蛍光指紋によるサトイモの産地判別法開発

中村結花子¹, 藤田かおり², 蔦 瑞樹^{2,†}, 杉山純一², 粉川美踏²,
吉村正俊², 柴田真理朗², 鍋谷浩志^{1,2}, 荒木徹也¹, 中村 哲³

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科,

² 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所

³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

Development of a Method for Determination of the Geographic Origin of Taros Using Fluorescence Fingerprint

Yukako NAKAMURA¹, Kaori FUJITA², Mizuki TSUTA^{2,†}, Junichi SUGIYAMA²,
Mito KOKAWA², Masatoshi YOSHIMURA², Mario SHIBATA²,
Hiroshi NABETANI^{1,2}, Tetsuya ARAKI¹, and Satoru NAKAMURA³

¹ Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo,
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

² National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization,
2-1-12 Kan-nondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8642, Japan

³ Headquarters, Food and Agricultural Materials Inspection Center, Saitama Shintoshin National Government Building,
Kensato Building 2-1, Shintoshin, Chuo-ku, Saitama-shi, Saitama 330-9731, Japan

Fluorescence fingerprints (FF) of 137 Japanese taro samples and 23 Chinese ones, harvested in 2008, were measured in the excitation and emission wavelengths ranging from 200 to 900 nm at 10 nm intervals after grinding and homogenization. The obtained data set was split into calibration and validation data sets. Canonical discriminant analysis was applied to the former to develop a model for the prediction of the country of origin from its FF. Then the model was applied to the validation set to test the model accuracy, which resulted in the misclassification rate of 9.4%. The area under the curve (AUC) of the receiver operating characteristics for the FF method was equivalent to those for inorganic elements composition and the combination of inorganic elements composition and the Sr isotopic ratio. These results showed the potential of FF as a quick and accurate method to determine the geographic origin of taros.

Keywords: excitation-emission matrix, multivariate analysis, non-destructive measurement, false labeling

1. 緒 言

日本では2000年からJAS法によりすべての農産物に対する原産地表示が義務付けられている。中でもサトイモ (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) は、見た目の違いが産地間で小さく、流通時期などのすみわけができていないという理由から、1996年に産地表示義務が課せられた青果物5品目のうちの1つである [1]。日本

へのサトイモの輸入は中国からのものが多く、2011年では日本産の単価 (544 円 /kg) が中国産の単価 (281 円 /kg) の約2倍 [2] と価格差が大きい。そのために中国産に対して国産と表示する産地偽装が頻発している。そこで偽装の抑止力として、科学的根拠に基づく産地判別技術が求められている。

現在サトイモの産地判別技術として、複数の微量元素濃度分析 [3,4] や安定同位体比分析 [5] による手法が試みられており、前者においては、日本産サンプルに対して100%、中国産サンプルに対して93.75%という高い判別率が得られている。しかしこれらの分析手法には、時間のかかる煩雑な前処理や、高価な分析機器、

(受付 2013 年 4 月 15 日, 受理 2013 年 5 月 27 日)

〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

FAX: 029-839-1552, E-mail: mizukit@affrc.go.jp

専門的な知識と技術が必要となる。したがって多くのサンプルの分析を行うような実用的な技術としては不十分であるといえる。このため、実用的に用いることができる迅速で簡便な新たな手法が必要とされている。

蛍光指紋は試料に照射する励起波長、試料から発せられる蛍光波長、そしてその蛍光強度の3軸からなる3次元データである。連続的に変化させた複数の励起波長に対する蛍光スペクトルを順に並べることで得られる。各物質に固有の形状パターンを示し、一般的な蛍光分析に比べ情報量が多いという特徴がある。さらに非破壊かつ非接触で迅速な計測が可能である。これまでにワインの醸造所や醸造年の判別 [6] やエビの産地や品種判別 [7] への適用例が報告されている。また、著者らはマンゴーを試料とした場合に果皮の蛍光指紋を計測することで産地判別の可能性があるという報告を行っている [8]。一方でサトイモのように塊茎や地下茎を食用に用いる野菜類では、収穫後の偽装が容易な皮に付着した土壌の影響を避け、可食部を計測する必要がある。

本研究の目的は、蛍光指紋によるサトイモの産地判別の可能性を明らかにすることである。加えて、従来法である元素濃度および同位体比分析との判別精度の比較を行った。

2. 実 験

2.1 試料

2008 年度に生産された生鮮サトイモを用いた。日本産は直売所にて生産者の氏名および生産地を確認の上 44 都府県から 117 サンプル入手し、海外産として中国産の 23 サンプルを小売店、卸・仲卸業者から入手した。次に調製方法を示す。前処理として、試料を購入後にまず皮をむき、ポリ袋に入れてハンマーでつぶしてから冷凍保存した。そして計測条件をそろえるために、計測直前に 1~2 g 程度をサンプリングしてから、マルチピーズショッカー (MB601, 安井器械(株)) を用いて 2000 rpm で 40 秒間の粉碎を行い、試料を均質化した。その後、試料の一部を測定機器に付属の粉末試料セル

に封入した。1 サンプルにつき封入と蛍光指紋計測を 2 回繰り返した。

2.2 蛍光指紋計測

分光蛍光光度計 (F7000, (株) 日立ハイテクノロジーズ) を使用した。計測範囲は励起波長・蛍光波長ともに、機器で計測可能な全範囲である 200 nm から 900 nm とした。波長間隔は両者とも 10 nm とした。また、ホトマル電圧は 400 V, スキャンスピードは 30,000 nm/min, レスポンスは 0.002 s に設定した。

2.3 データの前処理

Fig. 1 にデータの前処理工程を示す。蛍光指紋には蛍光由来ではないデータも含まれる。そのため蛍光波長 < 励起波長となる条件下にあるデータと、散乱光として蛍光波長 = 励起波長 ± 20 nm 幅、二次光として蛍光波長 = 励起波長 $\times 2 \pm 30$ nm 幅、三次光として蛍光波長 = 励起波長 $\times 3 \pm 30$ nm 幅、四次光として蛍光波長 = 励起波長 $\times 4 \pm 40$ nm 幅の条件下にあるデータを消去した [8]。

(励起波長) $\cdot$ (蛍光波長) を 1 つの (波長条件) として考え、データを並べ替えることで二次元行列データから一次元ベクトルデータへと蛍光指紋を展開した。

2.4 統計解析

統計ソフト JMP9 (SAS Institute Japan 株式会社) を用いて、蛍光指紋、つまり各波長条件における蛍光強度を説明変数とし、産地を目的変数として、正準判別分析を行った。正準判別分析では、説明変数の線形結合により、各サンプルの所属グループを推定する正準判別関数を作成する。線形結合の係数は、説明変数が構成する多次元空間におけるグループ間変動とグループ内変動の比が最大になるように定められ、各サンプルの正準判別関数の出力は正準得点とよばれる。判別すべき 2 つのグループ G_1 , G_2 における正準得点の平均値を m_1 , m_2 としたとき、両者の中点が判別境界として用いられる。すなわち、あるサンプルの正準得点が判別境界を超えるかどうかによって、そのサンプルが

Fig. 1 Preprocessing the fluorescence fingerprint (FF) data.

G_1 , G_2 のどちらに所属するかを判定する。

解析においては全データを、キャリブレーションセットとバリデーションセットの2グループに折半して分析に供した。まずキャリブレーションデータセットを用いて正準判別関数を作成した。この際に変数選択を行い、多くの波長条件の中から判別に有用な波長条件のみを抽出した。正準判別関数はキャリブレーションセットに合わせて作られるので、オーバーフィッティングにより他のサンプル群には適用できない基準が作られる可能性がある。そこで、バリデーションデータセットに作成した正準判別関数をあてはめて、判別基準としての有効性を検証した。有効性の指標として誤判別率を用いた。誤判別率とは、正準判別関数によって実際の産地とは異なる産地として判別されたサンプルの割合を示す。

変数選択では、ステップワイズ変数選択によりF値の大きいものから順に正準判別関数に取り込み、F値の最大のものの比が1/10以下である場合には取り込まなかった[9]。正準判別関数を変更するたびにF値は変化するため、すでに正準判別関数に取り込まれた変量のうちF値が最大のものの1/10以下になった場合は正準判別関数から除外した。

2.5 従来法との判別精度比較

蛍光指紋による産地判別の精度を検証するため、同一サンプルを用いて行われた微量元素濃度[3,4]およびSr同位体比[5]の従来法による産地判別結果と判別精度を比較した。前者では誘導結合プラズマ発光分析法および誘導結合プラズマ質量分析法にてNa, Mg, P, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Cd及びBaの計13元素の定量を行い、後者では多重検出器型ICP質量分析計を用いて $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ を測定した。得られた測定値を説明変数、産地を目的変数とした正準判別分析を行

い、微量元素分析のみ、または微量元素分析とSr同位体比の測定値両方を用いた正準判別関数を作成した。

蛍光指紋と従来法の判別精度を比較するため、Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線[10]を求めた。ROC曲線とは判別得点の閾値を変えながら横軸に偽陽性率、縦軸に感度をとってプロットしたものである。偽陽性率とは陰性試料のうち誤判別される割合、感度とは陽性試料のうち正しく判別される割合を示す。判別精度の指標としてROC曲線の下面積、Area Under the Curve (AUC)を用いた。AUCは0から1までの値を取り、完全に分類できている場合には1、ランダムな分類の場合には0.5となる。つまりAUCが1に近いほど判別精度が良いことを示す。陽性を中国産、陰性を日本産としてROC曲線とAUCを求め、蛍光指紋、微量元素分析のみ、及び微量元素分析とSr同位体を組み合わせた判別結果の比較を行った。

3. 結果および考察

合計280個の蛍光指紋データが得られた。Fig. 2に得られた日本産および中国産サトイモの蛍光指紋データの一例を示す。両者には励起波長280 nm・蛍光波長350 nm近傍および励起波長320 nm・蛍光波長400 nm近傍に共通した蛍光ピークが確認され、これらはトリプトファンおよびビタミンB6によるものと考えられた[11]。しかしながら産地ごとに特徴的なピークはみられなかった。つまり蛍光指紋の目視による判別は困難と考えられる。

次に、判別分析の結果を示す。変数選択により、3つの波長条件下での蛍光強度が選ばれ、正準判別関数DFとしてそれらの線形結合による式が以下のように作られた。

$$DF = -1.50 \times 10^{-2} \times I(220, 580) - 2.39 \times 10^{-2} \times I(340, 420) + 2.57 \times 10^{-3} \times I(380, 890) \quad (1)$$

Fig. 2 FF contour maps of taros.

ここで, $I(x, y)$ は励起波長 x nm, 蛍光波長 y nm における蛍光強度を示す. Fig. 3 にこのときの正準得点プロットを示す. このプロット図はサンプル間の違いを視覚的に表したものである. 横軸の正準得点 1 が正準判別関数から算出された値で, 判別境界は正準得点 = 1.37 であった.

Table 1 に分類表を示す. 誤判別率はキャリブレーションセットでは 6.3%, バリデーションセットでは 9.4% となった. 誤判別率から, 蛍光指紋データから作られた正準判別関数によって十分にサトイモの産地を判別することが可能であることが明らかになった.

一方でこのとき, キャリブレーションセットでは偽陽性率は 4.3%, 感度は 84.6% で, バリデーションセッ

トではそれぞれ 7.6%, 80.0% であった. 実用的に用いる場合, 偽陽性率を低く抑える, あるいは陽性サンプルの検出を優先するなど, 目的に合わせて判別境界を変更し, 擬陽性率および感度を調整することができる.

Fig. 4 にキャリブレーションとバリデーションの ROC 曲線を示す. AUC はそれぞれ 0.973, 0.952 だった. 一方, 微量元素濃度のみによる場合の AUC は 0.952, 微量元素濃度および Sr 同位体比の組み合わせによる場合は 0.982 だった. これら 2 つの AUC はサンプル群に Leave-one-out cross validation (LOOCV) を適用して得られた判別基準の値である. 以上の数値から, 蛍光指紋は微量元素濃度のみ, または微量元素濃度および Sr 安定同位体比分析と同等の判別能力をもつことが示

Fig. 3 Canonical component score plot.

Table 1 Confusion matrix.

(a) Calibration			(b) Validation		
Actual origin	Predicted origin		Actual origin	Predicted origin	
	China	Japan		China	Japan
China	22	4	China	16	4
Japan	5	111	Japan	9	109

Fig. 4 ROC curve.

された。また今後の解析の際に蛍光指紋データとこれらの分析データと組み合わせ、情報量を増大させることにより判別精度向上の可能性が考えられる。

以上のことから、正準判別関数に採用された3つの波長条件下における蛍光強度は、産地間の違いをよく表すことがわかった。また今回の計測時間は、1つの蛍光指紋として5041波長条件を計測するため約4分を要したが、3波長条件のみを計測すればよいということになれば短縮が期待される。

4. 結 論

サトイモを試料とした場合に蛍光指紋による産地判別が十分に可能であることを示した。また本手法で得られた正準判別関数が微量元素濃度および安定同位体比によるものと同等の判別能力をもつことが示された。前処理の手順の簡便さや計測時間の短さを考慮すると、蛍光指紋は実用的なスクリーニング手法として有効であると考えられる。また、今後の課題として生鮮のものだけでなく冷凍のサトイモについても適用できる正準判別関数を求めることが挙げられる。

5. 謝 辞

Sr 同位体比のデータをご提供いただきました農業環境技術研究所の川崎晃博士に御礼申し上げます。本研究は農林水産省委託プロジェクト「食品・農産物の表示の信頼性確保と機能性解析のための基盤技術の開発」により実施しました。また、JSPS 科研費 萌芽研究 24658220 の助成を受けたものです。ここに謝意を表します。

6. 参 考 文 献

- 1) T. Ueki; "Food Labeling and Authentication Technology" (in Japanese), J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol, **55**, 405-409 (2008).
- 2) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries; 2011 Report of Survey on Trend of Price and Sales of Perishable Food (2012).
- 3) N. I. Kobayashi, K. Tanoi, A. Hirose, T. Saito, A. Noda, N. Iwata, A. Nakano, S. Nakamura, T. M. Nakanishi; Analysis of the Mineral Composition of Taro for Determination of Geographic Origin, J. Agric. Food Chem., **59**, 4412-4417 (2011).
- 4) S. Nakamura, T. Suzuki, H. Horita, A. Nakano; Detection of Falsely Labeled Taro in Japan by Elemental Analysis: Improvement of Discrimination Ability Using a Sampling Plan,

Food Sci. Technol. Res., **18**, 723-733 (2012).

- 5) S. Nakamura, A. Kawasaki, T. Hirata; "Research Results Book No. 492: Integrated research program for functionality and safety of food toward an establishment of healthy diet", Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council ed., Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council, 2013, pp. 36-42.
- 6) C. Yin, H. Li, C. Ding, H. Wang; Preliminary Investigation on Variety, Brewery and Vintage of Wines using Three-dimensional Fluorescence Spectroscopy, Food Sci. Technol. Res., **15**, 27-38 (2009).
- 7) J. K. Eaton, A. Alcivar-Warren, J. E. Kenny; Multidimensional Fluorescence Fingerprinting for Classification of Shrimp by Location and Species. Environ. Sci. Technol. **46**, 2276-2282 (2012).
- 8) Y. Nakamura, K. Fujita, J. Sugiyama, M. Tsuta, M. Shibata, M. Yoshimura, M. Kokawa, H. Nabetani, T. Araki; "Discrimination of the Geographic Origin of Mangoes Using Fluorescence Fingerprint" (in Japanese), J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol, **59**, 387-393 (2012).
- 9) M. Hirono, T. Hayashi; "Method to Utilize Multivariate Data by JMP (JMP Niyoru Tahenryo Deta Katsuyoujutsu)", Kaibundo, Tokyo, Japan, 2004, p.177.
- 10) D. Bamber; The Area above the Ordinal Dominance Graph and the Area below the Receiver Operating Characteristic Graph, J. of Mathematical Psychology, **12**, 387-415 (1975).
- 11) J. Christensen, L. Norgaard, R. Bro, S. B. Engelsen; Multivariate autofluorescence of intact food systems. Chemical Reviews-Columbus, **106**, 1979-1994 (2006).

要 旨

2008年産の日本産サトイモ117個、2008年産の中国産サトイモ23個を粉碎、均一化したのち、それらの蛍光指紋を励起、蛍光波長範囲200-900 nmにおいて、10 nmおきに計測した。得られたデータはキャリブレーションとバリデーションセットに二分した。前者に正準判別分析を適用し、サトイモの産地を判別するモデルを構築した。得られたモデルをバリデーションセットに適用したところ、誤判別率は9.4%となった。Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線の下での面積であるArea Under the Curve (AUC)を蛍光指紋法について求めたところ、微量元素濃度のみおよび微量元素濃度とSr安定同位体比の組み合わせによる既往の産地判別法と同等の値を示した。これらの結果から、蛍光指紋による迅速かつ高精度なサトイモの産地判別の可能性が示された。