

炭素・窒素安定同位体比による豚肉の産地判別の検討

中村 哲¹、高嶋 康晴²

Satoru NAKAMURA, Yasuharu TAKASHIMA

要 約

国内で流通している国産豚肉 51 件及び外国産豚肉 160 件について、炭素・窒素安定同位体比の測定を行った。その結果、国産豚肉とデンマーク産豚肉については判別できる可能性が高いと認められたが、国産豚肉と米国産豚肉及びカナダ産豚肉については、炭素・窒素安定同位体比だけでは十分に判別することができなかった。

1 . はじめに

生鮮畜産物の原産地は、JAS 法により表示が義務づけられているが、表示義務の発生以降、外国産のものを国産とする産地偽装が相次いでいる。豚肉についても、国産豚肉と外国産豚肉の間で価格差があることから産地偽装が発生しており、産地判別法の開発が求められている。

近年、炭素、窒素、酸素などの安定同位体比を測定することにより、畜産物の産地判別が可能であるとの報告が相次いでいる^{1), 2), 3)}。畜産物の安定同位体比は、摂取した飼料や水の情報を反映することから、これらを組み合わせることにより産地を推定するという方法である。ただし、水素・酸素安定同位体比の測定には、試料の吸湿を防ぐ必要がある、原子の交換が起きる可能性がある、continuous-flow 法による測定法が完全に確立されていないなど、いくつかの困難を伴う^{4), 5)}。

本研究では、国産豚肉及び外国産豚肉(流通量の多い米国、カナダ及びデンマークの3国で生産されたもの)について、測定が比較的容易な炭素・窒素安定同位体比の測定を行い、判別が可能か検討を行った。

2 . 実験方法

2 . 1 試験試料

試験試料は、平成 19 年度から平成 20 年度にかけて、小売店及び加工業者から入手した生鮮豚肉及び冷凍豚肉を用いた。平成 19 年度は主に兵庫県及び大阪府で、平成 20 年度は

¹ (独)農林水産消費安全技術センター神戸センター(現 本部)

² (独)農林水産消費安全技術センター本部

全国で試料の入手を行った。国産試料のうち、平成20年度に入手したものは、生産者又は生産団体の詳細が確実なものに限定した。試料の詳細を表1及び表2に示す。

表1 国産豚肉の産地及び件数

産地	件数		
	平成19年	平成20年	計
鹿児島	16	12	28
宮崎	3	4	7
栃木	1	2	3
埼玉		3	3
熊本	1		1
沖縄	1		1
北海道		1	1
千葉		1	1
静岡		1	1
愛知		1	1
岐阜		1	1
愛媛		1	1
不明	2		2
合計	24	27	51

表2 外国産豚肉の産地及び件数

産地	件数		
	平成19年	平成20年	計
米国	17	46	63
カナダ	9	49	58
デンマーク	4	35	39
合計	30	130	160

2.2 試料の処理

試料の処理は、Radinの方法⁶⁾を改変して実施した。脂身を除去した豚肉試料0.8~1.2gを2mLプラスチックチューブに採取し、真空凍結乾燥機(ADVANTEC DRZ350WB)を用いて1晩凍結乾燥を行った。乾燥した試料をスパーテルで細かく砕いた後、ヘキサン(特級)と2-プロパノール(特級)を3:2で混合した溶媒(以下「混合溶媒」という。約1.5mLを添加し、チューブのふたをして30秒激しく振り混ぜてから、12,000×gで3分間遠心分離を行い、上澄みを廃棄した。更に混合溶媒約1mLで2回、同様の操作を行うことにより、脂肪分を除去した。溶媒を遠心エバポレーター(EYELA CVE-2000)で除去し、乾燥後の試料を安定同位体比の測定に用いた。

2.3 安定同位体比測定

2.2で処理した試料約1mgをスズカップに採取し、元素分析計(EuroVector EA3028)を接続した安定同位体比質量分析装置(GV Instruments IsoPrime)により、表3の測定条件で炭素・窒素安定同位体比を測定した。IAEAより入手した標準物質により炭素・窒素安定同位体比の値付けを行ったL-アスパラギン酸($\delta^{13}\text{C} = -21.7\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N} = 0.7\text{‰}$ 。 δ 値については後述。)についても同様の測定を行い、測定値の校正を行った。炭素の測定値に

については、かたよりを最小限にするために、L-アスパラギン酸及びL-トリプトファン($\delta^{13}\text{C} = -11.4\text{‰}$)の2点で校正した。測定値は以下の式に示す値で表記した。

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{n_B(^{13}\text{C})/n_B(^{12}\text{C})}{n_{\text{VPDB}}(^{13}\text{C})/n_{\text{VPDB}}(^{12}\text{C})} - 1$$

$$\delta^{15}\text{N} = \frac{n_B(^{15}\text{N})/n_B(^{14}\text{N})}{n_{\text{AIR}}(^{15}\text{N})/n_{\text{AIR}}(^{14}\text{N})} - 1$$

$n_B(^iE)$: 測定対象 B に含まれる同位体 iE の物質質量 [mol]

VPDB : Vienna Pee Dee Belemnite

AIR : 大気

表3 元素分析計の条件

条件	設定値
燃焼炉温度	1030
還元炉温度	670
GC オープン	115
He 流量	110 mL · min ⁻¹
He パージ	80 mL · min ⁻¹
酸素量	15 mL

IAEA より入手した標準物質 (NBS22, USGS40, USGS41, IAEA-N-2 及び IAEA-CH-6) を定期的に測定し、かたよりの確認を行った。併行試験及び標準物質の測定結果から、炭素、窒素共に併行標準偏差は 0.1 ‰、かたよりは 0.1 ‰未滿と見積もられた。

2.4 統計解析

各産地について、平成 19 年度、平成 20 年度及び全体の平均値及び標準偏差を求め、年度間及び産地間について、平均値に差があるかを Welch の t 検定により確認した。また、国産豚肉及び米国産豚肉の 2 群について、STATISTICA Pro 06J(スタットソフト ジャパン株式会社) を用いて線形判別分析を行い、判別モデルを構築した。この判別モデルについて 10-fold クロスバリデーション (1/10 の試料のデータを除いて新たに判別モデルを構築し、除いた試料について予測する操作を 10 回行い、全試料を予測することで判別精度を得る) によりその妥当性を検証した。

3 . 結果及び考察

国産豚肉及び外国産豚肉について年度間の比較及び産地間の比較 (国産豚肉と外国産豚肉各種) を行った結果を表 4 及び表 5 に示した。検定の結果、カナダ産豚肉について、平成 19 年度に入手した試料の炭素安定同位体比の平均値と平成 20 年度に入手した試料の炭素安定同位体比の平均値の間に有意な差が見られた ($p < 0.01$)。カナダ東部で養育されている豚の飼料はトウモロコシ含有量が多く、カナダ西部ではトウモロコシ含有量が少ないという報告があるため⁷⁾、平成 19 年度に入手した試料はカナダ西部で養育されたものを、平成 20 年度に入手した試料はカナダ東部で養育されたものを多く収集したと推測した。

この問題は平成 19 年度の試料入手地域が偏っていたことに由来すると推定したが、正確な原因は判明しなかった。ただし、結論には大きく影響しないので、ここではデータを一まとめにして扱った。また、他の産地については特に差が見られなかったため、同様に一まとめとした。

表 4 国産豚肉及び外国産豚肉の $\delta^{13}\text{C}$ の平均値 \pm 標準偏差、年度間の平均値の比較及び国産豚肉と外国産豚肉各種の平均値の比較

(p 値以外の単位: ‰)

産地	平成19年度	平成20年度	p 値(年度間比較)	全体	p 値(国産との比較)
日本	-17.61 \pm 1.03	-18.07 \pm 1.36	0.182	-17.85 \pm 1.23	-
米国	-16.25 \pm 1.13	-16.37 \pm 2.29	0.779	-16.34 \pm 2.04	0.000**
カナダ	-22.50 \pm 2.84	-18.99 \pm 2.52	0.006**	-19.53 \pm 2.85	0.000**
デンマーク	-23.63 \pm 2.75	-24.40 \pm 2.22	0.619	-24.32 \pm 2.25	0.000**

** : 1 % 有意水準で有意差あり

表 5 国産豚肉及び外国産豚肉の $\delta^{15}\text{N}$ の平均値 \pm 標準偏差、年度間の平均値の比較及び国産豚肉と外国産豚肉各種の平均値の比較

(p 値以外の単位: ‰)

産地	平成19年度	平成20年度	p 値(年度間比較)	全体	p 値(国産との比較)
日本	4.24 \pm 0.77	4.26 \pm 0.71	0.947	4.25 \pm 0.73	-
米国	3.64 \pm 0.75	3.81 \pm 0.82	0.435	3.77 \pm 0.80	0.001**
カナダ	5.09 \pm 0.60	4.67 \pm 0.87	0.095	4.73 \pm 0.85	0.002**
デンマーク	4.65 \pm 0.70	4.30 \pm 0.54	0.399	4.34 \pm 0.56	0.525

** : 1 % 有意水準で有意差あり

炭素安定同位体比は、国産豚肉と外国産豚肉各種の間で平均値に有意な差が見られた ($p < 0.01$)。一方、窒素安定同位体比は、国産豚肉対米国産豚肉及びカナダ産豚肉で平均値に有意な差が見られたが ($p < 0.01$)、炭素安定同位体比ほど顕著な傾向ではなかった。全データの散布図(図 1)を見ると、国産豚肉の分布とデンマーク産豚肉の分布はほとんど重ならず、国産豚肉と米国産豚肉及びカナダ産豚肉の分布は重なりが大きいことが確認できた。デンマーク産豚肉の炭素安定同位体比は C_3 植物の炭素安定同位体比の値とほぼ一致していることから、飼料にトウモロコシがほとんど使用されていないことが示唆された。一方、米国産豚肉は飼料中のトウモロコシの含有量が多いという事実を反映し、 C_4 植物の炭素安定同位体比の方にシフトしていた。国産豚肉は、米国産豚肉と比較して飼料中のトウモロコシ含有量が少ないと示唆された。

国産豚肉か外国産豚肉かを判別する場合、国産豚肉対米国産豚肉、国産豚肉対カナダ産豚肉及び国産豚肉対デンマーク産豚肉の 3 種類の判別モデルを作成することが最良である。国産豚肉対米国産豚肉及び国産豚肉対デンマーク産豚肉であるが、米国産豚肉及びデンマーク産豚肉の大半がそれぞれ比較的狭い範囲に存在しており、線形判別分析などを用いた判別を行うことが可能である。一方、国産豚肉対カナダ産豚肉においては、カナダ産豚肉は国産豚肉と分布が重なっているため、良好な判別モデルを形成することができない。そのため、他の産地の判別モデルを適用することにより検出能力を確認することとした。また、米国産豚肉及びデンマーク産豚肉のうち、各産地の群から外れているものについても、もう一方の判別モデルにより検出できるか確認した。

国産豚肉と米国産豚肉の2群を判別するモデルを線形判別分析により作成した結果、(判別得点) = $-0.444 \times \delta^{13}\text{C} + 0.546 \times \delta^{15}\text{N} - 9.78$ という式が得られた。10-fold クロスバリデーションの結果から、(判別得点) = 0 を判定基準とした場合、国産豚肉を71%、米国産豚肉を81%の確率で正しく判別できた。しかし、この判別モデルを用いて国産である旨の表示がされた豚肉の検査を行う場合、偽陽性率(ここでは国産豚肉を誤って外国産豚肉と判定する確率) α があまりにも高く、このままでは検査に使用することができない。そこで、判定基準を変動させながら 10-fold クロスバリデーションにより得られる判別得点と比較して、偽陽性率 α と感度(検出力) $1 - \beta$ (ここでは米国産豚肉を正しく米国産豚肉と判定する確率) をプロットすることにより、受信者操作特性曲線(ROC 曲線)を作成した。得られた ROC 曲線を図2に示した。真の ROC 曲線は、図2とは異なり滑らかな曲線を描くことから、 $\alpha = 0.02$ では $1 - \beta = 0.6$ 程度で、その時の判定基準は(判別得点) = -0.50 付近であると推定した。(判別得点) = -0.50 としたとき、カナダ産豚肉は58件中4件(7%)を国産豚肉でないと判定し、デンマーク産はすべて国産と判定した。

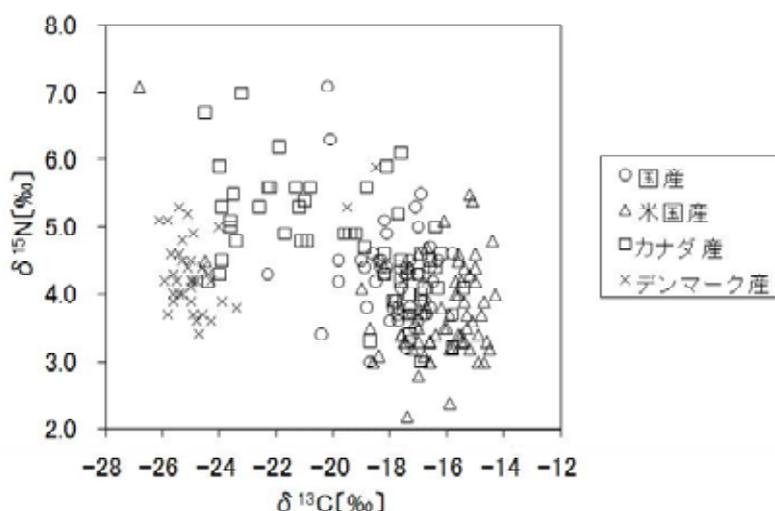


図1 豚肉の安定同位体比散布図

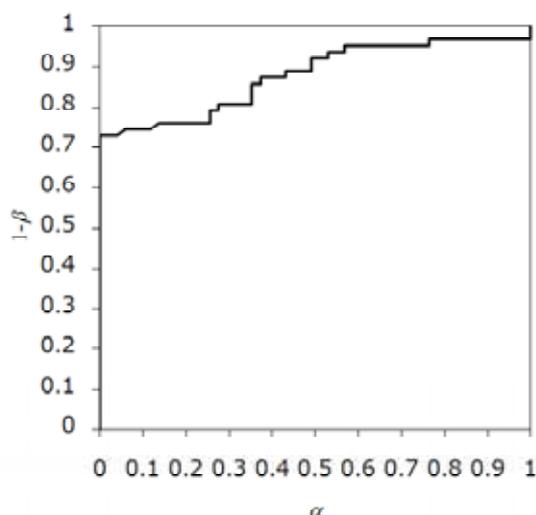


図2 国産豚肉対米国産豚肉の判別モデルのROC曲線

一方、デンマーク産豚肉の大半及びカナダ産豚肉の一部は国産豚肉と大きく異なる炭素安定同位体比であることから、炭素安定同位体比による基準を定めることにより、外国産豚肉の検出が可能と考えた。国産豚肉の $\delta^{13}\text{C}$ の(平均値) $-2 \times$ (標準偏差) = -20.3 ‰ 及び(平均値) $-3 \times$ (標準偏差) = -21.5 ‰ を基準としたときの、国産豚肉の偽陽性率 α 及び各外国産豚肉の感度 $1 - \beta$ の実測値を表6に示した。いずれの基準でも、デンマーク産豚肉は90%程度の確率で国産でないとして判定できたが、カナダ産豚肉を国産でないとして判定する確率は30~40%にとどまった。また、米産豚肉は大半が国産と判定された。

線形判別分析の判定と炭素安定同位体比の判定を組み合わせるにより、国産豚肉の偽陽性率 $\alpha = 0.05$ に設定した場合、米産豚肉の感度 $\beta = 0.60$ 、カナダ産豚肉の感度 $\beta = 0.40$ 、デンマーク産豚肉の感度 $\beta = 0.90$ 程度であると推定した。この結果、デンマーク産豚肉の検出には優れているものの、米産豚肉及びカナダ産豚肉の検出には不十分であると結論づけた。外国産豚肉の感度を上げるには、酸素安定同位体比を測定するなど、別の測定法と組み合わせる必要がある。

炭素・窒素安定同位体比を用いて判定を行うと仮定した場合、豚の養育に使用された飼料の組成によっては誤判別するおそれがあるので注意を払う必要がある。また、最近の飼料作物の需給状況から、飼料中のトウモロコシ含有量が変化していく可能性があり、状況を注視する必要がある。

表6 $\delta^{13}\text{C}$ の基準を定めたときの国産豚肉の α 及び各外国産豚肉の $1 - \beta$

外国産豚肉の産地	(基準) = -20.3 ‰		(基準) = -21.5 ‰	
	α	$1 - \beta$	α	$1 - \beta$
米 国	0.04	0.03	0.02	0.03
カ ナ ダ	0.04	0.40	0.02	0.29
デンマーク	0.04	0.90	0.02	0.90

4 . ま と め

炭素・窒素安定同位体比の測定により国産豚肉から外国産豚肉を検出する方法の開発を試みた。その結果、デンマーク産豚肉については炭素安定同位体比による検出が可能であったが、米産豚肉及びカナダ産豚肉については炭素・窒素安定同位体比の測定だけで検出することが困難だった。

5 . 謝 辞

本研究の実施に当たり、豚肉試料の入手にご協力いただいた南九州畜産興業株式会社に深く感謝申し上げます。

6 . 文 献

- 1) Piasentier, E., Valusso, R., Camin, F. and Versini, G., Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. *Meat Sci.*, **64**, 239-247 (2003).
- 2) Schmidt, O., Quilter, J. M., Bahar, B., Moloney, A. P., Scrimgeour, C. M., Begley, I. S. and Monahan, F. J., Inferring the origin and dietary history of beef from C, N and S stable isotope ratio analysis. *Food Chem.*, **91**, 545-549 (2005).
- 3) Boner, M. and Förstel, H., Stable isotope validation as a tool to trace the authenticity of beef. *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 301-310 (2004).
- 4) Bowen, J. B., Chesson, L., Nielson, K., Cerling, T. E. and Ehleringer J. R., Treatment methods for the determination of $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of hair keratin by continuous-flow isotope-ratio mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 2371-2378 (2005).
- 5) Brand, W. A., Coplen, T. B., Aerts-Bijma, A. T., Böhlke, J. K., Gehre, M., Geilmann, H., Gröning, M., Jansen, H. G., Meijer, H. A. J., Mroczkowski, S. J., Qi, H., Soergel, K., Stuart-Williams, H., Weise, S. M. and Werner, R. A., Comprehensive inter-laboratory calibration of reference materials for $\delta^{18}\text{O}$ versus VSMOW using various on-line high-temperature conversion techniques. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, 999-1019 (2009).
- 6) Radin, N. S., Extraction of tissue lipids with a solvent of low toxicity. *Methods in Enzymol.*, **72**, 5-7 (1981).
- 7) 藤島博康, 長野秀行, 特別レポート 輸出を拡大させるカナダの豚肉産業 (前編), 畜産の情報 海外編, **195**, 61-73 (2006).