用混合標準溶液は、単元素標準溶液(ICP分析用)を適宜希釈して調製した。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

収集試料の粉碎には、セラミック刃のミキサー(B-400、日本ビュッヒ)を用いた。元素濃度の測定には、誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)(820MS、Varian(現Agilent Technologies))及び誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-OES)(725-ES、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計(MC-ICP-MS)(Neptune Plus、Thermo Fisher Scientific)を用いた。

2.4 試料調製

樹脂製ネット等に入っている同一ロットの商品からオクラ約100gを抽出し用いた。オクラ全体を超純水で洗浄しセラミック製包丁でがくを除去した後、ミキサーを用いて粉碎試料とした。

2.5 酸分解

粉碎試料約5.0gを採取した樹脂製ヒータブルビーカーに61%硝酸を10mL加え、樹脂製時計皿でふたをし、120℃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

(注) 国産試料の収集は、農林水産消費安全技術センターの安藤峰央、野村ともみ、今村正彦、田口真希、堤光典、琵琶隆史、伊澤淳修、坪根政文、荒尾祐子が担当した。

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 180~230 °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。次に時計皿を外し、約 230 °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 回繰り返す、内標準として In を 5 µg/L になるように加え、1 %硝酸で定容後、元素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。次に元素濃度測定用試料溶液 (Sr が 200~400 ng 含まれる量) を 200 °C 程度で蒸発乾固した。放冷後、61 %硝酸 0.5 mL 及び 48 %フッ化水素酸 0.1 mL を加え、100 °C で 30 分加温した後、蒸発乾固した。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 元素濃度及び Sr 安定同位体比の測定

元素濃度は、ICP-MS 及び ICP-OES を用いて内標準法 (内標準 : In) により表 2 の測定条件で測定した。Sr 安定同位体比は、MC-ICP-MS を用いて表 3 の測定条件で測定した。測定により得られた試料や SRM987 の Sr 安定同位体比の補正は井伊ら¹¹⁾に準じ、結果の解析等にはこの補正後の値を用いた。

表 2 ICP-MS 及び ICP-OES の測定条件

プラズマ条件	ICP-MS	ICP-OES
RFパワー	1.3 kW	1.20 kW
プラズマガスフロー	15.5 L/min	15.0 L/min
補助ガスフロー	1.55 L/min	1.50 L/min
ネブライザーガスフロー	0.95 L/min	
ネブライザーガス圧力		200 kPa
ポンプ速度	5 rpm	15 rpm

表 3 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	0.85-1.00 L/min
ネブライザー (吸入量)	PFA (100µL/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	50

2.8 水分測定

水分測定は石井ら¹⁰⁾の方法に従った。粉碎試料約 5.0 g をアルミ箔容器に採取して、恒温乾燥器を用いて 70 °C で 24 時間乾燥し、乾燥前後の重量差により、粉碎試料中の水分含有量を求めた。水分含有量は、各元素の粉碎試料中濃度から乾燥重量あたりの濃度 (以下「乾燥試料中濃度」という。) を求めるのに用いた。

2.9 判別モデルの構築

2.7 で得られた収集試料の元素濃度及び Sr 安定同位体比を判別モデルの構築に用いた。乾燥試料中元素濃度の常用対数、K に対する濃度比の常用対数及び Sr 安定同位体比を説明変数として、サポートベクターマシン及び二次判別分析により判別モデルを構築した。サポートベクターマシンは R 3.5.3 (<http://www.r-project.org/>) の e1071 パッケージに同封されている svm 関数を、二次判別分析は MASS パッケージに同封されている QDA 関数を用いた。解析は中村ら⁶⁾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 元素濃度

収集試料（国産試料 63 点、フィリピン産試料 45 点、タイ産 36 点）の各元素の乾燥試料中濃度を表 4 に示す。

表 4 収集試料の各元素の乾燥試料中濃度 (mg/kg)

	国産 (n=63)		フィリピン (n=45)		タイ (n=36)	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
Li	0.08	0.2	0.03	0.02	0.09	0.1
Mn	50	36	71	52	45	34
Co	0.14	0.1	0.30	0.2	0.17	0.1
Ni	1.4	1	3.5	1.9	1.7	1
Cu	7	2	8	1	8	1
Zn	48	10	44	10	50	7
Rb	16	12	84	47	48	27
Sr	23	23	52	15	28	15
Y	0.007	0.01	0.005	0.004	0.003	0.003
Mo	0.62	0.3	0.27	0.2	0.43	0.2
Cd	0.34	0.3	0.20	0.1	0.28	0.2
Cs	0.05	0.1	0.22	0.3	0.14	0.1
Ba	16	24	38	30	15	11
P	5243	473	5065	596	5565	362
Ca	7734	1422	8497	1451	10390	1703
Mg	4450	512	5609	597	5035	383
K	24388	2140	23532	2667	25293	1679

3.2 Sr 安定同位体比

収集試料の Sr 安定同位体比の度数分布を図 1 に示す。平均値±標準偏差は、国産試料 (n = 63) は 0.7091 ± 0.001、フィリピン産試料 (n = 45) は 0.7055 ± 0.001、タイ産試料 (n = 36) は 0.7171 ± 0.004 となり、3 カ国間の分布範囲はそれぞれ分かれる傾向が見られた。分散が等しくないとして仮定した t 検定では、国産試料とフィリピン産試料、国産とタイ産試料の平均値間に有意な差が確認された (p < 0.01)。

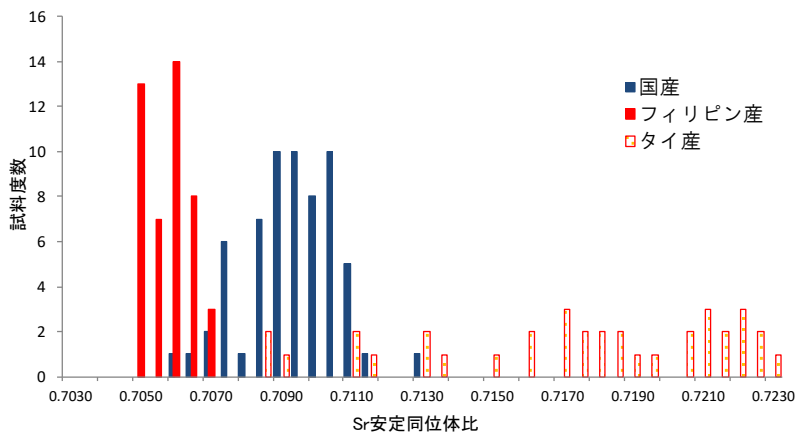


図 1 オクラの Sr 安定同位体比の度数分布

3.3 元素濃度による判別の検討

国産試料 ($n = 63$) と外国産試料 ($n = 81$) の乾燥試料中元素濃度を用いて、国産－外国産判別モデルを構築した。サポートベクターマシンにより 12 元素 (Mn、Co、Ni、Cu、Rb、Mo、Cd、Cs、Mg、P、K 及び Ca) の常用対数を説明変数とする判別モデル (model I)、ガウスクーネルサポートベクターマシンにより 10 元素 (Mn、Co、Ni、Rb、Mo、Cs、Ba、Mg、Zn 及び Sr) の K に対する濃度比の常用対数を説明変数とする判別モデル (model II)、二次判別分析により 12 元素 (Li、Mn、Co、Cu、Rb、Mo、Cs、Ba、Mg、P、Ca 及び Zn) の常用対数を説明変数とする判別モデル (model III) が得られた。

国産を陰性、外国産を陽性として、それぞれの判別モデルについて、偽陽性率 (国産品を誤って陽性と判別する確率) を横軸に、感度 (外国産品を陽性と正しく判別する確率) を縦軸にプロットした Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線を図 2 に示す。3 つの判別モデルの中で偽陽性率が 0.1 以下の時の感度が最も高い値をとる Model I は、特異度 (国産品を陰性と正しく判別する確率) を最大に設定したい時に最適な判別モデルといえる。また、3 つの判別モデルの中で感度が 0.99 の時の偽陽性率が最も低い値となる model II は、偽陰性率 (外国産品を誤って陰性と判別する確率) を最小に設定したい時に最適な判別モデルといえる。

判別モデルの ROC 曲線が、左上 (偽陽性率が最小 0、感度が最大 1) に最も近い位置にある model I は、特異度・感度ともに高い判別精度が得られる判別モデルである。model I について、LOOCV により得られた判別得点の度数分布を図 3 に示す。判別得点が基準値以上の場合は国産、基準値未満の場合は外国産と判別することとし、その基準値を 0 とした場合、この国産－外国産判別モデルでは、判別モデル構築に用いた試料のうち、国産試料の 93.7% (59/63)、外国産試料の 92.6% (75/81) を正しく判別した。また、偽陽性率が最小となる値 (判別得点-1.5) を基準値とした場合は、国産試料は全てを正しく判別し外国産試料は 67.9% (55/81) を正しく判別した。

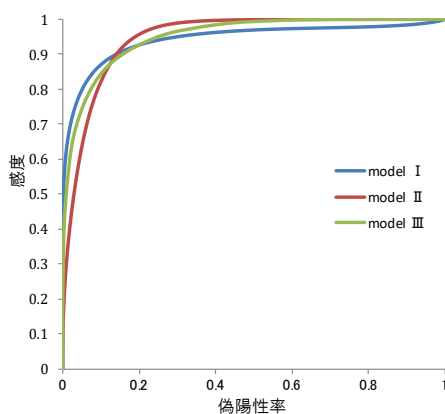


図 2 本研究で得られた判別モデルの ROC 曲線

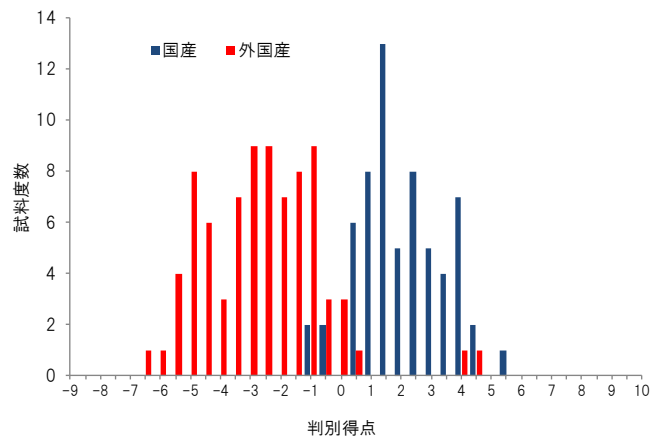


図 3 model I の判別得点の度数分布

3.4 元素濃度及び Sr 安定同位体比 の組合せによる判別の検討

国産試料 ($n = 63$) と外国産試料 ($n = 81$) の乾燥試料中元素濃度と Sr 安定同位体比を説明変数として、二次判別分析により国産－外国産判別モデルを構築した。LOOCV により得られた判別得点の度数分布を図 4 に示す。元素濃度による判別と同様に判別得点が基準値以上の場合は国産、基準値未満の場合は外国産と判別することとした。その基準値を 0 とした場合、この国産－外国産判別モデルでは、判別モデル構築に用いた試料のうち、国産試料の 95.2% (60/63)、外国

産試料の 93.8 % (76/81) を正しく判別した。また、偽陽性率が最小となる値 (判別得点-12) を基準値とした場合、国産試料は全てを、外国産試料は 88.9 % (フィリピン産 43/45、タイ産 29/36) を正しく判別し、元素濃度単独で構築した判別モデルよりも判別精度が向上した。

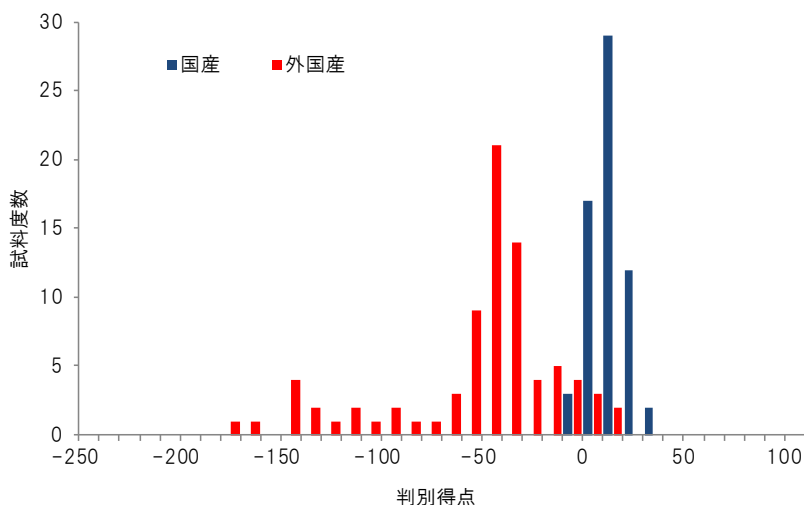


図 4 元素濃度と Sr 安定同位体比による判別得点の度数分布

4. まとめ

本研究では、元素濃度と Sr 安定同位体比を利用したオクラの原産地判別法を検討した。元素濃度を説明変数とした判別モデルを検討したところ、サポートベクターマシンにより構築した判別モデルが最も判別精度が良かった。このモデルにおける判別モデル構築用試料の的中率 (判別得点-1.5 を基準値) は、国産 100 %、外国産 67.9 %であった。元素濃度と Sr 安定同位体比を組み合わせた判別モデルを二次判別分析により構築した。偽陽性率が最小となる値 (判別得点-12) を基準値とした場合、判別モデル構築用試料の的中率は、国産 100 %、外国産 88.9 %となり元素濃度単独で構築した判別モデルと比較して判別精度が向上する結果が得られた。なお、今後、生産地や輸入先の変化などにより判別モデルの判別能力が変化していくことがあるため、定期的に由来の確かな試料を用いて、判別モデルの検証を行うことが望まれる。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、国産オクラの収集にご協力いただいた農業協同組合の皆様に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 農林水産省地域特産野菜生産状況調査 (平成26年)
- 2) 農林水産省植物検疫統計 (平成26年輸入検査数量)
- 3) 東京都中央卸売市場年報 (平成26年)
- 4) 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)

- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) Aoyama, K.; Nakano, T.; Shin, K.C.; Izawa, A.; Morita, S. : Variation of strontium stable isotoperatios and origins of strontium in Japanese vegetables and comparison with Chinese vegetables, *Food Chemistry*, **237**, 1186-1195(2017)
- 10) 石井修人, 箱田晃子, 石原敏史, 山川義正: カボチャの元素分析による原産地判別法の改良, 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**,1-7(2017)
- 11) 井伊悠介, 後藤祐之介, 石井修人, 申基澈, 陀安一郎: 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, 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, **42**,1-9(2018)
- 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) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)

新たな統計解析手法による原産地・原料原産地判別マニュアルの見直し

山川 義正, 中村 哲

Yoshimasa Yamakawa, Satoru Nakamura

要 約

農林水産消費安全技術センターにおいて食品の原産地判別のために線形的な判別モデルを採用している 6 品目について、過去のデータを活用して非線形の判別モデルの採用を検討し、再解析を実施した。その結果、一部の品目について判別能力の向上した判別モデルや検査コストを削減し得る判別モデルが得られた。

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）により、生鮮食品には名称及び原産地表示が義務付けられ、輸入品以外の加工食品においても名称、原材料名などの他に、対象原料について原産地名の表示が義務付けられている。また、特色のある原料として特定の原産地を表示している等、原産地に関する表示がなされている食品は多く、また消費者の関心も高まっている。そのため食品の原産地及び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ている。事実、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などの分析による手法が研究されており^{1)~9)}、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・運用を行っているところである^{10)~19)}。しかしながら、現代においては計算機的能力上昇や計算手法そのものが新たに登場するなど技術の進歩は著しく、加えて近年の食品の原産地への関心の高さから判別技術への要求は高まっており、より高精度な判別のために測定などの分析技術のみならず、それらの結果を解析する手法も見直す必要がある。

FAMIC では、食品の原産地判別において食品中の元素濃度と重元素安定同位体比の単独又は組み合わせにより判別するものがある。これらの判別において、平成 28 年度以前に検討されたものはその説明可能性や計算速度の問題からほとんどが線形分類器である線形判別分析(LDA)及び線形カーネルのサポートベクターマシン(SVM)を用いた解析を行ってきたところである。しかしながら、例えば外国産が複数産地から構成されている場合、直線（平面）的な判別を行う線形関数による判別が不向きな場合がある。こういった場合においては複数の判別関数を構築することで対応していたが、必ずしも判別検査の特異度・感度の向上にはつながらないことがある。また、複数の判別関数を用いた場合には最適な判別基準を設定するのが困難という問題もある。そのため新たに作成する判別法については線形的な判別に加え、二次判別分析(QDA)や非線形カーネルの SVM を導入して解析を行っており、判別精度の向上に寄与している。そこで、以前に作成された古い判別法の判別モデルに対して従前利用していたこれらの線形的な解析のみならず、非線形の解析と人工ニューラルネットワーク(ANN)を加え、総合的により適した手法を検討した。

2. 実験方法

2.1 解析データ

すでに FAMILIC において元素濃度分析のみ又は元素濃度分析にストロンチウム安定同位体比分析を併せて利用する産地判別を行っている品目において、その開発段階で線形での判別を行っているもので過去にモデル作成用に使用した元素濃度及びストロンチウム安定同位体比データが現在の解析に利用可能なものを対象とした。品目は6品目（ショウガ・アサリ・ゴボウ・乾燥ひじき（以下「ひじき」という。）・タマネギ・はちみつ）を対象として解析をした。

2.2 統計手法の探索と実装

解析に当たっては基本的な処理は中村らの方法¹⁾に従ったが、従前から導入されていた LDA、線形カーネル SVM に加え、QDA、非線形カーネル（ラジアル、多項式）SVM、ロジスティクス回帰及び ANN を導入、実装し解析に用いた。

非線形カーネルの SVM は線形での分離が不可能または困難なデータについて、より高次元の空間に射影して超平面により分離を試みるものであり、比較的説明が容易で入り組んだデータにも適用可能性があることから機械学習においても頻用される手法である。一方でパラメータによっては過適合によりモデルデータしか判別精度がでない等の状況が起きる汎用性の低下の恐れも有り、汎化性能に注意が必要である。

ANN は線形分離不可能な問題に対して、比較的小さい計算量で結果が良好なことが多いことから、近年データマイニング等で広く応用されている方法である。その特徴は活性化関数などにより決まるが、実装するにあたり、特異度や感度をカーネル密度推定から算出する現在の方法との整合性を検討し、活性化関数に Rectified Linear Unit (ReLU) を使用した ANN を実装した。

また、説明変数探索のための手法として前進（後進）ステップワイズが用いられていたが、新たに遺伝的アルゴリズム (GA) を実装した。

説明変数の探索においては Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線を描くことにより、最適となる判別モデルを選択した²⁾。ROC 曲線を描くに当たっては、国産試料を陰性試料、外国産試料を陽性試料として扱い、ROC 曲線の特定の接線の傾きの値に対して接線が最も左上になるよう、変数選択を行う。接線の傾き m は (偽陽性の損失) / (偽陰性の損失) $\times (1-p)/p$ (p : 事前確率) である。このとき、損失指標を $\alpha + \beta/m$ (α : 偽陽性率、 β : 偽陰性率) で定義でき、この値が最小になるとき ROC 曲線の接線が最も左上になる。

前進（後進）ステップワイズは一つずつ変数を追加（削除）し損失指標が最小になるものを選択していくため、ローカルミニマムに達し、変数の追加（削除）をしても損失指標の減少が得られない場合にそれ以上の探索ができなくなる。しかしながら、GA ではランダムに選ばれた変数群から損失指標の低いものから順にいくつか選び、交差や変異といった遺伝的な変化を加えて複数世代を重ねることで、最適な説明変数の探索を行い、これにより局所解に落ち込んでしまうことを防ぐことができる。

解析には統計解析向けのプログラミング言語である R 3.5.1²⁾を使用し、LDA 及び QDA においては MASS パッケージに同封された `lda` 及び `qda` 関数を、SVM においては `e1071` パッケージに同封された `svm` 関数を、また、ロジスティック回帰においては `nnet` パッケージに同封された `multinom` 関数により解析した。

2.3 データの解析

既往モデル試料における元素濃度及びストロンチウム安定同位体比のデータを変数として前述の解析手法を用いて網羅的に解析した。このとき、変数の標準不確かさから、モンテカルロ法により判別得点の不確かさを推定した。この方法では変数の標準不確かさが正規分布に従うと仮定して、乱数により濃度を変動させた時の判別得点の分散から判別得点の標準不確かさを推定している。また、Sheather & Jones の方法²²⁾によるカーネル密度推定のバンド幅及び判別得点の標準不確かさを合成したものを最終的なバンド幅として、カーネル密度推定により判別得点分布を推定した。これらから、偽陽性率と偽陰性率を元にした損失指標を算出し、これが最小となるように GA による変数選択を行った。

3. 結果及び考察

3.1 遺伝的アルゴリズムの導入効果

GA は世代を重ねることで最小の値を探索するアルゴリズムであるが、その世代ごとの値の変化を見ると（図 1）、ある世代において一度低い値を取った後にしばらく値の変化が見られなくとも、世代を進めるにつれてランダムな変異によってより低い値の組み合わせが現れる場合がある。また、前進ステップワイズにおいて計算回数は変数の数の 2 乗に比例した量となるが GA においては変数の数の定数倍に比例するため、GA の採用により大量の変数を解析する際の計算量を削減することができるようになった。

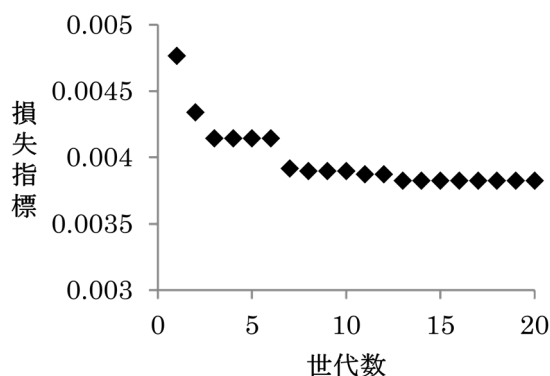


図 1 世代ごとの損失指標

ラジアルカーネル SVM におけるタマネギの損失指標（事前確率 1%）。第 3～6 世代の頃に変数の変更による変動のないローカルミニマムとなっているが、その後の世代で変異によってより低い損失の状態を発見できている。

3.2 解析方法による損失指標の違い

解析については、7 種の方法で判別式を探索した結果、各品目の損失指標は表 1、図 2 のとおりとなった。はちみつを除く全てでラジアルカーネルの SVM が最小の損失を示し、線形分類器よりも良い成績を示している。ANN においては、いくつかの品目において線形の判別よりも小さい損失を示したが、一方で品目によっては線形の判別よりも損失が大きく、必ずしも線形分類器よりも良い方法となるとは限らない。はちみつにおいては、全ての方法で一様に高い損失であり、現行の線形分類器と比べ特異に成績が向上することはなかった。

本研究においてはほとんどの品目においてラジアルカーネル SVM が好成績であったが、他の方法の成績を比較すると、その優劣は一樣ではない。これは、モデル試料のデータの複雑さや構造の違いによるものであると考えられる。それぞれの解析方法は適したデータ構造があり、例えば LDA では一樣な分布を前提としているなど十分な性能を得るためには最適な方法がある。複雑な判別曲線を描くことのできる非線形の SVM や ANN に関しても、様々なデータに対応するために各種カーネルや活性化関数が存在し、また、直線的な分離が十分可能なデータについては線形分類器が最適な場合も存在しうる。したがって、新たな品目を検討する場合には全ての方法に

ついて引き続き網羅的に検討することが必要である。

表1 解析方法ごとの各品目の損失指標

解析方法	品目					
	ショウガ	ひじき	アサリ	ゴボウ	タマネギ	はちみつ
線形カーネルSVM	0.0173	0.0061	0.0058	0.0006	0.0075	0.0141
ラジアルカーネルSVM	0.0058	0.0027	0.0048	0.0003	0.0054	0.0149
多項式カーネルSVM	0.0071	0.0061	0.0105	0.0049	0.0070	0.0128
LDA	0.0101	0.0055	0.0072	0.0006	0.0072	0.0136
QDA	0.0082	0.0048	0.0070	- ^{a)}	0.0075	0.0160
ロジスティック回帰	0.0074	0.0046	0.0061	0.0034	0.0084	0.0158
ANN	0.0062	0.0051	0.0066	0.0016	0.0081	0.0148

注)損失指数は全て事前確率2%を想定して計算した。

a)システム上解析できなかったため欠損値とした。

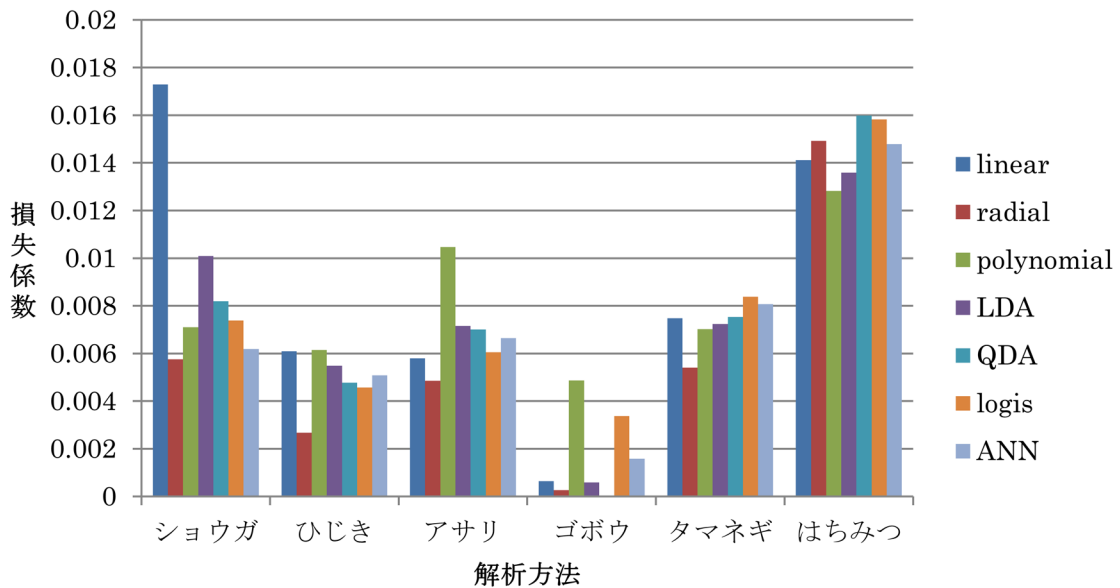


図2 解析方法ごとの各品目の損失指標

線形カーネルSVM(linear)、ラジアルカーネルSVM(radial)、多項式カーネルSVM(polynomial)、線形判別分析(LDA)、二次判別分析(QDA)、ロジスティック回帰(logis)及び人工ニューラルネットワーク(ANN)を解析方法としたときの各品目の損失指標。

3.3 判別モデルの作成

ほとんどの品目で最小の損失指標を示したラジアルカーネルSVMを用いて作成した各品目の判別モデルについて、得られた新しいモデルを使った判別(新規法)及び各品目の従来の判別方式(旧法)の現行の運用における事前確率においての特異度、感度、説明変数の数、判別式の数及びストロンチウム安定同位体比分析値(SrIR)の利用の有無について表2に示す。

損失指標の比較でショウガ及びひじきにおいて、ラジアルカーネルのSVMが線形分類器の結果と有意な違いがあったにもかかわらず、旧法と比較してほとんど違いがないか、感度の低下を引き起こしている。これは旧来の方法では、判別精度を向上させるために二つの判別式を組み合わせる手法を採用しているためである。こういった判別モデルの組み合わせの場合にはその判別の基準値の設定は複雑となるため、モデルが現在の試料に適合するかの評価とモデル修正が難し

表2 新旧の方法での判別式の性能

品目	新/旧 ^{a)}	特異度	感度	変数の数	判別式の数	SrIR
ショウガ	新	99.96	75.9	2	1	有
	旧	99.93	76.1	4	2	有
アサリ	新	97.8	95	20	1	
	旧	97.8	94.2	6	1	
ひじき	新	99.99	87.34	13	1	
	旧	99.94	88.5	7	2	
ゴボウ	新	99.99	99.08	11	1	有
	旧	99.9	71.2	6	1	
はちみつ	新	98.7	71.8	4	1	
	旧	98.9	77.1	7	1	
タマネギ	新	99.96	69.5	15	1	
	旧	99.94	62.8	9	2	

a)ラジアルカーネルSVMを使用した方法を新規法(新)、線形的な判別を用いているこれまで用いていた方法を旧法(旧)とした。

くなる。一方で新規法ではわずかな感度低下はあるものの単一モデルでの判別を可能としたためモデルの検証及び修正が効率的に可能となる。

ゴボウとタマネギにおいては判別精度の向上が見られた。ゴボウは元素分析による判別とストロンチウム安定同位体比による判別の二つの方法があったが新規法においては単一モデルとして運用できる。タマネギも二つの判別式により判別していたところを単一のモデルとできるが、ゴボウと比較し判別精度の向上は小さい。

アサリは性能の向上がほとんどなく変数が増大しており、はちみつは従来の線形での判別の方が有利となっている。これらの品目については、非線形の判別法が線形の判別に比べて優位とはならなかった。

3.4 採用の検討

特異度や感度の向上した品目（ゴボウ及びタマネギ）については現在の流通品とモデルの整合性についての追加検討が必要ではあるが、今回のモデルを利用すれば判別精度の向上が期待できる。また、ショウガとゴボウについては、元素分析とストロンチウム安定同位体比分析の二種類の分析を単一モデルにできている。これらについては、そのうち一種類の分析値（通常はコストの低い元素分析）の変数を抜き出したモデルを作成することが可能である。このモデルは元のモデルから大きく判別性能が低下することは免れないが、目的によって感度あるいは特異度に大きく特化した判別基準を採ることによりスクリーニング判別として利用が可能なため検査の時間削減とコスト削減に大きく寄与しうる。ショウガでは判別精度の向上はないものの、これらの運用上の利点から新たな判別モデルの採用は十分に利点がある。

4. まとめ

FAMIC においては多くの品目で元素濃度分析及びストロンチウム安定同位体比分析による産地判別法を運用してきたが、新しい解析手法の導入がされ、効果を上げていることから、さらなる手法の導入と過去に作成されてきた判別法についても新たな解析手法による性能向上が期待されていた。このため、新たに変数探索のために遺伝的アルゴリズムを、また解析法として人工ニ

ューラルネットワークを導入した。これによってより多くの解析手法により判別モデルの検討が可能になった。また、過去のデータの解析から、ラジアルカーネル SVM による判別によってゴボウとタマネギについて判別精度の向上が見込まれる判別モデルが得られ、またショウガとゴボウについては検査コスト低減等の利点のある判別モデルが得られた。

文 献

- 1) 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, 日本土壤肥料学雑誌, **76**(6), 875-880(2005)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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食品関係等調査研究報告, **37**, 1-10 (2013)
- 12) 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)
- 13) 船木紀夫, 服部賢志, 木村康晴, 佐藤耕一, 塚田政範, 津村明宏, 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)
- 14) 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)
- 15) 石井修人, 箱田晃子: 原木栽培乾しいたけの元素分析及び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)
- 16) 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)

- 17) 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)
- 18) 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開発, 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)
- 19) 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)
- 20) Zweig, M. H. and Campbell, G., Receiver-Operating Characteristic (ROC) Plots: A Fundamental Evaluation Tool in Clinical Medicine. *Clin. Chem.*, **39**, 561-577(1993)
- 21) R Foundation (<http://www.r-project.org/>)
- 22) Sheather, S. J. and Jones, M. C. : A reliable data-based bandwidth selection method for kernel density estimation. *Journal of the Royal Statistical Society series B*, **53**, 683-690 (1991).

DNA分析における分析時間短縮についての検討

澤田 桂子¹, 豊田 正俊¹, 高嶋 康晴²

Keiko Sawada, Masatoshi Toyoda, Yasuharu Takashima

要 約

魚種判別法等のDNA分析については、DNA抽出、PCR、制限酵素処理、電気泳動、DNAシーケンス法による判別など、複数の工程があるが、今回、マグロ属の魚種判別法を対象に、複数工程を通した迅速化の検討を行ったところ、一連の工程を合わせて分析時間を50%程度削減することが可能であった。

1. 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）では、魚種判別法等のDNA分析を行っているが、DNA抽出、PCRによる増幅、制限酵素処理、電気泳動、DNAシーケンス法による判別など、複数の工程があり、結果が出るまでに時間を要している。現在までに、FAMICでは、DNA分析における分析時間短縮のため、簡易DNA抽出法の検討¹⁾など、1工程ごとの迅速化の検討を行ってきたが、複数工程の一連の迅速化検討は行っていなかった。

FAMICで実施しているマグロ属の魚種判別法は、マグロ属のDNA解析の報告^{2)~4)}を基にして、FAMICがDNA分析を開始した初期に導入したものであり、PCR反応に3時間を要するなど、近年開発した他のDNA分析法と比較すると分析時間を要している。

そこで今回は、マグロ属の魚種判別法を対象に、工程ごとに分析時間の短縮化を検討した。

マグロ属の魚種判別法の概要について述べる。マグロ試料からDNAを抽出し、抽出したDNA溶液を鋳型として、マグロ属のミトコンドリアDNAのATPase 6遺伝子の一部からcytochrome c oxidase subunit III (COIII) 遺伝子の一部にまたがる領域(以下「ATCO領域」という。)の915bpを増幅するプライマー²⁾を用いてPCRを行う。得られたPCR産物を制限酵素で処理し、断片長パターンの違いによりマグロ属の魚種を判別する。試料が想定と異なるDNA断片長パターンであった場合には、ミトコンドリアDNAのATCO領域のDNA配列を決定し、各魚種に特有な配列と比較することで判別している。

ただし、クロマグロ(大西洋産)ではビンナガのミトコンドリアDNAと同じ配列を持つ個体が存在することが報告されている⁵⁾ため、クロマグロと想

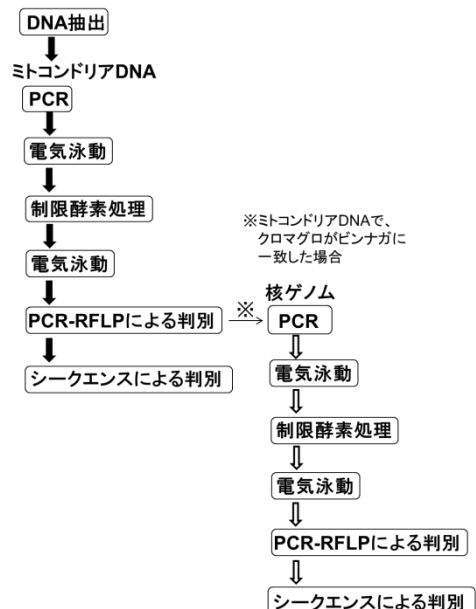


図1 判別法のフローチャート

¹独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

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

定された試料で、DNA断片長パターンがビンナガに一致した場合には、核DNAのミオグロビン遺伝子の一部領域の529 bpを増幅するプライマーを用いてPCRを行い、得られたPCR産物を制限酵素で処理し、DNA断片長パターンの違いによりクロマグロとビンナガの両魚種を判別する。DNA断片長パターンにより判別できない場合は、シーケンスで核DNAのミオグロビン遺伝子のDNA配列を解析し、クロマグロとビンナガに特有な配列を確認することで判別している。なお、核DNAの遺伝子領域について「太平洋産クロマグロ」と「大西洋産クロマグロ」を比較した報告³⁾⁶⁾⁷⁾はあるが、いずれの遺伝子領域も塩基配列は近似しており、ミトコンドリアDNAのような差異のある遺伝子領域の知見は得られていない。

これらの工程において、DNA抽出における簡易抽出法、PCR反応におけるプライマーの変更及びDNA合成酵素の変更、制限酵素試薬の変更、サイクルシーケンスのSTeP⁹⁾法の導入を検討し、判別法全体の分析時間の短縮化を図ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

対象魚種はマグロ属の太平洋産クロマグロ（クロマグロ；*Thunnus orientalis*）、大西洋産クロマグロ（タイセイヨウクロマグロ；*T.thynnus*）、ミナミマグロ（*T.maccoyii*）、メバチ（*T.obesus*）（ α 及び β タイプ）、キハダ（*T.albacares*）、ビンナガ（*T.alalunga*）とした⁸⁾。生鮮品の部位については赤身、トロ及びハラモを用いた。加工品については、表面を軽く炙っているたたき、みりん漬及び茹でたものを用いた。

2.2 機器

PCR及び制限酵素処理には、サーマルサイクラーGeneAmp[®] PCR System 9700（Thermo Fisher Scientific）又は9700 シミュレーションモードに設定したProFlex[™] PCR System（Thermo Fisher Scientific）を用いた。DNAシーケンサーは、Applied Biosystems[™] 3130xl ジェネティックアナライザ（Thermo Fisher Scientific）を用いた。

2.3 DNA抽出

マグロ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。

2.3.1 通常法

DNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN）を用い、製品の添付プロトコールに従った。

2.3.2 迅速法

簡易DNA抽出法では、1試料につきテイル溶解液を100 μ L、プロテイナーゼK溶液（関東化学）を7.5 μ L、ジルコニアボール1個を加えた。インキュベーターを用いて56 $^{\circ}$ Cで10分間程度保温し、その間、ジルコニアボールが上下に動くよう、試験管ミキサーで適宜かくはんし、試料をほぼ完全に溶解させた。その後、インキュベーターを用いて85 $^{\circ}$ Cで10分間加温し、プロテイナーゼKを失活させた。卓上小型遠心機で10秒程度遠心し、残渣を沈殿させた。その後、浮遊物等がある場合はできる限り採取しないよう上清を採取し、上清を滅菌水で50倍に希釈した。また、既報⁹⁾による簡易DNA抽出液も使用できることを確認するために併せて用意した。

2.4 ミトコンドリア DNA の PCR

2.4.1 通常法

通常法の PCR には、フォワードプライマー L8562 及びリバースプライマー H9432 を用いた (表 1)。プライマーは、株式会社ファスマックでオリゴ DNA を合成し、逆相カラムで精製したものをを用いた (以下のプライマーも同じ)。

PCR 反応液は、3.75 U DNA 合成酵素 AmpliTaq Gold® (Thermo Fisher Scientific) を含み、最終濃度が 1× PCR Buffer II (AmpliTaq Gold® 添付試薬)、0.2 mmol/L dNTP (AmpliTaq Gold® 添付試薬)、1.5 mmol/L MgCl₂ (AmpliTaq Gold® 添付試薬)、各プライマー 0.5 μmol/L となるように混合し、5 μL の抽出 DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を 50 μL とした。

PCR の温度条件は、最初の熱変性として 95 °C・8 分の後、熱変性 94 °C・1 分、アニーリング 53 °C・1 分、伸長反応 71 °C・1 分 30 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル後、最後の伸長反応を 71 °C・7 分で行った。

2.4.2 迅速法

迅速法の PCR には、ビンナガの増幅効率を考慮して通常法のプライマーを改良したフォワードプライマー L8562-kai 及びリバースプライマー H9432-kai を用いた (表 1)。

PCR 反応液は、0.3 U DNA 合成酵素 KOD FX Neo (東洋紡) を含み、最終濃度が 1× PCR Buffer for KOD FX Neo、0.4 mmol/L dNTPs Mixture (KOD FX Neo 添付試薬)、各プライマー 0.3 μmol/L となるように混合し、1.5 μL の抽出 DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を 15 μL とした。

PCR の温度条件は、最初の熱変性として 94 °C・2 分の後、熱変性 98 °C・3 秒、アニーリング 53 °C・3 秒、伸長反応 68 °C・15 秒を 1 サイクルとして 35 サイクルで行った。

表 1 ミトコンドリア DNA の PCR 及びシーケンスに使用するプライマーの配列

用途	プライマー名	向き	配列
ミトコンドリア DNA (通常法)	L8562	F	CTTCGACCAATTTATGAGCCC
	H9432	R	GCCATATCGTAGCCCTTTTTG
ミトコンドリア DNA (迅速法)	L8562-kai	F	CTTTGACCAATTTATGAGCCC
	H9432-kai	R	ACCATATCGGAGACCTTTTTG
ミトコンドリア DNA (通常法及び迅速法) ※シーケンスで追加	L8526tuna-ATP6	F	GTACTAATTGTCATCGAAACAAT
	H8548tuna-ATP6	R	GGTCGGATGAATAAGCTAA

2.5 ミトコンドリア DNA の制限酵素処理

2.5.1 通常法

3 種類の制限酵素すなわち AluI (Thermo Fisher Scientific) を 5.0 U、MseI (New England BioLabs) 又は TruII (Thermo Fisher Scientific) を 2.5U、Tsp509I (TasI) (Thermo Fisher Scientific) を 2.5U 使用した。

制限酵素反応液は、2.4.1 で調製した PCR 産物 10 μL に制限酵素と緩衝液、滅菌水を加えて全量を 20 μL とした。制限酵素処理は、AluI 制限酵素反応液及び MseI 制限酵素反応液は 37 °C で、TruII 制限酵素反応液及び Tsp509I (TasI) 制限酵素反応液は 65 °C で各 1 時間 30 分以上処理を行った。

2.5.2 迅速法

3種類の制限酵素すなわち AluI (Thermo Fisher Scientific)を 3.0 U、FastDigest TruII (Thermo Fisher Scientific)を 1 μ L 及び FastDigest TasI (Thermo Fisher Scientific)を 1 μ L 使用した。

制限酵素反応液は、2.4.2 で調製した PCR 産物 2 μ L に制限酵素と緩衝液、滅菌水を加えて全量を 10 μ L とした。制限酵素処理は、AluI 制限酵素反応液については 37 $^{\circ}$ C で 15 分、FastDigest TruII 及び FastDigest TasI 制限酵素反応液については 65 $^{\circ}$ C で 5 分処理を行った。

2.6 ミトコンドリア DNA のゲル電気泳動

ゲル電気泳動には、エチジウムブロマイド (ニッポンジーン) を 0.5 μ g/mL 含むアガロースゲル (Agarose L03 (タカラバイオ)) を用い、ゲル濃度は通常法は 3.0 % (w/v)、迅速法は 3.5 % (w/v) とした。電気泳動緩衝液は、1 \times TAE 緩衝液 (ニッポンジーン) を用いた。

2.7 ミトコンドリア DNA の塩基配列解析

塩基配列決定はダイレクトシーケンス法によって行った。DNA 塩基配列の解析には、遺伝子情報処理ソフトウェア GENETYX[®] ver.12 (ゼネティックス) を用いた。

2.7.1 通常法

PCR 産物の精製には illustra[™] ExoProStar[™] (GE Healthcare) を用いた。エキソヌクレアーゼ I 1 μ L、アルカリフォスファターゼ 1 μ L 及び滅菌水 3 μ L を混合後、PCR 後の反応液 5 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 15 分間処理した後、80 $^{\circ}$ C で 15 分間加熱し、酵素を不活性化した。

サイクルシーケンス反応には、BigDye[®] Terminator v3.1 Ready Reaction Mix 2 μ L、BigDye[®] Sequencing Buffer (5 \times) 3 μ L (いずれも Thermo Fisher Scientific) に、最終濃度が 0.15 μ mol/L となるように L8562、H9432、L8526tuna-ATP6 又は H8548tuna-ATP6 プライマー (表 1) を混合し、これに 10 ng/ μ L に調製した精製 PCR 産物 2 μ L を加え、滅菌水で全量を 20 μ L とした。PCR の温度条件は、最初の熱変性として 94 $^{\circ}$ C \cdot 1 分の後、熱変性 94 $^{\circ}$ C \cdot 20 秒、アニーリング 50 $^{\circ}$ C \cdot 15 秒、伸長反応 60 $^{\circ}$ C \cdot 4 分を 1 サイクルとして 25 サイクルで行った。

サイクルシーケンス後の余剰な蛍光色素の除去は、エタノール沈殿により行った。シーケンス反応物 20 μ L に 125 mM EDTA を 5 μ L 添加後、エタノール (99.5 %以上) を 60 μ L 添加し、かくはん後、室温で 15 分間静置した。室温、2000 \times g で 45 分間遠心後、96 well Plate を上下反転させて、最大 185 \times g でスピンドウンし、ウェル内の液を廃棄した。さらに、各ウェルに 70 %エタノールを 60 μ L 添加後、室温、1700 \times g で 15 分間遠心した。最大 185 \times g でスピンドウンし、ウェル内の液を廃棄した。

エタノールが気化してから、Hi-Di Formamide (Thermo Fisher Scientific) を 20 μ L 添加し、95 $^{\circ}$ C で 2 分間加温後、4 $^{\circ}$ 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解析した。

2.7.2 迅速法 (STeP 法)

PCR 産物の精製には、illustra[™] ExoProStar[™] を用い、通常法の半量で実施した。また、ExoSAP-IT[™] PCR Product Cleanup Reagent 又は ExoSAP-IT[™] Express PCR Product Cleanup Reagent (いずれも Thermo Fisher Scientific) を用いた場合は、エキソヌクレアーゼ I 及びアルカリフォスファターゼが混合された ExoSAP-IT[™] 1 μ L 及び滅菌水 1.5 μ L を混合後、PCR 後の反応液 2.5 μ L を加え反応させた。ExoSAP-IT[™] PCR Product Cleanup Reagent は 37 $^{\circ}$ C で 15 分間処理した後、80 $^{\circ}$ C で 15 分間加熱し、ExoSAP-IT[™] Express PCR Product Cleanup Reagent は 37 $^{\circ}$ C で 4 分間処理した後、80 $^{\circ}$ C で 1 分間加熱し、酵素を不活性化した。

サイクルシーケンス反応は、STeP法⁹⁾を参照して行った。BigDye[®] Terminator v3.1 Ready Reaction Mix 0.5 μ L、BigDye[®] Sequencing Buffer (5 \times) 2.0 μ Lに、最終濃度が0.15 μ mol/LとなるようにL8562-kai、H9432-kai、L8526tuna-ATP6又はH8548tuna-ATP6 (表1) を混合し、これに約5 ng/ μ Lに調製した精製PCR産物1 μ Lを加え、滅菌水で全量を10 μ Lとした。サイクルシーケンス反応の温度条件は、最初の熱変性として96 $^{\circ}$ C \cdot 1分の後、熱変性96 $^{\circ}$ C \cdot 10秒、アニーリング50 $^{\circ}$ C \cdot 5秒、伸長反応60 $^{\circ}$ C \cdot 1分15秒を1 サイクルとして15 サイクル、熱変性96 $^{\circ}$ C \cdot 10秒、アニーリング50 $^{\circ}$ C \cdot 5秒、伸長反応60 $^{\circ}$ C \cdot 1分30秒を1 サイクルとして5 サイクル、熱変性96 $^{\circ}$ C \cdot 10秒、アニーリング50 $^{\circ}$ C \cdot 5秒、伸長反応60 $^{\circ}$ C \cdot 2分を1 サイクルとして5 サイクルで行った。

サイクルシーケンス後の余剰な蛍光色素の除去は、エタノール沈殿により通常法の半量で実施した。Hi-Di Formamide を10 μ L 添加し、95 $^{\circ}$ C で2分間加温後、4 $^{\circ}$ 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解析した。

2.8 核 DNA の PCR

2.8.1 通常法

プライマーは、フォワードプライマーTunaMyoF及びリバースプライマーTunaMyoR (橋本ら・未公表) を用いた。

PCR 反応液は、0.5 U DNA 合成酵素*TaKaRa Ex Taq[®] HS* (タカラバイオ) を含み、最終濃度が1 \times *Ex Taq Buffer*、0.2 mmol/L dNTP Mixture (*TaKaRa Ex Taq[®] HS*添付試薬)、各プライマー0.25 μ mol/L となるように混合し、2 μ L の抽出DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を20 μ L とした。

PCR の温度条件は、最初の熱変性として94 $^{\circ}$ C \cdot 1分の後、熱変性94 $^{\circ}$ C \cdot 30秒、アニーリング60 $^{\circ}$ C \cdot 30秒、伸長反応72 $^{\circ}$ C \cdot 30秒を1 サイクルとして35 サイクル、最後の伸長反応を72 $^{\circ}$ C \cdot 7分で行った。

2.8.2 迅速法

迅速法には、上記通常法と同じプライマーであるTunaMyoF及びTunaMyoRを用いた。

PCR 反応液は、0.3 U DNA 合成酵素KOD FX Neoを含み、最終濃度が1 \times PCR Buffer for KOD FX Neo、0.4 mmol/L dNTPs Mixture (KOD FX Neo 添付試薬)、各プライマー0.3 μ mol/L となるように混合し、1.5 μ L の抽出DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を15 μ L とした。

PCR の温度条件は、最初の熱変性として94 $^{\circ}$ C \cdot 2分の後、熱変性98 $^{\circ}$ C \cdot 10秒、アニーリング60 $^{\circ}$ C \cdot 30秒、伸長反応68 $^{\circ}$ C \cdot 30秒を1 サイクルとして35 サイクルで行った。

2.9 核 DNA の制限酵素処理

2.9.1 通常法

制限酵素はPvuII (Thermo Fisher Scientific)を2.5 U 使用した。制限酵素反応液は、PCR 産物7.5 μ L に制限酵素と緩衝液、滅菌水を加えて全量を20 μ L とした。制限酵素処理は、37 $^{\circ}$ C で1時間処理を行った。

2.9.2 迅速法

制限酵素はFastDigest PvuII (Thermo Fisher Scientific)を1 μ L 使用した。制限酵素反応液は、PCR 産物を生鮮品は2 μ L、加工品は5 μ L に制限酵素と緩衝液、滅菌水を加えて全量を10 μ L とした。制限酵素処理は、37 $^{\circ}$ C で5分処理を行った。

2.10 核 DNA のゲル電気泳動及び塩基配列解析

シーケンス用のプライマーは、TunaMyoF 及び TunaMyoR を用い、その他の操作は、2.6 及び 2.7 のミトコンドリア DNA と同様に行った。

3. 結果及び考察

3.1 DNA 抽出法

迅速法の簡易 DNA 抽出法では、既報法¹⁾を改変して溶解液量を 1/4 へ変更し、ジルコニアボールを加えて試験管ミキサーで適宜かくはんすることで、溶解時間を既報法¹⁾の 40 分以上から 10 分程度へ短縮することができ、迅速な簡易 DNA 抽出が可能であった (16 点)。なお、既報法¹⁾による簡易 DNA 抽出液 (DNA 濃度は迅速法の 1/4 濃度に相当) の場合 (14 点) や通常法のキットで抽出した DNA 溶液 (7 点) についても、以降の迅速法に使用可能であった。

3.2 ミトコンドリア DNA の PCR-RFLP 法

3.2.1 迅速法用 PCR プライマーの設計

通常法のキットで抽出した DNA (7 点) を用い、DNA 合成酵素を AmpliTaq Gold[®]から増幅効率の良い KOD FX Neo へ変更し、KOD FX Neo の製品の添付 PCR プロトコルを参照して通常法のプライマーセットにて PCR 増幅を行ったが、他種のマグロに比べてビンナガの PCR 増幅効率が悪かった。PCR の増幅効率が 1 種のみ異なる場合、PCR の迅速化の妨げとなるため、PCR 増幅が悪いビンナガにも適するようプライマー配列の一部を変更した。なお、塩基の種類のみの変更のため、増幅長や制限酵素の切断パターンは通常法のプライマーセットと同じである。改変したプライマーで KOD FX Neo により PCR 増幅を行ったところ、6 種 7 タイプで同等に PCR 増幅が得られたため、以降の検討は改変したプライマーを用いることにした。

(a) フォワードプライマー		10	20	30	40																																			
プライマー-通常法	C	T	T	C	G	A	C	C	A	A	T	T	T	A	T	G	A	G	C	C	C																			
プライマー-迅速法	C	T	T	T	G	A	C	C	A	A	T	T	T	A	T	G	A	G	C	C	C																			
太平洋産クロマグロ	C	T	T	T	G	A	C	C	A	A	T	T	T	A	T	G	A	G	C	C	C	T	G	T	T	T	C	C	T	A	G	G	C	A	T	T	C	C	T	40
大西洋産クロマグロ	40
ミナミマグロ	40
メバチ α タイプ	40
メバチ β タイプ	40
キハダ	40
ビンナガ	40
(b) リバースプライマー		890	900	910																																				
プライマー-通常法(相補鎖)				C	A	A	A	A	G	G	G	C	T	A	C	G	A	T	A	T	G	G	C																	
プライマー-迅速法(相補鎖)				C	A	A	A	A	G	G	T	C	T	C	C	G	A	T	A	T	G	G	T																	
太平洋産クロマグロ	A	C	A	C	C	C	C	T	C	C	T	G	T	C	C	A	A	A	A	G	G	T	C	T	C	C	G	A	T	A	T	G	G	T		915				
大西洋産クロマグロ	.	Y	915		
ミナミマグロ	.	T	915			
メバチ α タイプ	915			
メバチ β タイプ	915			
キハダ	.	T	915			
ビンナガ	Y	.	.	.	915		

図 2 プライマー配列及びマグロ属 6 種 7 タイプの配列

プライマー迅速法について、変更した塩基部分を赤字で示した。

3.2.2 迅速法による PCR

3.2.1 で改変したプライマーと、不純物の多い DNA においても増幅効率の良い DNA 合成酵素である KOD FX Neo を用いた 2.4.2 の条件により、3.1 の DNA 溶液 37 点について迅速法による PCR を行ったところ、通常法の 3 時間に対し、45 分間で PCR 増幅することが可能であった。

3.2.3 迅速法による制限酵素処理

迅速法による制限酵素処理後の電気泳動像を図 3 に示す。PCR 産物 37 点の制限酵素処理時間は通常法の 1 時間 30 分以上に対し、AluI は 15 分間、FastDigest TruI 及び FastDigest TasI は 5 分間で処理することが可能であった。

また、FastDigest 制限酵素で処理を行う際、電気泳動用の色素が添加されている Green Buffer (FastDigest 制限酵素添付品) を用いることで、電気泳動時の制限酵素処理溶液と色素の混合操作がなくなることから、より迅速に電気泳動を行うことができた。

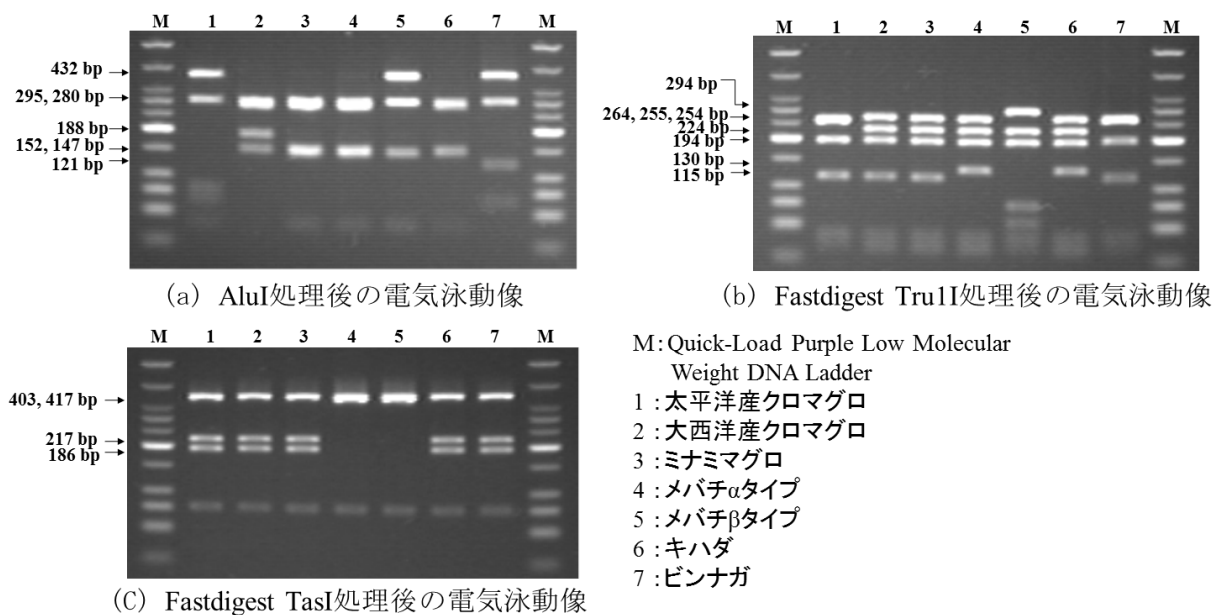


図 3 迅速法による制限酵素処理後の電気泳動像

なお、AluI について、FastDigest AluI (Thermo Fisher Scientific) を用いた場合も同じ 15 分間の処理であり、時間短縮のメリットはなかった。また、FastDigest TruI 及び FastDigest TasI について、試薬のコストを優先して通常法で用いる制限酵素 MseI、TruI 及び Tsp509I (TasI) で処理を行った場合、PCR 産物 2 μL に対し各 2U の使用により 15 分間で切断可能であった。

3.2.4 制限酵素の種類削減

現在行っている魚種の判別では、表示された魚種にかかわらずすべての試料において、制限酵素を 3 種類使用している。FAMIC では試料が想定とは異なる DNA 断片長パターンとなった場合は、次に DNA シークエンスにより判別を行っている。そこで、分析時間短縮のため、想定される魚種により使用する制限酵素の削減を検討した (表 2)。

表2 マグロ6種7タイプの基本のDNA断片長パターン

制限酵素	太平洋産 クロマグロ	大西洋産 クロマグロ	ミナミ マグロ	メバチ α タイプ	メバチ β タイプ	キハダ	ビンナガ
AluI	A	B	C	C	D	C	E
MseI (TruI)	A	B	B	C	D	C	A
Tsp509I (TasI)	A	A	A	B	B	A	A

制限酵素の使用例として、想定される魚種が太平洋産クロマグロ、大西洋産クロマグロ、メバチ β タイプ及びビンナガの場合は AluI のみの使用で、想定される魚種であるか否かの判別が可能である。このとき、太平洋産クロマグロ及び大西洋産クロマグロがビンナガと判別された場合は、クロマグロ（太平洋産又は大西洋産）ではビンナガのミトコンドリア DNA と同じ配列を持つ個体が存在することから核 DNA 分析を行う。同様に、ミナミマグロは AluI 及び MseI (TruI) を、メバチ α タイプ又は β タイプは Tsp509I (TasI) を、キハダは MseI (TruI) 及び Tsp509I (TasI) を使用することで、想定される魚種であるか否かの判別が可能である。これにより制限酵素処理を3種類から1又は2種類へ削減することが可能になった。

3.3 核 DNA の PCR-RFLP

簡易抽出した DNA（迅速法5点及び既報法¹⁾3点）及び通常法のキットにより抽出した DNA（2点）を用いて迅速法により PCR を行ったところ、いずれも PCR 増幅が可能であった。核 DNA はミトコンドリア DNA と比べて PCR 増幅効率が悪く、PCR 増幅の時間は通常法に要する1時間26分に比べて迅速法は1時間11分と15分のみの短縮となった。簡易 DNA 抽出法において、DNA 合成酵素に *TaKaRa Ex Taq*[®] HS を用いた場合、通常は PCR のサイクル数を増やす必要があり増幅時間は長くなるが、迅速法に KOD FX Neo を用いたことでサイクル数を増やす必要はなかった。また、制限酵素処理時間も通常法の1時間に対し FastDigest PvuII では5分間で処理することが可能であった。なお、試薬のコストを優先して通常法で用いる PvuII で処理を行った場合、PCR 産物 2 μ L に対し 2U の使用により 15分間で切断された。

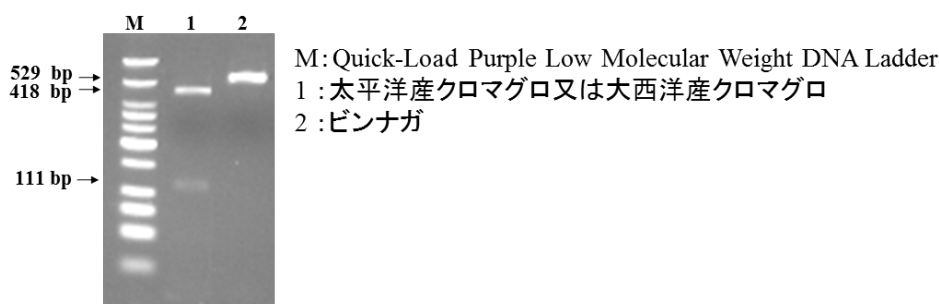


図4 FastDigest PvuII 処理後の電気泳動像

3.4 STeP 法による塩基配列決定

サイクルシーケンシングにおける STeP 法⁹⁾とは、伸長反応の時間を3段階（1分15秒→1分30秒→2分）で徐々に長くすることで、全反応時間を2.5時間から1時間程度へ短縮化できる方法であり、反応時間の短縮化だけでなく、BigDye[®] Terminator v3.1 Ready Reaction Premix の使用量が1/4量となる利点もある方法である。

今回、STeP 法でミトコンドリア DNA を対象に簡易抽出 DNA（迅速法13点及び既報法¹⁾13点）を各4プライマーで、また、核 DNA を対象に簡易抽出 DNA（迅速法3点及び既報法¹⁾3点）及

び通常法によるキット抽出 DNA (2 点) を各 2 プライマーで分析した結果、解析は可能であった。

また、FAMIC の調査研究において、STeP 法はマグロ以外の米、大豆及びコンブのシーケンスを行った際にも使用可能であった (未公表データ) ことから、他品目にも拡大することが可能と考えられた。

3.5 サイクルシーケンス後の精製

エタノール精製の他、BigDye® XTerminator™ Purification Kit の製品の添付プロトコールによるシーケンス反応物の精製も可能であった。エタノール精製は 1 時間 30 分程度を要するが、BigDye® XTerminator™ Purification Kit では 30 分程度で精製可能であり、1 回の分析試料数が少ない場合には有用であった。

3.6 分析に要する時間

マグロについて 1 点ずつ分析した場合、DNA 抽出、ミトコンドリア DNA の PCR、制限酵素処理及び電気泳動 (PCR-RFLP 分析) で判別を行う場合は、分析に要する時間が通常法の 17.9 時間から迅速法では 8.3 時間となり、分析時間が 54.0 %削減された。ミトコンドリア DNA の PCR-RFLP 分析に加えて、ミトコンドリア DNA のシーケンスにより判別を行う場合は、分析に要する時間が 28.4 時間から 14.7 時間となり、分析時間が 48.4 %削減された。また、ミトコンドリア DNA の PCR-RFLP 分析に加えて、核 DNA の PCR-RFLP 分析を行う場合は分析に要する時間が 25.8 時間から 15.0 時間となり 42.1 %削減された (表 3)。

表 3 1 点あたりの分析時間概算

工程	時間			
	通常法	迅速法	削減時間	削減率 (%)
DNA抽出	3.5 時間	0.8 時間	2.7 時間	76.2
ミトコンドリアDNA PCR(電気泳動含む)	5.8 時間	3.4 時間	2.3 時間	40.6
ミトコンドリアDNA 制限酵素処理(電気泳動含む)	8.7 時間	4.0 時間	4.7 時間	53.8
ミトコンドリアDNA シークエンス(精製時間を含む)	10.5 時間	6.4 時間	4.1 時間	39.0
核DNA PCR+制限酵素処理(電気泳動含む)	7.9 時間	6.7 時間	1.2 時間	15.2
ミトコンドリアDNA DNA抽出+PCR+制限酵素処理	17.9 時間	8.3 時間	9.7 時間	54.0
ミトコンドリアDNA DNA抽出+PCR+制限酵素処理+シーケンス	28.4 時間	14.7 時間	13.8 時間	48.4
ミトコンドリアDNA DNA抽出+PCR+制限酵素処理 核DNA PCR+制限酵素処理	25.8 時間	15.0 時間	10.9 時間	42.1
ミトコンドリアDNA DNA抽出+PCR+制限酵素処理 核DNA PCR+制限酵素処理+シーケンス	36.3 時間	21.4 時間	15.0 時間	41.2

4. まとめ

マグロ属の種判別法を用いて、DNA 分析の一連の工程 (DNA 抽出、PCR、制限酵素処理、制限酵素処理後の電気泳動、DNA シークエンス等) を通じた迅速化の検討を行った。簡易 DNA 抽出法の溶解操作の工夫、プライマーや DNA 合成酵素の変更による PCR 反応時間の短縮、FastDigest 制限酵素の使用や制限酵素使用数の削減等による分析時間の短縮、STeP 法によるシーケンス反応時間の短縮の検討を行い、DNA 分析の一連の工程を通じた分析時間が 50 %程度削減された。

今回の迅速化を検討した DNA 分析に係るそれぞれの工程は、他品目の DNA 分析の各工程に適宜組み合わせ導入することが可能であるため、他の品目の分析時間の短縮にも効果があると考えられた。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、マグロの魚種判別法についてご指導いただきました国立研究開発法人水産研究・教育機構 山下倫明氏、張成年氏、柳本卓氏、DNA分析の迅速法の検討につきまして、シーケンスの STeP 法等をご助言頂きました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（現 農林水産省 消費・安全局）岸根雅宏氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 井伊悠介, 小岩智宏, 足立静香 : 水産物からの簡易 DNA 抽出の検討, 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**, 33-41 (2017)
- 2) Chow S. and Inoue S.: Intra-and interspecific restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of Thunnus tuna species: *Bull. Nat. Res. Inst. Far Seas Fish.*, **30**, 207-225 (1993)
- 3) Chow S. and Kishino H.: Phylogenetic relationships between tuna species of the genus Thunnus (Scombridae:Teleostei): Inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes: *J. Mol. Evol.*, **41**, 741-748 (1995)
- 4) Takeyama H., Chow S., Tsuzuki H. and Matsunaga T.: Mitochondrial DNA sequence variation within and between tuna Thunnus species and its application to species identification: *J. Fish Biology*, **58**, 1646-1657 (2001)
- 5) Alvarado Bremer JR., Viñas J., Mejuto J., Ely B. and Pla C.: Comparative phylogeography of Atlantic bluefin tuna and swordfish: the combined effects of vicariance, secondary contact, introgression, and population expansion on the regional phylogenies of two highly migratory pelagic fishes: *Mol. Phylogenet. Evol.*, **36**, 169-187 (2005)
- 6) Chow S., Nakagawa T., Suzuki N., Takeyama H. and Matsunaga T.: Phylogenetic relationships among Thunnus species inferred from rDNA ITS1 sequence: *J. Fish Biology*, **68**, 24-35 (2006)
- 7) Díaz-Arce N., Arrizabalaga H., Murua H., Irigoien X. and Rodríguez-Ezpeleta N.: RAD-seq derived genome-wide nuclear markers resolve the phylogeny of tunas: *Mol. Phylogenet. Evol.*, **102**, 202-207 (2016)
- 8) 北川貴士: クロマグロ *Thunnus orientalis* の行動生態と水温適応機構に関する研究 日本水産学会誌 **74**(4), 580-583 (2008)
- 9) Platt A.R., Woodhall R.W., George A.L. Jr.: Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques*, **43**, 58-62 (2007)

[他誌掲載論文]

日本食品科学工学会誌 第66巻 第9号 341-345, 2019年

技術論文

デジタル PCR を用いたダイズ及びその加工品の 定量的品種判別法の開発

岸根雅宏¹, 岡崎法子¹, 石原敏史², 加賀秋人³, 橘田和美¹

¹ 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

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター

³ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 次世代作物開発研究センター

**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43号**

令和元年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： 社会福祉法人東京コロニー東京都大田福祉工場