報 文

安定同位体比分析によるうなぎ加工品の原料原産地判別

一色摩耶^{1*}, 中村 哲¹, 高嶋康晴¹, 寺田昌市¹, 鈴木彌生子²

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター

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

Determination of the Geographic Origin of Eel Products by Stable Isotope Ratio Analysis

Maya Isshiki^{1*}, Satoru Nakamura¹, Yasuharu Takashima¹, Shouichi Terada¹ and Yaeko Suzuki²

¹ Food Agricultural Materials Inspection Center, 2-1 Shintoshin, Chuo-ku, Saitama 330-9731

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

Stable isotope analysis of carbon, nitrogen, and oxygen ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) was evaluated as a potential tool for discriminating the geographical origin of eel products. We investigated a total of 244 samples collected from two countries; 139 samples from Japan and 105 samples from China. We also developed method to minimize N_2 contamination of $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ measurements, and confirmed the absence of oxygen-exchange during ultrasonic cleaning of the samples. The isotope ratios of carbon, nitrogen, and oxygen were significantly different between the Japanese and Chinese samples. The difference in the isotope ratio between collection years (i.e., 2010 and 2011) was significant for carbon and nitrogen, but negligible for oxygen. Based on these results, we established a linear discriminant model and tested its predictive accuracy by leave-one-out cross validation. Consequently, 97.8% of the Japanese samples and 83.8% of the Chinese samples were correctly identified. We concluded that stable isotope analysis is useful for discriminating the geographic origin of eel products. (Received Aug. 20, 2013; Accepted Nov. 1, 2013)

Keywords : stable isotope analysis, eel products, geographical origin

キーワード : 安定同位体比, うなぎ加工品, 産地判別

うなぎ加工品は JAS 法に基づくうなぎ加工品品質表示基準により, その原材料であるウナギの原産地の表示が義務付けられている。うなぎ加工品の輸入先は約 90% が中国である¹⁾ が, 中国産のうなぎ加工品は日本産に比べて安価であることから, 原材料として「うなぎ (中国)」等と表示すべきところを「うなぎ (国産)」等と, 日本産であるかのように表示して販売されることが懸念される。

ウナギの産地判別技術については, DNA 分析による魚種判別法が既に報告されている¹⁾²⁾。ウナギの養殖は, ジャポニカ種 (ニホンウナギ: *Anguilla japonica*) およびアンギラ種 (ヨーロッパウナギ: *Anguilla anguilla*) を中心に行われている。アンギラ種は中国で養殖されているが, 日本ではジャポニカ種のみが養殖されているため, DNA 分析を用いてアンギラ種と判定された場合は, 輸入品と判別される。しかし, 輸入されるウナギは必ずしもアンギラ種だけではなく, 国産と同じジャポニカ種も養殖されていることから, ジャポニカ種については, DNA 分析以外の有効な産地判別技術が求められている。

そこで, 本研究では, 同一種であっても生育環境の違いを反映するために産地判別可能な技術として注目されている安定同位体比分析を利用して, うなぎ加工品の産地判別法を検討した。安定同位体比は安定同位体の組成を比率で表したもので, 例えば炭素の場合, (質量数 13 の炭素の数) / (質量数 12 の炭素の数) で計算される。安定同位体比は自然界の様々な要因によって変動することが知られている。例えば, 降水の酸素安定同位体比は地域や季節によって異なり³⁾, 植物の炭素安定同位体比は C3 植物と C4 植物で異なり⁴⁾, 土壌の窒素安定同位体比は肥料の種類によって異なることが挙げられる⁵⁾。このような雨や植物の安定同位体比の変動は水や餌を通じて動物組織に反映されるため, 実際に, 安定同位体比分析を利用した動物性食品の産地判別の可能性が報告されている^{6)~11)}。このような特徴から, 同一種のウナギであっても, 日本と中国で養殖されたウナギの水や餌が異なれば安定同位体比分析により産地の判別が可能と考えられる。安定同位体比分析によるうなぎ加工品の産地判別については既に報告されており¹⁴⁾, 酸素

¹ 〒330-9731 埼玉県さいたま市中央区新都心 2-1, ² 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

*連絡先 (Corresponding author), mayais@affrc.go.jp

安定同位体比による日本産と中国産の判別の可能性が示唆されている。しかし、うなぎ加工品の安定同位体比の年および季節変動についての検討はされていない。

また、安定同位体比分析については前処理方法や同位体比の測定方法に関して検討すべき課題がいくつか指摘されている。とくに、産地判別において地理的な要因を反映するため重要な役割を担っている酸素安定同位体比の測定方法には、留意すべき問題点がある。酸素安定同位体比を分析する際に、熱分解過程において試料中の酸素は一酸化炭素ガスに変換され、窒素は窒素ガスに変換される。しかし、一酸化炭素ガスと窒素ガスは同じ m/z 28 で検知されるため、熱分解後のクロマトグラムにおける一酸化炭素ガスと窒素ガスのピーク分離が、得られた結果の真度および精度へ大きな影響を及ぼすと考えられる。実際に、含窒素化合物の酸素安定同位体比を試験室間で比較した結果、試験室間で値が異なったとする報告がある¹²⁾¹³⁾。このような点から、酸素安定同位体比を測定する際は、窒素の影響を十分に検討する必要があると言える。

さらに、試料の前処理が安定同位体比に与える影響についても検討する必要がある。安定同位体は質量数の違いによって反応性が異なることから、化学反応や状態変化の前後で安定同位体比が変動する可能性がある。酸素安定同位体比に関しては、前処理過程において、試料と水などの溶媒との間で酸素交換が起こる可能性もある。鈴木らは、うなぎ加工品の調味料等がウナギ本来の安定同位体比に影響することから、前処理として試料を水で洗浄している¹⁴⁾。しかし、洗浄における酸素の交換反応の有無については検討していない。

そこで本研究では、まず、(1) 酸素安定同位体比の測定条件の検討と(2) 水洗浄による前処理方法がうなぎ加工品の安定同位体比に与える影響の検討を行った。その後、最適な前処理方法および測定条件を用いて、年および季節の異なるうなぎ加工品の炭素、窒素および酸素安定同位体比を分析した。さらに分析結果を統計解析して日本産と中国産の判別関数を構築し、安定同位体比分析がうなぎ加工品の食品表示検査に利用できるかを検討した。

実 験 方 法

1. 試 料

2010年4月から2011年11月に生産されたうなぎ加工品244尾(日本産139尾、中国産105尾)を用いた。日本産は国内生産量を反映するように、鹿児島県産30尾、宮崎県産25尾、愛知県産39尾、静岡県産25尾、三重県産6尾、高知県産5尾、徳島県産5尾、熊本県産4尾を収集した。日本産は漁協等を通じて由来の確かなものを入手し、中国産は卸売業者、商社および小売店等を通じて入手した。品種の違いが判別に影響を与えるか確認するため、入手した中国産の一部についてDNA分析による種の特定を行った

ところ、分析した29尾のうち、ジャポニカ種は21尾、アングラ種は8尾であった。

2. 試料調製

鈴木ら¹⁴⁾の方法を参考に調製した。うなぎ加工品の筋肉組織0.5g-1.0gを切り出し、皮および表面の焦げを除去した。共栓付きガラス試験管に採取し、蒸留水約15mlを加えて10分間超音波洗浄した後、蒸留水を廃棄する操作を3回繰り返して調味液を除去した。クロロホルムとメタノールを2:1で混合した溶媒約15mLを加えて1分間激しく振り、静置して溶媒を廃棄する操作を4回繰り返して脱脂した。静置時間は1回目24時間、2回目1時間、3回目1時間、4回目24時間とした。脱脂後、24時間凍結乾燥し、乳棒および乳鉢で粉碎したものを安定同位体比測定用試料とした。試料のうち半数以上を2点併行で分析し、分析精度の確認を行った。また、管理試料としてウナギ1尾を用意し、筋肉組織の切り出し過程から実試料と一緒に2点併行で分析し、調整日によって値が変動しないか確認を行った。管理試料は-30℃で保管して使用した。

3. 安定同位体比測定

炭素および窒素安定同位体比の測定は、試料約1mgをスズカップに採取し、元素分析計(FlashEA1112, Thermo Fisher Scientific 社製)に接続した安定同位体比質量分析装置(Delta V Advantage, Thermo Fisher Scientific 社製)で行った。燃焼管温度1000℃、還元管温度850℃、GCオーブン温度110℃、Heガス流量100ml/minとした。酸素安定同位体比の測定は、試料約0.4mgを銀カップに採取した後、真空凍結乾燥機で一晩凍結乾燥したものを測定用試料として行った。装置は熱分解型元素分析計(TC/EA, Thermo Fisher Scientific 社製)に接続した安定同位体比質量分析装置(Delta V Advantage, Thermo Fisher Scientific)を使用した。カラムはモレキュラーシーブ5Aカラム(0.6mまたは1.2m)を使用し、反応炉温度1400℃、GCオーブン温度90℃、Heガス流量80ml/minに設定した。

安定同位体比は δ 値を使って国際測定標準からの偏差として表し、単位は‰とした。すなわち、

$$\delta X = R_{\text{試料}} / R_{\text{標準}} - 1 \quad (1)$$

ここでXは、炭素、窒素および酸素のそれぞれに対して、 ^{13}C 、 ^{15}N および ^{18}O を表す。 $R_{\text{試料}}$ は試料の安定同位体比($R(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{試料}}$, $R(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{試料}}$, $R(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{試料}}$)を表し、 $R_{\text{標準}}$ は国際測定標準の安定同位体比を表す。国際測定標準は、炭素についてはVienna PeeDee Belemnite (VPDB)、窒素についてはair nitrogen (Air)、酸素についてはVienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW)とした。

試料の測定値は、試料と同時に測定した自家標準物質で校正した。自家標準物質は、International Atomic Energy Agency (IAEA)が管理する標準物質で値付けを行い、酸素については数値の異なる2種の安息香酸24.21‰ $\pm$ 0.53

%および $90.51\% \pm 0.27\%$ (付与値±標準不確かさ), 炭素についてはアスパラギン酸 $-21.71\% \pm 0.04\%$ およびトリプトファン $-11.71\% \pm 0.03\%$, 窒素についてはアスパラギン酸 $0.73\% \pm 0.06\%$ を使用した. 測定は1試料につき2回行い, 平均値を試料の値とした. 10~12試料ごとに自家標準物質を組み込み測定値の確認を行った. 実試料の測定値から計算した併行標準偏差は, 炭素安定同位体比および窒素安定同位体比は 0.1% ($n=129$), 酸素安定同位体比は 0.5% ($n=129$) であった. また, 管理試料の測定値から計算した日間標準偏差は, 炭素安定同位体比は 0.05% ($n=18$), 窒素安定同位体比は 0.03% ($n=17$), 酸素安定同位体比は 0.2% ($n=39$) であった.

4. 酸素安定同位体比の測定条件の検証

酸素を含み窒素を含まない安息香酸に, 酸素を含まず窒素を含むアゾベンゼンを添加し, 酸素と窒素の質量比を変化させて, 酸素安定同位体比分析における窒素ピークの影響を検証した. 自家標準物質として値付けした安息香酸にアゾベンゼンを添加したものを試料として, 酸素安定同位体比を測定した. 試料中の酸素に対する窒素の質量比は, 0.05, 0.11, 0.19, 0.21, 0.25, 0.30, 0.33, 0.44 および 0.49 の9段階とした.

酸素安定同位体比は, 試料を熱分解して発生する一酸化炭素ピークの面積に基づいて計算するが, 窒素を含む試料の酸素安定同位体比については, 窒素ピークの影響を補正すると精度よく分析が可能であることが報告されている¹⁵⁾. 窒素の影響を補正する方法として, Accoeらは窒素の影響を除いた一酸化炭素ピークの面積値を計算する方法が有効であったと報告している¹⁵⁾. 通常, 一酸化炭素ピークの面積は一酸化炭素ピークの始点をバックグラウンド値として計算するが, Accoeらの計算方法では一酸化炭素ピークの前に溶出する窒素ピークの始点をバックグラウンド値として計算する. これは, 一酸化炭素ピークの始点が窒素の影響によって実際の値より高くなるため, 窒素の影響を受ける前の値, すなわち窒素ピークの始点をバックグラウンド値として使用するという計算方法である. しかし, この方法で計算すると, バックグラウンド値は実際の値より低く見積もられる可能性があるため, 本研究では次に示す方法でも補正を行った. すなわち, それぞれの面積補正值 ($A_{CO\text{ corrected}}$) を以下の式により求め, 計算に使用した.

$$A_{CO\text{ corrected}} = A_{CO} + \Delta t \times (B_{CO} - B_{ref}) / 2 \quad (2)$$

ここで, A_{CO} は一酸化炭素ピークの面積 (mV), Δt は一酸化炭素ピークの幅 (s), B_{CO} は一酸化炭素ピークのバックグラウンド値 (mV), B_{ref} は一酸化炭素ピークの直後のリファレンスガスのバックグラウンド値 (mV) を表す. 図1に式(2)の内容を図示した.

また, 一酸化炭素ピークと窒素ピークの分離が酸素安定同位体比へ及ぼす影響を検証するため, 元素分析計内の分

図1 酸素安定同位体比の面積補正值の計算

$A_{CO\text{ corrected}}$: 一酸化炭素ピークの面積補正值

A_{CO} : 一酸化炭素ピークの面積

Δt : 一酸化炭素ピークの幅

B_{CO} : 一酸化炭素ピークのバックグラウンド値

B_{ref} : 一酸化炭素ピークの直後のリファレンスガスのバックグラウンド値

離カラムについて0.6mと1.2mのものを使用し, 酸素安定同位体比の比較を行った.

5. 統計解析

分離カラムの影響については, Tukey-Kramer検定によりすべての群について測定値の対比較を行った (有意水準1%). 超音波洗浄処理の影響については, Studentの t 検定により2群間の平均値の差を検定した (有意水準1%). 季節変動の影響については, 一元配置分散分析により製造月の間で測定値に差があるか調べた (有意水準1%). 安定同位体比の測定結果については, Shapiro-Wilkの正規性検定 (有意水準1%) により正規性が認められた2群間について Studentの t 検定により平均値の差を検定し (有意水準1%), 正規性が認められなかった2群間について Mann-Whitneyの U 検定により差を検定した (有意水準1%). 日本産と中国産の判別関数は, 炭素, 窒素および酸素安定同位体比を説明変数として線形判別分析により構築した. 分析にはR 2.9.0のMASSパッケージを使用した. 判別関数の未知試料に対する予測率を確認するため, 判別関数構築用試料を用いた Leave-one-out cross validation (LOOCV) を実施した. これは1試料のデータを除いて新たに判別関数を構築し, 除いた試料を予測するという操作を全試料について行うことで予測率を得る方法である.

実験結果および考察

1. 酸素安定同位体比の測定条件の検証

(1) 酸素安定同位体比に及ぼす窒素の影響

試料中の酸素に対する窒素の質量比を変化させて, カラム0.6mを用いて酸素安定同位体比を測定した. 測定値に対して酸素安定同位体比の補正計算を行った値と行わなかった値を図2に示した. 補正計算は本研究で示した方法と Accoeら¹⁵⁾の方法の2通りを行った. 補正なしの場合,

図 2 酸素安定同位体比に対する窒素の影響

◆, 補正なし; □, 補正あり (本研究の方法による); ▲, 補正あり (Accoe 等の方法による)
点線は安息香酸の標準値を示す。

酸素に対する窒素の質量比が高くなるほど、酸素安定同位体比は標準値 24.21 ‰ よりも低下する傾向が見られた。一方、本研究で示した方法で補正計算した場合、酸素に対する窒素の質量比に関わらず、標準値に近い値になった。

酸素安定同位体比は、窒素の影響によって値が変動することが報告されており¹²⁾¹³⁾¹⁶⁾、今回の結果はそれらの報告に一致した。試料中の酸素と窒素は熱分解により一酸化炭素ガスと窒素ガスに変換され、分離カラムで分離された後、質量分析計に入って検出される。酸素安定同位体比は m/z 28, 29, 30 の一酸化炭素ピークの面積を基に計算され、窒素安定同位体比は m/z 28, 29 の窒素ピークの面積を基に計算される。よって、正確な酸素安定同位体比を得るためには m/z 28, 29 において一酸化炭素と窒素のピーク分離が重要となる。一方、硝酸塩を分析した報告¹⁵⁾¹⁷⁾¹⁸⁾では、イオン源で形成される m/z 30 の一酸化窒素ピークが、酸素安定同位体比に影響を与えることが報告されている。一酸化窒素ピークは、試料の窒素とイオン源周りに残存する水分やリーク由来の酸素が反応して生成するため、バックグラウンドレベルまで下がるのに時間がかかると考えられており¹⁵⁾、一酸化炭素ピークとの分離が難しい。このバックグラウンドの影響を受けて、一酸化炭素ピークの m/z 30 のバックグラウンド値は実際の値よりも高くなる。よって、 m/z 30 の一酸化炭素ピークの面積値は実際の値よりも低くなり、酸素安定同位体比の値は標準値よりも低くなったと考えられる。試料中の酸素に対する窒素の質量比が高くなるほど、イオン源に導入される窒素の量が増加して一酸化窒素が多く生成し、 m/z 30 のバックグラウンド値が高くなった結果、酸素安定同位体比は低くなる傾向を示したと考えられた。

窒素の影響を Accoe らの方法で計算したところ、酸素に対する窒素の質量比が高くなるほど高い値となり、最大で標準値に対して 11.6 ‰ 高い値になった。これは、採用し

表 1 カラム長さおよび補正の有無と酸素安定同位体比

カラム長さ (m)	補正*	$\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ (‰)**
0.6	無	11.21 ± 1.21^a
1.2	無	$12.79 \pm 0.75^{\text{ad}}$
0.6	有	$13.51 \pm 1.06^{\text{bd}}$
1.2	有	$13.78 \pm 0.77^{\text{cd}}$

平均値±標準偏差で表示 ($n=5$)

* 本文の (2) 式を用いた補正の有無を示した。

** 異なる英文字は Tukey-Kramer 法による検定で有意差 ($p < 0.01$) があることを示す。

たバックグラウンド値が実際の値より低いためと考えられた。そこで、本研究では新たに一酸化炭素ピークの後に溶出するリファレンスガスの始点をバックグラウンド値とする方法で修正した。その結果、酸素安定同位体比は標準値に対して 3.4 ‰ 以内で補正された。従って、本研究における実試料の分析では、酸素安定同位体比をこの方法で計算した。

(2) 酸素安定同位体比に対する分離カラムの影響

含窒素化合物の酸素安定同位体比を精度よく測定する補正計算以外の方法として、分離用 GC カラムを長くすることが挙げられる。装置付属のカラムは 0.6 m であるが、1.0 m–1.5 m に変更することが有効であると報告されている¹⁶⁾。よって、カラムを 0.6 m から 1.2 m に変更してウナギ試料の酸素安定同位体比を測定し、それぞれのカラムについて、(2) 式による補正なしの値と (2) 式による補正ありの値を比較した (表 1)。

カラム 0.6 m で測定した補正なしの値と補正ありの値を比較したところ、補正なしの値のほうが有意に低い値となった。また、カラム 0.6 m とカラム 1.2 m で測定した補正ありの値の平均値を比較したところ有意差は認められなかったが、カラム 1.2 m の標準偏差が小さい傾向にあった (1.2 m で $\pm 0.77 \%$ 、0.6 m で $\pm 1.06 \%$)。カラム 1.2 m で測定した補正なしの値と補正ありの値の平均値を比べたところ有意差は認められなかったが、補正なしの値のほうが約 1 ‰ 低くなった。これは酸素安定同位体比の測定精度と比べて無視できない大きさであると考えられた。

(3) 国際測定標準 IAEA-600 を用いた酸素安定同位体比分析方法の検証

(1) および (2) で最適化した酸素安定同位体比分析条件の検証を行うため、含窒素有機化合物の国際測定標準である IAEA-600 (カフェイン) を測定した。IAEA-600 の酸素安定同位体比の認証値 $-3.48 \pm 0.53 \%$ に対して、分離カラム 1.2 m で分析し、本研究で提案した (2) 式を用いた補正計算を行うと、 $-3.25 \pm 0.14 \%$ ($n=2$) となり認証値の範囲内であった。一方、分離カラム 1.2 m で分析し、補正計算しない場合は $-4.27 \pm 0.05 \%$ ($n=2$) となり、認証値の範囲外であった。よって、酸素安定同位体比分析法

表 2 超音波洗浄したうなぎ加工品の酸素安定同位体比

	$\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}} (\text{‰})^{**}$
蒸留水	$12.41 \pm 0.96^{\text{N.S.}}$
重酸素水*	$12.88 \pm 1.00^{\text{N.S.}}$

平均値±標準偏差で表示 ($n=4$)

* 酸素安定同位体比 250 ‰ に調整した蒸留水.

** N.S. は Student の t 検定で有意差 ($p < 0.01$) が無いことを示す.

としては, カラム 1.2 m で測定し, 得られた値について (2) 式を用いた補正計算を行う方法がより適切と考えられた.

2. うなぎ加工品の酸素安定同位体比に対する超音波洗浄処理の影響

ウナギの構成要素であるアミノ酸や糖類の酸素原子は, 周囲の水の酸素原子と交換する可能性があることが報告されている¹³⁾¹⁹⁾。そこで, 調味液の除去のために蒸留水による超音波洗浄処理を行った際に, 試料と蒸留水の酸素原子が交換しないか確認するため, 蒸留水で洗浄した試料と酸素安定同位体比 250 ‰ に調整した蒸留水 (重酸素水) で洗浄した試料の酸素安定同位体比を比較した (表 2)。その結果, 得られた平均値およびその標準偏差に有意差は認められず, 蒸留水による超音波洗浄処理は試料の酸素安定同位体比に有意な影響を与えないことがわかった。ただし, 酸素交換について, 酸素安定同位体比 250 ‰ の水を 80℃ 48 時間でアミノ酸と反応させた場合に酸素交換が認められたとの報告¹³⁾がある。おそらく今回の処理が常温かつ短時間であったために, 酸素交換反応がほとんど起こらなかったと考えられる。

3. うなぎ加工品の炭素・窒素・酸素安定同位体比

(1) 日本産および中国産うなぎ加工品の炭素・窒素・酸素安定同位体比の比較

日本産と中国産のうなぎ加工品の窒素・酸素安定同位体比の分布を図 3 に, 炭素・酸素安定同位体比の分布を図 4 にそれぞれ示した。2010 年と 2011 年に収集した試料を区別して示した。窒素安定同位体比は日本産と中国産の分布が重なる傾向が見られたが, 酸素安定同位体比は分かれる傾向が見られた (図 3)。一方, 炭素安定同位体比の分布は日本産と中国産で分かれる傾向が見られた (図 4)。図 3 と図 4 を比較すると, 炭素・酸素安定同位体比の分布のほうがより明確に二国間の分布が分かれる傾向があった。

平均値±標準偏差を確認したところ, 窒素安定同位体比は日本産 $16.5 \text{ ‰} \pm 1.0 \text{ ‰}$, 中国産 $15.6 \text{ ‰} \pm 1.2 \text{ ‰}$, 炭素安定同位体比は日本産 $-17.2 \text{ ‰} \pm 0.4 \text{ ‰}$, 中国産 $-17.8 \text{ ‰} \pm 0.7 \text{ ‰}$, 酸素安定同位体比は日本産 $13.1 \text{ ‰} \pm 0.7 \text{ ‰}$, 中国産 $15.2 \text{ ‰} \pm 1.1 \text{ ‰}$ となり, いずれの安定同位体比においても有意差が認められた。

動物組織の炭素および窒素安定同位体比は餌の影響を受けることが報告されている^{20)~25)} ことから, うなぎ加工品の

図 3 うなぎ加工品の窒素・酸素安定同位体比

◆, 中国産 2010 年; ◇, 中国産 2011 年; ▲, 日本産 2010 年; ○, 日本産 2011 年.

図 4 うなぎ加工品の炭素・酸素安定同位体比

◆, 中国産 2010 年; ◇, 中国産 2011 年; ▲, 日本産 2010 年; ○, 日本産 2011 年.

炭素および窒素安定同位体比の差は, 日本産と中国産の養殖用飼料の安定同位体比の違いを反映していると考えられる。鈴木ら¹⁴⁾ は日本産と中国産のうなぎ加工品の炭素および窒素安定同位体比について差はなかったと報告しており, 今回の結果と異なる。飼料を構成する原料やその組成はその年の需給状況や価格等によって変動すると考えられ, その変動を反映し, 年によって炭素および窒素安定同位体比に差が出たり出なかったりすると考えられる。2010 年と 2011 年に収集した試料について, 同一産地内で炭素および窒素安定同位体比を比較したところ, 日本産は炭素および窒素安定同位体比, 中国産は炭素安定同位体比で有意差が認められた。従って, 同一産地内であっても飼料の原料構成や組成が年によって変動し, その影響を反映してうなぎ加工品の炭素および窒素安定同位体比が変動してい

ると考えられる。

一方、動物組織の酸素安定同位体比は、その動物が育った地域の水の値と相関があることが報告されている^{10)26)~28)}。ウナギは主に地下水を利用して養殖されることから、日本産と中国産の差は地下水の酸素安定同位体比の違いを反映していると考えられる。地下水の酸素安定同位体比はその地域の降水の平均値を反映することが報告されている²⁹⁾ことから、日本産と中国産の差は降水の平均値を反映していると考えられる。降水の酸素安定同位体比は一般的に、緯度が高くなるほど、気温が低くなるほど、降水量が多くなるほど、そして内陸ほど低くなると報告されている³⁾。中国のウナギの主要産地は福建省や広東省であるが、これらの産地は日本に比べて緯度が低いため、降水の酸素安定同位体比は日本に比べて高くなると考えられる。降水の酸素安定同位体比の年平均値を IAEA の Water Resources Programme³⁾ で確認すると、平均値±標準偏差は東京 $-7.1\% \pm 0.7\%$ 、福建 $-5.2\% \pm 1.2\%$ となっており、中国は日本に比べて高い値であった。中国産のうなぎ加工品の酸素安定同位体比は日本産よりも有意に高い傾向があったとする報告があり¹⁴⁾、今回の結果と一致する。2010 年と 2011 年に収集した試料について同一産地内で酸素安定同位体比を比較したところ、日本産、中国産ともに有意差は認められなかった。降水の酸素安定同位体比は季節や年で変動することが知られているが、地下水は降水の値を平均化した値をとるために変動が小さくなり、差が認められなかったと考えられる。

(2) うなぎ加工品の炭素・窒素・酸素安定同位体比の季節変動

うなぎ加工品の炭素、窒素および酸素安定同位体比について季節変動の有無を確認するため、2011 年 1 月から 9 月の間に製造された日本産のうなぎ加工品 48 件について、製造月ごとに値をプロットした (図 5)。全体的にいずれの元素の安定同位体比においても季節に応じて大きく変動するような傾向は見られなかった。また、製造月の間に平均値の有意差は認められなかった。牛肉の安定同位体比は季節変動があることが報告されている⁸⁾が、本研究では、日本産のウナギの季節変動はそれほど大きくない可能性が示唆された。炭素および窒素安定同位体比の季節変動については、餌の原料や組成の季節変動が小さいことを反映していると考えられる。酸素安定同位体比については養殖に用いる地下水の季節変動が小さいことを反映していると考えられる。

4. 日本産と中国産の判別

炭素、窒素、および酸素安定同位体比を説明変数として、線形判別分析により、日本産と中国産の判別関数を構築した。

$$Y = 1.19\delta^{13}C - 0.09\delta^{15}N - 0.88\delta^{18}O + 34.88 \quad (3)$$

図 5 2010 年 1 月から 9 月の間に製造された日本産うなぎ加工品の安定同位体比の季節変動

a) 炭素安定同位体比, b) 窒素安定同位体比, c) 酸素安定同位体比。

判別得点が正の場合は日本産、負の場合は中国産と判定した。この判別関数により、日本産 139 件については 97.8% が、中国産 105 件については 85.7% が正しく分類された。また、判別関数の予測率を LOOCV により確認したところ、日本産で 97.8%、中国産で 83.8% となった (表 3)。中国産のうち、ジャポニカ種 21 件については、21 件を正しく中国産と予測しており、予測率 100% であった。また、アンギラ種 8 件については、6 件を正しく中国産と予測しており、予測率 75.0% であった。ジャポニカ種に比べてア

表 3 判別関数による分類およびクロスバリデーション

産地	分類		クロスバリデーション	
	%	件数*	%	件数**
日本	97.8	136/139	97.8	136/139
中国	85.7	90/105	83.8	88/105

* 正しく分類された件数 / 判別関数構築用試料の件数を示す.

** 正しく予測された件数 / 判別関数構築用試料の件数を示す.

ンギラ種の件数が少ないため単純に比較はできないものの、いずれの品種でも高い予測率となったことから、安定同位体比分析による産地判別は品種の影響を受けにくい可能性が示唆された。

判別関数の各変数にかかる係数の大きさから、炭素および酸素安定同位体比が判別への寄与が大きかった。炭素安定同位体比は産地内で年変動があるものの産地間差のほうが大きく、判別への寄与が大きくなったと考えられる。窒素安定同位体比は判別への寄与が小さく年変動があるため、変数から窒素安定同位体比を除外して判別関数を構築することも有用と考えられる。酸素安定同位体比は判別への寄与が大きく年変動も認められなかったことから判別に有効な変数と考えられる。

今回のように判別得点 0 を基準として判定すると、予測率の確認において中国産の誤判別率（ここでは中国産を誤って日本産と判定する確率）は 16.2% となり、日本産の 2.2% に比べて高い値になるが、判別得点を正側にずらすことで中国産の誤判別率を低くすることができる。例えば、判別得点 0.3 を基準として式 (3) で判定した場合、中国産の誤判別率 11.4% となり判別得点 0 での判別より低い値になる。ただし、この場合は日本産の誤判別率が 5.0% となってしまう。このように、どちらの誤判別率を小さくしたいかを考慮して、判別得点を正もしくは負の方向にずらすことも有用と考えられる。

判別分析により高い予測率が得られたことから、安定同位体比分析はうなぎ加工品の原料原産地表示の真正性を確認するために有効な分析法であると考えられる。一方、安定同位体比の年変動が考えられることから、定期的に試料を分析して判別関数の有効性を確認し、必要に応じて判別関数の更新を行うことが望ましいと考えられる。

要 約

炭素、窒素、および酸素安定同位体比分析によるうなぎ加工品の原料原産地判別を検討した。酸素安定同位体比分析については、試料の酸素安定同位体比に及ぼす窒素の影響を補正する方法を検討した。分離カラム 1.2m を用いて測定し、かつ本研究で提案した補正計算を行うことで窒素の影響を軽減できることが分かった。また、うなぎ加工品の前処理である調味料洗浄過程における酸素安定同位体交換のリスクを評価し、本研究で用いた水洗浄は試料の値に

影響しないことを確認した。最適化した分析方法を用いて、うなぎ加工品 244 件（日本産 139 件および中国産 105 件）を試料として分析した結果、全ての安定同位体比に有意差が認められた。また、同一産地の試料について収集年度による有意差が炭素および窒素安定同位体比については認められたが、酸素安定同位体比については認められなかった。分析結果に基づいて線形判別分析により判別関数を構築したところ、その予測率は日本産で 97.8%、中国産で 83.8% となった。高い予測率で判別可能であったことから、炭素、窒素および酸素の安定同位体比分析はうなぎ加工品の原料原産地表示の真正性を確認するための有効な分析法であることが示唆された。

本研究を行うにあたり、貴重な御意見と試料収集に御協力いただいた日清丸紅飼料株式会社の寺尾義行氏に感謝いたします。また、試料収集に御協力いただいた、一色うなぎ漁業協同組合、大森淡水株式会社、浜名湖養魚漁業協同組合、JA 東とくしま、大隅地区養ま漁業協同組合、四万十うなぎ株式会社、山七商店に感謝いたします。

文 献

- 1) 若尾卓也, 正田雄一, 常吉俊宏, 梶 眞壽, 久保田裕明, 久保田隆, PCR-制限断片多型法を用いたウナギ種簡易 DNA 鑑定, 日本水産学会誌, **65**, 391-399 (1999).
- 2) Sezaki, K., Itoi, S. and 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.*, **71**, 414-421 (2005).
- 3) Dansgaard, W., Stable isotopes in precipitation. *Tellus*, **16**, 436-468 (1964).
- 4) Farquhar, G. D., Ehleringer, J. R. and Hubick, K. T., Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **40**, 503-537 (1989).
- 5) Alison, S. B., Simon, D. K. and Mark, W., Nitrogen isotope composition of organically and conventionally grown crops. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 2664-2670 (2007).
- 6) Franke, B. M., Koslitz, S., Micau, F., Piantini, U., Maury, V., Pfammatter, E., Wunderli, S., Gremaud, G., Bosset, J.-O., Hadorn, R. and Kreuzer, M., Tracing the geographic origin of poultry meat and dried beef with oxygen and strontium isotope ratios. *Eur. Food Res. Technol.*, **226**, 761-769 (2008).
- 7) Thiem, I., Lupke, M. and Seifert, H., Factors influencing the $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -ratio in meat juices. *Isot. Environ. Health Stud.*, **40**, 191-197 (2004).
- 8) Boner, M. and Forstel, H., Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef. *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 301-310 (2004).
- 9) Heaston, K., Kelly, S. D., Hoogewerff, J. and Woolfe, M., Verifying the geographical origin of beef: The application of multi-element isotope and trace element analysis. *Food Chem.*, **107**, 506-515 (2008).
- 10) 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, **58**, 1023-1028 (2009).
- 11) 一色摩耶, 中村 哲, 高嶋康晴, 安定同位体比分析による豚