

# 食品関係等調査研究報告

第40号  
平成28年

## Research Report of Food Products

Vol.40  
2016



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

FAMIC は、農林水産省との密接な連携の下に、専門技術的知見を活かして、肥料、農薬、飼料等の農業生産資材の安全性や食品表示の真正性についての検査・分析等を実施し、農業生産資材の安全と消費者の信頼の確保に技術で貢献することを使命としています。

このため、FAMIC では、検査・分析能力の向上に不断に取り組むとともに、分析における精度管理や分析方法の妥当性確認を的確に実施し、データの信頼性の確保に努めています。

また、科学技術の進歩に対応した新たな検査・分析技術を開発・導入することにより、国民の皆様を提供するサービスの質の向上を目指しています。

このうち食品表示の真正性についての検査・分析については、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27年4月1日に食品表示基準が施行され、食品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、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。また、成果の一部は、公開調査研究発表会の開催、関係学会への論文投稿等を通じて公表に努めているところです。

今般、その一環として、平成27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40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します。

関係各位には成果の活用や更なる検査・分析手法の改良・開発に向けて、ご指導、ご鞭撻いただきますようお願い申し上げます。

平成29年3月

独立行政法人 農林水産消費安全技術センター  
理事長 木村 真人



## 目 次

脂肪酸分析によるブリ、ヒラメ、トラフグ、クロマグロの養殖判別法の検討 中山 祐輔, 高嶋 康晴 .....	1
原木栽培乾しいたけの元素分析とストロンチウム安定同位体比分析の組み合わせによる原料 原産地判別法の検討 石井 修人, 箱田 晃子 .....	9
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 後藤 祐之介, 伊澤 淳修, 申 基澈, 中野 孝教 .....	17
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 渡邊 彩乃, 寺田 昌市 .....	25
水産物からの簡易 DNA 抽出の検討 井伊 悠介, 小岩 智宏, 足立 静香 .....	33
<b>【他誌掲載論文 (抄録)】</b>	
べにふうき緑茶中のメチル化カテキン測定法の室間共同試験による妥当性確認 日本食品科学工学会誌 第63巻 第7号 2016年7月 法邑雄司, 稗島佑介, 児玉貴志, 田中真澄, 堀江秀樹, 鈴木忠直, 安井明美 .....	45
ウンシュウミカン中の $\beta$ -クリプトキサンチン測定法の室間共同試験による妥当性確認 日本食品科学工学会誌 第63巻 第10号 2016年10月 熊谷雅孝, 門倉雅史, 水田賢司, 田中真澄, 生駒吉識, 鈴木忠直, 安井明美 .....	47



# 脂肪酸分析によるブリ、ヒラメ、トラフグ、クロマグロの 養殖判別法の検討

中山 祐輔、高嶋 康晴

Yusuke Nakayama, Yasuharu Takashima

## 要 約

ブリ、ヒラメ、トラフグ、クロマグロの 4 魚種について、天然魚と養殖魚の筋肉中の脂質の脂肪酸組成を比較したところ、クロマグロを除く 3 魚種において天然魚－養殖魚間でリノール酸等の脂肪酸組成に差が見られた。特にブリにおいては、リノール酸の脂肪酸組成の差が顕著であったことから、養殖判別の可能性が示唆された。

## 1. はじめに

我が国における食品の品質に関する表示は、食品表示法（平成 25 年法律第 70 号）及びこれに基づき制定された食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）により定められており、生鮮水産物においては、養殖されたものである場合は「養殖」の表示が義務付けられている。

養殖業は、日本における重要な水産業の一つである。平成 27 年次の養殖業生産量は 111 万トンであり、漁業・養殖業総生産量の 23.6 %を占めている<sup>1)</sup>。海面養殖生産量が最も多い魚種はブリであり、平成 27 年次では海面養殖生産量全体の 57.0 %を占めている。次いで養殖生産量の多い魚種は生産量の順に、マダイ、クロマグロ、ギンザケ、フグ類、シマアジ、ヒラメ、マアジとなっている<sup>1)</sup>。

これらの魚種の卸売価格は、天然魚が養殖魚を上回ることが多く、ブリでは、天然ブリの卸売価格は脂の乗った冬に上昇し、養殖ブリの卸売価格を上回っている。また、魚を購入する際に、見た目や価格が同程度の場合、養殖魚より天然魚を選ぶ消費者が多い<sup>2)</sup>。しかしながら、切り身やさくの状態では養殖魚を目視により判別することは困難であり、科学的な判別法の開発が求められる。

養殖魚と天然魚の生体成分の比較については、一般成分（水分、粗たんぱく、粗脂肪、灰分）、遊離アミノ酸、無機質成分、ビタミン含量、筋肉硬度、脂肪酸組成等が報告されている<sup>3-10)</sup>。そのうち、脂肪酸組成については、いくつかの魚種で天然魚と養殖魚の差異が報告され<sup>3-10)</sup>、FAMIC においても、マダイについて天然－養殖間でリノール酸の脂肪酸組成に差が見られ養殖判別の有効な指標として用いることが可能であることを報告している<sup>11-13)</sup>。これらの知見を参考に、本研究では、養殖生産量が多く天然魚も一定量漁獲されているブリ、ヒラメ、トラフグ、クロマグロの 4 魚種について、天然魚と養殖魚の脂肪酸組成を比較し、養殖判別の可否について検討を行った。

## 2. 実験方法

### 2. 1 試料

4 魚種（ブリ、ヒラメ、トラフグ、クロマグロ）について、天然魚及び養殖魚を収集した（表1、表2）。試料の形態としては、ブリではラウンド又はフィレー、ヒラメではラウンド、トラフグではラウンド又は有毒部位を除去した身欠き、クロマグロではさくの状態で入手した。収集試料数は、各魚種の漁獲海域（養殖魚においては生産地）における漁獲量（養殖魚においては生産量）を参考にした。

表1 試料の内訳（ヒラメ、トラフグ、クロマグロ）

ヒラメ		トラフグ				クロマグロ					
天然		養殖		天然		養殖		天然		養殖	
青森	1	大分	3	愛知	2	大分	2	青森	1	チュニジア	2
茨城	1	鹿児島	1	大分	1	熊本	1	カナダ	1	メキシコ	1
千葉	1	愛媛	1			長崎	1	スペイン	1	鹿児島	1
新潟	1			計	3	計	4	計	3	計	4
北海道	1										
宮城	1										
計	6	計	5								

表2 試料の内訳（ブリ）

種類	原産地 (県名)	試料数	入手時期			
			2015年 4~6月	2015年 7~9月	2015年 10~12月	2016年 1~3月
養殖	鹿児島	8	2	2		4
	大分	6		3	3	
	愛媛	5	1		4	
	香川	2			1	1
	熊本	2				2
	高知	2		1	1	
	長崎	2				2
	宮崎	2	1			1
	三重	1				1
	計	30	4	6	9	11
	天然	北海道海区 北海道	3		1	2
岩手		1		1		
太平洋海区		茨城	1	1		
		千葉	3			2
		三重	1			1
		高知	1			
日本海区		新潟	1			1
		富山	2			1
		石川	3			3
		福井	1			1
		鳥取	2		1	1
		島根	3			
		瀬戸内海区 兵庫	1			
山口		1			1	
東シナ海区		長崎	5			5
		佐賀	1			1
		宮崎	1			1
計		31	1	3	8	19

## 2. 2 脂肪酸組成分析

### 2. 2. 1 粗脂肪の抽出

既報の手法<sup>13)</sup>から試料の粉碎部分を改変した。すなわち、ブリでは背部筋肉のうち頭部側の筋肉から血合筋を極力除去し粉碎に供した。また、ヒラメでは有眼側の背部筋肉のうち頭部側の筋肉を、トラフグでは骨、皮、内臓等を除いた筋肉全量を、クロマグロでは試料全量を粉碎に供した。フードプロセッサーで十分に均一化したものを約 3.5 g 採取し、これに HI 混液（ヘキサン（関東科学）：イソプロピルアルコール（和光純薬）= 3 : 2, vol）を 50 mL 加え、ポリトロンホモジナイザー（PT 10-35、KINEMATICA）で 1 分間粉碎した。その後、HI 混液を 50 mL 追加し、1 分間粉碎した後、さらに HI 混液を 30 mL 追加し、1 分間粉碎した。粉碎混合した HI 混液全量を、減圧ろ過により不溶物を除去し、ろ液を分液ロートに移し 6.7 %硫酸ナトリウム（和光純薬又は関東化学）水溶液を 75 mL 加え、振とう後、有機層を回収した。水層は再度分液ロートに戻し、ヘキサン：イソプロピルアルコール混液（7 : 2, vol）を 50 mL 加え、振とう後、有機層を回収した。回収した有機層を合わせて、ロータリーエバポレーターにより溶媒を除去した後、真空下（100 Pa 以下）で溶媒を完全に除去したものを粗脂肪とした。

### 2. 2. 2 脂肪酸メチルエステル化

既報の手法<sup>13)</sup>を用いた。粗脂肪を 10 ~ 30 mg（粗脂肪量が 10 mg に満たない場合は全量）脂肪抽出受器に採取し、メタノール（和光純薬）を 10 mL、塩酸（和光純薬）を 0.1 mL 加え 2 時間以上加熱還流した。還流後、飽和食塩水（塩化ナトリウム；一級以上、和光純薬又は関東化学）を 100 mL、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（炭酸水素ナトリウム；特級、和光純薬）を 10 mL 加えた分液ロートに回収し、50 mL のヘキサンで脂肪抽出受器を洗浄し、分液ロートに加えた。中性条件下で振とう後、有機層をスリ付き三角フラスコに回収した。無水硫酸ナトリウム（和光純薬）を 5 g 加え、栓をした状態で 1 時間静置し、有機層の脱水をした。脱水後、吸着剤としてシリカゲル（シリカゲル 60、メルク）、展開溶媒にヘキサン：ジエチルエーテル（和光純薬）混液（20 : 1, vol）を用いたカラムクロマトグラフィーにより脂肪酸メチルエステルを精製した。

### 2. 2. 3 脂肪酸組成の測定

水素炎イオン化検出器（Flame Ionization Detector; FID）を装備したガスクロマトグラフ装置（HP6890、Agilent Technologies）を用いて測定した。なお、分析条件は既報の測定条件<sup>13)</sup>を用いた。カラムはキャピラリーカラム（Omegawax<sup>TM</sup>250、Supelco）（長さ 30 m、内径 0.25 mm、シリカコーティング 0.25  $\mu$ m）を用い、注入口温度 230 °C、FID 検出器温度 240 °C、カラム温度は 215 °C（スプリット比 1/76）とし、キャリアーガスとしてヘリウムガス（0.7 mL/min）を用いた。精製した脂肪酸メチルエステルは約 10 mg/1.5 mL の濃度でヘキサンに溶解し、注量は 1  $\mu$ L で測定を行った。各脂肪酸メチルエステルのピーク同定は、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸の各メチルエステル化物については、混合脂肪酸メチルエステル標準 F.A.M.E.Mix（GLC - 10、Supelco）を、アラキジン酸、エイコセン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸（EPA）、ドコサヘキサエン酸（DHA）の各メチルエステル化物については、混合脂肪酸メチルエ



ステル標準 FAME Qualitive Mix (1021-58209、GL サイエンス) を試料と同じように測定し、その保持時間から各脂肪酸メチルエステルピークを同定した。検出された上記 10 種類の脂肪酸メチルエステルのピーク面積の総和に対する各脂肪酸メチルエステルのピーク面積の百分率を、各脂肪酸の脂肪酸組成とした。ピークの検出及び脂肪酸組成の計算にはクロマトパック OpenLAB CDS ChemStation (Agilent Technologies) を使用した。

### 3. 結果及び考察

#### 3. 1 筋肉中の血合筋の影響

天然ブリ 1 試料について、血合筋と血合筋を除いた筋肉部位（普通筋）の脂肪酸（パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキジン酸、エイコセン酸、アラキドン酸、EPA、DHA）を測定し、各脂肪酸組成を比較したところ、脂肪酸によって 0.54 ~ 1.49 倍の開きが見られ、ブリ筋肉中の血合筋と普通筋では脂肪酸組成が異なる結果となった（表 3）。このことから、ブリ試料を粉砕する際、血合筋を含めて粉砕すると脂肪酸組成に血合筋中の脂肪酸の影響が生じることが考えられた。試料に含まれる血合筋の割合は魚種ごとに異なり、自身魚に比べて含有量の多いブリにおいては、あらかじめ血合筋を除去し、普通筋のみを粉砕して分析に供するのが適切と考えられた。

ヒラメ及びトラフグについては、筋肉中の血合筋の割合が低く脂肪酸組成への影響が少ないと考えられるため、血合筋ごと粉砕し分析に供した。また、クロマグロについては、赤身魚であり血合筋が多い種であるが、一般的に血合筋は除去されて流通するため、そのまま粉砕し分析に供した。

表 3 ブリ筋肉中の血合筋と普通筋の脂肪酸組成 (%) の比較

脂肪酸名	血合筋	普通筋	普通筋/ 血合筋
C16:0 パルミチン酸	19.8	28.3	1.43
C18:0 ステアリン酸	12.2	8.1	0.67
C18:1 オレイン酸	14.2	10.4	0.73
C18:2 リノール酸	1.8	1.7	0.95
C18:3 リノレン酸	0.7	0.7	0.97
C20:0 アラキジン酸	0.6	0.4	0.73
C20:1 エイコセン酸	4.1	2.2	0.54
C20:4 アラキドン酸	1.8	2.7	1.49
C20:5 EPA	6.6	8.9	1.36
C22:6 DHA	38.2	36.6	0.96

#### 3. 2 各魚種における天然—養殖間の脂肪酸組成の比較

4 魚種（ブリ、ヒラメ、トラフグ、クロマグロ）について、筋肉中の 10 種類の脂肪酸（パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキジン酸、エイコセン酸、アラキドン酸、EPA、DHA）を測定し、各脂肪酸組成を比較した（表 4）。

各魚種の脂肪酸組成の平均値を見ると、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸の組成は

天然魚より養殖魚が高く、逆にアラキドン酸、DHA は養殖魚より天然魚が高く、その他の脂肪酸組成については、魚種ごとに異なる特色が見られた。特に、天然魚より養殖魚の方が平均値で2倍以上高い脂肪酸組成としては、ブリ及びトラフグではリノール酸及びリノレン酸、ヒラメではリノール酸が見られ、逆に養殖魚より天然魚の方が平均値で2倍以上高い脂肪酸組成としては、トラフグのアラキドン酸が見られたことから（表4 太字下線）、これらの脂肪酸組成が養殖判別の有効な指標となる可能性が示唆された。また、収集試料数の多いブリについて、t 検定により天然-養殖間の各脂肪酸組成を比較したところ、エイコセン酸と EPA を除く 8 種類の脂肪酸組成で統計的に有意な差が見られた。

脂肪酸組成による養殖魚の判別法については、複数の脂肪酸組成を用いて多変量解析を行い判別関数式を得ることで天然トラフグと養殖トラフグを判別する手法が報告されており<sup>9)</sup>、大きな差異が無くても複数の脂肪酸組成を組み合わせることで判別できる可能性があると推測された。

表4 各魚種における天然魚と養殖魚の脂肪酸組成 (%)

	ブリ						ヒラメ				
	天然 N=31		養殖 N=30		養殖平均/ 天然平均	t検定	天然 N=6		養殖 N=5		養殖平均/ 天然平均
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差			平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	
C16:0 パルミチン酸	28.0	2.3	24.9	3.0	0.89	**	24.7	0.5	27.1	0.4	1.10
C18:0 ステアリン酸	7.8	1.4	5.4	0.9	0.70	**	5.9	0.5	6.9	0.7	1.17
C18:1 オレイン酸	21.9	7.1	31.6	6.4	1.44	**	8.2	2.1	13.3	1.0	1.61
C18:2 リノール酸	1.4	0.6	11.1	4.5	<b>7.75</b>	**	1.2	0.3	3.2	1.2	<b>2.70</b>
C18:3 リノレン酸	0.8	0.6	1.8	0.7	<b>2.37</b>	**	0.5	0.3	0.7	0.2	1.43
C20:0 アラキジン酸	0.2	0.2	0.4	0.1	1.62	*	0.2	0.0	0.2	0.0	1.06
C20:1 エイコセン酸	4.0	3.7	2.3	0.7	0.59		1.6	0.6	1.4	0.4	0.88
C20:4 アラキドン酸	2.1	0.6	1.2	0.4	0.57	**	3.6	1.3	2.8	0.4	0.77
C20:5 EPA	7.7	2.6	7.5	3.7	0.97		10.0	1.9	6.4	1.5	0.65
C22:6 DHA	26.1	8.1	13.8	5.0	0.53	**	44.2	4.8	37.9	1.9	0.86

	トラフグ					クロマグロ				
	天然 N=3		養殖 N=4		養殖平均/ 天然平均	天然 N=3		養殖 N=4		養殖平均/ 天然平均
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差		平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	
C16:0 パルミチン酸	23.4	0.8	24.0	1.1	1.03	22.6	1.0	24.6	1.6	1.09
C18:0 ステアリン酸	11.2	0.6	10.3	0.9	0.93	8.4	2.5	7.3	1.7	0.87
C18:1 オレイン酸	11.5	1.2	13.6	1.1	1.18	19.0	8.2	19.7	4.4	1.04
C18:2 リノール酸	1.0	0.2	4.3	1.1	<b>4.25</b>	1.7	0.5	2.1	0.3	1.23
C18:3 リノレン酸	0.1	0.1	0.3	0.1	<b>2.48</b>	0.7	0.6	1.4	0.4	1.91
C20:0 アラキジン酸	0.3	0.0	0.2	0.0	0.67	0.2	0.1	0.4	0.1	1.71
C20:1 エイコセン酸	0.7	0.2	1.3	0.1	1.87	7.1	8.0	7.4	5.1	1.04
C20:4 アラキドン酸	8.4	0.8	4.0	0.7	<b>0.48</b>	2.9	1.8	1.6	0.7	0.56
C20:5 EPA	9.5	1.1	9.6	0.7	1.01	9.5	5.7	15.7	5.3	1.65
C22:6 DHA	33.9	0.7	32.4	1.0	0.96	27.8	11.2	19.7	7.0	0.71

\* : 5%の有意水準で天然-養殖間に有意差が認められた脂肪酸  
 \*\* : 0.5%の有意水準で天然-養殖間に有意差が認められた脂肪酸  
 太字下線 : 養殖平均/天然平均が2以上または0.5以下

天然魚と養殖魚間で脂肪酸組成に差異が生じる要因については、一般に、養殖魚の脂肪酸組成は給餌された飼料の影響を受けると言われており<sup>7,8)</sup>、養殖魚に給餌される飼料と天然飼料間の脂肪酸組成が異なることが考えられる。そのうち、養殖魚のリノール酸組成が高い要因については、魚粉に代わるタンパク質源としての大豆かす等の植物性たんぱく原料の使用が考えられる。もともと、天然海域に生息する魚介類中の脂質のリノール酸組成は低いことが知られており<sup>8)</sup>、このためイワシなどの魚粉のリノール酸組成も同様に低い。一方、大豆かすにはリノール酸が多く含まれた油脂が残留していることが多く、これを使用した配合飼料のリノール酸組成を高くしていると考えられる<sup>5)</sup>。ブリ、ヒラメ、トラフグの養殖では近年配合飼料化が進められており<sup>2)</sup>、これらの養殖魚については、リノール酸組成が天然魚に比べて高くなったと推測された。

一方、クロマグロにおいては、いくつかの脂肪酸組成で天然－養殖間に差が見られるものの、他の3魚種に比べると顕著な差が見られた脂肪酸組成はなかった。原因としては、クロマグロの養殖では現在のところサバ類やイカ類などの生餌が中心であり、配合飼料化は進んでおらず<sup>2)</sup>、天然クロマグロと養殖クロマグロ間の食性に大きな差異がないため、脂肪酸組成に差異が生じにくいことが推測された。このためクロマグロについては、現在の養殖形態では養殖判別は難しいと考えられた。ただし今後養殖クロマグロの配合飼料化が進むことで、脂肪酸組成に変化が生じる可能性があるかと推測される。

### 3. 3 ブリにおける養殖判別の可能性

ブリにおいては、リノール酸組成が平均値で養殖魚が天然魚の 7.75 倍と顕著に高かったことから、リノール酸組成のみを用いた養殖判別の可能性について検討した。

天然ブリ及び養殖ブリ筋肉中のリノール酸組成の分布を比較したところ（図1）、養殖ブリ 30 試料のうち、天然ブリ 31 試料と分布が重なった試料数は3試料であった。このことから、リノール酸組成のみを用いて、養殖ブリをおおむね判別できる可能性が示唆された。なお、養殖業者からの聞き取りによる情報では、配合飼料化が進んだブリにおいても、生餌や生餌の割合が高い飼料の給餌をする場合があるとのことから、既報<sup>13)</sup>のマダイとは異なり、リノール酸組成においても、天然ブリと養殖ブリ間で一部分布が重なったと推測された。

また、背部筋肉で養殖ブリと天然ブリを比較したが、切り身やさくの状態では、それが魚体中のどこの部位のものであるかを特定することは困難なため、ラウンドで入手した天然ブリと養殖ブリ各 1 試料について、4 部位（背部筋肉の頭部側及び尾部側、腹部筋肉の頭部側及び尾部側）のリノール酸組成をそれぞれ測定したところ、天然ブリ、養殖ブリともにリノール酸組成の相対標準偏差は 5 %以下であり、部位間のばらつきが比較的小さいことから、部位が不明な切り身やさくの状態でも分析をしても判別への影響が少ないと考えられた。

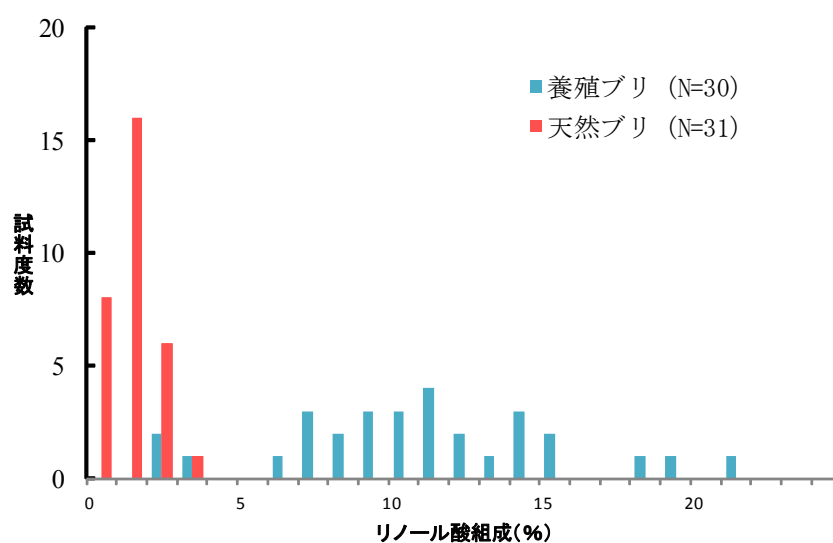


図1 ブリ筋肉中のリノール酸組成の分布

#### 4. まとめ

ブリ、ヒラメ、トラフグ、クロマグロの4魚種について、天然魚と養殖魚の筋肉中の脂質の脂肪酸組成を比較したところ、クロマグロを除く3魚種において天然魚－養殖魚間でリノール酸等の脂肪酸組成に差が見られた。特にブリにおいて顕著な差が見られたリノール酸について、天然ブリ及び養殖ブリ筋肉中のリノール酸組成の分布を比較したところ、養殖ブリをおおむね判別できる可能性が示唆された。

#### 5. 謝辞

試料の収集にあたり、ご協力いただきました漁業協同組合及び水産業者の皆様には深く感謝いたします。

#### 6. 文献

- 1) 農林水産省 平成27年漁業・養殖業生産統計
- 2) 水産庁 平成25年水産白書
- 3) 平野敏行, 中村秀男, 須山三千三: 天然および養殖アユの脂質の品質に関する化学的研究-II, 一般成分の季節変化, 日本水産学会誌, 46(1), 75-78 (1980)
- 4) 平野敏行, 須山三千三: 天然および養殖アユの脂質の脂肪酸組成とその季節変化, 日本水産学会誌, 49(9), 1459-1464 (1983)
- 5) 佐伯清子, 熊谷洋: 10種の天然魚および養殖魚の一般成分の比較, 日本水産学会誌, 50(9), 1551-1554 (1984)
- 6) 佐藤守, 吉中禮二, 西中義裕, 森本晴之, 小島朝子, 山本義和, 池田静徳: 天然および養殖ヒラメ肉の栄養成分の比較, 日本水産学会誌, 52(6), 1043-1047 (1986)
- 7) 青木隆子, 鷹田馨, 國崎直道: 天然および養殖魚6種の一般成分, 無機質, 脂肪酸, 遊離アミノ酸, 筋肉硬度および色差について, 日本水産学会誌, 57(10), 1927-1934 (1991)
- 8) 森岡克司, 森木竜也, 伊藤慶明, 小島渥: 異なる餌料で養成したマダイ体成分の比較, 日本水産学会, 64(5), 867-877 (1998)
- 9) 小泉鏡子: 筋肉中の脂肪酸組成による天然トラフグと養殖トラフグの判別について, 静岡水技研研報, 43, 75-77 (2008)
- 10) 齋藤洋昭: 「水産物の養殖・天然」日本分析化学会表示・起源分析技術研究懇談会編『食品表示を裏づける分析技術－科学の目で偽装を見破る－』, pp.157-165, 東京電機大学出版局 (2010)
- 11) 藤田卓, 安永聡, 辻映美, 小林佐貴子, 千場堅司, 矢野敏弘: 天然マダイと養殖マダイの判別法の検討, 農林水産消費技術センター調査研究報告, 26, 27-49 (2002)
- 12) 藤田卓, 千場堅司, 森田幸博, 矢野敏弘: 養殖魚と天然魚の判別方法の検討－マダイのフィレー部位における適用－, 農林水産消費技術センター調査研究報告, 27, 21-36 (2003)

- 13) 高嶋康晴：脂肪酸分析によるマダイの養殖魚判別法の検討，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，39，7-14（2015）

# 原木栽培乾しいたけの元素分析とストロンチウム安定同位体比分析の組み合わせによる原料原産地判別法の検討

石井 修人, 箱田 晃子

Shuto Ishii, Akiko Hakoda

## 要 約

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（FAMIC）が平成 18 年に開発した元素分析による原木栽培乾しいたけの原料原産地判別法の判別精度を向上させることを目的として検討を行った。その結果、元素分析と Sr 安定同位体比分析を組み合わせることで、元素分析単独による産地判別法と比較して判別精度が向上することを確認した。

## 1. はじめに

食品表示法（平成 25 年法律第 70 号）に基づき定められた食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）には、食品を販売する際に表示しなければならない表示事項やその表示の方法が規定されており、乾しいたけにおいては、栽培方法（原木栽培品にあつては「原木」、菌床栽培品にあつては「菌床」）及び原料原産地などを表示することが義務付けられている。

平成 26 年における乾しいたけの輸入量は国産生産量の約 1.6 倍と、輸入量の割合が高い状況である。また、輸入品のほぼ 100 %が中国産であり、輸入品の価格は国産品の 3 割程度と輸入品に比べ国産が高い傾向にある<sup>1)2)</sup>。このことから、中国産乾しいたけを国産乾しいたけと偽装表示して販売する事例が指摘され、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きた。

食品における産地の科学的検証法は、元素分析、軽元素安定同位体比分析及び Sr 安定同位体比分析を利用した方法が報告されている<sup>3 ~ 5)</sup>。これらの方法は、土壌や水質等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産地判別法である。乾しいたけにおいても、元素分析及び Sr 安定同位体比分析による栽培方法及び原料原産地判別法が報告されている<sup>6 ~ 8)</sup>。

そこで、FAMIC においても平成 18 年に元素分析による乾しいたけの栽培方法及び原木栽培品の原料原産地を判別するための手法を検査で使用できるように開発を行った<sup>9)10)</sup>と、栽培方法の判別については高い中率を示した。しかし、原木栽培品の原料原産地の判別については、栽培方法の判別と比較すると低い中率であり、判別精度を向上する必要があった。

そこで本研究では、原木栽培乾しいたけの元素濃度及び Sr 安定同位体比を測定し、元素分析と Sr 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について検討した。

その結果、元素分析単独による判別法と比較して判別精度が向上することを確認したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2. 1 試料

平成 26～28 年に原木栽培乾しいたけ 77 点（国産 55 点、中国産 22 点）を入手した。国産試料については、試料点数が各県の生産量を反映するように<sup>1)</sup>、商社や農産物直売所等を通じて入手した。県別の試料点数を表 1 に示す。中国産試料については、主要産地である河南省産、陝西省産のものを中心に、商社等を通じて入手した。

表 1 県別の試料点数

県	点数	県	点数	県	点数
岩手	2	石川	1	愛媛	3
宮城	1	山梨	2	高知	1
福島	1	静岡	1	福岡	1
茨城	1	三重	1	長崎	1
栃木	1	鳥取	1	熊本	3
群馬	1	島根	1	大分	20
埼玉	1	岡山	1	宮崎	7
新潟	1	山口	1	鹿児島	1

### 2. 2 試薬

試料の分解には、61 %高純度電子工業用硝酸（関東化学）、70 %過塩素酸（TAMAPURE-AA-100、多摩化学工業）及び 48 %フッ化水素酸（Ultrapur-100、関東化学）を使用した。Sr の精製には、Sr レジン（50-100 $\mu$ m、eichrom technologies）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、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。Sr 安定同位体比測定用の標準溶液は、NIST の認証標準物質 Strontium Carbonate SRM987 を溶解し、適宜希釈して調製した。水は超純水製造装置（Milli-Q Integral3：メルクミリポア）により製造した超純水（比抵抗値  $> 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ）を用いた。

### 2. 3 装置

元素濃度の測定には、誘導結合プラズマ発光分析装置（ICP-OES）（icap6300：Thermo Fisher Scientific）及び誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）（Agilent 7500cx：Agilent Technologies）を使用した。Sr 安定同位体比の測定には、高分解能型誘導結合プラズマ質量分析装置（HR-ICP-MS）（ELEMENT XR：Thermo Fisher Scientific）を使用した。

### 2. 4 分析

試料調製及び酸分解は法邑ら<sup>10)</sup>の方法に従って行った。

#### 2. 4. 1 試料調製

試料 1 点につき 1 個体を抜き取り、柄部と傘裏面のヒダ部を除去後、105 °C で 2 時間乾燥した。乾燥後にポリエチレン製袋に入れ、袋の上から乳棒で叩いて粉碎したものを粉碎試料とした。

#### 2. 4. 2 酸分解

粉碎試料約 0.5 g を 61 %硝酸 10 mL、70 %過塩素酸 2.5 mL 及び 48 %フッ化水素酸 2 mL で酸分解し、蒸発乾固させた。残留物を 1 %硝酸で 50 mL に定容し、元素濃度測定用試料溶液とした。内標準用の In は定容後の濃度が 10 µg/L となるように添加した。試料は全て 2 点併行で分析した。

#### 2. 4. 3 元素濃度測定

ICP-OES を用いて検量線法により Na、Mg、P、K、Ca、Mn、Zn、Sr 及び Ba の 9 元素の元素濃度測定した。また、ICP-MS を用いて内標準法により Co、Cu、Rb、Mo、Cd、Cs、La、Ce 及び Nd の 9 元素の元素濃度を測定した。

#### 2. 4. 4 Sr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 レジンはカラム管に充填し、8 M 硝酸でコンディショニングを行った。元素分析測定用試料溶液を蒸発乾固させ、残留物を 8 M 硝酸 6 mL に溶解し、コンディショニングを行った Sr レジンに負荷した。8 M 硝酸 3 mL を加えて Sr レジンを洗浄後、0.05 M 硝酸 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 Sr安定同位体比測定

HR-ICP-MS を用いて exponential law を用いた内部補正法<sup>11)</sup>により Sr 安定同位体比を測定した。

### 2. 5 元素分析判別モデルの構築

2. 4. 3 で得られたデータを元素分析判別モデルの構築に用いた。各試料 2 点併行で測定した結果からランダムに 1 点選択した粉碎試料中元素濃度、粉碎試料中元素濃度の常用対数を説明変数として、線形判別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。線形判別は R 3.1.3 の MASS パッケージを使用し、SVM は e1071 パッケージを使用した。

解析は中村ら<sup>12)</sup>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。できるだけ少ない元素数で高い的中率が得られるモデルを最適な判別モデルとして選択した。

### 2. 6 元素分析とSr安定同位体比分析の組み合わせ判別モデルの構築

各試料の 2. 5 で得られた元素分析判別得点及び 2. 4. 5 で得られた Sr 安定同位体比を説明変数として、2. 5 と同様の方法で判別モデルを構築した。

## 3. 結果及び考察

### 3. 1 試料の元素組成



18 元素の粉碎試料中元素濃度を統計解析に用いた。各産地の乾燥試料中元素濃度を表 2 に示す。

表 2 各産地の粉碎試料中元素濃度 (mg/kg)

	国産原木栽培乾しいたけ (n=55)			中国産原木栽培乾しいたけ (n=22)		
	平均値	標準偏差		平均値	標準偏差	
Na	55	± 25		51	± 17	
Mg	959	± 158		1165	± 216	
P	2548	± 957		2520	± 712	
K	19190	± 3800		17464	± 3976	
Ca	82	± 35		187	± 105	
Mn	11.9	± 3.8		14.5	± 4.4	
Zn	24.5	± 8.8		20.0	± 5.9	
Sr	0.37	± 0.23		0.61	± 0.38	
Ba	0.52	± 0.32		0.91	± 0.38	
Co	0.024	± 0.024		0.078	± 0.054	
Cu	4.7	± 2.7		4.4	± 1.9	
Rb	67	± 39		30	± 18	
Mo	0.027	± 0.024		0.096	± 0.065	
Cd	0.60	± 0.68		0.36	± 0.25	
Cs	0.50	± 0.49		0.43	± 0.53	
La	0.0060	± 0.0048		0.030	± 0.022	
Ce	0.0102	± 0.0088		0.059	± 0.040	
Nd	0.0050	± 0.0043		0.025	± 0.017	

既報<sup>9)</sup>と比較すると、粉碎試料中元素濃度の変動が大きい元素は、国産は La、Ce、Nd で濃度が約半分に、中国産は Cd で濃度が約 1/3 になっていた。国産、中国産共に、残りの元素は、濃度がほぼ同等又はわずかに減少していた。既報から 10 年以上が経過しているが、全体として元素濃度の変動が小さかった。

### 3. 2 元素分析判別モデルの構築

国産 55 点、中国産 22 点の計 77 点を解析して判別モデルを構築した。その結果、最適な判別モデルとして、K、Mg、Na、P、Sr 及び Mo の粉碎試料中元素濃度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)。

$$X = 12.40 \times \log_{10}[K] - 11.07 \times \log_{10}[Mg] - 0.22 \times \log_{10}[Na] - 3.36 \times \log_{10}[P] - 2.29 \times \log_{10}[Sr] - 2.97 \times \log_{10}[Mo] - 12.07 \quad \dots (式 1)$$

ここで、[K]、[Mg]、[Na]、[P]、[Sr] 及び [Mo] はそれぞれの元素の粉碎試料中濃度 (mg/kg) を示す。LOOCV により得られた判別得点 X のヒストグラムを図 1 に示す。判別得点 X が正の場合は国産、負の場合は中国産と判別した。この判別モデルでは、モデル構築に用いた試料のうち、国産試料の 91 %、中国産試料の 86 % を正しく判別した (表 3)。

なお、既報<sup>10)</sup>の判別モデルは、国産 94 ~ 97 %、中国産 72 ~ 81 % を正しく判別する判別モデルであったため、今回の判別モデルは、国産では的中率がやや低くなってはいるも

この、中国産では高くなっており、全体としてはほぼ同程度の的中率となった。

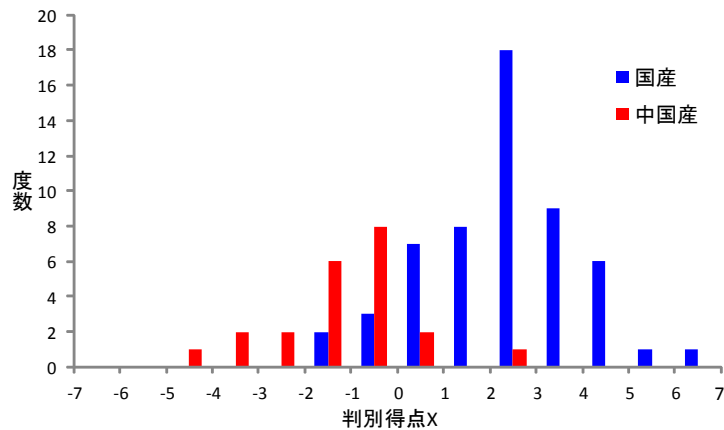


図1 構築した元素分析判別モデルの LOOCV 判別得点のヒストグラム

### 3. 3 Sr安定同位体比分析単独での判別

Sr安定同位体比分析単独での判別精度を確認した。Sr安定同位体比が0.710以下の場合には国産、0.710より大きい場合は中国産と判別すると、モデル構築に用いた試料のうち、国産試料の93%、中国産試料の95%を正しく判別した(表3)。

### 3. 4 元素分析とSr安定同位体比分析の組み合わせ判別モデルの構築

国産55点、中国産22点の計77点を解析して判別モデルを構築した。その結果、最適な判別モデルとして、元素分析判別モデルによる判別得点Xを説明変数とする判別モデルが得られた(式2)。

$$Y = 0.529 \times X - 465.2 \times (^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}) + 330.17 \quad \dots \text{(式 2)}$$

ここで、Xは元素分析判別モデルによる判別得点Xを、 $(^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr})$ はSr安定同位体比を示す。LOOCVにより得られた判別得点Yのヒストグラムを図2に示す。判別得点Yが正の場合は国産、負の場合は中国産と判別した。この判別モデルでは、モデル構築に用いた試料のうち、国産試料の98%、中国産試料の95%を正しく判別した(表3)。また、今回判別モデル構築に使用した国産55点、中国産22点の元素分析による判別得点XとSr安定同位体比の散布図を図3に示す。

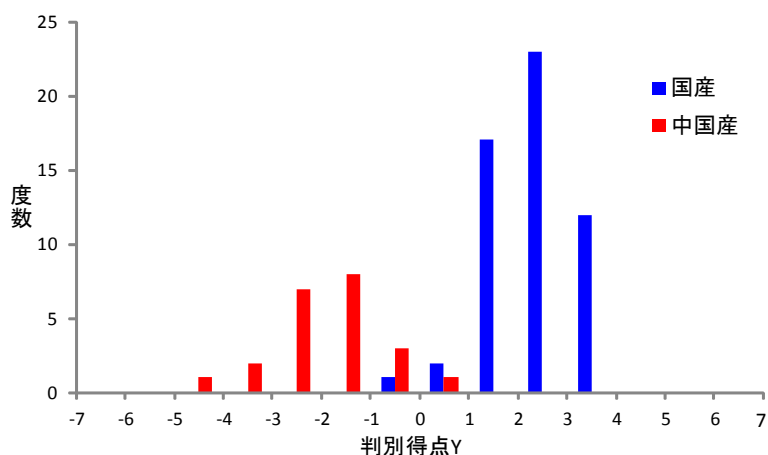


図2 構築した組み合わせ判別モデルの LOOCV 判別得点のヒストグラム

表3 LOOCVによる構築した判別モデルのモデル構築用試料の的中率

産地	元素分析	Sr安定同位体比	→	元素分析とSr安定同位体比 分析の組み合わせ
	的中率	的中率		的中率 (%)
国産	91% (50/55)	93% (51/55)		98% (54/55)
中国産	86% (19/22)	95% (21/22)		95% (21/22)

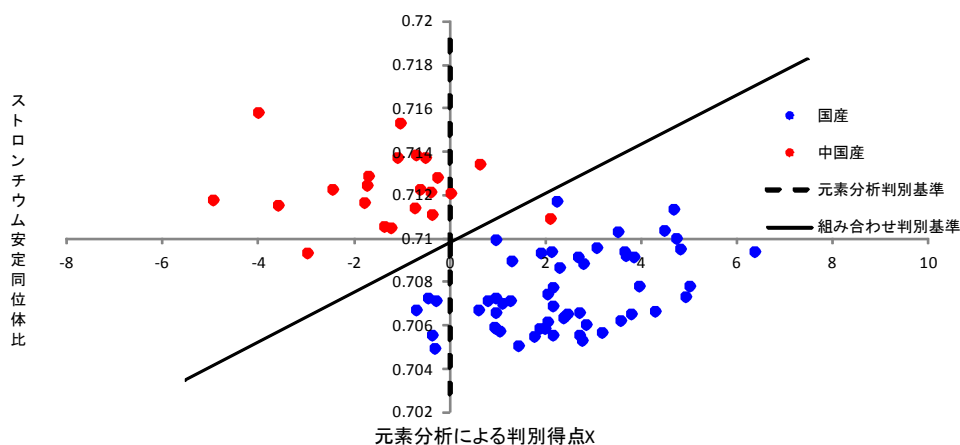


図3 判別モデル構築に使用した試料の判別得点XとSr安定同位体比の散布図

元素分析と Sr 安定同位体比分析を組み合わせると、各分析単独の場合に比べて国産と中国産の分布の重なり部分が少なくなり、より高い判別精度を有する判別法となることがわかった (図3)。また、LOOCV によるモデル構築用試料の的中率も、各分析単独の場合から大きく向上することがわかった (表3)。

#### 4. まとめ

本研究では、元素分析による原木栽培乾しいたけの原料原産地判別モデルを再構築した。さらに、元素分析とSr安定同位体比分析を組み合わせることで、各分析単独による判別法と比較して高い判別精度を有する判別法となることを確認した。この組み合わせによる判別モデルのモデル構築用試料の的中率は国産 98 %、中国産 95 %と、既報よりの中率が向上した。

今後、栽培地、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。

なお、本判別法を使用するに際しては、特許<sup>8)</sup>使用許諾を得る必要がある。

#### 5. 謝 辞

本研究を実施するにあたり、試料収集のご協力やご助言をいただきました一般財団法人日本きのこセンターの時本景亮様及び一般財団法人日本きのこ研究所の赤石博様をはじめ、ご協力やご助言をいただきましたすべての皆様に感謝を申し上げます。

#### 6. 文 献

- 1) 農林水産省 特用林産基礎資料
- 2) 財務省 貿易統計
- 3) 船木紀夫, 服部賢志, 木村康晴, 佐藤耕一, 塚田政範, 津村明宏, 佐藤雅敏, 豊田正俊, 小塚健志, 門倉雅史, 法邑雄司: 無機元素分析によるゴボウの原産国判別, 日本食品科学工学会誌, 57(2), 70-77(2010)
- 4) 門倉雅史, 法邑雄司, 渡邊裕之, 堀田博, 鈴木忠直, 安井明美, 無機元素組成によるカボチャの原産地判定技術: 日本食品科学工学会誌, 57(2), 78-84(2010)
- 5) 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)
- 6) 時本景亮: 日本産乾シイタケと中国産乾シイタケとを判別する手法の開発, 菌蕈, 48, 10-14(2002)
- 7) 時本景亮: 「ストロンチウム同位体比を用いる乾シイタケの原産国判別法」の開発を終えて, 菌蕈, 57, 16-22(2011)
- 8) 乾燥椎茸判別方法, 特許第 3485309 号
- 9) 門倉雅史, 臼井裕一, 有山薫: 無機元素分析による乾シイタケの原料原産地および栽培方法の判別, 日本食品科学工学会誌, 53(9), 489-497(2006)
- 10) 法邑雄司: 無機分析による乾しいたけの栽培方法及び原料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, 33, 1-7(2009)
- 11) 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)

- 12) 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)

## 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

後藤 祐之介<sup>1</sup>, 伊澤 淳修<sup>1</sup>, 申 基澈<sup>2</sup>, 中野 孝教<sup>2</sup>

Yunosuke Gotou, Atsunobu Izawa, Ki-Cheol Shin, Takanori Nakano

### 要 約

国産（日本産）及び中国産の生鮮ネギについて、Sr 安定同位体比（<sup>87</sup>Sr/<sup>86</sup>Sr）による原産地判別法を検討した。

収集した生鮮ネギ試料（国産 64 試料、中国産 38 試料）の Sr 安定同位体比を測定し、Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線により判別基準を設定した結果、国産ネギ 64 試料中 60 試料、中国産ネギ 38 試料中 23 試料の原産地を正しく判別した。

Sr 安定同位体比分析と元素分析の組み合わせによる原産地判別法を検討するために、まず、試料に含有する 6 元素（Mg、P、Ca、Co、Rb、Sr）を説明変数とした線形判別分析を行った結果、国産ネギ 64 試料全て、中国産ネギ 38 試料中 33 試料の原産地を正しく判別した。次に Sr 安定同位体比と元素分析の結果を 2 変数として線形判別分析を行ったところ、国産ネギ 64 試料全て、中国産ネギ 38 試料中 35 試料を正しく判別したことから、Sr 安定同位体比分析に元素分析を組み合わせることで判別精度が向上する可能性があると考えられた。

### 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表示事項やその表示の方法が規定されており、生鮮食品に対しては原産地などを表示することを義務付けている。

平成 27 年における生鮮ネギの国内流通量（輸入量＋国産出荷量）は 44 万トンである<sup>1)</sup>。そのうち 5.7 万トン<sup>1)</sup>が外国産で、その 99 %以上が中国からの輸入である。中国産のネギは、日本人の嗜好に合わせて日本で栽培されている品種と同じ品種が栽培されたものであるため、見た目や遺伝学的手法による品種判別では国産か中国産かを判別することは難しく、これらの方法に替わる科学的検証法が求められていた。そこで、水質、土壌などの生育地の環境の違いが動植物中の元素組成に反映されることを利用した元素分析による原産地判別法<sup>3)~5)</sup>を開発し、平成 17 年に検査マニュアルとして実用化した。しかし、元素分析による原産地判別法の判別精度が必ずしも十分ではなく、より高い判別精度を有する方法の開発が望まれていた。

---

<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

独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) において、Sr 安定同位体比を利用した野菜水煮加工品の原料原産地判別法について検討したところ、国産と中国産の Sr 安定同位体比間に有意差が認められたと報告している<sup>6)</sup>。そこで、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 (以下「MC-ICP-MS」という。) を用いて、Sr 安定同位体比分析によるネギの原産地判別法の開発に取り組んだ。また、Sr 安定同位体比分析及び元素分析を組み合わせた原産地判別法について検討したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2. 1 試料

収集試料の内訳を表 1 に示した。平成 25 年 5 月から 12 月にかけて生鮮ネギ 33 試料 (国産 21 試料、中国産 12 試料)、平成 27 年 6 月から平成 28 年 2 月にかけて生鮮ネギ 69 試料 (国産 43 試料、中国産 26 試料) を収集した。国産試料は国内出荷量の多い 25 道府県の集出荷団体等から入手し、中国産試料は輸入業者等から入手した。また、カット野菜製造業者からカットネギ及びその原料ネギを 7 試料 (国産 3 試料、中国産 4 試料) 入手した。

表 1 収集試料の内訳  
生鮮ネギ

産地	試料数	産地	試料数	産地	試料数
千葉	7	静岡	3	宮城	2
埼玉	5	栃木	2	広島	1
茨城	5	秋田	2	岩手	2
北海道	3	神奈川	2	長崎	1
群馬	3	長野	3	兵庫	2
大分	3	山形	2	徳島	1
青森	2	福島	2	富山	2
鳥取	4	鹿児島	2		
新潟	2	京都	1	中国	38

カットネギ及び原料ネギ			
国産	試料数	中国産	試料数
大阪	1	山東省	4
香川	1		
福岡	1		

### 2. 2 試薬

実験に使用した水は、超純水製造装置 (Milli-Q Element A10、日本ミリポア) 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。Sr 安定同位体比測定において、Sr を精製・濃縮するために陽イオン交換樹脂カラム (DOWEX 50W X8 200-400mesh H型、ダウケミカル) を用いた。元素分析の検量線用標準液は単元素標準溶液 (Na、Mg、P、K、Ca、Mn、Fe、Zn、Sr、Ba、Co、Ni、Cu、Rb、Mo、Cd、Cs、La、Ce、Tl 及び In (ICP 測定用内部標準)) を適宜希釈し調製した。

### 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、誘導結合プラズマ発光分析装置 (ICP-OES) (725-ES、Varian (現 Agilent Technologies)) 及び誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) (820MS、Varian (現 Agilent Technologies)) を使用した。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 MC-ICP-MS (Neptune plus、Thermo Fisher Scientific) を用いた。

## 2. 4 試料調製

各収集試料について、基部から 1 cm を除去し、そこから 10 cm の部位を同重量の超純水とともにミキサーで粉碎した。粉碎試料を樹脂製葉さじを用いて、樹脂製ヒータブルビーカーに 5 g 採取した。

## 2. 5 酸分解

試料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 °C のホットプレート上で加熱した。褐色のガスが発生する激しい反応が収まった後に放冷し、70 %過塩素酸を 2.5 mL 加え、徐々に温度を上げながら 180 ~ 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。次にふたを外し、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、25 mL 容樹脂製全量フラスコに移す操作を 3 回繰り返し、内標準として In を 5 µg/L になるように加え、1 %硝酸で定容後、元素測定用試料溶液とした。

## 2. 6 カラム処理 (Sr安定同位体比分析)

Sr 安定同位体比分析には、元素測定用試料溶液を陽イオン交換樹脂カラムを用いて Sr の精製・濃縮を行った溶液を用いた。元素測定用試料溶液を樹脂製ヒータブルビーカーに量りとり、200 °C 付近で乾固した。この乾固物を 8 M 硝酸で加温・溶解し陽イオン交換樹脂カラムに負荷した後、0.05 M 硝酸で溶出し Sr 安定同位体比測定用試料溶液とした。

## 2. 7 測定

Sr 安定同位体比は MC-ICP-MS により表 2 の分析条件で測定した。

Mg、Na、P、K、Ca、Sr、Ba の濃度は、検量線法で ICP-OES により、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Rb、Mo、Cd、Cs、Tl、La、Ce の濃度は内標準法（内標準：In）で ICP-MS により、表 3 の分析条件で測定した。

表 2 MC-ICP-MSの測定条件

RFパワー	1.2kw
プラズマガスフロー	15 L/min
補助ガスフロー	0.7-0.8 L/min
ネブライザーガスフロー	0.85 L/min
ネブライザー(吸入量)	PFA(100 µL/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	30

表 3 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	1.3kw	1.20kw
プラズマガスフロー	15.5 L/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	0.95 L/min	
ネブライザーガス圧力		200 kPa
ポンプ速度	0.08 rps	15 rpm



## 2. 8 解析

### 2. 8. 1 元素データの解析

測定した元素濃度を説明変数として線形判別分析により判別式を構築した。各収集試料について判別得点を算出し、国産試料の誤判別率が最小となる値を産地判別の基準値とした。

### 2. 8. 2 Sr安定同位体比データの解析

測定した Sr 安定同位体比の分布範囲において、Sr 安定同位体比を産地判別の基準値としたカットオフ値を変化させて、国産ネギを国産と正しく判別する確率（特異度）及び中国産ネギを中国産と正しく判別する確率（感度）を算出し、偽陽性率（1 - 特異度）を横軸、感度を縦軸にプロットした ROC 曲線から基準値を設定した。

### 2. 8. 3 Sr安定同位体比分析法の適用範囲の検討

Sr 安定同位体比分析による判別法がカットネギにも適用可能であることを検討するため、カット野菜の製造工程（洗浄、切断、殺菌）による影響を確認した。

## 3. 結果及び考察

### 3. 1 Sr安定同位体比

#### 3. 1. 1 Sr安定同位体比の測定

収集試料の Sr 安定同位体比の測定結果を表 4 に示した。平均値±標準偏差は、国産（n=64）0.7081 ± 0.0012、中国産（n=38）0.7098 ± 0.0021 となり、国産と中国産間に t 検定で有意差がみられた（ $p < 0.05$ ）。国産の Sr 安定同位体比より中国産が高くなる傾向にあったが、国産の 2 試料（長野県産、鳥取県産）は中国産の平均値より高い値を示し、また、中国産の一部試料は国産の平均値より低い値を示した。

表 4 判別に用いた収集試料中の Sr 安定同位体比

	平均値	標準偏差	RSD%	最大	最小
国産 (n=64)	0.7081	0.0012	0.17	0.7127	0.7054
中国産 (n=38)	0.7098	0.0021	0.30	0.7127	0.7051
A省産 (n=27)	0.7109	0.0013	0.18	0.7127	0.7083
B省産 (n=11)	0.7071	0.0013	0.18	0.7098	0.7051

#### 3. 1. 2 Sr安定同位体比分析法の適用範囲の検討

ネギをはじめとするカット野菜は品質低下を防ぐ目的で、主に次亜塩素酸 Na による原料野菜の洗浄と殺菌が行われている。その影響を確認するために国産 3 試料と中国産 4 試料について、カット処理前の原料ネギとカットネギの Sr 安定同位体比を測定した（図 1）。原料ネギの Sr 安定同位体比は、国産試料より中国産試料が高く、生鮮ネギ収集試料と同

様の傾向であった。原料ネギとカットネギの Sr 安定同位体比を比較したところ、国産試料と中国産試料ともに大きな差はみられなかったことから、カットネギの製造工程による影響は少ないと考えられた。

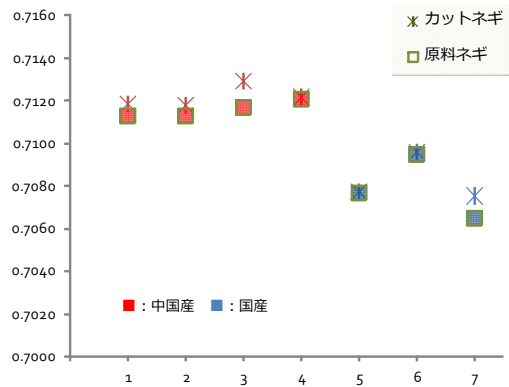


図1 カットネギと原料ネギのSr安定同位体比の比較

### 3. 1. 3 Sr安定同位体比データの解析

ROC 曲線で偽陽性率が最小 (0)、感度が最大 (1) に最も近い値を産地判別の基準値とした (図2)。得られた基準値は  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr} : 0.7095$  となり、この基準値において国産試料は 64 試料中 60 試料が国産と判別され、中国産の平均値より高かった 2 試料 (長野県産、鳥取県産) は中国産の分布と重なり判別できなかった (図3)。また、中国産試料は 38 試料中 23 試料が中国産と判別された。Sr 安定同位体比を用いた判別法は、生鮮ネギだけでなくカットネギにも適用できる可能性があるものの、中国産試料の判別率からみると Sr 安定同位体比だけでは判別精度が不十分と考えられた。

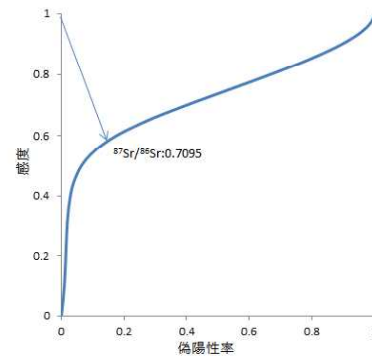


図2  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ による判別法のROC曲線

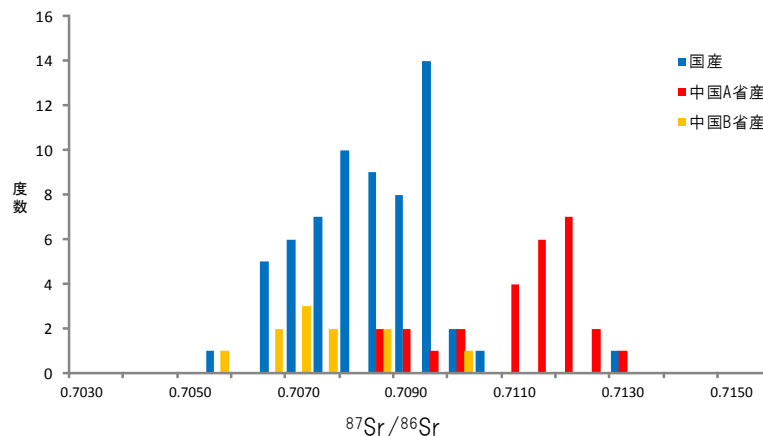


図3 収集試料中の $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ のヒストグラム

### 3. 2 元素分析

#### 3. 2. 1 元素濃度の測定

国産試料と中国産試料の乾燥試料中濃度を表5に示した。20 元素の測定結果について t 検定を行ったところ、10 元素について国産と中国産間に有意差がみられた (p<0.05)。

表5 乾燥試料中の元素濃度

t検定	国産 (mg/kg)									
	Na ※	Mg ※	P ※	K	Ca ※	Mn ※	Fe	Co ※	Ni ※	Cu
平均値	34	11.0×10 <sup>2</sup>	29.1×10 <sup>2</sup>	17.2×10 <sup>3</sup>	2.9×10 <sup>3</sup>	11	29	3.5×10 <sup>-2</sup>	1.0	3.0
標準偏差	35	2.3×10 <sup>2</sup>	6.6×10 <sup>2</sup>	3.9×10 <sup>3</sup>	1.1×10 <sup>3</sup>	11	13	4.4×10 <sup>-2</sup>	1.5	1.6
最小値	8	6.1×10 <sup>2</sup>	15.7×10 <sup>2</sup>	10.0×10 <sup>3</sup>	1.2×10 <sup>3</sup>	3	5	0.8×10 <sup>-2</sup>	0.1	0.9
第1四分位数	20	9.4×10 <sup>2</sup>	24.6×10 <sup>2</sup>	14.1×10 <sup>3</sup>	2.1×10 <sup>3</sup>	6	17	1.6×10 <sup>-2</sup>	0.4	1.7
中央値	27	10.7×10 <sup>2</sup>	28.0×10 <sup>2</sup>	17.5×10 <sup>3</sup>	2.8×10 <sup>3</sup>	7	30	2.1×10 <sup>-2</sup>	0.6	2.7
第3四分位数	38	12.5×10 <sup>2</sup>	33.7×10 <sup>2</sup>	19.6×10 <sup>3</sup>	3.5×10 <sup>3</sup>	10	37	3.3×10 <sup>-2</sup>	0.9	3.9
最大値	312	18.9×10 <sup>2</sup>	52.0×10 <sup>2</sup>	26.8×10 <sup>3</sup>	7.7×10 <sup>3</sup>	75	59	32.2×10 <sup>-2</sup>	9.6	7.3

t検定	国産 (mg/kg)									
	Zn	Rb	Sr ※	Mo ※	Cd ※	Cs	Ba	Tl	La	Ce
平均値	29	5.7	10.2	0.25	8.0×10 <sup>-2</sup>	4.3×10 <sup>-3</sup>	3.3	2.6×10 <sup>-2</sup>	0.6×10 <sup>-2</sup>	0.5×10 <sup>-2</sup>
標準偏差	15	3.4	6.6	0.47	7.7×10 <sup>-2</sup>	6.5×10 <sup>-3</sup>	4.8	9.5×10 <sup>-2</sup>	1.5×10 <sup>-2</sup>	1.4×10 <sup>-2</sup>
最小値	12	1.4	2.1	0.01	0.4×10 <sup>-2</sup>	0.2×10 <sup>-3</sup>	0.1	0.9×10 <sup>-3</sup>	0.5×10 <sup>-3</sup>	0.7×10 <sup>-3</sup>
第1四分位数	20	3.6	6.7	0.05	2.7×10 <sup>-2</sup>	1.5×10 <sup>-3</sup>	1.1	0.6×10 <sup>-2</sup>	0.1×10 <sup>-2</sup>	0.1×10 <sup>-2</sup>
中央値	24	5.0	8.8	0.13	5.2×10 <sup>-2</sup>	3.0×10 <sup>-3</sup>	2.0	0.9×10 <sup>-2</sup>	0.2×10 <sup>-2</sup>	0.2×10 <sup>-2</sup>
第3四分位数	33	7.1	12.1	0.34	12.0×10 <sup>-2</sup>	4.7×10 <sup>-3</sup>	4.0	1.8×10 <sup>-2</sup>	0.5×10 <sup>-2</sup>	0.4×10 <sup>-2</sup>
最大値	107	17.0	51.1	3.93	36.4×10 <sup>-2</sup>	53.6×10 <sup>-3</sup>	37.4	83.7×10 <sup>-2</sup>	11.1×10 <sup>-2</sup>	10.6×10 <sup>-2</sup>

※はt検定により、国産と中国産間で有意水準5%で有意差が認められたことを示す。

t検定	中国産 (mg/kg)									
	Na	Mg	P	K	Ca	Mn	Fe	Co	Ni	Cu
平均値	122	12.2×10 <sup>2</sup>	3.5×10 <sup>3</sup>	17.6×10 <sup>3</sup>	3.7×10 <sup>3</sup>	22.4	39.1	10.3×10 <sup>-2</sup>	1.7	2.7
標準偏差	95	1.5×10 <sup>2</sup>	5.6×10 <sup>3</sup>	4.6×10 <sup>3</sup>	1.5×10 <sup>3</sup>	18.3	17.5	8.9×10 <sup>-2</sup>	1.2	1.2
最小値	35	8.0×10 <sup>2</sup>	1.9×10 <sup>3</sup>	9.0×10 <sup>3</sup>	0.9×10 <sup>3</sup>	6.6	13.8	1.5×10 <sup>-2</sup>	0.3	1.0
第1四分位数	66	11.0×10 <sup>2</sup>	3.4×10 <sup>3</sup>	15.0×10 <sup>3</sup>	2.8×10 <sup>3</sup>	12.1	21.7	5.3×10 <sup>-2</sup>	0.6	1.9
中央値	91	12.2×10 <sup>2</sup>	3.6×10 <sup>3</sup>	16.4×10 <sup>3</sup>	3.6×10 <sup>3</sup>	15.9	39.7	6.8×10 <sup>-2</sup>	1.5	2.4
第3四分位数	125	13.2×10 <sup>2</sup>	4.0×10 <sup>3</sup>	20.4×10 <sup>3</sup>	5.0×10 <sup>3</sup>	21.8	51.1	12.6×10 <sup>-2</sup>	2.5	2.9
最大値	483	14.6×10 <sup>2</sup>	4.4×10 <sup>3</sup>	29.5×10 <sup>3</sup>	6.3×10 <sup>3</sup>	79.6	87.8	42.4×10 <sup>-2</sup>	4.7	6.4

t検定	中国産 (mg/kg)									
	Zn	Rb	Sr	Mo	Cd	Cs	Ba	Tl	La	Ce
平均値	30.6	4.8	27.3	6.0×10 <sup>-2</sup>	1.3×10 <sup>-1</sup>	5.7×10 <sup>-3</sup>	3.0	1.5×10 <sup>-2</sup>	1.3×10 <sup>-2</sup>	1.2×10 <sup>-2</sup>
標準偏差	11.1	3.2	11.9	6.6×10 <sup>-2</sup>	1.1×10 <sup>-1</sup>	5.3×10 <sup>-3</sup>	2.0	1.5×10 <sup>-2</sup>	1.9×10 <sup>-2</sup>	1.5×10 <sup>-2</sup>
最小値	16.4	0.5	14.5	0.4×10 <sup>-2</sup>	9.7×10 <sup>-3</sup>	0.6×10 <sup>-3</sup>	0.3	0.6×10 <sup>-5</sup>	0.1×10 <sup>-2</sup>	0.1×10 <sup>-2</sup>
第1四分位数	22.0	1.9	21.3	1.6×10 <sup>-2</sup>	0.6×10 <sup>-1</sup>	1.9×10 <sup>-3</sup>	1.7	0.5×10 <sup>-2</sup>	0.5×10 <sup>-2</sup>	0.5×10 <sup>-2</sup>
中央値	29.6	4.5	24.3	3.8×10 <sup>-2</sup>	0.9×10 <sup>-1</sup>	4.1×10 <sup>-3</sup>	2.5	1.0×10 <sup>-2</sup>	0.8×10 <sup>-2</sup>	0.8×10 <sup>-2</sup>
第3四分位数	36.2	7.0	31.1	8.6×10 <sup>-2</sup>	1.9×10 <sup>-1</sup>	7.2×10 <sup>-3</sup>	3.8	1.9×10 <sup>-2</sup>	1.2×10 <sup>-2</sup>	1.1×10 <sup>-2</sup>
最大値	63.1	12.5	81.5	30.9×10 <sup>-2</sup>	5.9×10 <sup>-1</sup>	23.5×10 <sup>-3</sup>	9.5	5.6×10 <sup>-2</sup>	10.9×10 <sup>-2</sup>	9.1×10 <sup>-2</sup>

#### 3. 2. 2 元素データの解析

有意差のあった 5 元素と Rb の濃度を説明変数として線形判別分析を行い判別式を構築した (式 1)。

$$x = 4.712 \times \log_{10}[\text{Mg}] - 8.198 \times \log_{10}[\text{P}] + 1.397 \times \log_{10}[\text{Ca}] - 1.815 \times \log_{10}[\text{Co}] + 1.259 \times \log_{10}[\text{Rb}] - 4.755 \times \log_{10}[\text{Sr}] + 11.703 \quad \dots \text{(式 1)}$$

ここで、[Mg]、[P]、[Ca]、[Co]、[Rb]、[Sr]は、それぞれの元素の乾燥試料中濃度 (mg/kg) を示す。

国産ネギ 64 試料と中国産ネギ 38 試料の元素濃度について、この判別式により判別得点を求めた。判別得点のヒストグラムを図 4 に示した。国産試料の誤判別が最小となる値を基準値として、この判別モデルにおいて判別得点  $x$  が -1 以上の場合は国産、-1 未満の場合は中国産と判別したところ、中国産ネギ 38 試料中 33 試料を正しく判別する結果が得られた。

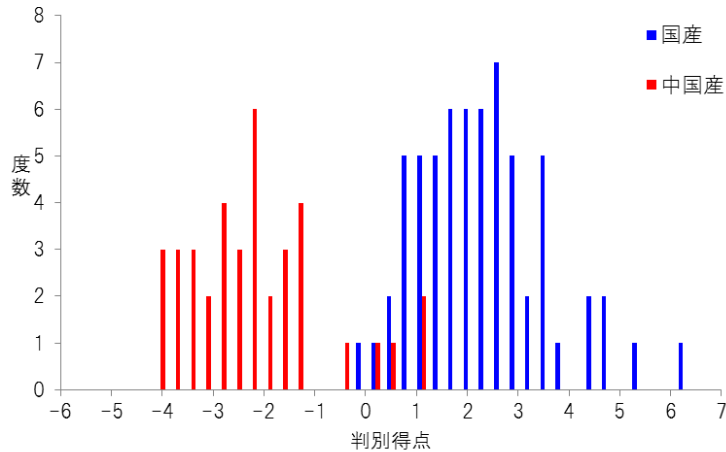


図 4 元素分析による判別得点のヒストグラム

### 3. 3 Sr安定同位体比と元素分析の組み合わせによる解析

Sr 安定同位体比と元素分析結果をもとに線形判別分析により求めた判別得点  $x$  を 2 変数として、線形判別分析を行い判別式を構築した (図 5)。

$$y = 0.905 \times x \text{ (式 1)} - 265.464 \times {}^{87}\text{Sr}/{}^{86}\text{Sr} + 188.194 \quad \dots \text{ (式 2)}$$

このとき国産ネギ 64 試料全てを正しく判別し、中国産ネギ 38 試料中 35 試料を正しく判別した。Sr 安定同位体比分析において判別が困難であった中国産ネギの一部試料においても判別の可能性があると考えられた。

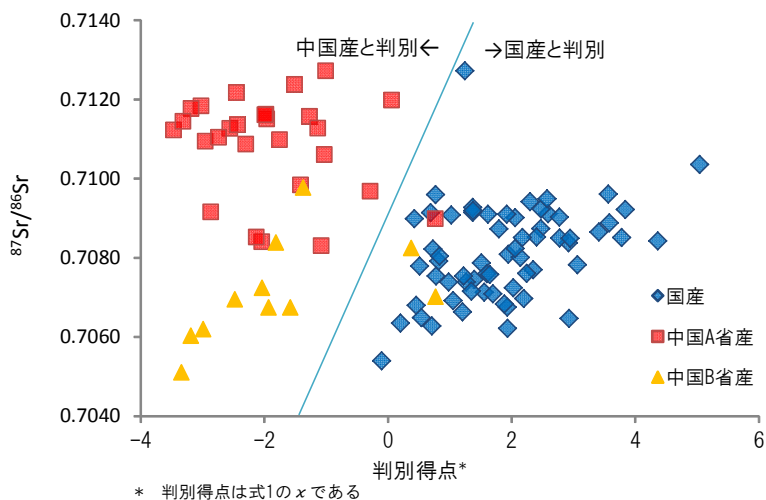


図 5  ${}^{87}\text{Sr}/{}^{86}\text{Sr}$  と元素分析法による判別得点の散布図

#### 4. まとめ

本調査研究では、生鮮ネギの Sr 安定同位体比による原産地判別法を検討した。その結果、収集試料 102 試料中 83 試料の原産地を正しく判別した。また、カットネギと原料ネギの Sr 安定同位体比に大きな差はみられなかったことから、製造工程による影響は小さく、生鮮ネギと同様に判別できる可能性が考えられた。Sr 安定同位体比と元素分析の組み合わせによる原産地判別法を検討した。その結果、収集試料 102 試料中 99 試料の原産地を正しく判別したことから、Sr 安定同位体比分析に元素分析を組み合わせることで判別精度が向上する可能性があると考えられた。

#### 5. 謝 辞

本研究を行うにあたり、試料提供いただいたユーフーズ株式会社に深く感謝いたします。

#### 6. 文 献

- 1) 財務省貿易統計
- 2) 農林水産省作物統計
- 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, 969-978 (2003)
- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) 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)

# 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

渡邊 彩乃, 寺田 昌市

Ayano Watanabe, Shouichi Terada

## 要 約

国産（日本産）及び外国産のりんごを原料としたりんごジュースについて、炭素及び酸素安定同位体比分析を利用した原料原産地判別法を検討した。

りんご果汁 118 試料（国産 65 試料、外国産 53 試料）の炭素及び酸素安定同位体比を測定し、線形判別分析により判別関数を構築した。この判別関数により、判別関数の構築に用いた試料のうち国産試料 62 点（95.4 %）、外国産試料 52 点（98.1 %）の国産・外国産の別を正しく判定した。また、りんごジュース製造時の加工による安定同位体比への影響を確認した結果、幅広い商品（ストレート果汁及び還元果汁、混濁タイプ及び透明タイプ、酸化防止剤添加のもの）に対して本判別法を適用できることが分かった。以上の結果から、炭素及び酸素安定同位体比分析は、りんごジュースの原料りんごの原産地表示の真正性を検証するための手法として有効であることが示された。

## 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表示事項やその表示の方法が規定されており、一部の加工食品に対しては原料原産地の表示が義務づけられている。現在りんごジュースについては原料原産地表示は義務づけられていないが、原料りんごの原産地が国産である旨が表示されたりんごジュースが多く販売されている。

りんごジュースの原料であるりんご濃縮果汁の平成 25 年における輸入量は 86,900 トンであり、主な輸入先（輸入量）は、中国(63,700 トン)、オーストリア (7,100 トン)、ブラジル (5,700 トン) となっている<sup>1)</sup>。一方、平成 25 年の国内生産量は 12,600 トン<sup>1)</sup>であり、国内生産量に比べ大量の果汁が輸入されている。

このため、りんごジュースに表示された原料りんごの原産地表示の真正性を科学的に検証する技術の開発が求められている。

これまでの原料りんごの原産地判別に関する研究では、安定同位体比分析や元素組成分析による判別の可能性が報告されている。これらの方法は、生育環境の違いが植物組織に反映されることを利用したものである。このうち、炭素及び酸素安定同位体比分析を用いた研究では、中下ら<sup>2)</sup>により国産及び輸入りんご果汁について、また鈴木ら<sup>3)</sup>により青森県産及び中国産の生鮮りんごについて、それぞれ判別の可能性が報告されている。ま

た、元素組成分析による研究<sup>4)</sup>では、生鮮りんごの果梗及び種子中の元素濃度を用いた日本産と外国産の判別の可能性が報告されている。

本研究では、炭素及び酸素安定同位体比分析を用いてりんごジュースの原料りんごの原料原産地判別法の検討を行うこととした。検討にあたり、市販されている様々な種類りんごジュースに適用できる判別法とするため、りんごジュース製造時の加工による安定同位体比への影響の確認に重点を置くこととした。

加工による安定同位体比への影響とは、りんごジュース製造時の様々な加工により安定同位体比が変動し、りんごジュースと原料りんごの安定同位体比の間に差が生じることである。原料原産地判別では、生育環境が反映された原料りんごの安定同位体比がりんごジュースに保持されていることが理想的であるため、加工による影響は小さいほど望ましい。また、いずれかの加工による安定同位体比への影響が大きい場合には、その加工が行われたりんごジュースを原料原産地判別法の適用対象から外すなどの対応が必要となる。

りんごジュースの製造時の主な加工工程と加工による炭素及び酸素安定同位体比への影響の可能性について表1にまとめた。なお、本報告では、水分以外りんごジュースの成分のうち、糖や有機酸などの果汁中に溶けている成分を水溶性成分、食物繊維などの懸濁または沈殿している成分を不溶性成分と呼び、水溶性成分と不溶性成分を合わせて固形分と呼ぶこととした。

**表1 りんごジュースの主な加工工程及び加工による炭素及び酸素安定同位体比への影響の可能性**

	加工工程の概要	加工による安定同位体比への影響の可能性
アスコルビン酸 添加	<ul style="list-style-type: none"> <li>・褐変防止のために搾汁時に添加される</li> <li>・一般的な添加量は原料りんご重量の0.1%程度</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・L-アスコルビン酸の安定同位体比及び添加量による</li> <li>・添加量は微量のため影響は小さいと推測される</li> </ul>
加熱殺菌	<ul style="list-style-type: none"> <li>・殺菌及びりんご由来酵素の失活のための工程</li> <li>・一般的な加熱条件は90℃で20秒間程度</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・酸素安定同位体比が変動しやすい条件（高温条件下では固形分の酸素原子と水分などの酸素原子との交換が起こりやすいため）</li> <li>・加熱時間が短いため影響は小さいと推測される</li> </ul>
酵素処理	<ul style="list-style-type: none"> <li>・透明タイプのジュースを製造するための工程</li> <li>・濁りの原因となる不溶性成分を分解して除去する</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・固形分のうち不溶性成分と水溶性成分との安定同位体比の差が大きい場合には、不溶性成分の除去による影響があると推測される</li> <li>・安定同位体比の測定前に不溶性成分を除去する手順を行うことで影響を軽減できる可能性がある</li> </ul>
加熱減圧濃縮	<ul style="list-style-type: none"> <li>・濃縮果汁を製造するために行われる工程</li> <li>・加熱及び減圧により水分を蒸発させて除去する</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・加熱による影響は加熱殺菌の工程と同様</li> <li>・減圧による固形分の安定同位体比への影響はほとんど無いと推測される</li> </ul>

## 2. 実験方法

### 2. 1 試料調製及び安定同位体比測定

りんご果汁の水溶性成分の試料調製は、約 2 mL を遠心分離 (20000 × g, 5 分間) し、その上清をフィルター (孔径 0.45 μm) でろ過した。次に、ろ液の糖度が一定になるように蒸留水で希釈した。微量の希釈液をスズまたは銀製の固体用カプセルに採取し、加熱減圧乾燥 (90 °C、150 分間) を行った後、カプセルを包んだ。

炭素安定同位体比の測定は、元素分析計 (Flash 2000, Thermo Fisher Scientific) を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。測定条件は、燃焼管温度 1000 °C、還元管温度 750 °C、GC カラム温度 50 °C とした。

酸素安定同位体比の測定用試料は、固体用カプセルを包んだ後、真空凍結乾燥機で一晩以上凍結乾燥させたものを用いた。測定は、熱分解型元素分析計 (TC/EA, Thermo Fisher Scientific) を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。GC カラムはモレキュラーシーブ 5A カラム 1.2 m を使用した。測定条件は反応炉温度 1400 °C、GC カラム温度 90 °C とした。

安定同位体比は  $\delta$  値を使って国際測定標準からの偏差として表し、単位は ‰ とした。すなわち、

$$\delta X = R_{\text{試料}} / R_{\text{標準}} - 1 \quad (1)$$

ここで X は、炭素及び酸素のそれぞれに対して、 $^{13}\text{C}$  及び  $^{18}\text{O}$  を表す。R<sub>試料</sub> は試料の安定同位体比 (R ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) 試料、R ( $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ) 試料) を表し、R<sub>標準</sub> は国際測定標準の安定同位体比を表す。国際測定標準は、炭素については Vienna PeeDee Belemnite (VPDB)、酸素については Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW) とした。

### 2. 2 加工による安定同位体比への影響

水溶性成分と不溶性成分との安定同位体比の差の確認には、試料として国産の生鮮りんごの果汁を用いた。不溶性成分は、果汁を遠心分離 (4000 × g、5 分間) し、沈殿を蒸留水で洗浄し、真空凍結乾燥を行った後、約 1 mg を固体用カプセルに採取し、カプセルを包んだ。水溶性成分の試料調製及び安定同位体比測定は 2. 1 の通り行った。成分間差が許容範囲内か否かを判断するための検定は、JISZ8402-6 8.4.9.3.2 の平均値の差の検定を用いた。

加工による影響の確認には、試料として国産の生鮮りんごの果汁を用いた。加工処理は、実験室において、①酵素処理、② L-アスコルビン酸添加、③加熱減圧濃縮、の各処理を以下の方法で行った (なお、各処理の条件は、りんごジュースの製造時に一般的に用いられているものである)。

- ①酵素処理：果汁に対して、ペクチナーゼ (MP Biomedicals) を酵素濃度 0.02 % になるように添加し、45 °C に設定したウォーターバスで約 5 時間、酵素反応を行った。
- ② L-アスコルビン酸添加：果汁に対して、10 % L-アスコルビン酸水溶液を L-アスコルビン酸濃度 0.1 % になるように加え、よく攪はんした。反応終了後、沈殿が生じたため上清のみを採取した。



③加熱減圧濃縮：果汁約 5 mL をナスフラスコに採取し、ロータリーエバポレーターで約 30 ° Brix まで濃縮した。ウォーターバスの設定温度は 90 °C とした。濃縮された果汁を採取し、蒸留水でストレート果汁と同程度の糖度になるように希釈した。

①～③のそれぞれについて、処理を行っていない果汁を比較の際の対照とした。また、試料調製及び安定同位体比測定は 2. 1 の通り行った。加工による影響が許容範囲内か否かを判断するための検定は、JISZ8402-6 8.4.9.3.2 の平均値の差の検定を用いた。

### 2. 3 判別関数の構築

試料は、国産試料として生鮮りんごを 65 点、外国産試料については生鮮りんごの入手が困難であるため、りんご濃縮果汁を 53 点用いた。国産試料は農業協同組合、生産者等から入手し、外国産試料は輸入商社、製造者等から入手した（表 2）。

生鮮りんごは果肉及び果皮部分を破碎、搾汁して果汁を得た。りんご濃縮果汁は、糖用屈折計示度が 10 ～ 15 °Brix になるように蒸留水で希釈した。その後の試料調製及び安定同位体比測定は 2. 1 と同様に行った。

線形判別分析は、国産試料 65 点、外国産試料 53 点の炭素及び酸素安定同位体比を説明変数として、判別関数及び各試料の判別得点を得た。この際、R3.2.2 の MASS パッケージに同封されている lda 関数を使用した。判別関数の構築に用いた試料について、(判別関数) = 0 を基準とした場合に国産試料を国産と判別する確率及び外国産試料を外国産と判別する確率を算出した。

表 2 判別関数の構築に用いた試料の内訳

国産試料		外国産試料	
道県名	点数	国名	点数
青森県	35	中国	34
長野県	11	オーストラリア	5
岩手県	5	ブラジル	4
山形県	4	チリ	4
秋田県	3	南アフリカ	2
福島県	3	ニュージーランド	2
群馬県	3	アメリカ	2
北海道	1		

### 2. 4 判別関数の確認

試料として、原料りんごの原産地が国産のりんごジュース 9 点（全て混濁タイプのストレート果汁）を製造者等から入手した。入手したジュースの県別の内訳は、青森県 2 点、岩手県 3 点、長野県・山形県・秋田県・福島県各 1 点であった。

国産と外国産の判別は、2. 3 で構築した判別関数に各試料の炭素及び酸素安定同位体比を代入して判別得点を算出し、判別得点が正の場合は国産、負の場合は外国産と判定した。

## 3. 結果及び考察

### 3. 1 加工による安定同位体比への影響

### 3. 1. 1 酵素処理による影響

りんごジュースの製造時の主な加工工程のうち、酵素処理は不溶性成分を除去する工程である。安定同位体比の測定対象を固形分とするにあたり、酵素処理によって除去される不溶性成分と残存する水溶性成分との安定同位体比の差が大きい場合には、加工による安定同位体比への影響が生じると考えられる。このため、2種類のりんごの果汁を用いて水溶性成分と不溶性成分との安定同位体比の差の確認を行い、その結果を表3に示した。

表3 水溶性及び不溶性成分の安定同位体比の比較

りんご産地		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				$\delta^{18}\text{O}$ (‰)			
(品種)	成分	n	平均値±標準偏差	平均値の差	許容差	n	平均値±標準偏差	平均値の差	許容差
青森県	水溶性	3	-27.22 ± 0.05			3	21.82 ± 0.19		
(紅玉)	不溶性	2	-30.84 ± 0.05	3.62	0.18	3	20.81 ± 0.13	1.01	0.49
長野県	水溶性	3	-27.72 ± 0.04			2	22.99 ± 0.03		
(サンふじ)	不溶性	3	-31.19 ± 0.01	3.47	0.16	3	20.36 ± 0.05	2.63	0.55

水溶性成分と不溶性成分との安定同位体比の平均値の差は、炭素で最大 3.6 ‰、酸素で最大 2.6 ‰ であり、両方において有意差があった。この結果から、酵素処理によって炭素及び酸素安定同位体比が変動することが推測された。ただし、酵素処理による安定同位体比への影響は、測定対象である固形分に含まれる不溶性成分の割合が減少することによるものであるため、あらかじめ全ての試料について不溶性成分を除去する手順を行うことで、加工による影響を軽減できると考えられた。このため、安定同位体比の測定前の試料調製として、遠心分離およびフィルターろ過を行って果汁から不溶性成分を除去し、水溶性成分を測定することとした。

決定した試料調製の方法を用いて、酵素処理の有無による安定同位体比の差を確認した結果を表4に示した。処理の有無による安定同位体比の平均値の差は、炭素で 0.04 ‰、酸素で 0.21 ‰ となり有意差は無かった。この結果は、試料調製において不溶性成分を除去したことによるものと考えられる。

表4 酵素処理による安定同位体比への影響

加工の種類	処理	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				$\delta^{18}\text{O}$ (‰)			
		n	平均値±標準偏差	平均値の差	許容差	n	平均値±標準偏差	平均値の差	許容差
酵素処理	無	2	-26.55 ± 0.01			3	23.67 ± 0.38		
	有	2	-26.59 ± 0.02	0.04	0.20	3	23.46 ± 0.21	0.21	0.49

### 3. 1. 2 L-アスコルビン酸の添加及び加熱減圧濃縮による影響

L-アスコルビン酸添加及び加熱減圧濃縮の各処理の有無による安定同位体比の差を確認した結果を表5に示した。なお、加熱殺菌の処理は省略し、加熱殺菌の一般的な加熱温度と同じ 90 °C での加熱処理を行った加熱減圧濃縮の結果を用いることとした。

各処理による安定同位体比の平均値の差は、炭素で 0.02 ~ 0.03 ‰、酸素で 0.02 ~ 0.25 ‰ となり、両方の処理において有意差は無かった。各加工により有意な安定同位体比の

変動がみられなかった要因としては、L-アスコルビン酸添加については添加量が微量であるため、加熱減圧濃縮については加熱時間が短いためと考えられる。また、加熱殺菌についても加熱減圧濃縮と同様に有意な影響はないものと推測された。

**表 5 L-アスコルビン酸の添加及び加熱減圧濃縮による安定同位体比への影響**

加工の種類	処理	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				$\delta^{18}\text{O}$ (‰)			
		n	平均値±標準偏差	平均値の差	許容差	n	平均値±標準偏差	平均値の差	許容差
アスコルビン酸 添加	無	2	-24.76 ± 0.02			2	24.22 ± 0.06		
	有	2	-24.74 ± 0.00	0.02	0.20	2	24.46 ± 0.01	0.25	0.60
加熱減圧濃縮	無	3	-28.10 ± 0.02			3	23.40 ± 0.05		
	有	3	-28.07 ± 0.03	0.03	0.16	3	23.42 ± 0.15	0.02	0.49

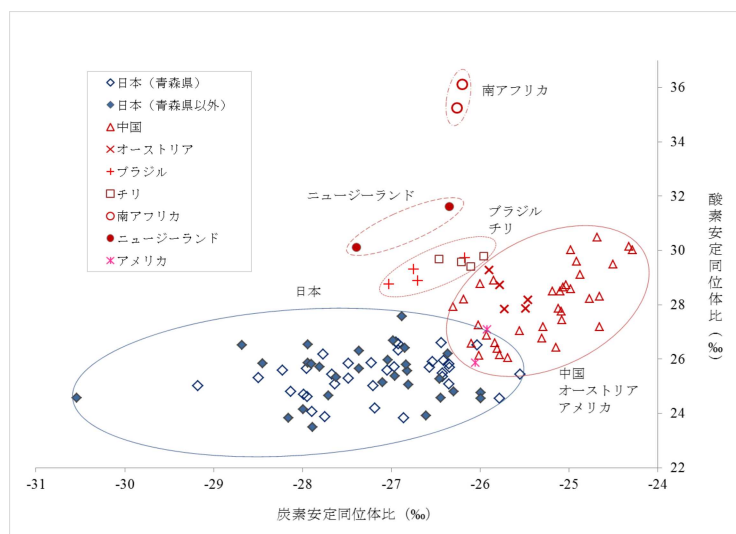
### 3. 1. 3 原料原産地判別法の適用対象

3. 1. 1 及び 3. 1. 2 において、各加工による安定同位体比への有意な影響は無いことを確認した。この結果から、原料原産地判別法の適用対象として、L-アスコルビン酸添加、加熱殺菌、酵素処理、加熱減圧濃縮、の各加工が行われたりんごジュースを含めることができることがわかった。りんごジュースの種類としては、ストレート果汁及び還元果汁、混濁タイプ及び透明タイプ、酸化防止剤添加のものを適用対象とすることができる。

## 3. 2 判別関数の構築

### 3. 2. 1 安定同位体比の分布

国産試料 65 点、外国産試料 53 点の炭素及び酸素安定同位体比を図 1 に示した。国産試料は、炭素及び酸素安定同位体比の両方において外国産よりも低い値を示す傾向がみられた。この傾向は既報<sup>2)</sup>と同様であった。炭素安定同位体比、酸素安定同位体比それぞれ単独では、国産と外国産の分布の重なりが大きいものの、両元素の同位体比を組み合わせることで、分布の重なりが小さくなった。



**図 1 炭素及び酸素安定同位体比の分布**

### 3. 2. 2 判別関数による判定

炭素及び酸素安定同位体比を説明変数として、線形判別分析により、国産と外国産の判別関数を構築した。さらに判別関数に判別関数の構築に用いた試料の炭素及び酸素安定同位体比を代入し、各試料の判別得点を算出した。判別得点が正の場合は国産、負の場合は外国産と判定した。この判別関数により、判別関数の構築に用いた国産試料 65 点のうち 62 点 (95.4 %) が、外国産試料 53 点のうち 52 点 (98.1 %) が正しく判定された。

今回は (判別関数) = 0 を基準として判定したため、国産試料 3 点が外国産の判定となったが、基準とする判別得点を負の方向に移動させることで、国産試料を誤って外国産と判定する確率を低くすることができる。

### 3. 3 判別関数の確認

判別関数の構築にあたり、外国産試料としてりんご濃縮果汁を、国産試料として生鮮りんごを用いたため、生鮮りんごとりんごジュースの間で安定同位体比の分布にズレが生じていないことを確認するために原料りんごの原産地が国産のりんごジュースを用いて国産の分布の確認を行うこととした。なお、国産試料として生鮮りんごを用いた理由は、生鮮りんごの輸入先がニュージーランドのみで輸入量もごくわずかであるため<sup>1)</sup>、国内で流通している生鮮りんごのほとんどが国産であり、複数の国から大量に輸入されているりんご果汁と比較して、より原産地の確かな試料を収集することができる考えたためである。

判別関数の確認用として入手した原料りんごの原産地が国産のりんごジュース 9 点の分布を、判別関数の構築に用いた試料の分布 (図 1) に重ね合わせたものを図 2 に示した。判別関数確認用のりんごジュースの分布は、生鮮りんごを用いて構築した国産試料の分布の範囲内であった。また、構築した判別関数でりんごジュース試料を判定した結果、全 9 点を正しく国産と判定した。この結果より、りんごジュースに対して構築した判別関数を適用できることを確認した。

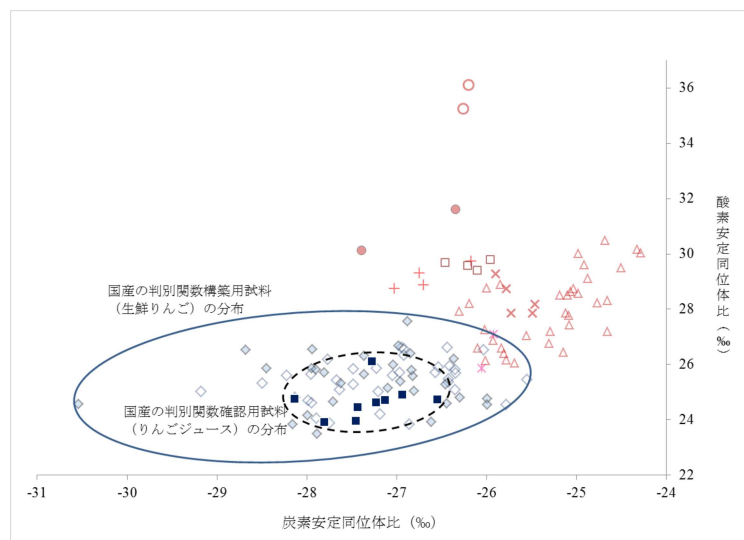


図 2 判別関数の確認用試料の分布

#### 4. まとめ

本研究では、炭素及び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を行った。線形判別分析により構築した国産と外国産の判別関数により、判別関数の構築に用いた国産試料の95.4%、外国産試料の98.1%が正しく判定された。また、りんごジュース製造時の加工による安定同位体比への影響を確認した結果、L-アスコルビン酸添加、加熱殺菌、酵素処理、加熱減圧濃縮の各処理による影響を受けないことが分かった。このため、ストレート果汁及び還元果汁、混濁タイプ及び透明タイプ、酸化防止剤添加のものに対して本判別法を適用することができる。以上の結果から、炭素及び酸素安定同位体比分析は、原料りんごの原産地表示の真正性を検証するための方法として有効であることが示された。

なお、今後、原料りんごの栽培地域や輸入先の変化などにより判別関数の判別能力が変化していくことがあるため、定期的に原産地の確かな試料を用いて、判別関数の妥当性の確認を行うことが望ましい。

#### 5. 謝辞

本研究を実施するにあたり、試料の提供及び製造工程の調査にご協力いただきました生産者、農業協同組合、輸入商社、卸売業者、製造業者等の皆様に心より御礼申し上げます。

#### 6. 文献

- 1) 農林水産省, 品目毎の農林水産物への影響について, 平成27年11月
- 2) 中下留美子, 鈴木彌生子: 安定同位体比分析による国産及び輸入りんご果汁の原産地判別の可能性, 分析化学, 58(12), 1059-1061(2009)
- 3) 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りんごの産地判別の可能性, 日本食品科学工学会誌, 59(2), 69-75(2012)
- 4) 井上博道, 梅宮善章, 喜多正幸: りんご「ふじ」の果梗および種子中元素濃度を用いた日本産と外国産との判別: 日本土壌肥料学雑誌, 80(6), 583-588(2009)

## 水産物からの簡易 DNA 抽出の検討

井伊 悠介, 小岩 智宏, 足立 静香  
Yusuke Ii, Tomohiro Koiwa, Shizuka Adachi

### 要 約

水産物の種判別等に用いる PCR-RFLP 法において、DNA 抽出に要する時間短縮等のため、スピнкаラムを用いたキットに代わる簡便な操作で実施できる抽出法を複数の水産物を用いて検討した。DNA の精製工程においてスピнкаラム、クロロホルムのような劇物、エタノール沈殿法を用いることなく、1つのマイクロチューブ内で試料と2種類の試薬(溶解液と Proteinase K)を混合・加温し、得られた液を希釈することで水産物の種判別等に適用できる DNA の抽出が可能であった。その結果、キットによる方法に比べて、20～25%の時間で PCR-RFLP 分析に利用できる DNA を抽出することができた。

### 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 DNA 分析により水産物の種判別等の検査を実施している。現在、水産物のほとんどの品目において、スピнкаラムを用いた DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) による DNA 抽出を行っているところである。

スピнкаラムを用いたキットは、PCR 阻害物質が除去された DNA を抽出・精製できる一方で、抽出操作は煩雑である。具体的には、試料の溶解後に複数の試薬を添加した後に、この液をスピнкаラムに負荷し、不純物を取り除くためのバッファーを加え、最後に溶出バッファーにより精製された DNA をスピнкаラムより溶出させる。これらの操作には、試薬添加やスピнкаラムへの溶液負荷のピペッティング以外にも複数回の遠心分離やスピнкаラムを新しいマイクロチューブへの移動等を伴う。このため、DNA 抽出に時間を要し、多数の検体を扱う場合は、操作の煩雑さのために、コンタミネーションや試料の取違いを生じる恐れがある。これらの問題点を解決するために、抽出 DNA の純度が良好でなくても、操作工程が少ない簡便な方法により抽出された DNA を用いて検査することが可能となれば、より迅速に検査を行うことができる。

以上のことを踏まえ、本研究では、スピнкаラムを用いたキットより使用試薬の種類が少なく、スピнкаラムやエタノール沈殿法を用いない3種類の簡易な DNA 抽出法を検討し、PCR-RFLP に供する十分な量の PCR 産物量が得られる PCR 条件を検討した。

## 2. 実験方法

### 2. 1 試料

試料として生鮮食品3品目（アサリ、シジミ、マグロ）、加工食品3品目（アジ加工品、サバ加工品、タコ加工品）の合計6品目を用いた。アサリは閉殻筋を、シジミは斧足部を用いた。加工品は表面に調味液等が付着している場合は、滅菌水で洗い流し、余分な水分を産業用ワイパーで取り除いてから用いた。

### 2. 2 DNA抽出

#### 2. 2. 1 キット法 (DNeasy Blood & Tissue Kit)

プロトコルを一部変更して次のとおり DNA 抽出を行った。試料を採取したマイクロチューブに Buffer ATL を 180  $\mu$ L、20 mg/mL Proteinase K 溶液を 20  $\mu$ L 添加し、56  $^{\circ}$ C で 2 時間以上加温し、その間適宜かくはんしながら試料を溶解させた後、100 mg/mL RNaseA 溶液 (Qiagen) を 4  $\mu$ L 添加し、56  $^{\circ}$ C で 5 分間加温した。次に、Buffer AL を 200  $\mu$ L 加えてかくはんし、さらにエタノール (99.5) を 200  $\mu$ L 加えかくはんした。この溶液の全量を mini spin column に負荷し、6000 rcf 以上で 1 分間遠心分離を行い、DNA 等を mini spin column に吸着させた。この mini spin column を新しいマイクロチューブに設置し、Buffer AW1 を 500  $\mu$ L 負荷し、6000 rcf 以上で 1 分間遠心分離を行い、mini spin column の洗浄を行った。この mini spin column を新しいマイクロチューブに設置し、Buffer AW2 を 500  $\mu$ L 負荷し、20000 rcf 以上で 3 分間遠心分離を行い、mini spin column の洗浄を行った。溶出液が付着しないように mini spin column を注意して取り出し、新しいマイクロチューブに設置した。Buffer AE を 100  $\mu$ L 負荷し、3 分以上静置した後に、6000 rcf 以上で遠心分離を行い、溶出液を得た。Buffer AE の負荷と遠心分離を繰り返し 2 回行うことで得た 200  $\mu$ L の溶出液を抽出 DNA 溶液とし、PCR の鋳型 DNA に用いた。

#### 2. 2. 2 簡易抽出法 (テイル溶解液)

試料を採取したマイクロチューブに、試料 1 mg 当たりテイル溶解液 (ナカライテスク) を 20  $\mu$ L、20 mg/mL Proteinase K 溶液 (関東化学) を 1.5  $\mu$ L 添加し、56  $^{\circ}$ C で 40 分間以上加温し、その間適宜かくはんした。次に、85  $^{\circ}$ C で 10 分間静置して Proteinase K を失活させた。

#### 2. 2. 3 簡易抽出法 (GenCheck<sup>®</sup> DNA Extraction Reagent)

試料を採取したマイクロチューブに、試料 1 mg 当たり GenCheck<sup>®</sup> DNA Extraction Reagent (以下「GenCheck」という。ファスマック) を 21.5  $\mu$ L 添加し、95  $^{\circ}$ C で 40 分間以上加温し、その間適宜かくはんした。次に、4  $^{\circ}$ C で 5 分間以上静置した。

#### 2. 2. 4 簡易抽出法 (水酸化ナトリウム)

試料を採取したマイクロチューブに、試料 1 mg 当たり水酸化ナトリウム水溶液を 21.5  $\mu$ L 添加し、95  $^{\circ}$ C で 40 分間以上加温し、その間適宜かくはんした。水酸化ナトリウム水溶液の濃度は岸根・奥西<sup>1)</sup>を参考にし 50 mM とした。

### 2. 2. 5 簡易抽出法により得られた DNA の希釈

抽出 DNA 溶液の上清を TE バッファー (pH 8.0) で 1 (希釈せず)、5、10、25、50、100、200 倍に希釈して PCR の鋳型 DNA に用いた。

### 2. 3 PCR-RFLP 及びアガロースゲル電気泳動

品目ごとに設定された条件 (プライマー配列、PCR サイクル条件、制限酵素の種類等) による PCR-RFLP を行った。Taq ポリメラーゼは AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA Polymerase (以下「Ampli Taq Gold」という。Thermo Fisher Scientific)、又は TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> Hot Start Version (以下「TaKaRa Ex Taq HS」という。タカラバイオ) を用い、サイクル数は 35 サイクル、又は 45 サイクルとした。鋳型 DNA 量は原則、PCR 反応液の 1/10 量とした。増幅対象部位はミトコンドリア DNA の一部分であり、目的の増幅長はアサリ 283 bp、シジミ 888 bp、アジ 360 bp、サバ 505 bp、マグロ 915 bp、タコ 432 bp である。

アガロースゲル電気泳動は 0.5 µg/mL の臭化エチジウムを含む 3 %アガロースと TBE バッファーにより電気泳動を行った。アガロースは、アガロース S (ニッポンジーン)、又はアガロース KANTO HC (関東化学) を用いた。

## 3. 結果及び考察

### 3. 1 簡易抽出法における試料の溶解

テイル溶解液による抽出においては、試料の全てもしくは一部の溶解が目視により確認できた。GenCheck、水酸化ナトリウムによる抽出においては、目視による観察では試料の溶解はほとんど確認できなかった。

### 3. 2 PCR-RFLP 産物の電気泳動による 3 種類の簡易抽出法の比較

アサリ、シジミは TaKaRa Ex Taq HS により、アジ加工品、サバ加工品、マグロは AmpliTaq Gold により 35 サイクルの PCR-RFLP を行った。結果を図 1 に示す。

テイル溶解液により抽出した DNA を用いた場合、抽出 DNA 溶液の上澄みの 1、5、10 倍希釈では PCR 産物が確認できず、25 倍以上希釈したもので PCR 産物が確認された。アジ加工品、サバ加工品、マグロは、キット法により抽出した DNA からの PCR 産物に比べ薄い傾向であった。GenCheck により抽出した DNA を用いた場合、アサリ、シジミでは希釈倍率によらず PCR 産物が確認された。アジ加工品、サバ加工品は 5 から 200 倍希釈で、マグロは 5 から 25 倍希釈で PCR 産物が確認されたが、キット法により抽出した DNA による PCR 産物量と比べると非常に少ない結果であった。水酸化ナトリウムにより抽出した DNA を用いた場合、アサリ、シジミでは希釈倍率によらず PCR 産物が確認された。アジ加工品においても PCR 産物が確認されたが、キット法により抽出した DNA による PCR 産物量と比べると非常に少ない結果であった。サバ加工品、マグロでは PCR 産物が確認できなかった。



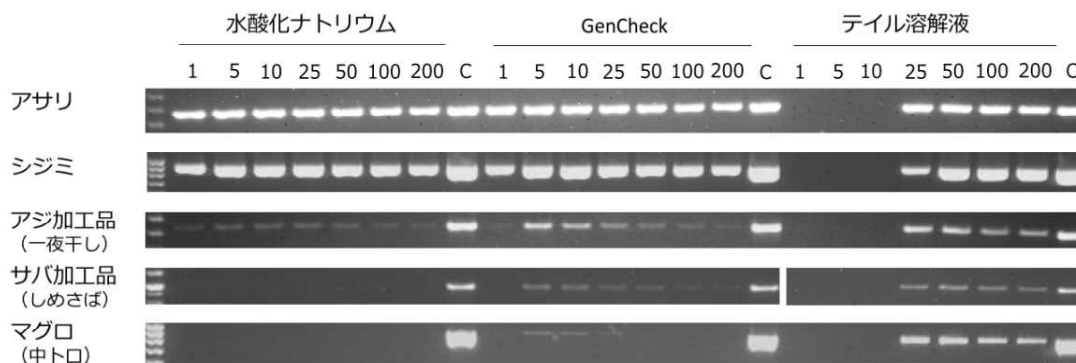


図1 3種類の簡易抽出法により得られたDNAのPCR産物の比較

アサリ、シジミは TaKaRa Ex Taq HS により、アジ加工品、サバ加工品、マグロは Ampli Taq Gold を用いて PCR を行った。C は DNeasy Blood & Tissue Kit により抽出した試料からの DNA の PCR 産物を示す。1、5、10、25、50、100、200 は希釈倍率を示す。

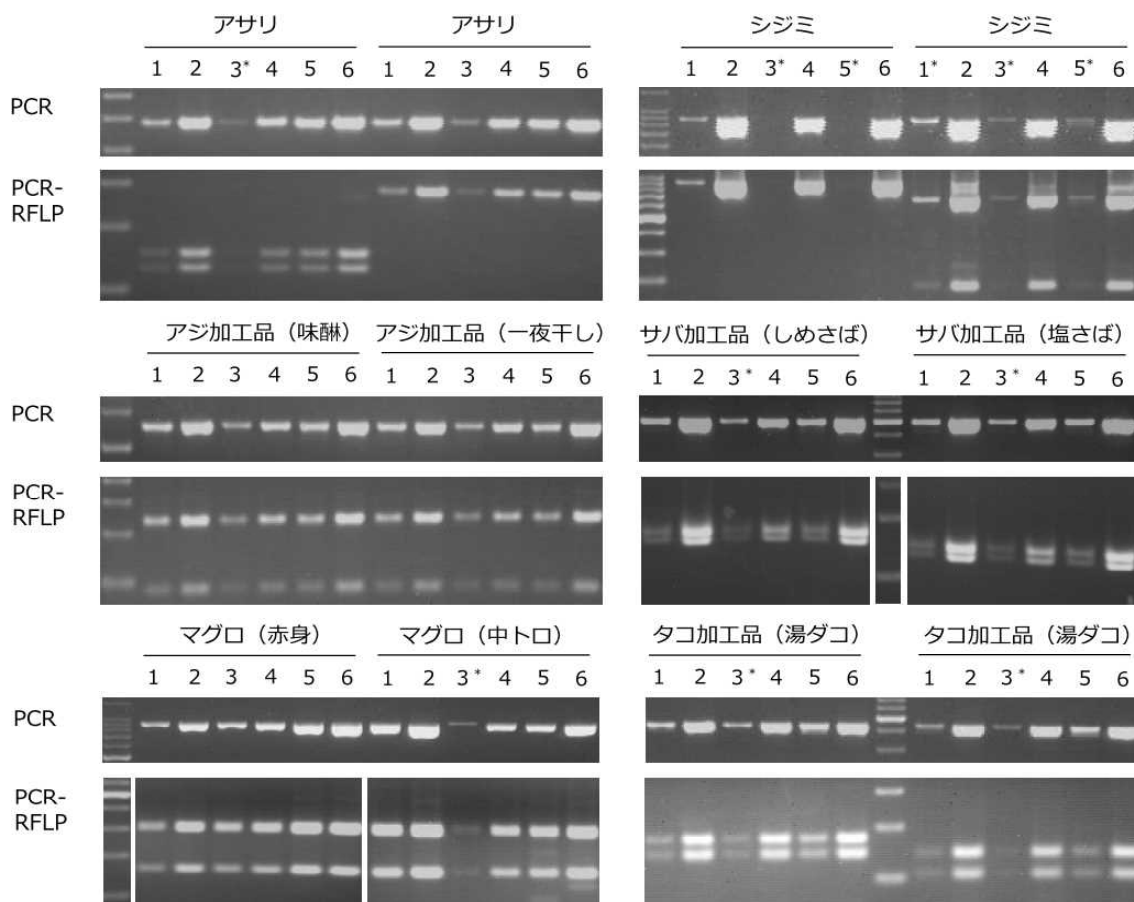
テイル溶解液で抽出した DNA は、1、5、10 倍希釈では PCR 産物が生じなかったが、これは鋳型 DNA にテイル溶解液が含まれる場合、希釈して用いるとされていることから<sup>2)</sup>、テイル溶解液には PCR を阻害する物質が含まれており、この濃度を薄めることで、PCR 増幅が可能になると思われた。

サバ加工品やマグロのように、GenCheck 又は水酸化ナトリウムによる抽出 DNA では PCR 産物がほとんど確認できない品目があったことから、品目に関わらず同一の方法で簡易抽出を行う場合を考えると、3 種類のうちテイル溶解液の方法が適していると考えられた。

### 3. 3 簡易抽出したDNAのためのPCR条件の検討

アサリ、シジミ、アジ加工品、サバ加工品、マグロ、タコ加工品からキット法により抽出した DNA と簡易抽出法 (テイル溶解液) により抽出した DNA を 50 倍に希釈したものをを用いた。Taq ポリメラーゼは、Ampli Taq Gold 及び TaKaRa Ex Taq HS を用いた。サイクル数は 35 サイクルとし、簡易抽出法による DNA については 45 サイクルでも実施した。結果を図 2 に示す。

2 種の Taq ポリメラーゼの違いによる PCR 増幅量を比較すると、サイクル数と抽出方法が同じであれば、いずれの品目でも Ampli Taq Gold に比べ TaKaRa Ex Taq HS による PCR において、より多くの PCR 産物が得られ、その結果 RFLP が明瞭に観察される傾向にあった。特に、シジミ、サバ加工品、タコ加工品でその傾向が顕著であった。アサリ及びタコ加工品においては Ampli Taq Gold を用いた場合、サイクル数を 35 サイクルから 45 サイクルに増やすことで PCR 産物の増加が認められたが、その産物量はアサリにおいては TaKaRa Ex Taq HS による 35 サイクルのものと同程度で、タコ加工品においては TaKaRa Ex Taq HS による 35 サイクルのものより少なかった。これらの結果から、簡易抽出法による鋳型 DNA と PCR 条件の組み合わせでは Taq ポリメラーゼは Ampli Taq Gold より TaKaRa Ex Taq HS が適していると考えられた。



**図 2** DNeasy Blood & Tissue Kit 及びテイル溶解液により抽出された DNA による PCR-RFLP 産物の電気泳動図

1～6のPCR等の条件（鋳型DNAの抽出試薬、Taqポリメラーゼ、サイクル数）は下記のとおり。レーン番号に付した\*はPCR-RFLP産物が特に薄い、もしくは観察されない試料を示す。

- 1 DNeasy Blood & Tissue Kit、Ampli Taq Gold、35 サイクル
- 2 DNeasy Blood & Tissue Kit、TaKaRa Ex Taq HS、35 サイクル
- 3 テイル溶解液、Ampli Taq Gold、35 サイクル
- 4 テイル溶解液、TaKaRa Ex Taq HS、35 サイクル
- 5 テイル溶解液、Ampli Taq Gold、45 サイクル
- 6 テイル溶解液、TaKaRa Ex Taq HS、45 サイクル

3. 2で GenCheck や水酸化ナトリウムによるマグロの簡易抽出 DNA について Ampli Taq Gold を用いて PCR を行った場合、その増幅は良好ではなかった（図1）。よって TaKaRa Ex Taq HS による PCR で良好な増幅結果が得られるかを調査した結果（図3）、水酸化ナトリウム及び GenCheck から得た抽出 DNA では、アサリやシジミのような良好な PCR 増幅（図1）は生じなかった。水酸化ナトリウムによる抽出 DNA ではほとんど PCR 産物を得ることができず、また GenCheck による抽出 DNA では50倍以上に希釈したテイル溶解液による PCR 産物の方が量が多い結果であったことから、TaKaRa Ex Taq HS を用いた場合でも簡易抽出法はテイル溶解液による方法が適していると思われた。GenCheck で抽出した DNA を TaKaRa EX Taq HS により PCR に供した場合、シジミ等では1倍希釈、

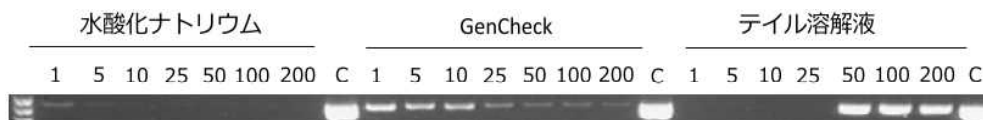


図3 3種類の簡易抽出法により得られたマグロからのDNAの TaKaRa Ex Taq HS による PCR 産物の比較

マグロは中トロを用いた。CはDNeasy Blood & Tissue Kitにより抽出した試料からのDNAの PCR 産物を示す。1、5、10、25、50、100、200は希釈倍率を示す。

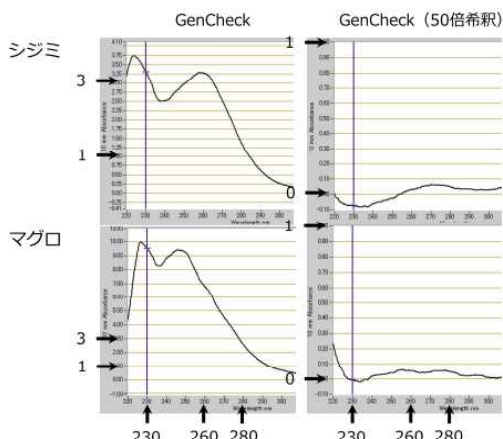


図4 GenCheck により簡易抽出されたシジミ及びマグロのDNA溶液の吸収スペクトル

X軸：波長 (nm)、Y軸：吸光度

50倍希釈でも同程度のPCR産物量である一方で(図1)、マグロでは1倍希釈より50倍希釈のPCR産物量は少ない傾向であった(図3)。GenCheckにより抽出したシジミとマグロのDNAの吸収スペクトルを図4に示す。ともに、希釈することで、DNA以外の物質の濃度も減少し、希釈後の吸収スペクトルはほとんど同じと思われるが、シジミのように希釈してもPCR産物量が変わらない場合とマグロのように希釈することでPCR産物量が減少する場合がある理由是不明である。簡易抽出では精製操作がないことから、抽出DNA溶液に試料由来のPCR阻害物質が含まれている可能性が考えられたので、希釈した抽出DNA溶液もPCRに用いて検討し

たが、テイル溶解液の1~10もしくは1~25倍希釈以外においては(図1及び図3)、希釈によるPCR産物の増加はほとんど確認されなかった。

### 3. 4 使用量を同一にしたテイル溶解液による簡易DNA抽出

2. 2. 2の簡易DNA抽出法において、テイル溶解液とProteinase K溶液の使用量は試料の採取量に応じて変更している。抽出操作の工程はキット法に比べ簡易であるが、試料ごとに試薬の添加量を変更する作業には労力を要する。そこで、異なる試料量において、添加する試薬量が同一でもPCR増幅が得られるかを調査した。

採取した試料について、その量によらず、20mgの試料の抽出に用いる量に相当する、400µLのテイル溶解液と30µLのProteinase K溶液により抽出を行い、50倍に希釈したものをTaKaRa Ex Taq HSによるPCRに供した。用いた試料量の範囲等は表1のとおりである。また、これらの試料とは別に2. 2. 2のとおり、1mg当たり20µLのテイル溶解液と1.5µLのProteinase K溶液により抽出し、50倍に希釈したものをコントロールに用いた。結果の一部を図5に示す。採取した試料の量は、最小量と最大量で5~35倍の違いがあったが、他の4試料も含めて、いずれもコントロールと同程度の量のPCR産物が観察された。

表 1 テイル溶解液による簡易抽出の試薬量の検討のために採取した各試料の量

試料	n=	試料量					
		平均値(mg)	標準偏差(mg)	RSD(%)	最小量(mg)	最大量(mg)	最大量/最小量
アサリ	33	20	13	67	4	46	12
シジミ	43	19	16	82	2	69	35
アジ加工品 (味醂)	18	27	19	71	4	57	14
アジ加工品 (開き)	18	26	19	73	4	61	15
サバ加工品 (しめさば)	18	30	20	67	4	68	17
サバ加工品 (味醂)	18	28	17	62	3	56	19
サバ加工品 (味噌漬)	18	30	19	61	5	60	12
マグロ (中トロ)	18	38	17	46	9	70	8
マグロ (赤身)	18	37	18	48	13	71	5

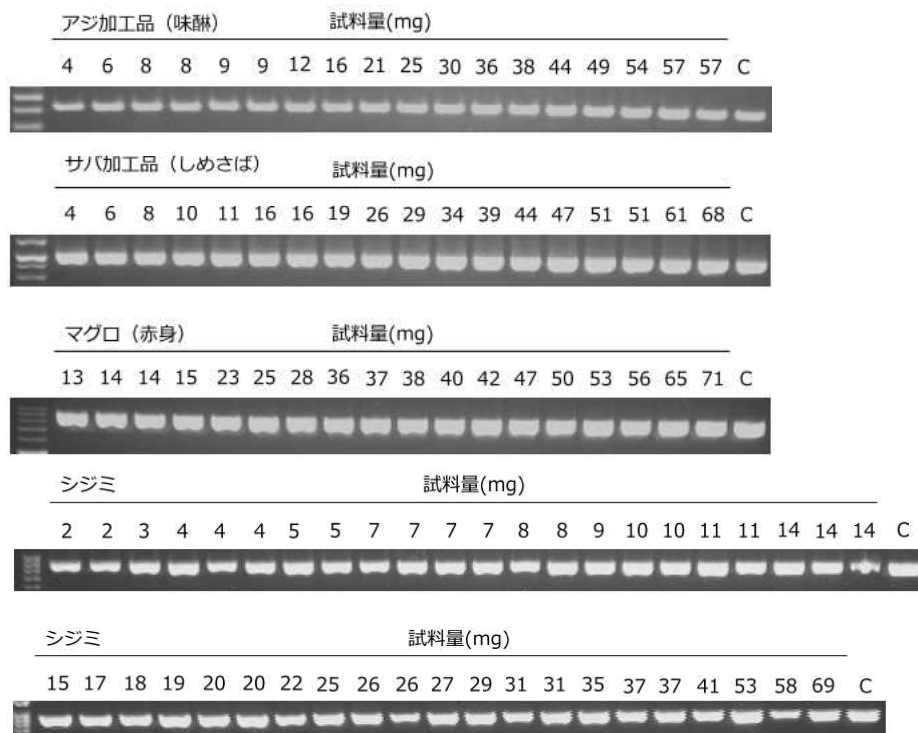


図5 テイル溶解液の添加量を同一にして試料から抽出された DNA の PCR 産物の電気泳動図

C は、試料 1 mg 当たり、200  $\mu$ L のテイル溶解液と 1.5  $\mu$ L で抽出した試料からの DNA の PCR 産物を示す。

DNA の抽出効率や、抽出液中の DNA や夾雑物の濃度を一定にすることで、異なる試料量でも同程度の PCR 産物量が得られることを想定して、試料量に応じた試薬量で抽出を行ったが、テイル溶解液及び Proteinase K 溶液の添加量は試料量に関わらず一律でも、同等の結果が得られることが分かった。従ってある試料量の範囲では試薬の添加量を試料量ごとに変更する必要がなく、より効率的な抽出操作が可能と考えられた。

### 3. 5 テイル溶解液の利点及び評価

本調査研究においてテイル溶解液により簡易抽出された6種類の水産物のDNAのいずれにおいてもPCR増幅が可能であることが確認された。DNeasy Blood & Tissue Kitは溶解液中のDNAや夾雑物をスピнкаラムに吸着させることで、DNAの精製を行うものであるが、スピнкаラムの容量が固定されているためか、試料量が25 mgを超えると収量が低下するとされている<sup>3)</sup>。スピнкаラムの容量が固定されているため試料量には制約がある一方で、今回検討したテイル溶解液による簡易抽出法は幅広い範囲の試料量に対応できることから、少量の試料採取が簡便に実施できる。さらに用いる試薬数や操作工程が少なく、スピнкаラムの使用やエタノール沈殿の必要がなく全体的に操作が簡便であり、ピペティング操作の回数も少ないことからコンタミネーションのリスク軽減も期待できる。なお、今回のテイル溶解液による鋳型DNAは4℃で1ヶ月保存した後でもPCRに供することが可能である。

今回検討したテイル溶解液による簡易抽出法と似た工程による、魚介類からの簡易抽出法にEstoupら<sup>4)</sup>の方法がある。これは100～200 meshの陽イオンをキレート化する樹脂とProteinase Kを含む溶液中で55℃で60分間かくはんした後に、15分間100℃で熱して得られた上清をPCRの鋳型DNAとする方法である。要する時間も今回検討したテイル溶解液による方法と大きくは異ならないが、筋肉部位の供試料は1 mm<sup>3</sup>であることが求められる<sup>4)</sup>。一方でテイル溶解液による今回の方法は、少量の決まった量の試料採取ができなくても、上で述べたように問題なく抽出できることから、より簡便な実用的な方法と考えられる。

これらのことに加え、16～96検体のDNA抽出に要する時間はDNeasy Blood & Tissue Kitによる方法(2.2.1)では約240～600分であるのに対して、テイル溶解液による方法(2.2.2)は約60～110分(約20～25%相当)であり、試薬に要する費用はDNeasy Blood & Tissue Kitによる方法では約470円であるのに対して、テイル溶解液による簡易抽出法(試料20 mg時)は約85円(約20%相当)であることから、テイル溶解液による簡易DNA抽出は、検査に実用的であり、簡便で安価なDNA抽出法と考えられる。ただし、簡易抽出法はDNAの純度が劣ることから、PCR増幅が生じない試料の場合は、キット法によるDNA抽出を行うといった対応が必要と考えられる。

#### 4. まとめ

水産物の種判別等に用いるPCR-RFLP法において、DNA抽出に要する時間短縮等のため、スピнкаラムを用いたキットに代わる簡便な抽出法を複数の水産物を用いて検討した。その結果、テイル溶解液を用いてDNA抽出を行い、TaqポリメラーゼとしてTaKaRa Ex Taq HSを用いたPCRによりPCR-RFLP分析が可能であった。この簡易DNA抽出法により、従来のDNeasy Blood & Tissue Kitを用いた方法に比べ、約20～25%の時間でDNA抽出が可能となった。

#### 5. 文献

1) 岸根雅宏, 奥西智哉. (2011). LAMP法を利用したコシヒカリの高精度・迅速識別. 日本

食品科学工学会誌, 58(12), 591-596.

- 2) 「テイル溶解液」, Specially Prepared Reagents. BULLETIN, L-115. ナカライテスク.  
(<https://www.nacalai.co.jp/products/handling/pdf/BULLETIN-L-115-110310.pdf>)
- 3) 「DNeasy® Blood & Tissue Handbook」, July 2006, Qiagen
- 4) Estoup, A., Largiadere, C. R., Perrot, E., Chourrout, D. (1996). Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular marine biology and biotechnology*, 5(4), 295-298.



## [ 他誌掲載論文 ] (抄録)

- 1 日本食品科学工学会誌 第63巻 第7号 2016年7月 より抄録  
べにふうき緑茶中のメチル化カテキン測定法の室間共同試験による妥当性確認  
法邑雄司, 稗島佑介, 児玉貴志, 田中真澄, 堀江秀樹, 鈴木忠直,  
安井明美
- 2 日本食品科学工学会誌 第63巻 第10号 2016年10月 より抄録  
ウンシュウミカン中の  $\beta$ -クリプトキサンチン測定法の室間共同試験による妥当性確認  
熊谷雅孝, 門倉雅史, 水田賢司, 田中真澄, 生駒吉識, 鈴木忠直,  
安井明美





## べにふうき緑茶中のメチル化カテキン測定法の室間共同試験による妥当性確認

法邑雄司<sup>1</sup>, 稗島佑介<sup>1</sup>, 児玉貴志<sup>1</sup>, 田中真澄<sup>1</sup>, 堀江秀樹<sup>2</sup>, 鈴木忠直<sup>1,3</sup>, 安井明美<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター

<sup>2</sup> 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所  
(現：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶業研究部門)

<sup>3</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食品研究部門)

べにふうき緑茶 (*Camellia sinensis* L.) 中のメチル化カテキンの測定法を、室間共同試験により評価した。本測定法におけるエピガロカテキン-3-O- (3-O-メチル) ガレート (EGCG3"Me) の検出限界 (S/N=3) 及び定量限界 (S/N=10) は、それぞれ 0.005 % (w/w) 及び 0.015 % (w/w) であった。共同試験には 10 試験室が参加し、5 材料を非明示 2 反復で測定した。その結果、EGCG3"Me 含有量が 1.1 % ~ 1.9 % (w/w) の範囲で、併行相対標準偏差 (RSD<sub>F</sub>) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD<sub>R</sub>) はそれぞれ 1.4 % ~ 2.0 % 及び 1.6 % ~ 5.7 % であった。HorRat は 0.39 ~ 1.4 となり、本測定法の妥当性を確認した。拡張不確かさ  $U$  ( $k=2$ ) は、0.094 % (w/w) であった。



## ウンシュウミカン中の $\beta$ -クリプトキサンチン測定法の室間共同試験による妥当性確認

熊谷雅孝<sup>1</sup>, 門倉雅史<sup>1</sup>, 水田賢司<sup>1</sup>, 田中真澄<sup>1</sup>, 生駒吉識<sup>2</sup>, 鈴木忠直<sup>1,3</sup>, 安井明美<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター

<sup>2</sup> 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所  
(現：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶業研究部門)

<sup>3</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食品研究部門)

ウンシュウミカン (*Citrus unshiu* Marc.) 中の $\beta$ -クリプトキサンチンの測定法を、室間共同試験により評価した。本測定法における $\beta$ -クリプトキサンチンの検出限界 (S/N=3) 及び定量限界 (S/N=10) は、それぞれ 0.4 mg/kg 及び 1.2 mg/kg であった。共同試験には 11 試験室が参加し、5 材料を非明示 2 反復で測定した。その結果、 $\beta$ -クリプトキサンチン含有量が 4.7 mg/kg ~ 23 mg/kg の範囲で、併行相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) 及び室間再現相対標準偏差 ( $RSD_R$ ) はそれぞれ 2.0 % ~ 4.2 % 及び 9.0 % ~ 14 % であった。HorRat は 0.75 ~ 1.1 となり、本測定法の妥当性を確認した。拡張不確かさ  $U$  ( $k=2$ ) は、21 % であった。



**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40号**

平成29年3月発行

発行： 独立行政法人 農林水産消費安全技術センター

〒330-9731 埼玉県さいたま市中央区新都心2-1

さいたま新都心合同庁舎検査棟

電話： 050 - 3797 - 1851

FAX： 048 - 600 - 2373

印刷： 名取印刷工業株式会社

