

## 安定同位体比分析による豚肉の産地判別法の検討

一色 摩耶, 中村 哲, 高嶋 康晴

Maya Isshiki, Satoru Nakamura, Yasuharu Takashima

### 要 約

国産 18 件、米国産 31 件、カナダ産 25 件、デンマーク産 14 件の豚肉について酸素安定同位体比を分析し、国産と米国産及び国産とカナダ産の判別可能性を検討した。また、国産とデンマーク産の判別精度の向上を検討した。既報の炭素及び窒素安定同位体比と合わせて線形判別分析を行ったところ、国産と米国産については判別できる可能性は低かったが、国産とカナダ産について判別の可能性が示唆された。国産とデンマーク産については既報と同程度の判別精度であった。

### 1. はじめに

生鮮食品は農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律（JAS 法）に基づく生鮮食品品質表示基準（平成 12 年 3 月 31 日農林水産省告示第 514 号）により原産地の表示が義務付けられている。日本の豚肉輸入量は約 69.2 万トン（部分肉ベース・平成 21 年度）で国内流通量の約 50 %を占めている。主な輸入先は米国、カナダ、デンマークで、輸入量の 80 %以上を占めており、これら外国産豚肉は国産に比べて安価であることから、これまでにいくつかの産地偽装の報告がある。

豚肉の産地判別に関する報告<sup>1)</sup>は限られているが、畜産物の判別については、安定同位体比分析を利用した牛肉の産地判別の報告がいくつかある。これは、動物の安定同位体比が生育環境の違いを反映することを利用した方法である。牛肉の炭素及び窒素安定同位体比は飼料の影響を受けることが報告されている<sup>2)3)</sup>。また、牛肉の酸素安定同位体比はその地域の降水の酸素安定同位体比を反映することが報告されている<sup>4)5)6)</sup>。よってこれら生育環境の異なる地域であれば安定同位体比分析により判別可能と考えられる。

既報<sup>7)</sup>では、炭素及び窒素安定同位体比分析による豚肉の産地判別を検討したが、国産と米国産及びカナダ産について十分に判別することができなかった。デンマーク産については判別可能であったが、炭素及び窒素安定同位体比は飼料が変われば変動する可能性があるため、飼料以外の影響を反映する指標を加えて判別精度を向上することが望ましい。

よって、本研究では酸素安定同位体比を分析し、既報の炭素及び窒素安定同位体比と合わせて豚肉の産地判別が可能かどうかを検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料

既報で用いた試料のうち、国産 18 件、米国産 31 件、カナダ産 25 件、デンマーク産 14 件を選択した。試料は既報にしたがって脱脂及び乾燥処理を行ったものを用いた。

### 2.2 酸素安定同位体比測定

2.1 の試料約 0.4 mg を銀カップに採取し、真空凍結乾燥機で一晩凍結乾燥したものを安定同位体比測定用試料とした。分析装置は、熱分解型元素分析計 (TC/EA, Thermo Fisher Scientific) に接続した安定同位体比質量分析装置 (Delta V Advantage, Thermo Fisher Scientific) を使用した。カラムはモレキュラーシーブ 5A カラム 1.2 m を使用し、反応炉温度 1400 °C、GC オープン温度 90 °C、He ガス流量 60 ~ 70 ml/min とした。

IAEA が管理する標準物質 (IAEA-600, IAEA-601, IAEA-602) により値付けを行った 2 種類の安息香酸 ( $\delta^{18}\text{O} = +24.2\text{‰}$  及び  $+90.5\text{‰}$ 、 $\delta$  値については後述) についても同様に測定し、試料の測定値を校正した。 $\delta^{18}\text{O} = +90.5\text{‰}$  の安息香酸は Wedeking ら<sup>8)</sup>の方法を参考に、酸素交換を行って作成した。測定値は以下の式に従い、標準平均海水 (VSMOW) からの偏差として表記した。

$$\delta^{18}\text{O} = [R(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{試料}}/R(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{VSMOW}} - 1]$$

### 2.3 統計解析

酸素安定同位体比について産地ごとに平均値及び標準偏差を求め、国産を対照群とした Dunnett 検定により平均値の有意差検定を行った。

既報で分析した炭素及び窒素安定同位体比の値と合わせて、R 2.15.0 (<http://www.r-project.org/>) の MASS パッケージに同封されている lda 関数により、安定同位体比を説明変数として産地間の線形判別分析を行い、判別モデルを構築した。判別モデルの精度は Leave-one-out cross-validation (LOOCV) により確認した。

LOOCV を行い得られた判別得点からカーネル密度推定により判別得点の分布を推定した。バンド幅として「試料の安定同位体比のばらつきから計算した判別得点のばらつき」と「判別得点分布のばらつき ( $\sigma$ ) 及び試料数 ( $n$ ) から得られた値 ( $0.9 \times \sigma/n^{0.2}$ )<sup>9)</sup>」を合成したものを用いた。なお、 $\sigma$  には標準偏差と正規四分位範囲のうち小さい値を用いた。

推定した判別得点の分布から ROC 曲線を作成して判別得点の検討を行った。ROC 曲線とは、ある判別モデルについて判別得点を最小値から最大値まで変化させたときの偽陽性率  $\alpha$  を横軸に、感度  $1 - \beta$  を縦軸にプロットしたもので、全ての判別得点にわたって判別精度を図示することができる。Zweig ら<sup>10)</sup>の方法によれば、次式で  $m$  の値を計算し、接線の傾きが  $m$  と等しくなる点を最適な判別得点として選択できる。

$$m = (\text{Cfp}/\text{Cfn}) \times ((1 - P)/P)$$

Cfp は偽陽性のコスト、Cfn は偽陰性のコスト、P は陽性の事前確率を示す。国産対外国産の判別モデルにおいて、陽性は外国産、陰性は国産とした場合、偽陽性は「国産を誤って外国産と判定すること」、偽陰性は「外国産を誤って国産と判定すること」、陽性の事前確率は「検査対象となる国産市販品中の外国産の確率」を表す。本研究では Cfp/Cfn を 1 と仮定して  $m$  を  $(1 - P)/P$  として計算した。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 酸素安定同位体比の比較

国産と外国産の酸素安定同位体比を比較したところ、カナダ産は国産に比べて有意に高い値を示した ( $p < 0.05$ )。また、国産と米国産及び国産とデンマーク産の間に有意差は認められなかった ( $p > 0.05$ ) (表 1)。動物の酸素安定同位体比は、その動物が育った地域の降水の値と相関があることが報告されている<sup>2)6)11)12)13)</sup>。これは、その地域の降水が水や食物を通じて動物に取り込まれ、動物の値に反映されるためと考えられている。降水の酸素安定同位体比は、緯度が高くなるほど、気温が低くなるほど、降水量が多くなるほど、そして内陸ほど低くなると言われている<sup>11)</sup>。カナダは日本に比べて緯度が高いため、降水の酸素安定同位体比は日本に比べて低くなり、その影響が豚肉の値に反映したと考えられた。一方、デンマークは日本に比べて緯度が高いにも関わらず、デンマーク産は国産と同じような値となった。デンマークは高緯度地域にあるが、温暖な北大西洋海流とその上をわたる偏西風のため、冬でも比較的暖かい気候となっている。そのため降水の酸素安定同位体比は緯度の割に高い値となり、その影響が豚肉の値に反映したと考えられた。米国については、豚肉生産の中心地（中西部、ノースカロライナ州等）の大部分が日本と同じような緯度及び気候条件にあるため、日本と同じような値になったと考えられた。

各産地ごとの酸素安定同位体比のばらつきを見ると（図 1）、デンマーク産の酸素安定同位体比は比較的狭い範囲に分布している。これはデンマークの国土面積が狭く、国内の気候条件や地理条件に差異が生じにくいためと考えられた。一方、カナダ産は広い範囲に分布し、範囲は+4.0 ‰～+11.7 ‰となった。カナダの降水の安定同位体比は他の地域に比べてばらつきが大きいとする報告があり<sup>12)14)</sup>、その影響を反映して豚肉の値がばらついたと考えられた。

表 1 酸素安定同位体比の平均値±標準偏差

産地	日本 (n=18)	米国 (n=31)	カナダ (n=25)	デンマーク (n=14)
$\delta^{18}O$ (‰)	11.3±1.3	11.8±1.3	8.0±2.2*	11.1±0.7

\*日本に対して5%有意水準で有意差あり

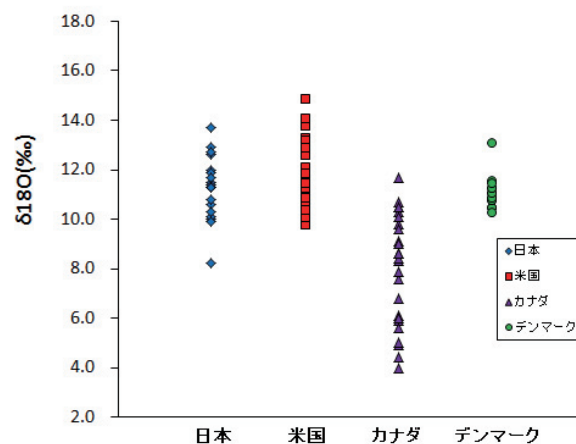


図 1 酸素安定同位体比の分布

### 3. 2 国産と外国産豚肉の判別

酸素安定同位体比に既報の窒素及び炭素安定同位体比を合わせて線形判別分析を行い、国産対米国産、国産対カナダ産及び国産対デンマーク産の判別モデルを作成した。判別モデルに用いる変数は全ての変数の組み合わせを計算し、最も判別精度が高いものを選択した。選択した変数及び LOOCV による的中率を表 2 に示した。国産対米国産の判別モデルでは、炭素、窒素及び酸素を変数とした場合に最も判別精度が高く、的中率は国産 56 %、米国産 77 % となった。既報と比べて試料数が少ないための中率は低いが、酸素安定同位体比の結果と合わせて考えると、試料数を増やしても判別精度が大きく向上する可能性は低いと考えられた。国産対カナダ産の判別モデルは、国産 94 %、カナダ産 76 % となり、既報と比べて良好な判別モデルを形成できる可能性が示唆された。国産対デンマーク産の判別モデルは、国産 94 %、デンマーク産 93 % となった。既報では、炭素安定同位体比で基準を定めた場合に、国産 98 %、デンマーク産 90 % となり、今回の判別精度と同程度であった。このとき判別モデルは、(判別得点) =  $0.57 \times \delta^{13}\text{C} - 0.11 \times \delta^{18}\text{O} + 13.4$  という式になり、酸素安定同位体比よりも炭素安定同位体比のほうが判別への寄与が大きかった。

表 2 判別モデルの変数及び LOOCV による的中率

判別モデル	変数	的中率			
		日本	米国	カナダ	デンマーク
日本 - 米国	$\delta^{13}\text{C}$ , $\delta^{15}\text{N}$ , $\delta^{18}\text{O}$	56% (10/18)※	77% (24/31)※	-	-
日本 - カナダ	$\delta^{13}\text{C}$ , $\delta^{15}\text{N}$ , $\delta^{18}\text{O}$	94% (17/18)※	-	76% (19/25)※	-
日本 - デンマーク	$\delta^{13}\text{C}$ , $\delta^{18}\text{O}$	94% (17/18)※	-	-	93% (13/14)※

※(正しく判別した試料数)/(判別した試料数)を表す。

表 2 では (判別得点) = 0 を基準とした場合の的中率を示したが、このとき国産対米国産の判別モデルの偽陽性率 (ここでは国産を誤って外国産と判定する確率) は 44 % となり、検査で使用するにはあまりに偽陽性率が大きいと考えられた。偽陽性率は感度 (ここでは外国産を正しく外国産と判定する確率) と trade-off (一方を高めれば他方は低下) の関係にあるので、両者を同時に検討する必要がある。そのため LOOCV によって得られた判別得点の分布について、判別得点を最小値から最大値まで変化させたときの偽陽性率  $\alpha$  を横軸に、感度  $1 - \beta$  を縦軸にプロットした ROC 曲線を作成し、判別得点の全範囲にわたって  $\alpha$  及び  $1 - \beta$  がどう変化するかを確認した (図 2)。ROC 曲線は左上方に近いほど判別精度が高い判別モデルと判断される。よって、 $\alpha = 0.6$  付近までは、国産対デンマーク産、国産対カナダ産、国産対米国産の順で判別精度が高いモデルになることがわかった。 $\alpha$  を小さくする方向に判別得点をずらした場合、例えば  $\alpha = 0.05$  では、国産対米国産は  $1 - \beta = 0.09$ 、国産対カナダ産は  $1 - \beta = 0.54$ 、国産対デンマーク産は  $1 - \beta = 0.93$  であった。

次に、事前確率  $P$  の値に応じて ROC 曲線上で最適な判別得点を設定した場合の、 $\alpha$  及び  $1 - \beta$  の変動を確認した (表 3)。事前確率とは、ここでは「検査対象となる国産市販品中の外国産の確率」を表す。豚肉の場合、検査対象となる国産市販品中の 50 % 以上が外国産である状況は考えにくいことから、 $P = 0.5$  までの間で変動を確認した。国産対米国産

では  $P = 0.2$  までは  $\alpha$  及び  $1-\beta$  は低く、 $P = 0.3$  においては  $1-\beta$  が 58 % まで上がるものの  $\alpha$  も 25 % と高くなるため、事前確率を考慮した場合でも検査に使用するのには難しいと考えられた。国産対カナダ産については、 $P = 0.1$  において  $1-\beta$  が 26 % となり、 $P = 0.5$  においては  $1-\beta$  は 73 % と比較的高いものの、 $\alpha$  も比較的高い値で 13 % となった。国産対デンマーク産については、いずれの  $P$  においても  $1-\beta$  が 93 %、 $\alpha$  が 0.1 % 未満となり、良好な判別モデルであった。

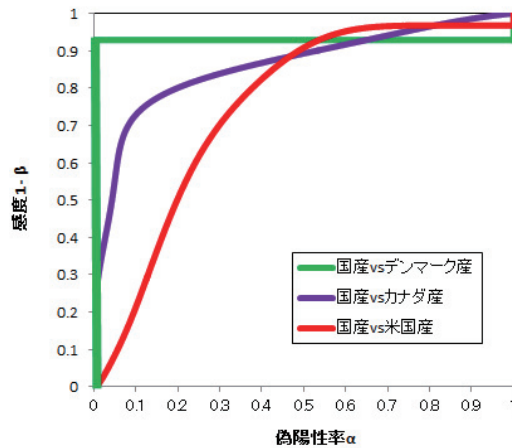


図2 判別モデルのROC曲線

偽陽性率  $\alpha$  は「国産を誤って外国産と判定する確率」、感度  $1-\beta$  は「外国産を正しく外国産と判定する確率」を表す。

表3 事前確率  $P$  の値を変化させたときの偽陽性率  $\alpha$  及び感度  $1-\beta$

P	日本 - 米国		日本 - カナダ		日本 - デンマーク	
	$\alpha$ (%)	$1-\beta$ (%)	$\alpha$ (%)	$1-\beta$ (%)	$\alpha$ (%)	$1-\beta$ (%)
0.001	0.00	0.00	0.00	2.4	0.00	91
0.002	0.00	0.00	0.00	3.4	0.00	92
0.005	0.00	0.00	0.01	5.4	0.00	92
0.01	0.00	0.00	0.03	7.6	0.01	92
0.02	0.00	0.00	0.07	11	0.01	93
0.05	0.00	0.00	0.28	17	0.01	93
0.1	0.00	0.00	0.96	26	0.02	93
0.2	0.00	0.00	5.1	54	0.02	93
0.3	25	58	8.7	66	0.04	93
0.5	42	83	14	73	0.05	93

偽陽性率  $\alpha$  は「国産を誤って外国産と判定する確率」、感度  $1-\beta$  は「外国産を正しく外国産と判定する確率」を表す。

#### 4. まとめ

豚肉の酸素安定同位体比を分析し、炭素及び窒素の安定同位体比を合わせて解析したと

ころ、国産と米国産を判別できる可能性は低いものの、国産とカナダ産を判別できる可能性が示唆された。国産とデンマーク産については既報と同程度の判別精度となった。

## 5. 文 献

- 1) Thiem, I., Lupke, M. and Seifert, H., Factors influencing the  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -ratio in meat juices. *Isotopes Environ. Health Stud.*, 40, 191-197(2004).
- 2) Boner, M. and Forstel, H., Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef. *Anal. Bioanal. Chem.*, 378, 301-310(2004).
- 3) Bahar, B., Monahan, F. J., Moloney, F. P., Okiely, P. O., Scrimgeour, C. M. and Schmidt, O., Alteration of the carbon and nitrogen stable isotope composition of beef by substitution of grass silage with maize silage. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 1937-1942(2005).
- 4) 中下留美子, 鈴木彌生子, 伊永隆史, 渡辺伸枝, 田中公一, 安定同位体比分析による日本国内に流通する牛肉の産地判別, *分析化学*, 58, 1023-1028(2009).
- 5) Nakashita, R., Suzuki, Y., Akamatsu, F., Iizumi, Y., Korenaga, T. and Chikaraishi, Y., Stable carbon, nitrogen, and oxygen isotope analysis as a potential tool for verifying geographical origin of beef. *Anal. Chim. Act.*, 617, 148-152(2008).
- 6) Heaston, K., Kelly, S. D., Hoogewerff, J. and Woolfe, M., Verifying the geographical origin of beef: The application of multi-element isotope and trace element analysis. *Food Chemistry*, 107, 506-515(2008)
- 7) 中村哲, 高嶋康晴, 炭素・窒素安定同位体比による豚肉の産地判別の検討, *農林水産消費安全技術センター調査研究報告*, 33, 8-14(2009).
- 8) Wedeking, K. W. and Hayes, J. M., Exchange of oxygen isotopes between water and organic material. *Isotope Geoscience*, 1, 357-370(1983).
- 9) Silverman, B.W., Choosing the smoothing parameter. In "Density estimation for statistics and data analysis", Chapman and Hall, London, pp.43-61(1986)
- 1 0) Zweig, M. H. and Campbell, G., Receiver-operating characteristic (ROC) plots: A fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.*, 39, 561-577(1993).
- 1 1) Dansgaard, W., Stable isotopes in precipitation. *Tellus*, 16, 436-468(1964).
- 1 2) Bowen, G. J., Wassenaar, L. I. and Hobson, K. A., Global application of stable hydrogen and oxygen isotopes to wildlife forensics. *Oecologia*, 143, 337-348(2005).
- 1 3) Bowen, G. J. and Revenaugh, J., Interpolating the isotopic composition of modern meteoric precipitation. *Water Resources Research*, 39(10), 1299.
- 1 4) Bowen, G. J. and Wilkinson, B., Spatial distribution of  $\delta^{18}\text{O}$  in meteoric precipitation. *Geology*, 30, 315-318(2002).