

食品関係等調査研究報告

第46号
令和5年

Research Report of Food Products

Vol.46
2023



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。

令和4年4月には食品表示基準の一部改正による加工食品の原料原産地表示が完全に義務化され、その真正性の確認に対するニーズが高まっており、引き続き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4年度まで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46号を発行しました。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5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 木内 岳志

目 次

元素分析及びストロンチウム安定同位体比分析による梅農産物漬物の原料原産地判別法の開発 森田 美文, 中村 哲, 高嶋 康晴, 川井 清明, 後藤 祐之介, 福元 雅代, 申 基澈, 陀安 一郎	1
元素分析によるアカシアはちみつの原料原産地判別法の検証 中村 哲, 山川 義正, 田中 真澄	8
安定同位体比分析及び元素分析によるこんにゃくの原料いもの原産地判別法の検討 井伊 悠介	16
DNA分析による大豆加工品の原料原産地判別法の検討 豊田 正俊, 山崎 実緒, 岸根 雅宏	24
りんごジュース中のプロシアニジン類定量法の妥当性確認 山多 晴子, 小林 寛子, 門倉 雅史, 庄司 俊彦	35

元素分析及びストロンチウム安定同位体比分析による梅農産物漬物の原料原産地判別法の開発

森田 美文¹, 中村 哲², 高嶋 康晴¹, 川井 清明², 後藤 祐之介², 福元 雅代²,
申 基澈³, 陀安 一郎³

MORITA Mifumi, NAKAMURA Satoru, TAKASHIMA Yasuharu, KAWAI Kiyooki,
GOTOU Yunosuke, FUKUMOTO Masayo, SHIN Ki-Cheol, TAYASU Ichiro

要約

梅農産物漬物（梅漬け、調味梅漬け、梅干し、調味梅干し）について、元素分析及びストロンチウム（Sr）安定同位体比*分析による原料原産地判別法の検討を行った。国産梅が原料の梅農産物漬物（以下「国産試料」と記載。「外国産試料」も同様）60点及び外国産試料50点（中国産試料49点、タイ産試料1点）を収集し、これらの仁の粉碎試料について22元素の濃度及びSr安定同位体比を測定した。Sr安定同位体比は国産試料と外国産試料で分布が重なったため、国産試料と外国産試料の判別モデルを元素濃度のみを用いて構築した。判別モデル構築に用いた試料の判別率（各産地の試料を正しく判定した割合）は、国産試料100%、外国産試料98%となり、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。

*本報告では⁸⁷Sr/⁸⁶Srの分析値を用いているので、⁸⁸Sr/⁸⁶Srの値と区別するために前者を放射起源同位体比と表記することもあるが、他の調査研究報告との整合性・継続性を考慮して安定同位体比と表記した。

1. はじめに

一般用加工食品としての梅農産物漬物の表示にあつては、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）において名称等のほか、国内で製造したものは原料原産地の表示が義務付けられ、原料原産地については原則、国産原料を使用した商品にあつては国産である旨を、輸入原料を使用した商品にあつては原産国名を表示しなければならない。

平成30年の梅調製品の輸入量は約5,606トン¹⁾であり、主な輸入先は中国（99.7%）である。また、国産品に対して外国産品は比較的安価であることなどから産地偽装が懸念されており、原産地表示の真正性を確認するための科学的検査の方法が必要であった。農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という。）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²⁾~¹²⁾。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、いく

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

² 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

³ 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

つかの農産物において国産と外国産の判別指標として有効である⁸⁾。

梅農産物漬物の元素分析による原料原産地判別法は FAMIC において平成 16 年に開発¹³⁾したが、和歌山県産以外の国産原料梅の判別ができないこと、小梅（梅干・梅漬用原料流通量の約 2%）は適用対象外であることから、これらを改善した判別法が求められていた。

そこで本研究では、元素分析及び Sr 安定同位体比分析を用い、梅農産物漬物の原料原産地を推定するための判別方法を検討した。

2. 実験方法

2.1 試料

国産試料は、収穫量¹⁴⁾の割合（平成 29～30 年の平均）を参考に一般社団法人全国漬物検査協会、生産者及び製造業者を通じて 18 県から 60 点（小梅 9 点を含む）を、外国産試料は、一般社団法人全国漬物検査協会、製造業者及びスーパー等の小売業者を通じて国ごとの輸入量¹⁾（平成 30 年）の割合に応じて中国産 49 点（小梅 5 点を含む）及びタイ産 1 点を収集した（表 1）。

表 1 収集試料の内訳

原料原産地		判別モデル構築用 試料点数	収穫量割合 2年平均 (%)
国産	和歌山	28(4)	69.5
	群馬	2	6.0
	三重	2	2.1
	長野	2(1)	2.0
	奈良	2	1.9
	神奈川	2	1.7
	宮城	1	1.6
	福井	2	1.4
	山梨	5(3)	1.4
	埼玉	1	1.3
	大分	2	1.3
	福岡	2(1)	1.3
	茨城	2	1.3
	福島	2	1.1
	青森	2	—
	滋賀	1	—
	広島	1	0.8
	山形	1	—
	計	60(9)	94.7
原料原産地		判別モデル構築用 試料点数	輸入量割合 (%)
外国産	中国	49(5)	99.7
	タイ	1	—
	計	50(5)	99.7

() は小梅の点数（内数）

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 $18\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 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 の精製には、Sr resin (50-100 μm 、Eichrom Technologies) 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) を用いた。

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。Sr 安定同位体比の測定には、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) を用いた。

2.4 試料調製

果肉を除去し、種子を超純水で洗浄した後、ハンマーで砕いて仁を取り出した。取り出した仁の薄皮を除去し、超純水で洗浄したものをハンマーでたたいて細かく粉碎して、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 1.0 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 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 2.0 mL を加え、徐々に温度を上げながら $180\sim 230\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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。時計皿を外し約 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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内標準として In を 250 ng 加えた 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。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。

2.6 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 250 ng 含まれる量の Sr 安定同位体比分析用分解溶液を $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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、 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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。

2.7 元素濃度及び Sr 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。Sr 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¹⁰⁾に準じ、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

RFパワー	1.2 kw
プラズマガスフロー	15 L/min
補助ガスフロー	0.7 L/min
サンプルガスフロー	0.80-1.00 L/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	50

2.8 判別モデルの構築

判別モデルの構築は、中村ら²⁾¹⁵⁾の方法に準じた。モデル試料の粉砕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。

3. 結果及び考察

3.1 元素濃度

国産試料 60 点、外国産試料 50 点の各元素の粉砕試料中濃度を表 4 に示す。

表 4 モデル試料の各元素の粉碎試料中濃度 (mg/kg)

国産 (n=60)	Li	Na	Mg	P	K	Ca	Mn	Fe	Co	Ni	Cu
平均値	6.0×10^{-3}	1.1×10^4	5.4×10^2	1.1×10^3	1.4×10^3	1.0×10^3	4.8	1.4×10	5.7×10^{-2}	3.3×10^{-1}	3.6
標準偏差	1.2×10^{-2}	9.0×10^3	3.0×10^2	5.8×10^2	8.6×10^2	4.7×10^2	2.8	5.8	6.9×10^{-2}	2.3×10^{-1}	1.9
	Zn	Rb	Sr	Y	Mo	Cd	Cs	Ba	La	Nd	Tl
平均値	1.6×10	2.0	3.4	1.1×10^{-3}	3.1×10^{-1}	4.4×10^{-3}	1.1×10^{-3}	2.0	1.9×10^{-3}	8.6×10^{-4}	1.6×10^{-4}
標準偏差	9.7	2.4	2.4	2.5×10^{-3}	2.0×10^{-1}	3.0×10^{-3}	1.2×10^{-3}	1.5	4.1×10^{-3}	1.8×10^{-3}	1.5×10^{-4}
外国産 (n=50)	Li	Na	Mg	P	K	Ca	Mn	Fe	Co	Ni	Cu
平均値	3.1×10^{-2}	9.1×10^3	2.3×10^2	3.6×10^2	3.2×10^2	1.4×10^3	2.4	1.3×10	4.1×10^{-2}	2.1×10^{-1}	1.2
標準偏差	5.7×10^{-2}	4.6×10^3	1.6×10^2	3.1×10^2	3.2×10^2	4.4×10^2	2.3	8.2	4.0×10^{-2}	1.6×10^{-1}	9.0×10^{-1}
	Zn	Rb	Sr	Y	Mo	Cd	Cs	Ba	La	Nd	Tl
平均値	5.6	1.9	7.4	1.5×10^{-2}	4.2×10^{-2}	8.5×10^{-4}	2.5×10^{-3}	5.0	3.2×10^{-2}	1.5×10^{-2}	4.3×10^{-4}
標準偏差	5.1	2.1	2.9	1.2×10^{-2}	4.1×10^{-2}	5.2×10^{-4}	2.8×10^{-3}	5.0	2.2×10^{-2}	1.1×10^{-2}	2.3×10^{-4}

3.2 Sr 安定同位体比

国産試料 60 点、外国産試料 50 点の Sr 安定同位体比を表 5 及び図 1 に示す。

平均値±標準偏差は、国産試料は 0.7085 ± 0.0010 、外国産試料は 0.7098 ± 0.0022 であった。外国産試料 50 点の中で 37 点が国産試料の分布と重なっており、Sr 安定同位体比で国産試料と外国産試料を判別することは困難であった。

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

	平均値	標準偏差	最小値	最大値
国産試料 (n=60)	0.7085	0.0010	0.7051	0.7099
外国産試料 (n=50)	0.7098	0.0022	0.7081	0.7235

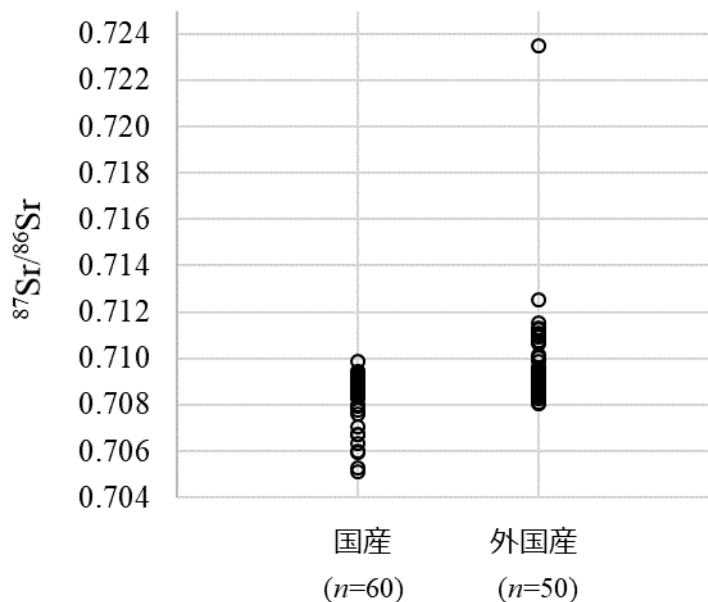


図 1 モデル試料の Sr 安定同位体比 ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) の分布図

3.3 元素濃度による判別の検討

国産試料 ($n = 60$) 及び外国産試料 ($n = 50$) の粉碎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 8 元素を用いた濃度比の常用対数を説明変数とする判別モデルが得られた。

LOOCV により得られた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 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 100 % (60/60)、外国産試料の 98 % (49/50) を正しく判別した。

事前確率が 1 % で誤判別が最小となる判別基準 (判別得点 -1.40) の場合は、特異度が 99.94 %、感度が 78.6 % となり、国産試料と外国産試料の判別モデルとして良好な精度の結果が得られた。

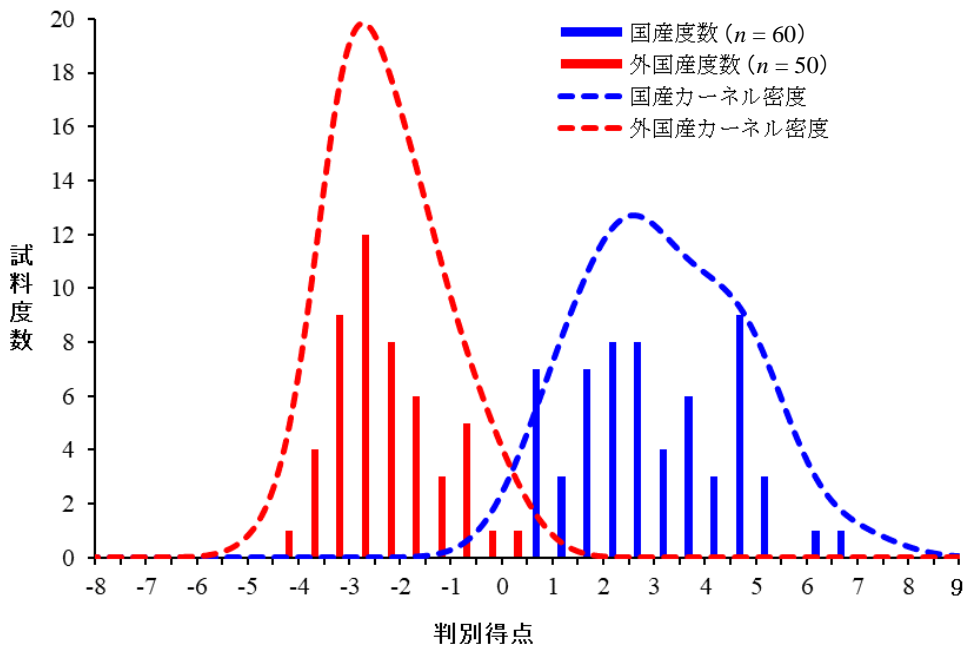


図 2 元素濃度による判別モデルの判別得点

4. まとめ

本研究では、元素濃度及び Sr 安定同位体比を利用した梅農産物漬物の産地判別法を検討した。元素濃度については、8 元素を用いた濃度比の常用対数を説明変数とする判別モデルが得られ、判別モデル構築用試料の的中率は、国産 100 %、外国産 98 % であった。また、Sr 安定同位体比で国産試料と外国産試料を判別することは困難であった。

謝辞

本研究を実施するにあたり、梅農産物漬物の収集にご協力いただいた一般社団法人全国漬物検査協会に深く感謝いたします。

文献

- 1) 貿易統計, 財務省 (2018)
- 2) 中村哲, 法呂雄司, 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 塚田政範, 藤原守, 山崎行宏, 宮武信, 小林孝: ICP-MS 元素分析による梅干し等の産地判別, 農林水産消費安全技術センター調査研究報告, **28**, 10-16 (2004)
- 14) 野菜生産出荷統計, 農林水産省 (2017-2018)
- 15) 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)

元素分析によるアカシアはちみつの原料原産地判別法の検証

中村 哲¹, 山川 義正², 田中 真澄³

NAKAMURA Satoru, YAMAKAWA Yoshimasa, TANAKA Masumi

要約

過去に農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という。）において開発したアカシアはちみつの原料原産地判別法について、市販試料による検証を行った。その結果、元素濃度の分布が過去の判別モデル構築用試料と市販試料で異なっていることが確認された。その影響を低減するため、半教師付き分類（半教師あり学習）に加えて、Adversarial validation による検証を行い、判別モデル構築用試料と市販試料の両方について適切な結果が得られる判別モデルを構築した。

1. はじめに

元素分析によるアカシアはちみつの原料原産地判別は、FAMIC においては平成 27 年に国産－中国産の判別法を報告した¹。また、平成 29 年にはハンガリー産を追加して判別モデルを再構築した²。これらの研究に用いられた試料の多くは業界団体を通じて入手したものであったが、実際に市販されている商品と比較して、元素濃度分布が異なっている場合がある。そのような条件下では、国産－外国産の判別において誤判別を引き起こす可能性がある。はちみつ以外の例として、ネギにおいて選択バイアスを原因とした元素濃度分布の違いを指摘しており³、判別モデルの修正のために半教師付き分類（半教師あり学習）を採用している。選択バイアスを主な原因とした判別モデル構築用試料（既知標本）と市販試料（未知標本）の間の分布の違いは共変量シフトとも呼ばれる^{4,5}。共変量シフトへの対応としては、半教師付き分類以外に分布の確率密度の比（密度比）の 0～1 乗に応じて計算時の重みを修正する方法が存在するが^{4,5}、実際の密度比を計算するのは容易ではないという問題がある。一方、2016 年に機械学習コンペの Kaggle⁶において、Adversarial validation と呼ばれる方法が開発された⁷。この方法は、共変量シフトが発生している条件下では判別モデル構築用試料と市販試料が教師付き分類（教師あり学習）で判別可能であり、この判別モデル構築用試料－市販試料の判別に寄与している変数を除外する等の対処を行うことで、実際のラベル（国産－外国産）の判別への影響を低減するというものである。アカシアはちみつの場合、変数を除外すると使用できる変数が極めて限られてしまうという問題があるが、Adversarial validation の結果から密度比を推定することは可能なので、そこから計算時の重みを調整することが可能と考えられる。Adversarial validation は教師付き分類を使用することから、計算が半教師付き分類よりも容易であるという長所がある。

本研究では、アカシアはちみつの判別モデル構築用試料と市販試料の間に元素濃度の共変量シフトが存在しているかどうかを確認するとともに、その影響を低減する方法について検討したので報告する。

¹ 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

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部（現内閣府食品安全委員会事務局情報・勧告広報課）

³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

2. 実験方法

2.1 試料

判別モデル構築用試料のデータは、既報¹²⁾で使用したアカシアはちみつのデータ（国産 107 点、中国産 70 点、ハンガリー産 18 点）を用いた。ただし、2.5 及び 2.6 の標準不確かさの計算の都合上、各試料の 2 点併行の平均値ではなく、1 点を抽出したデータとした。

国産と表示された市販試料は、令和 2 年度及び令和 3 年度に FAMIC で検査したアカシアはちみつ検査試料 84 点を用いた。

外国産と表示された市販試料は、令和 3 年度に小売店から購入したアカシアはちみつ検査試料 49 点（中国産 31 点、ハンガリー産 14 点、イタリア産 2 点、インド産 1 点、ルーマニア産 1 点）を用いた。

2.2 試薬

市販試料の元素分析には、超純水製造装置（Milli-Q Element A10、メルクミリポア又は Milli-Q Integral、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）及び 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は、単元素標準溶液（Mg、P、K、Ca、Mn、Rb 及び Sr、ICP 分析用、SCP SCIENCE、Merck 及び AccuStandard）を適宜希釈して調製した。また、In（ICP 分析用、SCP SCIENCE、Merck 及び AccuStandard）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

市販試料の測定には、誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）（820MS、Varian（現 Agilent Technologies））及び Agilent 7800 ICP-MS、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））及び iCAP 6300 Duo、Thermo Fisher Scientific）を用いた。

2.4 元素分析

元素分析は既報¹⁾に準じた。すなわち、粉碎試料約 1.0 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、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 2.5 mL を加え、徐々に温度を上げながら 200 °C まで加熱し、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。時計皿を外し、約 230 °C で分解液を蒸発乾固させた後、樹脂製ヒータブルビーカーに 1%硝酸 10 mL 程度を加え、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。樹脂製全量フラスコには、内標準として In を 5 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。試料溶液中の元素濃度は、ICP-MS を用いて内標準法（内標準：In）により Mn、Rb 及び Sr を、ICP-OES を用いて検量線法により Mg、P、K 及び Ca を測定した。2.5 及び 2.6 の計算に用いるデータは、各試料の併行分析の結果から 1 点を抽出したものをを用いた。

2.5 半教師付き分類による判別モデルの検討

半教師付き分類は既報³⁾に準じた。すなわち、判別モデル構築用試料については市販試料の事前確率により補正した交差エントロピー、市販試料についてはエントロピーを計算し、その総和を最小化するように人工ニューラルネットワークの最適化を行った。半教師付き分類の結果から、判別モデルに含めることが可能な市販試料を選別し、これらを判別モデル構築用試料と組み合わせる上で、教師付き分類により国産-外国産を判別する判別モデルを構築した。

教師付き分類は既報³⁾に準じた。すなわち、教師付き分類により判別得点を計算するとともに、変数の標準不確かさからモンテカルロ法により判別得点の乱数を計算した後、判別得点の乱数からカーネル密度推定のバンド幅を Sheather & Jones の Direct Plug-in 法⁹⁾により計算し、バンド幅の中央値を用いて判別得点の全乱数からカーネル密度推定を行った。ただし、モンテカルロ法の試行回数は 10000 とし、人工ニューラルネットワークの計算は実施しなかった。また、判別得点の一部については、他の図との比較のため、判別得点から単にカーネル密度推定を行った。

以上の計算に当たっては、Leave-one-out cross-validation (LOOCV) を行った。

計算には R 4.1.2、4.2.0 及び 4.2.1¹⁰⁾を用いた。また、R のパッケージ MASS 7.3-54、7.3-55、7.3-57 及び 7.3-58.1、e1071 1.7-9 及び 1.7-11 並びに nnet 7.3-16 及び 7.3-17 を用いた。

2.6 Adversarial validation による判別モデルの検討

国産及び外国産のそれぞれについて、判別モデル構築用試料及び市販試料のデータを用いて、教師付き分類により判別モデルを構築した。これらの判別結果から、各試料に対して判別得点のカーネル密度の密度比の値を計算し、判別モデル構築用試料を用いて国産-外国産を判別する判別モデルを構築する際にカーネル密度推定の計算に密度比の 0.5 乗及び 1 乗に比例した重みを適用した。教師付き分類は 2.5 に準じた。また、2.1 に示したデータの変更に伴い、既報²⁾の判別モデルについて改めて計算を行った（密度比の 0 乗の計算に相当）。

以上の計算に当たっては、Leave-one-out cross-validation (LOOCV) を行った。

計算には R 4.1.2、4.2.0 及び 4.2.1 を用いた。また、R のパッケージ MASS 7.3-54、7.3-55、7.3-57 及び 7.3-58.1、e1071 1.7-9 及び 1.7-11 並びに nnet 7.3-16 及び 7.3-17 を用いた。

3. 結果及び考察

3.1 各元素の濃度分布及び過去の判別モデルの判別得点分布

各元素濃度の Mg 濃度比の常用対数の分布を図 1 に示す。また、既報²⁾の判別モデル（再計算後）による判別得点分布を図 2 に示す。図 1 及び図 2 から、判別モデル構築用試料と市販試料で分布が完全に重なっておらず、産地ごとの標本数の違いでは説明が付かないことから、アカシアはちみつでは共変量シフトが存在しており、判別に影響していることが確認された。既報では選択バイアスを発生させる原因として試料収集の偏り、年・季節変動、飼料の組成変動を例として挙げているが³⁾、アカシアはちみつの場合はニセアカシア以外の蜜の混入具合も影響している可能性がある。

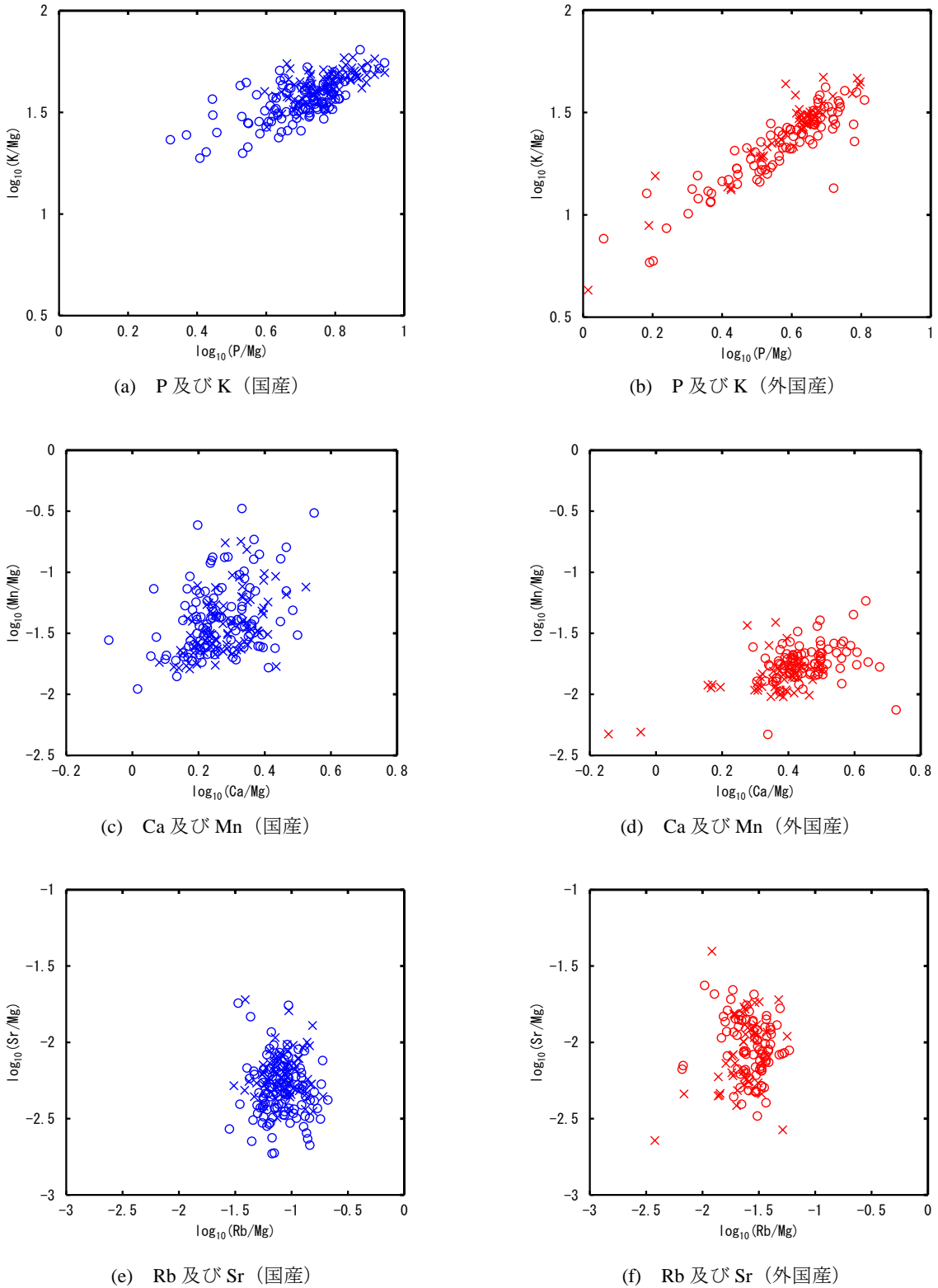


図1 各元素濃度の Mg 濃度比の分布

○ : 国産判別モデル構築用試料 ($n = 107$)、× : 国産市販試料 ($n = 84$)
 ○ : 外国産判別モデル構築用試料 ($n = 88$)、× : 外国産市販試料 ($n = 49$)

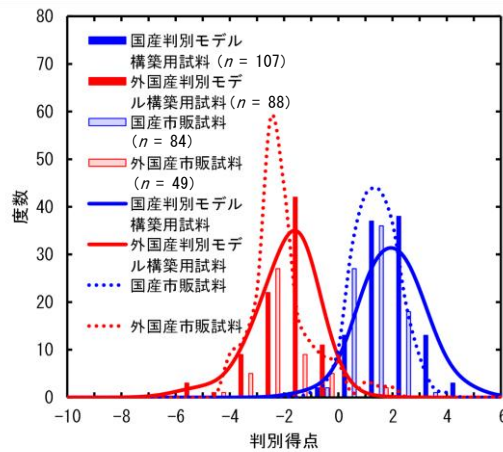


図2 既報²⁾の判別モデル(再計算後)による判別得点分布

3.2 半教師付き分類及び Adversarial validation による判別モデル

国産市販試料及び外国産市販試料の半教師付き分類による判別モデルの判別得点分布を図3及び図4に示す。半教師付き分類及び教師付き分類の組合せによる国産-外国産の判別モデルの判別得点分布を図5に示す。Adversarial validation による判別モデル構築用試料-市販試料の判別モデルの判別得点分布を図6及び図7に、密度比の0.5乗及び1乗に比例した重みを使用した国産-外国産の判別モデルの判別得点分布を図8及び図9に示す。また、国産-外国産の判別モデルにおいて、判別得点0を判別基準としたときの判別モデル構築用試料及び市販試料の的中率(正答数の割合)を表1に示す。

半教師付き分類の結果、イタリア産市販試料の判別得点が国産の値に近いものとなったが、判別モデル構築用試料にイタリア産が含まれていないことから、偽装によるものではないと判断し、以降の判別に含めた。それ以外の市販試料についてはいずれも本来の原料原産地の判別得点の傾向と一致した。

Adversarial validation の結果、判別モデル構築用試料と市販試料で判別得点の分布にずれが生じていることから、共変量シフトが生じていることが確認された。表1の的中率ではいずれの判別モデルもほぼ同等であるが、図を比較すると、通常の判別(図2)よりも密度比の0.5乗(図8)及び1乗(図9)の場合に判別モデル構築用試料及び市販試料の判別得点のカーネル密度の一致度は高くなった。そのため、今回の Adversarial validation 及び密度比による重みの修正の組合せによって、共変量シフトの影響を低減した判別モデルが構築できており、半教師付き分類及び教師付き分類の組合せ(図5)と同等以上に判別できていることが確認された。ただ、密度比の1乗の場合は判別モデル構築用試料及び市販試料の判別得点のヒストグラムに差が生じてしまうため、判別モデル構築用試料及び市販試料の両方について適切に判別するには、密度比の0.5乗を用いる方がよいと考えられた。

市販試料に偽装品が混入している場合の Adversarial validation への影響であるが、共変量シフトが存在しない条件下を例に取ると、密度比の0.5乗は Adversarial validation の判別得点が偽装品に近づくにつれて急速に増加するが、判別モデル構築用試料に含まれる偽装品と同じ判別得点となる試料が元々少ないことから、密度比の0.5乗に比例した重みを用いた場合には偽装品の存在による影響は低減されることになる(図10)。そのため、大量に偽装品が混入しない限り、Adversarial

validation への影響は小さいと考えられる。なお、密度比の 1 乗を用いた場合は密度比の 0.5 乗の場合よりも影響が大きくなる。

今回の Adversarial validation 及び密度比による重みの修正の組合せは、既報³⁾で指摘した市販試料が国産又は外国産のいずれか一方のみ存在する場合についても適用可能である。一方、この手順の問題点として、判別モデル構築用試料と市販試料で著しく分布にずれが生じている場合が挙げられる。この場合、密度比から重みを計算すること自体が困難となる可能性があり、判別に寄与している変数の除外と組み合わせるといった対応が必要になると考えられる。

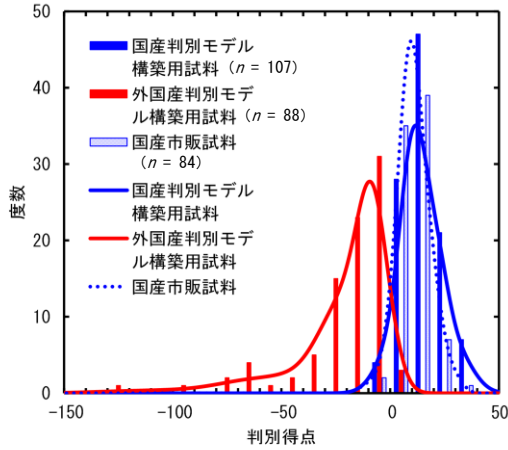


図 3 半教師付き分類の判別得点分布 (国産)

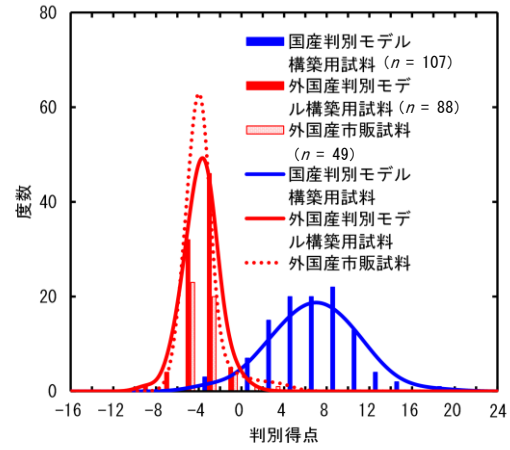


図 4 半教師付き分類の判別得点分布 (外国産)

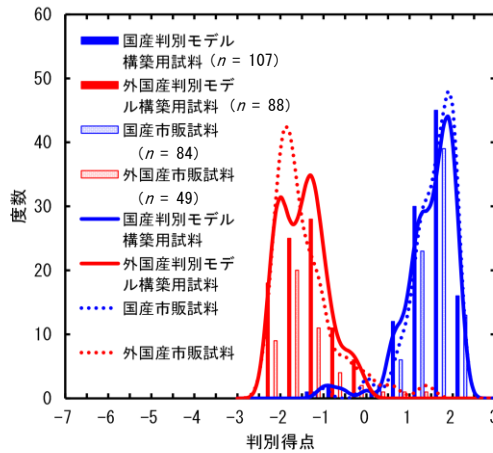


図 5 半教師付き分類及び教師付き分類の組合せによる判別得点分布

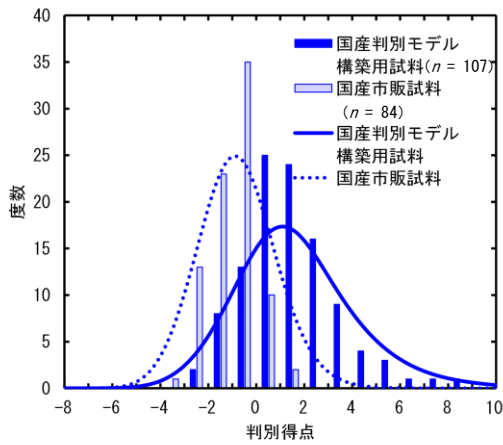


図6 Adversarial validation の判別得点分布 (国産)

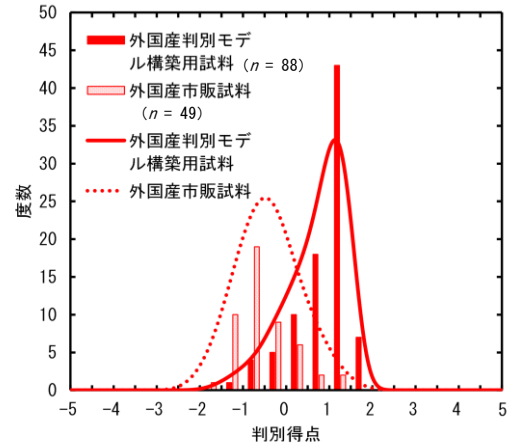


図7 Adversarial validation の判別得点分布 (外国産)

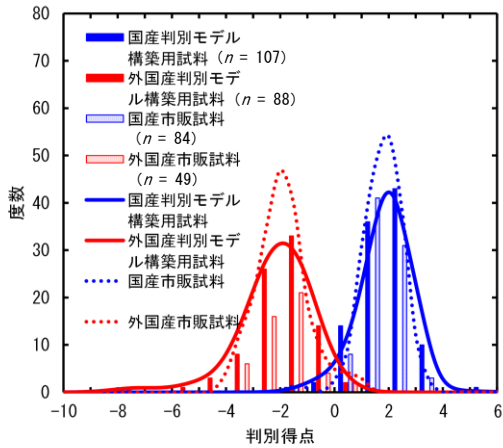


図8 密度比の0.5乗の重みによる国産—外国産判別モデルの判別得点分布

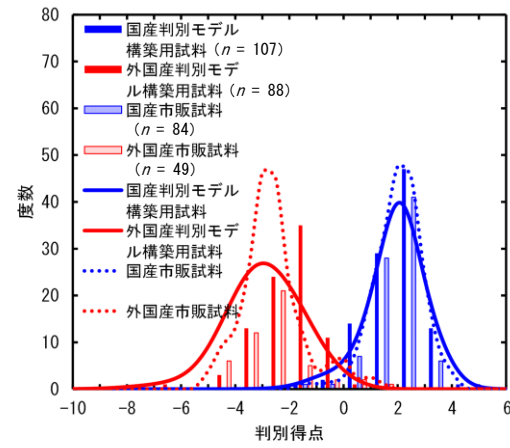
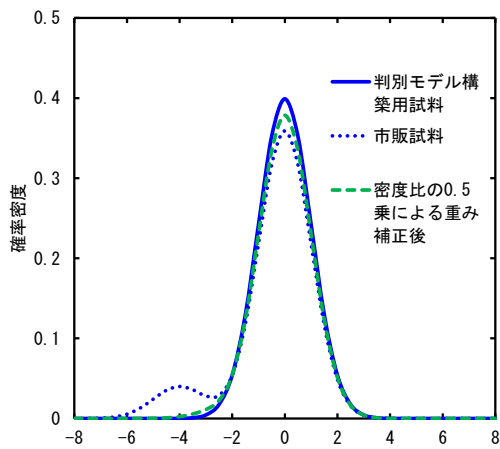
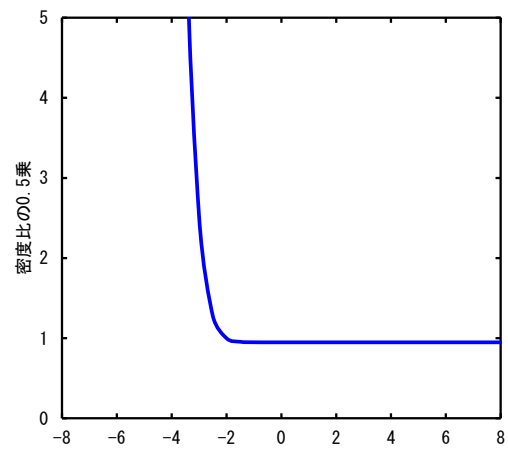


図9 密度比の1乗の重みによる国産—外国産判別モデルの判別得点分布



(a) Adversarial validation の結果



(b) 密度比の0.5乗

図10 市販試料に偽装品が混入している場合のAdversarial validationへの影響 (混入率10%の例)

表 1 各判別モデルの的中率

判別モデル	国産		外国産	
	判別モデル 構築用試料	市販試料	判別モデル 構築用試料	市販試料
豊田ら ²⁾ (再計算後)	104/107 (97.2 %)	82/84 (97.6 %)	88/88 (100.0 %)	47/49 (95.9 %)
半教師付き分類+教師付き分類	104/107 (97.2 %)	83/84 (98.8 %)	88/88 (100.0 %)	46/49 (93.8 %)
密度比の0.5乗に比例する重み	104/107 (97.2 %)	83/84 (98.8 %)	86/88 (97.7 %)	47/49 (95.9 %)
密度比の1乗に比例する重み	104/107 (97.2 %)	82/84 (97.6 %)	87/88 (98.9 %)	46/49 (93.8 %)

4. まとめ

元素分析によるアカシアはちみつの原料原産地判別において、判別モデル構築用試料と市販試料の間に元素濃度の分布の差（共変量シフト）があることが確認された。共変量シフトの判別への影響を低減するため、半教師付き分類及び Adversarial validation による検討を行い、いずれの方法においても判別への影響を低減することが可能であった。Adversarial validation による判別モデルの修正は半教師付き分類と比較すると容易であることから、共変量シフトによる誤判別が発生した場合に再解析を行いやすくなることが期待される。

文献

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) Shimodaira, H.: Improving predictive inference under covariate shift by weighting the log-likelihood function. *Journal of Statistical Planning and Inference*, **90**, 227-244 (2000).
- 5) 杉山将: 共変量シフト下での教師付き学習, 日本神経回路学会誌, **13**, 111-118 (2006)
- 6) Kaggle, 2022-9-12, Kaggle Inc., <<https://www.kaggle.com/>>
- 7) Adversarial validation, part one, 2022-09-08, Zygmunt Zajac, <<http://fastml.com/adversarial-validation-part-one/>>
- 8) 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)
- 9) Sheather, S. J.; Jones, M. C.: A Reliable Data-Based Bandwidth Selection Method for Kernel Density Estimation. *J. Royal Stat. Soc. Ser. B*, **53**(3), 683-690 (1991).
- 10) R: A Language and Environment for Statistical Computing, 2022-09-14, R Foundation for Statistical Computing, <<http://www.r-project.org/>>

軽元素安定同位体比分析及び元素分析によるこんにゃくの原料いもの原産地判別法の検討

井伊 悠介

II Yusuke

要約

軽元素安定同位体比分析及び元素分析によるこんにゃくの原料いもの原産地判別法の検討を行った。モデル試料として国産の原料いもを用いたこんにゃく（以下「国産試料」という。「外国産試料」も同様）（白こんにゃく及び黒こんにゃく）及び外国産試料（白こんにゃく及び黒こんにゃく）を両分析法で測定し、それぞれの分析法による原料いもの原産地の判別モデルを作成した。炭素及び酸素の軽元素安定同位体比分析（国産試料 23 点、外国産試料 54 点）では特異度 75 %、感度 67 %であった。一方で 6 元素による元素分析（国産試料 19 点、外国産試料 27 点）では特異度 92 %、感度 84 %であった。

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）において名称等のほか、国内で製造したものは原料原産地の表示が義務付けられ、原料原産地については原則、国産原料を使用した商品にあつては国産である旨を、輸入原料を使用した商品にあつては原産国名を表示しなければならない。こんにゃくは輸入品以外ではこんにゃくいもの原産地名を、輸入品では原産国名を表示することとなっている。

こんにゃくの原料であるこんにゃくいも（以下「原料いも」という。）は、国産の令和元年～令和 3 年産の平均の収穫量が 55,667 トン¹⁾で、主な産地は群馬県であり収穫量の 94 %を占める¹⁾。貿易統計²⁾（令和元年～令和 3 年の平均）によると、原料いも（荒粉*及び精粉**を含む）は 125 トンがミャンマー（84 %）、中国（10 %）、インドネシア（5 %）等から輸入されている。またこんにゃく製品は 13,167 トンが中国（86 %）、韓国（9 %）、インドネシア（4 %）等から輸入されている。

このように原料いも及びこんにゃく製品は、一定量の輸入がある。国産に比べ外国産の方が安価であり、原料いもでは 2 倍程度の価格差がある³⁾。よって安価な外国産の原料いもを用いた製品や外国で製造された製品の原料原産地表示を国産とする不適正表示の懸念があるため、こんにゃくの原料原産地判別技術の開発の必要性があるといえる。

農産物等の産地判別法に用いる手法として、軽元素安定同位体比や元素濃度の分析があげられる⁴⁾。これらの手法による食品の産地判別の検討は、これまでも農林水産消費安全技術センターで検討されており、元素分析では乾燥ひじき⁶⁾、精米⁷⁾、ニンジン⁸⁾、ブロッコリー⁹⁾等、軽元素安定同位体比分析では小麦加工品¹⁰⁾等の原産地及び原料原産地の判別に関する報告を行っている。こんにゃくでは窒素含有率及び軽元素安定同位体比分析によるこんにゃく粉及びこんにゃくの産地判定方法も報告されている¹¹⁾。

このため、本研究では、既報¹¹⁾等を参考に軽元素安定同位体比分析及び元素分析によるこんにゃくの原料いもの原産地判別法の可能性を確認した。

*荒粉・・・原料いものを洗い、スライスし、乾燥させたもの

**精粉・・・荒粉を粉碎、精製し粉末状にしたもの

2. 実験方法

2.1 モデル試料等の収集

判別モデル作成のためにモデル試料としてこんにゃくを収集した。収集するこんにゃくは白こんにゃく（原材料が精粉及び凝固剤のみのもの）及び黒こんにゃく（原材料が精粉、海藻及び凝固剤のみのもの）とした。モデル試料のうち国産試料は精粉の生産組合及びこんにゃくの生産組合から合計 25 点入手した（白こんにゃく 7 点、黒こんにゃく 18 点）。原料いものは、16 点については産地の都道府県名が明らかな試料を入手した（群馬県（15 点）及び長野県（1 点））。残りの 9 点のうち 8 点は産地の都道府県名が不明であり、残りの 1 点は複数の県のいものが混ざっていた。外国産試料（原料原産地が外国のもの若しくは外国で製造されたもの）はこんにゃくの生産組合及び小売店等から合計 60 点を入手した（白こんにゃく 49 点、黒こんにゃく 11 点）。中国産が 57 点、ミャンマー産が 3 点であり、精粉の輸入量に占める割合の大きいミャンマー産はほとんど収集できなかった。

2.2 軽元素安定同位体比分析

2.2.1 試料の前処理

こんにゃくの表面を超純水で軽く洗浄し、5 g を採取し凍結乾燥に供し、これを 2.2.2 に用いた。

2.2.2 炭素及び酸素の安定同位体比の測定

試料及び自家標準物質を金属カプセルに採取し、IR/MS（安定同位体比質量分析装置）（Delta V Advantage、Agilent Technologies）により、炭素及び酸素の安定同位体比を測定した。安定同位体比質量分析装置のための前処理装置には炭素安定同位体比分析では元素分析装置を、酸素安定同位体比分析では熱分解型元素分析装置を用いた（装置及び測定条件は表 1 のとおり）。

表 1 軽元素安定同位体比分析の測定条件

		炭素	酸素
金属カプセル			
	材質	錫（97.5 %以上）	銀（99.99 %以上）
	直径(mm)、高さ(mm)	5、9	3.3、5
	試料採取量 mg	0.89~0.99	0.45~0.54
IR/MS			
	前処理装置	元素分析装置 FlashEA2000	熱分解型元素分析計 TC/EA
	キャリアガス流量 ml/分	100	80
	反応温度 (°C)	燃焼 1000 還元 750	熱分解 1400
	カラム温度 (°C)	60	90
	カラム長 (m)	3	1.2
	試料ガスの希釈率 (%)	90	36
	質量分析装置	Delta V Advantage	Delta V Advantage

金属カプセルは LUDI SWISS 社、前処理装置及び質量分析装置は Thermo Fisher Scientific 社である。

測定した軽元素安定同位体比の値を、自家標準物質の結果により補正し、 δ 値を使って国際標準物質からの差の千分率 (‰) として下式のとおり求めた。

$$\delta X = R_{\text{試料}}/R_{\text{国際標準物質}} - 1$$

ここでXは炭素及び酸素のそれぞれについて¹³C及び¹⁸Oを表し、 $R_{\text{試料}}$ は試料の、 $R_{\text{国際標準物質}}$ は国際標準の軽元素安定同位体比 (¹³C/¹²Cもしくは¹⁸O/¹⁶O) である。国際標準物質は、炭素安定同位体比についてはVienna PeeDee Belemnite (VPDB)、酸素安定同位体比についてはVienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW) とした。

2.3 元素分析

2.3.1 試料の酸分解

20gのこんにやくをPFAビーカーに採取し、61%硝酸（電子工業用、関東化学）を10mL加えてPFA時計皿でふたをし、120℃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、60%過塩素酸（原子吸光分析用、関東化学）を2.5mL加えて、徐々に温度を上げながら230℃まで加熱し、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。時計皿を外し、約200℃で分解液を蒸発乾固させた後、PFAビーカーに1%硝酸10mL程度を加え、ビーカー内の残留物をホットプレート上で溶解し、樹脂製全量フラスコに回収する操作を3回繰り返した。全量フラスコには、さらに内標準としてInを5µg/Lとなるように加え、1%硝酸で50mLに定容し、2.3.3に供する試料溶液とした。

2.3.2 試料の固形分測定

8gのこんにやくをアルミ皿に採取し、通風乾燥機で100℃で16時間以上乾燥させ、乾燥前後の質量よりこんにやくの固形分(%)を求めた。

2.3.3 元素濃度の測定

2.3.1の試料溶液に含まれる元素の濃度を、Li、Mn、Co、Ni、Cu、Zn、Ga、Rb、Sr、Y、Mo、Cd、Cs、Ba、La、Pr、Nd、Sm、Gd、Dy及びTlについてはICP-MS（誘導結合プラズマ質量分析装置）（Agilent 7800 ICP-MS、Agilent Technologies）を用いた内標準法（内標準：In）により、Na、P、K及びFeについてはICP-OES（誘導結合プラズマ発光分光分析装置）（iCAP 6300 Duo、Thermo Fisher Scientific）を用いた検量線法により測定した（測定条件は表2のとおり）。ICP-OES測定にあつては2.3.1の試料溶液を1%硝酸でさらに10倍に希釈したものを供した。機器分析により求められた溶液中の各元素の濃度と試料量（酸分解に供した量に固形分を乗じたもの）により、各元素の試料中の濃度を算出した。

表2 ICP-MS及びICP-OESの測定条件

条件		ICP-MS	ICP-OES
機種		Agilent 7800 ICP-MS	iCAP 6300 Duo
RFパワー	kW	1.55	1.15
プラズマガスフロー	L/分	15	13
補助ガスフロー	L/分	0.9	0.5
ネブライザーガスフロー	L/分	1.07	0.5
ポンプ速度	rpm	6	6

ICP-MSはAgilent Technologies社、ICP-OESはThermo Fisher Scientific社である。

2.4 判別モデルの作成

2.2 及び 2.3 で得られた軽元素安定同位体比分析及び元素分析の結果についてそれぞれ中村らの方法¹²⁾¹³⁾をもとに判別モデルを作成し、特異度及び感度を求めた。

3. 結果及び考察

3.1 軽元素安定同位体比分析によるモデル試料の測定結果と判別モデルの作成

モデル試料として収集したこんにやくの炭素及び酸素安定同位体比を測定した。国産 23 点（白こんにやく 6 点、黒こんにやく 17 点）及び外国産 54 点（白こんにやく 45 点、黒こんにやく 9 点）を測定した。こんにやく、それらのうちの白こんにやくのみ及び黒こんにやくのみの結果を表 3 に示す。

表3 モデル試料のこんにやくの炭素及び酸素安定同位体比

試料	産地	n	炭素安定同位体比 (‰)			酸素安定同位体比 (‰)		
			平均	標準偏差	検定	平均	標準偏差	検定
こんにやく	国産	23	-26.08	0.46		24.60	0.84	
	外国産	54	-26.32	0.79		23.18	1.19	
白こんにやく	国産	6	-26.43	0.40	ab	25.61	0.76	a
	外国産	45	-26.21	0.70	a	23.25	1.17	b
黒こんにやく	国産	17	-25.96	0.42	a	24.25	0.53	c
	外国産	9	-26.88	0.98	b	22.81	1.29	b

検定はデューキー・クレマーの検定の結果である。国産/外国産間及び白こんにやく/黒こんにやく間について、計4グループの検定を行った。異なるアルファベット間では平均値に有意差が認められた（有意水準 5%）。

国産/外国産間では炭素安定同位体比では黒こんにやくで、酸素安定同位体比では白こんにやくと黒こんにやくの両方で平均値に有意差が認められた（本報告では有意水準は 5 %とする。以下同じ）。

黒こんにやくには海藻粉末が使用されているため、海藻粉末の軽元素安定同位体比への影響が考えられたことから、国産試料と外国産試料でそれぞれ白こんにやくと黒こんにやくを比較した結果、国産試料は酸素安定同位体比において、外国産試料は炭素安定同位体比において平均値に有意差が認められた。このことから白こんにやくと黒こんにやくに分けて判別モデルを作成することが適切と考えられたが、国産試料の試料数が少なく、また外国産試料も黒こんにやくの試料数が少ないことから、今回は白こんにやくと黒こんにやくをあわせた一つの判別モデルを作成した。

作成した判別モデルにおいて、判別得点 0 以上を国産、0 未満を外国産と判別することとした場合、特異度は 75 %、感度は 67 %であった。各試料の判別得点の分布は図 1 のとおりである。モデル試料の産地の正答率は国産試料においては 70 %（16/23）、外国産試料においては 69 %（37/54）であった。

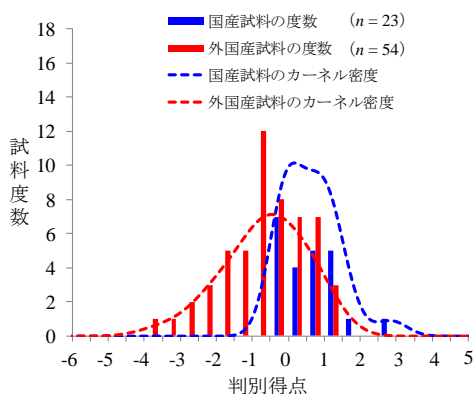


図1 軽元素安定同位体比分析による判別モデルにおける試料の判別得点の分布

既報¹¹⁾では判別に炭素及び窒素の安定同位体比及び含有量を利用している。精粉こんにやくでは炭素が含まれている炭水化物量（2.3 %）に対して、窒素が含まれているたんぱく質量（0.1 %）

は少ない¹⁴⁾。よって窒素安定同位体比の測定で、質量分析装置で十分なシグナル強度を得るために、炭素の場合 (0.89~0.99 mg) より試料量を多く供する必要がある。これにより前処理装置である元素分析装置のメンテナンス (反応管の交換等) の頻度が増加することから、実用面を考慮し本研究では炭素及び酸素安定同位体比を測定した。

3.2 元素分析によるモデル試料の測定結果と判別モデルの作成

モデル試料として収集したこんにゃくの 25 元素の濃度を ICP-MS 及び ICP-OES により測定した。国産試料 21 点 (白こんにゃく 7 点、黒こんにゃく 14 点) 及び外国産試料 29 点 (白こんにゃく 6 点、黒こんにゃく 23 点) を測定した。こんにゃく、それらのうちの白こんにゃくのみ及び黒こんにゃくをみの結果を表 4 に示す。

表4 モデル試料のこんにゃくの元素濃度

試料	産地	Li				Na				P			
		n	平均値	標準偏差	検定	n	平均値	標準偏差	検定	n	平均値	標準偏差	検定
こんにゃく	国産	21	0.137	0.054		21	727	379		21	1524	213	
	外国産	29	0.179	0.204		29	405	256		28	1195	449	
白こんにゃく	国産	7	0.116	0.079	a	7	472	430	ab	7	1543	242	ab
	外国産	23	0.174	0.227	a	23	415	283	a	22	1150	476	a
黒こんにゃく	国産	14	0.148	0.036	a	14	855	287	b	14	1514	207	b
	外国産	6	0.197	0.074	a	6	370	102	ab	6	1357	310	ab
試料	産地	K				Mn				Fe			
		n	平均値	標準偏差	検定	n	平均値	標準偏差	検定	n	平均値	標準偏差	検定
こんにゃく	国産	20	10120	6299		21	7.4	1.8		21	78	49	
	外国産	29	1398	1924		29	13.0	6.6		24	73	65	
白こんにゃく	国産	6	7522	6828	a	7	6.9	1.9	a	7	32	19	a
	外国産	23	656	597	b	23	11.6	5.7	abc	20	50	19	a
黒こんにゃく	国産	14	11233	5967	a	14	7.7	1.8	ab	14	101	43	b
	外国産	6	4238	2635	a	6	18.3	7.5	c	4	190	91	b
試料	産地	Co				Ni				Cu			
		n	平均値	標準偏差	検定	n	平均値	標準偏差	検定	n	平均値	標準偏差	検定
こんにゃく	国産	21	0.051	0.023		21	0.53	0.29		21	2.71	2.82	
	外国産	28	0.041	0.046		28	0.24	0.23		28	1.18	1.06	
白こんにゃく	国産	7	0.033	0.016	a	7	0.36	0.18	a	7	1.64	0.60	a
	外国産	23	0.023	0.008	a	23	0.14	0.05	b	23	0.74	0.48	b
黒こんにゃく	国産	14	0.059	0.022	b	14	0.61	0.31	ac	14	3.25	3.34	a
	外国産	5	0.125	0.056	c	5	0.68	0.19	c	5	3.16	0.59	a
試料	産地	Zn				Ga				Rb			
		n	平均値	標準偏差	検定	n	平均値	標準偏差	検定	n	平均値	標準偏差	検定
こんにゃく	国産	19	17.0	2.6		21	0.032	0.014		21	5.2	3.1	
	外国産	28	21.5	15.1		29	0.037	0.025		29	1.2	1.8	
白こんにゃく	国産	6	16.8	3.4	a	7	0.021	0.013	a	7	3.6	2.8	a
	外国産	22	21.5	16.8	a	23	0.027	0.009	ab	23	0.4	0.2	b
黒こんにゃく	国産	13	17.1	2.4	a	14	0.037	0.011	b	14	6.0	3.1	a
	外国産	6	21.5	7.3	a	6	0.077	0.024	c	6	4.4	1.6	a
試料	産地	Sr				Y				Mo			
		n	平均値	標準偏差	検定	n	平均値	標準偏差	検定	n	平均値	標準偏差	検定
こんにゃく	国産	21	67.4	27.9		21	0.33	0.14		21	0.133	0.057	
	外国産	29	28.7	22.2		29	0.29	0.12		29	0.063	0.075	
白こんにゃく	国産	7	38.4	20.0	a	7	0.30	0.21	a	7	0.128	0.049	a
	外国産	23	18.7	10.0	b	23	0.27	0.12	ab	23	0.058	0.081	b
黒こんにゃく	国産	14	81.9	18.3	c	14	0.35	0.10	b	14	0.136	0.062	a
	外国産	6	67.2	8.2	ab	6	0.38	0.08	ab	6	0.079	0.050	ab

平均値及び標準偏差はmg/kgである。検定はテューキー・クレーマーの検定の結果である。国産/外国産間及び白こんにゃく/黒こんにゃく間について、計4グループの検定を行った (濃度値の常用対数を用いた)。異なるアルファベット間では平均値に有意差が認められた (有意水準 5%)。元素によっては一部の試料で測定結果に問題が認められた場合があり、これらは平均値等の算出、検定、判別モデルの作成には用いなかったため元素間でnが異なっている場合がある。

表4 (続き)

試料	産地	Cd				Cs				Ba			
		n	平均値	標準偏差	検定	n	平均値	標準偏差	検定	n	平均値	標準偏差	検定
こんにやく	国産	21	0.141	0.063		21	0.011	0.008		21	3.1	1.9	
	外国産	29	0.111	0.105		29	0.010	0.012		29	6.9	6.9	
白こんにやく	国産	7	0.073	0.047	a	7	0.005	0.004	a	7	1.4	1.2	a
	外国産	23	0.062	0.023	a	23	0.005	0.003	a	23	5.5	5.8	b
黒こんにやく	国産	14	0.176	0.035	c	14	0.014	0.007	b	14	3.9	1.7	b
	外国産	6	0.301	0.071	b	6	0.030	0.013	b	6	12.4	8.6	c

試料	産地	La				Pr				Nd			
		n	平均値	標準偏差	検定	n	平均値	標準偏差	検定	n	平均値	標準偏差	検定
こんにやく	国産	21	0.117	0.047		21	0.019	0.008		21	0.083	0.034	
	外国産	28	0.140	0.062		28	0.024	0.013		28	0.100	0.050	
白こんにやく	国産	7	0.095	0.064	a	7	0.014	0.009	a	7	0.063	0.041	a
	外国産	22	0.114	0.038	b	22	0.018	0.006	b	22	0.078	0.025	ab
黒こんにやく	国産	14	0.128	0.033	b	14	0.021	0.006	bc	14	0.092	0.025	bc
	外国産	6	0.234	0.033	b	6	0.044	0.009	c	6	0.180	0.034	c

試料	産地	Sm				Gd				Dy			
		n	平均値	標準偏差	検定	n	平均値	標準偏差	検定	n	平均値	標準偏差	検定
こんにやく	国産	21	0.017	0.007		21	0.024	0.010		21	0.024	0.010	
	外国産	28	0.020	0.010		28	0.026	0.011		29	0.024	0.010	
白こんにやく	国産	7	0.014	0.009	a	7	0.020	0.013	a	7	0.020	0.013	a
	外国産	22	0.015	0.005	ab	22	0.021	0.007	ab	23	0.020	0.007	ab
黒こんにやく	国産	14	0.019	0.005	bc	14	0.026	0.007	bc	14	0.026	0.007	b
	外国産	6	0.036	0.007	c	6	0.042	0.005	c	6	0.038	0.005	b

試料	産地	Tl			
		n	平均値	標準偏差	検定
こんにやく	国産	21	0.039	0.014	
	外国産	25	0.007	0.010	
白こんにやく	国産	7	0.028	0.015	a
	外国産	21	0.004	0.002	b
黒こんにやく	国産	14	0.044	0.010	a
	外国産	4	0.025	0.016	a

国産/外国産間で平均値を比較したところ、白こんにやくのみでは10元素(K、Ni、Cu、Rb、Sr、Mo、Ba、La、Pr及びTl)で、黒こんにやくのみでは5元素(Mn、Co、Ga、Cd及びBa)において有意差が認められた。

黒こんにやくには海藻粉末が使用されているため、3.1同様に海藻粉末の元素濃度への影響が考えられる。黒こんにやくに含まれる海藻粉末の元素が黒こんにやくの元素濃度に影響を及ぼす可能性が考えられたことから、国産試料と外国産試料でそれぞれ白こんにやくと黒こんにやくを比較した結果、国産試料では13元素(Fe、Co、Ga、Y、Cd、Cs、Ba、La、Pr、Nd、Sm、Gd、及びDy)において、外国産試料では16元素(K、Fe、Co、Ni、Cu、Ga、Rb、Sr、Cd、Cs、Ba、Pr、Nd、Sm、Gd及びTl)において、白こんにやくと黒こんにやくの間で平均値に有意差が認められた(表4)。このことから白こんにやくと黒こんにやくに分けて判別モデルを作成することが適切と考えられたが、測定試料数が少ないため、今回は白こんにやくと黒こんにやくをあわせた一つの判別モデルを作成することにした。ここで白こんにやくと黒こんにやくの違いが判別モデルに影響を及ぼすことを避けるために、同一産地内では白こんにやくと黒こんにやくで平均値に有意差が認められなかった元素を使うこととし、表4より6元素(Li、Na、P、Mn、Zn及びMo)を用いた。この6元素の測定結果に問題のなかった国産試料19点、外国産試料27点の濃度値の常用対数の値を変数とした判別モデルを作成した。

作成した判別モデルにおいて、判別得点0以上を国産、0未満を外国産と判別することとした場合、特異度は92%、感度は84%であった。各試料の判別得点の分布は図2のとおりである。モデル試料の産地の正答率は国産試料においては95%(18/19)、外国産試料においては81%(22/27)であった。

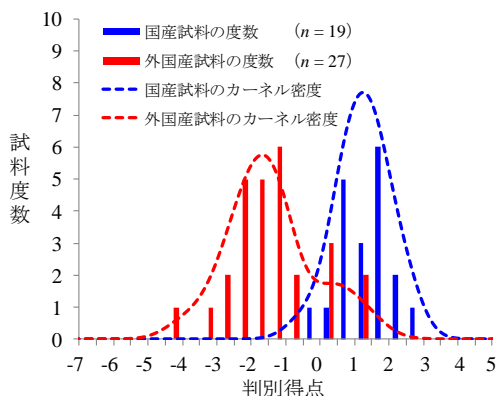


図2 元素分析による判別モデルにおける試料の判別得点の分布

4. まとめ

軽元素安定同位体比分析及び元素分析によるこんにやく（白こんにやく及び黒こんにやく）の産地判別法の検討を行った。判別モデル作成のために軽元素安定同位体比分析及び元素分析により国産試料及び外国産試料を測定した。いずれの分析でも元素によっては白こんにやくと黒こんにやく間で同一産地内において平均値に有意差が認められた。白こんにやくと黒こんにやくごとの判別モデルの作成が適切と考えられたが、測定試料数が少ないため今回は白こんにやくと黒こんにやくをあわせた一つの判別モデルを作成した。判別モデルの精度は軽元素安定同位体比分析では特異度 67 % 及び感度 75 % であり、元素分析では特異度 92 %、感度 84 % であった。

謝辞

本調査研究の実施にあたり、試料収集にご協力頂いた全国蒟蒻原料協同組合、全国こんにやく協同組合連合会の役員様、組合員様、担当者様及び株式会社関越物産の担当者様にお礼申し上げます。また軽元素安定同位体比分析にあたりご助言頂いた株式会社関越物産の担当者様にお礼申し上げます。

文献

- 1) 作物統計，農林水産省，2020-04-10，<<https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/index.html>>
- 2) 貿易統計，財務省，2020-4-10，<<https://www.customs.go.jp/toukei/srch/index.htm?M=29&P=0>>
- 3) 一般財団法人日本こんにやく協会：「こんにやくに関する資料」，p.56（2020）
- 4) 安井明美：食品の産地判別技術の展望，食品衛生学雑誌，**50**，191-197（2009）
- 5) 鈴木彌生子：軽元素安定同位体比分析及び微量元素分析による食品の産地判別，分析化学，**68**，671-682（2019）
- 6) 高嶋康晴，松野 和久：元素分析による乾燥ひじき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，**44**，1-7（2020）
- 7) 山川義正，中村哲，石井修人：元素分析による精米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，**44**，8-15（2020）
- 8) 後藤祐之介，川井清明，申基澈，陀安一郎：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，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，**44**，16-25

(2020)

- 9) 川井清明, 後藤祐之介: 元素分析によるブロッコリー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, **45**, 8-14 (2021)
- 10) 寺田昌市, 一色摩耶: 炭素安定同位体比分析による小麦加工品の原料小麦の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, **45**, 24-32 (2021)
- 11) 外山慶一, 新井啓之: こんにゃく粉及びこんにゃく加工品の産地判定方法, 特許第 7054516 号, 2022-4-6
- 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)
- 13) 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)
- 14) 日本食品標準成分表 2020 年版 (八訂), 文部科学省, 2022-10-3, <https://www.mext.go.jp/a_menu/syokuhinseibun/mext_01110.html>

DNA 分析による大豆加工品の原料原産地判別法の検討

豊田 正俊¹, 山崎 実緒², 岸根 雅宏³

TOYODA Masatoshi, YAMAZAKI Mio, KISHINE Masahiro

要約

大豆加工品の原料となる食用大豆は国内需要量の多くを輸入大豆に依存しており、原料原産地表示の科学的検証法開発が望まれている。そこで本研究では、大豆の原産地表示が「国産」である豆腐を対象として、北米産大豆の混入割合推定方法を確立するために、リアルタイム PCR を用いた定量的原料原産地判別法を検討した。*GmTfl1* 遺伝子の第 1 イントロンに存在する計 6 塩基の挿入・欠失により大豆を a 型と b 型に分類する DNA マーカーを利用して、a 型に特異的な配列と、両者に共通する配列を同時に増幅することで a 型大豆の相対定量を行った。その結果、入手が容易な市販豆腐を相対定量法の標準試料として用いて、北米産に多く見られる a 型大豆の混入割合を検量線法及び $\Delta\Delta Ct$ 法のどちらでも概ね推定することに成功した。

1. はじめに

日本の食生活に欠かせない豆腐、納豆、みそ、しょうゆ等の大豆加工品の原料となる食用大豆は、国内需要量の多くを輸入大豆に依存している。平成 28 年度～令和 2 年度における食用大豆の国内需要量は年間平均 101.3 万トンであった。一方、同期間に食品向けに用いられた国産大豆の量は年間平均 22.0 万トンにすぎなかったり。また、国産大豆の取引価格は、例年、輸入大豆より高値で推移し、気象災害の影響等による生産量の減少に伴い価格が大きく変動することもある¹⁾。

このような状況の中、豆腐や納豆を主として、「国産大豆使用」等の表示をしている大豆加工品が市場で多く見られる。また、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）において名称等のほか、国内で製造したものは原料原産地の表示が義務付けられ、原料原産地については原則、国産原料を使用した商品にあっては国産である旨を、輸入原料を使用した商品にあっては原産国名を表示しなければならない。

加工食品の原料原産地表示の真正性を確認するためには科学的検証法が必要である。そのため、農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という。）では、DNA 分析、元素組成分析、炭素安定同位体比分析、ストロンチウム安定同位体比分析等の手法を用いた検証法を報告している^{2~5)}。大豆加工品についても、原料原産地表示の真正性を確認する科学的検証法が必要とされている。

これまでに、大豆の産地判別法として、FAMIC と国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構の共同研究により、大豆の無限/有限伸育を決める遺伝子である *GmTfl1* の第 1 イントロンに存在する挿入・欠失を DNA マーカーとする方法が報告されている⁶⁾。この方法は、DNA 分析により大豆品種の国産・外国産（米国産及びカナダ産）を推定できる手法である。

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部横浜事務所

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

³ 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

大豆加工品の原料原産地判別に当たっては、外国産大豆の混入割合を推定できる手法が望まれている。混入割合を推定することで、外国産大豆が意図的に混入されたのか否か等を検証する際の判断材料となり得る。しかしながら、既報⁶⁾は従来のエンドポイント PCR により行われており、大豆加工品への適用や a 型大豆の混入割合推定は検討されていない。

そこで本研究においては、フクユタカ豆腐の異品種混入割合推定法⁷⁾を参考として、リアルタイム PCR を用いることで大豆加工品の定量的原料原産地判別法の確立を目指すこととした。また、標準試料には、入手が容易な市販の加工食品を用いることとした。

本研究では豆腐を大豆加工品のモデルとし、大豆の原産地表示が「国産」である豆腐を対象に検量線法及び $\Delta\Delta Ct$ 法による検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 試料及び DNA 抽出

国産大豆は、農業協同組合から入手した「エンレイ（新潟県）」、「おおすず（青森県）」、「里のほほえみ（栃木県）」、「とよみづき（北海道）」、「トヨムスメ（北海道）」、「フクユタカ（佐賀県）」、「ユキホマレ（北海道）」及び「リュウホウ（岩手県）」を用いた。

米国産及びカナダ産（以下「北米産」という。）大豆は、商社から入手した 8 試料を用いた。米国産は、イリノイ州産、インディアナ州産、オハイオ州産、ミシガン州産及びミネソタ州産各 1 試料を用いた。カナダ産は、オンタリオ州産 2 試料及びケベック州産 1 試料を用いた。

模擬混入豆乳試料及び模擬混入豆腐試料は、川瀬ら⁸⁾の手法に準拠して作製した。模擬混入豆乳試料は、原料中の北米産大豆を穀粒の重量比で 50 % となるように混合して作製した（表 1）。国産大豆と北米産大豆の両者を原料として用いた模擬混入豆腐試料は、原料中の北米産大豆を穀粒の重量比で 5 %、10 %、50 % となるように混合して作製した（表 2）。なお、作製に用いる穀粒重量は計 12 g とした。

市販豆腐試料は、原料原産地表示が「カナダ又はアメリカ」と記載された「もめん豆腐」1 試料を小売店で購入した。

大豆試料の DNA 抽出には、GM quicker（ニッポンジーン）又は DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN）を用いた。このうち DNeasy Plant Mini Kit による抽出は、消費者庁の遺伝子組換え農産物の検査法「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」⁹⁾に従って行った。GM quicker による抽出は同検査法を一部変更して行った。豆乳試料及び豆腐試料の 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、NanoDropTM ND-1000（Thermo Fisher Scientific）を用いた。市販豆腐試料以外の抽出 DNA 溶液は、滅菌水で 10 ng/ μ L に希釈したものをリアルタイム PCR の鋳型 DNA とした。市販豆腐試料の抽出 DNA 溶液は、滅菌水でまず 16 ng/ μ L に調製し、さらにこれを滅菌水で 4 倍（4 ng/ μ L）、16 倍（1 ng/ μ L）、64 倍（0.25 ng/ μ L）に希釈した。この希釈系列をリアルタイム PCR における検量線作成用の鋳型 DNA とした。

2.2 リアルタイム PCR

プライマーは、表 3 に示すものを受託会社に発注して合成した。すべて逆相カラム精製品を用いた。

PCR 反応液は全量 20 μ L とし、10 μ L の PowerUPTM SYBR[®] Green Master Mix（Thermo Fisher Scientific）、1 μ L の 20 \times プライマー Mix（表 3 参照）及び 9 μ L の鋳型 DNA を混合した。PCR 反応液は 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。なお、20 \times プライマー

DNA 分析による大豆加工品の原料原産地判別法の検討

Mix は、フォワード及びリバースプライマーの終濃度が 0.5 μmol/L となるように調製した。

リアルタイム PCR 装置は、Applied Biosystems™ 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 °C 2 分及び最初の熱変性として 95 °C 2 分で保持後、95 °C 15 秒、60 °C 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクルの条件で行った。PCR 終了後、Ct 値 (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) をウェルごとに算出した。蛍光強度の閾値 (Threshold line) は 0.2 に設定した。また、本方法は SYBR Green 色素を用いたインターカレーター法であるため、PCR 後には融解曲線分析を行い、曲線の形状や Tm 値 (加熱により 2 本鎖 DNA の半分が 1 本鎖に解離するときの温度) から、プライマーダイマー等の非特異的な増幅産物に由来する蛍光を検出していないかどうかを確認した。

表 1 作製した模擬混入豆乳試料

試料名	原料大豆 (重量比) ^{a)}			
	国産 (b 型)	北米産 (a 型)		
TN-1	とよみづき	50 %	カナダ (オンタリオ州) 1	50 %
TN-2	ユキホマレ	50 %	カナダ (オンタリオ州) 1	50 %
TN-3	リュウホウ	50 %	カナダ (オンタリオ州) 1	50 %
TN-4	フクユタカ	50 %	カナダ (オンタリオ州) 1	50 %
TN-5	おおすず	50 %	カナダ (オンタリオ州) 1	50 %
TN-6	トヨムスメ	50 %	カナダ (オンタリオ州) 1	50 %
TN-7	里のほほえみ	50 %	カナダ (オンタリオ州) 1	50 %
TN-8	エンレイ	50 %	カナダ (オンタリオ州) 1	50 %
TN-9	エンレイ	50 %	米国 (インディアナ州)	50 %
TN-10	エンレイ	50 %	米国 (オハイオ州)	50 %
TN-11	エンレイ	50 %	米国 (ミシガン州)	50 %
TN-12	エンレイ	50 %	米国 (イリノイ州)	50 %
TN-13	エンレイ	50 %	米国 (ミネソタ州)	50 %
TN-14	エンレイ	50 %	カナダ (オンタリオ州) 2	50 %
TN-15	エンレイ	50 %	カナダ (ケベック州)	50 %

a) 国産試料は品種名を示す。北米産試料は産地名及び枝番を示す。

表 2 作製した模擬混入豆腐試料

試料名	原料大豆 (重量比) ^{a)}			
	国産 (b 型)	北米産 (a 型)		
TF0	フクユタカ	100 %	—	
TF5-1	エンレイ	95 %	カナダ (ケベック州)	5 %
TF5-2	リュウホウ	95 %	カナダ (オンタリオ州) 2	5 %
TF10-1	エンレイ	90 %	カナダ (ケベック州)	10 %
TF10-2	リュウホウ	90 %	カナダ (オンタリオ州) 2	10 %
TF50-1	エンレイ	50 %	カナダ (ケベック州)	50 %
TF50-2	フクユタカ	50 %	米国 (ミネソタ州)	50 %
TF50-3	里のほほえみ	50 %	米国 (イリノイ州)	50 %
TF50-4	ユキホマレ	50 %	米国 (インディアナ州)	50 %
TF50-5	リュウホウ	50 %	カナダ (オンタリオ州) 2	50 %
TF100	—	—	米国 (イリノイ州)	100 %

a) 国産試料は品種名を示す。北米産試料は産地名及び枝番を示す。

表 3 使用したプライマー

検知する系	プライマー名	配列 (5' → 3')	終濃度 (μmol/L)	増幅長 (bp)
a 型	TFL1-a-F	GAAAAAACTTAAGCTGTTGCCAGTG	0.5	68
	TFL1-R	GACATACCGTGTGACCATGATTAC	0.5	
b 型	TFL1-b-F	AAGAGAAGATTTTTTTTTGCCAGTGTG	0.5	68
	TFL1-R	GACATACCGTGTGACCATGATTAC	0.5	
共通配列	Gm-C-F	CACACGGTATGTCTCTTTTATTGGAG	0.5	74
	Gm-C-R	CCGAAAAAGGGGACATTTGC	0.5	

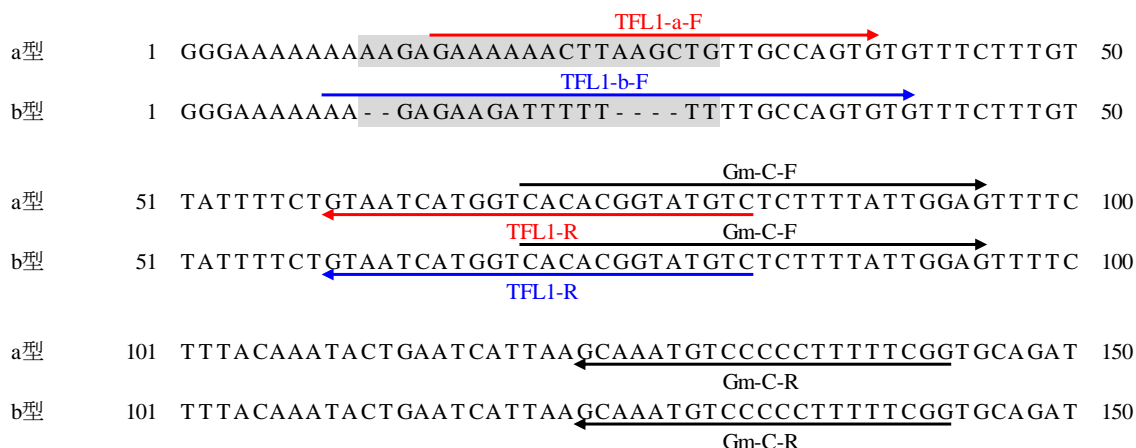


図 1 *GmTf1l* 遺伝子第 1 イントロンの挿入・欠失付近の部分配列とプライマーの設計

3. 結果及び考察

3.1 検知系の設計

判別に用いる DNA マーカーには、既報⁶⁾と同様に大豆の *GmTf1l* 遺伝子の第 1 イントロンに存在する挿入・欠失部位を利用した。すなわち、第 1 イントロンに計 6 塩基の欠失がない遺伝子型を a 型、欠失がある遺伝子型を b 型とした。なお、既報⁶⁾において、国産大豆の主要品種はほぼ全てが b 型であり、北米産大豆の多くは a 型であることが示されている。

リアルタイム PCR による検知系には、a 型を検知する系（以下「a 型検知」という。）、b 型を検知する系（以下「b 型検知」という。）、両者の共通配列（リファレンス配列）を検知する系（以下「共通配列検知」という。）の 3 つの系を構築することとした。そこで、*GmTf1l* 遺伝子の第 1 イントロンの配列情報（図 1）に基づいて、表 3 に示すプライマーを設計した。a 型検知においては、DNA マーカーの挿入領域上にフォワードプライマーを設計した。同様に、b 型検知においては、DNA マーカーの欠失領域上にフォワードプライマーを設計した。リバースプライマーは両検知系において共通のものを設計した。

共通配列検知用のプライマーは、フクユタカ豆腐の異品種混入割合推定法⁷⁾を参考として、挿入・欠失領域の直後に設計した。共通配列検知は、リアルタイム PCR において相対定量を行う場合に必須となるリファレンス遺伝子の検知に相当するものである。なお、加工食品では製造時の加熱や加圧等によって DNA の断片化がランダムに起こるため¹⁰⁾、本研究では PCR 産物の増幅長を 75 bp 以下とすることで DNA 断片化の影響を抑えた。

これらのプライマーと、既報⁶⁾の方法により遺伝子型を確認した大豆の抽出 DNA 溶液を用いてリアルタイム PCR を行い、プライマーの特異性を確認した。その結果、a 型の大豆は、a 型検知において指数関数的な増幅が見られ、b 型検知では増幅が見られない又は PCR 終盤 (Ct 値 35 以上) に増幅が見られた。一方、b 型の大豆は、b 型検知において指数関数的な増幅が見られ、a 型検知では増幅が見られない又は PCR 終盤 (Ct 値 35 以上) に増幅が見られた。さらに、共通配列検知においては、a 型の大豆と b 型の大豆の両者において指数関数的な増幅が見られた。また、リアルタイム PCR 後の融解曲線分析の結果、いずれの検知系においても、増幅の見られた試料については単一のピークのみが得られた。さらに、試料間及びウェル間の Tm 値の差異は 1.0 °C 未満であった。なお、Ct 値 35 は、後述する検量線法では検量線の範囲外となる。

以上の結果から、Ct 値が 35 以上の場合は不検知、35 未満の場合を検知とすることで設計した各プライマーの特異性に問題はなく、プライマーダイマー等の非特異的な増幅は起きていないと考えられた。

3.2 北米産大豆試料の遺伝子型確認

本研究に供試した北米産大豆試料 (表 1) の遺伝子型が a 型のみであるかどうかを検証した。既報⁶⁾において北米産大豆の多くは a 型の遺伝子型であったが、b 型の大豆も少数確認されている (57 試料中 1 試料) ことから、3.1 で設計した a 型検知及び b 型検知を用いて遺伝子型を確認した。この確認においては大豆試料から GM quicker を用いて DNA を抽出し、両検知系ともに Ct 値が 35 未満の場合を「検知」として判定した。

その結果、本研究に供試した北米産大豆試料は、全ての試料において a 型のみを検知し、b 型は検知しなかった。そのため、これらの試料は模擬混入豆乳試料及び模擬混入豆腐試料の a 型大豆原料として使用できると判断した。

3.3 市販豆腐を用いた標準試料の検証

検査現場において、標準試料を容易に入手できることは重要である。そこで、フクユタカ豆腐の異品種混入割合推定法⁷⁾を参考に、市販豆腐を標準試料として使用できるかどうかを検証した。

原料原産地が「カナダ又はアメリカ」と表示された市販豆腐試料について、DNA を抽出し、a 型検知及び b 型検知の両検知系を用いて遺伝子型を確認した結果、a 型のみを検知した。このため、当該市販豆腐試料は a 型 100% であると判断し、以下の検証を行った。

この市販豆腐試料の抽出 DNA 溶液の希釈系列 (表 4) を用いて、a 型検知及び共通配列検知の検量線を作成し、直線性及び PCR の増幅率を検証した。検量線は、縦軸を Ct 値、横軸を相対 DNA 量の常用対数として作成した (図 2)。相対 DNA 量は、希釈系列のうち濃度の低いものから順に 1、4、16、64 とした。

その結果、直線性及び PCR の増幅率ともに問題ないことが確認された。a 型検知及び共通配列検知ともに検量線の相関係数 (R^2) は 0.999 であった (表 5)。検量線の傾きから計算される PCR の増幅率は、a 型検知では 1.975、共通配列検知では 1.999 であり、いずれも理論値の 2 に近い値であるとともに、両検知系の増幅率はほぼ同じであることが示された (表 5)。一般に、リアルタイム PCR を用いて相対定量を行う方法には、検量線法と $\Delta\Delta Ct$ 法がある。 $\Delta\Delta Ct$ 法は、2 つの試料の増幅曲線を比較し、両者の Ct 値の差が 1 の場合、理論的には初期鋳型量に 2 倍量の差 (Ct 値の差が n の場合、 2^n 倍量の差) があることを利用した方法である。 $\Delta\Delta Ct$ 法は検量線を引く必要がなく効率のよい測定方法であるが、PCR の増幅率が 2 に限りなく近い必要がある。今回の結果は、ターゲット (a 型検知) とリファレンス (共通配列検知) の増幅率が 2 に近く、増幅率が同等であ

るため、どちらの方法でも市販豆腐試料を標準豆腐試料として a 型の相対定量が可能であることが示唆された。

表 4 豆腐抽出 DNA の希釈系列

	溶液 1	溶液 2	溶液 3	溶液 4
DNA 濃度	0.25 ng/μL	1 ng/μL	4 ng/μL	16 ng/μL
相対 DNA 量	1	4	16	64
相対 DNA 量 (log ₁₀)	0	0.602	1.204	1.806

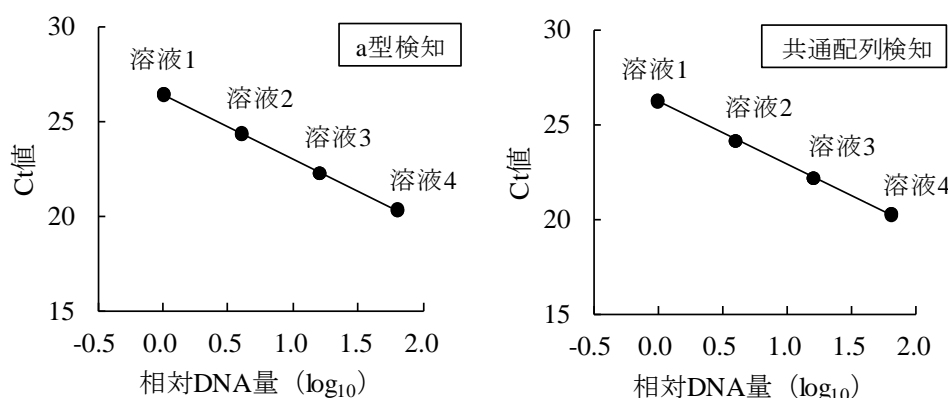


図 2 豆腐抽出 DNA の希釈系列による検量線

表 5 PCR の増幅率等

	a 型検知	共通配列検知
検量線の傾き	-3.38	-3.33
検量線の相関係数 (R ²)	0.999	0.999
PCR の増幅率	1.975	1.999

3.4 a 型大豆の推定混入率の検証

市販豆腐を標準豆腐試料として用いて相対定量を行える可能性が示されたため、模擬混入豆乳試料 (表 1) 及び模擬混入豆腐試料 (表 2) を作製し、a 型大豆推定混入率の検証を行った。

推定混入率は、試料中の *GmTfl1* 遺伝子に占める a 型の割合から求めた。具体的には、下式の通り、①検量線を用いた方法及び② $\Delta\Delta Ct$ 法で算出した。 $\Delta\Delta Ct$ 法の計算に当たっては、3 ウェルの Ct 値の平均値を用いた。また、対象試料の a 型検知から増幅曲線が得られない場合は、推定混入率を 0% とした。

(検量線法による推定混入率の算出方法)

1. 標準試料 (0.25 ng/μL、1 ng/μL、4 ng/μL、16 ng/μL) の測定値を用いて検量線を作成する (3.3 を参照)。
2. 検量線から対象試料の a 型検知と共通配列検知のそれぞれについて相対 DNA 量を計算する。

3. 対象試料の推定混入率を計算する。

$$\text{推定混入率 (\%)} = 100 \times (\text{a 型検知の相対 DNA 量} / \text{共通配列検知の相対 DNA 量})$$

($\Delta\Delta\text{Ct}$ 法による推定混入率の算出方法)

1. 標準試料 (16 ng/ μL) と対象試料のそれぞれについて ΔCt を計算する。

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{a 型検知}} - \text{Ct}_{\text{共通配列検知}}$$

2. $\Delta\Delta\text{Ct}$ を計算する。

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{対象試料}} - \Delta\text{Ct}_{\text{標準試料}}$$

3. 対象試料の推定混入率を計算する。

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

この方法で算出される推定混入率と、実際の大豆の重量比で計算した混入率を比較するため、まず、模擬混入豆乳試料による予備検証を行った。原料中の北米産大豆を穀粒の重量比で 50% となるように混合して作製した試料 (表 1) と上述した標準試料を用いて、混合する品種・試料の違いによる推定混入率への影響がどの程度あるのかを検証した。

b 型大豆に国産 8 品種を用い、a 型大豆に同一試料 (カナダ・オンタリオ州産 1) を用いて作製した模擬混入豆乳試料の推定混入率を表 6 に示す。検量線法で算出した推定混入率の平均値は 52.0%、最小値は 47.3%、最大値は 56.5% であった。 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法で算出した推定混入率の平均値は 52.7%、最小値は 47.9%、最大値は 57.3% であった。

これとは逆に、b 型大豆に国産 1 品種 (エンレイ) を用い、a 型大豆に北米産 8 試料を用いて作製した模擬混入豆乳試料の推定混入率を表 7 に示す。検量線法で算出した推定混入率の平均値は 50.0%、最小値は 45.1%、最大値は 52.6% であった。 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法で算出した推定混入率の平均値は 49.5%、最小値は 44.5%、最大値は 52.2% であった。

このように、混合する品種・試料によって推定混入率に若干の差があるものの、概ね模擬混入豆乳試料作製時の混合率である 50% に近い値が得られた。また、検量線法と $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法のどちらを用いても同様な値が得られた。このことから、今回検討した方法は、原料大豆の品種や試料の違いに関わらず、重量比による混入率を推定するために有用であることが示唆された。また今回検討した市販豆腐試料は標準豆腐試料として用いることが可能と判断した。

模擬混入豆乳試料による予備検討で良好な結果が得られたため、次に、模擬混入豆腐試料における推定混入率を検証した。表 2 に示した模擬混入豆腐試料と標準試料を用いてリアルタイム PCR を行い、a 型大豆の推定混入率を計算した結果を表 8 に示す。増幅曲線の例を図 3、PCR 後の融解曲線分析の例を図 4 に示す。

いずれの試料においても、推定混入率と試料作製時の a 型大豆混合率は近い値を示し、本研究で検討した方法が有効であることが示された。また、模擬混入豆乳試料の場合と同様に、検量線法と $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法のどちらを用いても同様な値が得られた。 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法は、検量線作成のための DNA 希釈系列を測定する必要がないため、検査の省力化の観点からも有効である。

本研究では豆腐を対象としたが、今回設計した検知系を用いることで、他の大豆加工品を対象とした a 型大豆混入率の推定も可能となると考えられる。加工食品は加工方法によって DNA の断片化程度が異なるが¹⁰⁾、今回設計した検知系は、a 型検知と共通配列検知の増幅場所が極めて近いこと、増幅長が 75 bp 以下と短いことから、他の品目においても有効であると考えられる。

表 6 a型大豆を50%混合した模擬混入豆乳試料の推定混入率 (b型大豆に国産8品種を使用)

a型大豆 混合率	試料名	b型の 原料大豆 ^{a)}	推定混入率	
			検量線法	ΔΔCt法
50%	TN-1	とよみづき	53.0%	53.7%
50%	TN-2	ユキホマレ	53.7%	54.5%
50%	TN-3	リュウホウ	54.9%	55.6%
50%	TN-4	フクユタカ	47.7%	48.2%
50%	TN-5	おおすず	51.5%	52.1%
50%	TN-6	トヨムスメ	56.5%	57.3%
50%	TN-7	里のほほえみ	51.5%	52.1%
50%	TN-8	エンレイ	47.3%	47.9%

a) a型大豆には、カナダ・オンタリオ州産1を用いた。

表 7 a型大豆を50%混合した模擬混入豆乳試料の推定混入率 (a型大豆に北米産8試料を使用)

a型大豆 混合率	試料名	a型の 原料大豆 ^{a)}	推定混入率	
			検量線法	ΔΔCt法
50%	TN-8	カナダ (オンタリオ州産) 1	50.5% ^{b)}	50.0% ^{b)}
50%	TN-9	米国 (インディアナ州)	51.7%	51.3%
50%	TN-10	米国 (オハイオ州)	51.0%	50.5%
50%	TN-11	米国 (ミシガン州)	51.8%	51.3%
50%	TN-12	米国 (イリノイ州)	50.6%	50.0%
50%	TN-13	米国 (ミネソタ州)	46.6%	46.1%
50%	TN-14	カナダ (オンタリオ州) 2	52.6%	52.2%
50%	TN-15	カナダ (ケベック州)	45.1%	44.5%

a) b型大豆には、エンレイを用いた。 b) 表6のTN-8とは別の日に測定した。抽出DNA溶液は同一である。

表 8 模擬混入豆腐試料の推定混入率

a型大豆 混合率	試料名	推定混入率	
		検量線法	ΔΔCt法
0%	TF0	0.0%	0.0%
5%	TF5-1	3.8%	3.5%
5%	TF5-2	5.9%	5.6%
10%	TF10-1	8.2%	7.8%
10%	TF10-2	10.5%	10.1%
50%	TF50-1	42.5%	41.8%
50%	TF50-2	45.4%	44.7%
50%	TF50-3	50.0%	49.2%
50%	TF50-4	50.0%	49.3%
50%	TF50-5	48.7%	48.0%
100%	TF100	95.4%	95.0%

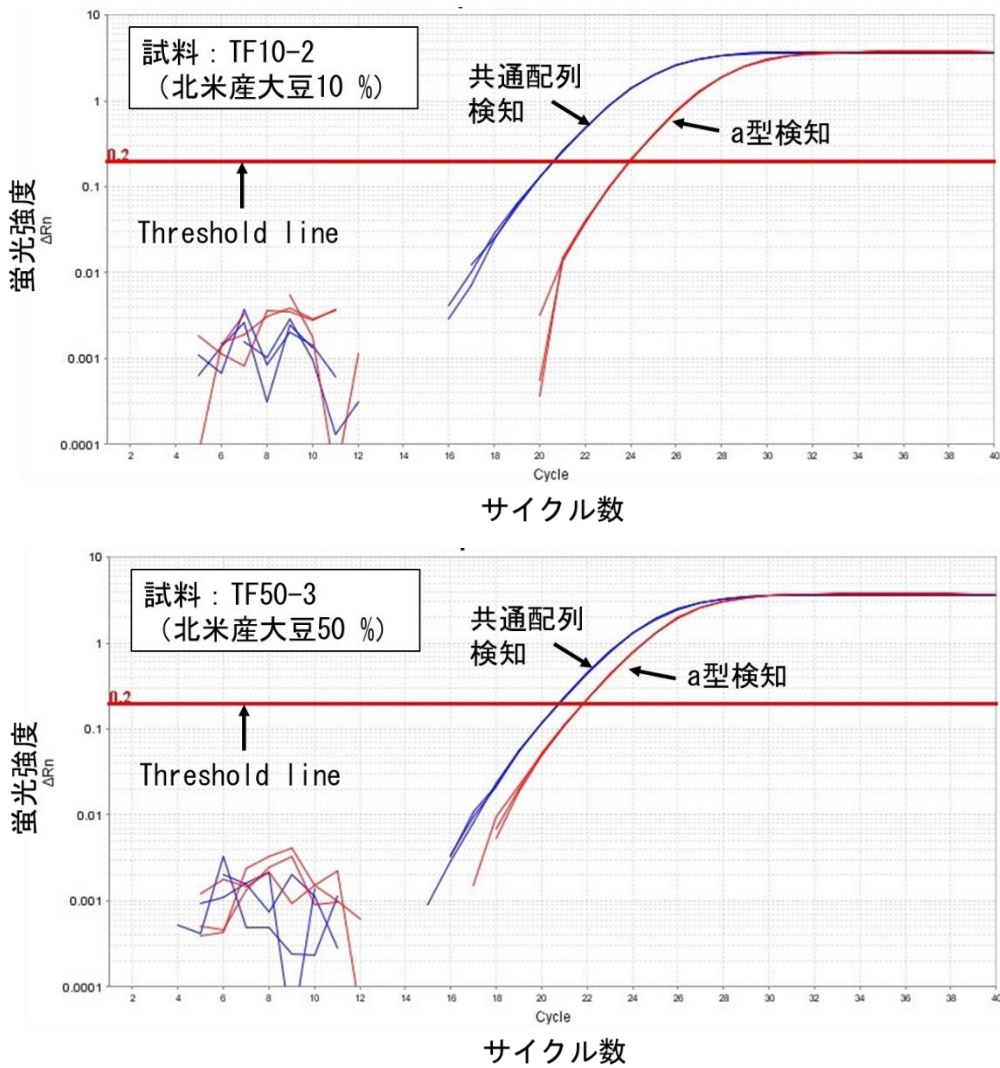


図 3 リアルタイム PCR による増幅曲線

上図：模擬混入豆腐試料 TF10-2 (北米産大豆 10%混合)

下図：模擬混入豆腐試料 TF50-3 (北米産大豆 50%混合)

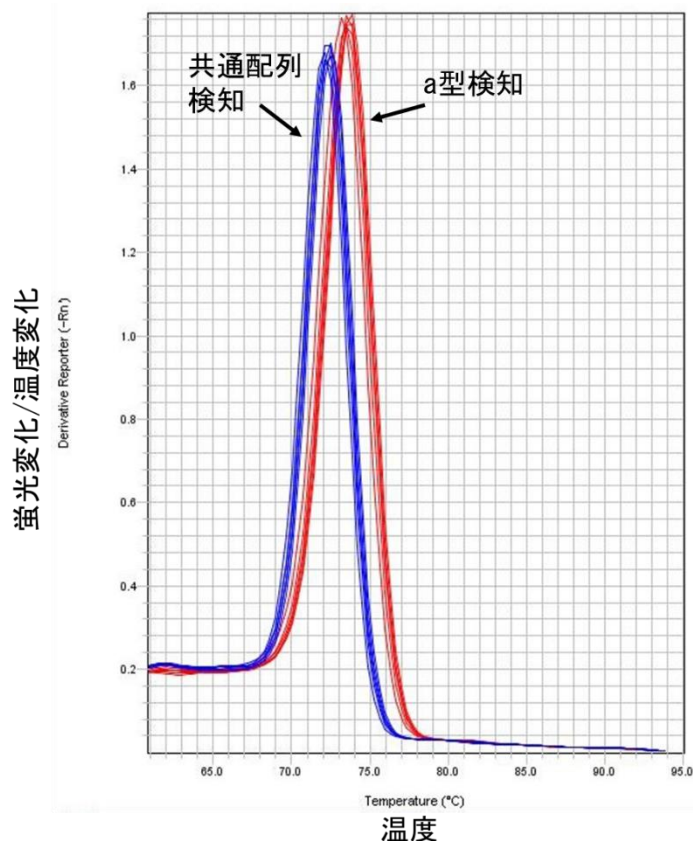


図 4 PCR 後の融解曲線分析

4. まとめ

本研究では、大豆の原産地が国産である旨表示された豆腐を対象として、北米産大豆の混入割合を推定するために、リアルタイム PCR を用いた定量的原料原産地判別法を検討した。*GmTfII* 遺伝子の第 1 イントロンに存在する計 6 塩基の挿入・欠失により大豆を a 型と b 型に分類する DNA マーカーを利用し、a 型に特異的な配列と、両者に共通する配列を同時に増幅することで a 型大豆の相対定量を行った。その結果、入手が容易な市販豆腐を相対定量法の標準試料として用いて、北米産に多く見られる a 型大豆の混入割合を検量線法及び $\Delta\Delta Ct$ 法のどちらでも推定することに成功した。混合する品種・試料によって推定混入率に若干の差があるものの、概ね、模擬混入豆腐試料作製時の重量比による混合率に近い値が得られた。

以上の結果から、大豆の原産地が国産である旨表示された豆腐を対象とした北米産大豆の混入割合の推定方法を確立した。

本研究では豆腐を対象としたが、今回設計した検知系及びプライマーを用いることで、他の大豆加工品を対象とした a 型大豆混入率の推定も可能となると考えられる。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、試料の提供にご協力いただきました農業協同組合、商社の皆様に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) 農林水産省：大豆をめぐる事情（令和4年12月版），2023-01-17，<<https://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/attach/pdf/index-13.pdf>>
- 2) 澤田桂子，井口潤，浪越充司：DNA分析によるのりの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**，16-22 (2014)
- 3) 高嶋康晴，松野和久：元素分析による乾燥ひじき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，**44**，1-7 (2020)
- 4) 寺田昌市，一色摩耶：炭素安定同位体比分析による小麦加工品の原料小麦の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，**45**，24-32 (2021)
- 5) 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)
- 6) 石原敏史，岸根雅宏，岡崎法子，豊田正俊，澤田桂子，橘田和美：Dt1遺伝子座に基づくダイズの国産・外国産判別検査法の開発，日本食品科学工学会誌，**68**，235-241 (2021)
- 7) 豊田正俊，澤田桂子，足立静香，石原敏史，岸根雅宏：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，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，**44**，35-41 (2020)
- 8) 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)
- 9) 消費者庁：食品表示基準について（平成27年3月30日付け消食表第139号消費者庁次長通知）別添「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法（最終改正2021年9月15日）」
- 10) Mano, J.; Nishitsuji, Y.; Kikuchi, Y.; Fukudome, S.; Hayashida, T.; Kawakami, H.; Kurimoto, Y.; Noguchi, A.; Kondo, K.; Teshima, R.; Takabatake, R.; Kitta, K.: Quantification of DNA fragmentation in processed foods using real-time PCR. *Food Chemistry*, **226**, 149-155 (2017).

りんごジュース中のプロシアニジン類定量法の妥当性確認

山多 晴子¹、小林 寛子²、門倉 雅史³、庄司 俊彦⁴

YAMATA Seiko, KOBAYASHI Hiroko, KADOKURA Masashi, SHOJI Toshihiko

要約

りんごジュース中のプロシアニジン類の定量分析方法を日本農林規格（以下「JAS」という。）として制定するため、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構が特許権を有する「プロシアニジン類の分析方法及び分析システム（特許第 6508741 号）¹⁾」（以下「特許分析法」という。）を基礎とした分析方法の妥当性確認調査を行った。りんごストレートジュースを対象として、単一試験室での調査及び 11 試験室による室間共同試験を行った。共同試験の結果、プロシアニジン類の含有量が $8.5 \times 10 \text{ mg/kg} \sim 2.4 \times 10^2 \text{ mg/kg}$ 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 1.1%～2.6% 及び 9.9%～12.6%、 $HorRat(R)$ は 1.2～1.8 となり、本分析方法の室間再現性は妥当であると判断された。これらの精度は質量分率に基づき算出したが、飲料品においては体積当たりの含有量を表示することが多い。このことから、体積当たりの含有量に対する拡張不確かさ U ($k=2$) を推定した。その結果 U は、プロシアニジン類の測定含有量 ρ に対して $0.244\rho \text{ mg/L}$ と推定された。この分析方法は、農林水産省によって JAS 0024 として制定された。

1. はじめに

りんごは、国産果実で 3 番目の産出額を占め（令和 2 年）²⁾、その主産地は青森県や長野県である³⁾。結果樹面積及び出荷量が減少傾向である一方、消費者の需要は大きく変わらず、産出額は増加傾向にある²⁾。りんごジュースは、中国、香港、台湾等のアジア地域を中心に輸出が行われ、令和 3 年の年間輸出量は 2,945 トンと平成 28 年の 1,356 トンよりも約 2.2 倍増加しており⁴⁾、今後も輸出の増加が見込まれる。

りんごの生鮮品や加工食品に含まれるプロシアニジン類はポリフェノールの一種で、カテキン、エピカテキンの 2 量体以上の重合体の総称である。りんご由来プロシアニジン類は抗酸化作用やヒトの内臓脂肪を減らす等の機能性があるといわれている⁵⁾ ⁶⁾。この成分に対する事業者の関心は高く、りんご由来プロシアニジン類を関与成分とする機能性表示食品の届出は生鮮品及び加工食品（サプリメントを除く）において、令和 4 年 8 月現在 9 件あり、今後も増加が予想される。

このように機能性関与成分として関心が高まっているりんご由来プロシアニジン類は、信頼性の高い定量分析方法が求められていたが、これまで統一的な分析方法は定められてこなかった。また、従来的高速液体クロマトグラフ（以下「HPLC」という。）を用いた分析方法では、プロシアニジン類を重合度ごとに分離して定量するため、用意すべき標準品のコストや測定に時間を要するという課題もあった。今回、重合度の異なるプロシアニジン類をほぼ 1 つのピークとして

¹ 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

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部（現農林水産省）

³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

⁴ 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 食品健康機能研究領域

HPLC で検出、定量する迅速な分析方法を JAS とすることによって、試験者の負担を低減して取引の円滑化を図るとともに、輸出先国に対し、国産りんごの客観的な優位性を示す機会の拡大も目指した。

まず、手軽に摂取でき、かつ、前処理が簡便なりんごジュースを対象とした JAS の制定を目標とし、短時間で測定可能な特許分析法を基礎として手順書を作成し、妥当性確認調査を実施したので報告する。

2. 実験方法

2.1 試薬及び器具

プロシアニジン類の標準品として、エピカテキンの 2 量体であるプロシアニジン B2（純度（HPLC） $\geq 97\%$ 、富士フイルム和光純薬）を用いた。L(+)-アスコルビン酸、アセトン、酢酸は、それぞれ JIS K 9502、JIS K 8034、JIS K 8355 に規定する特級を用いた。水は、JIS K 0557 に規定する A3 以上の品質を有するものを用いた。また、アセトニトリル及びメタノールは HPLC 用を用いた。

全量ピペット及び全量フラスコは、JIS R 3505 に規定するクラス A のものを用いた。また、試料抽出液のろ過には PTFE 製メンブランフィルター（孔径 0.45 μm 、ADVANTEC）を用いた。なお、添加回収試験の試料調製及び標準液の調製には JIS K 0970 に規定する可変容量形のピストン式ピペットを用いた。

2.2 添加回収試験

2.2.1 試料

市販のりんごストレートジュース（プロシアニジン類含有量約 100 mg/L）を測定試料とし、添加回収試験を実施した。

プロシアニジン B2 を L(+)-アスコルビン酸含有アセトン/水/酢酸混合液（アセトン、水及び酢酸を 70 : 29.5 : 0.5（体積比）で混合した溶媒 1 L 当りに L(+)-アスコルビン酸 0.5 g を溶解したもの。以下「標準希釈用混合液」という。）で希釈し、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製したものを添加溶液とした。この添加溶液 2.5 mL と測定試料 11 mL とをよく混合したものを添加試料とした。対照試料として、標準希釈用混合液 2.5 mL と測定試料 11 mL とをよく混合したものを用意した。添加試料、対照試料ともに 6 点ずつを用いて以下の試験を行った。

2.2.2 抽出

2.2.1 の添加試料及び対照試料 2 mL を全量ピペットを用いてそれぞれ 10 mL 容全量フラスコにはかり取り、アセトン 7 mL を加えた。次いで L(+)-アスコルビン酸含有酢酸水溶液（水 1 L 当りに酢酸 50 mL 及び L(+)-アスコルビン酸 5 g を溶解したもの。）を標線まで加えて定容し、これを振り混ぜたものを試料抽出液とした。試料抽出液約 1.5 mL をろ過し、これを試料抽出物として HPLC による測定に供した。

2.2.3 HPLC による測定

2.2.3.1 標準液の調製

プロシアニジン B2 を標準希釈用混合液で溶解して 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準原液を調製した。標準原液をさらに標準希釈用混合液で希釈し、3 濃度（10、30 及び 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の検量線用標準液を調製

した。

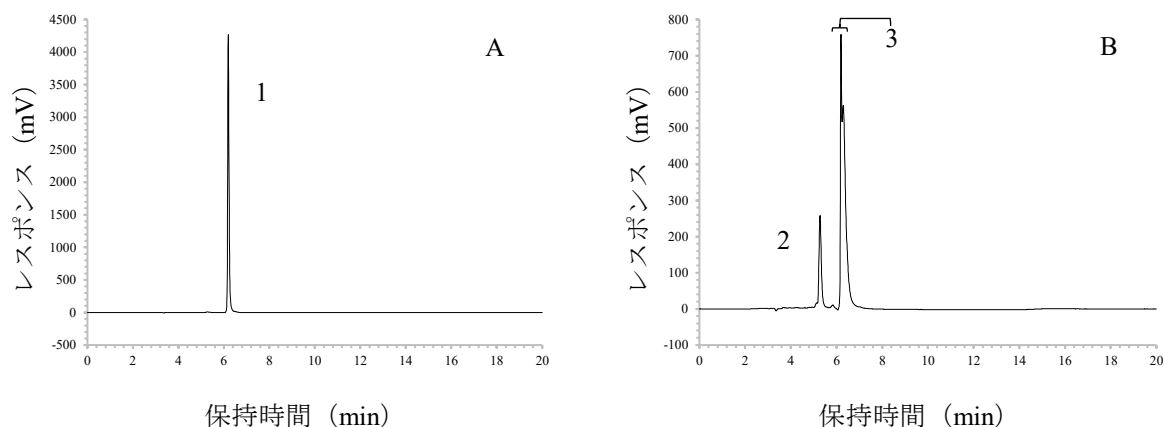
2.2.3.2 測定

試料抽出物中のプロシアニジン類の測定には、HPLC (LC-20AD、島津製作所) を用いた。HPLC の測定条件は表 1 のとおり。なお、カラムは特許分析法の推奨固定相 (ジオール相) が充填された Inertsil® WP300 Diol (GL サイエンス) を使用した。

この測定条件で得られた標準原液及び試料抽出物のクロマトグラムを図 1 に示す。各標準液のプロシアニジン B2 の濃度に対してピーク面積を一回帰して検量線を作成した。作成した検量線は、その直線性を目視によって確認するとともに、相関係数が 0.995 以上であることを確認し、試料抽出物中のプロシアニジン類の濃度算出に用いた。このとき、濃度算出の対象は、特許分析法と同様に、試料抽出物のクロマトグラムに出現するピークのうち、標準液のクロマトグラムに出現するプロシアニジン B2 由来のピークの保持時間と一致したピーク及び連続して現れる一連のピークを合わせたものとした。これらの一連のピーク面積と検量線から分析種であるプロシアニジン類の濃度を計算した。

表 1 HPLC 測定条件

移動相	移動相 A : アセトニトリル/酢酸混合液 (98 : 2、体積比) 移動相 B : メタノール/水/酢酸混合液 (95 : 3 : 2、体積比)		
移動相の流量	1.0 mL/min		
カラム	Inertsil® WP300 Diol (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒子径 5 µm)		
カラムの設定温度	35 °C		
励起波長	230 nm		
蛍光波長	321 nm		
注入量	5 µL		
サンプルクーラー温度	4 °C		
ミキサー容量	0.5 mL		
	時間 (分)	移動相 A (体積比率%)	移動相 B (体積比率%)
グラジエント条件	0~1.5	93	7
	1.5~10	2	98
	10~20	93	7



- 1 : プロシアニジン B2
- 2 : カテキン又はエピカテキン
- 3 : プロシアニジン類

図1 標準原液 (A) 及び試料抽出物 (B) のクロマトグラム

2.2.4 回収率の計算

式1によって添加試料又は対照試料中の体積当たりのプロシアニジン類の含有量 ρ を計算し、それぞれ6点併行試験の平均値を算出した。その後、式2によって回収率 R_m を計算した。

$$\rho = \frac{\rho_s \times V}{V_s} \dots \dots \dots \text{(式1)}$$

- ここで、
- ρ : 添加試料又は対照試料のプロシアニジン類含有量 (mg/L)
 - ρ_s : 試料抽出物中のプロシアニジン類の濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
 - V_s : 試験用試料採取量 (mL)、この試験では2
 - V : 抽出時の定容量 (mL)、この試験では10

$$R_m (\%) = \frac{\rho_f - \rho_u}{\rho_A} \times 100 \dots \dots \dots \text{(式2)}$$

- ここで、
- ρ_f : 添加試料のプロシアニジン類含有量平均値 (mg/L)
 - ρ_u : 対照試料のプロシアニジン類含有量平均値 (mg/L)
 - ρ_A : 添加含有量 (mg/L)、この試験では $400 \times 2.5 / (11 + 2.5)$

2.3 室間共同試験

2.3.1 試料

りんご由来プロシアニジン類は1日当たり110 mg以上を継続的に摂取したとき、内臓脂肪の低減効果があるとされている⁹⁾。この目安量の相当量～半分程度をジュースで摂取する場合を想定し、今回の室間共同試験で用いる試料の含有量を150 mg/L～250 mg/L程度と設定した。収集した市販のりんごストレートジュースのうち、酸化防止剤を使用した製品及び酸化防止剤不使用の製品から5種類の共同試験用試料(試料A～試料E)を次のように調製した。

プロシアニジン類は酸化による減少のおそれがあるため、ジュースを窒素雰囲気下でかき混ぜながら約3 mLずつ小分けし、密封した。各試験用試料の均質性の判定はIUPAC技能試験ハーモ

ナイズドプロトコル⁷⁾に基づき行い、いずれの試料も基準を満たし均質であることを確認した。共同試験用試料は1種類につき非明示2反復の計10試料を冷凍の宅配便で参加11試験室に配付した。調製した共同試験用試料を表2に示す。なお、今回の室間共同試験では、室間再現精度の評価に HorRat 値⁸⁾を採用することとし、含有量を質量分率として算出している。

表2 共同試験用試料

試料	酸化防止剤の 使用の表示	プロシアニジン類含有量* (mg/kg)
A	表示なし	93
B	表示なし	115
C	表示あり (ビタミンC)	141
D	表示あり (ビタミンC)	171
E	表示あり (ビタミンC)	226

*均質性確認において測定した含有量

2.3.2 抽出

参加試験室は、2.2.2と同様に共同試験用試料2mLを10mL容全量フラスコにはかり取った。このとき、試験用試料の採取質量を記録した。その後、2.2.2と同様に試料抽出物を調製した。試料抽出物は調製当日にHPLC測定に供された。

2.3.3 HPLCによる測定

2.3.3.1 標準液の調製

共同試験主催者において2.2.3.1と同様に100 μ g/mLの標準原液を調製し、冷凍の宅配便で参加試験室に配付した。参加試験室は、HPLC測定実施日に標準原液を標準希釈用混合液で5濃度(10、20、40、60及び80 μ g/mL)に希釈調製し、標準原液と併せて6濃度の検量線用標準液を用意した。

2.3.3.2 測定

HPLCの測定条件例は表1のとおり。なお、ミキサー容量の設定は、各試験室で所有するHPLCの仕様に従った。また、蛍光強度は、測定環境の温度の影響を受けることから、検出器に温度調節機能を有する場合は40 $^{\circ}$ Cに設定し、その他の場合は、空調等の利用によって検出器周辺の室温変化が5 $^{\circ}$ C以内になるように条件を指定した。各試験室の所有HPLCを表3に示す。加えて、測定値の受入条件として、一連の測定の開始、中間及び終了時に40 μ g/mLの検量線用標準液を測定し、中間及び終了時のプロシアニジンB2のピーク面積が、開始時のそれと比較して $\pm 10\%$ 以内であることを求めた。

参加試験室は、2.2.3.2と同様に検量線を作成、確認して試料抽出物中のプロシアニジン類の濃度を算出した。なお、室間再現精度の評価に HorRat 値を利用するため、2.3.2で記録した試験用試料の採取質量を用い、プロシアニジン類含有量を質量分率(mg/kg)で求めた。

表 3 共同試験参加試験室の所有 HPLC

試験室	送液部			検出器	
	メーカー	型式等	ミキサー容量	型式等	温調の有無
1	島津製作所	LC-20AT	0.5 mL	RF-20Axs	有
2	島津製作所	LC-20AD	0.5 mL	RF-20Axs	有
3	島津製作所	LC-20AD	0.5 mL	RF-20Axs	有
4	島津製作所	LC-20AD	0.5 mL	RF-20Axs	有
5	島津製作所	LC-20AT	0.5 mL	RF-20Axs	有
6	島津製作所	LC-20AD	0.5 mL	RF-20A	無
7	島津製作所	LC-20AD	0.5 mL	RF-20Axs	有
8	Waters	e2695	-	2475 FLR Detector	無
9	Waters	e2695	-	2475 FLR Detector	無
10	島津製作所	LC-20AD	0.5mL	RF-20A	無
11	島津製作所	LC-40D	0.5mL	RF-20Axs	有

3. 結果及び考察

3.1 添加回収試験

対照試料及び添加試料のプロシアニジン類含有量を表 4 に示す。併行相対標準偏差 RSD_r は、それぞれ 1.3 %、2.6 %、回収率 R_m は 88 %となり、AOAC のガイドライン⁹⁾で示された許容範囲内となった。

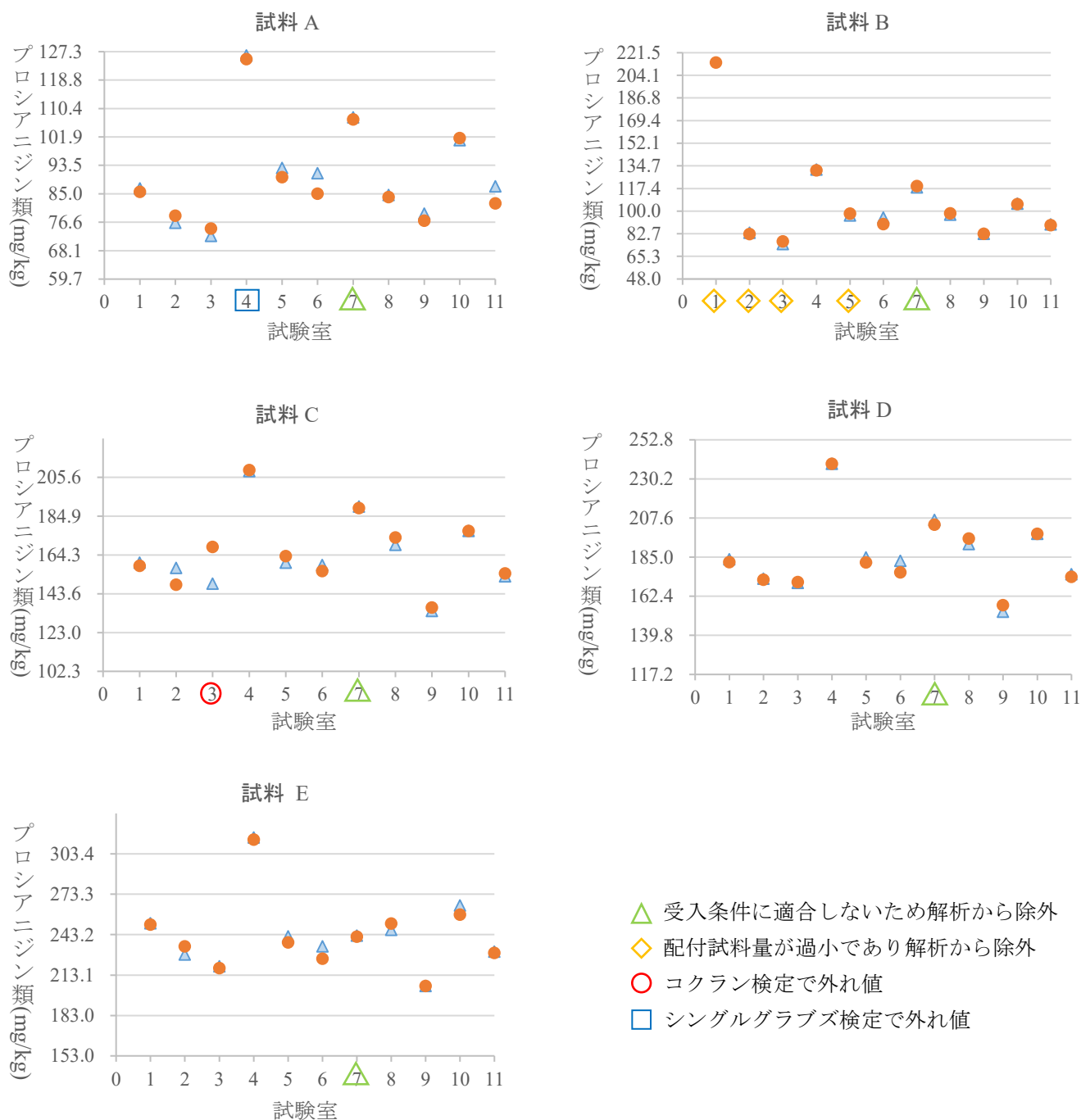
表 4 添加回収試験結果 (mg/L)

	対照試料	添加試料
1	83.4	152.5
2	84.5	147.1
3	82.7	149.7
4	81.1	152.2
5	83.1	142.6
6	82.6	146.0
平均	82.9	148.3
$RSD_r(\%)$	1.3	2.6
$R_m(\%)$	88	

3.2 室間共同試験

3.2.1 試験データの解析

参加 11 試験室のうち試験室 7 は、測定の実入条件（測定中の標準液のピーク面積の変動が ± 10 %以内）から外れたため、解析から除外した。また、試料 B では手順書で定めた採取量 2 mL に満たない配付試料が認められ、一部の参加試験室で試験用試料の採取に手順の変更を要した。この手順変更の影響を排除するため、配付試料量が過小であった 4 試験室分のデータを解析から除外した。



各図中の縦軸目盛りの間隔は、表 5 の室間再現標準偏差 S_R を利用

図 2 共同試験データプロット (非明示・2 反復試験)

試料 B の各試験室の報告データは、除外により 6 試験室分となり、解析に必要な試験室数 (8 試験室) を満たさなかったため、その解析結果は参考データとして扱うこととした。

試料 B を除く 4 試料のデータについて、IUPAC 共同試験プロトコル¹⁰⁾に規定されている外れ値検定を行った。試料 A において 1 試験室がシングルグラブズ検定で外れ値となった。試料 C において 1 試験室がコ克蘭検定で外れ値となった。これらの外れ値を除いた残りのデータについて統計処理を行った。共同試験用試料毎に各試験室の報告データをプロットしたものを図 2 に示

す。

共同試験データから求めた精度指標を表5に示す。試料Bを除いたプロシアニジン類含有量の平均値は $8.5 \times 10 \text{ mg/kg} \sim 2.4 \times 10^2 \text{ mg/kg}$ 、併行相対標準偏差 RSD_r は 1.1%~2.6%、室間再現相対標準偏差 RSD_R は 9.9%~12.6%であった。また、Horwitz式⁸⁾から予測される室間再現相対標準偏差 Predicted- RSD_R は 7.0%~8.2%、HorRat(R)は、1.2~1.8であった。室間再現精度は、コーデックスガイドライン (CAC/GL 72-2009)⁸⁾で示された正常な範囲内 ($0.5 < \text{HorRat(R)} \leq 2.0$) であることから妥当と判断した。

表5 共同試験結果 (質量当たり含有量)

試料	有効試験室数 ^a (外れ試験室)	平均値 (mg/kg)	S_r	S_R	RSD_r (%)	RSD_R (%)	Horwitz-Predicted RSD_R (%) ^b	HorRat value ^c
A	9 (1)	85.0	2.2	8.5	2.6	9.9	8.2	1.2
(A ^d)	10 (0)	89.1	2.1	15.1	2.3	17.0	8.1	2.1)
(B)	6 (0)	100.0	1.5	17.3	1.5	17.3	8.0	2.2)
C	9 (1)	164.3	2.7	20.6	1.6	12.6	7.4	1.7
(C ^d)	10 (0)	163.7	5.0	19.8	3.1	12.1	7.4	1.6)
D	10 (0)	185.0	2.0	22.6	1.1	12.2	7.3	1.7
E	10 (0)	243.2	3.3	30.1	1.3	12.4	7.0	1.8

S_r : 併行標準偏差、 S_R : 室間再現標準偏差、 RSD_r : 併行相対標準偏差、 RSD_R : 室間再現相対標準偏差

a 外れ値検定をする前の試験室数から外れ試験室を除いた数。なお、試料Bは解析に必要な試験室数(8試験室)が確保できなかったため参考データとして掲載。

b Horwitz-Predicted RSD_R (%) = $2 \times (\text{平均値} / 10^6)^{0.1505}$

c $RSD_R / \text{Predicted } RSD_R$

d 外れ試験室を除かないで統計処理を行った場合の参考データとして掲載。

3.2.2 不確かさの算出

3.2.2.1 試験用試料の採取方法による変動

ジュース中のプロシアニジン類含有量は、体積当たりの含有量 (mg/L) で示される場合が多く、操作の簡便性から試験用試料の採取量を体積計で測定することが一般的である。このことから、試料Bを除く4試料で体積当たりのプロシアニジン類含有量 ρ を、2.3.2で採取した試験用試料の採取容量 (2mL) を用い、改めて計算してそのデータから室間再現標準偏差 S_R' を解析した (表6)。ここで、試験用試料の採取に体積計を用いる場合に増加する標準不確かさ $S_{R(v)'}$ を式3により求めた。

$$S_{R(v)'} = \sqrt{S_R'^2 - S_R^2} \dots \dots \dots \text{(式3)}$$

いずれの試料においても、 $S_{R(v)'}$ は S_R' の 1/3 未満であった (表6)。このことから、試験用試料の採取方法として体積計を用いることによる不確かさ全体への寄与は 5% 以下であり十分に小さく¹¹⁾、体積計を用いることに問題はないと考えた。このため、本項以降に実施した室間再現精度の含有量に対する従属性の確認及び不確かさの算出には、体積当たりのプロシアニジン類含有量 ρ 及びその室間再現標準偏差 S_R' を利用した。

本分析方法は農林水産省に JAS 制定の申出が行われ、日本農林規格調査会の議決を経て、令和4年3月に JAS 0024 として制定された。

謝辞

本研究を実施するにあたり、室間共同試験に参加いただいた関係者各位に感謝の意を表します。

文献

- 1) 庄司俊彦, 升本早枝子: プロシアニジン類の分析方法及び分析システム, 特許第6508741号
- 2) 農林水産省, 果樹をめぐる情勢 (令和4年8月)
- 3) 農林水産省, 作物統計調査 令和3年産りんごの結果樹面積、収穫量及び出荷量 (令和4年5月)
- 4) 財務省, 貿易統計
- 5) 庄司俊彦: リンゴポリフェノールの健康機能性とその活用, 日本食品科学工学会誌, 63(1), 57-61 (2016)
- 6) Akazome, Y.; Kametani, N.; Kanda, T.; Shimasaki, H.; Kobayashi, S.: Evaluation of safety of excessive intake and efficacy of long-term intake of beverages containing apple polyphenols. *J. Oleo Sci.*, 59(6), 321-338(2010)
- 7) Thompson, M.; Ellison, S.L.R.; Wood, R.: The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. *Pure Appl. Chem.*, 78(1), 145-196 (2006)
- 8) Codex Alimentarius Commission: Guidelines on analytical terminology (CAC/GL 72-2009).
- 9) AOAC Int.: Guidelines for dietary supplements and botanicals (Appendix K). In “Official Methods of Analysis of AOAC Int.”, 21st ed (2019)
- 10) Horwitz, W.: Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure Appl. Chem.*, 67(2), 331-343 (1995)
- 11) Eurachem: Quantifying uncertainty in analytical measurement (Eurachem Guides), 3rd ed (2012)
- 12) 日本産業規格, 測定方法及び測定結果の正確さ (真度及び精度) - 第2部: 標準測定方法の併行精度及び再現精度を求めるための基本的方法 (JIS Z 8402-2 : 1999)

**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46号**

令和5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

