

# 近赤外分析による凍結履歴判別法の検討

高嶋康晴、井口潤、浪越充司

Yasuharu Takashima, Jun Iguchi, Atsushi Namikoshi

## 要 約

クロマグロにおける凍結履歴の有無を判別するために、光ファイバーケーブル近赤外分光計により近赤外領域の吸光度の測定を行った。非凍結群と凍結-解凍群間の近赤外領域(750~1050 nm)における吸光度の二次微分値について両群間で有意水準1%のt検定を行い有意な差が見られた波長域の吸光度の二次微分値を用い、判別分析を行った。その結果から判別関数を作成したところ非凍結試料で85.0%(n=20)、凍結-解凍試料で100.0%(n=18)、供試料全体で92.1%(n=38)の判別率(非凍結群又は凍結-解凍の各個体を正しく凍結履歴なし又はありと判別する割合)となる関数が得られた。本研究により近赤外分析がクロマグロ凍結履歴判別に利用できる可能性が示唆された。

## 1. はじめに

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)により、生鮮の水産物においては、凍結-解凍されたものを販売する際には「解凍」の表示が義務づけられている。これまでに、血球や眼球の観察等による凍結履歴の判別法が報告されているが<sup>1~3)</sup>、柵などのように魚体の一部が切り出された状態では判別が困難である。近赤外分析は、非破壊で迅速な測定が可能であり、カツオやマアジの脂質含有量の測定や果物の糖度の測定などに用いられている<sup>4~6)</sup>。凍結履歴に関する研究では、マダイやマアジにおいて皮上からの近赤外分析により凍結履歴を明らかにする研究が行われている<sup>7~9)</sup>。本研究では、マグロ属魚類の中で最も高価なクロマグロを供試料とし、柵等の皮を取り除いた販売状態から凍結履歴を判別するために分析条件及び判別の可否について検討を行った。

## 2. 試料及び方法

### 2.1 試料

非凍結、凍結及び解凍クロマグロは平成19年11月~平成20年2月に、市場内及び場外の専門店を中心に購入し、供試料とした(表1)。非凍結の確認は、店頭での口頭確認に加えてスタンプ法による血球観察により正常な血球が確認されたものを供試料として用いた。

---

(独)農林水産消費安全技術センター本部

凍結試料の解凍法はマグロの柵をラップし温水（35～40℃）に1分程度浸けた後に4℃で24時間冷蔵し供試料とした。

表1 クロマグロ試料一覧

No.	状態	原産地	養殖・天然	No.	状態	原産地	養殖・天然
1	非凍結	鹿児島県	養殖	21	凍結	アイルランド	天然
2	非凍結	鹿児島県	養殖	22	凍結	スペイン	天然
3	非凍結	鹿児島県	養殖	23	解凍	アイルランド	天然
4	非凍結	青森県(尻労)	天然	24	解凍	スペイン	天然
5	非凍結	岩手県	天然	25	解凍	スペイン	天然
6	非凍結	岩手県	天然	26	解凍	トルコ	養殖
7	非凍結	青森県(三厩)	天然	27	解凍	トルコ	養殖
8	非凍結	富山県(氷見)	天然	28	解凍	アイルランド	天然
9	非凍結	青森県	天然	29	解凍	トルコ	養殖
10	非凍結	岩手県(宮古)	天然	30	凍結	スペイン	養殖
11	非凍結	長崎県	養殖	31	解凍	アイルランド	天然
12	非凍結	長崎県	天然	32	解凍	スペイン	養殖
13	非凍結	長崎県	天然	33	解凍	スペイン	天然
14	非凍結	長崎県(壱岐)	養殖	34	解凍	アイルランド	天然
15	非凍結	メキシコ	養殖	35	解凍	クロアチア	養殖
16	非凍結	和歌山県(勝浦)	天然	36	解凍	スペイン	養殖
17	非凍結	アメリカ	天然	37	凍結	アイルランド	天然
18	非凍結	アイルランド	天然	38	解凍	アイルランド	天然
19	非凍結	青森	天然				
20	非凍結	和歌山県	天然				

## 2.2 方法

### 2.2.1 スタンプ法による血球標本の作製及び顕微鏡による血球観察

下記の手順により血球観察を行った。

- ① 試料の断面積が約1 cm<sup>2</sup>になるように魚肉切片を切り取り、スライドガラスに10分間静置する。
- ② 風乾し、メタノール固定を1～5分間行う。
- ③ ギムザ染色液を純水で20倍に希釈した液に15分間浸水する。
- ④ 水洗
- ⑤ 風乾
- ⑥ 光学顕微鏡（倍率100～400倍）で観察する。

### 2.2.2 近赤外分光計を用いた分析

光ファイバースコープを用いたインタラクティブ測定はプローブ先端部外側のリングから光が試料に照射され、試料内部で拡散反射した光を先端部内側で測定する方法である。プローブと接する表面の切断後経過時間は試料によって一定でないことから測定に影響すると考えられたため、約1 cmを切除し、切断面を測定に用いたとした。また、近赤外分析では、測定温度により分析値に影響があるため、測定前に状態を安定化させ

ることが必要である。そのため、測定条件を一定にするために、4℃で24時間保存した後に室温で速やかに測定に供した。

試料の測定は、NIRECO社製の近赤外分光光度計システム NIRS6500 を用いた。外部光の影響をさけるために専用のサンプルボックスを使用し、試料とプローブの先端間に隙間がないように光ファイバプローブを固定し測定を行った。自動測定で32回吸光度を測定し、その平均値を測定値とした。

### 2.3 統計処理

統計処理及び線型判別分析には Black-box (群馬大学情報学部青木繁伸氏作成) を用いた。有意差を判定するための検定は、Welch の t 検定 (両側) により行った。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 スタンプ法による血球標本の作製及び顕微鏡による血球観察

スタンプ法で作成した血球標本は、組織内に残存する赤血球をスライドガラスに付着させる手法であり、血液塗沫標本よりスライドガラスに付着する赤血球数が少ない。また、冷蔵期間が長いと酵素の影響で正常な赤血球組織は少なくなり、細胞液等が溶出するが、ギムザ染色液により細胞液等も染色されるため、観察が困難な場合が多く、分析業務で活用するには適当でないと推測された (図2)。

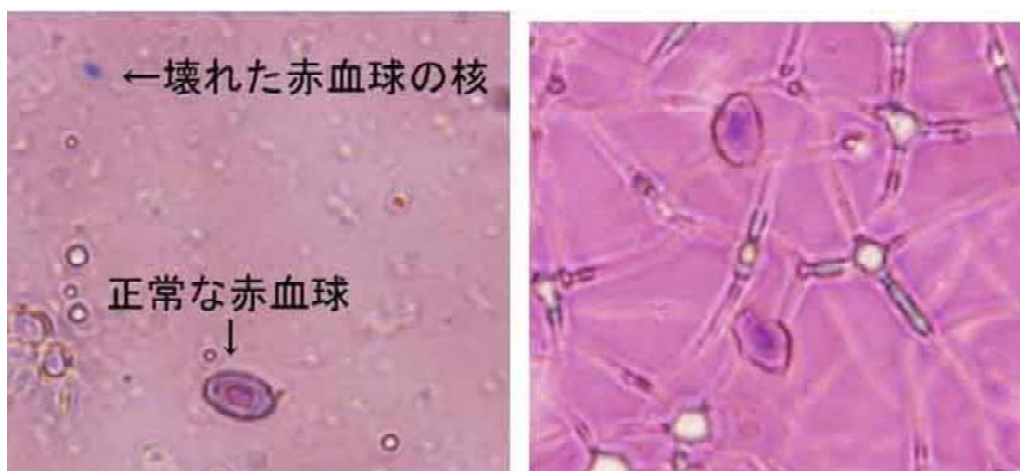


図1 スタンプ法による血球観察  
血球観察組織液より観察しやすい標本(左)と観察しにくい標本(右)

### 3.2 近赤外分光計を用いた分析

#### 3.2.1 測定波長

高含水試料のインタラクティブ測定では、可視光～近赤外領域 (450～1050 nm) の測定が可能である。高脂質部分 (いわゆる「トロ」) と低脂質部分 (いわゆる「赤身」) 各5箇所測定し、測定値のばらつきをみたところ、可視波長 (450～750 nm) では、近赤外波長領域 (750～1050 nm) に比べて標準偏差が高くなったことから、近赤外波長領

域を測定領域とした（図2, 表2）。

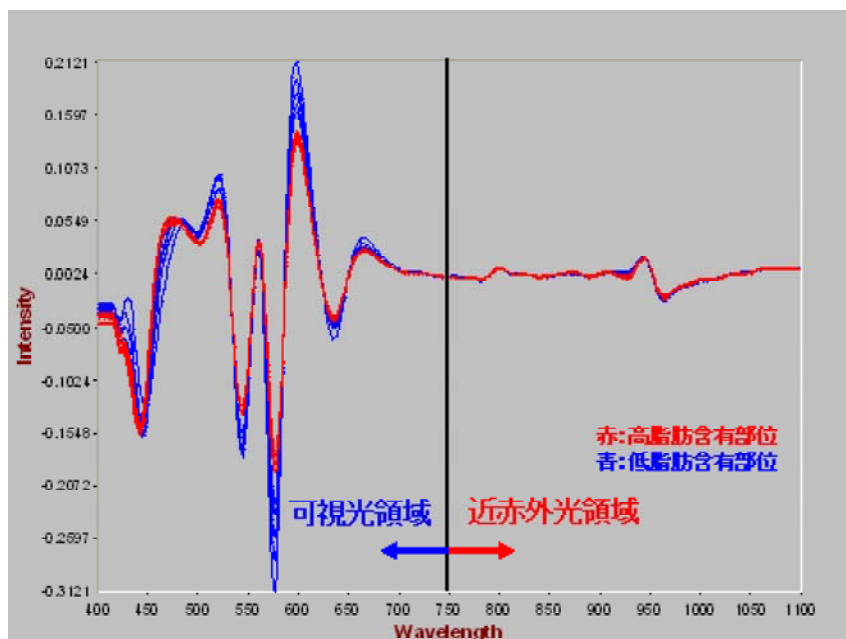


図2 同一個体中の高脂肪含有部位と低脂肪含有部位間の吸光度の二次微分値の差異  
近赤外領域(750~1050 nm)に対して可視光領域(400~750 nm)では部位間の差異が大きい

表2 部位間及び測定領域間の標準偏差の差異 (RSD%)

測定領域	低脂肪含有部位	高脂肪含有部位
可視光領域 (450~750 nm)	36.6	47.0
近赤外光領域 (750~1050 nm)	15.8	7.28

### 3.2.2 近赤外分析による凍結履歴の判別

凍結履歴を判別するための領域の選定については、非凍結試料 (n = 20) と凍結-解凍試料 (n = 18) の近赤外領域 (750~1050 nm) の吸光度を測定し、その二次微分値を用いた。まず、同一供試料で判定に差異が生じないために、高脂肪含有部位と低脂肪含有部位における吸光度の二次微分値を比較し、有意水準5%のt検定で有意な差がある領域を除いた。さらに、非凍結試料群と凍結-解凍試料群間で有意水準1%のt検定を行い有意な差が見られる波長域として、772、838、1018 nmの3波長域を選択した。これらの3波長の吸光度の二次微分値を用い判別分析を行い、以下の判別得点を与える式において判別得点が正の場合は非凍結、負の場合は凍結-解凍と判別する関数が得られた。得られた判別関数では、非凍結試料で85.0% (n = 20)、凍結-解凍試料で100% (n = 18)、供試料全体で92.1% (n = 38) の判別率が得られた。(図3~4、表3~4)。

$$[\text{判別得点}] = -2176.5 \times a + 3985.6 \times b - 8033.3 \times c - 20.0$$

a : 波長 772 nm の吸光度の二次微分値

b : 波長 838 nm の吸光度の二次微分値

c : 波長 1018 nm の吸光度の二次微分値

構築した判別関数の有効性を確認するために、5-fold cross validation(試料データを5等分し、そのうち1つを除いて新たに判別関数を構築し、除いた試料について予測する

操作を5回行い、全供試料を予測することで判別精度を得る)を行った。判別精度は、非凍結で85.0%で凍結-解凍で100.0%の的中率であり、今回構築した判別関数は有効であることが確認された。

非凍結試料群及び凍結-解凍試料群間の差異についての要因は、マダイやマアジでは化学的要因よりも物理的要因の影響が大きいとの報告がある<sup>7-9)</sup>が、明確な要因は明らかにされていない。また、一般的に流通する市販品の検査に活用するには、原産地、養殖-天然、販売時期等を考慮し、さらなる検証が必要である。

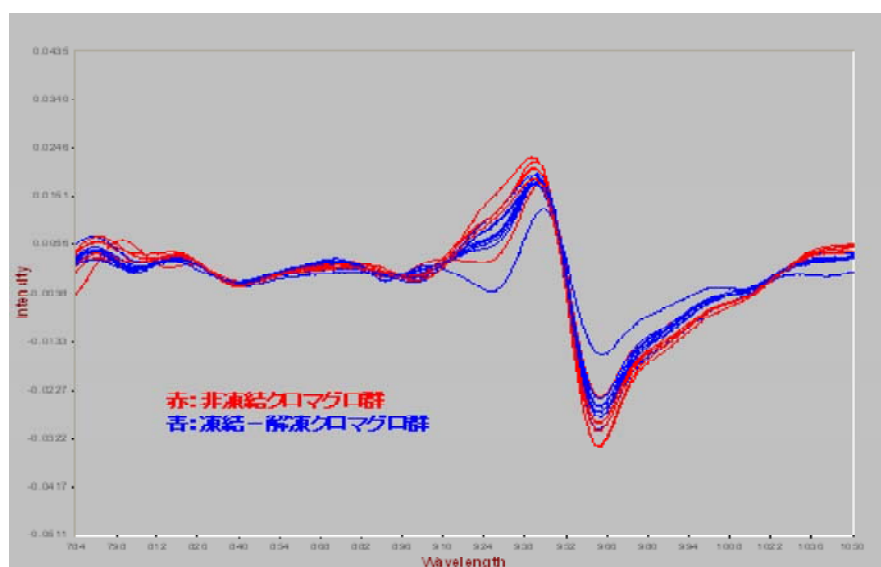


図3 非凍結クロマグロ群と凍結-解凍クロマグロ群の吸光度二次微分値の差異

表3 各試料の判定

No.	状態	判別値	判定	正誤	No.	状態	判別値	判定	正誤
1	非凍結	-1.2	凍結-解凍	誤	21	凍結-解凍	-3.3	凍結-解凍	正
2	非凍結	0.2	非凍結	正	22	凍結-解凍	-1.9	凍結-解凍	正
3	非凍結	3.2	非凍結	正	23	凍結-解凍	-2.6	凍結-解凍	正
4	非凍結	8.5	非凍結	正	24	凍結-解凍	-0.9	凍結-解凍	正
5	非凍結	3.7	非凍結	正	25	凍結-解凍	-7.6	凍結-解凍	正
6	非凍結	3.7	非凍結	正	26	凍結-解凍	-0.9	凍結-解凍	正
7	非凍結	6.1	非凍結	正	27	凍結-解凍	-3.4	凍結-解凍	正
8	非凍結	3.2	非凍結	正	28	凍結-解凍	-4.1	凍結-解凍	正
9	非凍結	6.5	非凍結	正	29	凍結-解凍	-5.7	凍結-解凍	正
10	非凍結	-1.0	凍結-解凍	誤	30	凍結-解凍	-7.6	凍結-解凍	正
11	非凍結	0.6	非凍結	正	31	凍結-解凍	-6.1	凍結-解凍	正
12	非凍結	5.2	非凍結	正	32	凍結-解凍	-1.1	凍結-解凍	正
13	非凍結	5.0	非凍結	正	33	凍結-解凍	-7.6	凍結-解凍	正
14	非凍結	5.9	非凍結	正	34	凍結-解凍	-3.2	凍結-解凍	正
15	非凍結	8.4	非凍結	正	35	凍結-解凍	-2.2	凍結-解凍	正
16	非凍結	-0.8	凍結-解凍	誤	36	凍結-解凍	-5.5	凍結-解凍	正
17	非凍結	3.9	非凍結	正	37	凍結-解凍	-4.2	凍結-解凍	正
18	非凍結	1.8	非凍結	正	38	凍結-解凍	-1.2	凍結-解凍	正
19	非凍結	7.9	非凍結	正					
20	非凍結	5.9	非凍結	正					

表4 判別モデルによる供試料の判別率

実際の群	正しい判別された試料数 (%)
非凍結	17 (85.0)
凍結-解凍	18 (100.0)
合計	35 (92.1)

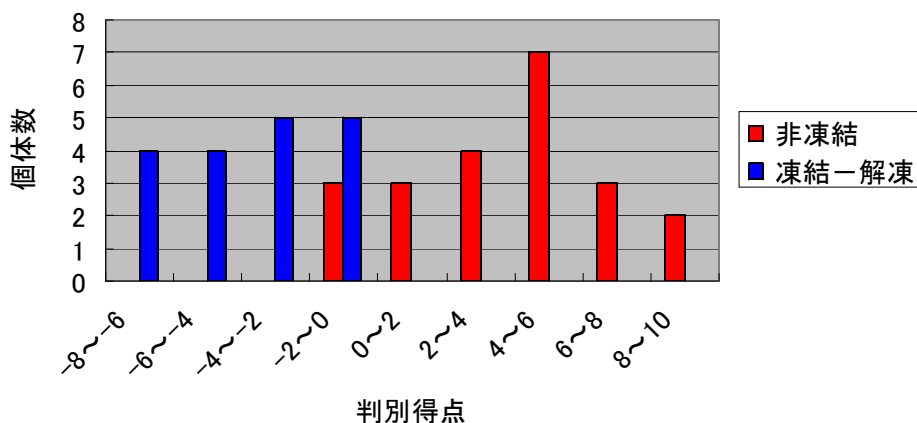


図4 判別得点の分布 (正:非凍結、負:凍結-解凍)

#### 4. まとめ

非凍結のクロマグロ群と凍結-解凍したクロマグロ群間では、近赤外領域の吸光度を測定し、その二次微分値を用いた判別分析により非凍結試料で85.0% (n = 20)、凍結-解凍試料で100% (n = 18)、供試料全体で92.1% (n = 38)の判別率となるモデルが得られ、近赤外分析による凍結履歴の判別の可能性が示唆された。しかし、市販品にモデルを活用するには多様な要因が考えられるため、さらなる検討が必要である。

#### 5. 謝辞

本研究を実施するに当たり、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所食品分析研究領域非破壊評価ユニット及び独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所利用加工部品質管理研究室の皆様からは、技術指導を含め多大なるご支援をいただいたので感謝を申し上げます。

#### 6. 参考文献

- 1) 北御門学, 吉岡慶子, 生鮮魚と凍結・解凍魚との鑑別法, 日本冷凍協会論文集

- 2) 北口裕一, 山口勤, 内野三禎, 高嶋康晴, 山下由美子, 山下倫明, 農林水産消費技術センター調査研究報告, **26**, 61-66 (2002).
- 3) 北口裕一, 角田福太郎, 内野三禎, 高嶋康晴, 山下由美子, 山下倫明, 農林水産消費技術センター調査研究報告, **27**, 9-19 (2003).
- 4) 山内 悟, 澤田敏雄, 河野澄夫, インタラクタンス方式の光ファイバーを用いた近赤外分光法による冷凍カツオ粗脂肪量の非破壊測定, 日水誌, **65**, 747-752 (1999).
- 5) 寫本淳司, 長谷川薫, 井出 圭, 河野澄夫, 生・凍結マアジの近赤外分光法による脂肪量の非破壊測定, 日水誌, **67**, 717-722 (2001).
- 6) 清川智之, 井岡久, ポータブル型近赤外分光分析装置によるマアジ, アカムツ脂質含有量の非破壊測定とその活用事例, 島根水技セ研報, **1**, 11-17 (2007).
- 7) Uddin M., Okazaki E., Turza S., Yamashita Y., Tanaka M., Fukuda Y.: Non-destructive Visible/NIR Spectroscopy for Differentiation of Fresh and Frozen-thawed Fish, *J. Food Sci.*, **70**, C506-510 (2005).
- 8) Uddin M., Okazaki E. Classification of fresh and frozen-thawed fish by near-infrared spectroscopy: *J. Food Sci.*, **69**, C665-668 (2004).
- 9) 岡崎恵美子, 山下由美子, 大村裕治, Musleh Uddin, 高嶋康晴, 近赤外分光法による魚介類の凍結履歴の判別, 平成17年度農林水産関係研究成果情報