

# 食品関係等調査研究報告

第44号

令和3年

## Research Report of Food Products

Vol.44

2021



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、令和元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44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3年2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

元素分析による乾燥ひじきの原料原産地判別法の開発 高嶋 康晴, 松野 和久 .....	1
元素分析による精米の原産地判別法の開発 山川 義正, 中村 哲, 石井 修人 .....	8
元素分析及び重元素安定同位体比分析によるニンジンの原産地判別法の開発 後藤 祐之介, 川井 清明, 申 基澈, 陀安 一郎 .....	16
DNA 分析によるスルメイカ加工品の原料種判別法の開発 足立 静香, 豊田 正俊, 高嶋 康晴, 澤田 桂子, 石原 敏史, 若林 敏江、柳本 卓	26
DNA 分析による複数の品種が混合されたダイズ加工品における混入割合推定法の開発 豊田 正俊, 澤田 桂子, 足立 静香, 石原 敏史, 岸根 雅宏 .....	35

# 元素分析による乾燥ひじきの原料原産地判別法の開発

高嶋 康晴、松野 和久

TAKASHIMA Yasuharu, MATSUNO Kazuhisa

## 要 約

乾燥ひじきについて元素分析による原料原産地判別法の検討を行った。国産ヒジキが原料の乾燥ひじき（以下「国産試料」と記載。「外国産試料」、「中国産試料」及び「韓国産試料」も同様。）89点及び外国産試料80点（中国産試料39点、韓国産試料41点）を収集し、これらの粉碎試料について14元素の濃度を測定し、国産試料と外国産試料の判別モデル（モデル1）を構築した。各産地の試料を正しく判定した割合（以下「的中率」という。）は、国産試料は98.9%、外国産試料は77.5%であった。外国産試料のうち中国産試料の的中率が100%である一方で、韓国産試料の的中率が56.1%であったことから、国産試料と韓国産試料の判別モデル（モデル2）を構築した。その結果、的中率は国産試料が100%、韓国産試料が78.0%となった。モデル1及びモデル2を組み合わせることよりの的中率は、国産試料が100%、外国産試料が88.8%となり、判別精度が向上する結果が得られた。

## 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。輸入品以外の一般用加工食品にはさらに、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。ヒジキ（*Sargassum fusiforme*）は、褐藻類ホンダワラ科（Sargassaceae）の海藻の一種であり、波の荒い海岸近くの岩場の潮間帯付近に繁茂し、春から初夏に孢子嚢を付けて成熟する。日本では北海道から本州、四国、九州及び南西諸島（奄美大島、沖縄島）に、日本国外では朝鮮半島及び中国南部に分布する<sup>1)</sup>。

乾燥ひじきの輸入量は、令和元年では約4,200トンで、その輸入先は中国（総輸入量のうち55%）、韓国（同45%）の順である<sup>2)</sup>。国内における乾燥ひじきの流通量の9割以上は外国産原料を用いて製造されたものであり<sup>1)</sup>、原料価格は国産に比べて中国産は1/4以下、韓国産は半額以下である（日本ひじき協議会聞取調査より）。このように乾燥ひじきは内外価格差が大きく、かつ外観で原産地を判別することが難しいことから、原産地の偽装が懸念され、乾燥ひじきの原料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ている。食品における原産地及び原料原産地に関する科学的検証法は、原産地間の元素濃度の差異を利用した方法が報告されている<sup>3)~8)</sup>。これらの方法は、土壌、水質、飼料・餌料等の生育、生息又は飼育環境の違いが農水産物の元素濃度に影響を与えることを利用した判別法である。本研究では、乾燥ひじきの元素濃度を測定し、ヒジキの原料原産地判別について検討したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料

試料として収集した乾燥ひじきの内訳を表1に示した。国産ヒジキが原料の国産試料は、都道府県別の生産量を参考にして試料数を配分し、89点を収集した。外国産ヒジキが原料の外国産試料は、平成26年度の輸入量を参考に、中国産試料39点及び韓国産試料41点を収集した。収集は、日本ひじき協議会等の生産者団体の協力を得て行った。

表1 収集試料の内訳

	原料原産地	試料数	生産割合* (%)
国産	大分県	20	17.2
	長崎県	19	16.1
	三重県	14	14.0
	愛媛県	13	14.0
	千葉県	11	10.8
	和歌山県	4	4.3
	鹿児島県	4	4.3
	広島県	3	3.2
	熊本県	1	1.0
	計	89	85.0
外国産	中国産	39	49
	韓国産	41	51
	計	80	100

\* 日本ひじき協会調べ（平成26年度）

### 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）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（Li、Mg、P、Ca、Mn、Fe、Co、Zn、As、Cd、Sr、Y、Ba 及び Ce、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。

### 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）（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。

## 2.4 分析

### 2.4.1 試料調製

試料から約 5 g を任意に抽出し、恒温乾燥器で 105 °C、16 時間以上乾燥させた後、二重にしたポリエチレン製袋へ入れ、樹脂製ハンマーで全体が概ね 2 mm 以下となるように粉碎したものを以後の試料（以下「粉碎試料」という。）とした。

### 2.4.2 酸分解

粉碎試料約 0.1 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 180~230 °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 回繰り返した。内標準として In を 10 µg/L となるように加え、1 %硝酸で 50 mL に定容後、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。

### 2.4.3 元素濃度の測定

試料溶液中の元素濃度については、ICP-OES を用いて検量線法により Mg、P、Ca、Mn、Fe、Zn、Sr 及び Ba を、ICP-MS を用いて、内標準法（内標準：<sup>115</sup>In）により Li、Co、As、Cd、Y 及び Ce をそれぞれ表 2 の測定条件で測定した。これらの値を用いて粉碎試料中の元素濃度を算出した。

表 2 ICP-OES 及び ICP-MS の測定条件

プラズマ条件	ICP-OES	ICP-MS
RFパワー	1.20 kW	1.3 kW
プラズマガスフロー	15 L/min	15.5L/min
補助ガスフロー	1.5 L/min	1.5 L/min
ネブライザーガスフロー	—	0.95L/min
ネブライザーガス圧力	200 kPa	—
ポンプ速度	15 rpm	0.08 rps

## 2.5 判別モデルの構築

判別モデルの構築は、中村ら<sup>9)</sup>の方法に準じた。測定した粉碎試料中の元素濃度を説明変数として、線形判別分析 (LDA) 及びサポートベクターマシン (SVM) により判別モデルを構築した。モデルの構築には、R 3.4.1 (<http://www.r-project.org/>) の MASS パッケージ及び e1071 を使用した。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。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 元素濃度の測定結果

国産試料 (N=89)、中国産試料 (N=39) 及び韓国産試料 (N=41) の粉碎試料中元素濃度の各種統計量を表 3 に示す。検出限界以下の場合には、検出下限値として取り扱った。

表 3.1 粉砕試料中元素濃度（国産試料）の各種統計量

国産試料 (N=89) (mg/kg)								
ICP-OES								
	Mg	P	Ca	Mn	Fe	Zn	Sr	Ba
平均	68.8 ×10 <sup>2</sup>	8.8 ×10 <sup>2</sup>	14.1 ×10 <sup>3</sup>	23.8	10.1 ×10	13.2	13.2 ×10 <sup>2</sup>	13.0
標準偏差	7.7 ×10 <sup>2</sup>	2.0 ×10 <sup>2</sup>	1.9 ×10 <sup>3</sup>	28.9	7.9 ×10	7.2	3.0 ×10 <sup>2</sup>	4.6
最小値	55.6 ×10 <sup>2</sup>	5.3 ×10 <sup>2</sup>	10.1 ×10 <sup>3</sup>	5*	2.7 ×10	10.0*	6.4 ×10 <sup>2</sup>	5.6
第1四分位数	63.8 ×10 <sup>2</sup>	7.4 ×10 <sup>2</sup>	13.2 ×10 <sup>3</sup>	8.7	5.1 ×10	10.0*	10.6 ×10 <sup>2</sup>	10.2
中央値	67.6 ×10 <sup>2</sup>	8.4 ×10 <sup>2</sup>	14.0 ×10 <sup>3</sup>	13.1	7.4 ×10	11.1	13.9 ×10 <sup>2</sup>	12.9
第3四分位数	71.5 ×10 <sup>2</sup>	10.2 ×10 <sup>2</sup>	15.0 ×10 <sup>3</sup>	28.0	11.8 ×10	13.0	15.1 ×10 <sup>2</sup>	14.9
最大値	91.8 ×10 <sup>2</sup>	15.4 ×10 <sup>2</sup>	18.8 ×10 <sup>3</sup>	175.8	53.6 ×10	59.9	19.9 ×10 <sup>2</sup>	31.1

国産試料 (N=89) (mg/kg)						
ICP-MS						
	Li	Co	As	Y	Cd	Ce
平均	4.3 ×10 <sup>-1</sup>	2.5 ×10 <sup>-1</sup>	11.2 ×10	1.6 ×10 <sup>-1</sup>	11.2 ×10 <sup>-1</sup>	3.2 ×10 <sup>-1</sup>
標準偏差	1.4 ×10 <sup>-1</sup>	1.2 ×10 <sup>-1</sup>	3.7 ×10	1.2 ×10 <sup>-1</sup>	5.2 ×10 <sup>-1</sup>	6.5 ×10 <sup>-1</sup>
最小値	2.4 ×10 <sup>-1</sup>	1.0 ×10 <sup>-1</sup>	5.6 ×10	0.2 ×10 <sup>-1</sup>	3.0 ×10 <sup>-1</sup>	0.3 ×10 <sup>-1</sup>
第1四分位数	3.1 ×10 <sup>-1</sup>	1.7 ×10 <sup>-1</sup>	8.2 ×10	0.9 ×10 <sup>-1</sup>	7.4 ×10 <sup>-1</sup>	0.7 ×10 <sup>-1</sup>
中央値	4.0 ×10 <sup>-1</sup>	2.3 ×10 <sup>-1</sup>	10.8 ×10	1.3 ×10 <sup>-1</sup>	10.6 ×10 <sup>-1</sup>	1.4 ×10 <sup>-1</sup>
第3四分位数	5.3 ×10 <sup>-1</sup>	2.7 ×10 <sup>-1</sup>	13.7 ×10	2.2 ×10 <sup>-1</sup>	14.4 ×10 <sup>-1</sup>	2.4 ×10 <sup>-1</sup>
最大値	8.2 ×10 <sup>-1</sup>	7.8 ×10 <sup>-1</sup>	21.0 ×10	5.6 ×10 <sup>-1</sup>	31.2 ×10 <sup>-1</sup>	44.2 ×10 <sup>-1</sup>

表 3.2 粉砕試料中元素濃度（中国産試料）の各種統計量

中国産試料 (N=39) (mg/kg)								
ICP-OES								
	Mg	P	Ca	Mn	Fe	Zn	Sr	Ba
平均	66.9 ×10 <sup>2</sup>	15.1 ×10 <sup>2</sup>	16.3 ×10 <sup>3</sup>	38.6	57.3 ×10	26.9	13.7 ×10 <sup>2</sup>	65.5
標準偏差	5.7 ×10 <sup>2</sup>	1.5 ×10 <sup>2</sup>	2.1 ×10 <sup>3</sup>	21.0	30.7 ×10	10.0	1.9 ×10 <sup>2</sup>	25.6
最小値	56.4 ×10 <sup>2</sup>	9.8 ×10 <sup>2</sup>	14.0 ×10 <sup>3</sup>	18.2	10.4 ×10	11.7	9.4 ×10 <sup>2</sup>	30.2
第1四分位数	63.3 ×10 <sup>2</sup>	14.4 ×10 <sup>2</sup>	15.2 ×10 <sup>3</sup>	24.6	46.0 ×10	21.2	13.3 ×10 <sup>2</sup>	56.8
中央値	66.1 ×10 <sup>2</sup>	15.2 ×10 <sup>2</sup>	15.6 ×10 <sup>3</sup>	28.3	55.0 ×10	25.3	14.4 ×10 <sup>2</sup>	64.1
第3四分位数	67.6 ×10 <sup>2</sup>	16.0 ×10 <sup>2</sup>	17.0 ×10 <sup>3</sup>	47.7	61.4 ×10	30.6	14.9 ×10 <sup>2</sup>	67.7
最大値	84.9 ×10 <sup>2</sup>	18.4 ×10 <sup>2</sup>	24.4 ×10 <sup>3</sup>	103.0	211.3 ×10	60.1	17.0 ×10 <sup>2</sup>	193.7

中国産試料 (N=39) (mg/kg)						
ICP-MS						
	Li	Co	As	Y	Cd	Ce
平均	10.3 ×10 <sup>-1</sup>	3.3 ×10 <sup>-1</sup>	8.8 ×10	6.2 ×10 <sup>-1</sup>	25.1 ×10 <sup>-1</sup>	26.3 ×10 <sup>-1</sup>
標準偏差	2.3 ×10 <sup>-1</sup>	1.9 ×10 <sup>-1</sup>	1.4 ×10	2.3 ×10 <sup>-1</sup>	18.9 ×10 <sup>-1</sup>	35.1 ×10 <sup>-1</sup>
最小値	7.5 ×10 <sup>-1</sup>	1.5 ×10 <sup>-1</sup>	5.4 ×10	1.5 ×10 <sup>-1</sup>	12.9 ×10 <sup>-1</sup>	2.7 ×10 <sup>-1</sup>
第1四分位数	8.9 ×10 <sup>-1</sup>	2.7 ×10 <sup>-1</sup>	8.2 ×10	3.9 ×10 <sup>-1</sup>	18.3 ×10 <sup>-1</sup>	9.1 ×10 <sup>-1</sup>
中央値	9.8 ×10 <sup>-1</sup>	3.0 ×10 <sup>-1</sup>	9.1 ×10	7.1 ×10 <sup>-1</sup>	20.6 ×10 <sup>-1</sup>	11.4 ×10 <sup>-1</sup>
第3四分位数	10.9 ×10 <sup>-1</sup>	3.4 ×10 <sup>-1</sup>	9.8 ×10	8.3 ×10 <sup>-1</sup>	23.8 ×10 <sup>-1</sup>	38.2 ×10 <sup>-1</sup>
最大値	20.6 ×10 <sup>-1</sup>	13.4 ×10 <sup>-1</sup>	11.3 ×10	10.1 ×10 <sup>-1</sup>	111.9 ×10 <sup>-1</sup>	196.0 ×10 <sup>-1</sup>

表 3.3 粉碎試料中元素濃度（韓国産試料）の各種統計量

	韓国産試料 (N=41) (mg/kg)							
	ICP-OES							
	Mg	P	Ca	Mn	Fe	Zn	Sr	Ba
平均	69.6 ×10 <sup>2</sup>	11.2 ×10 <sup>2</sup>	16.2 ×10 <sup>3</sup>	29.2	128.1 ×10	21.6	13.5 ×10 <sup>2</sup>	29.4
標準偏差	10.4 ×10 <sup>2</sup>	2.6 ×10 <sup>2</sup>	2.6 ×10 <sup>3</sup>	16.8	238.5 ×10	22.4	2.8 ×10 <sup>2</sup>	18.7
最小値	56.5 ×10 <sup>2</sup>	5.3 ×10 <sup>2</sup>	13.4 ×10 <sup>3</sup>	10.0	7.0 ×10	10.0*	6.5 ×10 <sup>2</sup>	7.2
第1四分位数	62.8 ×10 <sup>2</sup>	9.5 ×10 <sup>2</sup>	14.6 ×10 <sup>3</sup>	18.3	29.5 ×10	11.1	10.6 ×10 <sup>2</sup>	21.9
中央値	65.9 ×10 <sup>2</sup>	11.0 ×10 <sup>2</sup>	15.4 ×10 <sup>3</sup>	23.0	53.4 ×10	13.4	14.3 ×10 <sup>2</sup>	24.7
第3四分位数	72.8 ×10 <sup>2</sup>	12.9 ×10 <sup>2</sup>	16.3 ×10 <sup>3</sup>	29.7	69.6 ×10	20.6	15.3 ×10 <sup>2</sup>	26.3
最大値	94.6 ×10 <sup>2</sup>	16.7 ×10 <sup>2</sup>	23.1 ×10 <sup>3</sup>	85.7	1349.1 ×10	128.5	18.2 ×10 <sup>2</sup>	98.3

	韓国産試料 (N=41) (mg/kg)						
	ICP-MS						
	Li	Co	As	Y	Cd	Ce	
平均	12.5 ×10 <sup>-1</sup>	6.5 ×10 <sup>-1</sup>	12.7 ×10	4.8 ×10 <sup>-1</sup>	23.4 ×10 <sup>-1</sup>	108.3 ×10 <sup>-1</sup>	
標準偏差	7.9 ×10 <sup>-1</sup>	5.4 ×10 <sup>-1</sup>	2.6 ×10	3.1 ×10 <sup>-1</sup>	20.1 ×10 <sup>-1</sup>	306.4 ×10 <sup>-1</sup>	
最小値	2.4 ×10 <sup>-1</sup>	1.7 ×10 <sup>-1</sup>	7.2 ×10	0.4 ×10 <sup>-1</sup>	8.3 ×10 <sup>-1</sup>	0.9 ×10 <sup>-1</sup>	
第1四分位数	7.0 ×10 <sup>-1</sup>	3.0 ×10 <sup>-1</sup>	10.8 ×10	2.9 ×10 <sup>-1</sup>	13.5 ×10 <sup>-1</sup>	7.6 ×10 <sup>-1</sup>	
中央値	11.2 ×10 <sup>-1</sup>	4.2 ×10 <sup>-1</sup>	12.9 ×10	4.5 ×10 <sup>-1</sup>	16.0 ×10 <sup>-1</sup>	9.7 ×10 <sup>-1</sup>	
第3四分位数	14.8 ×10 <sup>-1</sup>	6.6 ×10 <sup>-1</sup>	14.8 ×10	6.1 ×10 <sup>-1</sup>	22.9 ×10 <sup>-1</sup>	17.6 ×10 <sup>-1</sup>	
最大値	35.0 ×10 <sup>-1</sup>	22.8 ×10 <sup>-1</sup>	17.7 ×10	18.4 ×10 <sup>-1</sup>	99.9 ×10 <sup>-1</sup>	1781.7 ×10 <sup>-1</sup>	

### 3.2 元素濃度による判別の検討

国産試料 (N = 89) と外国産試料 (N = 80; 中国産試料 39 点、韓国産試料 41 点) の粉碎試料中の元素濃度を用いて、国産試料と外国産試料を判別するモデルを構築した。LDA により 4 元素 (Li、P、Fe 及び Ba) を説明変数とする判別モデル (モデル 1) 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 1 が正の場合を国産試料と判別するとき、モデル構築用試料のうち国産試料の的中率は 98.9 % (88/89)、外国産試料の的中率は 77.5 % (62/80) であった。外国産の内訳を見ると、中国産試料では 100 % (39/39) 正しく外国産と判別された一方で、韓国産試料が正しく外国産と判別された割合は 56.1 % (23/41) であった。

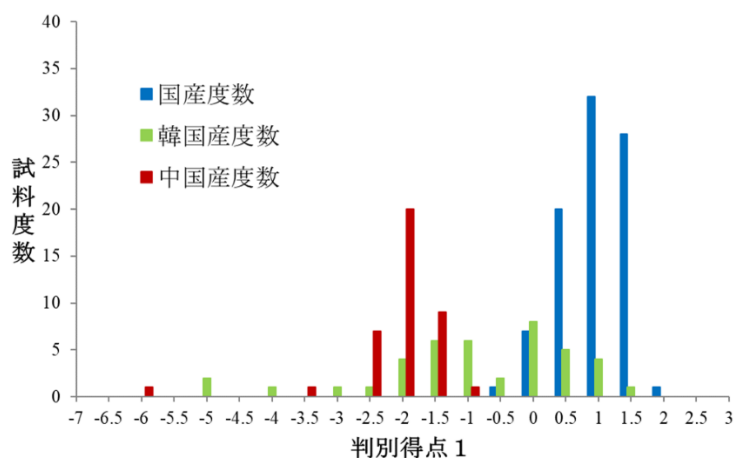


図 1 元素濃度の判別モデル (モデル 1) による国産試料、中国産試料及び韓国産試料の度数分布



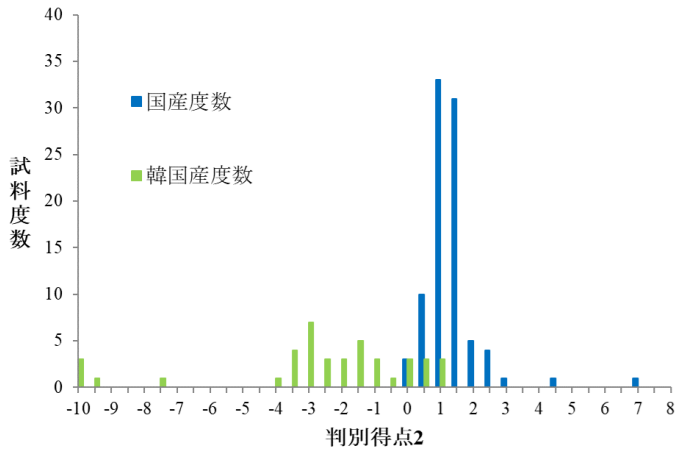


図2 元素濃度の判別モデル（モデル2）による  
国産試料及び韓国産試料の度数分布

このため、国産試料と韓国産試料を判別するモデルを構築した。SVMにより4元素（Li、Mn、Co及びY）を説明変数とする判別モデル（モデル2）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2に示す。判別得点2が正の場合を国産試料と判別するとき、モデル構築用試料のうち国産試料100%（89/89）、韓国産試料78.0%（32/41）を正しく判別し韓国産試料の的中率が向上した。モデル1及びモデル2を組み合わせることにより、的中率は国産試料100%（89/89）及び外国産試料88.8%（71/80）となり、判別精度の向上がみられた。各試料の判別得点による分布を図3に示した。

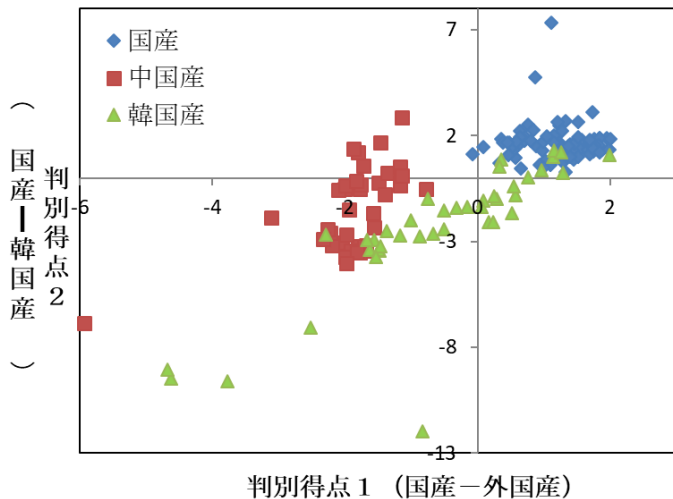


図3 判別得点1及び判別得点2による散布図

#### 4. まとめ

本研究では、元素濃度による乾燥ひじきの原料原産地判別法を検討した。粉碎試料について14元素の元素濃度を説明変数とした国産試料と外国産試料を判別するモデルを検討したところ、LDAにより構築した4元素（Li、P、Fe及びBa）の濃度を説明変数とした判別モデル（モデル1）では、このモデルにおける判別モデル構築用試料の的中率は、国産試料98.9%、外国産試料77.5%であった。外国産試料のうち韓国産試料の的中率が低いため、新たに国産試料-韓国産試料の判

別モデルを検討したところ、SVMにより構築した4元素（Li、Mn、Co及びY）の濃度を説明変数とした判別モデル（モデル2）では、この判別モデル構築用試料の的中率のうち韓国産試料の的中率は、モデル1での56.1%から78.0%となり、判別精度が向上した。また、二つの判別モデルを組み合わせることで、的中率は国産試料100%、外国産試料88.8%となり、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、試料の提供、ご助言いただいた日本ひじき協議会の皆様に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) ひじき Q&A, 日本ひじき協議会, 2020-8-25, <<http://www.hijiki.org/html/content14.htm>>
- 2) 令和元年貿易統計, 財務省 (2019)
- 3) 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)
- 4) 渡邊裕之, 法邑雄司, 堀田博: カボチャの無機元素組成による原産地判別の検討, 関税中央分析所報, **47**, 15-23 (2007)
- 5) 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**, 70-77 (2010)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) Iguchi, J.; Takashima, Y.; Namikoshi, A.; Yamashita, Y.; Yamashita, M.: Origin identification method by multiple trace elemental analysis of short-neck clams produced in Japan, China, and the Republic of Korea, *Fish. Sci.*, **79**, 977-982(2013)
- 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)

## 元素分析による精米の原産地判別法の開発

山川 義正<sup>1</sup>, 中村 哲<sup>1</sup>, 石井 修人<sup>2</sup>

YAMAKAWA Yoshimasa, NAKAMURA Satoru, ISHII Shuto

### 要 約

精米について元素分析による原産地判別法の検討を行った。国産の精米 198 試料及び外国産の精米 87 試料を収集し 17 元素の濃度を測定し、それを元に国産と外国産の判別モデルを検討、構築した結果、国産－外国産判別に十分な判別性能のあ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、表示の方法等が規定されており、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。

その中において、精米に対し原料玄米の産地の表示が義務付けられており、産地、品種及び産年が同一である原料玄米を用い、かつ、当該原料米の産地、品種及び産年について証明（国産品にあつては、農産物検査法（昭和 26 年法律第 144 号）による証明をいい、輸入品にあつては、輸出国の公的機関等による証明をいう。）を受けた原料玄米にあつては、「単一原料米」と表示し、その産地、品種及び産年を併記することとし、この場合における産地は国産品にあつては都道府県名、市町村名その他一般に知られている地名を、輸入品にあつては原産国名又は一般に知られている地名を表示することとされている。

また、米穀等の取引等に係る情報の記録及び産地情報の伝達に関する法律（平成 21 年法律第 26 号）により、米穀事業者は、指定米穀等を他の米穀事業者への譲渡しをするときには、産地情報の伝達を義務づけられている。

国内の米収穫量（主食用）は年間 730 万トン（平成 29 年～令和元年の平均値）であり、農林水産省による主食用の米の自給率（重量ベース）は 97%前後を維持しているが、平成 7 年度以降は、ガット・ウルグアイ・ラウンド合意（WTO 協定）に基づき、国が一元的にミニマム・アクセス米（以下「MA 米」という。）を輸入するようになっている。この MA 米の枠内で、輸入業者と国内実需者の実質的な直接取引を行う SBS（Simultaneous Buy and Sell：売買同時契約）米がある。SBS 米は 7.7 万実トン（玄米 8.6 万トン相当）が主に主食用に輸入されており<sup>2)</sup>、一方、SBS 米以外の MA 米（一般輸入米）は 68 万玄米トンで、加工用、飼料用等の非主食用に輸入されている（平成 28～30 年度の平均値）<sup>2)</sup>。また、国を通さずに高水準の関税を支払って輸入される枠外輸入もあるが、これらの輸入量は 0.01～0.02 万トン／年とわずかである<sup>2)</sup>。このため、国内に流通している主食用の外国産米は、主に SBS 米として輸入された米となる。

精米の産地については、消費者の関心が高く、また検査の効果と効率の面からも品種判別検査と合わせて産地判別検査を実施することの意義は大きいことから、産地表示の真正性を客観

<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

<sup>2</sup> 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

的に検証する科学的技術の開発が求められてきた。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<sup>4)~15)</sup>。これらは、土壌や水質等の生育環境の違いが生育した農産物等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。

そこで、本研究において平成 29 年度から平成 30 年度にかけて、SBS 米の主な輸入先である米国産、豪州産及び中国産を対象に、精米の元素分析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

収集した試料の内訳を表 1 に示す。国産については都道府県別の収穫量（平成 26 年度～平成 28 年度の 3 年間の平均<sup>16)</sup>）の割合を参考に、農業協同組合等から平成 29 年産を中心に 198 点（43 道府県）を収集した。外国産については産地国等ごとの輸入量に係る SBS の決定数量（平成 27 年度～平成 28 年度の 2 年間の平均<sup>17)</sup>）の割合に応じて、商社等から平成 29 年産を中心に 87 点（米国産 63 点、豪州産 18 点、中国産 6 点）の SBS 米を収集した。

### 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

表1 収集試料の内訳

	産地	試料数	収穫量割合(%)	産地	試料数	収穫量割合(%)	
国産	北海道	18	7.4	滋賀	5	2.1	
	岩手	5	3.5	京都	3	0.9	
	宮城	7	4.6	大阪	2	0.3	
	秋田	10	6.5	兵庫	5	2.3	
	山形	7	5.0	和歌山	3	0.4	
	福島	7	4.5	鳥取	3	0.8	
	茨城	4	4.6	島根	3	1.1	
	栃木	6	4.0	岡山	3	2.0	
	群馬	3	1.0	広島	3	1.6	
	埼玉	3	2.0	山口	3	1.3	
	千葉	5	3.9	徳島	6	0.7	
	神奈川	3	0.2	香川	3	0.8	
	新潟	12	8.0	愛媛	6	0.9	
	富山	4	2.6	高知	5	0.7	
	石川	3	1.7	福岡	4	2.2	
	福井	3	1.6	佐賀	3	1.6	
	山梨	3	0.3	長崎	3	0.7	
	長野	3	2.5	熊本	4	2.2	
	岐阜	3	1.4	大分	3	1.3	
	静岡	3	1.0	宮崎	4	1.0	
	愛知	5	1.8	鹿児島	3	1.2	
	三重	4	1.7				
				計	198	96.0	
		産地	試料数	輸入量割合			
	外国産	アメリカ	63	74.4			
		オーストラリア	18	19.2			
		中国	6	5.3			
計		87	98.9				

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(Li、Co、Ni、Cu、Rb、Sr、Mo、Cd、Cs及びBa、Ca、K、Mg、Mn、Na、P並びにZn、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。

### 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)(7500CX、Agilent Technologies)及び誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-OES)(ICAP6300Duo、Thermo Fisher)を用いた。

### 2.4 試料調製

精米として得た試料についてはそのまま、玄米として得た試料についてはこれを元試料として圧力式の小型精米機(家庭用)によりとう精歩合が約90%となるようとう精し、これを測定用の試料原物(以下「原物」という)とした。この原物約2.5gに対し、20mLの超純水を加え5秒間かくはんし超純水を捨てる洗浄操作を4回繰り返したものを酸分解用調製済み試料とした。

### 2.5 酸分解

酸分解用調製済み試料(原物量約2.5g)を樹脂製ヒータブルビーカーに採取し、61%硝酸を10mL加え、樹脂製時計皿でふたをし、ホットプレート上で徐々に温度を上げ120℃に加熱した後、さらに61%硝酸を10mL加えて170℃まで徐々に温度を上げて加熱した。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2mL加え、徐々に温度を上げ200℃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℃で加熱して分解液を蒸発・乾固した。ビーカーに1%硝酸を10mL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、50mL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10µg/Lとなるように加え、1%硝酸で50mLに定容後、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。

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	15.5L/min	15 L/min
補助ガスフロー	1.5 L/min	1.5 L/min
ネブライザーガスフロー	0.95L/min	
ネブライザーガス圧力		200 kPa
ポンプ速度	0.08 rps	15 rpm

### 2.6 元素濃度の測定

試料溶液中の元素濃度はICP-MSを用いて内標準法(内標準:<sup>115</sup>In)によりLi、Co、Ni、Cu、Rb、Sr、Mo、Cd、Cs及びBaを、ICP-OESを用いて検量線法によってCa、K、Mg、Mn、Na、及びZnを、それぞれ表2の測定条件で測定した。これらの値を用いて原物中の元素濃度を算出した。

### 2.7 判別モデルの構築

判別モデルの構築は、中村ら<sup>9)18)</sup>の方法に準じた。測定した原物中の元素濃度から、P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。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 精米の洗浄方法の検討

米の表面についたぬかなどの影響で元素濃度に影響がでる可能性がある。このため、市販品の精米を用いて、洗米回数による元素濃度の変化を確認した。1回の洗浄操作を前述のとおり精米試料約2.5gに対し超純水20mLを加え、5秒間かくはんし、超純水を捨てることとし、洗浄操作を0回から10回まで繰り返した場合について元素濃度を測定した。精米中の各元素の濃度変化を見ると急激な濃度変化は洗浄回数4回以上において概ね終了しており、試料表面の洗浄はこの段階で終了しているものと考えられる。一方でLi、Na等の水溶性の比較的高い元素については回数が増えるごとに低下し続けるものもある(図1)。このため、洗浄が終了する最小限の回数である4回を、本測定における洗浄回数とした。

#### 3.2 とう精歩合についての検討

米はぬかに多くの元素が含まれており、精米中の元素濃度はそのとう精歩合により変動することが知られているが、精米で収集した試料のとう精歩合を確定することは困難であり、判別モデルを構築する際にはそのことを考慮する必要がある。そのため、玄米(国産コシヒカリ)を用い

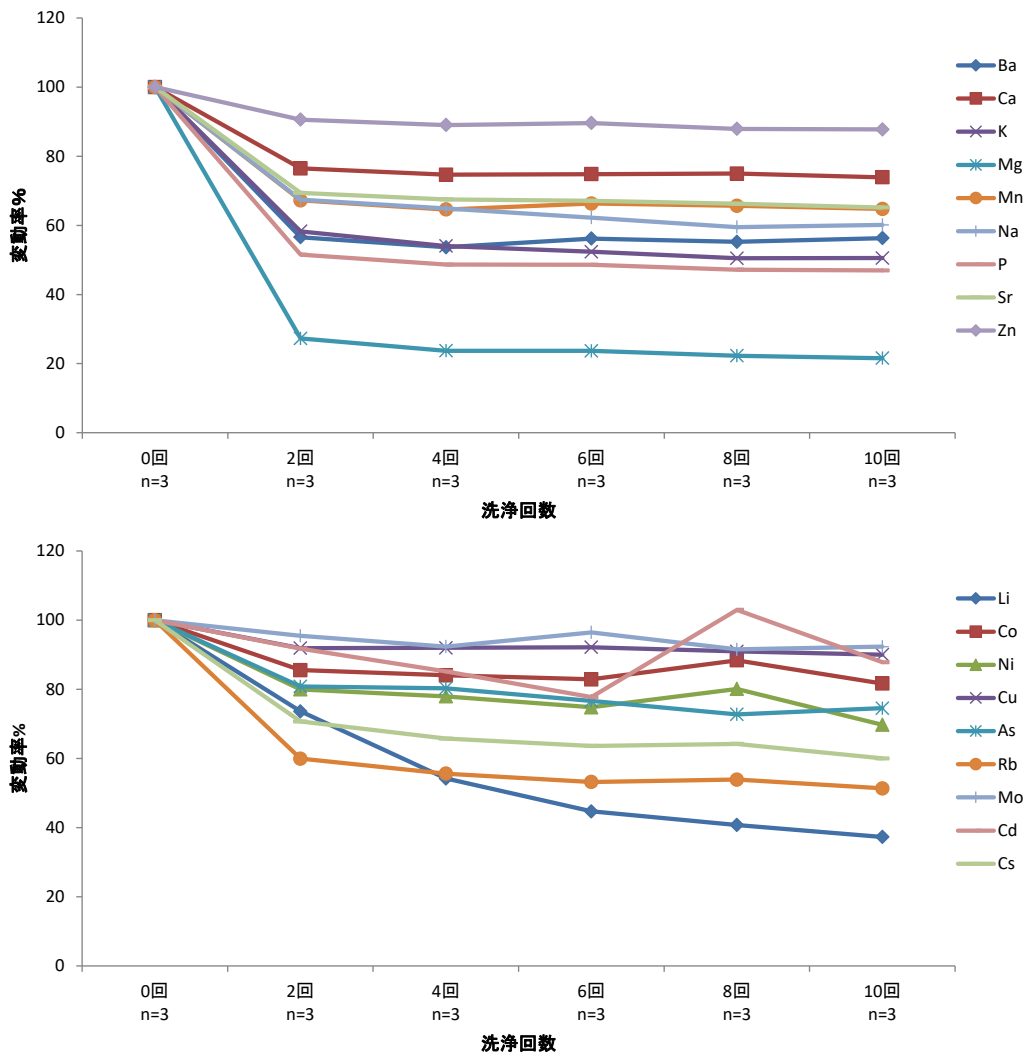


図1 洗米回数による元素濃度の変化  
無洗浄(洗浄0回)での濃度を100%とした

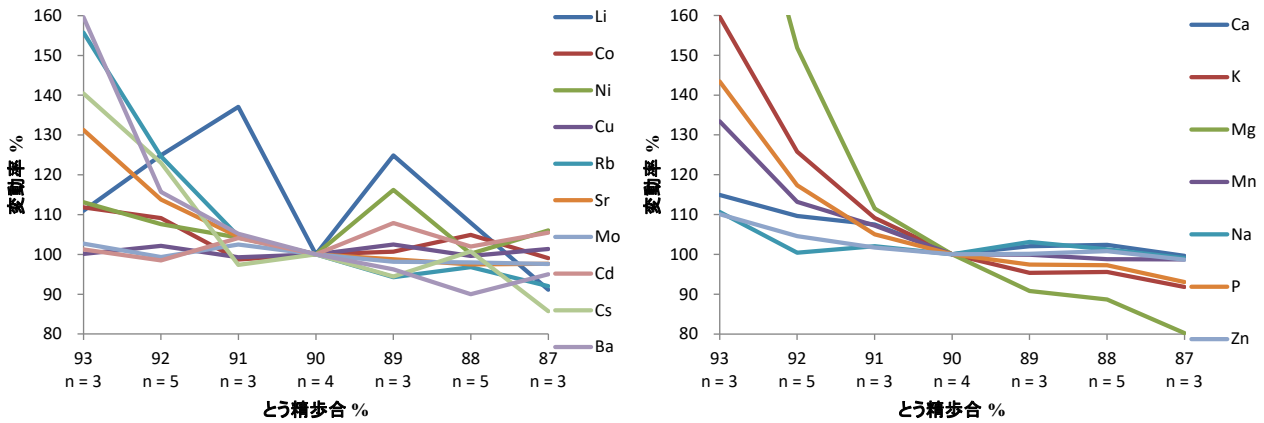


図 2 とう精歩合による精米の元素濃度変動

とう精歩合 90 % での各元素濃度を 100 % としている。ぬか部分に多く含まれる元素は玄米の状態からとう精歩合 90 % になるにしたがって減少し、それ以降はおおよそ一定となる傾向にある。

て、FAMIC の小型精米器で 87～93 % に 1 % 刻み (89.5～90.5 % の試料を 90 % としている。) で各 3～5 点併行でとう精し、その元素濃度の変動を確認した。とう精歩合による元素濃度の変動率を図 2 に示す。

とう精歩合 87～91 % において多くの元素で濃度の変動が小さくなったが、K、Mg、P 等は 90 % 付近でも比較的変動が大きく、濃度によって異なる分析法の不確かさと比べて無視できないほどの大きさとなった。

このような一般的な精米のとう精歩合と考えられる 90 % 付近においての元素濃度の変動は、測定したモデル試料の分析値をそのまま使用して判別モデルを構築した場合には判別精度に悪影響を与え得るため、検査品のとう精歩合は 88.0～92.0 % の三角分布であると仮定し、そのとう精歩合による各元素濃度の標準偏差を上記の試料のうち 87.5～92.5 % の試料を用いた回帰分析により算出し、判別モデル構築には、分析法の不確かさにとう精歩合による標準偏差を合成したものを、とう精歩合に関わらず用いることとした (表 3)。

なお、とう精歩合による各元素濃度の標準偏差は、玄米で収集した米国产米及び国産米を同じ方法で算出し、各元素について 2 試料のうち標準偏差が大きい方を使用することとした。

### 3.3 元素濃度の測定結果と判別の検討

国産 198 点 (43 道府県)、外国産 87 点 (米国产 63 点、豪州産 18 点、中国産 6 点) のモデル試料を 2 点併行で分解し、17 元素 (Li、Co、Ni、Cu、Rb、Sr、Mo、Cd、Cs、Ba、Ca、K、Mg、Mn、Na、P 及び Zn) を測定した結果の統計量を表 4 に示す。

モデル検討の結果、測定した試料中濃度から、12 元素 (Li、Co、Ni、Cu、Rb、Mo、Cs、Ba、K、Na、P 及び Zn) を P による濃度比を用いた 11 の説明変数として国産と外国産の判別式を構築した。その後 LOOCV により得られた判別得点からカーネル密度推定を行い、国産と外国産の判別モデルを構築した。この判別モデルは、各元素濃度のとう精歩合による標準偏差を合成した

表3 とう精歩合による精米の元素濃度の標準偏差

	Li	Co	Ni	Cu	Rb	Sr	Mo	Cd	Cs	Ba	Ca	K	Mg	Mn	Na	P	Zn
とう精歩合による標準偏差 RSD %	2.6	0.4	0.5	0.3	5.1	3.1	0.4	0.0	3.7	4.9	1.5	5.7	11.1	2.8	0.0	3.8	0.8
とう精歩合が90 %の場合の分析法の不確かさ RSD %	22.0	22.0	21.5	14.3	16.5	22.0	17.8	22.0	22.0	22.0	9.6	6.5	8.2	12.0	13.5	6.2	10.7
合成後の不確かさ RSD %	22.1	22.0	21.5	14.3	17.2	22.2	17.8	22.0	22.3	22.5	9.7	8.7	13.8	12.4	13.5	7.3	10.7

表4 精米の元素濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )

国産 (n = 198)									
	Li	Co	Ni	Cu	Rb	Sr	Mo	Cd	Cs
平均	<0.0005	0.0032	0.111	1.81	0.91	0.043	0.66	0.0361	0.00236
標準偏差	0.00024	0.0018	0.085	0.48	0.62	0.013	0.28	0.0338	0.00424
最小値	<0.0005	<0.002	<0.01	0.72	<0.1	0.016	0.21	0.0018	<0.0003
第1四分位数	<0.0005	0.0023	0.058	1.52	0.51	0.035	0.42	0.0077	0.00041
中央値	<0.0005	0.0031	0.104	1.79	0.87	0.044	0.53	0.0192	0.00090
第3四分位数	<0.0005	0.0039	0.149	2.09	1.41	0.060	0.73	0.0416	0.00190
最大値	0.01819	0.0160	0.531	3.63	3.62	0.105	1.96	0.1815	0.02992

国産 (n = 198)								
	Ba	Ca	K	Mg	Mn	Na	P	Zn
平均	0.050	33.8	430	72	6.0	4.3	540	14.9
標準偏差	0.039	3.2	60	16	1.1	2.3	47	2.0
最小値	<0.02	26.7	279	37	3.8	1.8	447	8.2
第1四分位数	<0.02	31.2	399	56	5.2	3.0	507	12.3
中央値	0.033	33.0	439	68	6.0	4.2	528	14.4
第3四分位数	0.063	35.3	496	78	6.6	5.5	557	15.8
最大値	0.224	42.5	777	172	10.2	17.9	805	20.8

外国産 (n = 86)									
	Li	Co	Ni	Cu	Rb	Sr	Mo	Cd	Cs
平均	0.00201	0.0046	0.140	1.90	1.22	0.085	0.45	0.0047	0.00090
標準偏差	0.00328	0.0012	0.035	0.36	0.54	0.022	0.11	0.0042	0.00086
最小値	<0.0005	<0.002	0.038	0.75	0.39	0.047	0.19	0.0009	<0.0003
第1四分位数	0.00076	0.0035	0.109	1.66	0.65	0.072	0.36	0.0025	0.00037
中央値	0.00134	0.0049	0.132	1.85	0.99	0.084	0.43	0.0043	0.00069
第3四分位数	0.00200	0.0057	0.169	2.15	1.76	0.108	0.52	0.0089	0.00154
最大値	0.01953	0.0293	0.447	3.55	2.87	0.475	0.90	0.1018	0.03571

外国産 (n = 86)								
	Ba	Ca	K	Mg	Mn	Na	P	Zn
平均	0.025	33.4	605	59	6.9	5.7	533	9.9
標準偏差	0.018	3.7	91	20	1.0	2.5	46	1.3
最小値	<0.02	25.1	440	37	4.1	<1.2	247	8.0
第1四分位数	<0.02	31.8	534	50	6.4	3.7	514	9.8
中央値	0.024	34.8	585	67	7.3	4.9	548	10.5
第3四分位数	0.059	39.5	658	87	8.0	6.7	602	12.5
最大値	0.247	55.0	957	121	13.9	15.5	791	17.0

上で構築され、その判別得点のヒストグラムとカーネル密度推定の結果を図3に示す。

この判別モデルにおいて判別得点が正の場合に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% (198/198)、外国産試料の97.7% (84/86)を正しく判別した。

事前確率が2%で誤判別が最小となる判別基準(判別得点-0.25)の場合は、特異度が99.90%、感度が86.8%、事後確率が94.8%となった。誤判別となった試料は外国産2点であるが、そのどちらも中国産であり、中国産の判別精度が低いことが示唆されるものの国産米と外国産米の判別としては良好な結果が得られた。しかしながら、これら判別モデルの元素のうち、平均的に濃度が低く分散の大きくなるLi及びCsやとう精や洗米の影響の大きいNa、K、Ni及びRbなどについては、条件によっては試験室間の相対標準偏差が大きくなる可能性があり、実用においては検査品質の管理を厳密にするか、より試験室間での安定度が高い元素でのモデル構築を必要とする可能性がある。



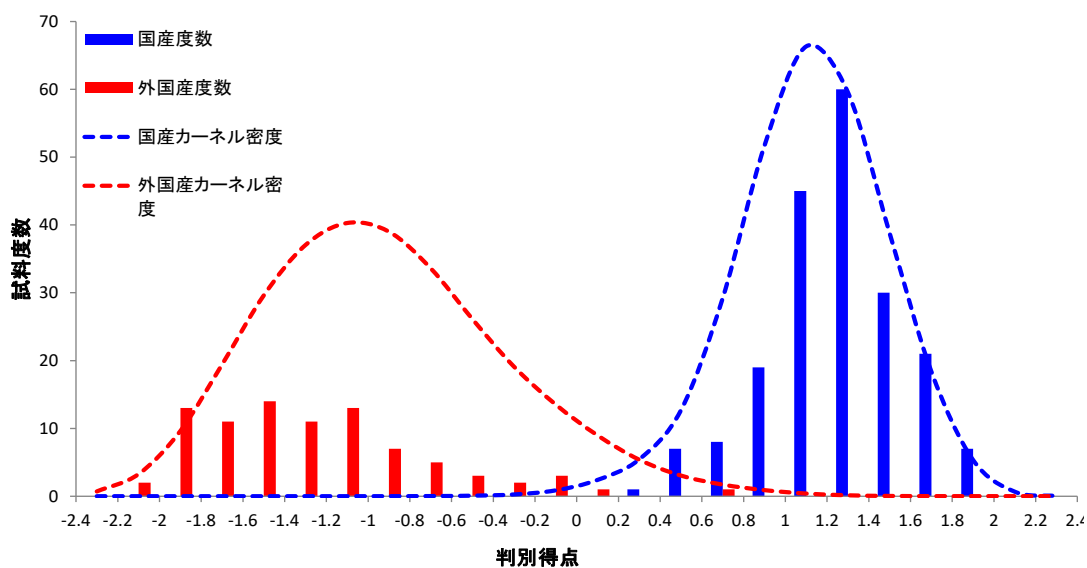


図 3 モデルの判別得点とカーネル密度

#### 4. まとめ

精米の産地判別について検討を行い、元素分析による判別モデル構築を試みた。その結果、元素分析においては、とう精歩合による不確かさを加味すれば、実用可能な判別精度の判別モデル構築が可能であることが示唆された。

#### 謝 辞

本研究を実施するにあたり、御協力や御助言をいただきました（独）農業・食品産業技術総合研究機構、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) 作物統計、農林水産省(2019)
- 2) 米をめぐる関係資料、農林水産省(2019)
- 3) 「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）
- 4) 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）
- 5) 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)
- 6) 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)

- 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) 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)
- 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調査研究報告, **37**, 1-10 (2013)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 後藤祐之介, 小岩智宏, 申基澈, 陀安一郎: 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, 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, **43**,20-26(2019)
- 16) 作物統計調査、農林水産省(2014～2016)
- 17) 輸入米に係る SBS の結果概要、農林水産省 (2015～2016)
- 18) 中村哲: 元素分析によるネギの原産地判別マニュアルの検証, 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, **43**,1-11(2019)

## 元素及び重元素安定同位体比分析による ニンジンの産地判別法の開発

後藤 祐之介<sup>1</sup>, 川井 清明<sup>1</sup>, 申 基澈<sup>2</sup>, 陀安 一郎<sup>2</sup>

GOTOU Yunosuke, KAWAI Kiyooki, SHIN Ki-Cheol, TAYASU Ichiro

### 要 約

生鮮ニンジンについて、元素分析及び重元素安定同位体比分析による原産地判別法の検討を行った。国産の生鮮ニンジン 44 試料及び外国産の生鮮ニンジン 37 試料（中国産 34 試料、ベトナム産 3 試料）を収集し、20 元素濃度並びにストロンチウム（Sr）及び鉛（Pb）の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又は重元素安定同位体比を用いて構築した。判別モデル構築に用いた試料の判別率の中率は、元素濃度による判別モデルでは国産 97.7 %、外国産 94.6 %であり、重元素安定同位体比による判別モデルでは国産 95.5 %、外国産 97.3 %であった。重元素安定同位体比を用いた判別モデルについては、生鮮ニンジンに加え冷凍ニンジンにも適用できる可能性が認められた。

### 1. はじめに

一般用生鮮食品としての生鮮ニンジンの表示にあつては、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）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。国産ニンジンの国内出荷量は年間約 50.6 万トン<sup>1)</sup>であるのに対し、生鮮ニンジンの輸入量は年間約 8.1 万トン<sup>2)</sup>である。主な輸入相手国は、中国（約 91 %）、次いでベトナム（約 3 %）である。一方、価格<sup>3)</sup>については、国産品がキロ当たり 200 円前後であるのに対して、輸入品はキロ当たり 80 円～100 円と安価であることなどから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検証法が求められている。FAMIC では、生鮮野菜等の原産地判別法を白ネギ、ショウガなど通年輸入されている品目を対象として、元素分析や Sr 安定同位体比分析を用いて検討してきた<sup>4)~14)</sup>。これらの方法は、栽培地域の環境（土壌や水質等）の違いを農産物中の元素濃度や Sr 安定同位体比（<sup>87</sup>Sr/<sup>86</sup>Sr）が反映することを利用して生育地域を判別する方法である。Sr 安定同位体比は、国産と中国産の判別指標として有効であるが、一部の地域は誤判別となる傾向にある<sup>10)</sup>。そこで、産地判別の新たな判別指標として利用されている Pb 安定同位体比（<sup>208</sup>Pb/<sup>207</sup>Pb）<sup>15)16)</sup>を測定し、Sr 及び Pb 安定同位体比を組み合わせた判別法を検討した。また、調理用に下処理（カット、洗浄等）をした冷凍野菜が市販されているが、軽度な処理であれば安定同位体比の判別モデルで判別できる可能性が考えられる。冷凍野菜は、品質低下を防ぐ目的でブランチング（加熱処理）により原料野菜の酵素を不活性化させている。この処理による安定同位体比の変動を確認するため、冷凍ニンジンの模擬試料を作製し判別モデルの適用について検討したので報告する。

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> 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

収集した試料の内訳を表1に示した。国産試料については、都道府県別のエンジンの生産量<sup>1)</sup> (平成 28~30 年の平均) の割合に応じて 44 点を収集し、外国産試料については国ごとの生鮮エンジンの輸入量<sup>2)</sup> (平成 26~28 年の平均) の割合に応じて 37 点 (中国産 34 点、ベトナム産 3 点) を収集した。

収集した試料は、すべて判別モデル構築のモデル試料とした。

冷凍エンジンの模擬試料については、煮込み調理用を想定し、国産エンジンから 6 点 (5 mm 幅、10 mm 幅、各 3 点)、中国産エンジンから 6 点 (5 mm 幅、10 mm 幅、各 3 点) を加熱処理後に冷凍して作製した。

表 1 収集試料の内訳

原産地	試料数	生産割合 (%)
北海道	11	30.9
千葉	7	19.5
徳島	5	9.3
青森	4	6.9
長崎	4	5.7
茨城	2	5.0
国産 埼玉	2	3.3
鹿児島	2	3.1
愛知	2	3.0
宮崎	2	2.6
新潟	2	1.0
熊本	1	3.1
計	44	93.4
中国	34	91
外国産 ベトナム	3	3
計	37	94

### 2.2 試薬

本研究には、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) を使用した。試料の酸分解には、61 %硝酸 (高純度電子工業用、関東化学) 又は 68 %硝酸 (TAMAPURE-AA-100、多摩化学工業)、70 %過塩素酸 (TAMAPURE-AA-100、多摩化学工業) 及び 48 %フッ化水素酸 (Ultrapure-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 及び Pb の精製には、Sr resin (50-100 μm、Eichrom Technologies)、AG1-X8 resin 200-400 mesh (Bio-Rad Laboratories)、47 %臭化水素酸 (TAMAPURE-AA-100、多摩化学工業) 及び 20 %塩酸 (TAMAPURE-AA-100、多摩化学工業) 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 SRM987 (National Institute of Standards and Technology) を、Pb 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 NMIJ CRM3681-a (国立研究開発法人産業技術総合研究所) を用いた。

### 2.3 装置

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。重元素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) 及び脱溶媒試料導入装置 (aridus II) を用いた。

## 2.4 試料調製

ニンジン全体を超純水で洗浄し、セラミック製包丁で上部及び下部をそれぞれ約 5 mm 程度除去した後、セラミック製ピーラーで皮を薄く除去した。縦方向に 4 分割し、全量又は 4 分割した対角の 2 本分を 4 cm 程度の長さに切断してミキサーを用いて粉碎し、以後の試料（以下「粉碎試料」という。）とした。

## 2.5 酸分解

元素濃度測定用及び Sr 安定同位体比分析用に、粉碎試料約 5.0 g を樹脂製ヒータブルビーカーに採取し、61 %硝酸 10 mL を加えて樹脂製時計皿でふたをして 120 °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 2.5 mL を加え、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（以下「過塩素酸分解操作」という。）。時計皿を外し約 230 °C で蒸発乾固させた後、1 %硝酸 5 mL 程度でビーカー内の残留物を溶解して 50 mL 容樹脂製全量フラスコに移す操作を 3 回繰り返した。内標準として In を 250 ng 加えた後、1 %硝酸で 50 mL に定容し、元素濃度測定用及び Sr 安定同位体比分析用の分解溶液とした。

Pb 安定同位体比測定用は、乾燥試料（粉碎試料を 70 °C で 24 時間乾燥）約 1.5 g を樹脂製ヒータブルビーカーに採取し、68 %硝酸 10 mL を加えて樹脂製時計皿でふたをして 120 °C のホットプレート上で加熱した。その後、過塩素酸分解操作を行い、放冷後、Pb 安定同位体比測定用の分解溶液とした。

## 2.6 精製

### 2.6.1 Sr の精製

Sr 安定同位体比分析用の分解溶液は、測定を阻害する Rb を除去する目的で Sr resin を用いた精製を行った。Sr resin をカラム管に充填し、8 mol/L 硝酸でコンディショニングを行った。次に Sr が 200~400 ng 含まれる量の元素濃度測定用試料溶液を 150 °C 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 mol/L 硝酸 6 mL に溶解し、Sr resin に負荷した。8 mol/L 硝酸 3 mL を添加して Sr resin を洗浄した後、0.05 mol/L 硝酸 2 mL で Sr を溶出させた。この溶出液を 65 °C 程度で蒸発させて残留物を 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。

### 2.6.2 Pb の精製

Pb 安定同位体比測定用の分解溶液は、Pb イオンを分離・精製するために陰イオン交換樹脂 AG1-X8 による精製を行った<sup>17)</sup>。イオン交換樹脂をカラム管に充填し、2 mol/L 臭化水素酸でコンディショニングを行った。次に Pb 安定同位体比測定用の分解溶液に 48 %フッ化水素酸 1 mL を加え 100 °C で 30 分加温した後、150 °C で蒸発乾固した。残留物を 2 mol/L 臭化水素酸 3 mL に溶解し、陰イオン交換樹脂に負荷した。2 mol/L 臭化水素酸 2 mL を添加して陰イオン交換樹脂を洗浄する操作を 3 回繰り返した後、6 mol/L 塩酸 3 mL で Pb を溶出させた。この溶出液を 120 °C 程度で蒸発させて残留物を 3 %硝酸 2 mL に溶解し、これを Pb 安定同位体比測定用試料溶液とした。

## 2.7 元素濃度及び重元素安定同位体比の測定

試料溶液中の元素濃度は、ICP-OES 及び ICP-MS (In による内標準法) を用いて表 2 の測定条件で測定した。重元素安定同位体比は、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 Sr 安定同位体比の補正は井伊ら<sup>12)</sup>に準じ、Pb 安定同位体比の補正はタリウム外部補正法<sup>18)</sup>により行い、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

	Sr安定同位体比	Pb安定同位体比
RFパワー	1.2 kw	1.2 kw
プラズマガスフロー	15 L/min	15 L/min
補助ガスフロー	0.7 L/min	0.7 L/min
サンプルガスフロー	0.80-1.00 L/min	0.80-1.00 L/min
脱溶媒装置	-	Aridus II
スweepガスフロー	-	3.8-4.1 L/min
検出器配置 m/z (cup)	83(L3), 84(L2), 85(L1) 86(C), 87(H1), 88(H2)	202(L4), 203(L3), 204(L2), 205(L1) 206(C), 207(H1), 208(H2)
測定ブロック数	1	1
測定サイクル数	50	60

## 2.8 水分測定

水分測定は石井ら<sup>8)</sup>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、重量の差から粉碎試料中の水分含有率を求めた。

## 2.9 判別モデルの構築

### 2.9.1 元素濃度による判別

判別モデルの構築は、中村ら<sup>4)19)</sup>の方法に準じた。モデル試料の元素濃度及び水分含有量から、乾燥試料中元素濃度の常用対数を説明変数として、サポートベクターマシン (SVM) 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。

### 2.9.2 安定同位体比による判別

Sr 安定同位体比による判別については、2.7 で得られたモデル試料の  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  を判別率の算出に用いた。モデル試料の  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  の分布範囲において、 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  を基準値としたカットオフ値を変化させて、国産試料の判別率 (国産と正しく判別する確率 (特異度)) 及び外国産試料の判別率 (外国産と正しく判別する確率 (感度)) を算出し、偽陽性率 ( $100 - \text{特異度}$ ) 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。

Sr 及び Pb 安定同位体比による判別については、収集試料の  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 、 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$  を説明変数として、SVM 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 LOOCV により確認した。

### 2.9.3 判別モデルの適用範囲の検討

煮込み調理用を想定した冷凍ニンジン（5 mm 幅、10 mm 幅）の模擬試料を作製し、加工処理による安定同位体比の変動を確認した。模擬試料は、国産と中国産の生鮮ニンジンを同一ロット（10 kg）から3本ずつ抜き取って作製した。まず、ニンジンの表面の皮を除去した後に縦方向に4等分したものを横方向に一定間隔に切断して、5 mm 幅及び10 mm 幅のカットニンジンをそれぞれ1/4本分作製した。次に、カットニンジンを95℃で加熱処理（5 mm 幅は2分、10 mm 幅は3分）し冷水で冷却した後、-20℃で冷凍したものを冷凍ニンジンの模擬試料とした。残りのニンジン（1/4本分×2）は、加工前の原料ニンジンとした。作製した国産冷凍ニンジン（5 mm 幅、10 mm 幅、各3点）、中国産冷凍ニンジン（5 mm 幅、10 mm 幅、各3点）、原料ニンジン（国産、中国産、各3点）については、2.4から2.7までの手順で安定同位体比を測定し、2.9.2で構築した判別モデルの適用可能性を検討した。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 元素濃度

モデル試料国産44点、中国産34点及びベトナム産3点の各元素の乾燥試料中濃度を表4に示す。

表4 モデル試料の各元素の乾燥試料中濃度 (mg/kg)

	国産 (n=44)		中国産 (n=34)		ベトナム (n=3)	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
Ba	14	13	19	17	13	3.7×10 <sup>-1</sup>
Ca	2176	401	2640	437	3049	452
Fe	14	3.9	18	8.5	11	8.9×10 <sup>-1</sup>
K	24046	5407	23795	6516	20243	5836
Mg	893	256	1066	247	872	248
Mn	14	12	15	17	7.3	1.3
Na	2067	1188	6404	2324	7338	4380
P	2233	669	3303	1106	3360	268
Sr	7.9	3.4	20	7.2	8.2	8.5×10 <sup>-1</sup>
Zn	14	5.5	13	4.7	17	4.0
Cd	1.3×10 <sup>-1</sup>	1.3×10 <sup>-1</sup>	8.4×10 <sup>-2</sup>	9.2×10 <sup>-2</sup>	1.3×10 <sup>-1</sup>	5.6×10 <sup>-2</sup>
Co	1.6×10 <sup>-2</sup>	1.3×10 <sup>-2</sup>	2.4×10 <sup>-2</sup>	1.5×10 <sup>-2</sup>	1.1×10 <sup>-2</sup>	2.2×10 <sup>-3</sup>
Cs	4.8×10 <sup>-2</sup>	8.3×10 <sup>-2</sup>	1.9×10 <sup>-2</sup>	1.0×10 <sup>-2</sup>	1.4×10 <sup>-1</sup>	1.9×10 <sup>-2</sup>
Cu	2.7	1.0	2.9	1.2	3.0	5.7×10 <sup>-1</sup>
Li	4.5×10 <sup>-3</sup>	5.8×10 <sup>-3</sup>	2.8×10 <sup>-2</sup>	2.0×10 <sup>-2</sup>	1.8×10 <sup>-3</sup>	7.9×10 <sup>-4</sup>
Mo	8.6×10 <sup>-2</sup>	1.1×10 <sup>-1</sup>	1.2×10 <sup>-1</sup>	8.0×10 <sup>-2</sup>	4.9×10 <sup>-2</sup>	5.7×10 <sup>-3</sup>
Ni	2.1×10 <sup>-1</sup>	1.9×10 <sup>-1</sup>	3.3×10 <sup>-1</sup>	2.9×10 <sup>-1</sup>	1.3×10 <sup>-1</sup>	2.9×10 <sup>-2</sup>
Pb	2.8×10 <sup>-2</sup>	2.6×10 <sup>-2</sup>	3.8×10 <sup>-2</sup>	2.6×10 <sup>-2</sup>	7.7×10 <sup>-2</sup>	3.2×10 <sup>-2</sup>
Rb	16	10	6.5	3.9	21	3.2
Tl	2.9×10 <sup>-2</sup>	3.0×10 <sup>-2</sup>	1.0×10 <sup>-2</sup>	7.4×10 <sup>-3</sup>	2.7×10 <sup>-2</sup>	7.6×10 <sup>-3</sup>

### 3.2 安定同位体比

モデル試料国産 44 点、中国産 34 点（福建省 10 点、山東省 12 点、河北省 6 点、内モンゴル自治区 6 点）及びベトナム産 3 点の安定同位体比 ( $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 、 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ ) を表 5 及び図 1 に示す。

$^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  の平均値±標準偏差は、国産試料は  $0.7079 \pm 0.0010$ 、中国産試料は  $0.7101 \pm 0.0013$ 、ベトナム産試料は  $0.7126 \pm 0.0001$  であった。中国産試料の  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  の分布は、福建省産とそれ以外の産地（山東省、河北省、内モンゴル自治区）に大きく二分される傾向がみられ、また、福建省産試料は国産試料の分布と重なりが大きかった。福建省を除く中国産試料は国産試料よりも高い範囲（ $0.7099 \sim 0.7118$ ）に分布しており、ベトナム産試料も同様に高い値であった。

$^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$  の平均値±標準偏差は、国産試料は  $2.459 \pm 0.011$ 、中国産試料は  $2.477 \pm 0.013$ 、ベトナム産試料は  $2.480 \pm 0.008$  であり、分散が等しくないと仮定した t 検定において、国産試料と外国産試料の平均値間に有意な差が確認された ( $p < 0.01$ )。中国産試料は国産試料より高い傾向がみられ、 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  では国産試料の分布と重なっていた福建省産試料についても概ね国産試料より高い値であった。

表 5 モデル試料の安定同位体比 ( $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 、 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ )

	$^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$				$^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$			
	平均値	標準偏差	最小値	最大値	平均値	標準偏差	最小値	最大値
日本( $n=44$ )	0.7079	0.0010	0.7055	0.7095	2.459	0.011	2.428	2.475
中国( $n=34$ )	0.7101	0.0013	0.7051	0.7118	2.477	0.013	2.459	2.510
福建省( $n=10$ )	0.7085	0.0012	0.7051	0.7091	2.481	0.011	2.471	2.507
山東省( $n=12$ )	0.7112	0.0004	0.7106	0.7118	2.483	0.016	2.459	2.510
河北省( $n=6$ )	0.7106	0.0002	0.7103	0.7107	2.468	0.004	2.462	2.473
内モンゴル自治区( $n=6$ )	0.7104	0.0004	0.7099	0.7108	2.468	0.003	2.466	2.472
ベトナム( $n=3$ )	0.7126	0.0001	0.7126	0.7127	2.480	0.008	2.471	2.484

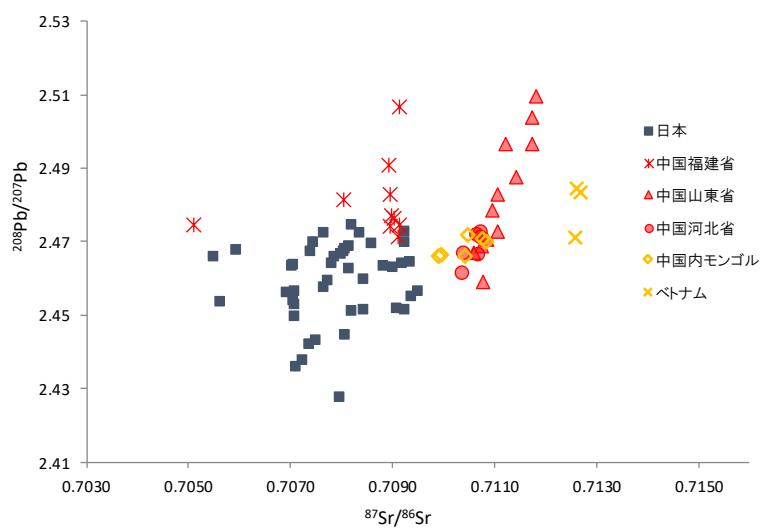


図 1 安定同位体比 ( $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 、 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ ) の散布図



### 3.3 元素濃度による判別の検討

国産試料 ( $n = 44$ ) 及び外国産試料 ( $n = 37$ ) 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。SVM により 5 元素 (Na、Sr、Co、Li 及び Rb) の常用対数を説明変数とする判別モデルが得られた (式 1)。

$$x = -5.364 \times \log_{10}[Na] - 5.288 \times \log_{10}[Sr] + 1.942 \times \log_{10}[Co] - 0.710 \times \log_{10}[Li] + 1.519 \times \log_{10}[Rb] + 25.335 \quad \dots \quad (\text{式 1})$$

$[Na]$ 、 $[Sr]$ 、 $[Co]$ 、 $[Li]$ 、 $[Rb]$  : Na、Sr、Co、Li、Rb の乾燥試料中濃度 (mg/kg)

LOOCV により得られた判別得点のヒストグラムを図 2 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 97.7 % (43/44)、外国産試料の 94.6 % (35/37) を正しく判別した。外国産で誤判別となった 2 試料はいずれもベトナム産であった。

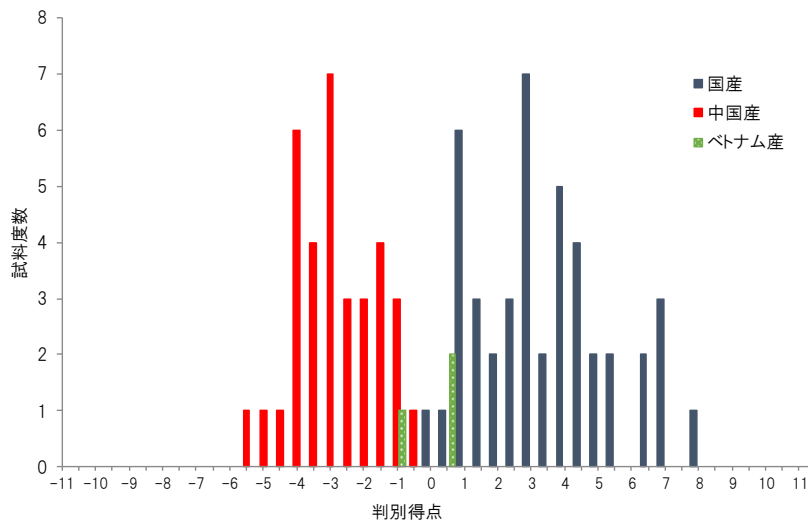


図 2 元素濃度による判別モデルの判別得点

### 3.4 安定同位体比による判別の検討

#### 3.4.1 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ による判別

$^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  を判別基準値として基準値以上の場合は外国産、基準値未満の場合は国産と判別することとし、モデル試料の  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  の分布範囲における判別精度 (特異度、感度) を算出した。基準値が 0.702 から 0.718 の範囲における偽陽性率 (100 - 特異度) を横軸、感度を縦軸にプロットした ROC 曲線を図 3 に示す。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値とした。判別基準値は 0.7092 となり、判別モデル構築に用いた試料のうち国産試料 86.4 % (38/44)、外国産試料 73.0 % (27/37) を正しく判別した (図 4)。外国産で誤判別となった 10 試料は、全て中国福建省産であった。

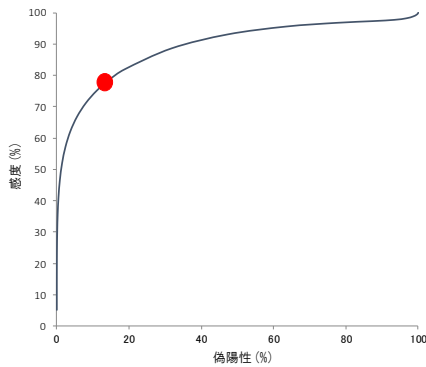


図3  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  判別の ROC 曲線

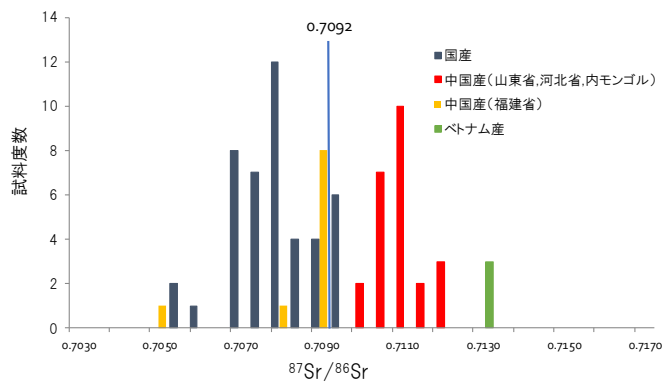


図4 モデル試料の  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$

### 3.4.2 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 及び $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ による判別

モデル試料の Sr 及び Pb 安定同位体比を説明変数として、SVM により国産—外国産判別モデルを構築した (式 2)。

$$x = -710.745 \times \log_{10}[^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}] - 1745.804 \times \log_{10}[^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}] + 18.188 \quad \dots \quad (\text{式} 2)$$

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。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 95.5 % (42/44)、外国産試料の 97.3 % (36/37) を正しく判別した。Sr と Pb 安定同位体比を組み合わせることで中国福建省産のうち外国産と正しく判別した割合は 90 % (9/10) となり、Sr 安定同位体比単独の判別より判別精度の向上がみられた。

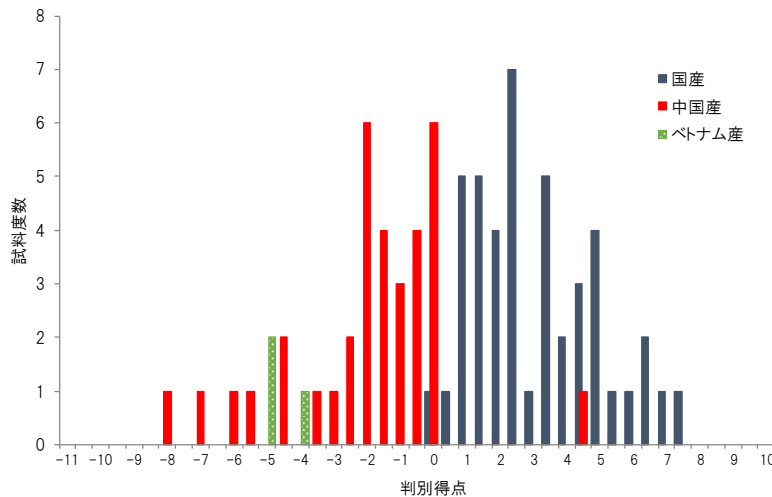


図5 Sr 及び Pb 安定同位体比による判別モデルの判別得点

### 3.4.3 判別モデルの適用範囲の検討

冷凍ニンジンの模擬試料と原料ニンジンの  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 、 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$  を測定した結果を表 6 に示す。ブランチング処理による安定同位体比の変動を模擬試料及びその原料ニンジンの測定値の差から求めたところ、 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 、 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$  とともに、中国産原料ニンジンよりも国産原料ニンジンを用いた模擬試料で大きかった。 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  の変動の最大値は国産模擬試料 (5 mm 幅) における 0.0003

で、模擬試料 ( $n = 3$ ) の標準偏差 0.0001 の 3 倍程度であった。 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$  の変動の最大値は国産模擬試料 (10 mm 幅) における 0.004 で、模擬試料 ( $n = 3$ ) の標準偏差 0.003 と同程度であった。

2.9.2 で構築した判別モデル ( $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 、 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ ) を用いて原料ニンジンと模擬試料の判別得点を算出した。国産原料から作製した模擬試料は、原料ニンジンの判別得点より低くなる傾向がみられ、原料ニンジンと模擬試料の判別得点の差は 0.6~0.9 であった。産地判別の基準値を 0 として模擬試料の原産地を判定したところ、12 試料とも原料ニンジンと一致する結果であった。これらの結果から煮込み調理用に 5~10 mm 幅程度にカット処理された冷凍ニンジンであれば、2.9.2 で構築した判別モデルに適用できる可能性が認められた。

表 6 模擬試料と原料ニンジンの  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 、 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$  及び生鮮判別モデルによる判別得点

	$^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$			$^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$			生鮮判別モデルによる判別得点
	平均値 ( $n=3$ )	標準偏差	模擬試料と原料ニンジンの差	平均値 ( $n=3$ )	標準偏差	模擬試料と原料ニンジンの差	
原料ニンジン(国産)	0.7061	0.0000		2.455	0.004		4.9
冷凍ニンジン 5mm幅	0.7064	0.0000	0.0003	2.456	0.003	0.002	4.3
冷凍ニンジン10mm幅	0.7064	0.0001	0.0003	2.459	0.003	0.004	4.0
原料ニンジン(中国産)	0.7105	0.0002		2.468	0.001		-1.5
冷凍ニンジン 5mm幅	0.7105	0.0002	0.0001	2.466	0.000	0.001	-1.3
冷凍ニンジン10mm幅	0.7106	0.0002	0.0001	2.468	0.001	0.000	-1.6

#### 4. まとめ

本研究では、元素濃度及び重元素安定同位体比を利用したニンジンの産地判別法を検討した。元素濃度については、5 元素 (Na、Sr、Co、Li 及び Rb) の常用対数を説明変数とする判別モデルが得られ、モデル構築用試料の的中率は、国産 97.7 %、外国産 94.6 %であった。安定同位体比については、 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  による判別では中国福建省産を全て誤判別としたが、 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  と  $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$  を組み合わせた判別モデルは福建省産の判別も可能であった。この判別モデルの的中率は、国産 95.5 %、外国産 97.3 %であり、 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  単独の判別よりも判別精度の向上がみられた。さらに、冷凍ニンジンの模擬試料を作製し、2.9.2 で構築した安定同位体比の判別モデルで判定したところ、加工前の原料ニンジンと一致する判別結果が得られた。この結果から軽度な加工処理であれば安定同位体比を用いた判別モデルが適用できる可能性が認められた。今後、利便性等の観点からカット野菜や冷凍野菜の需要が増加していくものとみられることから、野菜の原産地判別法については加工処理の影響を受けにくい判別技術を用いた開発が望まれる。

#### 謝 辞

本研究を実施するにあたり、国産ニンジンの収集にご協力いただいた農業協同組合の皆様へ深く感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 野菜生産出荷統計、農林水産省(2016~2018)
- 2) 植物検疫統計、農林水産省(2014~2016)
- 3) 東京都中央卸売市場年報(2018)

- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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: サトイモの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, **43**, 12-19(2019)
- 14) 後藤祐之介, 小岩智宏, 申基澈, 陀安一郎: 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, 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, **43**, 20-26(2019)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) Lugmair, G. W.; Galer, S. J. C.: Age and isotopic relationships among the angrites Lewis Cliff 86010 and Angra dos Reis, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **56**, 1673-1694(1992)
- 18) Tanimizu, M.; Ishikawa, T.: Development of rapid and precise Pb isotope analytical techniques using MC-ICP-MS and new results for GSJ rock reference samples, *Geochemical Journal*, **40**, 121-133(2006)
- 19) 中村哲: 元素分析によるネギの原産地判別マニュアルの検証, 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, **43**, 1-11(2019)

## DNA 分析によるスルメイカ判別法の開発及びその加工品における原料種判別の適用検討

足立 静香<sup>1</sup>, 豊田 正俊<sup>2</sup>, 高嶋 康晴<sup>1</sup>, 澤田 桂子<sup>3</sup>, 石原 敏史<sup>4</sup>, 若林 敏江<sup>5</sup>, 柳本 卓<sup>6</sup>

ADACHI Shizuka, TOYODA Masatoshi, TAKASHIMA Yasuharu, SAWADA Keiko,

ISHIHARA Toshifumi, WAKABAYASHI Toshie, YANAGIMOTO Takashi

### 要 約

農林水産消費安全技術センター (FAMIC) では、イカ類の名称 (種名) 表示の真正性の確認のため、ミトコンドリアDNAのCOI領域内の約560 bpの配列を解析するDNAシーケンス法により種を判別している。イカ加工品の主要な原材料であるスルメイカは、近年、漁獲量が減少しており、アメリカオオアカイカ等の他のイカ類への置換えが進んでいる。DNAシーケンス法は、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。このため、原料種に「スルメイカ」を使用した旨が表示された加工食品の表示が正しく行われているか否かを判別するスクリーニング法として、スルメイカ及びその他7種を対象としたPCR-RFLP法を開発し、イカ加工品への適用を確認した。

### 1. はじめに

食品は、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。

スルメイカ (*Todarodes pacificus*) は、アカイカ科 (Ommastrephidae) に属するイカ類で、東シナ海南部から日本海全域、オホーツク海、さらに東経 170 度に至る北西太平洋に広く分布している。スルメイカはイカ類の中で国内漁獲量が最も多く<sup>2)</sup>、生食用の他、干物 (するめ等)、さきいか、塩辛、惣菜等の加工食品の原材料として広く利用されている。また、スルメイカ以外にもアメリカオオアカイカ (*Dosidicus gigas*)、アカイカ (*Ommastrephes bartramii*)、アルゼンチンマツイカ (*Illex argentinus*)、カナダマツイカ (*Lillecebrosus*) などが使用されている<sup>3)~5)</sup>。近年、スルメイカの国内漁獲量は顕著に減少しており、平成 20 年の約 22 万トンに対して平成 30 年は約 5 万トンであった<sup>2)</sup>。こうしたスルメイカ不漁の影響を受け、イカ加工品の原材料は、上述したイカ類への代替が進んでいる。

また、スルメイカを使用した加工食品には、「スルメイカ使用」等の特色のある原材料の表示

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

<sup>3</sup> 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

<sup>4</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部 (現) 福岡センター

<sup>5</sup> 国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産大学校

<sup>6</sup> 国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産資源研究所

がされていることが多い。しかしながら、イカ類は、一部に全形で流通及び販売されるものもあるが、その多くは生鮮食品であれば、柵、細切されたいかそうめん等、加工食品であれば、さきいか等の乾燥珍味、塩辛、惣菜や冷凍食品に用いる切身といった外観から種を判別することは容易ではない形状で流通及び販売されている。

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））<sup>6)</sup>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。こうした制度の見直しを踏まえ、特に外観では名称（種名）表示の真正性の確認が難しい魚介類に適用できる科学的な判別分析法が必要とされ、FAMIC では、イカ類に対し、ミトコンドリア DNA の cytochrome c oxidase subunit I (COI) の遺伝子領域内の約 560 bp 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<sup>7)</sup>。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。若林らは、イカ加工品の原料種を COI 遺伝子領域の 854 bp 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) による判別法を開発している<sup>8)</sup>。そこで、この成果を活用して、幅広い加工度の食品に対応できるよう増幅長を短縮し、原料種に「スルメイカ」を使用した旨が表示された加工食品の表示が正しく行われているか否かを判別するスクリーニング法として、スルメイカ及び他のイカ類 7 種 (アメリカオオアカイカ、アカイカ、アルゼンチンマツイカ、カナダマツイカ、オーストラリアスルメイカ、ケンサキイカ及びソデイカ) を対象とした PCR-RFLP 法を開発したので、報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料

スルメイカ、アメリカオオアカイカ、アカイカ、アルゼンチンマツイカ、カナダマツイカ、ニュージーランドスルメイカ、オーストラリアスルメイカ、ケンサキイカ、アオリイカ、ソデイカ、コウイカ (以上 11 種、各 5 点) 及びヨーロッパコウイカ (3 点) は、国立研究開発法人水産研究・教育機構から入手した。ヤリイカ及びカリフォルニアヤリイカ (各 5 点) は、一般小売店から入手した。これらのイカ 14 種をイカ種判別の検討に供した。

イカ加工品は、原料にスルメイカを使用する商品群から選定し、乾燥珍味 (するめ、さきいか、焼きいか、いか足、くん製、イカフライ (スナック))、塩辛、惣菜 (沖漬、焼きいか、松前漬、唐揚げ)、冷凍食品 (イカリング、シーフードミックス、天ぷら) 及び缶詰の計 45 点を一般小売店で購入し、検討に供した (表 1)。このうち、スルメイカの別名である「真イカ」の表示を含め 14 点にスルメイカである旨記載があった。

### 2.2 DNA 抽出

試料は、表面を避けた内部の組織から 10~25 mg を採取した。イカ加工品にあつては、調味液等が付着している試料は表面を滅菌水で洗浄後に、また、イカフライ (スナック) は、試料を滅菌水に浸し、衣をふやかしてイカと衣を分離してから採取した。DNA 抽出は、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用い、製品プロトコールに従った。

表1 イカ加工品の分類、表示された種名、DNA塩基配列解析による推定種及びPCR-RFLPの結果

試料番号	商品群1	商品群2	表示された原料イカ種	塩基配列解析により推定された種*	PCR-RFLPの結果**
18TpDM1	乾燥珍味	魚介乾製品 (するめ)	スルメイカ	スルメイカ	切断
18UDM7	乾燥珍味	魚介乾製品 (するめ)	-	アルゼンチンマツイカ	非切断
18UDM9	乾燥珍味	魚介乾製品 (するめ)	-	スルメイカ	切断
18UDM13	乾燥珍味	魚介乾製品 (するめ)	-	スルメイカ	切断
18UDM15	乾燥珍味	魚介乾製品 (するめ)	-	スルメイカ	切断
18TpDM2	乾燥珍味	魚介乾製品 (さきいか)	スルメイカ	スルメイカ	切断
18TpDM6	乾燥珍味	魚介乾製品 (さきいか)	スルメイカ	スルメイカ	切断
18UDM3	乾燥珍味	魚介乾製品 (さきいか)	-	アメリカオオアカイカ	非切断
18UDM12	乾燥珍味	魚介乾製品 (さきいか)	-	アメリカオオアカイカ	非切断
18TpDM3	乾燥珍味	魚介乾製品 (焼きいか)	スルメイカ	スルメイカ	切断
18UDM5	乾燥珍味	魚介乾製品 (ソフトいか)	-	PCR増幅せず	PCR増幅せず
18TpDM4	乾燥珍味	魚介乾製品 (下足)	スルメイカ	スルメイカ	切断
18UDM6	乾燥珍味	魚介乾製品 (下足)	-	アメリカオオアカイカ	非切断
18UDM8	乾燥珍味	魚介乾製品 (いか耳ロール)	-	スルメイカ	切断
18UDM2	乾燥珍味	いかくん製品	-	アカイカ	非切断
18UDM4	乾燥珍味	いかくん製品	-	アメリカオオアカイカ	非切断
18TpDM5	乾燥珍味	イカフライ(スナック)	スルメイカ	スルメイカ	切断
18UDM14	乾燥珍味	イカフライ(スナック)	-	-	PCR増幅せず
19TpDM1	乾燥珍味	イカフライ(スナック)	スルメイカ	-	切断
19UDM1	乾燥珍味	イカフライ(スナック)	-	-	切断
19UDM2	乾燥珍味	イカフライ(スナック)	-	-	PCR増幅せず
19UDM3	乾燥珍味	イカフライ(スナック)	-	-	切断
19UDM4	乾燥珍味	イカフライ(スナック)	-	-	切断
18TpDM7	乾物	乾燥するめ(細切)	スルメイカ	スルメイカ	切断
18UDM10	乾物	乾燥するめ(細切)	-	スルメイカ	切断
18UDM11	乾物	乾燥するめ(細切)	-	スルメイカ	切断
18TpAM1	魚介類加工品	塩辛	スルメイカ	スルメイカ	切断
18TpAM2	魚介類加工品	塩辛	スルメイカ	スルメイカ	切断
18UAM1	魚介類加工品	塩辛	-	アカイカ	非切断
18UAM2	魚介類加工品	塩辛	-	スルメイカ	切断
18UAM3	魚介類加工品	塩辛	-	アメリカオオアカイカ	非切断
18UAM4	魚介類加工品	塩辛	-	アメリカオオアカイカ	非切断
18UAM5	魚介類加工品	塩辛	-	スルメイカ	切断
18UAM6	魚介類加工品	塩辛	-	アルゼンチンマツイカ	非切断
18TpBM1	魚介類加工品	ポイルカット	真いか	スルメイカ	切断
18TpCM1	惣菜	沖漬	スルメイカ	スルメイカ	切断
18TpCM2	惣菜	焼きいか	真いか	スルメイカ	切断
18UCM3	惣菜	焼きいか	-	アルゼンチンマツイカ	非切断
18UCM2	惣菜	松前漬	-	スルメイカ	切断
18DgCM1	惣菜	いかステーキ	アメリカオオアカイカ	アメリカオオアカイカ	非切断
18UCM1	惣菜	いか唐揚げ	-	スルメイカ	切断
18TpFM1	冷凍食品	いかリング	スルメイカ	スルメイカ	切断
18UFM1	冷凍食品	シーフードミックス	-	アメリカオオアカイカ	非切断
18UFM2	冷凍食品	いかの天ぷら	-	アメリカオオアカイカ	非切断
18UKM1	缶詰	味付いか	-	カナダマツイカ	非切断

\* IkaCOI プライマー対による COI遺伝子領域 337 bp による判別結果

\*\* IkaCOI プライマー対による PCR 産物を制限酵素 BstXI により処理した結果

表 2 プライマー設計において比較したイカ類及び IkaCOI プライマー対による PCR 結果

種名	学名	DDBJデータの 比較数	BstXI認識部 位の有無*	IkaCOIプライマー対 による378 bpの増幅**
アカイカ科				
スルメイカ	<i>Todarodes pacificus</i>	36	+	+
ヨーロッパスルメイカ	<i>T. sagittatus</i>	4	-	
ミナミスルメイカ	<i>T. filippovae</i>	1	-	
アメリカオオアカイカ	<i>Dosidicus gigas</i>	27	-	+
アカイカ	<i>Ommastrephes bartramii</i>	6	-	+
アルゼンチンマツイカ	<i>Illex argentinus</i>	6	-	+
カナダマツイカ	<i>I. illecebrosus</i>	1	-	+
ニュージーランドスルメイカ	<i>Nototodarus sloanii</i>	2	-	-****
オーストラリアスルメイカ	<i>N. gouldi</i>	1	-	+
トビイカ	<i>Sthenoteuthis oualaniensis</i>	10	-	
ヤリイカ科				
ケンサキイカ	<i>Uroteuthis edulis</i>	3	-	+
ヤリイカ	<i>Heterololigo bleekeri</i>	13	-	-
カリフォルニアヤリイカ	<i>Doryteuthis opalescens</i>	2	-	-
パタゴニアヤリイカ	<i>D. gahi</i>	2	-	-
アオリイカ	<i>Sepioteuthis lessoniana</i>	4	***	-
ソデイカ科				
ソデイカ	<i>Thysanoteuthis rhombus</i>	2	-	+
テカギイカ科				
ドスイカ	<i>Beryteuthis magister</i>	4	-	
コウイカ科				
コウイカ	<i>Sepia esculenta</i>	1	-	-
ヨーロッパコウイカ	<i>S. officinalis</i>	1	-	-

\* IkaCOI プライマー対による 378 bp の増幅領域内の制限酵素 BstX I 認識部位の有無 + : 認識部位あり  
- : 認識部位なし

\*\* 種判別に供した 14 種のイカ試料による PCR 増幅の結果 + : 増幅あり - : 増幅なし

\*\*\* 4 データ中 1 データに制限酵素 BstX I 認識部位があった。

\*\*\*\* 378 bp 以外の増幅を確認

## 2.3 プライマーの設計及び PCR 条件

プライマーは、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録されているイカ類のデータベースから 19 種のイカ (スルメイカ、ヨーロッパスルメイカ、ミナミスルメイカ、アメリカオオアカイカ、アカイカ、アルゼンチンマツイカ、カナダマツイカ、ニュージーランドスルメイカ、オーストラリアスルメイカ、トビイカ、ケンサキイカ、ヤリイカ、カリフォルニアヤリイカ、パタゴニアヤリイカ、アオリイカ、ソデイカ、ドスイカ、コウイカ及びヨーロッパコウイカ) (表 2) の COI 遺伝子領域を比較して、BstXI 認識部位を含み、幅広い加工度の食品に対応できるよう増幅長を短縮するように設計した。プライマーの設計には、Primer3Plus (<http://www.primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) を用いた。

PCR 反応液は、0.4 Units の DNA ポリメラーゼ KOD FX Neo (東洋紡) を含み、最終濃度が 1× PCR Buffer for KOD FX Neo (DNA ポリメラーゼ添付品)、0.4 mmol/L dNTP Mixture (DNA ポリメラーゼ添付品)、プライマー対 (フォワードプライマー IkaCOI-F 及びリバースプライマー IkaCOI-R) (図 1) 各 0.3 μmol/L となるよう混合し、2.0 μL の抽出 DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を 20.0 μL とした。PCR の温度条件は、最初の熱変性として 94 °C 2 分で保持後、熱変性 98 °C 10 秒、アニーリング 56 °C 30 秒、伸長反応 68 °C 10 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 (Thermo Fisher Scientific) を主に使用し、Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)、ProFlex™ PCR System (Thermo Fisher Scientific) 及び TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (タカラバイオ) を用いて、PCR 条件の頑健性の確認を行った。

アガロースゲル電気泳動は、エチジウムブロマイド (ニッポンジーン) を 0.5 μg/mL 含む質量分率 2~3 % アガロースゲル (Agarose L03 「TAKARA」 (タカラバイオ) 又は 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。

## 2.4 DNA シークエンス法 (DNA 塩基配列解析)

DNA 塩基配列の決定は、ダイレクトシークエンス法によって行った。種判別に供したイカ 14 種の DNA 塩基配列は、COI 遺伝子領域内の約 700 bp を対象とした。PCR 反応液は、0.5 Units DNA ポリメラーゼ *TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> Hot Start Version (以下「*Ex Taq*<sup>®</sup> HS」; タカラバイオ) を含み、最終濃度が 1× *Ex Taq* Buffer (*Ex Taq*<sup>®</sup> HS 添付試薬)、0.2 mmol/L dNTP Mixture (*Ex Taq*<sup>®</sup> 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:GGTCAACAAATCATAAA GATATTGG 及びリバースプライマー HCO2198:TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA)<sup>8)</sup> 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 分で保持後、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 分を行った。イカ加工品は、設計したプライマー対 (IkaCOI-F 及び IkaCOI-R) を用い、2.3 に示した条件で PCR を実施した。

PCR 産物の精製には、*illustra*<sup>™</sup> *ExoProStar*<sup>™</sup> (グローバルライフサイエンステクノロジーズ ジャパン) を用いた。1.0 μL の *Exonuclease I*、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。

サイクルシークエンス反応には、*BigDye*<sup>™</sup> *Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific) を用いた。反応液は、*BigDye*<sup>™</sup> *Terminator v3.1 Ready Reaction Mix* 2.0 μL、*BigDye*<sup>™</sup> *sequencing buffer (5×)* 3.0 μL に、最終濃度が 3.0 pmol/L となるように プライマーを混合した。使用するプライマーは、種判別に供したイカ 14 種にあっては、プライマー-LCO1490 又は HCO2198 を、イカ加工品にあっては、プライマー-IkaCOI-F 又は IkaCOI-R を用いた。これに約 2.5 ng/μL に調製した精製 PCR 産物 2.0 μL を加え、滅菌水で全量を 20 μL とした。サイクルシークエンス反応の温度条件は、最初の熱変性として 94 °C 1 分で保持後、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。DNA 塩基配列の決定にかかる PCR は、サーマルサイクラー-GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

サイクルシークエンス後の余剰な蛍光色素の除去は、*AutoSeq G-50* (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン) を用い、製品プロトコールに従った。G-50 カラムから溶出した精製 DNA 溶液を DNA シークエンサーにそのまま供し、DNA 塩基配列を決定した。DNA シークエンサーは、*Applied Biosystems*<sup>™</sup> 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。DNA 塩基配列の比較は、DDBJ に登録されているスルメイカ (AB158364)、アメリカオオアカイカ (AB571181)、アカイカ (AB715401)、アルゼンチンマツイカ (AB675089)、カナダマツイカ (AB270933)、ニュージーランドスルメイカ (AB270938)、オーストラリアスルメイカ (AB270939)、ケンサキイカ (AB675080)、ヤリイカ (AB441181)、カリフォルニアヤリイカ (KP336703)、アオリイカ (KM878671、KF019369)、ソデイカ (EU735371)、コウイカ (AB266516) 及びヨーロッパコウイカ (AB266516) と比較し、相同性の高いものを当該種と判定した。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 DNA シークエンス法による種の判定

種判別に供したイカ 14 種について、COI プライマー対 (LCO1490-HCO2198) を用いた PCR を行い、得られた約 700 bp の増幅産物を用いて、DNA 塩基配列解析を行った。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 COI 遺伝子領域 558 bp の配列を決定し、DDBJ に登録された DNA 塩基配列と照合した判定結果は、供試した試料の種と一致しており、今回供試した試料がスルメイカ判別の検討試料として使用できることを確認した。アオリイカは 5 点分析し、2 点に制限酵素 BstXI 認識部位が存在していた。

### 3.2 判別用プライマーの設計及び PCR-RFLP 法によるスルメイカ判別

スルメイカ判別の検討対象としたイカ 14 種の COI 遺伝子領域の比較から、スルメイカと一部のアオリイカに存在する制限酵素 BstXI 認識部位 (5' CCANNNNN<sup>^</sup>NTGG 3') を含み、アオリイカでは増幅せず、かつ、アガロースゲル電気泳動で判別できる断片長となる位置にフォワードプライマー IkaCOI-F (GCTGTAGAAAGAGGGGCAGG)、リバースプライマー IkaCOI-R (TTCGGGATGACCAAAGAACC A) を設計し、その増幅長は 378 bp であった (図 1)。

種判別に供したイカ 14 種における IkaCOI プライマー対による PCR の結果を表 2 及び図 2 に、PCR 増幅産物の得られた 8 種の PCR-RFLP の結果を図 3 に示した。スルメイカのみが制限酵素 BstXI により切断される「切断型 (スルメイカ型)」となり、アメリカオオアカイカ、アカイカ、アルゼンチンマツイカ、カナダマツイカ、オーストラリアスルメイカ、ケンサキイカ及びソデイカは切断されない「非切断型」であった。一方、アオリイカは制限酵素 BstXI 認識部位の存在の有無にかかわらず、ヤリイカ、カリフォルニアヤリイカ、コウイカ、ヨーロッパコウイカと同様に PCR 増幅されず、ニュージーランドスルメイカは約 700 bp 付近にバンドを検出した。

これらの結果から、IkaCOI プライマー対による PCR において種判別に供したイカ 14 種のうちスルメイカを含む 8 種に 378 bp の増幅産物が得られ、これら 8 種を対象に制限酵素 BstXI を用いた PCR-RFLP によりスルメイカであるか否かを判別するスクリーニングが可能であることが確認できた。

### 3.3 イカ加工品における判別用プライマーの適用

イカ加工品 39 点について、IkaCOI プライマー対を用いた PCR を行ったところ、38 点から 378 bp の増幅産物が得られた。増幅しなかった 1 点 (18UDM5) は、醸造酢を主体に調味された商品であり、酸の影響により DNA の消化が進んでいることが考えられた<sup>9)</sup>。得られた 378 bp の増幅産物を用い、DNA 塩基配列解析を行い、プライマー配列を除いた COI 遺伝子領域 337 bp の配列を決定した。この配列と種判別に供したイカ 14 種との相同性を比較した結果、種の判定を行ったイカ加工品 38 点は、スルメイカ 23 点、アメリカオオアカイカ 9 点、アルゼンチンマツイカ 3 点、アカイカ 2 点及びカナダマツイカ 1 点であった (表 1)。なお、スルメイカ表示のある 14 点は、いずれもスルメイカと判別された。

種の判定を行ったイカ加工品 38 点について、増幅した 378 bp の PCR 産物を用いて、制限酵素 BstXI 処理を行った。その結果、DNA シークエンス法によりスルメイカと判別された 23 点すべての試料が、制限酵素 BstXI により切断される「切断型 (スルメイカ型)」となり、アメリカオオアカイカ、アカイカ、アルゼンチンマツイカ、カナダマツイカと判別された試料は、いずれも制限酵素 BstXI により切断されない「非切断型」となり、誤判定となる試料はなかった (表 1)。

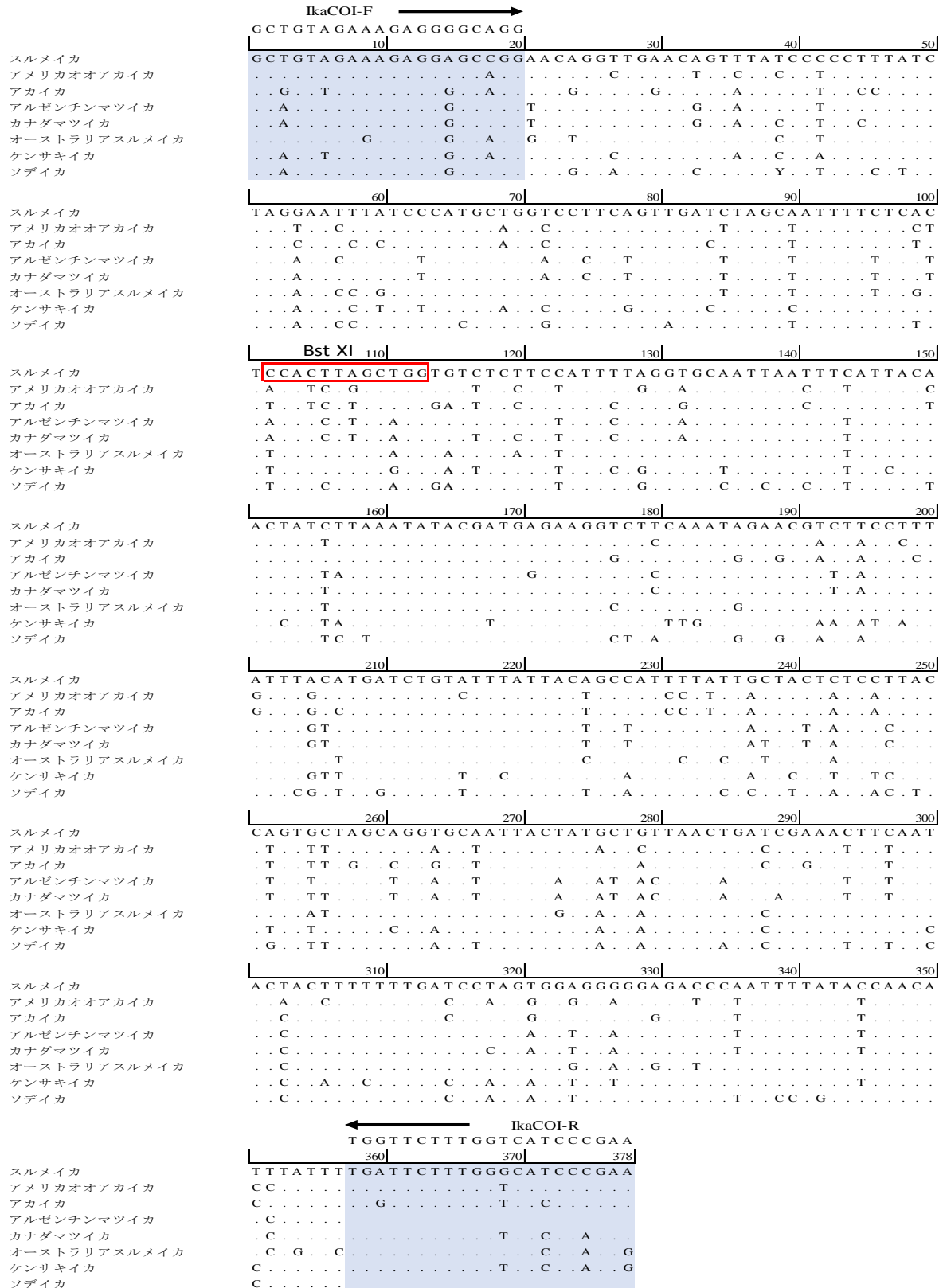


図1 イカ8種のDNA塩基配列

スルメイカ (AB158364)、アメリカオオアカイカ (AB571181)、アカイカ (AB715401)、アルゼンチンマツイカ (AB675089)、カナダマツイカ (AB270933)、オーストラリアスルメイカ (AB270939)、ケンサキイカ (AB675080)、ソデイカ (EU735371) における IkaCOI プライマー対による PCR 産物の DNA 塩基配列 (378 bp) である。スルメイカと共通の塩基は「・」で示し、異なる塩基はその塩基名を記載した。各プライマー領域の上部にプライマー配列を記し、プライマー IkaCOI-F 及び IkaCOI-R の領域を青色で、制限酵素 BstXI 認識部位を四角で囲んで示した。なお、塩基名の Y は T 又は C を表す。

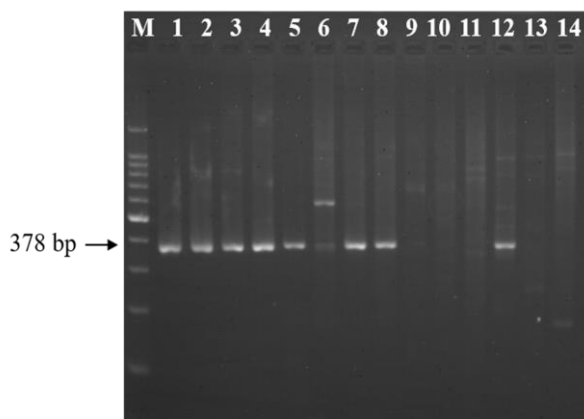


図2 イカ14種のPCRの泳動図

IkaCOI プライマー対による PCR 産物

1: スルメイカ 2: アメリカオオアカイカ 3: アカイカ 4: アルゼンチンマツイカ 5: カナダマツイカ 6: ニュージールランドスルメイカ 7: オーストラリアスルメイカ 8: ケンサキイカ 9: ヤリイカ 10: カリフォルニアヤリイカ 11: アオリイカ 12: ソデイカ 13: コウイカ 14: ヨーロッパコウイカ

M: 100 bp Ladder

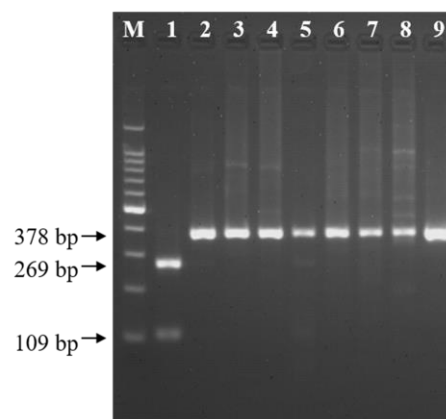


図3 イカ8種のPCR-RFLPの泳動図

IkaCOI プライマー対により PCR 産物が得られた試料を制限酵素 BstXI により処理した。

1: スルメイカ 2: アメリカオオアカイカ 3: アカイカ 4: アルゼンチンマツイカ 5: カナダマツイカ 6: オーストラリアスルメイカ 7: ケンサキイカ 8: ソデイカ 9: 制限酵素未処理 M: 100 bp Ladder

イカフライ（スナック）のように高度に加工された商品については、PCR 増幅がみられないことがあるとの報告<sup>4)</sup>があるが、増幅長を短縮した本分析法による PCR-RFLP では、今回の試料としたイカフライ（スナック）7点中2点で増幅が見られず、残り5点では判別が可能であった（表1）。今回のPCRで増幅しなかった商品は、衝撃を与えると商品が割れるような固めの状態であり、一方、増幅した商品は、いわゆる「ソフト」「やわらかい」と謳われている折り曲げることができる状態のものが含まれており、加工度の違いが反映していると考えられた。また、缶詰を1点供したが、PCR産物量が少なかったため、商品によっては判別ができない可能性が推測された。

以上の結果より、加工度により分析できない商品が含まれるものの、乾燥珍味、塩辛、イカの個体が分離できる総菜、冷凍食品及び缶詰といった商品群においてPCR-RFLP法によるスルメイカ判別法は適用可能であった。

#### 4. まとめ

スルメイカは、イカ加工品の主要な原材料であるが、近年のスルメイカ不漁の影響を受け、アメリカオオアカイカなどへの代替が進んでいる。このため、原料に「スルメイカ」を使用している旨表示されている加工品の原材料がスルメイカであるか否かを迅速・簡便にスクリーニング判別法として、PCR-RFLP法を検討した。設計したIkaCOIプライマー対によるPCRでは、種判別に供したイカ類14種のうちスルメイカを含む8種に378 bpの増幅産物が得られ、これら8種を対象とした制限酵素BstXIを用いたPCR-RFLPの結果は、スルメイカのみが切断され、スルメイカ以外の7種は切断されなかった。これにより、スルメイカとその他7種のイカ（アメリカオオアカイカ、アカイカ、アルゼンチンマツイカ、カナダマツイカ、オーストラリアスルメイカ、ケンサキイカ、及びソデイカ）を対象としたPCR-RFLP法によるスクリーニング検査が可能となった。適用可能な加工食品は、乾燥珍味、塩辛、総菜、冷凍食品及び缶詰であった。

## 文 献

- 1) 新編・世界イカ類図鑑（全国いか加工業協同組合）
- 2) 農林水産省「平成30年漁業・養殖業生産統計」
- 3) 若林敏江，柳本 卓：塩基配列分析に基づくスルメイカ不漁期のイカ加工製品原料種判別，日本DNA多型学会第26回大会講演要旨（2017）
- 4) 若林敏江，柳本 卓，酒井光夫，一井太郎，三木克弘，小林敬典：DNA解析結果に基づくアメリカオオアカイカの利用実態，スルメイカ資源評価協議会報告（平成20年度），日本海区水産研究所. 74（2009）
- 5) 水産物缶詰及び水産物瓶詰の日本農林規格，農林水産省告示第3110号（平成25年12月24日（最終改正））
- 6) 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）
- 7) 若林敏江，柳本 卓，酒井光夫，一井太郎，三木克弘，小林敬典：mtDNA COI領域を用いたイカ加工製品の原料種判別，DNA多型，**17**，144-146（2009）
- 8) 若林敏江：ミトコンドリアDNA塩基配列データに基づく海外イカ加工製品の原料種判別，DNA多型，**21**，99-102（2013）
- 9) 山下倫明：さかなの産地を調べる，第3回成果発表会講演要旨集（平成17年度），国立研究開発法人 水産研究・教育機構

# DNA 分析による複数の品種が混合されたダイズ加工品における 混入割合推定法の開発

豊田 正俊<sup>1</sup>, 澤田 桂子<sup>2</sup>, 足立 静香<sup>3</sup>, 石原 敏史<sup>4</sup>, 岸根 雅宏<sup>5</sup>

TOYODA Masatoshi, SAWADA Keiko, ADACHI Shizuka, ISHIHARA Toshifumi, KISHINE Masahiro

## 要 約

原料ダイズに「フクユタカ」のみを使用している旨が表示された豆腐について、品種表示の真正性確認のために、リアルタイム PCR を用いた検査法を検討した。デジタル PCR による先行研究を参考に、リアルタイム PCR 用に設計した検出系及びプライマーを用いた  $\Delta\Delta Ct$  法により、フクユタカ型以外の品種の混入割合を推定する検査法を開発した。

## 1. はじめに

一般加工食品の表示においては、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）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 パーセントである場合を除き、その重量の割合を表示することが義務づけられている。

ダイズ加工品には、原料ダイズが特定の品種であることを強調した商品が見られる。一方、ダイズ加工品に使用された品種を目視や食味等で判別することは困難であるため、DNA を分析対象とした品種判別方法の確立が求められてきた。そこで、FAMIC では、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。）食品研究部門と共同で、ダイズ加工品のうち豆腐、豆乳、おから及び油揚げを対象に Tetra-Primer ARMS-PCR 法を用いて「フクユタカ」、「ユキホマレ」及び「ユキシズカ」表示の真正性を確認する方法を開発した<sup>1)</sup>。しかしながら、Tetra-Primer ARMS-PCR 法を用いた方法は定性分析法であるため、表示された品種以外の品種がどの程度混入しているかはわからない。このため、表示された品種以外の品種の混入割合を推定する新たな検査方法の開発が望まれている。

定量的な品種判別法を実現する手法としては、デジタル PCR とリアルタイム PCR が考えられる。デジタル PCR は、基準試料を用いることなく絶対的な定量を可能とする最新の技術である。これまでに、豆腐を対象として、「フクユタカ」及び「エンレイ」のデジタル PCR による定量的品種判別法が報告されている<sup>2)</sup>。一方、リアルタイム PCR は、定量に基準試料が必要となるが、遺伝子組換え食品の検査方法<sup>3)</sup>等に広く採用されている。また、現時点では、リアルタイム PCR 装置はデジタル PCR 装置と比較して広く普及していると考えられる。そこで本研究では、豆腐を

<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

<sup>2</sup> 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

<sup>3</sup> 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

<sup>4</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部（現）福岡センター

<sup>5</sup> 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

ダイズ加工品の代表とし、豆腐の原料品種として強調されることの多い「フクユタカ」を対象に、リアルタイム PCR を用いた異品種（フクユタカ以外の品種）の混入割合推定方法を検討したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料及び DNA 抽出

リアルタイム PCR のプライマー設計、直線性、増幅効率及び特異性の検証には、ダイズ原種種子を用いることとし、「フクユタカ」原種種子は福岡県農林業総合試験場から、「リュウホウ」原種種子は山形県農業総合研究センターからそれぞれ分与されたものを用いた。種子からの DNA 抽出には、GM quicker（ニッポンジーン）を用いた。

豆腐試料は、市販の「フクユタカ」、「エンレイ」及び「ユキホマレ」種子並びに農業協同組合から入手した「里のほほえみ」及び「おおすず」種子を原料として、川瀬ら<sup>4)</sup>の手法に準拠して作製したのを用いた。このうち、フクユタカと異品種（エンレイ、ユキホマレ、里のほほえみ及びおおすず）の混合豆腐試料は、原料中の異品種を種子の重量比で 5%、10%、30%及び 50%となるように混合して作製した（表 1）。なお、作製に用いる種子重量は計 12 g とした。豆腐試料からの DNA 抽出には、GM quicker 4（ニッポンジーン）を用いた。

抽出 DNA 溶液の濃度測定には、NanoDrop ND-1000（Thermo Fisher Scientific）を用いた。

### 2.2 リアルタイム PCR 及びデジタル PCR

DNA マーカーには、岸根ら<sup>2)</sup>のデジタル PCR を用いた方法と同様に、フクユタカの第 14 染色体に存在する 3 塩基の欠失部位（Gm14\_01747305D）を用いた。挿入・欠失（Indel）マーカーに係る情報は、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。なお、フクユタカ以外にも同じ欠失を持つ品種があるため<sup>2)</sup>、以降、この欠失を持つ品種を「フクユタカ型」、持たない品種を「異品種型」と呼ぶ。令和元年度における国産大豆の検査数量上位 20 銘柄<sup>5)</sup>では、「とよまさり」構成品種の「トヨハルカ」及び「とよみづき」並びに「タンレイ」がフクユタカ型であり、その他の銘柄・品種は異品種型である。

リアルタイム PCR には、表 2 に示すプライマーを用いた。PCR 反応液は、5.0  $\mu$ L の PowerUP SYBR Green Master Mix（Thermo Fisher Scientific）にフォワード及びリバースプライマーを最終濃度 0.5  $\mu$ mol/L となるよう混合し、12.5 ng の抽出 DNA を加え、滅菌水で全量を 10  $\mu$ L とした。3 反応分をまとめて調製し、PCR プレートの 3 ウェルに分注した。リアルタイム PCR 装置は、Applied Biosystems<sup>TM</sup> 7500 リアルタイム PCR システム（Thermo Fisher Scientific）を用いた。PCR は、UNG 処理として 50  $^{\circ}$ C 2 分及び最初の熱変性として 95  $^{\circ}$ C 2 分で保持後、熱変性 95  $^{\circ}$ C 15 秒、アニーリング及び伸長反応 60  $^{\circ}$ C 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクルで行った。PCR 終了後、DNA の増幅に伴い増加する蛍光強度が閾値に達した際のサイクル数（Threshold cycle、以下「Ct 値」という。）をウェルごとに算出した。蛍光強度の閾値は 0.2 とした。

デジタル PCR は岸根ら<sup>2)</sup>の方法に準拠し、Digital PCR Chip v2（Thermo Fisher Scientific）及び QuantStudio<sup>TM</sup> 3D デジタル PCR システム（Thermo Fisher Scientific）を用いて行った。なお、蛍光強度による陽性・陰性判定の閾値は、VIC : 1200、FAM : 2000 とした。

表 1 作製した豆腐試料

試料名	原料ダイズ (重量比)				試料名	原料ダイズ (重量比)			
FU	フクユタカ	100 %			SH10	フクユタカ	90 %	里のほほえみ	10 %
EN5	フクユタカ	95 %	エンレイ	5 %	SH30	フクユタカ	70 %	里のほほえみ	30 %
EN10	フクユタカ	90 %	エンレイ	10 %	SH50	フクユタカ	50 %	里のほほえみ	50 %
EN30	フクユタカ	70 %	エンレイ	30 %	OS10	フクユタカ	90 %	おおすず	10 %
EN50	フクユタカ	50 %	エンレイ	50 %	OS30	フクユタカ	70 %	おおすず	30 %
EN100			エンレイ	100 %	OS50	フクユタカ	50 %	おおすず	50 %
YK10	フクユタカ	90 %	ユキホマレ	10 %					
YK30	フクユタカ	70 %	ユキホマレ	30 %					
YK50	フクユタカ	50 %	ユキホマレ	50 %					

表 2 リアルタイム PCR に用いたプライマー

検出する系	プライマー名	向き	配列 (5'-3')	増幅長 (bp)
異品種型	FuN-F	フォワード	ACGGGAATATGAATTCATCGAAGAC	53
	FuN-R	リバース	CAATGGCGACGATGGCTTG	
共通配列	Gm14C-F	フォワード	ACCCCGCTATAGCATTITTCG	51
	Gm14C-R	リバース	AAGGAGCGGGTATCGTTCC	

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 リアルタイム PCR 用プライマーの設計

まず、デジタル PCR による報告<sup>2)</sup>と同じプライマー・プローブを用いて、デュアルプローブ法によるリアルタイム PCR を行ったところ、フクユタカ型の PCR 効率が悪いことが判明した（データ省略）。フクユタカの Gm14\_01747305D 近辺の塩基配列をダイレクトシークエンス法で解析したところ、フクユタカとリファレンスゲノム<sup>6)</sup>の間には、Indel 領域の直前部位に 1 塩基多型が複数存在することがわかった（データ省略）。

そのため、リアルタイム PCR による検出には、SYBR Green を用いた検出系を採用し、異品種型を検出する系（以下「FuN」という。）と、フクユタカ型及び異品種型の共通配列を検出する系（以下「Gm14C」という。）の 2 つの系を設計した（図 1）。FuN のプライマーは、DNA マーカーの Indel 領域及びその直前の 1 塩基多型領域（以下「特異的配列領域」という。）上に作製した（図 1、表 2）。Gm14C のプライマーは、特異的配列領域の直後にあるフクユタカ型及び異品種型の両方で塩基配列が共通している領域上に作製した（図 1、表 2）。なお、全ての試料において、FuN と Gm14C は同一ランで測定を行った。

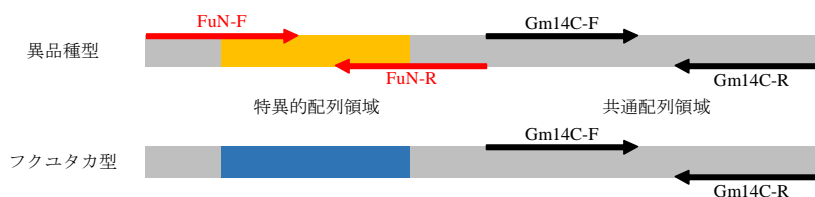


図 1 リアルタイム PCR による検出系

異品種型検出用のプライマー（赤矢印）は、異品種型の特異的配列領域に結合するが、フクユタカ型の特異的配列領域には結合しない。一方、共通配列検出用のプライマー（黒矢印）は、両者の共通配列領域に結合する。



### 3.2 リアルタイム PCR の直線性、増幅効率及び特異性の検証

リュウホウ原種種子の抽出 DNA 溶液を滅菌水で希釈し、鋳型 DNA が 1 ウェルあたり 0.1、0.5、2.5、12.5、25 ng になるように反応液に添加して 3 ウェル併行でリアルタイム PCR を行った。解析して得られた Ct 値を縦軸に、鋳型 DNA 量の常用対数を横軸にプロットして作成した検量線を図 2 に示す。また、検量線の傾き、相関係数 ( $R^2$ ) 及び増幅効率を表 3 に示す。

FuN 及び Gm14C とともに検量線の相関係数 ( $R^2$ ) は 0.99 以上であり、直線性は良好であった。

増幅効率は、FuN は 98.6 %、Gm14C は 99.7 % であり、理論値の 100 % にかなり近い値であった。

また、フクユタカ原種種子の抽出 DNA (12.5 ng) を鋳型とした場合は、Gm14C ではリュウホウ原種種子と同様の Ct 値が得られたが、FuN では増幅曲線が得られなかったことから、FuN 用プライマーの特異性を確認できた (データ省略)。

なお、本研究で採用した SYBR Green を用いた検出系では、測定値が非特異的な増幅の影響を受ける可能性があるため、リアルタイム PCR 後に融解曲線解析を行い、非特異的な増幅が起きていないことを確認することとした。本研究で設計した検出系では、融解曲線解析において単一のピークのみが得られ、非特異的な増幅は起きていないことが確認されている (データ省略)。

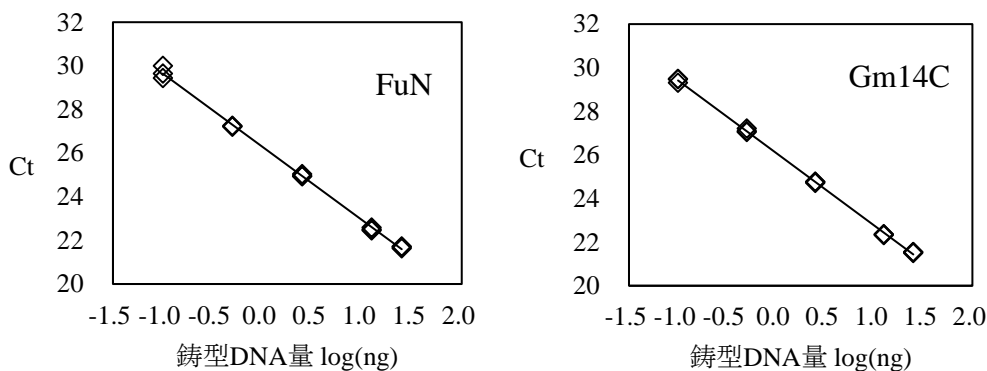


図 2 異品種型種子の抽出 DNA の希釈系列による検量線

リュウホウ種子から抽出した DNA の希釈系列を用いて、FuN 及び Gm14C のリアルタイム PCR を行い、得られた Ct 値から検量線を作成した。

表 3 PCR の増幅効率等

	FuN	Gm14C
検量線の傾き	-3.36	-3.33
検量線の相関係数 ( $R^2$ )	0.998	0.999
増幅効率	98.6 %	99.7 %

### 3.3 豆腐を用いた推定混入率の検証

DNA 希釈系列により増幅効率が理論値に近いことや非特異的な増幅が起きていないこと等を確認できたため、豆腐試料における推定混入率の検証を行った。まず、リアルタイム PCR により、表 1 に示した豆腐の抽出 DNA 溶液を水で希釈して、鋳型 DNA が 1 ウェルあたり 12.5 ng になるように反応液に添加して 3 ウェル併行で測定を行った。増幅曲線の例を図 3 に示す。推定混入率

の算出は、3 ウェルの Ct 値の平均値を用いて  $\Delta\Delta Ct$  法により行った（下式参照）。なお、異品種 100% である  $\Delta\Delta Ct$  算出の基準試料には、エンレイのみを用いて作製した豆腐（試料：EN100）を用いた。また、対象試料の FuN から増幅曲線が得られない場合は異品種混入率 0% とした。この方法による推定混入率と試料作製時の異品種混合率は、異品種混合率が高くなるにつれて差が大きくなるものの一定の相関を示した（表 4）。また、供試した 4 種の異品種では、混合した品種の違いに関わらず概ね同様の推定混入率が得られた（表 4）。

（ $\Delta\Delta Ct$  法による推定混入率の算出方法）

1. 対象試料と基準試料のそれぞれについて  $\Delta Ct$  を計算する。

$$\Delta Ct = Ct_{FuN} - Ct_{Gm14C}$$

$Ct_{FuN}$  : 異品種型検出の Ct 値（3 ウェルの平均値）

$Ct_{Gm14C}$  : 共通配列検出の Ct 値（3 ウェルの平均値）

2.  $\Delta\Delta Ct$  を計算する。

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{対象試料}} - \Delta Ct_{\text{基準試料}}$$

3. 対象試料の推定混入率を計算する。

$$\text{推定混入率 (\%)} = 100 \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

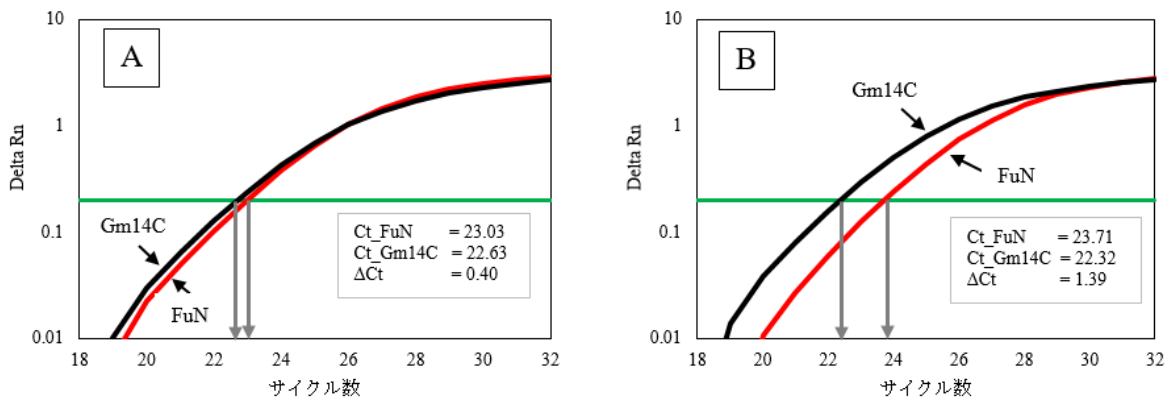


図 3 リアルタイム PCR による増幅曲線

A : 「エンレイ」100% の豆腐試料、B : 「フクユタカ」と「エンレイ」の混合豆腐試料（エンレイ 50%）

表 4 EN100 を基準試料とした  $\Delta\Delta Ct$  法による豆腐試料の推定混入率

異品種 混合率	エンレイ混合豆腐		ユキホマレ混合豆腐		里のほほえみ混合豆腐		おおすず混合豆腐	
	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率
0 %	FU*	0 %*						
10 %	EN10	11.8 %	YK10	10.7 %	SH10	10.1 %	OS10	11.2 %
30 %	EN30	33.3 %	YK30	33.7 %	SH30	31.7 %	OS30	36.7 %
50 %	EN50	52.5 %	YK50	57.1 %	SH50	56.7 %	OS50	63.1 %

\*異品種混合率 0% の試料（フクユタカ 100% 試料 FU）の結果は「エンレイ混合豆腐」の欄に記載した。

次に、デジタル PCR による推定混入率の検証を行った。リアルタイム PCR の場合と同じ抽出 DNA 溶液を用いて、既報<sup>2)</sup>に準拠してデジタル PCR で測定し解析した結果を表 5 に示す。既報と同様に、推定混入率と試料作製時の異品種混合率は高い相関を示した。また、供試した 4 種の異

品種では、混合した品種の違いにかかわらず同様の推定混入率が得られた。特に異品種 50%混合試料においては、リアルタイム PCR による結果と比較して、異品種混合率により近い値が得られた。また、基準試料を用いることなく混入率を正確に推定できるという、デジタル PCR の有効性を改めて確認できた。

表 5 デジタル PCR を用いた絶対定量法による豆腐試料の推定混入率

異品種 混合率	エンレイ混合豆腐		ユキホマレ混合豆腐		里のほほえみ混合豆腐		おおすず混合豆腐	
	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率
10 %	EN10	11.9 %	YK10	10.6 %	SH10	9.5 %	OS10	9.4 %
30 %	EN30	32.9 %	YK30	28.9 %	SH30	28.3 %	OS30	30.7 %
50 %	EN50	51.2 %	YK50	51.0 %	SH50	47.1 %	OS50	51.1 %

### 3.4 市販の豆腐を標準試料として用いることの検証

リアルタイム PCR による  $\Delta\Delta Ct$  法では基準試料が必須となる。本分析法の検証では、基準試料にはフクユタカを含まないことを確認した豆腐を用いたが、このような豆腐を検査機関で自ら作製することは煩雑であると考えられる。そこで、「ユキホマレ」等、異品種型ダイズのみを使用した旨を表示している市販の豆腐を基準試料として用いることができるかどうかを検証した。まず、フクユタカ型ダイズを特異的に検出するプライマー（表 6）を作製し、これを用いて本研究と同様のリアルタイム PCR を行い、この豆腐からフクユタカが検出されないことを確認した。次に、この豆腐を基準試料として表 1 の豆腐の異品種混入率を推定した結果、エンレイのみで我々が作製した豆腐（EN100）を基準試料とした場合と同様に推定できることが明らかとなった（表 7）。

以上より、フクユタカ型が検出されない市販の豆腐を基準試料として用いることが可能であると考えられた。

表 6 フクユタカ型ダイズを特異的に検出するプライマー

検出する系	プライマー名	向き	配列 (5'-3')	増幅長 (bp)
フクユタカ型	FuP-F	フォワード	GAATATGAATTCATCCAAAACATTGTGC	51
	FuP-R	リバース	GGTACAATGGCGATGGCTTC	

表 7 市販豆腐を基準試料とした  $\Delta\Delta Ct$  法による豆腐試料の推定混入率

異品種 混合率	エンレイ混合豆腐		ユキホマレ混合豆腐		里のほほえみ混合豆腐		おおすず混合豆腐	
	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率	試料名	推定混入率
0 %	FU*	0 %*						
5 %	EN5	4.0 %						
10 %	EN10	11.8 %	YK10	9.4 %	SH10	8.4 %	OS10	8.5 %
30 %	EN30	31.4 %						
50 %	EN50	48.3 %						
100 %	EN100	99.2 %						

\*異品種混合率 0% の試料（フクユタカ 100% 試料 FU）の結果は「エンレイ混合豆腐」の欄に記載した。

#### 4. まとめ

原料ダイズに「フクユタカ」のみを使用している旨が表示された豆腐について、リアルタイム PCR を用いてフクユタカ型以外の品種の混入割合を推定する検査方法の開発を行った。デジタル PCR によるフクユタカ判別方法<sup>2)</sup>と同様の DNA マーカーを用いて、リアルタイム PCR による測定に適した検出系及びプライマーを設計した。フクユタカ型以外の品種で特異的に増幅する PCR と、全ての品種で増幅する PCR を同時に行い、 $\Delta\Delta Ct$  法により推定混入率を算出した結果、推定混入率と異品種混合率は一定の相関を示した。また、供試した 4 種の異品種では、混合した品種の違いにかかわらず概ね同様に推定できることが明らかになった。

#### 謝 辞

本研究を実施するにあたり、DNA マーカーに係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、ダイズの原種種子をご提供くださいました福岡県農林業総合試験場及び山形県農業総合研究センターの皆様、並びに大豆の種子を提供くださいました全国農業協同組合連合会青森県本部及び JA 庄内みどりの皆様に心よりお礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) 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: 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, 農林水産消費安全技術センター調査研究報告, **42**,17-23(2018)
- 2) 岸根雅宏, 岡崎法子, 石原敏史, 加賀秋人, 橘田和美: デジタル PCR を用いたダイズおよびその加工品の定量的品種判別法の開発, 日本食品科学工学会誌, **66**(9),341-345(2019)
- 3) 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法, 消費者庁
- 4) 川瀬眞市朗, 猿田正恭, 菊池彰夫, 高田吉丈, 岡部昭典: 豆腐加工適性評価のための少量大豆子実による豆腐物性測定手法, 近畿中国四国農業研究センター2010年成果情報 (2010)
- 5) 令和元年度大豆の農産物検査結果, 令和2年3月31日現在(確定値), 農林水産省
- 6) Glycine max Wm82.a2.v1, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html> (2020年10月21日確認)

**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44号**

令和3年2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

