

博士論文

元素分析による水産物の原産地判別法に関する研究

井 口 潤

目 次

	頁
序論	1
謝辞	19
第1章 うなぎ加工品の原料原産地判別	
背景	20
第1節 DNA 分析によるうなぎ加工品の原料ウナギの種判別	
試料および方法	23
結果	24
第2節 元素分析によるうなぎ加工品の原料原産地判別	
試料および方法	25
結果	27
第3節 考察	31
第2章 アサリの原産地判別	
背景	34
試料および方法	35
結果	37
考察	41
第3章 シジミ類の原産地判別	
背景	44
第1節 DNA 分析によるシジミ類の原産地判別	
試料および方法	46

結果	48
第2節 元素分析によるシジミ類の原産地判別	
試料および方法	49
結果	51
第3節 元素分析による原産地判別法の室間共同試験	
試料および方法	54
結果	57
第4節 考察	59
第4章 総合的考察	63
文献	66
図表	84

序論

水産生物における元素分析

水産生物の硬組織における元素は、生息環境の元素組成および生物の生理状態を反映して蓄積することから、生態調査、とくに魚介類の回遊履歴や生息環境履歴の解析に用いられている。魚類の耳石、貝殻、サンゴ骨格中の Sr/Ca (ストロンチウム/カルシウム) 比や Mg/Ca (マグネシウム/カルシウム) 比の元素を測定することによって、塩分濃度や生息域の温度を推定する研究が行われている (新井ら, 2002; Tsukamoto *et al.*, 1998; 2001; 海野ら, 2007; 岡部ら, 2011; Radtke, 1989; Dodd, 1965; Takesue *et al.*, 2004; Carroll *et al.*, 2009; Beck *et al.*, 1992; Heiss *et al.*, 1997; Marshall and McCulloch, 2002; Sinclair, 2005)。

海水中のストロンチウム濃度は淡水中のストロンチウム濃度より高く、魚類が成長するときには耳石にはストロンチウムとそれ以外の元素を環境水中の比に応じて吸収する (新井ら, 2002)。Tsukamoto *et al.* (1998; 2001) は、日本沿岸で採集された産卵回遊中のウナギから得た耳石について、電子プローブマイクロアナライザー (Electron Probe Micro Analyzer, EPMA) により、Sr/Ca 比を分析した。一般的にウナギはシラスになった後は川に上って育つものだと思われていたが、シラスになっても川に上らず海で過ごす「海ウナギ」や汽水と淡水を複数回行き来している「河ロウナギ」がいることが耳石の Sr/Ca 比により明らかになった。

海野ら (2007) は、広島県芦田川の中、上流域で捕獲したアユ成魚 10 個体の耳石 Sr/Ca 比を EPMA で分析し由来判別を行った。その結果、9 個体の耳石の Sr/Ca 比に変動がなく、終始低レベルで推移したため、それらは仔稚魚期に海洋生活を送らなかった陸封アユと判断された。また、陸封アユは芦田川に建設されたダムで再生産したものと考えられた。

岡部ら (2011) は、カマキリ当歳魚の遡上履歴を推定するために、耳石輪紋の日周性、耳石 Sr/Ca 比および塩分濃度との関係について調べた。高知県四万十川および物部川で採集したカマキリ当歳魚の遡上時期を推定したところ、海水から淡水への移行期は、いずれの河川においても 3 月上旬と推定された。

Radtke *et al.* (1990) は、水温により Sr/Ca 比が変化することを利用し、大西洋ニシン仔魚の

耳石 Sr/Ca 比から経験水温を推定し、回遊履歴を推定した。飼育魚の耳石 Sr/Ca 比と生育温度との関係式を求め、実際の海域で採集したニシン仔魚の耳石 Sr/Ca 比から、Sr/Ca 比を水温に換算し、回遊中の水温履歴を推定した。推定経験水温の経時変化を耳石日周輪と対応させたところ、仔魚は餌生物の豊富な沿岸低温域に來遊していることがわかった。

二枚貝では、化石貝殻中の Sr/Ca 比や Mg/Ca 比を測定し、当時の海水温がどの程度であったかを推定する研究が行われている。貝殻中の Sr/Ca 比や Mg/Ca 比が生息している海水温を反映するとして、様々な環境にある現生の二枚貝中の元素濃度を測定し、Sr/Ca 比や Mg/Ca 比等の方程式が算出され、当時の海水温の推定に用いられている (Dodd, 1965; Takesue *et al.*, 2004; Carroll *et al.*, 2009)。

サンゴでは、成長に伴って環境水中の元素をサンゴ骨格に蓄積することから、サンゴ骨格の年輪に沿って数ヶ月単位の分解能で微量元素が測定され、海水温と連動した Sr/Ca 比や Mg/Ca 比等の変動が熱帯から亜熱帯の各地点で報告されている (Beck *et al.*, 1992; Heiss *et al.*, 1997; Marshall and McCulloch, 2002; Sinclair, 2005)。

以上のように、Sr/Ca 比や Mg/Ca 比等により、様々な魚介類の回遊履歴や生息環境履歴について研究されているが、その他の元素については、鉛やカドミウム含量など有害重金属蓄積のモニタリング調査で用いられており、回遊履歴や生息地域を推定する研究はあまり行われていない。しかし、誘導結合プラズマ発光分析装置 (Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy, ICP-OES) や誘導結合プラズマ質量分析装置 (Inductively coupled plasma mass spectroscopy, ICP-MS) による分析が一般的になってきたことにより、多くの元素を用いて回遊経路や生息地域を推定する研究が行われ始めている。

Rooker *et al.* (2003) は、魚類の成長に伴い生育環境を反映した元素が耳石に蓄積されていることを利用し、地中海と西大西洋で漁獲された 1 歳魚のクロマグロの耳石 (n=9 および 12) の元素を測定した。耳石における Li, Mg, Ca, Mn, Sr および Ba の含量の組成比から、67 % と 75 % の確率で生息域を分類できることを報告した。また、地中海のアルボラン海 (東スペイン)、リグリア海 (北イタリア) とティレニア海 (南イタリア) で漁獲された 0 歳魚のクロマグロの

耳石（n=11, 10 および 22）の元素を測定したところ、67 %、80 % および 62 % の確率で生息域を分類できたことを報告した。

Thorrold *et al.* (1998) は、アメリカシャッド *Alosa sapidissima* の耳石に含まれる元素を分析することによって、生息地域を判別した。コネチカット川、ハドソン川およびデラウェア川で漁獲したアメリカシャッド（n=52, 56 および 54）の耳石に含まれる Mg, K, Mn, Sr および Ba の含量を測定した。それぞれの川で元素濃度に大きな差のあった Mn, Sr および Ba について判別分析を行ったところ、79.9 %、92.9 %、98.2 % の確率でそれぞれの川のアメリカシャッドを分類した。

このように、水産生物は環境水中に含まれる元素を生理状態に応じて生体内、とくに硬組織に蓄積することから、生物の生息地域に特徴的な元素を見出すことによって、元素の蓄積パターンを原産地の推定技術に活用することが可能であると考えられる。

わが国の食品表示制度と原産地判別技術の必要性

わが国は世界中の国々から様々な食品を輸入しており、供給熱量ベースの総合食料自給率は 39 % である（農林水産省, 2016）。近年、外国産の食品を国産の食品として販売する食品偽装や安価な代替食品を使い高価な食品に偽装する事例が発生した（農林水産省, 2014）。食品表示の偽装が食の安全性および信頼性を揺るがす問題が生じたことから、食品偽装の鑑別技術に対する消費者、行政および業界からのニーズが高まった（農林水産省, 2014）。

株式会社日本政策金融公庫（2014）が消費者の加工食品の表示情報に対する意識を調査したところ、「かなり」と「多少」を合わせて約 8 割が加工食品の安全性に対して不安を感じており、食の安全に対する関心の高さが浮き彫りになった。消費者は、食品を購入する際に食品の内容を正しく理解して選択したいという要望を有している（株式会社日本政策金融公庫, 2015）。

食品の品質および安全性に対する消費者の関心の高まりとともに、平成 11 年に「農林物資の規格化等に関する法律（JAS 法）」が改正された（農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律の一部を改正する法律, 1999）。一般消費者向けに販売されるすべての飲食料品のうち、

生鮮食品については平成 12 年 7 月から名称や原産地を記載することが義務付けられた(生鮮食品品質表示基準, 2000)。水産物の原産地表示については, 国産品にあつては生産された水域の名称又は地域名を記載する必要があるが, 水域名の記載が困難な場合は, 水揚げ港名又は水揚げした港が属する都道府県名をもって水域名の記載に代えることができる。輸入品については原産国名を記載する(水域名を併記することができる)(水産物品質表示基準, 2000)。

また, 加工食品については平成 13 年 4 月以後に製造, 加工又は輸入された製品から名称, 原材料名, 内容量, 賞味期限又は消費期限, 保存方法, 製造者の氏名および住所等を表示することが義務付けられた(加工食品品質表示基準, 2000)。加工食品については, 原料調達先の多様化・グローバル化が進展する中, 原料の原産地についても重要視された。加工食品の中には, 原料の原産地によって商品が差別化されるものがあるが, 加工地を強調することによって消費者に原料の原産地と誤解を与えるような産地表示が行われており, 原料原産地表示の要望が行政部局に寄せられた(消費者庁, 2012)。このため, まず, 梅干しとらっきょう漬けに原料原産地表示を義務づける品質表示基準が平成 12 年 12 月に策定された。以降, 農産物漬物, 野菜冷凍品, うなぎ加工品, 乾燥わかめ, 塩蔵わかめ, 塩干魚類, 塩蔵魚類, かつお削りぶしの 8 品目について, 原料原産地の表示が義務づけられた。しかし, 加工食品には最後に実質的な変更がなされた地域(加工地)を製品の原産地として表示することができるが, なかには, あたかも原料の原産地であるかのように加工地を強調する表示が見られ, このような場合, 消費者の誤認を招くおそれがあった。さらに, 生鮮食品の原産地表示が平成 12 年 7 月から義務づけられている一方で, これらを少し加工した加工食品には, 原料の原産地表示が義務づけられていなかったため, 平成 16 年 9 月に改正加工食品品質表示基準(加工食品品質表示基準, 2004)が施行された(消費者庁, 2012)。主な改正点としては, 加工食品全般について, 産地名が加工地を示すのか原料の産地を示すのか不明確な表示は禁止され, 原産地に由来する原料の品質の差異が, 加工食品としての品質に大きく反映されると認識されている 20 の加工食品群が義務表示対象として横断的に網羅された。水産物では原料の品質が製品に反映されやすい素干魚介類, 塩干魚介類, 煮干魚介類及びこんぶ, 干のり, 焼きのりその他干した海藻類, 塩蔵魚介類及び塩

蔵海藻類，調味した魚介類及び海藻類，ゆで，又は蒸した魚介類及び海藻類，表面をあぶった魚介類，フライ種として衣をつけた魚介類について原料原産地の表示が義務付けられた。また，うなぎ加工品，かつお削りぶし，農産物漬物及び野菜冷凍食品については，個別に原料原産地の表示が義務づけられた。表示方法は，主な原材料が国産の場合は国産の旨，輸入品の場合は原産国を記載する。なお，国産の水産物の場合は生産した水域名，水揚げした港名，水揚げした港又は主たる養殖場が属する都道府県名その他一般に知られている地名を記載することができる。

わが国における食品の表示制度は，一般消費者の選択に資するための食品の品質表示基準を定めた JAS 法だけでなく，食品の安全性の確保のために飲食に起因する衛生上の危害の発生を防止するための「食品衛生法」（食品衛生法, 1947），国民の栄養の改善や国民の健康の増進等の国民保健の向上を図ることを目的とした「健康増進法」（健康増進法, 2002）などによって規定されている。これらの法令により表示が義務付けられる事項について，特に JAS 法と食品衛生法で重複がみられ，また，同じ用語でも定義や使われ方も異なるものがあるなど，当時の食品表示制度は，複雑でわかりにくいものとなっていた（消費者庁, 2014）。このため，JAS 法，食品衛生法および健康増進法の食品の表示に関する規定を統合して，食品の表示に関する包括的かつ一元的な制度として「食品表示法」が平成 27 年 4 月に施行された（食品表示法, 2013）。食品表示法は，消費者と事業者の双方にとってわかりやすい表示，消費者は口にする食品の安全性を確保し，自主的・合理的な食品選択の機会を与えることを目指している（消費者庁, 2013）。加工食品の栄養表示が原則として義務化され，アレルギー表示が患者の立場に立ってより詳しくなり，2013 年末に起きた冷凍食品の農薬混入事件を受けて製造所固有記号の制度が改正された。（食品表示基準, 2015）。

さらに，2017 年 9 月に食品表示基準が改正され，原則すべての加工食品について，現在原材料として表示されている重量割合第 1 位の原材料について，その産地の表示が行われることが義務づけられた。原則としては，使われている原材料の原産地を括弧内に表示し，原産地が 2 か国以上の場合，使用割合の多い順に表示するが，以下の例外表示が認められた。原材料が加

工食品の場合、その製造地が（〇〇製造）と表示される「製造地表示」、原材料の産地が2か国以上で切り替わる場合、過去の使用実績等をもとに使用割合の多い順に「又は」でつないで表示される「又は表示」、3か国以上の外国産の原材料が使用され、その産地の重量順位に変動する可能性がある場合、（輸入）と表示される「大括り表示」、国産を含む4か国以上の原材料が切り替えて使用される場合は、「輸入又は国産」などと表示される「大括り表示＋又は表示」の4種類である。表示方法は複雑になったが、消費者は食品表示基準の改正により、原材料が国産か輸入か、国産の重量割合が多いのか少ないのかの情報を得ることが可能になり、その情報に基づいて、加工食品を選択できるようになった。このような法規制に基づき不適切な食品表示を科学的に検証するための鑑別技術の開発が行政機関から求められている。

食品表示に関する鑑別法

食品の表示偽装は世界中で行われており、これらの偽装に対応するため、食品表示が適切かどうかを科学的に検証するための化学分析による技術が開発されている。海外では、1970年代から目視で産地を判別することが困難なワインについて元素組成によりヨーロッパの産地を判別する研究が報告されている（Kowalski and Bender, 1972）。その後、元素分析によって産地を判別する方法やDNA分析によって原料の生物種を判別する方法、安定同位体比によって産地を判別する方法などが研究されている（大坪ら, 1997; 2002; Nasu *et al.*, 2002; 中村ら, 2004; 2006; Chaw *et al.*, 1993; 2003; Iguchi *et al.* 2012; Takashima *et al.*, 2006; 農林水産消費技術センター・水産総合研究センター, 2007; 中下ら, 2008; 2009; Ariyama *et al.*, 2007; 門倉ら, 2006; 法邑ら, 2006; Ariyama *et al.*, 2004; 船木ら, 2010; Nakamura *et al.*, 2012; 渡邊ら, 2008; 門倉ら, 2010; 中村・堀田, 2011; 門倉, 2012; 杉山・榎本, 2012; Angerosa *et al.*, 1999; Mouly *et al.*, 1999; Gomez *et al.*, 2004; 諸橋ら, 2011; 服部ら, 2009）。

DNA分析は、種によって異なるDNA塩基配列を解析し、その差異を利用することによって種や産地を判別する。例えば、日本人の主食である米は、上位10品種で約8割を占めており、流通量の上位に位置するコシヒカリ、ひとめぼれ、あきたこまちなどの品種は良食味品種であ

り、これらの品種は他の品種と比較して高い価格で取引されている。コシヒカリを中心とする良食味品種への偽装表示はたびたび問題となっていたため、大坪ら（1997; 2002）はコシヒカリかその他の品種かを判別する方法を開発した。さらに米の品種判別に関する研究は進み、これまでに 110 品種の判別技術（Nasu *et al.*, 2002）、もち加工品における異種穀類の混入検出技術（中村ら, 2004）、いもち病真正抵抗性遺伝子を導入したコシヒカリの判別技術（中村ら, 2006）などが開発されている。

マグロ属魚類は、クロマグロ *Thunnus orientalis*, タイセイヨウクロマグロ *T. thynnus*, ミナミマグロ *T. maccoyii*, メバチ *T. obsus*, キハダ *T. albacares*, ビンナガ *T. alalunga*, コシナガ *T. tongglos* および タイセイヨウマグロ *T. atlantics* の 8 種が知られている。さらに、メバチは α タイプと β タイプの 2 つの系群に分類される。大西洋では α および β タイプが存在するが、インド洋および太平洋では β タイプがほとんどである（Chaw *et al.*, 2000）。マグロ属魚類のうちクロマグロおよびミナミマグロが高価であり、メバチやキハダのように比較的安価であるため、しばしば魚種を偽装する事件が起こっている（農林水産省, 2005）。マグロ属魚類は、ミトコンドリア DNA 分析による種間関係が解析されている。種特異的な一塩基多型を利用し、3 種類の制限酵素を用いた PCR-RFLP 法によって、クロマグロ、タイセイヨウクロマグロ、ミナミマグロ、メバチ α タイプ、メバチ β タイプ、キハダおよびビンナガを判別する手法が開発されている（Chaw *et al.*, 1993; 2003）。この判別法は、マニュアル化され農林水産消費安全技術センターで市販品の表示の真正性を確認するための分析法として、実用化されている（農林水産消費安全技術センター・水産総合研究センター, 2005）。

ブリ属 4 種（ブリ *Seriola quinqueradiata*, カンパチ *S. dumerili*, ヒラマサ *S. lalandi*, ヒレナガカンパチ *S. rivoliana*）に比較して安価な *Seriola* 属 3 種（ブルーワレフー *Seriola brama*, ホワイトワレフー *S. caerulea*, シルバーワレフー *S. punctata*）、メダイ *Hyperoglyphe japonica* およびスギ *Rachycentron Canadum* が、ブリ属の魚種として販売された。「オキブリ」や「クロカンパチ」としてブリ属の魚種名に似せ、販売される疑いが発生した。このため、Iguchi *et al.* (2012) はミトコンドリア DNA の *Cytb* 遺伝子 (1141 bp) について塩基配列を決定し、その解析結果が

らブリ属 4 種では 417 bp, *Seriotelella* 属 3 種とメダイでは 285 bp, スギでは 224 bp の 3 種類の PCR 産物が得られるプライマーを設計し, 更にブリ属 4 種は MspI, *Seriotelella* 属 3 種とメダイは BfaI および DdeI の制限酵素を用いた RFLP 分析から, これら 9 種を判別する技術を開発した。農林水産消費安全技術センターは, 3 試験室間で分析法の共同試験を行い, マニュアル化し, 市販品の表示の真正性を確認するための分析に利用している。

アジ類やサバ類の塩干品のような塩干魚介類は, 主な原材料である魚の原産地に関する表示が必要である。国内で漁獲されたマアジ *Trachurus japonicus* は, ヨーロッパから輸入されるニシマアジ *T. trachurus* に比べ, 市場平均価格で 1.5~2 倍の値で取引されていた(高嶋康晴, 2005)。また, マアジとニシマアジは形態的な特徴もよく似ており, アジ類の原料原産地に関する表示が適正に行われているかを検証するため, DNA による種判別法が開発された。Takashima *et al.* (2006) は, 大西洋で漁獲され日本近海に生息しないため日本で漁獲されることがないニシマアジと国産のマアジとを判別した。ミトコンドリア DNA の塩基配列を比較し, ND5 遺伝子の 360 bp を増幅させ, 制限酵素処理することにより, マアジとニシマアジの塩干品を判別する PCR-RFLP 法を開発した。

また, サバ類の塩干品については, 主にノルウェーから輸入されるタイセイヨウサバを国産のマサバとして原材料の表示を偽装したり, 国産ではあるもののマサバより安価なゴマサバをマサバと偽装して販売したりする疑いがあった。このため, ミトコンドリア DNA の *tRNA Leu* から ND5 の領域にある 505 bp を増幅し, 制限酵素処理することにより, マサバ, ゴマサバおよびタイセイヨウサバを判別する PCR-RFLP 法が開発された(農林水産消費安全技術センター・水産総合研究センター, 2007)。これらの分析法も, 農林水産消費安全技術センターでマニュアル化され, 市販されている加工品の原料魚種の原料原産地を確認するための分析法として使用されている(農林水産省, 2009)。

これら DNA 分析は, 誤判別が少なく, 一度に多くの試料を分析できる手法である。しかし, DNA 分析で産地判別を行う場合, 同一の種や同一の品種が, 異なる産地で漁獲されると DNA の差異がないため, 産地を判別することができない。一方, 安定同位体比分析や元素分析は,

生育環境が異なっていれば産地判別ができることが多い（有山ら, 2010）。

生物中の C, O, Sr などの元素の安定同位体の比 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) は、生物が育ってきた環境要因を反映するため、その比を利用し産地判別を行うものである。安定同位体比は、元素によって反映するものに特徴がある。例えば、植物では、C 同位体比は光合成経路の異なる C3 植物と C4 植物ではその安定同位体比が大きく異なる（和田, 1997）。また、同一植物間では主に温度・湿度の違いが安定同位体比に反映される。生物の O 同位体比には生育環境中の水や温度、湿度などの違いが反映される（Bowen *et al.*, 2005）。雨水や地下水などにおける水の O 同位体比は緯度や高度といった地理的な要因で変化する（Rummel *et al.*, 2010）。Sr 安定同位体比は、主に植物の産地判別に使用されており、土壌中に含まれる Sr 安定同位体比の違いが反映される。岩石や鉱物に含まれる Sr 同位体比はマグマから分離して岩石が生成したときの条件やその年代に応じた値となり、地域的な値をとる（加々美ら, 2008）。岩石の同位体比は土壌、水、土壌中の成分を吸収した作物の同位体比にも反映されるため、作物の産地の推定に利用できる可能性がある。

中下らは、牛肉について、国産、オーストラリア産、アメリカ産の C, N および O の同位体比分析を行い、牛肉の産地判別の可能性を示している（中下ら, 2008; 2009）。C 同位体比はアメリカ産、国産、オーストラリア産の順で高い傾向がみられた。家畜の C 同位体比は餌に占めるトウモロコシ（C4 植物）の割合が多いほど高い値を示すことが報告されている（Heaton *et al.*, 2008）。中下らはアメリカの牛肉生産過程は餌に占めるトウモロコシの割合が圧倒的に高く、オーストラリアではトウモロコシの割合が低く、麦類の割合が多いため、このような結果になったと考察している。また、O 同位体比はオーストラリア産が国産とアメリカ産よりも有意に高い値を示した。降水の O 同位体比について、オーストラリアが他の 2 カ国よりも高い値を示していることから、牛肉の O 同位体比は主に牛の飲み水の O 同位体比を反映していると考察している。

元素分析による産地判別では、土質、水質、餌等の生育環境の違いが生物に含まれる元素組成に影響すると考えられており、測定したデータを統計解析することにより、2 種又は複数の

産地を判別することができる。元素分析は、試料を粉砕し均質化させた後、有機物を分解し溶液化する。その溶液化した試料の測定は ICP-OES や ICP-MS などを用いて各元素を測定する。試料の調製については、動植物試料では試料の形状が大きく、その一部しか使用しないことがある。元素分析に用いる試料量は、ほとんどの場合 1 g 未満で十分分析できるので、代表性をもった試料の一部を分析に供する。代表性を保ちながら試料を小分けにするために、基本的には粉砕し、水分が多いものはペースト状にし、均質化するまで混合する。粉砕するときには、使用する器具からの微量元素の汚染に気をつけ、例えば試料を切り出す刃物には、ステンレス等の金属刃ではなく、セラミック刃のものをを用いる。また、ビーカー等には、無機元素が溶け出す可能性があるガラス器具類はできるだけ用いず、フッ素樹脂やポリプロピレン製容器類を用いる。本研究で用いたウナギ類の肉間骨については、採取できる試料量が少ないため、10 本程度を混合させ元素濃度を平均化させた。アサリとシジミの殻については、ポリプロピレン製容器とジルコニア製の粉砕用ビーズを用いて、振とうさせることによって粉砕した。

試料の溶液化方法は、酸分解法（開放系、密閉系）、乾式灰化法、アルカリ溶解法、希酸抽出法が用いられるが、測定対象となる元素の多さや作業環境からの汚染の少なさ等から、産地判別を目的とする元素分析には、酸分解法が用いられることが多い。酸分解法は、試料に高濃度の酸として硝酸、硫酸、過塩素酸等を加えて、加熱することにより有機物を分解し、無機元素溶液を調整する方法である。開放系による分解法は、樹脂製容器等に入れた試料に酸を添加し、ホットプレートやブロックヒーター等を用いて、大気圧下で加熱分解する方法である。分解が終わっているかを途中で確認ができ、一度に処理できる点数が多いが、作業環境中から汚染を受けやすく、酸の揮発と共に揮発する元素もある。密閉系による分解法は、耐圧耐熱容器中にひょう量した試料と酸を加え、マイクロ波分解装置で加熱分解する手法である。分解時の発生ガス（酸蒸気、 CO_2 、 NO_x 、 H_2O ）による容器内圧力上昇によって酸の沸点が高くなり、開放系より分解効率がよい。また、外部環境からの汚染が少なく、揮発性元素の回収率が良いという利点もある（堀田, 2011）。これらの利点のため、本研究では密閉系による分解法を選択した。

分解が終わった酸溶液は超純水で希釈し、誘導結合プラズマ装置で複数の元素を測定する。

誘導結合プラズマ装置の測定原理は以下のとおりである。まず、試料溶液がペリスタルティックポンプでネブライザーに導入され、霧状化された後、プラズマに導入される。これらはアルゴンガスにより、プラズマトーチと呼ばれる石英の三重管に導かれる。トーチの先端部には高周波コイルが巻きつけてあり、アルゴンガスが 6000～8000 °C という高温のプラズマ炎となって噴出している。霧状になった試料溶液はプラズマに導入され、原子化される。励起状態の原子が基底状態に戻る際に、元素ごとに特定の波長の光が発光される。ICP-OES は、そのスペクトルを調べることで、元素の種類を同定・定量するものである。一方、ICP-MS は、プラズマ中で生成したイオンを直接真空内に引き込み、質量分析計で質量電荷比 (m/z)により分離し、検出器で計測を行う。ICP-OES では数百 ppm～数百 ppb レベル、ICP-MS では数 ppm～数百 ppt レベルの 20～30 元素を数分で測定することができる。両機器とも共通して、固体試料である場合、溶液化する必要があり、固体試料の分解・希釈により分析精度が大きく左右されるという点がある（原口，1986；河口・中原，1994）。近年、これらの装置の性能が向上し、低価格化していることから環境、工業、農業、食品分野など多くの分野で利用されるようになり、国内外問わず元素分析を用いた産地判別法が開発されている。

判別モデルは、判別対象の地域から試料を収集し、元素分析を行い、元素濃度データについて統計処理することで判別モデルが構築される。

産地判別を行う上で、試料収集は最も重要であり、試料収集が適切に行われないと正しい判別モデルが構築できない。試料収集は、由来の確かな試料、対象となる産地を代表する試料、様々な地域の試料が求められる。試料収集次第で、判別法の信頼性、判別率、ひいては判別法の開発の成否が決まってくるため、注意が必要である（有山ら，2010）。

元素分析については、ICP-MS や ICP-OES で 1 度に多くの元素データが得られるが、マトリックス効果やイオン化干渉等があるため、その値が本当に正しい値かどうか確認する必要がある。このため、判別したい品目と似たマトリックスからなる認証標準物質を分析したり、添加回収試験を行ったりして、分析値が正しいか確認する。試料中の元素濃度は単独の元素だけで産地の推定ができるものは少なく、多くの判別法では多変量解析やケモメトリックス等の統計

解析がされ、産地の推定が行われている。これらの中で最もよく利用されているのが線形判別分析である。線形判別分析は産地（分類）のわかっている試料の元素データ（トレーニングデータ、教師データ）を用いて解析することで、判別に有効な元素を選別し、試料を産地ごと直線によって判別するモデルを構築する方法である。

構築した判別モデルは、クロスバリデーションやモデル構築に用いていない試料等により判別モデルの有効性を確認する。判別モデルは、モデル構築試料の線形判別分析を行い、試料を分類するため、モデル構築に用いていない試料をモデルに当てはめた場合、得られる判別精度はモデル構築時より低くなる。このため、判別モデルがどの程度有効なのかを知るには、クロスバリデーションなどを行う。

新たな分析法を開発したら、試験担当者、試験室、測定機器の機種など分析条件が変わっても問題なく分析ができるのか、分析値がどの程度の範囲でばらつく可能性があるのかを明らかにする必要がある。これらは「妥当性確認」と呼ばれ、妥当性が確認されていなければ、用いようとする産地判別法が信頼できる方法なのか判別結果がどの程度確かなのか等が判断できず、実際の試料分析には使えないことにもなりかねない。元素組成に基づく産地判別法では、元素の測定値が真値から大きく外れた場合、判別結果が誤って陽性になったり、陰性になったりしてしまう。また、ICP-MS や ICP-OES の元素分析はかなり一般的になってきているが、熟練を要する分析法であるため、妥当性確認の実施が重要である。妥当性を確認するためには、均質化された同一の試料を複数試験所に配付し、各分析試験所は決められた分析手順書に従って分析し、報告する。国際的に通用する有効な解析を行うには、AOAC International のプロトコールによると、定量分析では試験所 8 カ所以上、試料数は 5 種類以上分析された報告値について定められた範囲内であるかどうかを確認する共同試験を行うことが推奨されている（AOAC International, 2005）。ただし、共同試験はコストがかかるため、AOAC International のプロトコールに従って共同試験を行うのが望ましいが、開発したすべての方法が AOAC International のプロトコールに従って確認されているわけではない。

Ariyama *et al.* (2007) は、日本産（北海道、兵庫県および佐賀県）と外国産（中国、アメリ

カ、ニュージーランド、タイ、オーストラリアおよびチリ)のタマネギの7元素(Na, Mg, P, Mn, Zn, Sr および Ba)の濃度をICP-OESにより、7元素(Co, Ni, Cu, Rb, Mo, Cd および Cs)をICP-MSにより測定し、日本産と外国産のタマネギの産地を判別するための判別モデルを作成した。このモデルは12元素(Na, Mg, P, Co, Cu, Zn, Rb, Sr, Mo, Cd, Cs および Ba)により作成され、判別率は、平均で87%であった。さらに、北海道-外国、兵庫県-外国および佐賀県-外国の判別モデルも作成した。北海道-外国判別モデルは、7元素(Na, P, Mn, Sr, Mo, Cd および Ba)により判別を行い、北海道産の産地を100%正しく北海道と判別し、外国産の産地を89%の確率で外国産と判別した。兵庫県-外国判別モデルは、8元素(Na, P, Mn, Zn, Sr, Cd, Cs, および Ba)により判別を行い、兵庫県産の産地を100%正しく兵庫県と判別し、外国産の産地を93%の確率で外国産と判別した。佐賀県-外国の判別モデルは、8元素(Na, Mg, P, Mn, Rb, Sr, Mo および Ba)により判別を行い、佐賀県産の産地を98%の確率で正しく佐賀県と判別し、外国産の産地を90%の確率で外国産と判別した。また、Ariyama *et al.*はAOAC Internationalのプロトコールに従った8試験室の共同試験ではないものの、3試験室の共同試験を行い、各試験室の各元素の分析値から相対標準偏差等を計算し、AOAC Internationalが規定する基準内であったと報告している。

門倉ら(2006)は、元素分析により、乾シイタケの産地判別法を開発した。日本産原木栽培品、中国産原木栽培品および中国産菌床栽培品のモデル構築用乾シイタケの傘部をマイクロ波試料分解装置により酸分解して、試料溶液を調製した後、ICP-OESにより10元素(Na, Mg, P, K, Ca, Mn, Fe, Zn, Sr および Ba), ICP-MSにより19元素(Li, Al, V, Co, Ni, Cu, Rb, Y, Mo, Cd, Cs, La, Ce, Nd, Sm, Gd, W, Tl および Pb)を定量し、栽培方法と原料原産地の判別モデルを構築した。原木と菌床の栽培方法の判別については、5元素(P, Cu, Zn, Mo, La)を用いた判別式により原木栽培品(日本, 中国)97試料と中国産菌床50試料をそれぞれ100%の判別的中率で推定した。日本と中国の原料原産地の判別については、9元素(Li, Mg, Al, Ca, Mn, Co, Mo, Cd および Ce)を用いた判別式により、日本産原木栽培品50試料を100%, 中国産原木栽培品47試料を97.9%の判別的中率で推定した。

法邑ら (2006) は、丹波黒について元素分析を行い、国産と中国産の判別モデルを構築した。国産、中国産計 66 試料の丹波黒について約 100 粒をマイクロ波試料分解装置により酸分解し、ICP-OES により 9 元素 (Ba, Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, Sr および Zn) および ICP-MS により 15 元素 (Al, V, Co, Ni, Cu, Rb, Mo, Cd, Cs, La, Ce, Nd, Sm, Gd および W) の計 24 元素測定した。国産と中国産を比較すると中国産の方が、Cs, La, Ce, Nd, Gd および V の平均濃度が 2 倍以上高く、Al, Ni, Rb では 2 倍程度高かった。逆に、K, P, Cd, W および Mo では国産の方が中国産より高く、Cd および Mo は中国産の 2 倍程度であった。線形判別分析により選択した 6 元素 (Ba, Ca, Mn, Nd, W および Ni) と K の濃度比により、全試料 66 点について国産、中国産の 2 群を判別するモデルを構築した。このモデルは 66 試料をすべて正しく判別した。

農産物ではその他に、ネギ (Ariyama *et al.*, 2004), ゴボウ (船木ら, 2010), サトイモ (Nakamura *et al.*, 2012), カボチャ (渡邊ら, 2008; 門倉ら, 2010), 落花生 (中村・堀田, 2011), 生しいたけ (門倉, 2012), マツタケ (杉山・榎本, 2012), オリーブオイル (Angerosa *et al.*, 1999), オレンジジュース (Mouly *et al.*, 1999), ワイン (Gomez *et al.*, 2004) などの産地を検証する技術が研究されている。

水産物においては、諸橋ら (2011) は原料原産地が日本産および中国産の湯通し塩蔵わかめについて元素分析を行った。日本産 100 点 (三陸産 50 点, 鳴門産 50 点) および中国産 50 点について、6 元素 (Mn, Cu, Zn, Rb, Sr および Ba) を ICP-MS で測定し、線形判別分析により選択した 2 元素 (Mn および Ba) の濃度を用い、判別関数を構築した。構築した判別関数による日本産の的中率は 99 %, 中国産の的中率は 96 % であり、日本産および中国産の湯通し塩蔵わかめの原料原産地判別法を開発した。

干し昆布については、服部ら (2009) が日本産および中国産の干し昆布の無機元素の分析を行い、産地判別法を開発した。国産のマコンブ 80 点, リシリコンブ 50 点, ミツイシコンブ 50 点および中国産 70 点の計 250 点の干し昆布について、ICP-MS を用いて 12 元素 (Al, Ca, Mn, Fe, Zn, Rb, Sr, Mo, Ba, Nb, Sm および Gd) を定量したところ、ほとんどの元素で国産に

比べると中国産の方が、平均濃度が高く、とくに Al, Mn, Fe, Rb および Ba で差が大きかった。測定した元素すべての中から線形判別分析により、国産マコンブ、リシリコンブ、ミツイシコンブのそれぞれと中国産マコンブを判別する 3 つの判別関数および国産コンブ（3 種）と中国産マコンブを判別する関数を構築した。いずれの判別関数においても Mn および Ba の 2 元素が選択された。構築した判別関数による試料の判別率は 97.5～100 %であった。これらの判別法は、農林水産消費安全技術センターでマニュアル化され、市販品の表示の真正性を確認するための分析法として、実用化されている。しかし、農産物に比べると水産物の対象品目が少なく、今後も研究の余地が残されている。

産地表示に関して、水産物でも不適正表示が多くみられ、とくに、ウナギ類、アサリ、シジミ類の産地偽装事件が多く報告されている（関東農政局, 2014; 東京都, 2013; 熊本県, 2015; 千葉県, 2013; 茨城県, 2015; 農林水産省, 2013）。中国や台湾産ウナギを使った蒲焼きに日本産ウナギを使用している旨、表示して販売した例や中国産や韓国産のアサリを国産アサリとして販売した例や、ロシア産や中国産のシジミ類を国産シジミとして販売する産地偽装が摘発される報道が毎年行われている。このため、産地偽装品を鑑別する分析法の開発が行政部局から求められている。そこで本研究では、水産物や野菜類の元素分析による原産地判別に関する文献を参考にして、産地偽装の多いウナギ類、アサリ、シジミ類の産地判別法を開発した。

不適正表示の報道発表の例を挙げると、うなぎ加工品については、平成 27 年 3 月、農林水産省関東農政局は神奈川県对企业に対して JAS 法に基づく表示の是正の指示等を行っている（関東農政局, 2014）。中国産ニホンウナギを使用していたにもかかわらず、原料原産地名を「国産」と表示して、一般消費者向け商品として販売していたこと、事実と異なる産地名を記載した原料うなぎの納品書を用意し、備え付けていたこと等が確認された。東京都は、都内の企業が「中国産」の業務用うなぎ加工品（蒲焼き）を仕入れ、北海道の企業に詰め替えさせ、原料原産地を「愛知県産」と偽装した上で、平成 24 年 3 月から平成 25 年 7 月まで、少なくとも 2028 ケース（20280 kg）を一般消費者向け製品として販売したことを公表した（東京都, 2013）。ウナギ類の DNA 分析法は、ニホンウナギとヨーロッパウナギを判別する技術がすでに開発されてい

る (Sezaki *et al.*, 2005)。Sezaki *et al.*は、ウナギ類のミトコンドリア DNA の塩基配列を比較し、16S rDNA 遺伝子の 560 bp を増幅させ、制限酵素処理することにより、ウナギ類の種を判別する PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法を開発した。国内ではニホンウナギの養殖がほとんどであるのに対して、中国ではニホンウナギとヨーロッパウナギの養殖が行われていたため、うなぎ加工品に用いられるウナギの原料原産地の判別に DNA 分析による種判別法が使用できた。しかし、中国や台湾から輸入されるニホンウナギの産地判別には DNA 分析は適用できず、また、ワシントン条約によりヨーロッパウナギの輸入が難しくなることから、DNA 分析による種判別法以外による産地判別法の開発が求められていた。

アサリについては、平成 27 年 2 月、熊本県は、熊本県の企業に対し、中国産と韓国産のアサリを「熊本産」と表示して販売していたことから、JAS 法第 19 条の 14 第 1 項および景品表示法第 7 条の規定に基づき不適正な表示を改めるよう指示した (熊本県, 2015)。熊本県は、少なくとも、平成 24 年 11 月から 25 年 10 月までの 1 年間、中国産と韓国産のアサリ 3545 トンを「熊本産」と表示して、九州の卸売業者に販売したことを確認している。千葉県は、千葉県の企業が小分け・包装したアサリについて、外国産アサリ (韓国産、中国産) を、熊本県産または愛知県産と原産地を表示して、少なくとも平成 25 年 1 月から同年 7 月までの間に 160261kg を販売したことを確認した (千葉県, 2013)。アサリについては、ミトコンドリア DNA の部分配列が生息地域により違うことから PCR-RFLP 法による判別手法が開発されている (Hamaguchi *et al.*, 2005, Hamaguchi, 2007)。ミトコンドリア DNA の NDI 遺伝子の塩基配列に中国・韓国西岸地域系群と日本・韓国南岸地域系群とでは変異があることから判別する手法であるが、この手法では日本産と韓国産アサリは判別できないため、異なる産地判別法が必要である。

シジミ類については、平成 27 年 2 月に茨城県の企業が、「ロシア産」のシジミ類を「青森県十三湖産」と表示し、または、「ロシア産」のシジミ類と「青森県十三湖産」のシジミ類を混合し「青森県十三湖産」と表示して販売したことを申告している (茨城県, 2015)。茨城県は、平成 26 年 9 月 1 日から同年 12 月 15 日の間に、「青森県十三湖産」と表示して販売したシジミは 3989 kg であり、これに使用した「ロシア産」のシジミは約 3900 kg であったことを確認し、こ

の企業に対し、不適正な表示を行わないよう指示した。農林水産省は、山口県の企業が外国産シジミ（ロシア産、中国産および韓国産）を茨城県涸沼産および愛知県産と表示していたこと（原産地の虚偽表示）、少なくとも平成 23 年 1 月から平成 25 年 4 月までの間、首都圏の 3 業者の卸売業者等に 37.8 トンを販売し、最終的に一般消費者へ販売されていたことを確認した（農林水産省, 2013）。中国産および韓国産のシジミ類は日本産のシジミ類と種または遺伝子の集団構造が異なるとの研究成果が報告されているが（古丸ら, 2006; 古丸ら, 2010; 山田ら, 2010; 飯田ら, 2012; 農林水産研究開発レポート:

http://www.affrc.maff.go.jp/docs/report/report16/no16_p2.htm, 農林水産省, 2017 年 11 月 30 日), 輸入量の 8 割を占めるロシア産シジミ類の解析は詳細に行われていない。

第 1 章では、うなぎ加工品に使用される日本産、中国産および台湾産のウナギの原料原産地の判別するために、加工品の筋肉に含まれている肉間骨を用いて、元素分析による産地判別を行った。

第 2 章では、日本産、中国産および韓国産のアサリの貝殻を用いて元素分析により産地判別を行った。

第 3 章では、日本産とロシア産のシジミ類の産地判別について、ミトコンドリア DNA の分析と貝殻を元素分析することによって行った。

なお、本研究で得られた成果は以下のとおり公表済みである。

1. Iguchi J, Yamashita Y, Touhata K, Yabu T, Yamashita M. Origin identification method by multiple trace elemental analysis of intermuscular bones in grilled eel products produced in Japan, China, and Taiwan. *Fish. Sci.* 2013; **79**: 531–536.
2. Iguchi J, Takashima Y, Namikoshi A, Yamashita Y, Yamashita M. Origin identification method by multiple trace elemental analysis of short-neck clams produced in Japan, China, and the Republic of

Korea. *Fish. Sci.* 2013; **79**: 977–982.

3. Iguchi J, Isshiki M, Takashima Y, Yamashita Y, Yamashita M. Identifying the origin of *Corbicula* clams using trace element analysis. *Fish. Sci.* 2014; **80**: 1089–1096.

謝辞

本論文の作成について丁寧にご指導，ご助言いただいた東京大学 農学生命科学研究科 教授 潮秀樹先生に深甚なる謝意を表する。また，本研究の進行にあたりご指導，ご鞭撻いただいた国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産大学校 食品科学科 教授 山下倫明先生に深く謝意を表する。東京大学 農学生命科学研究科 教授 松永茂樹先生，大気海洋研究所 教授 井上 広滋先生，農学生命科学研究科 准教授 岡田茂先生には，副査としてご助言いただくとともに本論文の作成についてご指導いただいた。ここに厚く御礼申し上げる。

本研究の進行にあたって，山下由美子博士，東畑顕博士，藪健史博士，鈴木珠水氏，原竜彦氏，高嶋康晴氏，浪越充司氏，一色摩耶氏をはじめ，水産総合研究センター中央水産研究所および農林水産消費安全技術センターの皆様から御助言・ご協力をいただいた。心より感謝申し上げます。

第 1 章 うなぎ加工品の原料原産地判別

背景

ウナギ類は、ウナギ科 *Anguillidae* *Anguilla* 属に分類される魚類の総称であり、日本ではウナギ類は重要な食用魚である（小澤・林, 1999）。日本で消費されるウナギ類は、主にニホンウナギ *Anguilla japonica* とヨーロッパウナギ *A. anguilla* の 2 種である。日本で養殖されているウナギ類は、ニホンウナギであり、年間約 2 万トンが養殖生産されている（農林水産省, 2016）。また、日本には主に中国および台湾から活魚および加工品が輸入されている（財務省, 2015）。台湾では主にニホンウナギが養殖されているが、中国ではニホンウナギとヨーロッパウナギが養殖されている（出村, 2008; 出村, 2012）。平成 27 年財務省貿易統計、漁業・養殖業生産統計から輸入される加工品について、活鰻に換算すると、中国からの輸入量は 1 万 9 千トンに相当し、台湾からの輸入量は 1 千トンに相当する（加工品は原料としての活鰻として換算、換算率は 60 %）。ウナギ類の国内生産量は 2 万トン弱であることから、活鰻および加工品の輸入量の合計は活鰻の量に換算すると国内生産量とほぼ同程度と推定される。

ニホンウナギの産卵場は、西マリアナ海嶺南部海域にあり、稚魚は、黒潮にのって北上し、台湾や西日本沿岸で稚魚が採取され、それらが養殖に利用される（小澤・林, 1999; Katsumi, 2006; 張, 2008）。日本の主な養殖地域は、鹿児島県、愛知県、宮崎県および静岡県であり、これらの養殖場ではコンクリート製の水槽を使って養殖されている。一方、中国と台湾では主に露地池でニホンウナギの養殖が行われている（廖, 1991; 吉島, 2007）。ヨーロッパウナギはほぼヨーロッパ全域とアフリカの一部に生息しており（小澤・林, 1999）、稚魚は、中国へ輸出され、養殖種苗として多くが利用されていた（吉島, 2007）。

ウナギ類は、中国産、台湾産および日本産の間で価格に大きな差があることから、原料原産地を偽装することによって利益を得ようとする産地偽装事件が発生している（関東農政局, 2014; 東京都, 2013）。生体のニホンウナギとヨーロッパウナギは、外部形態の特徴から魚種判別は可能であるが、中国産のヨーロッパウナギは蒲焼きなど加工品の状態で流通することから、外部形態からの魚種判別が困難であると考えられる。また、外部形態や遺伝的形質から外国産

のニホンウナギを同定することもできない。これらのことから、外国産のウナギ類加工品の産地偽装を調査するため、原料原産地表示の真正性を検証する科学的方法が行政機関に求められている。

ヨーロッパウナギは中国で養殖生産されるが（水産庁, 2013; 白石・クルーク, 2015）、日本国内では養殖されていないことから、DNA 分析によってニホンウナギとヨーロッパウナギを判別する技術を利用し（Sezaki *et al.*, 2005）、中国産のうなぎ加工品の原料原産地の判別に使用されている（農林水産消費技術センター・水産総合研究センター, 2010）。しかしながら、ヨーロッパウナギは 2009 年からワシントン条約の付属書 II（ワシントン条約附属書（動物界））:

http://www.meti.go.jp/policy/external_economy/trade_control/02_exandim/06_washington/download/cites_appendices_fauna.pdf, 経済産業省, 2017 年 11 月 30 日) に記載され、国際取引が規制されていることから、中国におけるヨーロッパウナギの生産量は減少し、ニホンウナギの輸入割合は増加すると考えられる。このため、DNA 分析による種判別法だけでなく、中国産のニホンウナギの原産地判別法の開発が必要である。一方、アジアでは、2014 年に、中国、日本、韓国、台湾の漁業関連部署が「ニホンウナギその他の関連するうなぎ類の保存及び管理に関する共同声明」（Bureau of Fisheries of People's Republic of China *et al.*, 2014）を発出した。各国当局は、この声明の中で、ウナギ資源の管理の枠組み設立および養鰻生産量の制限等を内容とした共同声明を発出した。しかし、シラスウナギの取引は高い利益をもたらすため、東アジアの養殖場で養殖されるウナギ類の違法取引が懸念されている。税関や押収データ等の情報は、大量のウナギの稚魚が、ヨーロッパや東アジア域内で違法に輸出されていることを示している（Nijman, 2015; 白石・クルーク, 2015; Customs officials seize almost 200kg of eels at Liszt Ferenc.:

<http://dailynewshungary.com/customs-officials-seize-almost-200kg-of-eels-at-liszt-ferenc/>. Daily News Hungary. 4 月 27 日, 2017 年 11 月 30 日)。無報告・違法漁業により調達されたシラスウナギの問題により、ウナギ類の取引のトレーサビリティが困難となっており、原産国判別法の開発が重要となっている。

ウナギ類の元素分析による原産地判別法について、これまでに Yamashita *et al.* (2006) はウ

ナギの魚肉中の元素濃度を測定する方法を報告した。魚肉中の **Mn**, **Se** および **Zn** の元素濃度が日本の各地域と中国および台湾で有意に差があったと報告している。服部ら（2009）は日本と中国産うなぎ加工品の肉間骨中の **Mn**, **Sr**, **Zn** などの元素濃度を測定する原産地判別法を報告した。加工品の場合、筋肉組織は調味液などに含まれる元素が混入する可能性があり、加工工程の影響を受けやすいと考えられた。このため、分析には、筋肉内から上肋骨、上神経骨、上椎体骨などの肉間骨を採取して用いている。本研究は、中国産および台湾産の外国産加工品と日本産加工品とを判別するため、蒲焼き、白焼きなどの加工品から採取した肉間骨を研究材料として、測定元素数を増やしモデル構築用以外の試料も安定的に正しく判別できるよう 12 種類の元素を測定対象として、うなぎ加工品の原料原産地判別法を開発した。

第1節 DNA 分析によるうなぎ加工品の原料ウナギの種判別

日本、中国および台湾産のうなぎ加工品の原料ウナギについて、ミトコンドリア DNA のチトクローム *b* 遺伝子の塩基配列を決定し、種判別を行った。

試料および方法

供試料

うなぎ加工品は、2008 年～2009 年に小売店、卸売業者等を通じて日本産 53 点、中国産 43 点および台湾産 35 点を購入した。種判別用試料として、第2節でモデル構築用に使う日本産 40 点、中国産 30 点および台湾産 23 点を共通で用いた。

方法

DNA 抽出には、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) を用いた。試料の筋肉組織を 10～50 mg 採取し、抽出操作は製品プロトコールに従って実施した。PCR 反応液の組成は、約 50 ng のサンプル DNA, 2.5 mM の dNTP Mixture を 1.6 μ l, 10 \times Ex Taq® Buffer を 2 μ l, 各プライマー (5 μ M) を 1 μ l, TaKaRa Ex Taq® (Takara Bio, Otsu, Japan) を 0.5 ユニットに滅菌水を加え、総容量 20 μ l に調製した。プライマーには、5' プライマーとして L14735-Glu : AACCACCGTTGTTATTCAAC および 3' プライマーとして H15149-CYB:

GGTGGCKCCTCAGAAGGACATTTGKCCTCA (Miya・Nishida, 2000) を用いた。PCR の温度サイクルは、予備変性として 94 °C で 1 分間、次に(1) 熱変性として 94 °C で 20 秒間、(2) アニーリングとして 55 °C で 20 秒間、(3) 伸長反応として 72 °C で 40 秒間の(1)～(3)を 1 サイクルとして 35 サイクル、最後に伸長反応の延長として 72 °C で 7 分反応させた。

シーケンス反応は、PCR 産物をエタノール沈殿により濃縮し、BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Ready Reaction Kit (Thermo Fisher, Foster City, CA, USA) 添付のプロトコールに従って、各プライマーを用いて H 鎖および L 鎖の塩基配列を 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher)

によって決定した (Sanger *et al.*, 1977)。試料の塩基配列はニホンウナギ (AB038556; Inoue *et al.*, 2001) およびヨーロッパウナギ (AP007233; Minegishi *et al.*, 2005) との比較によって遺伝子コード領域を同定し、配列相同性を比較した。配列相同性が 99.0 % 以上の場合に、その魚種と推定することとした。

結果

日本産 53 点, 中国産 43 点および台湾産 35 点のうなぎ加工品に使用されているウナギのミトコンドリア DNA のチトクローム *b* 遺伝子の塩基配列を決定した。試料の魚種の推定を行った結果を Table 1-1 に示す。日本産, 台湾産の原料ウナギはすべてニホンウナギと推定された。中国産 43 点のうち, 37 点がニホンウナギ, 6 点がヨーロッパウナギと推定された。

第2節 元素分析によるうなぎ加工品の原料原産地判別

日本、中国および台湾産のウナギを使用したうなぎ加工品の肉間骨中の元素濃度を測定し、ウナギの原産国ごとに差異のある元素を調査した。測定した元素濃度を基に原料ウナギが中国産および台湾産の外国産うなぎ加工品か日本産のうなぎ加工品かを判別するため、原料原産地判別法を開発した。

試料および方法

供試料

うなぎ加工品は、前節で用いたものを使用した。判別モデル構築用には、日本産 40 点、中国産 30 点および台湾産 27 点を用いた。判別モデル検証用には、日本産 13 点、中国産 13 点および台湾産 8 点を用いた (Table 1-1)。

試薬

元素分析用試料の調製には、硝酸 (70 % 超高純度硝酸, 関東化学, 東京) および過酸化水素水 (30 % 原子吸光分析用, 和光純薬工業, 大阪) を用いた。ICP-MS 測定による検量線標準溶液には、多元素混合標準溶液 (XSTC-622: SPEX CertiPrep, Metuchen, NJ, USA) を適宜希釈して用いた。このとき、標準溶液 (標準溶液 50 mL 中に硝酸 5 mL が含まれる) の硝酸濃度は試料溶液と同一になるように希釈した。試料および試薬の調製には、超純水製造装置 (Milli-Q Element A10: Millipore, MA, USA) により製造された超純水 ($>18\text{M}\Omega\text{cm}$) を用いた。

器具

元素分析に用いる樹脂製ピンセット、樹脂製ビーカー、マイクロ波分解装置用テフロン製分解容器およびポリプロピレン製全量フラスコ器具は、周囲の環境からの微量元素の汚染を防ぐため、20 % の硝酸に一晩以上浸漬し、超純水で十分にすすいだものを使用した。

試料の調整

うなぎ加工品から肉間骨を樹脂製ピンセットで取り出し、付着している筋肉組織および加工工程中に焦げた部分は樹脂製ピンセットを使って丁寧に除去して、キムタオルで拭いた。肉間骨をアセトンに浸し脂肪分を除去した後、超純水で洗浄し、風乾した。

酸分解

樹脂製ピンセットを用いて肉間骨約 3 mg をテフロン製分解容器に量り取った。この際、静電気の影響が出ないように徐電した後、秤量した。肉間骨の入った分解容器に硝酸 5 ml と過酸化水素水 3 ml を添加し、マイクロ波分解装置 (MultiWave3000: Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) で分解した。分解は、220°C まで昇温 (40 分間) し、220°C を保持 (20 分間) の加熱プログラムで行った。分解容器を放冷後、ドラフト内で分解容器を開け、超純水で分解液を洗いこみながら 50 ml 容ポリプロピレン製の全量フラスコに移して定容し、試料溶液とした。全量フラスコにはあらかじめ、ICP-MS 用内標準としてベリリウム、スカンジウム、イットリウム、インジウムおよびビスマスを 10 µg/ml となるよう添加した。試料の分解工程はすべて 2 点併行で行った。

ICP-MS による元素濃度の測定

試料溶液中の元素濃度は、ICP-MS (Elan DRC II: Perkin Elmer) により内標準法で 13 元素 (Li, Ti, V, Mn, Ni, Co, Zn, Rb, Sr, Cd, Ba, Pb および U) の濃度を測定した。元素分析の内標準にはベリリウム (リチウム分析用)、スカンジウム (チタン、バナジウム、マンガン、ニッケルおよびコバルト分析用)、イットリウム (亜鉛、ルビジウムおよびストロンチウム分析用)、インジウム (カドミウムおよびバリウム分析用)、ビスマス (鉛およびウラン分析用) を用いた。測定の条件は Table 1-2 に示した。検量線および試料溶液の各元素の質量電荷比 (m/z) のプロフィールを得て、目的のイオンピークの形状を確認した。各元素の試料溶液濃度が検量線の範囲に含まれるように、0 濃度を含む 5 点の測定値を用いて検量線を作成した。測定時の検量線

の相関係数は、0.998 以上であり、直線性が良好なことを確認した。検出限界は、空試験値 8 点から標準偏差を算出し、3 倍した値を用いた。また、認証標準物質の耳石 (NIES CRM No.22) を分析し、正確に分析できていることを確認した (Table 1-3)。分析値は、試料中濃度に換算して表に記載した (Table 1-4)。

統計解析

統計処理および線形判別分析は、統計解析ソフト (R version 3.3.3; R Development Core Team, 2014) を用いた。測定した 13 元素の試料中濃度に対して Steel-Dwass 検定 (Steel, 1960) で多重比較を行い、3 群間 (日本産、中国産および台湾産) の平均値の差異を検定した (有意水準 5 %)。線形判別分析を行い、判別モデルを構成する元素の種類を選択した (Fisher, 1936)。Steel-Dwass 検定で有意差のあった元素の濃度を中心に、日本-中国、日本-台湾、中国-台湾および日本-中国・台湾判別モデルの 4 種類のモデルを構築した (Table 1-5)。その後、構築した判別モデルが的確かどうかを確認するため、Leave-one-out cross-validation (LOOCV) と未知試料の判別を行った (Table 1-6)。LOOCV は、モデル構築用試料から 1 試料のデータを除いてモデルを構築し、除いた 1 試料のデータについて判別を行い、これをデータの数だけ繰り返し、判別結果を合計した。モデル構築用試料で判別モデルを構築した後、判別モデルの構築とは別に用意したモデル検証用試料の元素濃度を、作成した 4 種類の判別モデルに代入し、うなぎ加工品の原料原産地を判別した。

結果

試料中濃度

原産国が異なるうなぎ加工品から採取した肉間骨中の元素濃度を Table 1-4 に示した。Steel-Dwass 検定によって日本産と中国産を比較すると、ストロンチウム、バリウム、鉛およびウランにおいて有意に差異が認められた。バリウムの平均値は、日本産 ($10 \pm 6.1 \mu\text{g/g}$) に比べ、中国産 ($22 \pm 15 \mu\text{g/g}$) とは 2.2 倍の差があり、鉛の平均値は、日本産 ($0.10 \pm 0.19 \mu\text{g/g}$) に比

べ、中国産 ($0.61 \pm 0.62 \mu\text{g/g}$) とは約 6 倍の差があった。日本産と台湾産を比較すると、バナジウム、コバルト、ストロンチウム、カドミウム、鉛およびウランにおいて有意に差異が認められた。鉛の平均値は、日本産に比べ、台湾産 ($0.46 \pm 0.28 \mu\text{g/g}$) とは 4.6 倍の差があり、ウランの平均値は、日本産 ($0.011 \pm 0.019 \mu\text{g/g}$) に比べ、台湾産 ($0.031 \pm 0.020 \mu\text{g/g}$) とは約 3 倍の差があった。中国産と台湾産を比較すると、バナジウムおよびコバルトにおいて有意に差異が認められた。バナジウムの平均値は、台湾産 ($0.16 \pm 0.12 \mu\text{g/g}$) に比べ、中国産 ($0.064 \pm 0.081 \mu\text{g/g}$) および日本産 ($0.069 \pm 0.086 \mu\text{g/g}$) とは 2 倍以上の差が認められた。

線形判別分析

日本-中国、日本-台湾、中国-台湾、日本-中国・台湾についての 4 種類の判別モデルを作成するため、線形判別分析を行った (Table 1-5)。

日本-中国判別モデル

日本-中国判別モデルは、ストロンチウム、バリウム、鉛およびウランの 4 種類の元素濃度から構築した。

$$Y_1 = -1.701 \times \text{Log}_{10}(\text{m}[\text{Sr}]) - 1.406 \times \text{Log}_{10}(\text{m}[\text{Ba}]) - 2.395 \times \text{Log}_{10}(\text{m}[\text{Pb}]) - 1.555 \times \text{Log}_{10}(\text{m}[\text{U}]) + 1.537$$

この判別式に試料の元素濃度、すなわちストロンチウム濃度 ([Sr])、バリウム濃度 ([Ba])、鉛濃度 ([Pb])、ウラン濃度 ([U]) を代入し、Y が 0 以上の場合は日本産、0 未満の場合は中国産と判別する。構築した判別式はモデル作成用試料の日本産うなぎ加工品 40 点中 33 点 (82.5 %) を正しく日本産と判別し、中国産うなぎ加工品 30 点中 28 点 (93.3 %) を正しく中国産と判別した (Table 1-5)。

日本-台湾判別モデル

日本-台湾判別モデルは、バナジウム、ニッケル、ストロンチウム、鉛およびウランの 5 種類

の元素濃度から構築した。

$$Y_2 = -2.272 \times \text{Log}_{10}(m[\text{V}]) + 2.979 \times \text{Log}_{10}(m[\text{Ni}]) - 1.322 \times \text{Log}_{10}(m[\text{Sr}]) - 2.758 \times \text{Log}_{10}(m[\text{Pb}]) \\ - 1.216 \times \text{Log}_{10}(m[\text{U}]) - 2.499$$

この判別式に試料の元素濃度，すなわちバナジウム濃度（[V]），ニッケル濃度（[Ni]），ストロンチウム濃度（[Sr]），鉛濃度（[Pb]），ウラン濃度（[U]）を代入し， Y_2 が0以上の場合は日本産，0未満の場合は台湾産と判別する。構築した判別式はモデル作成用試料の日本産うなぎ加工品40点中35点(87.5%)を正しく日本産と判別し，台湾産うなぎ加工品23点中20点(87.0%)を正しく台湾産と判別した（Table 1-5）。

中国-台湾判別モデル

中国-台湾判別モデルは，リチウムおよびバナジウムの2種類の元素濃度から構築した。

$$Y_3 = 3.215 \times \text{Log}_{10}(m[\text{Li}]) - 2.589 \times \text{Log}_{10}(m[\text{V}]) - 0.1171$$

この判別式に試料の元素濃度，すなわちリチウム濃度（[Li]），バナジウム濃度（[V]）を代入し， Y が0以上の場合は中国産，0未満の場合は台湾産と判別する。構築した判別式はモデル作成用試料の中国産うなぎ加工品30点中20点（66.7%）を正しく中国産と判別し，台湾産うなぎ加工品23点中18点（78.3%）を正しく台湾産と判別した（Table 1-5）。

日本-中国・台湾判別モデル

日本-台湾判別モデルは，ニッケル，ストロンチウム，鉛およびウランの4種類の元素濃度から構築した。

$$Y_4 = 2.012 \times \text{Log}_{10}(m[\text{Ni}]) - 2.894 \times \text{Log}_{10}(m[\text{Sr}]) - 2.480 \times \text{Log}_{10}(m[\text{Pb}]) - 1.693 \times \text{Log}_{10}(m[\text{U}]) + \\ 2.705$$

この判別式に試料の元素濃度，すなわちニッケル濃度（[Ni]），ストロンチウム濃度（[Sr]），鉛濃度（[Pb]），ウラン濃度（[U]）を代入し， Y が0以上の場合は日本産，0未満の場合は中国・台湾産と判別する。構築した判別式はモデル作成用試料の日本産うなぎ加工品40点中33点

(82.5 %) を正しく日本産と判別し、中国・台湾産うなぎ加工品 53 点中 50 点 (94.3 %) を正しく中国・台湾産と判別した (Table 1-5)。

Leave-one-out cross-validation (LOOCV, 一個抜き交差検証)

クロスバリデーションは、構築した 4 種類のモデルについて行った。1 試料の元素濃度のデータを除いて、残りの試料のデータで判別モデルを構築し、除かれた 1 つの試料の原産地を判別した。これを全試料について繰り返し、判別能力について確認した。構築した判別モデルとバリデーションの正答率を比較したところ、もっとも大きな差は日本-台湾判別モデルを用いて台湾産うなぎ加工品を判別した際であり、その差は 13.1 % であると見積もられた (Table 1-6)。

判別モデルによる未知試料の確認

未知試料は、モデル構築用に使用していない原産地が既知の試料を用いた。構築した判別式で未知試料の原料原産地を判別し、クロスバリデーションによる判別率と比較し、確認した。日本産および中国産各 13 点、台湾産 8 点の原料原産地の判別を行ったところ、その差は 5.4 ~ 26.1 % であった (Table 1-6)。構築した判別モデルの正答率と未知試料の判別率の最も大きな差は日本-台湾および中国-台湾判別モデルを用いて台湾産うなぎ加工品を判別した際であり、その差は 26.1 % であると見積もられた (Table 1-6)。

第3節 考察

うなぎ加工品に用いられるウナギ類の生物種は、以前は、日本産および台湾産がニホンウナギであり、中国産は、ヨーロッパウナギが多く使用されていたことから（出村, 2008; 出村, 2012）、ミトコンドリア DNA 分析によるニホンウナギとヨーロッパウナギの判別によって、中国産のヨーロッパウナギの原料原産地を判別することができた（Sezaki *et al.*, 2005）。2009 年以降ヨーロッパウナギは国際取引が規制されているが、本研究で用いた 2008～2009 年に入手した中国産うなぎ加工品では、43 点中 6 点がヨーロッパウナギを使用していることが分かった。また、ここ数年でニホンウナギやヨーロッパウナギ以外のアメリカウナギ *A. rostrata*, *A. bicolor*, オオウナギ *A. marmorata* の稚魚の養殖も中国で試みられている（曾・任, 2013）。日本でもニホンウナギのシラスウナギの漁獲量が少なくなり、ニホンウナギ以外の異種ウナギの稚魚を利用して業者が存在している（水産庁, 2016）。ただし、日本では 1970 年から 1980 年代にかけて、東南アジアや南アメリカの国々から、ウナギ養殖業者が様々な種を輸入し、養殖を試みたが、ニホンウナギ用に開発された技術の他の種への適用は、採算が取れるまでには至らなかったことから、これまではニホンウナギが主に養殖されていた（Ringuelet *et al.*, 2002）。このため、今後の状況次第ではあるが、DNA 分析によるウナギ類の種判別法は、原料原産地の判別に必要な技術である。無報告・違法漁業により調達されたシラスウナギを養殖に用いている問題（Nijman, 2015, 白石・クルーク, 2015, <http://dailynewshungary.com/customs-officials-seize-almost-200kg-of-eels-at-liszt-ferenc/>. Daily News Hungary. 4 月 27 日）については、DNA 分析が特に必要であると考えられる。

日本産、中国産および台湾産うなぎ加工品の肉間骨中の元素濃度をそれぞれ比較すると、バナジウム、コバルト、ストロンチウム、バリウム、鉛およびウランの濃度に有意な差が認められた（Table 1-4）。Yamashita *et al.* (2006) や服部ら (2009) が述べているように、これらの元素濃度の差は、飼料と育成環境によるものが考えられる。ニホンウナギの養殖用の配合飼料は魚粉、デンプン、魚油などを混合して作られている（渡邊, 1994）。また、ニホンウナギの育成のため配合飼料には亜鉛（50～100 mg/kg）、マンガン（10～20 mg/kg）、銅（5 mg/kg）およびコ

バルト ($5 > \text{mg/kg}$) がミネラル類として添加されている (佐藤, 2007)。日本産と台湾産の肉間骨におけるコバルト濃度は Steel-Dwass 検定で有意差が認められたが、コバルトは飼料に添加されており、飼料からの摂取量が肉間骨中の濃度に影響する可能性が考えられたことから、線形判別分析においてコバルトは除外して行った。一方、リチウム、バナジウム、ニッケル、ストロンチウム、バリウム、鉛およびウランは飼料に添加されていないと考えられるため、これら金属元素の肉間骨中の濃度には水環境または飼料中の元素濃度の差が影響したことが考えられる。日本産と台湾産との肉間骨中の元素濃度の比較では、ニッケルの濃度は Steel-Dwass 検定では有意な差が認められなかった ($p = 0.11$) が、日本産の約 7 割の製品で台湾産のニッケル濃度が平均値より高かったことから、モデル構築時の線形判別分析の結果から選択した。

本研究では、肉間骨中の鉛濃度の平均値について、日本産 ($0.10 \pm 0.19 \mu\text{g/g}$) は、中国産 ($0.61 \pm 0.62 \mu\text{g/g}$) および台湾産 ($0.46 \pm 0.28 \mu\text{g/g}$) とはそれぞれ 6.1 倍および 4.6 倍の差があり、判別に重要な指標になったと考えられる (Table 1-4)。中国と台湾の土壤中鉛濃度は、日本のそれより高い濃度であった (独立行政法人産業技術総合研究所地質調査総合センター, 2004; Xuejing, 1993)。Zhang *et al.* (1996) がアジア 10 カ国とその他の 7 カ国で採取したコメの鉛濃度の調査を行った結果、日本の平均値 5.06 ng/g に対し、中国では 22.17 ng/g 、台湾では 10.84 ng/g であった。日本のキャベツ中の鉛濃度を 2003 年および 2004 年に 30 点ずつ調査した結果、それぞれ定量限界 ($0.05, 0.03 \text{ mg/kg}$) 未満であった (農林水産省消費・安全局, 2006)。ウナギ養殖が盛んな中国福建省では、キャベツ中の鉛濃度は 50 点中 $0.009 \sim 2.20 \text{ mg/kg}$ であった (Huang, 2012)。また、農林水産省 (2006) による魚肉中の鉛濃度の調査によると、日本で調査された 20 魚種では、魚肉検体の鉛濃度が $<0.05 \sim 0.17 \text{ mg/kg}$ であった。中国の 38 魚種の調査では $<0.1 \sim 0.3 \text{ mg/kg}$ (Phillips *et al.*, 1982)、台湾の 3 魚種の調査では $0.30 \sim 0.49 \text{ mg/kg}$ であった (Liu and Cheng, 1990)。育成環境中の土壌や水の鉛濃度は、中国および台湾では日本国内よりも高かったため、養殖魚における肉間骨中の鉛濃度に差が生じたことが考えられた。ただし、業者や季節の違いにより使用する魚粉やデンプンの種類、添加する元素濃度によって、配合飼料中の含有元素量が異なるため (田中, 1995; 佐藤, 2007)、判別の際は注意が必要である。

本研究によって作成したうなぎ加工品の原産地推定のための日本-中国・台湾判別モデルでは、LOOCVを行った結果、日本産うなぎ加工品の原料原産地を日本と判別する確率は80.0%，中国・台湾産うなぎの加工品の原料原産地を中国と判別する確率は92.5%であった。日本産を正しく判別する確率は、中国産に比べ10%以上低かった。これは、誤判別した日本産試料は、バリウムと鉛濃度がやや高く、中国産の元素組成に似た値となったため、このような誤判別が生じたと考えられる。中国-台湾モデルはモデル構築用試料を正しく判別する確率がそれぞれ63.3%と73.9%であった。中国-台湾モデルはリチウムとバナジウム濃度を判別式に用いているが、日本産と外国産うなぎの鉛濃度の差のような大きな差が、中国産と台湾産うなぎのリチウムやバナジウムでは認められなかったため、判別率が低くなったと考えられる。

本研究では、原産地判別を行うためにDNA分析と元素分析を行った。今後、様々な生物種のウナギが養殖される可能性がある中で、DNA分析によるウナギ類の生物種の判別は、原料原産地判別や違法漁業を取り締まる上で、広く活用できる可能性がある。一方で、元素分析によるうなぎ加工品の肉間骨の元素分析法は、生息域の違いによる肉間骨中の元素濃度の差異に着目し、同種である日本産、中国産および台湾産ニホンウナギのうなぎ加工品についても判別が可能であった。DNA分析と元素分析による判別法は、輸入品の原料原産地推定法として、有効な判別法である。

第2章 アサリの実産地判別

背景

アサリ *Ruditapes philippinarum* は、淡水が流れ込む内湾の砂や泥の干潟に生息する、二枚貝綱マルスダレガイ目マルスダレガイ科に属し、日本では重要な貝類である（鳥羽, 2005）。アサリは、サハリン、千島列島、沿海州から朝鮮半島を経て中国大陸南部沿岸に至る海域に分布している（鳥羽, 2005; Chew, 1989）。現在のアサリの主な国内の生産地は、愛知、静岡、千葉および北海道である（農林水産省, 2016）。有明海は日本有数のアサリ産地であったが、福岡県では1983年に約6万2千トンの漁獲を記録した後、現在では数百トンで推移している。同様に、熊本県では1979年の約6万6千トンをピークにアサリの漁獲量は減少し、現在では数百トンで推移している。アサリ漁獲量減少の要因として、有明海・八代海総合調査評価委員会は、底質環境の変化やナルトビエイによる食害などを指摘しており、現在、その対策が求められている（環境省・有明海・八代海総合調査評価委員会, 2006）。東京湾（岡本, 2015）、伊勢湾（水野・丸山, 2009）等の地域でも漁獲量は減少しており（アサリ資源全国協議会企画会議、水産庁増殖推進部、独立行政法人水産総合研究センター, 2009）、1980年代前半の国内生産量は12万～16万トンであったが、2015年には1万4千トンとなっている（農林水産省, 2016）。このため、国内生産量だけでは日本の消費量を満たすことができないため、主に中国や韓国から年間約3万トンのアサリが輸入されている（財務省, 2015）。

国産アサリと外国産アサリとは価格差があり、また、日本の消費者は国産アサリを好むため、外国産アサリに国内産のアサリである旨を表示する産地偽装事件が続いている（千葉県, 2013; 熊本県, 2015）。アサリと同属の二枚貝は、ヨーロッパやアメリカにも分布し漁獲されているが、中国や韓国のアサリと日本のアサリの種は同一であり、貝の外観から産地を判別することは困難である（Chew, 1990）。アサリは活かした状態で流通することが多いため、出荷調整により外国産のアサリを国内の干潟に撒いて、数週間蓄養することで産地を分かりにくくし、偽装する方法も行われた（読売新聞, 2005）。国内産のアサリは、生産者から、主に漁業協同組合（漁協）や漁業協同組合連合会（漁連）を通じて、消費地の市場に卸され、卸売業者から仲卸業者を経

て、小売店で販売される。また、漁協へ出荷しないものは、輸入アサリと同様に産地仲卸業者を通じて直接小売店へ流通する（真木ら, 1997）。

アサリは、DNA 分析によって中国・韓国西岸地域系群と日本・韓国南岸地域系群とを判別する技術が開発されている（浜口・佐々木, 2006; 浜口, 2007）。ミトコンドリア DNA の部分配列が生息地域により違うことを利用した PCR-RFLP 法による手法であるが、日本産と韓国産アサリとを判別できない。このため、対象国を拡大した外国産と国内産とを判別する技術開発が必要であることから、硬組織である貝殻に経年蓄積した多種類の元素を分析する判別方法を検討した。筋肉など軟体部組織は、出荷調整のために水槽や砂浜などで蓄養されている期間に、代謝されて元素濃度が変化する可能性が考えられることから、多元素を蓄積する貝殻を研究材料に用いた。日本産と中国産および韓国産のアサリを分析することによって、原産国を判別した。

試料および方法

供試料

試料用の活貝は、2002 年、2005 年～2008 年に漁協、卸売業者および商社等から日本産 156 点、中国産 56 点および韓国産 60 点を入手した。試料は、モデル構築用に日本産 135 点、中国産 46 点および韓国産 50 点を用いた。モデル検証用に日本産 21 点、中国産 10 点および韓国産 10 点を用いた（Table 2-1）。

試薬

試料用貝殻粉末の湿式分解には、硝酸（61 %高純度電子工業用、関東化学）および過酸化水素水（35 %超高純度分析用、多摩化学工業）を用いた。ICP-MS による測定用の検量線作成には、単元素標準溶液（Merck KGaA, Darmstadt, Germany）を超純水で希釈して、混合標準溶液を作製し、適宜希釈して調整した。このとき、各標準溶液の硝酸濃度は試料溶液と同濃度になるように希釈した（標準溶液 50 mL 中に硝酸 5 mL が含まれる）。試料および試薬の調製には、超純水製造装置（Milli-Q Element A10）により製造された超純水（ $>18\text{M}\Omega\text{cm}$ ）を用いた。

器具

器具は、第 1 章に記載した器具を使用した。

試料の調製

20%の硝酸で洗浄したポリプロピレン製チューブにジルコニアコーンと貝殻を入れ，マルチビーズショッカー（MB400U: 安井器械，大阪）を用いて 2500 rpm で 20 秒間振とうし，粉碎した。

酸分解

粉碎した貝殻約 50 mg を秤量し，テフロン製分解容器に入れて，硝酸 5 ml と過酸化水素水 3 ml を添加し，マイクロ波分解装置（MultiWave3000, Perkin Elmer）を用いて分解した。試料の分解条件は，第 1 章に記載した。分解容器を放冷後，ドラフト内で分解容器を開封し，分解液を 50 ml 容ポリプロピレン製全量フラスコに超純水で洗いこみながら移して定容し，試料溶液として用いた。全量フラスコにはあらかじめ，ICP-MS 用内標準としてベリリウム，スカンジウム，イットリウム，インジウムおよびビスマスを 10 µg/ml となるよう添加した。試料の分解はすべて 2 点併行で行った。

測定

試料溶液中の元素濃度は，ICP-MS（Elan DRC II）により内標準法で 11 元素（Li, V, Mn, Co, As, Rb, Mo, Cd, Ba, Pb および U）を測定した（Table 2-2）。測定の条件は Table 1-2 に示した。元素分析の内標準にはベリリウム（リチウム分析用），スカンジウム（バナジウム，マンガン，ニッケルおよびコバルト分析用），イットリウム（亜鉛，ルビジウムおよびストロンチウム分析用），インジウム（カドミウムおよびバリウム分析用），ビスマス（鉛およびウラン分析用）を用いた。検量線は，各元素の試料溶液濃度が検量線の範囲に含まれるように，0 濃度を含む 5 点の測定値を用いて検量線を作成した。測定時の検量線の相関係数は 0.998 以上であ

り、直線性が良好なことを確認してから試料溶液を測定した。検出限界は空試験値 8 点から算出した標準偏差を 3 倍した値を用いた。試料中濃度の検出限界を算出した。元素濃度は、2 点併行で行った分析結果を平均して示した (Table 2-2)。

添加回収試験は、測定対象の元素を試料中濃度に対して定量限界の約 2 倍の濃度を秤量後の粉碎試料に添加して分析した。この添加回収試験の結果は 84~103 %であり、アサリの殻の元素濃度の分析が堅牢であることを確認した。

統計解析

統計処理および線形判別分析には、統計解析ソフト (R version 3.3.3) を用いた。判別分析は、3 群間 (日本産、中国産および韓国産) の平均値の差異を Steel-Dwass 検定 (Steel, 1960) で検定した (有意水準 5%)。日本-中国、日本-韓国、中国-韓国および日本-中国・韓国の 4 種類の判別モデルを構築するため、線形判別分析 (Fisher, 1936) を行った (Table 2-3)。その後、構築した判別モデルが的確かどうかを確認するため、LOOCV と未知試料の原産地の判別を行った (Table 2-4)。LOOCV は、モデル構築用試料から 1 試料のデータを除いてモデルを構築し、除いた 1 試料のデータについて判別を行い、これをデータの数だけ繰り返し、合計した。未知試料の判別では、判別モデルの構築とは別に用意したモデル検証用試料の元素濃度を、作成した判別モデルに代入し、アサリの原産地を判別した。

結果

試料中濃度

日本産アサリ 135 点、中国産アサリ 46 点、韓国産アサリ 50 点の貝殻を研究試料として用いて 11 種類の元素濃度を ICP-MS で測定した。アサリ貝殻の元素濃度の平均値と標準偏差を Table 2-2 に示す。カドミウムはほとんどの試料で検出限界未満であった。各試料の元素濃度から原産国を推定するための判別モデルを作成した。

Steel-Dwass 検定によって 3 産地のアサリの元素濃度を比較したところ、日本産と中国産の比

較結果では、9 元素 (Li, V, Mn, As, Rb, Mo, Ba, Pb および U) に差異が認められた。日本産と韓国産とを比較した結果、10 元素すべて (Li, V, Mn, Co, As, Rb, Mo, Ba, Pb および U) の濃度に差異が認められた。中国産と韓国産とを比較すると、コバルト、ルビジウム、モリブデン、バリウムおよび鉛の濃度において、差異が認められた。日本産に特徴的な元素として、マンガン、ヒ素、ルビジウム、バリウムおよび鉛の 5 元素が得られ、その元素濃度は、韓国産および中国産の組成と異なっていた。日本産の鉛濃度 ($0.09 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$) は韓国産 ($0.36 \pm 0.09 \mu\text{g/g}$) の約 1/4 であり、中国産 ($0.22 \pm 0.60 \mu\text{g/g}$) の約 1/2 であった。また、日本産のマンガン、ヒ素、ルビジウムおよびバリウムの元素濃度 (Mn: $13 \pm 9.8 \mu\text{g/g}$, As: $0.18 \pm 0.19 \mu\text{g/g}$, Rb: $0.06 \pm 0.06 \mu\text{g/g}$, Ba: $3.6 \pm 3.4 \mu\text{g/g}$) は、中国産 (Mn: $22 \pm 6.6 \mu\text{g/g}$, As: $0.38 \pm 0.19 \mu\text{g/g}$, Rb: $0.13 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$, Ba: $9.0 \pm 1.7 \mu\text{g/g}$) および韓国産 (Mn: $28 \pm 13 \mu\text{g/g}$, As: $0.40 \pm 0.13 \mu\text{g/g}$, Rb: $0.19 \pm 0.06 \mu\text{g/g}$, Ba: $6.2 \pm 1.9 \mu\text{g/g}$) の元素濃度の半分程度であった。

線形判別分析

線形判別分析によって日本-中国、日本-韓国、中国-韓国および日本-中国・韓国の 4 種類の原産国を推定する判別モデルを構築した (Table 2-3)。

日本-中国判別モデル

日本-中国判別モデルは、リチウム、バナジウム、マンガン、コバルト、ヒ素、バリウムおよび鉛の 7 種類の元素の濃度から構築した。

$$Y_I = -1.864 \times \log_{10}(m[\text{Li}]) + 1.964 \times \log_{10}(m[\text{V}]) - 2.055 \times \log_{10}(m[\text{Mn}]) + 1.868 \times \log_{10}(m[\text{Co}]) - 2.859 \times \log_{10}(m[\text{As}]) - 4.066 \times \log_{10}(m[\text{Ba}]) - 2.017 \times \log_{10}(m[\text{Pb}]) + 3.930$$

この判別式に試料の元素濃度、すなわちリチウム濃度 ([Li])、バナジウム濃度 ([V])、マンガン濃度 ([Mn])、コバルト濃度 ([Co])、ヒ素濃度 ([As])、バリウム濃度 ([Ba]) および鉛濃度 ([Pb]) を代入し、 Y_I が 0 以上の場合は日本産、0 未満の場合は中国産と判別した。構築した判別式はモデル作成用試料の日本産アサリ 135 点中 131 点 (97.0 %) を正しく日本産と判別

し、中国産アサリ 46 点中 44 点 (95.7 %) を正しく中国産と判別した (Table 2-3)。

日本-韓国判別モデル

日本-韓国判別モデルは、リチウム、バナジウム、マンガン、コバルト、ルビジウム、バリウムおよび鉛の 7 種類の元素濃度から構築した。

$$Y_2 = -1.486 \times \log_{10}(m[\text{Li}]) + 0.1836 \times \log_{10}(m[\text{V}]) - 1.062 \times \log_{10}(m[\text{Mn}]) + 3.093 \times \log_{10}(m[\text{Co}]) - 2.838 \times \log_{10}(m[\text{Rb}]) - 1.676 \times \log_{10}(m[\text{Ba}]) - 2.928 \times \log_{10}(m[\text{Pb}]) - 1.925$$

この判別式に試料の元素濃度、すなわちリチウム濃度 ([Li])、バナジウム ([V])、マンガン濃度 ([Mn])、コバルト濃度 ([Co])、ルビジウム濃度 ([Rb])、バリウム濃度 ([Ba]) および鉛濃度 ([Pb]) を代入し、 Y_2 が 0 以上の場合は日本産、0 未満の場合は韓国産と判別する。構築した判別式はモデル作成用試料の日本産アサリ 135 点中 132 点 (97.8 %) を正しく日本産と判別し、韓国産アサリ 50 点中 50 点 (100 %) を正しく韓国産と判別した (Table 2-3)。

中国-韓国判別モデル

中国-韓国判別モデルは、ルビジウム、バリウムおよび鉛の 3 種類の元素濃度から構築した。

$$Y_3 = -3.065 \times \log_{10}(m[\text{Rb}]) + 5.908 \times \log_{10}(m[\text{Ba}]) - 2.052 \times \log_{10}(m[\text{Pb}]) - 8.824$$

この判別式に試料の元素濃度、すなわちルビジウム濃度 ([Rb])、バリウム濃度 ([Ba]) および鉛濃度 ([Pb]) を代入し、 Y_3 が 0 以上の場合は中国産、0 未満の場合は韓国産と判別する。構築した判別式はモデル作成用試料の中国産アサリ 46 点中 43 点 (93.5 %) を正しく中国産と判別し、韓国産アサリ 50 点中 39 点 (78.0 %) を正しく韓国産と判別した (Table 2-3)。

日本-中国・韓国判別モデル

日本-中国・韓国判別モデルは、リチウム、バナジウム、マンガン、ヒ素、ルビジウム、バリウムおよび鉛の 7 種類の元素濃度から構築した。

$$Y_4 = -1.253 \times \log_{10}(m[\text{Li}]) + 1.614 \times \log_{10}(m[\text{V}]) - 1.286 \times \log_{10}(m[\text{Mn}]) - 1.844 \times$$

$$\log_{10}(m[\text{As}]) - 2.229 \times \log_{10}(m[\text{Rb}]) - 2.668 \times \log_{10}(m[\text{Ba}]) - 2.334 \times \log_{10}(m[\text{Pb}]) - 0.7659$$

この判別式に試料の元素濃度，すなわちリチウム濃度（[Li]），バナジウム（[V]），マンガン濃度（[Mn]），ヒ素濃度（[As]），ルビジウム濃度（[Rb]），バリウム濃度（[Ba]）および鉛濃度（[Pb]）を代入し， Y_4 が 0 以上の場合は日本産，0 未満の場合は中国・韓国産と判別する。構築した判別式はモデル作成用試料の日本産アサリ 135 点中 129 点（95.6 %）を正しく日本産と判別し，中国および韓国産アサリ 96 点中 94 点（97.9 %）を正しく中国・韓国産と判別した（Table 2-3）。

クロスバリデーション

クロスバリデーションとして，4 種類の構築したモデルについて LOOCV を行った（Table 2-4）。1 試料の元素濃度のデータ除いて，残りの試料の元素濃度のデータで判別モデルを構築し，除かれた 1 つの試料の原産国を判別した。これを全試料について繰り返し，判別能力について確認した。構築した判別モデルとバリデーションの正答率を比較したところ，もっとも大きな差は日本-韓国判別モデルを用いて中国産アサリを判別した際の 6.6 %であると見積もられた（Table 2-4）。

判別モデルによる未知試料の確認

未知試料は，モデル構築用に使用していない原産地が既知の試料を用いた。構築した判別式で未知試料を判別し，クロスバリデーションによる判別率と比較し，確認した（Table 2-4）。日本産 21 点，中国産および韓国産各 10 点の未知試料の判別を行い，比較したところ，その差は 0～12.0 %であった。構築した判別モデルの正答率と未知試料の判別率の最も大きな差は中国-韓国判別モデルを用いて韓国産アサリを判別した際での 12.0 %であると見積もられた。

考察

日本産、中国産および韓国産アサリの貝殻中の 11 元素 (Li, V, Mn, Co, As, Rb, Mo, Cd, Ba, Pb, U) を測定し、各国のアサリを判別する技術を開発した。日本産と中国産および韓国産のアサリ貝殻の元素濃度を比較すると測定対象に用いた元素の多くで、有意な差が認められており、その中から判別に有用な元素が線形判別法で選択された。

日本-中国判別モデルでは、日本産アサリの原産地を日本と判別する確率は 97.0%，中国産アサリの原産地を中国と判別する確率は 95.7% であった (Table 2-4)。このモデルでは、リチウム、バナジウム、マンガン、コバルト、ヒ素、バリウムおよび鉛が選択されたが、特にヒ素、バリウムおよび鉛が、原産国を推定するための重要なマーカーとなった。ヒ素濃度の平均値は、日本産 ($0.18 \pm 0.19 \mu\text{g/g}$) に対して中国産 ($0.38 \pm 0.19 \mu\text{g/g}$) は 2.1 倍、バリウム濃度の平均値は、日本産 ($3.6 \pm 3.4 \mu\text{g/g}$) に対して中国産 ($9.0 \pm 1.7 \mu\text{g/g}$) は 2.5 倍、鉛濃度の平均値は、日本産 ($0.09 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$) に対して中国産 ($0.22 \pm 0.60 \mu\text{g/g}$) は 2.4 倍であり、日本産と中国産の元素濃度に差があったため、判別可能であった (Table 2-2)。また、アサリの殻中のバリウムおよび鉛の 2 元素の濃度は、うなぎ加工品の肉間骨中の元素濃度を原産国間で比較した際と同様に、日本産と比べて中国産で高かった。うなぎ加工品の肉間骨中のバリウム濃度は、中国産 ($22 \pm 15 \mu\text{g/g}$) は日本産 ($10 \pm 6.1 \mu\text{g/g}$) の 2.2 倍であり、鉛濃度は、中国産 ($0.61 \pm 0.62 \mu\text{g/g}$) は日本産 ($0.10 \pm 0.19 \mu\text{g/g}$) の 6.1 倍であった。

日本-韓国判別モデルでは、日本産アサリの原産地を日本と判別する確率は 96.3 %，韓国産アサリの原産地を韓国と判別する確率は 100 % であった (Table 2-4)。このモデルでは、リチウム、バナジウム、マンガン、コバルト、ルビジウム、バリウムおよび鉛が選択されたが、特にマンガン、ルビジウムおよび鉛が原産国を判別するための重要なマーカーとなった。アサリ貝殻中のマンガン濃度の平均値は、日本産 ($13 \pm 9.8 \mu\text{g/g}$) に対して、韓国産 ($28 \pm 13 \mu\text{g/g}$) は 2.2 倍、ルビジウムの平均値は日本産 ($0.06 \pm 0.06 \mu\text{g/g}$) に対して、韓国産 ($0.19 \pm 0.06 \mu\text{g/g}$) は 3.2 倍、鉛の平均値は日本産 ($0.09 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$) に対して、韓国産 ($0.36 \pm 0.09 \mu\text{g/g}$) は 4 倍

であった (Table 2-2)。このように、日本産と韓国産のアサリ貝殻の元素濃度に大きな差があったため、高い判別率で判別することが可能であった。

日本-中国・韓国判別モデルでは、日本と中国および韓国産のアサリ貝殻中元素で特徴的であった上述のバリウム、ヒ素、マンガン、ルビジウムおよび鉛が選択された。日本産アサリの原産地を日本と判別する確率は 95.6%，中国・韓国産アサリの原産地を中国・韓国と判別する確率は 95.8 % であり、日本と中国および韓国産ともに 95% 以上の確率で判別が可能であった (Table 2-4)。

一方、中国-韓国判別モデルでは、中国産アサリの原産国を中国であると判別する確率は 93.5 %，韓国産アサリの原産国を韓国であると判別する確率は 78.0% であった (Table 2-4)。このモデルでは、リチウム、ルビジウム、バリウムおよび鉛が判別モデルの対象となる元素に選択されたが、中国産と韓国産との間で元素濃度に大きな差がなかったため (Table 2-2)，判別率が比較的低くなったと考えられる。

二枚貝の筋肉組織における元素濃度は水環境の元素濃度に影響されていると考えられる。Kraak *et al.* (1994) は、*Dreissena polymorpha* の短期間の元素濃縮について報告している。水槽に亜鉛 [9 (コントロール)~10000 µg/l]，カドミウム [<0.2~5000 µg/l] および銅 [3 (コントロール)~1000 µg/l] について濃度段階を変えて添加し、*D. polymorpha* を飼育したところ、添加した元素濃度が増えると、筋肉組織中の元素濃度は増加した。Angelo *et al.* (2007) らは鉱山の影響のある川で、貝類におけるカドミウム、鉛および亜鉛の蓄積に関して調査した。底質土のカドミウム、鉛および亜鉛の濃度はシジミとイガイの筋肉組織中の濃度と相関が認められた。本研究では、中国産アサリの貝殻における鉛濃度は日本産アサリより高かった。この傾向は、両産地の土壌や底質土の鉛濃度の違い (産業技術総合研究所, 2004; Xuejing, 1993; Wang, 2010) が関係しているのかもしれない。このように、地理的起源の判別に役立つアサリの殻中の特定の元素は、海の底質土や周囲の海水に由来することが考えられた。

これまでのアサリの産地判別の研究で、浜口 (2007) は日本、中国および韓国のアサリについて、ミトコンドリア DNA を対象にした判別法を開発している。この方法では PCR-RFLP に

よって中国・韓国西岸地域系群と日本・韓国南岸地域系群に判別可能である。このため、中国・韓国西岸地域で漁獲されたアサリが輸入された場合、日本産か外国産かをこの DNA 分析法で判別することができるが、韓国南岸地域で漁獲されたアサリが日本に輸入された場合、日本産か韓国産であるかをこの DNA 分析法で判別することができない。一方、本研究によって開発したアサリ貝殻の元素判別法では、DNA 分析で同じ系群に分類される韓国南岸産と日本産アサリの原産地を判別することができる。アサリの貝殻の元素判別法は、生育環境の元素組成の差異を利用し、中国産および韓国産の外国産アサリと日本産アサリとを判別するための検査法として、有用である。

第3章 シジミ類の原産地判別

背景

シジミ類は *Corbicula* 科に属する二枚貝である。我が国の水産業において重要な貝類の 1 つであり、淡水または汽水域に生息している（中村ら, 2000）。シジミ類の国内の主な生産地は、宍道湖（島根県）、小川原湖、十三湖（青森県）、涸沼（茨城県）、木曾川、揖斐川（三重県）、網走湖、天塩川（北海道）である（農林水産省, 2016）。八郎潟、利根川、長良川などでは、河口堰ができる前、1970 年代には約 5 万トンの生産量があった（中村ら, 2000）。しかしながら、シジミ類が生息する汽水域の埋め立てや砂防ダム建設による生育場所の減少、乱獲による個体数の減少などによって、近年、シジミ類の漁獲量は徐々に減ってきており、2015 年にはシジミ類の漁獲量は年間 9800 トンに減少した（農林水産省, 2016）。国内生産量だけでは日本国内の消費量を満たすことができないため、2400 トンのシジミ類がロシア、台湾、韓国などから輸入されている（財務省, 2014）。輸入割合は、ロシアが 85%、台湾が 12%、韓国が 3% を占めている。

国内産シジミ類と外国産シジミ類とでは価格差があり、日本国内の消費者は外国産よりも国内産を志向する傾向にある。業者は産地偽装することによって大きな利益が得られることから、産地偽装事件が発生している（茨城県, 2015; 農林水産省, 2013）。シジミ類はアサリと同じく生きたまま流通することが多く、出荷調整および砂抜きのため数週間水槽で飼育することから産地が分かりにくくなる。日本産のシジミは、生産者から、主に漁協や漁連等を通じて、消費地市場に流通し、卸売業者から仲卸業者を経て、小売店で販売される（真木ら, 1997）。また、生産者が漁協へ出荷しないものは、輸入されるシジミ類と同様に仲卸業者を通じて直接小売店へ流通する。日本には、汽水域に生息しているヤマトシジミ *Corbicula japonica* と淡水域に生息しているマシジミ *C. leana*、セタシジミ *C. sandai* およびタイワンシジミ *C. fluminea* の 4 種類のシジミが生息している（真木ら, 1997; 古丸ら, 2010; 山田ら, 2010; 飯田ら, 2012）。現在、日本国内で食用として流通しているシジミ類のほとんどがヤマトシジミであり、黒色でやや非対称、雌雄異体の 3 倍体の二枚貝である。10 年ほど前までは輸入量の 7 割を占めていた中国産の淡水

シジミ類は、*C. largillierii* といわれ、雌雄同体で貝殻が褐色でバチ型あるため、外観から産地を判別することが可能である。しかし、最近では、輸入シジミ類の約 8 割がロシア産であり、ロシア産シジミ類は、ヤマトシジミであると考えられるため、日本産のヤマトシジミの外見と類似しており、形態観察から生物種を判別することができない（中村ら, 2000）。そこで、本研究は、DNA 分析と元素分析により外国産シジミ類の原産地判別法を開発した。中国産および韓国産のシジミ類は日本産のシジミ類と種または遺伝子の集団構造が異なるとの研究成果が報告されているが（古丸ら, 2006; 古丸ら, 2010; 山田ら, 2010; 飯田ら, 2012; 農林水産研究開発レポート: http://www.affrc.maff.go.jp/docs/report/report16/no16_p2.htm, 農林水産省, 2017 年 11 月 30 日), 最も輸入量の多いロシア産シジミの解析はほとんど行われていない。そこで、ミトコンドリア DNA の一部領域の塩基配列を決定し、地域特異的な一塩基多型 (SNPs) を探索し、ロシア産、韓国産および中国産シジミ類を検出する PCR-RFLP 法を開発した。元素分析においては、外国産のうなぎ加工品およびアサリの原料原産地の判別に用いた元素分析をシジミ類の原産地判別法に応用した。日本産、ロシア産、中国産および韓国産のシジミ類の貝殻における多数の元素濃度を測定し、シジミ類の輸入量の 8 割以上を占めるロシア産シジミ類が主な外国産であることに着目することによって、原産地を推定する判別法を開発した。

第1節 DNA 分析によるシジミ類の原産地判別

DNA 分析による原産地判別法は、マグロ属、アジ属、サバ属魚類およびアサリにおいて実用化されている (Chaw *et al.*, 1993, 2003; Takashima *et al.*, 2006; 農林水産消費技術センター, 水産総合研究センター, 2007; 浜口, 2007)。これらの判別法は、ミトコンドリア DNA の塩基配列を比較し、遺伝子の一部を増幅させ、制限酵素処理することにより、日本近海に生息する魚種と生息しない魚種とを判別し、産地判別を行う技術である。同様に、日本産、ロシア産および中国産のシジミ類について、ミトコンドリア DNA の一部塩基配列を決定し、産地判別法の開発を行った。

試料および方法

供試料

試料のシジミ類は 2009 年～2011 年の間に漁協、卸売業者、商社から購入した。日本各地からヤマトシジミ 260 点、セタシジミ 18 点、ロシアからヤマトシジミと考えられるシジミ 105 点および中国から *C. largillierti* 21 点のシジミ類を入手した (Table 3-1)。

方法

DNA 抽出には、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いた。試料の貝柱を 10～50 mg 採取し、抽出操作は製品プロトコールに従って実施した。

ミトコンドリア DNA の塩基配列の決定は、プライマー・ウォーキング法により行った。PCR 反応溶液の組成は、約 50 ng のサンプル DNA, 2.5 mM の dNTP mixture を 1.6 μ l, 10 \times ExTaq buffer を 2 μ l, 各プライマー (5 μ M) を 1 μ l, ExTaq® (Takara Bio) を 0.5 ユニットに滅菌水を加え、総容量 20 μ l に調製した。PCR 反応は、予備変性 94 $^{\circ}$ C で 2 分間に続き、変性 94 $^{\circ}$ C で 20 秒間、アニーリング 50～60 $^{\circ}$ C で 20 秒間、伸長反応 72 $^{\circ}$ C で 1 分間を 30～45 サイクル行い、72 $^{\circ}$ C 5 分の伸長反応で終了した。

シーケンス反応は、PCR 産物をエタノール沈殿により濃縮し、BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Ready Reaction Kit (Thermo Fisher) 添付のプロトコールに従って、各プライマーを用いて H 鎖および L 鎖の塩基配列を 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher) によって決定した (Sanger et al., 1977)。試料の塩基配列はタイワンハマグリ (NC013188; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/256985392/>, National Center for Biotechnology Information, 2017 年 11 月 30 日) およびアサリ (AB065375; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AB_065375, National Center for Biotechnology Information, 2017 年 11 月 30 日) との比較によって遺伝子コード領域を同定した。

日本産とロシア産のヤマトシジミ、セタシジミおよび *C. largillierti* のミトコンドリア DNA の塩基配列に対する制限酵素地図は、NEB cutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>, New England Biolabs, 2017 年 11 月 30 日) を用いた。

PCR

PCR-RFLP 法に適用可能な種間および産地間での変異の頻度が高いミトコンドリア DNA 塩基配列として ND5 (NADH dehydrogenase 5) 遺伝子領域を選定し、プライマーを設計し、部分領域を PCR 法により増幅した。設計したプライマーは、5' プライマーとして CorbND5F : GCTGGKTTAAGGGCWATTTTAGAR GT および 3' プライマーとして CorbND5R : TAACACCGGCTACCTTAGTATGR CTCTGA である。PCR 反応溶液の組成は、約 50 ng のサンプル DNA, 2.5 mM の dNTP mixture を 1.6 μ l, 10 \times ExTaq buffer を 2.0 μ l, 各プライマー (5 μ M) を 1 μ l, Ex Taq® polymerase (Takara Bio) を 0.5 ユニットに滅菌水を加え、総容量 20 μ l に調製した。PCR 反応は、予備変性 94 °C で 1 分間に続き、変性 94 °C で 30 秒間、アニーリング 58 °C で 30 秒間、伸長反応 72 °C で 1 分間を 35 サイクル行い、72 °C で 7 分間の伸長反応で終了した。

制限酵素処理

制限酵素は、MfeI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) を用い、PCR 産物を制限酵素処

理した後、3.0%アガロースゲルを用いて電気泳動法で分析した。

結果

ミトコンドリア DNA の Cytochrome c oxidase I (COI) から 12S ribosomal DNA (12S rDNA) 遺伝子に挟まれた領域約 12000 bp の塩基配列を決定したが、途中シーケンサーの波形が読めない箇所があった。各産地数試料ずつシーケンスを行い、産地判別で有効となる配列を探し、産地判別につながる配列が ND5 遺伝子で見つかった。

そこで、ND5 遺伝子部分領域を PCR 増幅できるプライマーを設計し、各試料について PCR の後、アガロースゲル電気泳動で分離し、DNA バンドを確認したところ、決定した塩基配列と同様の 889 bp であった。これらの PCR 産物を MfeI によって処理した結果、ヤマトシジミの日本型では、64, 175, 650 bp に切断され、ヤマトシジミのロシア型では 239, 650 bp に切断された。セタシジミは 279, 610 bp, *C. largillierti* は切断されなかった。日本産のヤマトシジミ 260 点は 258 点がヤマトシジミ日本型に、2 点がヤマトシジミロシア型に判別された (Table 3-2)。ロシア産のヤマトシジミ 105 点は 57 点がヤマトシジミ日本型に 45 点がヤマトシジミロシア型に判別された。日本産のセタシジミ 18 点はすべてセタシジミ型に判別された。中国産の *C. largillierti* 21 点は、1 点がその他の型に 20 点が *C. largillierti* 型に判別された。

第2節 元素分析によるシジミ類の原産地判別

日本，ロシア，中国および韓国産のシジミ類の貝殻の元素濃度を測定し，シジミ類の原産国ごとに差異のある元素を調査した。測定した元素濃度を基に，日本産のシジミ類とロシア産シジミ類とを判別するための判別法を開発した。

試料および方法

供試料

試料は第1節に記載したものの中から，日本産 214 点，ロシア産 97 点および中国産 15 点を用い，韓国産 20 点を加え用いた。日本の琵琶湖産（5 点）および中国産は，淡水域で生産されたシジミ類であり，それ以外の地域で生産されたシジミ類は，汽水域または生育環境が不明の水域で漁獲されたシジミ類を試料として用いた（Table 3-3）。日本-ロシア判別モデルを構築するにあたり，判別モデル構築のため，日本産 183 点およびロシア産 77 点を元素分析に用いた。構築した判別モデルの検証用として日本産 31 点およびロシア産 20 点を用いた。

試薬

試薬は，2 章に記載した試薬を用いた。

器具

器具は，2 章に記載した器具を用いた。

試料の調製

試料の調製方法は，2 章に記載した方法で行った。

貝殻の酸分解

分解方法は、2章に記載した方法で行った。全量フラスコにはあらかじめ、ICP-MS 用内標準としてベリリウム，スカンジウム，インジウムおよびビスマスを終濃度 10 µg/ml となるように添加した。試料の分解は 2 点併行で行った。

測定

試料溶液中の元素濃度は、ICP-MS (Agilent 7500cx: Thermo Scientific) を用いて内標準法で 13 元素 (Li, Mg, V, Mn, Co, As, Rb, Mo, Cd, Ba, Ce, Pb, U) を測定した。ICP-OES (iCAP 6300 Duo: Thermo Scientific) を用いて検量線法で 2 元素 (Sr, Ca) の濃度を測定した (Table 3-4)。測定の条件は Table 1-2 に示した。元素分析の内標準には、ベリリウム (リチウムおよびマンガン分析用)，スカンジウム (バナジウム，マンガンおよびコバルト分析用)，インジウム (ヒ素，ルビジウム，モリブデン，カドミウム，バリウムおよびセリウムの分析用)，ビスマス (鉛およびウランの分析用) を用いた。ICP-MS および ICP-OES の分析に用いる検量線は、各元素の試料溶液濃度が含まれるように、0 濃度を含む 5 点からなる濃度範囲で作成した。測定時の検量線の相関係数が 0.998 以上あり、直線性が良好なことを確認してから試料溶液を測定した。検出限界は空試験値 8 点の標準偏差の 3 倍の値を算出し、試料中濃度の検出限界に換算して記載した (Table 3-4)。元素濃度は重量換算によって示した。2 点併行で行った分析結果を平均し、試料中濃度を算出した。

添加回収試験は、測定対象の元素について、試料中の濃度範囲から算出した定量限界の 2 倍程度の濃度を計量後の粉砕試料に添加して分析した。15 元素の添加回収試験の結果は 92.2～117.9 % であり、シジミ類の貝殻の元素濃度の分析法の堅牢性を確認した。

統計解析

統計処理および線形判別分析は、統計解析ソフト (R version 3.3.3) を用いた。日本産 183 点，ロシア産 77 点，中国産 15 点および韓国産 20 点の 4 群間の平均値について，Steel-Dwass 検定 (Steel, 1960) によって多重比較を行った (Table 3-4)。さらに，日本-ロシア判別モデルを構築

するために、線形判別分析 (Fisher, 1936) を行った (Table 3-5)。その後、構築した判別モデルが的確かどうかを確認するため、LOOCV と未知試料の判別を行った (Table 3-6)。未知試料の判別では、判別モデルの構築とは別に用意したモデル検証用試料の元素濃度を、作成した判別モデルに代入し、シジミの原産地を判別した。

結果

シジミ類の貝殻の元素濃度

日本産 183 点, ロシア産 77 点, 中国産 15 点および韓国産 20 点のシジミ類の 15 元素 (Li, Mg, V, Mn, Co, As, Rb, Mo, Cd, Ba, Ce, Pb, U, Sr, Ca) について分析を行い、元素濃度を比較した。モリブデン、カドミウムおよびウランは、ほぼすべてのシジミ類の貝殻で検出限界未満であった。日本国内の 13 地域の湖および河川のシジミ類の貝殻の元素濃度の平均値を比較した結果、特徴的な元素組成を見出した。琵琶湖産のリチウム濃度の平均値 ($0.02 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$) は日本産全体の平均値 ($0.12 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$) の 6 分の 1 倍であったが、江戸川産 ($0.39 \pm 0.13 \mu\text{g/g}$) は日本産全体の 3 倍以上の濃度であった。多摩川産のマンガン濃度の平均値 ($2.9 \pm 2.3 \mu\text{g/g}$) は日本産全体の平均値 ($66 \pm 70 \mu\text{g/g}$) の 5 % 程度であったが、宍道湖産 ($134 \pm 100 \mu\text{g/g}$) は日本産全体の 2 倍程度であった。琵琶湖産のストロンチウム濃度の平均値 ($353 \pm 33 \mu\text{g/g}$) は日本産全体の平均値 ($1290 \pm 296 \mu\text{g/g}$) の 4 分の 1 程度であった。天塩川産のバナジウム濃度は $0.50 \pm 0.28 \mu\text{g/g}$ 、ヒ素濃度は $2.5 \pm 1.5 \mu\text{g/g}$ 、セリウム濃度は $0.35 \pm 0.23 \mu\text{g/g}$ 、鉛濃度は $0.11 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$ であったが、日本産全体 (V: $0.09 \pm 0.17 \mu\text{g/g}$, As: $0.31 \pm 0.77 \mu\text{g/g}$, Ce: $0.04 \pm 0.11 \mu\text{g/g}$, Pb: $0.02 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$) に比べ 5 倍以上高い濃度を示した。

日本産とロシア産, 中国産および韓国産シジミ類の貝殻の元素濃度を比較すると ($p < 0.05$), いくつかの元素で差違が認められた。日本産とロシア産とを比較すると、リチウム、バナジウム、マンガン、コバルト、ヒ素、ルビジウム、セリウム、鉛およびストロンチウムの濃度で、有意な差違が認められた ($p < 0.05$)。日本産のマンガン濃度 ($66 \pm 70 \mu\text{g/g}$) はロシア産 ($25 \pm 14 \mu\text{g/g}$) の 2 倍以上高かった。日本産のヒ素濃度 ($0.31 \pm 0.77 \mu\text{g/g}$) はロシア産 ($0.62 \pm 0.74 \mu\text{g/g}$)

と中国産 ($0.54 \pm 0.49 \mu\text{g/g}$) の半分程度であった。日本産と中国産とを比較すると、リチウム、マグネシウム、ヒ素、ルビジウム、バリウム、セリウム、鉛およびストロンチウムの濃度は、有意な差違が認められた ($p < 0.05$)。日本産のリチウム濃度 ($0.12 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$) は中国産 ($0.05 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$) と比べて 2 倍以上高かった。日本の 13 地域の湖と河川のシジミ類の貝殻のルビジウム濃度は、ほとんどが検出限界未満 ($0.02 \mu\text{g/g}$) であったが、中国産は $0.07 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$ であった。さらに、中国産のバリウム濃度 ($111 \pm 47 \mu\text{g/g}$) は、他の 3 カ国の日本産 ($19 \pm 15 \mu\text{g/g}$)、ロシア産 ($23 \pm 24 \mu\text{g/g}$) および韓国産 ($36 \pm 28 \mu\text{g/g}$) と比較して、3 倍以上高かった。一方、中国産のストロンチウム濃度 ($467 \pm 70 \mu\text{g/g}$) は他の 3 カ国 {日本産 ($1290 \pm 296 \mu\text{g/g}$)、ロシア産 ($1115 \pm 304 \mu\text{g/g}$) および韓国産 ($757 \pm 263 \mu\text{g/g}$)} と比べて低かった。日本産と韓国産とを比較すると、バナジウム、マンガン、コバルト、ヒ素、ルビジウム、セリウム、鉛、カルシウムおよびストロンチウムの濃度に差違が認められた ($p < 0.05$)。韓国産のマンガン濃度 ($28 \pm 15 \mu\text{g/g}$) は、日本産 ($66 \pm 70 \mu\text{g/g}$) に比べ半分以下であった。一方、韓国産の鉛濃度 ($0.18 \pm 0.19 \mu\text{g/g}$) は、日本産 ($0.02 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$) の 9 倍高かった。

判別モデル

貝殻の元素分析に基づき、日本産とロシア産のシジミとを判別するために、判別モデルを構築した。線形判別分析の結果から、日本-ロシア判別モデルを構築するために、6 元素 (Li, V, Mn, As, Rb, Sr) を用いた。判別式は以下の方程式で表わされる。

$$Y_I = -1.768 \times \log_{10}(m[\text{Li}]) + 8.815 \times m[\text{V}] + 0.7171 \times \log_{10}(m[\text{Mn}]) - 1.562 \times \log_{10}(m[\text{As}]) - 4.796 \times \log_{10}(m[\text{Rb}]) + 2.682 \times \log_{10}(m[\text{Sr}]) - 20.35$$

この判別式に試料の元素濃度、すなわちリチウム濃度 ($[\text{Li}]$)、バナジウム濃度 ($[\text{V}]$)、マンガン濃度 ($[\text{Mn}]$)、ヒ素濃度 ($[\text{As}]$)、ルビジウム濃度 ($[\text{Rb}]$)、ストロンチウム濃度 ($[\text{Sr}]$) を代入し、 Y_I が 0 以上の場合は日本産、0 未満の場合はロシア産と判別する。元素濃度が検出限界未満の場合、バナジウム以外は検出限界値を代入する。構築した判別式はモデル作成用試料

の日本産シジミ類 183 点中 164 点 (89.6 %) を正しく日本産と判別し、ロシア産シジミ類 77 点中 71 点 (92.2 %) を正しくロシア産と判別した (Table 3-5)。

クロスバリデーション

クロスバリデーションとして構築したモデルの妥当性を確認するために LOOCV を行った。日本産シジミ類の原産国を日本と判別する確率は 89.6 %, ロシア産シジミ類の原産国をロシアと判別する確率は 88.3 % であった (Table 3-6)。判別モデルとクロスバリデーションの判別率を比較すると、日本産の判別率の差は 0 %, ロシア産の判別率の差は 3.9 % であった。

未知試料の判別

実際の判別が可能かどうか確認するために、判別モデル構築用に用いておらず、産地が既知の試料を未知試料として扱い、原産国を判別することにより、判別モデルを評価した。日本産 31 点、ロシア産 20 点の元素濃度を判別式に代入し、原産国を判別したところ、日本産 31 点中 28 点 (90.3 %) を正しく日本産と判別し、ロシア産 20 点中 17 点 (85.0 %) を正しくロシア産と判別した (Table 3-6)。クロスバリデーションの判別率と未知試料の判別率を比較すると、日本産の判別率の差は 0.7 %, ロシア産の判別率の差は 3.3 % であった。

第3節 元素分析による原産地判別法の室間共同試験

第2節で開発した判別法について、分析を行う試験室で問題なく適用できるかどうか妥当性確認試験を行った。農林水産消費安全技術センター（FAMIC）の3試験室に、シジミ類の貝殻の試料を配布し、試料の分解から測定までを行い、各試験室の測定値が基準値内に入っていることを確認した。

試料および方法

各試験室に事務局から、配付物として粉碎試料、添加回収試験用多元素混合標準溶液を配布した。各試験室は、「元素分析法の信頼性の確認」を行った後、結果を事務局に報告した。事務局が各試験室の測定結果を確認し、試験実施可能と判断した後、各試験室は「室間共同試験」を行った。酸分解するための試薬は第2節と同様のものを使用した。

配付物

- ・ 併行試験・添加回収試験用シジミ類の貝殻の粉碎試料：1点
- ・ 3桁の番号が付与されたシジミ類の貝殻の粉碎試料：8点
- ・ 添加回収試験用多元素混合標準溶液：1本

配付するための粉碎試料は、IUPACの技能試験プロトコール（Thompson *et al.*, 2006）に準拠し均質性を確認した。この粉碎試料を樹脂製チャック付袋に約0.5 gずつ小分けした。併行試験、添加回収試験用のシジミの貝殻の粉碎試料を1点、3桁の番号が付与されたシジミの貝殻の粉碎試料を1試験室当たり8点（4種類×2点）配付した。添加回収試験用溶液は、添加前の試料中濃度と同程度になるようにリチウム 10 µg/L、バナジウム 10 µg/L、マンガン 1,000 µg/L、ヒ素 50 µg/L およびストロンチウム 60,000 µg/L の濃度とした。

元素分析法の信頼性の確認

各試験室において、併行試験、添加回収試験用シジミ類の貝殻の粉碎試料を用い、検量線の直線性の確認、空試験溶液の測定値の確認、検出限界の確認、精度の確認、真度の確認を行った。

検量線の直線性の確認

Table 3-7 に示した各元素の検量線を測定し、相関係数を計算し、評価した。

空試験溶液の測定値の確認

分析操作による汚染等により、空試験溶液の測定値があまりにも大きいと精確な測定値を得ることが困難になるため、空試験溶液の補正值から前後に測定したゼロ濃度の標準溶液の測定値の平均値を引いた値を評価した。

検出限界の確認

空試験溶液 7 点の測定値の標準偏差の 3 倍を検出限界とし、値を評価した。

精度の確認

同一の粉碎試料から 7 点サンプリングしてそれぞれについて分析し、各試料について試料中濃度を計算した後、その平均値を計算する。得られた元素濃度の最大値と最小値の差の絶対値が、次式により得られる基準値 ($D(7)$) 以下であることを確認した。

$$D(7) = 0.042 \times \overline{w_A} \times 2/3 \times PRSD_R$$

w_A : 元素 A の試料中濃度の平均値 (mg/kg)

$PRSD_R$: $\overline{w_A}$ から求めた Horwitz 式の修正式 (Horwitz *et al.*, 1980; Thompson, 1999; Horwitz and Albert, 2006) による室間再現相対標準偏差 (%)

ISO 5725-6 : 1994 (JIS Z 8402-6 : 1999) を参考に、Horwitz 式の修正式による室間再現相対標準偏差 ($PRSD_R$) の 2/3 を併行相対標準偏差として計算した。

Horwitz 式の修正式

$$PRSD_R = \begin{cases} 22 & (w_A < 1.2 \times 10^{-7}) \\ 2 \times w_A^{-0.1505} & (1.2 \times 10^{-7} \leq w_A \leq 0.138) \\ w_A^{-0.5} & (w_A > 0.138) \end{cases}$$

w_A : 元素 A の試料中濃度を単位 1 の質量分率として表した値

真度の確認

添加回収試験により、真度の確認を行った。濃度既知の試料に、測定対象元素を、試料中濃度の 1/2 量～同量程度（試料中濃度が定量下限値（Table 3-9「試料中検出限界」に示す検出限界値の 10/3 倍）の 2 倍を下回る元素にあつては定量下限値の 2 倍程度）添加して分析を行い、以下の式により添加回収率を計算し、確認した。

$$R_M = 100 \times (w_A' - \overline{w_A}) \times m' / (I_A \times V_{add} / 1000)$$

R_M : 添加回収率 (%)

w_A' : 添加試料の試料中濃度 (mg / kg)

$\overline{w_A}$: 未添加試料の試料中濃度の平均値 (mg/kg)

m' : 添加試料の質量 (g)

I_A : 添加用溶液の濃度 (μg/L)

V_{add} : 添加用溶液の添加量 (mL)

室間共同試験

シジミ類の貝殻の粉碎試料（8 点）について、試料 1 点につき 1 点の分析を行い（併行分析は行わず）、各元素濃度を算出した。AOAC ガイドライン（2005）に基づき、室間再現相対標準偏差（ $PRSD_R$ ）を算出し、HorRat ($RSD_R / PRSD_R$)を求めた。さらに、それぞれ判別得点を算出し予測を行った。

結果

元素分析法の信頼性の確認

「元素分析法の信頼性の確認」として、併行試験・添加回収試験用シジミ類の貝殻の粉碎試料を用い、検量線の直線性の確認、空試験溶液の測定値の確認、検出限界の確認、精度の確認、真度の確認を行った。

検量線の直線性の確認

検量線の相関係数の 2 乗の値を Table 3-7 に示す。すべての検量線の相関係数の 2 乗が分析上問題のない範囲に収まる結果となった。

空試験溶液の測定値の確認（操作ブランク値の確認）

操作ブランク値の最大値を Table 3-8 に示す。すべての元素で操作ブランク値が必要とされる操作ブランク値未満となった。

検出限界の確認

得られた 7 点以上の操作ブランク値から計算した検出限界の値を Table 3-9 に示す。すべての元素の検出限界は、必要とされる検出限界の値未満であった。

精度の確認

同一の粉碎試料から 7 点を分析し、計算した相対標準偏差を Table 3-10 に示す。相対標準偏差の許容範囲は、Horwitz 式の修正式（Horwitz *et al.*, 1980; Thompson, 1999; Horwitz and Albert, 2006）を用いて計算した値の 4/3 倍とした。すべての元素の相対標準偏差は、許容範囲内に収まる結果となった。

真度の確認

添加回収試験の結果を Table 3-11 に示す。すべての元素で許容範囲内の回収率が得られた。

室間共同試験

各試験室の検量線の直線性の確認、空試験溶液の測定値の確認、検出限界の確認、精度の確認、真度の確認を行った結果、すべての確認事項で設定した許容範囲内に収まっていることから、試験実施可能と判断したため、各試験室は「室間共同試験」を行った。

シジミ類の貝殻を粉碎した未知試料の分析結果を Table 3-12 に、3 試験室の結果を取りまとめ計算した各値を Table 3-13 に示す。AOAC ガイドライン（2005）では 8 試験室以上の試験室が必要であるが、3 試験室であることから外れ値検定は行わず、すべての分析値を統計に用いた。AOAC ガイドライン（2005）では、HorRat の許容範囲が 0.5～2 とされているが、ICP-MS で分析した m/z 88 の Sr における試料 1, 2 で HorRat が許容範囲の 2 以上の値となった。Sr については、試験室 2 の ICP-MS で分析した分析値が他センターに比べ相対的に低く、試験室 2 の ICP-OES で分析した Sr の分析値と比較すると 1 割以上の差があった。

第4節 考察

これまでの研究で、中国、台湾のシジミ類の集団遺伝学的な構造を解析するため、ミトコンドリア DNA の塩基配列が決定されており、これが産地判別に利用することができる（古丸ら, 2006; 古丸ら, 2010; 山田ら, 2010）。中国産および台湾産のシジミ類は日本産のシジミ類と種または遺伝子の集団構造が異なっているため、日本産のシジミ類と中国産および台湾産のシジミ類の遺伝的差異を判別することができる。しかし、ロシア産のシジミ類の遺伝的多様性や日本産ヤマトシジミとの差異は詳細には研究されていない。これまでの研究では、ロシア産のヤマトシジミは、日本の北海道と日本海側の河川、湖に生息しているヤマトシジミと遺伝子の集団構造が似ていることが推定されている（飯田ら, 2012）。このため、日本とロシアのシジミ類を判別するためには、さらに詳細な遺伝学的な解析と遺伝マーカーの開発が必要であった。第1節では、日本産とロシア産ヤマトシジミのミトコンドリア DNA の配列を決定し、集団構造の違いを発見した。これを基により簡便な PCR-RFLP 法を開発し、日本産ヤマトシジミ 260 点、ロシア産ヤマトシジミ 105 点、中国産の *C. largillierti* 21 点および日本産のセタシジミ 18 点について、分析を行った。本判別法により、ヤマトシジミ日本型と分類されれば日本産、ヤマトシジミロシア型と分類されればロシア産、*C. largillierti* と分類されれば中国産、セタシジミと分類されれば日本産と判別することとした。日本産ヤマトシジミを日本産と判別する確率は 99.2%，ロシア産と判別する確率は 0.8%であった。ロシア産ヤマトシジミをロシア産と判別する確率は 42.9%，日本産と判別する確率は 54.3%であった。中国産の *C. largillierti* は 95.2%が中国産，4.8%がその他の型と判別された。日本産のセタシジミは 100%がセタシジミと分類され、産地は日本産と判別され誤判別はなかった。ロシア産ヤマトシジミは半分以上である 54.3%が誤判別となった。市販されているシジミ類を調査する際は、日本産シジミ類の産地表示の疑義を明らかにすることを目的としているため、ロシア産シジミを検出する確率は低いものの、日本産シジミの誤判別率は 0.8%であり、ほとんどないことから、市販品調査に利用できると考えられた。

一方、貝殻の元素分析によっても、ロシア産と日本産のヤマトシジミの判別が可能であった。第2節では、日本国内の各地域で漁獲されたシジミ類と、ロシア産、中国産、韓国産のシジミ類との間で貝殻の元素組成を比較した。この分析結果から、日本とロシアで原産国によって元素濃度の差異があるリチウム、バナジウム、マンガン、ヒ素、ルビジウム、ストロンチウムの6元素の濃度に基づく日本-ロシア判別モデルを開発した。この判別式は LOOCV では、日本産シジミ類に対して 89.6%を正しく日本産と判別し、ロシア産シジミ類に対して 88.3%を正しくロシア産と判別した。マンガンおよびヒ素濃度が、日本産とロシア産のシジミ類の間で大きく異なっていたことから、この2元素が原産国を判別する重要な指標になったと考えられる。マンガン濃度の平均値は、日本産 ($66 \pm 70 \mu\text{g/g}$) に対して、ロシア産 ($25 \pm 14 \mu\text{g/g}$) は 1/3 倍であったが、ヒ素濃度の平均値は日本産 ($0.31 \pm 0.77 \mu\text{g/g}$) に対して、ロシア産 ($0.62 \pm 0.74 \mu\text{g/g}$) は 2 倍であり、日本産とロシア産の元素濃度に差があった。

日本産 19 点およびロシア産 9 点がこのモデルでは正しく判別することができなかった。誤判別となった日本産の元素組成はロシア産と類似していた。日本産の天塩川産 8 点、利根川産 2 点、揖斐川産 3 点、江戸川産 3 点、多摩川 3 点 が正しい判別ができなかった。正しい判別ができなかったシジミは、すべて河口域で漁獲されたシジミであった。正しく判別できなかったシジミは、マンガン濃度が共通して日本産の平均値に比べ低く、天塩川、江戸川産のシジミはマンガン濃度の低さに加え、ヒ素濃度が日本産の平均値に比べ高い傾向にあった。

Angelo *et al.* (2007) は鉱山地域のスプリング川流域の底質と生息する貝殻におけるカドミウム、鉛および亜鉛濃度の関係について調査した。底質のカドミウム、鉛および亜鉛の濃度はイガイ、*Lampsilis rafinesqueana*, *Quadrula pustulosa*, *Corbicula fluminea* などのような貝類の殻と相関関係にあった。Riba *et al.* (2005) は Cadiz 湾にある鉱山地域を含むグアダルキビル川河口と含まない他の河口に生息する *Scrobicularia plana*, *Crassostrea angulata* の貝殻の重金属の生物濃縮について報告している。グアダルキビル川河口で採取された貝の亜鉛とカドミウム濃度は、鉱山地域に由来する重金属汚染の影響と関係していた。

ストロンチウム濃度が高いシジミ類貝殻は、汽水域環境に生息している傾向が認められた。

琵琶湖産とそれ以外のシジミ類の間で貝殻の元素組成に大きな差違が認められた。ストロンチウムの蓄積は、海水と淡水に生息する魚類の耳石や二枚貝の貝殻で調査されている(大竹, 2007)。河口地域に生息しているアユカケ *Cottus kazika* は、生息環境中の塩分を評価するのに耳石中のストロンチウム濃度とカルシウム濃度の比 (Sr/Ca) が用いられ、Sr/Ca 比は塩分と相関関係を示した(岡部ら, 2011)。古丸ら (2009) は低塩分地域に生息するシジミ類は、他の魚介類と同様に低い Sr/Ca 比を示した。本研究でも淡水湖である琵琶湖産のシジミ類の Sr/Ca 比は低かった。一方、カルシウム濃度は、淡水域に生息していても汽水域のものとほとんど差がなかった。

本研究で開発した日本産とロシア産シジミ類の原産地を貝殻の元素組成から推定する判別法を他試験室でも適用することができるように、室間共同試験を実施し、検査法としての妥当性を検討した。元素分析法の信頼性を確認する方法として、検量線の直線性の確認、空試験溶液の測定値の確認、検出限界の確認、精度の確認および真度の確認を行った。この結果、すべての確認事項で設定した許容範囲内に収まっていることから、問題なく測定できていると判断し、室間共同試験を行った。

未知試料の分析による室間共同試験について、AOAC ガイドライン (2005) では、HorRat の許容範囲が 0.5~2 とされているが、ICP-MS で分析した m/z 88 のストロンチウムにおける試料 1, 2 で HorRat が許容範囲の 2 以上の値となった (Table 3-13)。また、一部元素については HorRat が許容範囲の 0.5 を下回った。

ストロンチウムについては、試験室 2 の ICP-MS で分析した分析値が他試験室に比べ相対的に低く、試験室 2 の ICP-OES で分析した Sr の分析値と比較すると 1 割以上の差があった。ICP-MS と ICP-OES は共通の分解溶液を分析に用いており、ICP-OES の値は HorRat が許容範囲内となったことから、ICP-MS で分析した Sr については分解等の操作には問題なく、ICP-MS の測定に問題があると考えられた。シジミ類の貝殻は Ca を 30% 以上含む高マトリックス試料であるため、試験室 2 の ICP-MS は干渉により Sr のイオン化や検出器の測定などに影響があると考えられた。このことから試験室 2 の ICP-MS では正確に分析できず、ICP-OES で分析する必要が

あると考えられた。

HorRat の許容範囲の 0.5 を下回ったのは、試験室数の不足または、機器性能の向上により分析値のばらつきが少なくなった影響であると考えられた。このため、元素分析法についての妥当性は確認できた。なお、日本-ロシア間の判別については、配付した未知試料の測定値を判別式に代入し、すべて問題なく正しく判別された。

本研究により、DNA 分析および元素分析による日本産とロシア産のシジミの原産地を判別するための判別法を開発することができた。DNA 分析では、日本産のヤマトシジミの正答率は 99.2%であるものの、ロシア産のヤマトシジミの正答率は 42.9%であり、ロシア産のヤマトシジミの正答率は 5 割を切っている。元素分析による判別法は、日本産およびロシア産シジミの正答率は約 9 割であり、DNA 分析よりも正答率が高いが、貝殻の粉碎と分解に手間と時間を要し、多くの検体の分析が必要な場合、活用するのには向いていない。DNA 分析は、ロシア産シジミの判別率が低いものの、より多くの検体数を分析できる。また、市販されているシジミ類の調査は、日本産シジミ類の産地表示の疑義を明らかにすることを目的としているため、ロシア産シジミを検出できる確率は低いものの、日本産シジミの誤判別率は 0.8%であり、ほとんどないことから、市販品調査に利用できると考えられた。このため、対象であるシジミを原産地判別する目的により、どちらの分析法を選択するか又は両方で分析するかを選択することで実際の市販品の調査に適用できると考えられる。この開発された 2 種の原産地判別法は、市販されているシジミの原産地表示の真正性を確認するために、非常に役立つ分析方法であると考えらる。

総合的考察

近年、外国産の食品を国産の食品として販売したり、安価な代替食品を使い高価な食品に偽装したりするなど、食品表示の偽装が食の安全・安心を揺るがす問題となっており、こうした中で、消費者の食品表示に対する関心はますます高くなっている。

本研究では、水産物の中でも特に産地表示を偽って販売される事例の多いうなぎ加工品、アサリおよびシジミについて水産生物の回遊履歴や生態調査で用いられている元素分析による原産地判別法を開発した。日本産試料と輸入割合が大きい国で生産された試料について、元素分析または DNA 分析を行い、日本産と外国産の試料間で差異を探索し原産地判別法の開発を行った。

うなぎ加工品について、日本、中国および台湾産うなぎ加工品の肉間骨の 13 元素 (Li, Ti, V, Mn, Ni, Co, Zn, Rb, Sr, Cd, Ba, Pb および U) の濃度を測定し、日本-中国, 日本-台湾, 中国-台湾および日本-中国・台湾判別モデルを構築した。日本-中国・台湾判別モデルについて、LOOCV を行った結果、日本産うなぎ加工品の原料原産地を日本と判別する確率は 80.0 %, 中国および台湾産うなぎ加工品の原料原産地を中国・台湾産と判別する確率は 92.5 % であった。モデルの構築には、日本と中国および韓国産うなぎ加工品で濃度差のあったニッケル, ストロニウム, 鉛およびウランが選択された。特に肉間骨中の鉛濃度の平均値は、日本産 ($0.10 \pm 0.19 \mu\text{g/g}$) は中国産 ($0.61 \pm 0.62 \mu\text{g/g}$) および台湾産 ($0.46 \pm 0.28 \mu\text{g/g}$) とはそれぞれ 6.1 倍および 4.6 倍の差があり、判別に重要な指標になったと考えられる。すでに開発されている DNA 分析に基づくうなぎ加工品のウナギの魚種判別法を利用した原料原産地判別においては、中国および台湾産うなぎ加工品の魚種がニホンウナギの場合、産地判別ができない。このため、元素分析による判別法は、市販されているうなぎ加工品に使用されているウナギの原産地表示の真正性を確認するために、役立つ分析方法であると考えられる。

アサリの原産地判別法を開発するために、日本、中国および韓国産アサリの殻の 11 元素 (Li, V, Mn, Co, As, Rb, Mo, Cd, Ba, Pb および U) の濃度を測定し、日本-中国, 日本-韓国, 中国-韓国および日本-中国・韓国判別モデルを構築した。日本-中国・韓国判別モデルでは、日

本と中国および韓国産アサリで濃度差のあったリチウム、バナジウム、マンガン、ヒ素、ルビウム、バリウムおよび鉛が選択された。選択されたすべての元素について、日本産より中国および韓国産の元素濃度の平均値が3割から4倍高く、判別に重要な指標になったと考えられる。日本産アサリの原産地を日本と判別する確率は95.6%，中国・韓国産アサリの原産地を中国・韓国と判別する確率は95.8%であり、日本と中国および韓国産ともに95%以上の確率で判別が可能であった。

浜口（2007）によるDNA分析による産地判別法では、日本と韓国南岸産のアサリの原産地を判別することができないが、本研究の元素分析によるアサリの原産地判別法は、日本と韓国南岸産のアサリの原産地を判別することが可能である。元素分析による原産地判別法は、日本産、中国産および韓国産アサリの原産地を判別するための力強いツールであり、市販されているアサリの原産地表示の確認のために用いることができる。

日本とロシア産のシジミの原産地判別モデルを構築するためにDNA分析および元素分析に基づく原産地判別法を開発した。DNA分析においては、ND5遺伝子の部分領域を増幅するプライマーを作成し、MfeIで処理することにより、ヤマトシジミ日本型、ヤマトシジミロシア型、*C. largillierti*型、セタシジミ型に判別するPCR-RFLP法を開発した。開発したPCR-RFLP法は日本産のヤマトシジミの99.2%を正しくヤマトシジミ日本型に、ロシア産のヤマトシジミの42.9%を正しくヤマトシジミロシア型に判別した。

元素分析においては、15元素（Li, Mg, V, Mn, Co, As, Rb, Mo, Cd, Ba, Ce, Pb, U, SrおよびCa）を測定した。シジミの殻のマンガン濃度の平均値は、日本産がロシア産に比べ2倍以上、ヒ素濃度は日本産がロシア産に比べ半分程度であり、この2元素が重要な指標になったと考えられる。6元素（Li, V, Mn, As, Rb, Sr）の濃度に基づく日本-ロシア判別式モデルを開発し、構築した判別式はモデル作成用試料の日本産シジミ89.6%を正しく日本産と判別し、ロシア産シジミ88.3%を正しくロシア産と判別した。

DNA分析では、日本産のヤマトシジミの正答率は99.2%であるものの、ロシア産のヤマトシジミの正答率は42.9%であり、ロシア産のヤマトシジミの正答率は5割を切っている。元素分

析では、日本産およびロシア産シジミの正答率は約 9 割であり、DNA 分析を上回るが元素分析は貝殻の粉碎・分解に手間と時間を要し、多検体の分析が必要な場合、活用するのに不向きである。DNA 分析は、ロシア産シジミの判別率が低いもののより多くの検体数を分析できる。このため、対象であるシジミを原産地判別する目的により、どちらの分析法を選択するか又は両方で分析するかを選択することで実際の市販品の調査に適用できると考えられる。

本研究で開発した判別法について、さらに判別率や信頼性を上げるためには、さらに多くの地域から、また、試料採取時期による変動を確認するため異なる時期の試料を収集することが必要である。加えて、産地の移動や飼料、育成環境の経年変化などが考えられるため、引き続きモデル用試料の分析値を追加し、判別モデルを更新していくことが望ましいと考えられる。乗り越えるべき課題も存在するが、本研究の結果により、水産物の中でも特に産地表示を偽って販売される事例の多い、うなぎ加工品、アサリおよびシジミについて元素分析および DNA 分析に基づく原産地判別法を開発した。これら 3 品目についての原産地判別法により、これまで科学的な方法により原産地の判別ができない水産物の判別が可能となった。産地判別法が開発される以前から、産地表示の真正性調査は、行政機関による小売店の巡回調査、企業からの内部告発情報に基づいて行われてきたが、産地判別法が開発されたことにより、市販品の原産地表示の調査、監視が能動的、効率的に行えるようになってきた。本研究で開発した元素分析および DNA 分析に基づく原産地判別法は、市販されている食品の原産地表示の真正性を確認するために有用な判別法であると言える。

文献

Angelo RT, Cringan MS, Chamberlain DL, Stahl AJ, Haslouer SG, Goodrich CA. Residual effects of lead and zinc mining on freshwater mussels in the Spring River Basin (Kansas, Missouri, and Oklahoma, USA). *Sci. Total Environ.* 2007; **384**: 467–496.

Angerosa F, Bréas O, Contento S, Guillou C, Reniero F, Sada E. Application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* 1999; **47**: 1013–1017.

AOAC International. Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. *AOAC Official Method of Analysis*, Gaithersburg, MD, USA. 2005.

新井崇臣. 魚類の回遊履歴:解析手法の現状と課題. 魚類学雑誌 2002; **49**: 1–23.

Ariyama K, Aoyama Y, Mochizuki A, Homura Y, Kadokura M, Yasui A. Determination of the geographic origin of onions between three main production areas in Japan and other countries by mineral composition. *J. Agric. Food Chem.* 2007; **55**: 347–354.

Ariyama K, Horita H, Yasui A. Chemometric techniques on inorganic elements composition for the determination of the geographic origin of Welsh onions. *Anal. Sci.* 2004; **20**: 871–877.

有山薫. 元素組成, 「食品表示を裏づける分析技術」(安井明美編) 東京電機大学出版局, 東京. 2010; 18–23.

アサリ資源全国協議会企画会議, 水産庁増殖推進部, 独立行政法人水産総合研究センター. 提言 国産アサリの復活に向けて (平成 21 年 3 月改訂) . 2009.

Beck JW, Edwards RL, Emi I, Taylor FW, Recy J, Rougerie F, Joannot P, Henin C. Sea-surface temperature from coral skeletal strontium/ calcium ratios. *Science* 1992; **257**: 644–647.

Bowen GJ, Wassenaar LI, Hobson KA. Global application of stable hydrogen and oxygen isotopes to wildlife forensics. *Oecologia* 2005; **143**: 337–348.

Bureau of Fisheries of People’s Republic of China, Fisheries Agency of Japan, Ministry of Oceans and Fisheries of the Republic of Korea, Fisheries Agency of Chinese Taipei. Joint statement on international cooperation for conservation and management of Japanese eel stock and other relevant eel species. 2014.

Carroll ML, Johnson BJ, Henkes GA, McMahon KW, Voronkov A, Ambrose JWG, Denisenko SG. Bivalves as indicators of environmental variation and potential anthropogenic impacts in the southern Barents Sea. *Marine Pollution bulletin* 2009; **59**: 193–206.

Chaw S, Inoue S. Intra–and interspecific restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of *Thunnus* tuna species. *Bull. Natl. Res. Inst. Far Seas Fish.* 1993; **30**: 619–627.

Chaw S, Nohara K, Tanabe T, Itoh T, Tsuji S, Nishikawa Y, Uyeyanagi S, Uchikawa K. Genetic and morphological identification of larval and small juvenile tunus (Pisces: *Scombridae*) caught by a mid–water trawl in the western Pacific. *Bull. Fish. Res. Agen.* 2003; **8**: 1–14.

Chaw S, Okamoto H, Miyabe N, Hiramatsu K, Barut N. Genetic divergence between Atlantic and Indo-Pacific stocks of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and admixture around South Africa. *Mol. Eco.* 2000; **9**: 221–227.

Chew KK. Global bivalve shellfish introductions. *J. World Aquac.* 1990; **21**: 9–22.

Chew KK. Manila clam biology and fishery development in Western North America. In: Manzi JJ, Castagna M (eds). *Clam Mariculture in North America*. Elsevier, Amsterdam. 1989; 243–261.

千葉県. アサリの原産地不適正表示に関する食品表示法に基づく措置について. 2013.

張成年. 産卵海域で成熟ウナギの捕獲に成功！. 日本水産学会誌 2008; **74**: 979-981.

Crook V. Trade in *Anguilla* species, with a focus on recent trade in European Eel *A. anguilla*. *Traffic report prepared for the European Commission*. 2010.

Dodd JR. Environmental control of strontium and magnesium in *Mytilus*. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1965; **29**: 385–388.

独立行政法人産業技術総合研究所地質調査総合センター. 全国の元素濃度データ. 「日本の地球化学図」 谷田部印刷, つくば. 2004; 14–18.

Fisher RA. The use of multiple measurements in taxonomical problems. *Annals of Eugenics* 1936; **7**: 179–188.

船木紀夫, 服部賢志, 木村康晴, 佐藤耕一, 塚田政範, 津村明宏, 佐野雅敏, 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, 2010; **57**: 70–77.

Gomez MMC, Brandt R, Jakubowski N, Andersson JT. Changes of the Metal Composition in German white wines through the wine-making process. A study of 63 elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2004; **52**: 2953–2961.

Hamaguchi M, Okoshi K. Biological impacts caused by release of imported clam, *Ruditapes philippinarum*. *J. Japan Soci. on Water Envi.* 2005; **28**: 608–613.

Hamaguchi M. Development of discrimination methods of imported and native Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Res. J. Food and Agri.* 2007; **30**: 38–41.

浜口昌巳, 佐々木美穂. 有用二枚貝の種判別技術の開発. 水産学シリーズ「水産物の原料・産地判別」(福田裕, 渡部終五, 中村弘二編) 恒星社厚生閣, 東京. 2006; 67–77.

浜口昌巳. 輸入アサリの迅速判別法を開発. 農林水産技術研究ジャーナル 2007; **30**: 38–41.

原口紘丞. プラズマの特性. 「ICP-発光分析の基礎と応用」講談社, 東京. 1986; 13–56.

服部賢志, 木村康晴, 高嶋康晴, 法邑雄司. 無機元素分析によるニホンウナギ加工品の原産地判別. 日本水産学会誌 2009; **75**: 844–848.

服部賢志, 塚田政範, 法邑雄司. 無機元素分析によるコンブの原料原産地判別. 日本水産学会誌

2009; **75**: 77–82.

Heaton K, Kelly SD, Hoogewerff J, Woolfe M. Verifying the geographical origin of beef: The application of multi-element isotope and trace element analysis. *Food Chem.* 2008; **107**: 506–515.

Heiss GA, Camoin GF, Eisenhauer A, Dullo WC, Hansen B. Stable isotope and Sr/Ca-signals in corals from the Indian Ocean. *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium. Panama*, 1997; **12**: 1713–1718.

Horwitz W, Albert R. The Horwitz Ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *J. AOAC* 2006; **89**: 1095–1109.

Horwitz W, Kamps LR, Boyer KW. Quality assurance in the analysis foods for trace constituents. *J. AOAC* 1980; **63**: 1344–1354.

堀田博. 食品試料. 「元素の分析」(日本分析化学会編)丸善出版, 東京. 2011; 186–207.

法邑雄司, 鈴木忠直, 小阪英樹, 堀田博, 安井明美. 無機元素組成による黒大豆「丹波黒」の一粒産地判別. 食品科学工学会誌 2006; **53**: 619–626.

Huang ZY, Chen T, Yu J, Qin DP, Chen L. Lead contamination and its potential sources in vegetables and soils of Fujian, China. *Environ. Geochem. Health* 2012; **34**: 55–65.

茨城県. 原産地の不適正表示が判明した事業者に対する JAS 法に基づく指示について. 2015.

出村雅晴. ウナギをめぐる最近の情勢. 農林金融 2012; **65**: 58–63.

出村雅晴. ウナギをめぐる情勢変化とわが国への影響. 農中総研調査と情報 2008; **5**: 6–7.

Iguchi J, Takashima Y, Namikoshi A, Yamashita M. Species identification method for marine products of *Seriola* and related species. *Fish. Sci.* 2012; **78**: 197–206.

飯田雅絵, 菅野愛美, 木島明博. mtDNA–COI 領域のシーケンス分析によるヤマトシジミの地域集団構造. 日本水産学会誌 2012; **78**: 934–944.

Inoue J, Miya M, Aoyama J, Ishikawa S, Tsukamoto K, Nishida M. Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.* 2001; **67**, 118–125.

株式会社日本政策金融公庫. 安全性の判断基準に関する消費者動向調査結果. 2015.

株式会社日本政策金融公庫. 食品表示に関する消費者動向調査. 2014.

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. 食品科学工学会誌 2006; **53**: 489–497.

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 2010; **57**: 78–84.

門倉雅史. 元素分析による生シイタケの栽培方法及び原産国の判別法の開発. 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 2012; **36**: 1–11.

加々美寛雄, 周藤賢治, 永尾隆志. Rb-Sr 系による年代測定. 「同位体岩石学」共立出版, 東京, 2008; 13-49.

「加工食品品質表示基準」. 平成 12 年 3 月 31 日農林水産省告示第 513 号. 2000.

「加工食品品質表示基準」. 平成 16 年 9 月 14 日農林水産省告示第 1705 号. 2004.

「加工食品品質表示基準」. 平成 24 年 6 月 11 日消費者庁告示第 5 号. 2012.

環境省・有明海・八代海総合調査評価委員会. 委員会報告. 2006.

関東農政局. ヨコハマ島淡水魚株式会社におけるうなぎ加工品の不適正表示に対する措置について. 2014.

Katsumi T. Spawning of eels near a seamount. *Nature* 2006; **439**: 929.

河口広司, 中原武利. 序論. 「プラズマイオン源質量分析」学会出版センター, 東京. 1994; 1-11.

「健康増進法」. 平成 14 年 8 月 2 日法律第 103 号. 2002.

読売新聞. [北朝鮮産アサリ, 5 業者転々「国産」に](#). 2005 年 4 月 15 日.

古丸明, 堀久子, 柳瀬泰宏, 尾之内健次, 加藤武, 石橋亮, 河村功一, 小林正裕, 西田睦. 日本, 韓国, 中国産シジミ類の mtDNA 16SrDNA 塩基配列分析による判別. 日本水産学会誌 2010; **76**:

621–629.

古丸明, 尾之内健次, 柳瀬泰宏, 成田光好, 大竹二雄. EPMA (Electron Probe Micro Analyer) による塩分濃度の異なる水域で採集されたヤマトシジミ貝殻の Sr/Ca 比. 日本水産学会誌 2009; **75**: 443–450.

古丸明. ミトコンドリア DNA によるシジミの種判別. 「水産物の原料・産地判別」(福田裕, 渡部終五, 中村弘二編) 恒星社厚生閣, 東京. 2006; 78–86.

Kowalski BR, Bender CF. Pattern recognition. A powerful approach to interpreting chemical data. *J. Amer. Chem. Soc.* 1972; **94**: 5632–5639.

Kraak MSH, Toussaint M, Lavy D, Davids C. Short-term effects of metals on the filtration rate of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Environ. Pollut.* 1994; **84**: 139–143.

熊本県. アサリの実産地偽装に対する JAS 法に基づく指示・公表について. 2015.

Liu CF, Cheng CC. Survey on the contents of lead, copper, cadmium, mercury and arsenic in aquaculture fish in the Taiwan area. *Ann. Rep. Food Drug Admin.* 1990; **8**: 189–195.

真木長彰, 寺島裕晃, 中村啓美. アサリ. 「現代おさかな辞典」(山本保彦編) エヌ・ティー・エス, 東京. 1997; 860–864.

真木長彰, 寺島裕晃, 中村啓美. シジミ. 「現代おさかな辞典」(山本保彦編) エヌ・ティー・エス, 東京. 1997; 882–885.

Marshall JF, McCulloch MT. An assessment of the Sr/Ca ratio in shallow water hermatypic corals as a proxy for sea surface temperature. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2002; **66**: 3263–3280.

Minegishi Y, Aoyama J, Inoue JG, Miya M, Nishida M, Tsukamoto K. Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eels genus *Anguilla* based on the whole mitochondrial genome sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2005; **34**: 134–146.

Miya M, Nishida M. Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: A tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2000; **17**: 437–455.

水野知己, 丸山拓也. 伊勢・三河湾のアサリ漁業と資源. 「アサリと流域圏環境」(生田和正, 日向野純也, 桑原久実, 辻本哲郎編) 恒星社厚生閣, 東京. 2009.

諸橋保, 青山恵助, 浪越充司, 木村康晴, 服部賢志. 元素分析による湯通し塩蔵わかめの原料原産地判別. *日本水産学会誌* 2011; **77**: 243–245.

Mouly PP, Gaydou EM, Lapierre L, Corsetti J. Differentiation of several geographical origins in single-strength Valencia Orange juices using quantitative comparison of carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* 1999; **47**: 4038–4045.

Nakamura S, Suzuki S, Horita H, Nakano A. Detection of falsely labeled Taro in Japan by elemental analysis: Improvement of discrimination ability using a sampling plan. *Food Sci. Technol. Res.* 2012; **18**: 723–733.

中下留美子, 鈴木彌生子, 赤松史一, 小原和仁, 伊永隆史. 安定同位体比解析による国産・豪州産・米国産牛肉の産地判別の可能性. 食品科学工学会誌 2008; **55**: 191–193.

中下留美子, 鈴木彌生子, 伊永隆史, 渡辺伸枝, 田中公一. 安定同位体比分析による日本国内に流通する牛肉の産地判別. 分析化学 2009; **58**: 1023–1028.

中村幹雄. 「日本のシジミ漁業」たたら書房, 米子. 2000.

中村澄子, 鈴木啓太郎, 原口和朋, 與座宏一, 奥西智哉, 松井崇晃, 石崎和彦, 吉井洋一, 大坪研一. 糯米加工品における糯米の品種判別および異種穀類混入検出技術. 日本農芸化学会誌. 2004; **78**: 984–993.

中村澄子, 鈴木啓太郎, 伴義之, 西川恒夫, 徳永國男, 大坪研一. いもち病抵抗性に関する同質遺伝子系統「コシヒカリ新潟 BL」の DNA マーカーによる品種判別. 育種学研究. 2006; **8**: 79–87.

中村哲, 堀田博. 元素分析による落花生の原産国判別. 「日本食品科学工学会大会講演集」日本食品科学工学会, 東京. 2011; 113.

Nasu S, Suzuki J, Ohta R, Hasegawa K, Yui R, Kitazawa N, Monna L, Minobe Y. Search for and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rice (*Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*) and establishment of SNP markers. *DNA Res.* 2002; **9**: 163–171.

Nijman V. CITES-listings, EU eel trade bans and the increase of export of tropical eels out of Indonesia. *Marine Policy* 2015; **58**: 36–41.

「農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律の一部を改正する法律」. 平成 11 年 7 月 22 日改正法律第 108 号. 1999

「農林物資の規格化等に関する法律」. 昭和 25 年 5 月 11 日法律第 175 号. 1950.

農林水産消費安全技術センター, 水産総合研究センター. マグロ属魚類の魚種判別マニュアル. 2005

農林水産消費技術センター, 水産総合研究センター. うなぎ加工品の原料魚種判別マニュアル (ジャポニカ種及びアンギラ種) . 2010.

農林水産消費技術センター, 水産総合研究センター. サバ属魚類の魚種判別マニュアル. 2007.

農林水産省. 「マグロ」の表示に関する特別調査の実施結果について. 2005.

農林水産省. 「平成 27 年度 食料・農業・農村白書」農林統計協会, 東京. 2016

農林水産省. JAS 法に基づく生鮮食品品質表示基準. 加工食品品質表示基準に関する指示等の実績 (平成 27 年 3 月 31 日現在) . 2014.

農林水産省. 平成 26 年漁業・養殖魚統計. 2015.

農林水産省. 有限会社 東洋水産加工におけるシジミの不適正表示に対する措置について. 2013.

農林水産省. 緑茶・塩干魚介類の表示に関する特別調査の実施結果について. 2009.

農林水産省消費・安全局. 国産農産物の鉛，ヒ素及び水銀の含有実態調査の中間とりまとめ結果について. 2006.

大竹二雄. 耳石のミネラルでアユやウナギの回遊を探る. 「海のミネラル学」 (大越健嗣 編) 成山堂書店, 東京. 2007; 164-179.

岡部正也, 佐伯昭, 芥川健二, 清家暁, 海野徹也. 耳石 Sr/Ca 比による高知県四万十川および物部川産カマキリ当歳魚の遡上履歴の推定. 生物圏科学 2011; **50**: 33-42.

岡本隆. 千葉県のアサリ資源の現状. 東京湾の漁業と環境 2015; **6**, 9-11.

大坪研一, 中村澄子, 今村太郎. 米の PCR 品種判別におけるコシヒカリ用判別プライマーセットの開発. 日本農芸化学会誌 2002; **76**: 388-397.

大坪研一, 藤井剛, 橋野陽一, 豊島英親, 岡留博司, 中村澄子, 川崎信二. RAPD 法を用いた国内産精米の品種判別技術. 食品化学工学会誌 1997; **44**: 386-390.

小澤貴和, 林征一. 「ウナギの科学」 恒星社厚生閣, 東京. 1999.

Phillips DJH, Thompson GB, Gabuji KM, Ho CT. Trace metals of toxicological significance to man in Hong Kong seafood. *J. Environ. Pollut.* 1982; **3**: 27-45.

Radtke RL. Strontium-calcium concentration ratios in fish otolith as environmental indicators. *Comp.*

Biochem. Physiol. 1989; **92**: 189–193.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2005. (<http://www.R-project.org>).

Riba I, Blasco J, Jiménez-Tenorio N, Delvalls TA. Heavy metal bioavailability and effects: I. Bioaccumulation caused by mining activities in the Gulf of Cádiz (SW, Spain). *Chemosphere* 2005; **58**: 659–669.

Ringuet S, Muto F, Raymakers C. Eels: their Harvest and Trade in Europe and Asia. *Traffic. bulletin.* 2002; **19**: 80–106.

Rooker JR, Secor DH, Zdanowicz VS, Metrio GD, Relini LO. Identification of northern bluefin tuna stocks from putative nurseries in the Mediterranean Sea and western Atlantic Ocean using otolith chemistry. *Fish. Oceanogr.* 2003; **12**: 75–84.

Rummel S, Hoelzl S, Horn P, Rossmann A, Schlicht A. The combination of stable isotope abundance ratios of H, C, N and S with Sr/Sr for geographical origin assignment of orange juices. *Food Chem.* 2010; **118**: 890–900.

廖一久. 台湾の養鰻事情. 水産増殖 1991; **39**: 233–234.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1977; **74**: 5436–5467.

佐藤秀一. 水産物とミネラル. 「海のミネラル学」(大越健嗣編著)成山堂書店, 東京. 2007; 50–61.

「生鮮食品品質表示基準」, 平成 12 年 3 月 31 日農林水産省告示第 514 号. 2000.

Sezaki K, Itoi S, Watabe S. A simple method to distinguish two commercially valuable eel species in Japan *Anguilla japonica* and *A. anguilla* using polymerase chain reaction strategy with a species-specific primer. *Fish. Sci.* 2005; **71**: 414–421.

Sinclair DJ. Correlated trace element “vital effects” in tropical corals: A new geochemical tool for probing biomineralization. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 2005; **69**: 3265–3284.

白石広美, ビッキー・クルーク. ウナギの市場の動態: 東アジアにおける生産・取引・消費の分析. *Traffic report*, 東京. 2015.

「食品衛生法」, 昭和 22 年 12 月 24 日法律第 233 号. 1947.

「食品表示基準」, 平成 27 年 3 月 20 日内閣府令第 10 号. 2015.

「食品表示法」, 平成 25 年 6 月 28 日法律第 70 号. 2013.

消費者庁. 食品表示一元化検討会報告書. 2012.

消費者庁. 「平成 26 年版消費者白書」勝美印刷, 東京. 2014.

消費者庁. 加工食品品質表示基準改正（原料原産地表示等）に関する Q&A. 2012.

消費者庁. 食品表示基準の概要. 2016.

消費者庁. 食品表示法案の骨格. 2013.

曾雅, 任同軍. 中国のウナギ養殖産業 異種ウナギの導入が進む. 養殖ビジネス, 2013; **6**: 8–10.

Steel RGD. A rank sum test for comparing all pairs of treatments. *Technometrics* 1960; **2**: 197–207.

杉山真士, 榎本康敬. 微量無機元素組成によるまつたけの原産地判別の検討. 関税中央分析所報 2012; **52**: 103–109.

水産庁. その他の種のうなぎ種苗の池入れ実績. 2016

水産庁. ウナギをめぐる最近の状況と対策について. 2013.

「水産物品質表示基準」, 平成 12 年 3 月 31 日農林水産省告示第 516 号. 2000.

Takashima Y, Morita T, Yamashita M. Complete mitochondrial DNA sequence of Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* and molecular identification of two commercially important species *T. trachurus* and *T. japonicas* using PCR-RFLP. *Fish. Sci.* 2006; **72**: 1054–1065.

高嶋康晴. あじ塩干品. 「食品鑑定技術ハンドブック」(太田英明編)サイエンスフォーラム, 東京. 2005; 66–72.

Takesue RK, Geen AV. Mg/Ca, Sr/Ca, and stable isotopes in modern and Holocene *Protothaca staminea* shells from a northern California coastal upwelling region. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 2004; **68**: 3845–3861.

田中健二, 中川武芳, 大岡宗弘, 徳倉富夫, 田中勝祐, 瀬古幸郎. 養殖ニホンウナギにおける品質特性の季節変動. 水産増殖 1995; **43**: 499–509.

Thompson M. A natural history of analytical methods. *Analyst* 1999; **124**: 991.

Thompson M, Ellison SLR, Wood R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. *Pure & Appl. Chem*. 2006; **78**: 145–196.

Thorrold SR, Jones CM, Campana SE, McLaren JW, Lam JWH. Trace element signatures in otolith record natal river of juvenile American shad (*Alosa sapidissima*). *Limnol. Oceanogr*. 1998; **43**: 1826–1835.

鳥羽光晴. アサリ. 「貝類・甲殻類・ウニ類・藻類」(森勝義編)恒星社厚生閣, 東京. 2005; 287–298.

東京都. うなぎ加工品の不適正表示に対する JAS 法に基づく措置について. 2013.

Tsukamoto K, Nakai I, Tesch FW. Do all freshwater eels migrate?. *Nature*. 1998; **396**: 635–636.

Tsukamoto K, Arai T. Facultative catadromy of the eel *Anguilla japonica* between freshwater and seawater habitats. *Mar Ecol Prog Ser*. 2001; **220**: 265–276.

海野徹也, 柴智久, 検崎仁美, 柴田恭宏, 長澤和也. 耳石 Sr/Ca 比による広島県芦田川水系にお

ける陸封アユの確認. 広島大学大学院生物圏科学研究科紀要. 2007; **46**: 35-42.

和田英太郎. 安定同位体比精密測定法による陸上生態系の解析. 日本生態学会誌 1997; **47**: 333-336.

Wang S, Jia Y, Wang S, Wang X, Wang H, Zhao Z, Liu B. Fraction of heavy metals in shallow marine sediments from Jinzhou Bay, China. *J. Env. Sci.* 2010; **22**: 23-31.

渡邊武. 「新しい養魚飼料」 恒星社厚生閣, 東京. 1994.

渡邊裕之, 法邑雄司, 堀田博. 無機元素組成による輸入カボチャの産地判別. 日本食品科学工学会誌 2008; **55**: 637-639.

Xuejing X, Binchuan Y. Geochemical patterns from local to global. *J. Geochem. Explor.* 1993; **47**: 109-129.

Yamashita Y, Omura Y, Okazaki E. Distinct regional profiles of trace element content in muscle of Japanese eel *Anguilla japonica* from Japan, Taiwan, and China. *Fish. Sci.* 2006; **72**: 1109-1113.

山田充哉, 石橋亮, 河村功一, 古丸明. ミトコンドリア DNA のチトクローム b 塩基配列および形態から見た日本に分布するマシジミ, タイワンシジミの類縁関係. 日本水産学会誌 2010; **76**: 926-932.

吉島重鐵. 東アジアのウナギ養殖(日本水産学会水産増殖懇話会, 懇話会ニュース). 日本水産学会誌 2007; **73**: 975-976.

財務省. 2014 年財務省貿易統計. 2014.

Zhang ZW, Moon CS, Watanebe T, Shimbo S, Ikeda M. Lead Content of rice collected from various area in the world. *Sci. Total Environ.* 1996; **191**: 169–175.

Table 1-1 Identification of *Anguilla* species in eel products by nucleotide sequencing.

Origin of eel products	Number of samples (Blind samples trials)	<i>Anguilla japonica</i>	<i>A. anguilla</i>	Collected year
Japan	40	40	0	2008–2009
China	30	24	6	2008–2009
Taiwan	23	23	0	2008–2009

Table 1-2 Operating condition for ICP–MS instrument

Plasma condition	ICP–MS Elan DRC II	ICP–MS Agilent 7500cx	ICP–OES iCAP 6300 Duo
RF power	1500 kW	1550 kW	1.15kW
Plasma gas	17 L/min	15 L/min	14 L/min
Auxiliary gas	1.3 L/min	0 L/min	1.5 L/min
Neblizer gas	1.05–1.1 L/min	1.05–1.1 L/min	0.75 L/min
Pump	0.10 rps	0.10 rps	25 rpm
Data points	3 points/peak	3 points/peak	
Integration time	0.10 s/point*	0.10 s/point*	
Integration	three times	three times	

* Integration time of Li was 0.3 s/point

Table 1-3 Limit of detection and analytical results of certified reference material (CRM) of ear stone (NIES CRM No.22)

Element	<i>m/z</i>	Limit of detection (µg/g)	Mean ± standard deviation (µg/g) (n = 3)	Certified value ± uncertainty (mg/kg)
Li	7	0.020	—	—
Be ^{a)}	9	—	—	—
Ti	48	2.0	—	—
Sc ^{a)}	45	—	—	—
V	51	0.050	—	—
Mn	55	0.20	—	—
Ni	58	0.50	—	—
Co	59	0.020	—	—
Zn	66	5.0	0.64 ± 0.15 ^{b)}	0.47 ^{c)}
Rb	85	0.010	—	—
Y ^{a)}	89	—	—	—
Sr	86	0.20	2460 ± 58	0.236 ± 0.005 (%)
Cd	111	0.020	—	—
In ^{a)}	115	—	—	—
Ba	138	0.20	3.03 ± 0.08	2.89 ± 0.08
Pb	208	0.20	0.033 ± 0.003 ^{b)}	0.023 ^{c)}
Bi ^{a)}	209	—	—	—
U	238	0.0020	—	—

a) Internal standard b) Below limit of detection c) Reference value

A dash indicates no data available.

Table 1-4 Average trace elemental contents in intermuscular bones in grilled eel fillets derived from Japan, China, and Taiwan

	Mean \pm standard deviation ($\mu\text{g/g}$)								
	Japan (n=40)			China (n=30)			Taiwan (n=27)		
Li	0.20	\pm	0.14	0.33	\pm	0.24	0.14	\pm	0.04
Ti	138	\pm	22	132	\pm	19	139	\pm	21
V	0.07	\pm	0.09	0.06	\pm	0.08	0.14*	\pm	0.10
Mn	126	\pm	89	175	\pm	129	225	\pm	228
Ni	0.96	\pm	0.52	0.91	\pm	0.21	0.81	\pm	0.47
Co	0.42	\pm	0.23	0.34	\pm	0.13	0.28*	\pm	0.07
Zn	150	\pm	45	147	\pm	35	161	\pm	27
Rb	0.73	\pm	0.42	0.76	\pm	0.55	0.92	\pm	0.39
Sr	275	\pm	96	352*	\pm	121	323*	\pm	92
Cd	0.026	\pm	0.013	0.030	\pm	0.017	0.062*	\pm	0.074
Ba	10	\pm	6.1	22*	\pm	15	12	\pm	3.2
Pb	0.10	\pm	0.19	0.61*	\pm	0.62	0.39*	\pm	0.18
U	0.011	\pm	0.019	0.021*	\pm	0.009	0.030*	\pm	0.021

* Asterisks indicate statistical significance compared with Japanese origin ($P < 0.05$).

Table 1-5 Four discriminat models constructed by linear discriminant analysis (LDA) using trace elemental contents in intermuscular bones of eels derived from Japan, China, and Taiwan

Discriminant model	Elements	Country of origin	Number of samples classified correctly	Probability of correct classification (%)
Japan–China	Sr, Ba, Pb, U	Japan	33/40	82.5
		China	28/30	93.3
Japan–Taiwan	V, Ni, Sr	Japan	35/40	87.5
	Pb, U	Taiwan	20/23	87.0
China–Taiwan	Li, V	China	20/30	66.7
		Taiwan	18/23	78.3
Japan–China and Taiwan	Ni, Sr, Pb, U	Japan	33/40	82.5
		China and Taiwan	50/53	94.3

Table 1-6 Verification using cross-validation and blind samples trials of four discriminant models with intermuscular bones of eels derived from Japan, China, and Taiwan

Discriminant model	Country-of-origin	Leave-one-out cross-validation		Blind samples trials	
		Number of samples classified correctly	Probability of correct classification (%)	Number of samples classified correctly	Probability of correct classification (%)
Japan–China	Japan	32/40	80.0	13/13	100
	China	27/30	90.0	11/13	84.6
Japan–Taiwan	Japan	32/40	80.0	13/13	100
	Taiwan	17/23	73.9	8/8	100
China–Taiwan	China	19/30	63.3	7/13	53.8
	Taiwan	17/23	73.9	8/8	100
Japan–China and Taiwan	Japan	32/40	80.0	13/13	100
	China and Taiwan	49/53	92.5	18/21	85.7

* The number of samples classified correctly/ total number of samples

Table 2-1 Origins and body weights of short-neck clam samples used in this study

Origin of short-neck clams	Number of samples (Blind samples trials)	Body weight (g)	Collected year
Japan	156	2.6–40.1	2005–2008
China	56	7.5–23.7	2005–2008
Republic of Korea	60	7.0–16.7	2002, 2006–2008

Table 2-2 Average trace elemental contents in short-neck clams derived from Japan, China, and the Republic of Korea

Element	<i>m/z</i>	Limit of detection ($\mu\text{g/g}$)	Mean \pm standard deviation ($\mu\text{g/g}$)								
			Japan (n = 135)			China (n = 46)			Republic of Korea (n = 50)		
Li	7	0.05	0.89	\pm	0.44	1.3*	\pm	0.56	1.3*	\pm	0.70
V	51	0.02	0.14	\pm	0.12	0.18*	\pm	0.05	0.21*	\pm	0.09
Mn	55	0.1	13	\pm	9.8	22*	\pm	6.6	28*	\pm	13
Co	59	0.1	0.56	\pm	0.06	0.56	\pm	0.07	0.53*	\pm	0.06
As	75	0.1	0.18	\pm	0.19	0.38*	\pm	0.19	0.40*	\pm	0.13
Rb	85	0.01	0.06	\pm	0.06	0.13*	\pm	0.04	0.19*	\pm	0.06
Mo	98	0.02	0.02	\pm	0.02	0.04*	\pm	0.03	0.05*	\pm	0.03
Ba	138	0.2	3.6	\pm	3.4	9.0*	\pm	1.7	6.2*	\pm	1.9
Pb	207	0.05	0.09	\pm	0.08	0.22*	\pm	0.60	0.36*	\pm	0.09
U	238	0.05	0.12	\pm	0.12	0.16*	\pm	0.06	0.14*	\pm	0.07

* Asterisks indicate statistical significance compared with Japanese origin ($P < 0.05$).

Table 2-3 Four discriminant models constructed by linear discriminant analysis (LDA) using trace elemental contents in shell of short-neck clams derived from Japan, China, and the Republic of Korea

Discriminant model	Elements	Country-of-origin	Number of samples classified correctly	Probability of correct classification (%)
Japan–China	Li, V, Mn, Co, As, Ba, Pb	Japan	131/135*	97.0
		China	44/46	95.7
Japan–Republic of Korea	Li, V, Mn, Co, Rb, Ba, Pb	Japan	132/135	97.8
		Republic of Korea	50/50	100
China–Republic of Korea	Rb, Ba, Pb	China	43/46	93.5
		Republic of Korea	39/50	78.0
Japan–China and Republic of Korea	Li, V, Mn, As, Rb, Ba, Pb	Japan	129/135	95.6
		China and Republic of Korea	94/96	97.9

* The number of samples classified correctly/ total number of samples

Table 2-4 Verification using cross-validation and blind samples trials of four discriminant models with shell of short-neck clams derived from Japan, China, and the Republic of Korea

Discriminant model	Country-of-origin	Leave-one-out cross-validation		Blind samples trials	
		Number of samples classified correctly	Probability of correct classification (%)	Number of samples classified correctly	Probability of correct classification (%)
Japan–China	Japan	131/135*	97.0	21/21	100
	China	44/46	95.7	10/10	100
Japan– Republic of Korea	Japan	130/135	96.3	21/21	100
	Republic of Korea	50/50	100	10/10	100
China– Republic of Korea	China	43/46	93.5	9/10	90.0
	Republic of Korea	39/50	78.0	9/10	90.0
Japan–China and Taiwan	Japan	129/135	95.6	21/21	100
	China and Republic of Korea	92/96	95.8	20/20	100

* The number of samples classified correctly/ total number of samples

Table 3-1 Origins of *Corbicula* clam samples used in this study

Origin	Species	Number of samples	Collected year
Lake Abashiri	<i>Corbicula japonica</i>	20	2009–2010
Lake Ogawara		45	2009–2010
Lake Zyusan		35	2009–2010
Lake Hinuma		40	2009–2010
Lake Biwa		18	2010
Lake Tougou		5	2010
Lake Shinji		55	2009–2010
Teshio River		20	2009–2010
Tone River		10	2009–2010
Tama River		10	2010
Edo River		5	2010
Ibi River		10	2010
Oota River		5	2010
Japanese origin <i>C. japonica</i>		260	
Russia	<i>C. japonica</i>	105	2009–2011
China	<i>C. largillierti</i>	15	2009–2010
Lake Biwa	<i>C. sandai</i>	18	2010

Table 3-2 Number of four *Corbicula* spp. (Japanese origin *Corbicula japonica*, Russian origin *C. japonica* , Chinese origin *C. largillierti*, and *C. sandai*) analyzed PCR–RFLP with the restriction enzyme MfeI. Four electrophoresis patterns shows JCJ: Japanese origin *C. japonica*, RCJ: Russian origin *C. japonica* , CCL: Chinese origin *C. largillierti*, and CS: *C. sandai*.

	JCJ	RCJ	CCL	CS	Other patterns	Total
Japanese origin <i>Corbicula japonica</i>	258	2	0	0	0	260
Russian origin <i>C. japonica</i>	57	45	0	0	3	105
Chinese origin <i>C. largillierti</i>	0	0	20	0	1	21
<i>C. sandai</i>	0	0	0	18	0	18

Table 3-3 Origins and body weights of *Corbicula* clam samples used in this study

Origin	Area	Number of samples (Blind samples trials)	Average (g)	Min (g)	Max (g)	Standard deviation
Japan						
Lake Abashiri	Brackish	16 (2)	6.5	4.2	10.5	2.0
Lake Ogawara	Brackish	34 (5)	4.2	2.7	10.2	1.5
Lake Zyusan	Brackish	27 (6)	3.8	2.5	5.4	0.7
Lake Hinuma	Brackish	28 (5)	4.7	2.4	8.2	1.5
Lake Biwa	Fresh	4 (1)	4.0	2.7	5.3	1.4
Lake Tougou	Brackish	3	7.6	6.3	9.4	1.6
Lake Shinji	Brackish	34 (5)	3.5	2.2	5.9	0.9
Teshio River	Brackish	15 (3)	9.3	4.1	15.7	3.6
Tone River	Brackish	7 (1)	5.9	3.3	10.6	2.5
Tama River	Brackish	5 (1)	2.9	1.9	3.3	0.6
Edo River	Brackish	3	3.2	2.7	4.1	0.8
Ibi River	Brackish	4 (2)	3.6	2.5	4.6	0.9
Oota River	Brackish	3	4.3	3.8	4.7	0.5
Total	–	183 (31)	4.7	1.9	15.7	2.3
Russia	Unknown	77 (20)	6.3	2.1	14.5	2.8
China	Fresh	15	4.4	1.7	9.2	1.9
Republic of Korea	Unknown	20	2.4	0.9	5.8	1.4

Table 3-4 Average \pm standard deviation of trace element contents in *Corbicula* clam shells from Japan, Russia, China, and the Republic of Korea

	Li			Mg			V			Mn			Co			As		
<i>m/z</i> or wavelength	7			24			51			55			59			75		
Limit of detection*	0.02			2.0			0.02			1.5			0.05			0.03		
Japan																		
Lake Abashiri	0.08	±	0.01	64	±	10	0.11	±	0.10	69	±	37	1.1	±	0.11	0.24	±	0.13
Lake Ogawara	0.05	±	0.02	48	±	15	0.02	±	0.03	58	±	34	0.88	±	0.31	0.07	±	0.08
Lake Zyusan	0.12	±	0.04	64	±	9.0	0.04	±	0.04	97	±	90	0.93	±	0.08	0.09	±	0.05
Lake Hinuma	0.15	±	0.04	75	±	9.6	0.10	±	0.13	36	±	22	1.1	±	0.26	0.10	±	0.09
Lake Biwa	0.02	±	0.01	27	±	2.2	0.05	±	0.02	30	±	6.9	1.3	±	0.08	0.43	±	0.43
Lake Tougou	0.16	±	0.01	54	±	2.1	0.04	±	0.02	43	±	4.9	1.0	±	0.12	0.30	±	0.10
Lake Shinji	0.15	±	0.04	75	±	11	0.06	±	0.07	134	±	100	1.0	±	0.22	0.11	±	0.06
Teshio River	0.13	±	0.04	80	±	22	0.50	±	0.28	30	±	18	1.1	±	0.23	2.5	±	1.5
Tone River	0.15	±	0.03	84	±	10	0.03	±	0.02	14	±	2.8	1.0	±	0.14	0.14	±	0.11
Tama River	0.15	±	0.11	43	±	21	0.02	±	0.03	2.9	±	2.3	0.59	±	0.45	< LOD		
Edo River	0.39	±	0.13	87	±	5.2	< LOD**			9.1	±	3.5	1.7	±	0.07	0.05	±	0.04
Ibi rier (brackish)	0.15	±	0.05	60	±	14	0.02	±	0.02	13	±	1.5	1.1	±	0.11	0.55	±	0.45
Oota River	0.11	±	0.02	48	±	3.3	0.05	±	0.01	37	±	43	1.1	±	0.08	0.07	±	0.12
Total	0.12	±	0.07	65	±	19	0.09	±	0.17	66	±	70	1.0	±	0.26	0.31	±	0.77
Russia	0.15	±	0.06	69	±	20	0.07	±	0.05	25	±	14	0.87	±	0.19	0.62	±	0.74
China	0.05	±	0.03	38	±	11	0.07	±	0.07	45	±	26	0.95	±	0.12	0.54	±	0.49
Republic of Korea	0.10	±	0.06	61	±	32	0.10	±	0.08	28	±	15	1.1	±	0.17	0.37	±	0.41

*The units for Ca are mg/g, other elements are $\mu\text{g/g}$.

**Limit of detection.

<i>m/z</i> or wavelength	Rb	Ba	Ce	Pb	Sr	Ca
Limit of detection	85	137	140	208	407.7	317.9
	0.02	1.5	0.01	0.02	1	1
Japan						
Lake Abashiri	< LOD	34 ± 18	0.02 ± 0.01	< LOD	1296 ± 142	343 ± 21
Lake Ogawara	< LOD	18 ± 7.9	< LOD	< LOD	1244 ± 206	344 ± 25
Lake Zyusan	< LOD	29 ± 11	< LOD	< LOD	1148 ± 233	330 ± 31
Lake Hinuma	< LOD	5.8 ± 2.3	< LOD	< LOD	1489 ± 120	345 ± 18
Lake Biwa	0.03 ± 0.01	33 ± 6.0	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.03	353 ± 33	328 ± 13
Lake Tougou	< LOD	10 ± 2.7	0.02 ± 0.01	< LOD	1643 ± 21	344 ± 18
Lake Shinji	< LOD	11 ± 3.6	0.02 ± 0.02	0.03 ± 0.04	1591 ± 124	358 ± 29
Teshio River	0.07 ± 0.05	35 ± 21	0.35 ± 0.23	0.11 ± 0.08	1176 ± 111	332 ± 24
Tone River	< LOD	7.7 ± 4.0	< LOD	< LOD	1035 ± 100	332 ± 24
Tama River	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	1136 ± 153	323 ± 21
Edo River	< LOD	2.3 ± 0.4	< LOD	< LOD	1253 ± 130	345 ± 13
Ibi rier	< LOD	22 ± 8.8	< LOD	0.06 ± 0.05	1159 ± 292	351 ± 8.1
Oota River	< LOD	19 ± 6.3	0.02 ± 0.03	0.05 ± 0.05	1084 ± 18	325 ± 19
Total	< LOD	19 ± 15	0.04 ± 0.11	0.02 ± 0.04	1290 ± 296	342 ± 26
Russia	0.03 ± 0.02	23 ± 24	0.07 ± 0.06	0.04 ± 0.06	1115 ± 304	348 ± 31
China	0.07 ± 0.07	111 ± 47	0.09 ± 0.12	0.15 ± 0.17	467 ± 70	333 ± 19
Republic of Korea	0.05 ± 0.03	36 ± 28	0.06 ± 0.06	0.18 ± 0.19	757 ± 263	323 ± 27

Table 3-5 Discriminant model constructed by linear discriminant analysis (LDA) using trace element contents in *Corbicula* clam shells derived from Japan and Russia

Discriminant model	Elements	Country of origin	Number of samples classified correctly*	Probability of correct classification (%)
Japan–Russia	Li, V, Mn, As, Rb, Sr	Japan	164/183	89.6
		Russia	71/ 77	92.2

*The number of samples classified correctly/total number of samples.

Table 3-6 Verification of discriminant model using cross-validation and blind sample trials using *Corbicula* clam shells collected from Japanese lakes and rivers, and Russia

Discriminant model	Country of origin	Leave-one-out cross-validation		Blind sample trial	
		Number of samples classified correctly*	Probability of correct classification (%)	Number of samples classified correctly	Probability of correct classification (%)
Japan–Russia	Japan	164/183	89.6	28/31	90.3
	Russia	68/ 77	88.3	17/20	85.0

*The number of samples classified correctly/total number of samples.

Table 3-7 Result of a measurement of the calibration curve

Element	m/z or wavelength	Square of efficient of correlation			
		Lab 1	Lab 2	Lab 3	Allowance limit
Li	7	1.000	0.999	0.999	0.996
V	51	1.000	1.000	1.000	0.996
Mn	55	1.000	1.000	1.000	0.996
As	75	1.000	1.000	1.000	0.996
Sr	88	1.000	1.000	0.999	0.996
Sr	407.7	1.000	1.000	0.999	0.996

Table 3-8 Result of a measurement of the operation blank

Element	m/z or wavelength	The maximum of the operation blank ($\mu\text{g/g}$)			Allowance limit ($\mu\text{g/g}$)
		Lab 1	Lab 2	Lab 3	
Li	7	0.0021	0.0023	0.00070	0.05
V	51	0.0016	0.0060	0.020	0.05
Mn	55	0.024	0.013	0.029	1
As	75	0.0017	0.00051	0.014	0.05
Sr	88	-0.062	0.47	0.39	100
Sr	407.7	-1.2	5.8	-0.096	100

Table 3-9 Result of a measurement of the limit of detection

Element	<i>m/z</i> or wavelength	The limit of detection (μg/g)			Allowance of the limit of detection (μg/g)
		Lab 1	Lab 2	Lab 3	
Li	7	0.0014	0.0026	0.00073	0.05
V	51	0.0021	0.037	0.022	0.05
Mn	55	0.079	0.060	0.038	1
As	75	0.0064	0.0067	0.016	0.05
Sr	88	0.19	0.85	0.66	100
Sr	407.7	0.97	6.5	0.10	100

Table 3-10 Result of a measurement of the repeatability limit

Element	<i>m/z</i> or wavelength	The repeatability limit			
		Lab 1	Lab 2	Lab 3	The repeatability limit derived from Horwitz equation
Li	7	0.0092	0.039	0.038	0.13
V	51	0.016	0.031	0.036	0.12
Mn	55	0.52	1.5	1.4	10
As	75	0.077	0.22	0.14	0.78
Sr	88	48	85	100	340
Sr	407.7	41	130	36	370

Table 3-11 Result of a measurement of the recovery rate

Element	<i>m/z</i> or wavelength	Average of the recovery rate			Allowance the recovery rate
		Lab.1 (n=3)	Lab.2 (n=3)	Lab.3 (n=3)	
Li	7	115	107	110	80–120
V	51	106	97.8	98.3	80–120
Mn	55	112	100	108	80–120
As	75	111	94.6	116	80–120
Sr	88	94.8	87.2	102	80–120
Sr	407.7	98.2	105	96.6	80–120

Table 3-12 Result of elemental analysis and discriminant score of blind samples

		ICP-MS					ICP-OES		Discriminant score	Discriminant country
Country of origin	Material number	Li 7	V 51	Mn 55	As 75	Sr 88	Sr 407.7			
Material 1 Japanese origin Brackish area	Lab. 1	329	0.181	0.127	208	0.143	1562	1582	9.47	Japanese origin
		699	0.182	0.122	198	0.132	1544	1543	9.41	Japanese origin
	Lab. 2	535	0.166	0.106	183	0.160	1337	1550	8.54	Japanese origin
		144	0.179	0.101	185	0.153	1338	1612	8.79	Japanese origin
	Lab. 3	060	0.197	0.150	205	0.146	1779	1769	10.8	Japanese origin
		731	0.191	0.123	204	0.146	1697	1746	10.4	Japanese origin
Material 2 Japanese origin Brackish area	Lab. 1	414	0.0629	0.0322	63.2	0.0542	1209	1225	8.55	Japanese origin
		111	0.0639	0.0350	62.7	0.0556	1227	1234	8.70	Japanese origin
	Lab. 2	809	0.0695	0.0359(0.0133)*	58.1	0.0865	1057	1241	6.24	Japanese origin
		82	0.0629	0.0359(0.0245)	57.7	0.0908	1064	1225	6.40	Japanese origin
	Lab. 3	389	0.0660	0.0361	61.3	0.0533	1350	1325	9.64	Japanese origin
		425	0.0675	0.0426	65.3	0.062	1394	1391	9.97	Japanese origin
Material 3 Russian origin Brackish area	Lab. 1	128	0.220	0.194	20.2	1.32	1127	1144	−11.8	Russian origin
		956	0.221	0.193	20.1	1.29	1122	1115	−11.8	Russian origin
	Lab. 2	984	0.234	0.165	19.2	1.27	997	1160	−12.3	Russian origin
		251	0.226	0.170	18.5	1.23	962	1156	−12.0	Russian origin
	Lab. 3	882	0.228	0.208	19.4	1.49	1230	1218	−11.8	Russian origin
		492	0.216	0.202	19.1	1.37	1129	1090	−12.2	Russian origin
Material 4 Russian origin Freshwater area	Lab. 1	628	0.0722	0.157	43.8	0.479	513	508	−5.51	Russian origin
		928	0.0718	0.158	44.6	0.462	507	507	−5.31	Russian origin
	Lab. 2	110	0.0733	0.144	43.5	0.504	443	526	−5.87	Russian origin
		582	0.0685	0.128	39.2	0.445	435	517	−5.75	Russian origin
	Lab. 3	648	0.0754	0.151	44.8	0.546	551	525	−6.13	Russian origin
		838	0.0736	0.148	40.9	0.499	539	544	−5.81	Russian origin

* The value of the limit of detection (actual analyzed value)

Table 3-13 Elemental contents of the shell of freshwater clams determined by proposed method in interlaboratory study

Element	<i>m/z</i> or wavelength	Material	Mean ($\mu\text{g/g}$)	Repeatability standard deviation (S_r)	Repeatability relative standard deviation ($\text{RSD}_r\%$)	Reproducibility standard deviation (S_R)	Reproducibility relative standard deviation ($\text{RSD}_R\%$)	HorRat
Li	7	Material 1	0.18	0.0058	3.2	0.012	6.4	0.31
		Material 2	0.065	0.0028	4.3	0.0027	4.1	0.18
		Material 3	0.072	0.0021	2.9	0.0024	3.3	0.15
		Material 4	0.065	0.0028	4.3	0.0027	4.1	0.18
V	51	Material 1	0.12	0.012	9.6	0.019	15	0.70
		Material 2	0.03	0.0054	18	0.011	37	1.67
		Material 3	0.19	0.0029	1.5	0.019	10	0.50
		Material 4	0.15	0.0068	4.6	0.012	7.9	0.37
Mn	55	Material 1	200	4.3	2.2	12	6.1	0.84
		Material 2	61	1.7	2.7	3.2	5.3	0.61
		Material 3	19	0.31	1.6	0.72	3.7	0.36
		Material 4	43	2.4	5.5	2.2	5.1	0.57
As	75	Material 1	0.15	0.0053	3.6	0.010	7.1	0.33
		Material 2	0.07	0.0040	5.9	0.019	28	1.29
		Material 3	1.3	0.055	4.1	0.099	7.4	0.49
		Material 4	0.49	0.031	6.4	0.036	7.4	0.42
Sr	87	Material 1	1600	34	2.1	200	12	2.47
		Material 2	1200	20	1.6	160	13	2.34
		Material 3	1100	43	4.0	110	9.8	1.76
		Material 4	500	6.4	1.3	54	11	1.73
Sr	407.7	Material 1	1600	31	1.9	110	6.7	1.28
		Material 2	1300	28	2.2	76	6.0	1.09
		Material 3	1100	54	4.7	41	3.6	0.65
		Material 4	520	8.2	1.6	15	2.8	0.46

Fig. 1-1

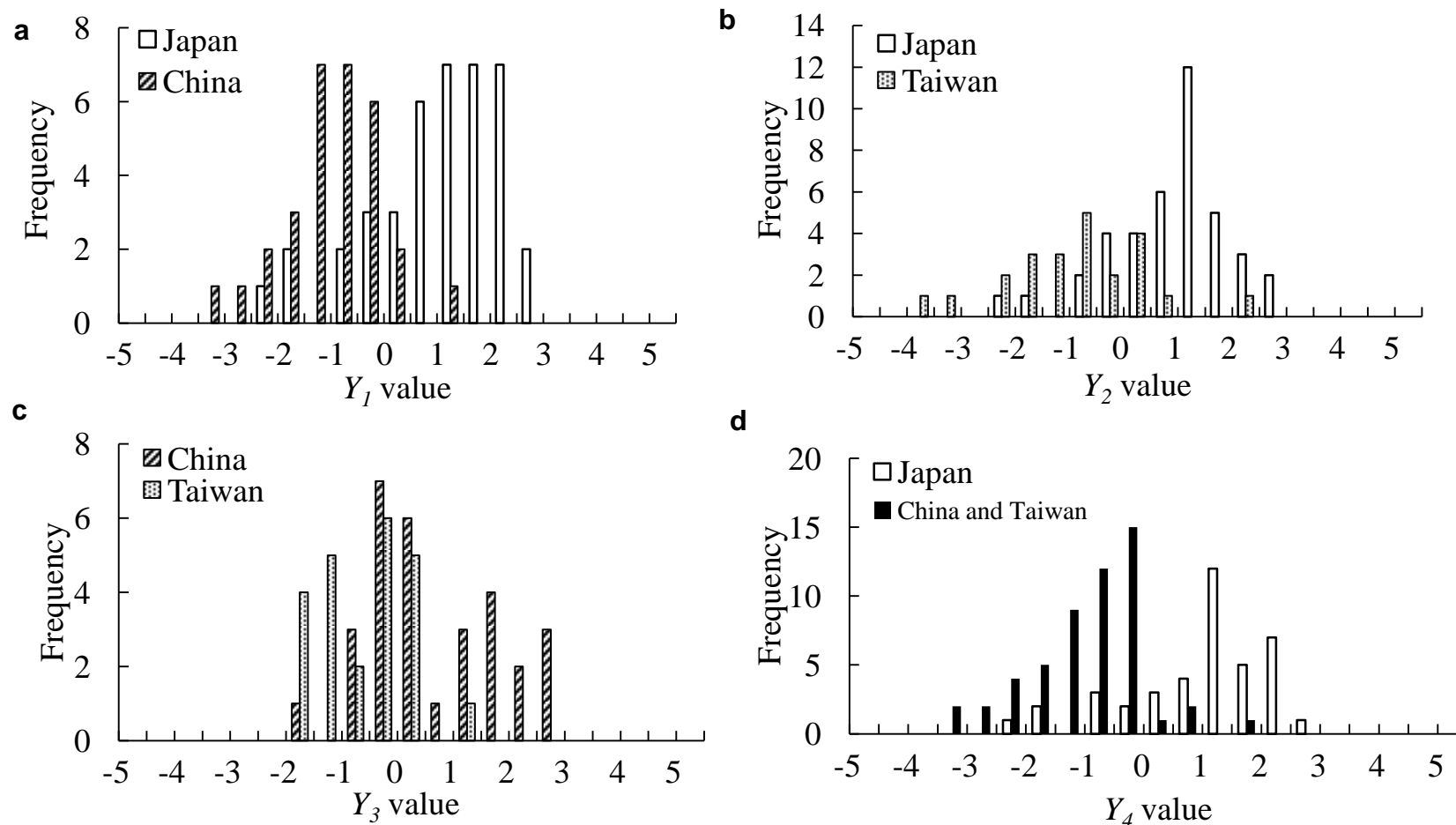


Fig. 1-1 Frequency distributions of discriminant score obtained by four discriminant models in intermuscular bones in grilled eel fillets derived from Japan, China, and Taiwan. **a** The Japan–China discriminant model consisted of 4 elements (Sr, Ba, Pb, and U). **b** The Japan–Taiwan discriminant model consisted of 5 elements (V, Ni, Sr, Pb, and U). **c** The China–Taiwan discriminant model consisted of 2 elements (Li and V). **d** The Japan–China and Taiwan discriminant model consisted of 4 elements (Ni, Sr, Pb, and U). X-axis: elemental content substituted into four discriminant equations (Y_1 – Y_4). Y axis: frequency of discriminant score.

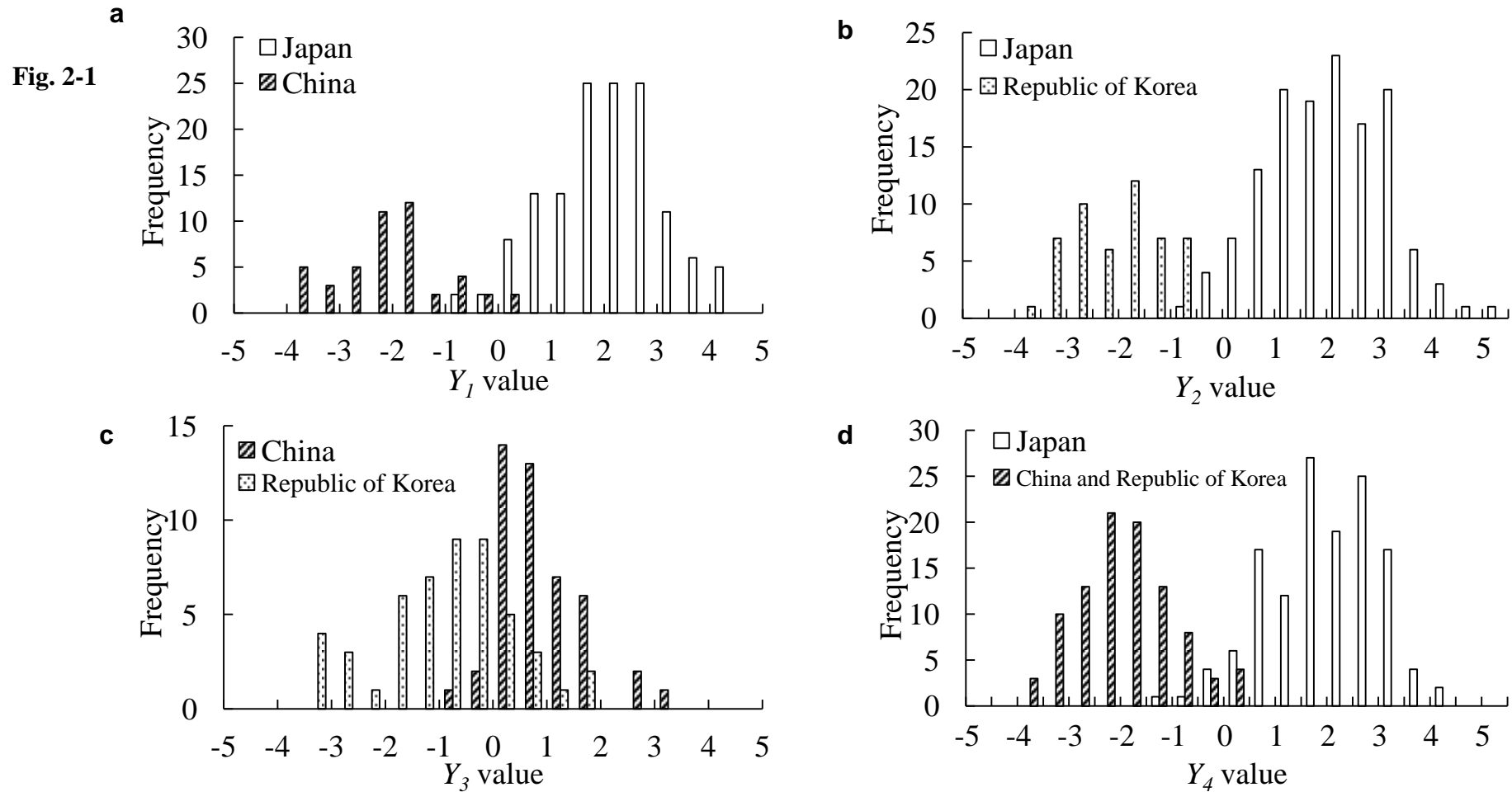


Fig. 2-1 Frequency distributions of discriminant score by four discriminant models in shells of short-neck clams derived from Japan, China, and the Republic of Korea. **a** The Japan–China discriminant model consisted of 7 elements (Li, V, Mn, Co, As, Ba, and Pb). **b** The Japan–Republic of Korea discriminant model consisted of 7 elements (Li, V, Mn, Co, Rb, Ba, and Pb). **c** The China–Republic of Korea discriminant model consisted of 3 elements (Rb, Ba, and Pb). **d** The Japan–China and Republic of Korea discriminant model consisted of 4 elements (Li, Rb, Ba, and Pb). X-axis: elemental content substituted into four discriminant equations (Y_1 – Y_4). Y axis: frequency of discriminant score.

Fig. 3-1

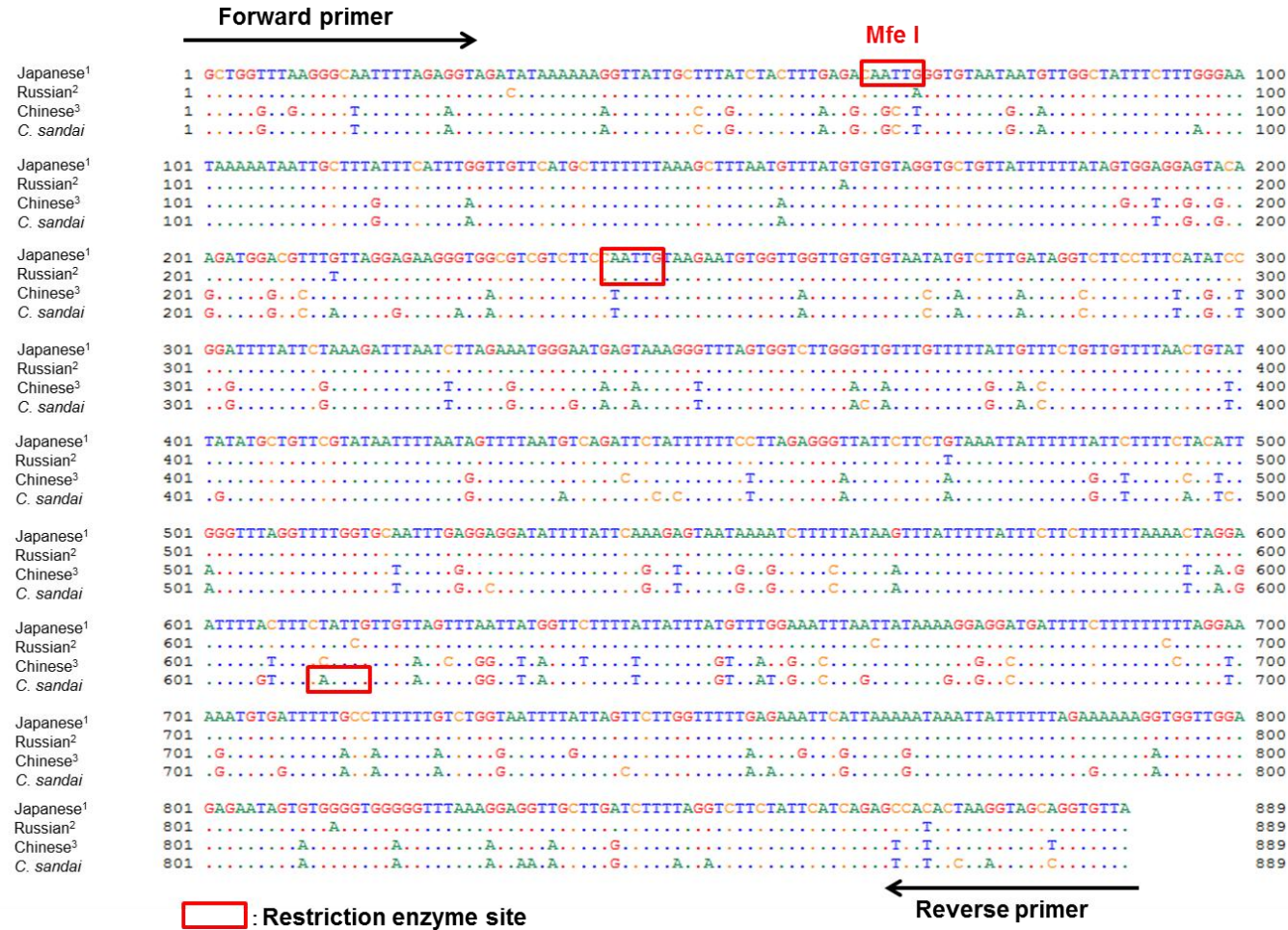


Fig.3-1. The sequences of ND5 gene in mitochondrial DNA from Japanese origin *Corbicula japonica* (1), Russian origin *C. japonica* (2), Chinese origin *C. largillierti* (3), and Japanese origin *C. sandai*. The arrows show primer pair, and the squares show restriction enzyme sites.

Fig. 3-2

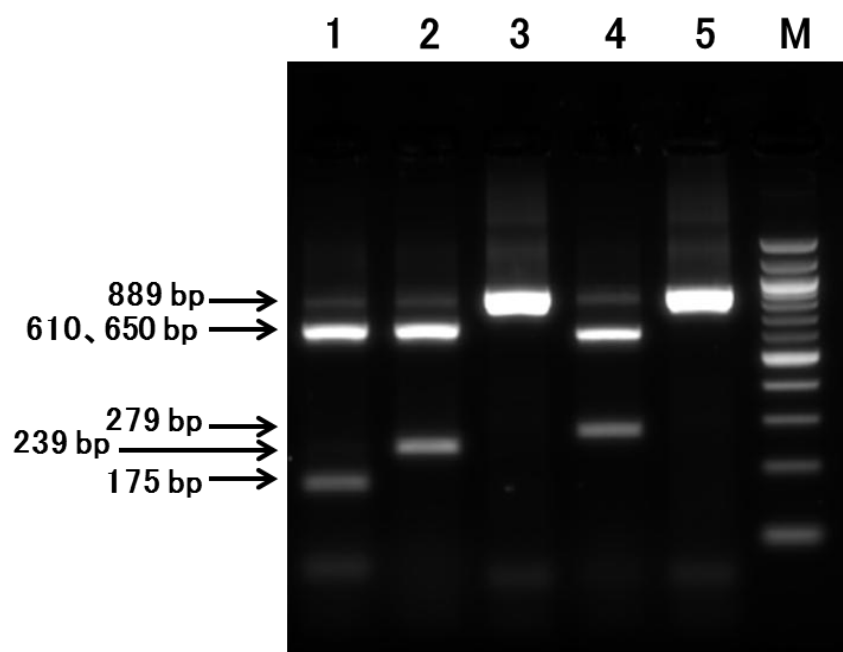


Fig.3-2 Agarose gel electrophoresis patterns for PCR products subsequent RFLP analysis for the four *Corbicula* spp. (Japanese origin *Corbicula japonica*, Russian origin *C. japonica*, Chinese origin *C. largillierti*, and Japanese origin *C. sandai*). RFLP patterns of the four *Corbicula* spp. following digestion with the restriction enzyme MfeI. Lanes 1–4: Japanese origin *Corbicula japonica*, Russian origin *C. japonica*, Chinese origin *C. largillierti*, and Japanese origin *C. sandai*, respectively. Lane 5: Japanese origin *Corbicula japonica* exclude restriction enzyme MfeI. Lane M: 100–bp DNA ladder marker.

Fig. 3-3

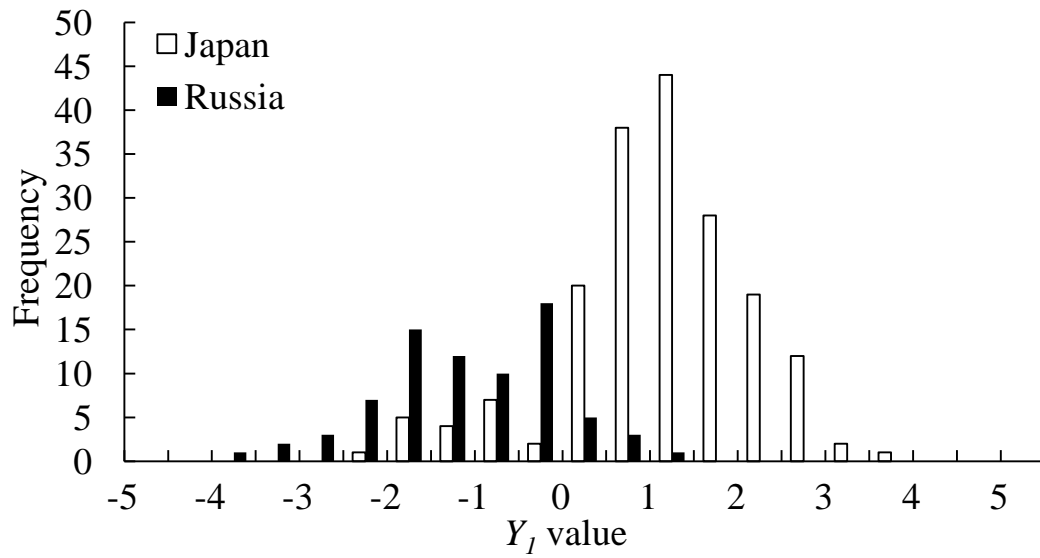


Fig. 3-3 Frequency distributions of the discriminant score from the discriminant model using the elemental contents of the shells of *Corbicula* clams collected from Japan and Russia. The Japan–Russia discriminant model was based on the concentrations of six elements (Li, V, Mn, As, Rb, and Sr). X-axis: elemental content substituted into the discriminant equation (Y_1). Y-axis: frequency of discriminant score.