

論文の内容の要旨

論文題目 元素分析による水産物の原産地判別法に関する研究

氏 名 井口 潤

水産生物の硬組織中の元素は、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、特に魚介類の回遊履歴の解析に用いられている。また、農産物では産地による土質と水質の違いや生育条件を反映して、元素組成が異なることから、原産地判別法が研究されている。このような元素分析法を水産食品に適用することによって、産地ごとの元素組成に関するデータが蓄積し、産地に特有の元素組成を明らかにすることが可能であると考えられる。このような分析法を食品偽装が発生している水産物、特に輸入食品に適用することによって、水産食品の品質表示の内容を科学的に検証し、食品偽装の対策のための鑑別に活用されることが行政機関から期待されている。

近年、安価な外国産の水産食品を国産として販売したり、安価な代替食品を使い高価な食品に偽装したりする事件がウナギ類やアサリ、シジミ類などの魚介類で発生している。このため、原産地または原料原産地の表示が農林物資の規格化等に関する法律（JAS 法）によって生鮮食品を対象に 2000 年から義務付けられた。加工食品では、当初、うなぎ加工品、あじ加工品、わかめ加工品などに対して設定され、徐々に対象品目が拡大され、2007 年に軽度の加工を行った 20 種類の食品群に適用された。

これまでに、食品表示の偽装鑑別を目的として、DNA 分析によって原料の生物種を判別する方法、元素分析または安定同位体比分析によって産地を判別する方法などが研究されている。DNA 分析は、生物の形態的な特徴に基づいて種を同定することが困難な細切された食品や加工品の原料の生物種を同定するために用いられる。対象生物種の生息地が限定される場合は種を同定することによって、原産地を判別することができるが、ニホンウナギ、アサリ、ヤマトシジミなどのように、国産と外国産が同一種の場合は、種判別のための DNA 分析法では産地を判別することができない。一方、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、測定したデータを統計解析することにより、国産・外国産または複数の産地を判別することができると考えられる。元素分析は、試料を粉碎し均質化させた後、有機物を無機態へと加熱分解し溶液化する。その試料溶液に含まれる各元素濃度を誘導結合プラズマ発光分析

装置（ICP-OES）や誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）などを用いて測定する。測定した元素データを統計処理し、判別モデルを構築して、原産地を判別することができる。

本研究は、このような背景のもと、水産重要種であり、外国産の産地偽装が発生しているうなぎ加工品、アサリおよびシジミ類を対象として、産地に特異的な元素組成を見出し、統計処理することによって判別法を開発した。また、近縁種が流通しているウナギ類およびシジミ類については、ミトコンドリア DNA の塩基配列を解析して生物種を判別した。成果の概要は以下のとおりである。

うなぎ加工品の原料原産地判別

蒲焼き、白焼きなどのうなぎ加工品を対象として、原料となるニホンウナギの産地判別法を開発した。日本には主に中国および台湾からニホンウナギの活魚および加工品が輸入されている。原料のニホンウナギは外国産と国産品との間で価格に大きな差があることから、外国産のニホンウナギの加工品が国産として表示して販売する産地偽装事件が発生している。うなぎ加工品の原料原産地表示の真正性を検証する科学的方法の開発が行政部局および業界から求められていることから、元素分析による外国産ニホンウナギの産地判別法を開発した。

ヨーロッパウナギは中国で養殖されるが、日本国内では養殖されていないことから、元素分析に用いたうなぎ加工品を対象として、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した。日本産 53 点、中国産 43 点および台湾産 35 点のうなぎ加工品から DNA を抽出し、ミトコンドリア DNA チトクローム *b* 遺伝子の塩基配列を決定した。試料の魚種を判別した結果、日本産および台湾産の原料魚はすべてニホンウナギであった。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であった。元素分析による原産地判別には、うなぎ加工品に含まれている硬組織として肉間骨を採取して分析に用いた。日本産 40 点、中国産 30 点および台湾産 27 点の肉間骨を硝酸-過酸化水素混液によって、マイクロウェーブ分解装置で有機物を分解し、溶液化後、ICP-MS によって 13 元素（Li, Ti, V, Mn, Ni, Co, Zn, Rb, Sr, Cd, Ba, Pb および U）の元素濃度を測定した。測定した元素データについて線形判別分析を行い、判別モデルを作成した。日本-中国・台湾判別モデルでは、日本産うなぎ加工品 80.0 %を正しく日本産と判別し、中国産および台湾産うなぎ加工品 92.5 %を正しく中国・台湾産と判別した。このように、開発した元素分析による判別法は、日本産と外国産において同じ生物種のニホンウナギが使用された場合でも、産地判別に適用可能であった。

アサリの原産地判別

貝殻の元素分析法による日本産と外国産アサリの原産地判別法を開発した。アサリの国内生産量は、1980 年代には 10 万トン以上あったが、2015 年には 1 万 4 千トンまで減少し

ている。国内生産だけでは日本の消費量を満たすことができないため、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が、日本の消費者は国産アサリを好むため、外国産アサリに国産である旨を表示する産地偽装事件が続いている。アサリは、ミトコンドリア DNA を分析することによって中国・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が、この DNA 分析法では日本産アサリと韓国南岸で漁獲されたアサリとを判別することができない。このため、中国産および韓国産を含む外国産と日本産とを判別する技術の開発が必要であることから、貝殻に蓄積した多種類の元素を分析することによる原産地判別法を開発した。

モデル構築用には日本産 135 点、中国産 46 点および韓国産 50 点のアサリの貝殻を粉碎し、有機物を分解後、ICP-MS により 11 元素 (Li, V, Mn, Co, As, Rb, Mo, Cd, Ba, Pb および U) の元素濃度を測定した。測定した元素データについて線形判別分析を行い、判別モデルを作成した。作成した日本-中国・韓国判別モデルでは、日本産アサリ 95.6 % を正しく日本産と判別し、中国および韓国産アサリ 95.8 % を正しく中国・韓国産と判別した。本研究で開発した元素分析による産地判別法により、ミトコンドリア DNA 分析では判別ができなかった韓国産と日本産アサリの判別が可能となった。また、従来から DNA 分析による判別が可能な中国産と日本産との判別も可能であった。

シジミ類の原産地判別

貝殻の元素分析法によるシジミ類の原産地判別法を開発した。シジミ類は 1970 年代の国内生産量は約 5 万トンあったが、2015 年には 9800 トンまでに減少した。このため、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おり、安価な外国産を国産と表示する産地偽装事件が発生している。このため、日本産のヤマトシジミと外国産のシジミ類を判別し原産地表示の真正性を検証する科学的方法を開発する必要があった。

日本で主に流通しているシジミ類は、汽水域に生息するヤマトシジミ *Corbicula japonica* であるが、輸入シジミ類の約 8 割を占めるロシア産も同様にヤマトシジミであり、形態的な特徴から判別することは困難である。そこで、日本産およびロシア産のヤマトシジミのミトコンドリア 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を見出した。この一塩基多型を利用して PCR-RFLP 法による産地判別法を開発した。ミトコンドリア DNA の ND5 遺伝子を対象にしてプライマーを設計し、増幅したのち、制限酵素 MfeI で処理することによって、日本産ヤマトシジミの場合は 64 bp, 175 bp および 650 bp の断片が得られ、ロシア産ヤマトシジミの場合は 239 bp および 650 bp に切断された。この PCR-RFLP 法によって、日本産ヤマトシジミ 255 点およびロシア産ヤマトシジミ 105 点を分析した結果、日本産ヤマトシジミを正しく日本産と判別する確率は 99.2 %, ロシア産ヤマトシジミを正しくロシア産と判別する確率は 42.9 % であり、ロシア産の判別率が低かった。

一方、元素分析においては日本産 183 点、ロシア産 77 点、中国産 15 点および韓国産 20 点のシジミ類を試料として用いて、貝殻を粉碎したのち、有機物を分解し、試料液に含まれる微量元素を ICP-MS および ICP-OES で分析した。15 元素 (Li, Mg, Ca, V, Mn, Co, As, Rb, Sr, Mo, Cd, Ba, Ce, Pb, U) の濃度を測定し、得られた結果について線形判別分析を行い、判別モデルを構築した。構築した判別モデルは、日本産シジミ類 89.6 % を正しく日本産と判別し、ロシア産シジミ類 88.3 % を正しくロシア産と判別した。

また、開発した元素分析による産地判別法について異なる試験室での検査業務に使用できるかどうかを確認するため室間共同試験を行った。農林水産消費安全技術センターの 3 試験室において、均質化したシジミ類の貝殻の試料の分解から測定までを行い、各試験室の測定値が *HorRat* の許容範囲内に入っていたことから、判別法の妥当性が確認できた。

以上、本研究の成果は、水産重要種であり、産地偽装の件数が多いうなぎ加工品、アサリおよびシジミ類を対象として、硬組織における元素濃度の差違を明らかにして、元素分析による産地判別法を開発したものであり、比較生化学および水産化学に資するところが少なくない。