

エタノール・農産物等の同位体組成に関する調査研究

＜原材料・原産地評価のための適切なデータベース因子の抽出に関する研究＞

報 告 書

平成 29 年 3 月 31 日

一般社団法人日本海事検定協会

(理化学分析センター)

目次

| | |
|---|----|
| 1. はじめに | 3 |
| 2. 研究目的と背景 | 3 |
| 3. 年度別スケジュール | 5 |
| 4. 年度別の成果 | 5 |
| 4-1 平成 23 年度の成果 | 5 |
| 4-2 平成 24 年度の成果 | 5 |
| 4-3 平成 25 年度の成果 | 6 |
| 4-4 平成 26 年度の成果 | 6 |
| 4-5 平成 27 年度の成果 | 6 |
| 5. 平成 28 年度の研究内容 | 6 |
| 6. これまでの研究成果の概要 | 6 |
| 7. 研究結果 | 9 |
| 7-1 【研究 A】統計手法を用いた農産物の産地判別 トウモロコシの産地判別 | 9 |
| 8. 総合所見 | 17 |
| 9. 文献 | 17 |
| 巻末資料 | 18 |

1. はじめに

わが国で食の安心安全が話題となる中、食品の産地偽装、ブランド偽装が後を絶たない。現在、原材料・原産地及び品種を明らかにするための分析手法として、遺伝子分析（DNA）及び金属元素分析による方法が確立されつつあるが、それぞれに短所と長所を抱えている。DNA分析は種別の特定に特化し、既に多くの農産物に適用されているが、原産地を特定することはできない。金属分析は原産地識別に用いられるが、加工食品には金属を含んだ食品添加物や強化剤が使われているため識別は困難である。

一方、安定同位体比分析は、半永久的に普遍的な安定同位体の存在比を求めることで食品の原料・原産地・天然養殖の違いなどを識別するものである。分析対象とされる炭素(C)・窒素(N)・酸素(O)の軽元素同位体比は農産物が育った環境条件を反映するため、DNA分析や金属分析では困難な原産地判別の可能性が期待されている。しかし、安定同位体比分析は現在一部の研究機関や企業で研究されているものの、殆どの機関で原材料及び原産地を識別するための手法としては、まだ実用化には至っていないとは言えない。

2. 研究目的と背景

本研究は食の安心安全を確立するための策として、軽元素安定同位体比に着目し、原材料及び原産地を識別するための手法の確立に資することを目的とし、エタノール・農産物・海産物を対象に分析を行った。

石油化学資源の危機や地球温暖化抑止対策として、需要が右肩上がりに伸びているバイオエタノールは、エタノール混合ガソリンとして政府が主体となって普及のための検証事業も行われているが、温暖化抑止の観点からして配合するエタノールはバイオ由来でなければならない。現在、ガソリンに混ぜるエタノールについては、原材料・原産地を明記した原産地証明書が必要であるが、根拠となるのが申請書類だけであるため、疑義が生じた場合に限って、理化学的手法による判別分析が必要となる。しかし、エタノールのように製造工程が複雑な貨物の詳細な原産地・原材料判別は難しく、研究実績は少ない¹。

農産物については、いまだ偽装表示などの報道を耳にする。そこで消費者への安心安全のアピールとして生産者の名前や顔を包装に表示する取り組みや、トレーサビリティの導入等も増えているが、科学的根拠をもってそれを保証することは農産物を守ることに繋がる。実際に、コシヒカリなどのブランド農産物の産地判別に関する研究が安定同位体比によって行われている例がある²が、個々にデータベースが必要となる安定同位体比の事例は少ない。また、今までの報告では製品の原料を対象としたものが多く、加工品についてはうなぎ³など一部の報告に限られ、まだまだ少ないのが実状である。

農産物や魚介類を脱脂乾燥し、そのまま測定サンプルとするバルク分析は多くの研究が報告されているが、多くの成分が混在したバルク分析ではそれぞれの成分の安定同位体比が影響しあい、産地判別が難しくなる。そこで、本研究では成分の抽出分や抽出残渣を測定することで、より精度の高い産地判別を試みた。また、産地判別の需要は加工食品において今後ますます増えると予想されるが、加熱や水分・調味料を加えるなどで加工された製品の原材料産地判別は、加えられた工程が多いほど困難となる。そこで、まずは熱と水分を加えた加工によってどれだけ安定同対比が変動するのかを検証し、安定同位体比分析が加工食品の原材料産地判別に適用

¹ 巻末第9章 引用文献(1) 参照

² 巻末第9章 引用文献(2) 参照

³ 巻末第9章 引用文献(3) 参照

可能かを調査する。

3. 年度別スケジュール

| 年度 | 分類 | | | テーマ/目的 | 成果 (判別については可能性を記載 ⁴) |
|----------|-------|-----|-----|--|---|
| | エタノール | 農産物 | 魚介類 | | |
| 平成 23 年度 | ○ | — | — | ● 海外産エタノールの原料・産地判別 | ● アルコールの原料が判別できる (C3 植物・C4 植物・合成エタノール) |
| | — | ○ | — | ● 種々の品目についての検討 (落花生・桃・さくらんぼ・お茶・繊維・コーヒー・植物油) | ● 脱脂処理することで落花生の国内外産判別ができる (測定部位を限定) |
| 平成 24 年度 | ○ | — | — | ● 海外産エタノールの原料・産地判別 | ● 工場単位で判別できる ● 発酵・蒸留過程で同位体分別が起きている ● バルク分析から分離分析 (GC/C/IRMS) にしたことによって精度が向上した |
| | — | ○ | — | ● トウモロコシによる前処理の違いによる判別の有効性の検討 | ● サンプルを脱脂しても判別精度は向上しない |
| 平成 25 年度 | ○ | — | — | ● 外国産エタノールの原料・産地判別 ● 飲料酒の産地判別 | ● 分離分析法の導入でエタノールの原料・産地判別の精度が向上した ● 日本酒・焼酎・ウイスキー・リキュール類などの産地が判別できる (GC/C/IRMS 法) |
| | — | ○ | — | ● トウモロコシの部位ごとにおける同位体比の変動について | ● 測定部位を限定することで判別精度が向上する |
| 平成 26 年度 | — | ○ | — | ● トウモロコシの産地判別 ● タケノコの前処理及び部位による同位体比変動に関する研究 | ● トウモロコシでは、窒素×酸素プロットで国内外の産地の判別ができる ● タケノコでは採取部位の違いが同位体比に大きく影響する (窒素安定同位体比) |
| | — | — | ○ | ● 魚介類の同位体比の利用に関する研究 | ● ブリやクロマグロ (大型魚) は、天然と養殖とで安定同位体比が相違する |
| 平成 27 年度 | — | ○ | — | ● トウモロコシの抽出油による産地判別の研究 | ● トウモロコシの抽出油を分析することで、種子よりも精度よく産地が判別できる |
| | — | ○ | — | ● 生米の産地判別及び炊飯による米の産地判別への影響に関する研究 | ● 生米による産地判別は困難である ● ヨーロッパ産と国内産との判別は可能 ● 米は炊飯加工しても安定同位体比は殆ど変化しない |
| | — | — | ○ | ● 魚介類の同位体比の利用に関する研究 | ● サケ類の天然養殖判別は可能である ● マグロ類は脱脂しても部位による同位体比は大きく変わらない ● 甲殻類は筋肉と内臓とで同位体比が大きく相違する |
| 平成 28 年度 | — | ○ | — | ● 統計手法を用いた農産物の産地判別 | ● トウモロコシの測定データに統計手法を用いて産地判別を行う |

⁴ データベースを構築するほどの検体を分析していないため、判別の可能性について記載した。

4. 年度別の研究成果

本研究の成果について以下の通り年度別に要約した。

4-1 平成 23 年度の成果

- (1) エタノール …… 原料や原産地の異なるエタノールを収集し、炭素、酸素及び水素の同位体比を測定した結果、原料の違い（C3 植物・C4 植物・化学合成エタノール）を判別することが可能となった。
- (2) 農産物（落花生） …… 落花生の産地を判別するため可食部の安定同位体比を測定したが明確に産地判別することが出来なかった。そこで落花生を脱脂して測定した結果、判別精度を向上させることができた。測定部位を限定することが有効である。

4-2 平成 24 年度の成果

- (1) 同位体比分別 …… 東南アジア産の糖蜜エタノールの原料であるサトウキビ・糖蜜・水の同位体比を測定した結果、原料とエタノールの酸素・水素同位体比が明確に識別された。すなわち、発酵、蒸留など製造工程における同位体効果⁵が最終製品のエタノールに反映されることが確認された。
- (2) エタノールの国別・工場別判別 …… 工場によって特異な同位体比を示すものがあることから、地域や工場別に判別できる可能性が示された。また、精度向上を目的として分析装置 GC/C/IRMS を用いて炭素安定同位体比を測定した結果、バルク分析よりも高精度に産地判別の精度を向上させることができた。
- (3) トウモロコシ産地判別の精度向上 …… より高精度な判別法を目的としてサンプルの脱脂を試行したが、精度は向上しなかった。

4-3 平成 25 年度の成果

- (1) エタノールの原料判別の高精度化 …… 炭素安定同位体比測定にガスクロマトグラフィー（分離分析）を適用することで高精度な判別が可能となった。同じ C4 植物のサトウキビ、糖蜜及びトウモロコシであっても炭素同位体比で判別できる可能性が示された。
- (2) エタノールの原産地判別 …… 一部の産地で同じ原料でも産地判別できる可能性が示されたが、水素・酸素の同位体比の測定値にばらつきが大きく（バルク分析）、安定した値を得ることができなかつた。課題は、エタノールの場合と同様に GC/C/IRMS 法を適用して高精度化を図ることである。
- (3) 飲料酒の原料・原産地判別 …… 国内外産の日本酒・焼酎・ウイスキー・リキュール類など、計 105 種類のサンプルについて研究した。北海道産及び大分県産の日本酒・麦焼酎の同位体比が特異なプロット領域を占めたことから、産地判別の可能が示された。ウイスキー・リキュール類については国内外および国内（大分・北海道）での判別が可能である。

酸素・水素同位体比については飲料酒中の水の影響が想定されることから、エタノールと同様にガスクロマトグラフィーによる分離分析によって原料・産地判別する必要がある。

- (4) トウモロコシ産地判別の精度向上 …… 可食部の部位ごとの同位体比の変動を調査した。胚部については個体ごとの同位体比測定値の差が 1‰ と大きく、同じ産地・品種間でも大きな差異が認められたため、胚部を産地同位体比判別には使用することは難しい。胚・種子・皮の各同位体比を比較すると、皮の同位体比が産地の違いを明確に識別できることが確認された。

⁵ 同位体効果とは、原子を同位体で置換したときの物理的・化学的な挙動に差異が生じる現象を言う。同位体効果により変化した同位体組成を比較することで、その物質がどのようなプロセスを経てきたかを推定することができる。

植物サンプルは部位によって同位体比のばらつき（偏差）が大きいことがあるため、測定する際は、同ロットサンプルにおいてばらつきの小さな部位を選定し、選別して分析する必要があります。

4-4 平成 26 年度の成果

- (1) トウモロコシの産地判別 …… 国内外で製造されたトウモロコシについては、酸素・窒素同位体比の測定によって産地判別できる可能性が示された。特に外国産の窒素同位体比は国産に比べてプロット領域が集中するため国内品との判別が容易である。
- (2) タケノコの前処理による同位体比変動 …… 部位の違いと同位体効果の影響を確認するため、その影響が現れ易いと考えられる成長の早い植物を選定して調査することとした。そこでタケノコをサンプルとして、部位ごとの同位体比の相違並びに加工前後の同位体比の変動を調査した。部位の違いによる差異が大きく現れるのは窒素同位体比であることを確認した。
- (3) タケノコの水煮加工による同位体比の変動 …… タケノコについて、サンプル前処理（乾燥条件）による同位体比の変動を調査した結果、加熱調理（水煮）されたものでも⁶十分に乾燥すれば安定した値が得られることを確認した。
- (4) 魚介類の安定同位体比 …… 天然の魚介類は餌の種類も幅広く、移動するため産地判別は難しい。しかし、大型魚のブリやクロマグロについては、天然品と養殖品とで差異があることが確認された。この差異は養殖期間中の給餌の影響によるものと考えられる。

4-5 平成 27 年度の成果

- (1) トウモロコシの抽出油による産地判別 …… トウモロコシから油分を抽出し、炭素及び酸素安定同位体比を測定した。抽出油の同位体比プロットは、種子のプロットよりも産地間に差が見られ、判別の精度向上がみられた。
- (2) 生米及び炊飯加工米の産地判別 …… 生米ではヨーロッパ等の、産地を限定した判別で産地判別の可能性が示された。炊飯加工米では、炊飯前後の安定同位体比に大きな変化はみられなかったことから、炊飯加工米でも生米のデータベースを使用できる可能性が示唆された。
- (3) 魚介類の天然養殖判別 …… 脱脂した筋肉サンプルを用いることで、天然養殖判別できる可能性が示された。しかし、内臓の同位体比は筋肉の同位体比と比較して大きく差がみられたことから、筋肉と内臓の混在サンプルを判別に用いるのは困難である。

5. 平成 28 年度の研究成果の概要

平成 28 年度の研究成果の概要は以下の通りである。

【研究 A】「統計手法を用いた農産物の産地判別」

トウモロコシの安定同位体比測定結果を統計解析し、産地判別を試みた。

トウモロコシ種子及び抽出油データによる産地判別

2 次元プロットと同様に詳細な地域の判別は難しいが、統計解析をすることで国産／外国産の高確率判別の可能性が示された。また、抽出油の炭素安定同位体比が判別関数に与える影響が大きいことが判明した。

6. これまでの研究成果（確認事項・まとめ）

平成 23 年度～平成 27 年度に行った研究によって得られた確認事項は以下の通りである。

- (1) エタノール

⁶ これまで、加工食品は同位体比の変動が起きるため、安定同位体比による判別分析は困難とされていた。

- 1) C3 植物・C4 植物（サトウキビ・糖蜜・トウモロコシ）・化学合成品の判別は可能である。
- 2) エタノールの製造地域・工場の判別は一部で可能である。
- 3) 日本酒，麦焼酎及びウイスキー・リキュールの産地判別は一部地域で可能である。
- 4) 分析装置 GC/C/IRMS を用いて分離分析することで産地判定の精度は大きく向上する。

(2) 農産物

- 1) 落花生は脱脂サンプルを測定することで判別精度が向上する。
- 2) トウモロコシ種子の安定同位体比測定では皮を使うことが好ましい。
- 3) トウモロコシ種子の酸素×窒素同位体比を用いることで国内外判別できる可能性がある。
- 4) トウモロコシの産地特定には種子・抽出油の両者から得られる同位体比情報が有効である。
- 5) タケノコの窒素同位体比は部位の差が大きいことから，測定部位を限定する必要がある。
- 6) タケノコの水煮加工品は，十分に湯煮してから乾燥すれば安定した値が得られる。
- 7) 米は炊飯加工しても同位体比への影響は殆どない。（窒素・炭素・酸素）
- 8) 米はヨーロッパ産と国産とで識別できる。

(3) 海産物

- 1) 大型魚類については，天然養殖判別は可能である。（養殖期間中の餌の影響）
- 2) 魚類では内臓を除いて同位体比を比較することが好ましい。
- 3) マグロは測定部位による同位体比への影響は殆どない。（ただし，内臓除く）
- 4) イカ・カニは筋肉と内臓とでは同位体比は大きく相違する。

【安定同位体比分析法とは（IRMS法）】

安定同位体は半永久的に崩壊しない元素であり、地球上の存在比（%）はほぼ一定である。しかし、気候／降水量／緯度等によって僅かではあるが存在比が異なっており、地域による違いは小数点以下4桁目が僅かに変動する程度である。この僅かな違いを識別して原産地や原料を判別する方法が安定同位体比分析法である。

例えば、植物原料による同位体比の違いは、光合成回路の違いによって現れる。植物は二酸化炭素を吸収し、ブドウ糖や酸素などを生成する（光合成）。この光合成回路の炭酸固定システム（反応経路）は植物の種類によって異なり、炭素の安定同位体比は僅かに変動する。この僅かに変動する炭素の安定同位体比から、原材料を判別することができる。

【安定同位体比の表記方法】

安定同位体比の値の表記方法は「 δ （デルタ）」が使われる。 δ は偏差比を表しており、特定の基準となる標準物質の安定同位体比に対する千分率（パーミル ‰）として表記する。

例えば、一般的に炭素同位体比では次のように表記する。

$$\begin{aligned}\delta^{13}\text{C} &= \frac{\text{サンプルの炭素同位体比} - \text{標準の炭素同位体比}}{\text{標準の炭素同位体比}} \times 1000 \\ &= \left(\frac{\text{サンプルの炭素同位体比}}{\text{標準の炭素同位体比}} - 1 \right) \times 1000\end{aligned}$$

サンプルの炭素同位体比： サンプルの炭素 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比
標準の炭素同位体比： 標準物質の炭素 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比

- (1) $\delta^{13}\text{C}$ ： 炭素安定同位体比（ ^{13}C と ^{12}C の存在比）
- (2) $\delta^{15}\text{N}$ ： 窒素安定同位体比（ ^{15}N と ^{14}N の存在比）
- (3) δD ： 水素安定同位体比（ ^2H と ^1H の存在比） ^2H は以後Dと記載する。
- (4) $\delta^{18}\text{O}$ ： 酸素安定同位体比（ ^{18}O と ^{16}O の存在比）

7. 研究結果

本年度の研究結果は以下の通りである。

7-1 【研究A】統計手法を用いた農産物の産地判別

安定同位体比による原料・原産地の判別では、農産物の炭素同位体比は原料が反映され、酸素及び水素同位体比は原産地の環境が反映され、窒素同位体比は土壌中の窒素源（肥料等）が反映されると言われている。すなわち、これらの軽元素安定同位体比測定結果を組み合わせることによって、原料・原産地の特徴を数値化し、農産物の産地判別に利用できると考えられる。

7-1-1 トウモロコシの産地判別

昨年度までの成果として、トウモロコシの軽元素安定同位体比測定結果の中から2元素プロットにおいて、国内外産地判別ができる可能性を示してきた（たとえば図1 種子【窒素×酸素】プロット）。

しかし、これまでのプロットは、一度に2元素しか比較できず、産地判別の判定に限界があった。

そこで、本研究では統計手法（多変量解析・数値解析）を用いて複数の元素を同時に解析することにより産地判別を試みた。

統計手法を用いる利点は以下の通りである。

- (1) 複数のデータ（変数）の相関を関数式に置き換えることが可能である。
- (2) 判別分析を用いることで標本の有効性を検討できる。
- (3) 対象サンプルの産地判別分析結果を具体的な数値として予測できる。
- (4) 個々のデータ（変数）を組み合わせることで比較することにより、どの変数をもっとも判別への影響が大きい因子であるかを判断できる。

また、今回解析した測定結果は正規分布に従うと仮定し、標準偏差値や正規分布曲線は、産地ごとにばらつきに違いがあると予想されたため、判別分析は重心（中心点）からの距離を用いて判定した。

7-1-2 測定及び判別結果

トウモロコシの種子及び種子から抽出した油（以下抽出油）について安定同位体比を測定し、測定結果を元に数値解析を行い、判別分析を行った。

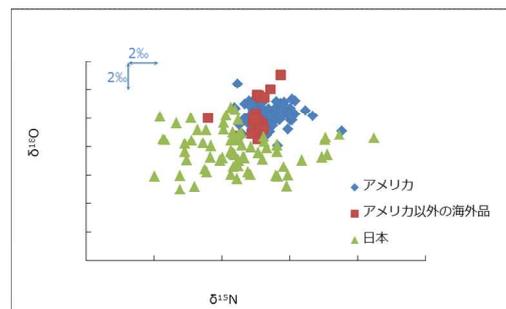


図1 種子【窒素×酸素】プロット
(2014年度実績)

表1 トウモロコシサンプル

| 区分 | 詳細（産地） | バルクデータ数 | 抽出油データ数 |
|------|--------|---------|---------|
| 国内産 | 北海道 | 9 | — |
| | 青森 | 14 | — |
| | 長野 | 6 | — |
| | 群馬 | 6 | — |
| | 茨城 | 8 | — |
| | 宮崎 | 4 | 2 |
| | 福岡 | 6 | — |
| | 鹿児島 | 3 | — |
| | 熊本 | 6 | — |
| | 山口 | 1 | — |
| | 高知 | 2 | — |
| | 大分 | 1 | 1 |
| | 長崎 | 2 | — |
| 沖縄 | 1 | — | |
| 海外産 | アメリカ | 88 | 6 |
| | アルゼンチン | 4 | 2 |
| | ウクライナ | 3 | 3 |
| | ブラジル | 13 | 4 |
| | メキシコ | 1 | 1 |
| | フランス | 1 | 1 |
| | 南アフリカ | 1 | 1 |
| 国内小計 | | 69 | 3 |
| 海外小計 | | 111 | 18 |
| 合計 | | 180 | 21 |

(1) 測定サンプル

国内産 69 検体，外国産 111 検体の計 180 検体のバルク分析（炭素，窒素及び酸素同位体比）及び，国内産 3 検体，外国産 18 検体の抽出油（炭素及び酸素同位体比）を分析に供した。サンプル詳細は表 1 に示す。

(2) 分析方法

凍結乾燥させ粉砕したトウモロコシ種子サンプルに，クロロホルム-メタノール溶液（以下，ホルチ液という）を加えて遠心分離し，上澄み液と沈殿物に分けた。採取した上澄みからホルチ液を揮散除去して得た抽出油をサンプルとした。沈殿物はホルチ液で数回洗浄し，凍結乾燥させたものを種子サンプルとした。種子サンプル（炭素，窒素及び酸素）及び抽出油サンプル（炭素及び酸素）について安定同位体比を測定した。

分析装置及び分析方法⁷は以下の通りである。

- ① 炭素同位体比（ $\delta^{13}\text{C}$ ）： EA-IRMS 法
- ② 窒素同位体比（ $\delta^{15}\text{N}$ ）： EA-IRMS 法
- ③ 酸素同位体比（ $\delta^{18}\text{O}$ ）： TC/EA-IRMS 法

(3) 統計手法による判別

複数の元素を同時に視覚化するため，3次元プロット図を作成した。

3次元プロット図の種類は表 2 の通りである。

表 2 3次元プロット作成の計算式

| 3次元プロットの種類 | 計算式 |
|-------------|------------------|
| 1. 実測値プロット | 測定値－平均値 |
| 2. 標準値プロット | (測定値－平均値) / 標準偏差 |
| 3. 判別関数プロット | 判別関数式より作成 |

統計解析条件上，データ数が 2 検体以下の地域は，数値解析の目的変数として採用できないため解析対象から外した。

明らかとなった事項は以下の通りである。

① トウモロコシ種子の 3 元素同時比較

3次元プロットは，X軸，Y軸及びZ軸に下記の変数を割り当ててプロットした。（表 3）

表 3 3次元プロットの軸の割り当て

| 軸 | 実測値プロット | 標準値プロット |
|-----|---------------------------------|--|
| X 軸 | $\delta^{13}\text{C}$ 【測定値－平均値】 | $\delta^{13}\text{C}$ 【(測定値－平均値) / 標準偏差】 |
| Y 軸 | $\delta^{15}\text{N}$ 【実測値】 | $\delta^{15}\text{N}$ 【実測値】 |
| Z 軸 | $\delta^{18}\text{O}$ 【実測値】 | $\delta^{18}\text{O}$ 【実測値】 |

国内産及び海外産トウモロコシ種子の 3次元プロットを作成した（表 9）。2次元プロットではいくつものグラフを見比べなくてはならなかったが，3次元プロットではいくつものファクターを 1 グラフでまとめることが出来る。

⁷ 分析条件は巻末資料参照

国内産の実数値プロットでは、各都道府県のプロットにばらつきが大きく、各産地（グループ）の重心（中心点）が不明確である。

そこで、実数値プロット変数を標準偏差で割った標準値プロットを作成した。これは変数として測定値と平均値の差を標準偏差で除することにより、実測値の差異を均等に分散させることができるため、差異が大きくまとまりがない変数をコンパクトにし、逆に差異が小さく区別しにくい変数を引き伸ばすことができる。それによって変数を偏在させることなくプロットすることが可能となった。

このように標準値化した値による国内産のプロットは、より変数が濃縮し重心が明確になった。しかし、変数に重なりが多く都道府県別に判別することは難しい。

海外産の標準値プロットにおいても、全体的に産地間の差が明確になり産地の判別がしやすくなった。また、アメリカ産の変数をプロットから除くと、アメリカ以外の産地はデータ数が少ないものの、産地間の差異がはっきりしており産地判別の可能性が示された。

② 国内産トウモロコシ種子の産地判別分析

国内産トウモロコシ種子産地判別分析を県別に行った。（表 10）

判別分析では母集団となる各産地群のデータを元に、判別のための係数及び関係式を作成する。その関係式に変数を代入して得られた結果がどこの産地に属するかを判別する。縦軸（観測値）は実際の産地であり、横軸（予測値）は統計解析によって導き出された予想産地である。観測値と予測値が一致しないサンプルは誤判定とみなす。

国内産トウモロコシ種子の県判別分析（表 10）を行ったが、判別の中率 16%から 87%となりばらつきが大きく全体として精度の良いものにはならなかった（平均判別の中率 60%）。ただし、青森、茨城及び福岡産の判別の中率は 80%以上と高確率となった。

③ 国内産トウモロコシ種子のグループ産地判別

国内を東日本と西日本とに分けて行ったグループ判別分析と、北日本と南日本のグループ判別分析の結果を表 4 及び表 5 に示す。茨城産の一部が九州産に近い位置にプロットされたため、茨城県を南日本に組み入れて南北判別した方がより高確率的中率となった（東西判別の中率 82.5 → 南北判別の中率 88.8%）。茨城県のグループ分けについては、今後検討が必要である。

表 4 国内産トウモロコシ種子の東西判別結果

| 判別結果 | | 予測値（予想産地） | | |
|--------------|----------------------|-----------|-----|-------|
| | | 東日本 | 西日本 | 判別の中率 |
| 観測値 （実産地） | 東日本（北海道，青森，群馬，長野，茨城） | 38 | 5 | 88% |
| | 西日本（福岡，宮崎，熊本，鹿児島） | 6 | 14 | 70% |
| | | | 全体 | 82.5% |

表 5 国内産トウモロコシ種子の南北判別結果

| 判別結果 | | 予測値（予想産地） | | |
|--------------|----------------------|-----------|-----|-------|
| | | 北日本 | 南日本 | 判別の中率 |
| 観測値 （実産地） | 北日本（北海道，青森，群馬，長野） | 29 | 6 | 83% |
| | 南日本（福岡，宮崎，熊本，鹿児島）＋茨城 | 1 | 27 | 96% |
| | | | 全体 | 88.9% |

測定サンプル数が少ないため、判別式作成のための産地変数として採用できなかったサ

ンプル（高知 2 検体，山口 1 検体，大分 1 検体，長崎 2 検体及び沖縄 1 検体）に対して，的中率の高かった南北判別関数を用いて，判別を行ったところ，山口 1 検体及び高知 1 検体が北日本グループと判定されたが，その他はすべて南日本グループと判定された（グループ別予想的中率 71%）。

③ 海外産のトウモロコシ種子の産地判別分析

諸外国のトウモロコシ種子を判別分析によって，判別式を求めた。（表 10 諸外国）

アメリカサンプルは幅広くプロットされるため，精度の高い判別は困難であったが，アメリカ以外の国は的中率 100%という結果となった。

判別分析では，目的データと各産地の集団プロット重心までの距離を求めて比較し，最短距離のグループを産地として判定する。アメリカ以外のサンプルは，アメリカを含む他のどの国の集団プロットよりも自国の集団プロット重心までの距離が最も近かったため，的中率が 100%となった。しかし，全体的に分散したアメリカ産サンプルの中には，アメリカの重心よりも，他国の重心に近かったため，アメリカ産の的中率は著しく低下した。つまり，アメリカ産以外の国（アルゼンチン，ウクライナ，ブラジル）だけであれば産地判別が可能であるが，アメリカ国内の産地特定は難しいという結果となった。ただし，アメリカ以外のサンプルは測定数が少ないため，今後測定数を増やして確認する必要がある。

また，サンプル数の少なかったメキシコ 1 検体，フランス 1 検体，南アフリカ 1 検体に，アメリカのデータを除いて得られた判別係数を適用し 3 次元プロットすると，アルゼンチン，ウクライナ及びブラジルの産地プロットとは離れてプロットされた（判別可）。今後これらのデータ数を増やすことで，それぞれ独自の産地として新たに判別できる国数を増やすことができると考える。

④ トウモロコシ種子の国内産海外産判別

国内産及び海外産の 3 次元プロットを行った（表 9 国内産・海外産）。しかし，国内産と海外産の単なる 3 次元プロットでは，個々の重心が隣接し，且つ各重心間にあるプロットの判別が難しいという結果となった。

そこで，国内を北日本，南日本（茨城を含む）の 2 グループ，外国産を北米，欧州及び南米の 3 グループに分け，計 5 グループに分けて判別分析を行った。その後国内産及び外国産の 2 グループにそれぞれ合算して判定する方法としたところ，国産／外国産の判別は 91%の的中率となった。（表 10 国内産・海外産判別）

⑤ 種子及び抽出油を組み合わせた産地判別分析（5 変数判別）

種子の炭素，窒素及び酸素安定同位体比に，抽出油の炭素及び酸素安定同位体比結果を加えた 5 変数を用いて判別分析を行った。

国ごとの判別結果はすべての産地で 100%という結果となった。（表 6）

また，5 変数プロットについても各プロットが明確に識別され，産地判別ができることが示された。（図 3）

表6 5変数（種子及び抽出油）の産地判別分析結果

| 判別結果 | | 予測値（予想産地） | | | | |
|------------------|-------|-----------|-------|------|----|-------|
| | | アメリカ | ウクライナ | ブラジル | 九州 | 判別の中率 |
| （実観 産測 地値） | アメリカ | 6 | 0 | 0 | 0 | 100% |
| | ウクライナ | 0 | 3 | 0 | 0 | 100% |
| | ブラジル | 0 | 0 | 4 | 0 | 100% |
| | 九州 | 0 | 0 | 0 | 3 | 100% |
| | | | | | 全体 | 100% |

※ アルゼンチン、メキシコ、フランス及び南アフリカについては、測定データが2変数以下であったため判別は省いた。

5変数の産地判別のために作成された判別関数は3つである。（表7）

そのうち、判別関数1の寄与率が最も高く、産地判別に大きく寄与していることがわかる（寄与率94%）。

表8の標準化判別係数では、各関数の中の5変数の安定同位体比の寄与率が示されている。このうち抽出油の炭素安定同位体比に基づく係数が最も大きく、判別に大きく寄与している（1.56）。種子の分析のみでの判別が困難であった事例も、抽出油の炭素安定同位体比のファクターを組み込んだ統計解析を適用することで、産地判別が可能になる事例が増えるものと思われる。

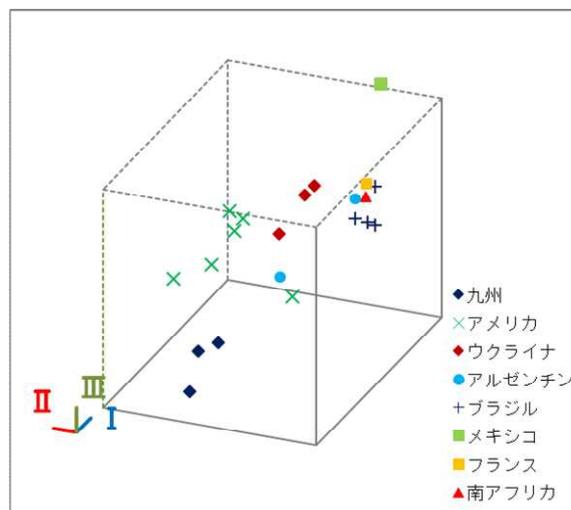


図3 5変数の判別関数3次元プロット

表7 5変数（種子及び抽出油）の判別関数固有値表

| 判別関数 | 固有値 | 寄与率 | 累積寄与率 | 相関比 |
|-------|---------|--------|---------|--------|
| 判別関数1 | 13.8233 | 93.98% | 93.98% | 0.9657 |
| 判別関数2 | 0.6093 | 4.14% | 98.12% | 0.6153 |
| 判別関数3 | 0.2762 | 1.88% | 100.00% | 0.4652 |

表8 5変数（種子及び抽出油）の判別関数標準化判別係数

| 変数 | 関数1 | 関数2 | 関数3 |
|---------------------------|-------|-------|-------|
| 種子 $\delta^{15}\text{N}$ | -0.88 | -0.10 | -0.49 |
| 種子 $\delta^{13}\text{C}$ | 0.72 | 0.02 | -0.77 |
| 種子 $\delta^{18}\text{O}$ | 0.73 | 0.22 | 0.08 |
| 抽出油 $\delta^{13}\text{C}$ | 1.56 | -0.10 | 0.26 |
| 抽出油 $\delta^{18}\text{O}$ | -0.04 | 1.04 | 0.07 |

(2) 小括 …… 種子の炭素、窒素及び酸素安定同位体比の3変数による判別分析では、県別や国別の細かい判別は困難である。しかし、統計解析を用いた国内産や海外産などの大まかな判別は、比較的よい結果となった。また、判別関数により判別の中率などが数値化できることから、今後検体数を増やすことで、より詳細な地域判別が可能になるものと期待される。

また、統計解析をするにあたり、地域のグループ分けについて、様々なパターンを試行することにより、気候や生育環境の共通点や産地の特徴を見出す手掛かりとして活用することも期待できる。

5変数（種子及び抽出油）を用いた判別分析では、抽出油の炭素安定同位体比が産地判別に大きな影響を与えることから、今後抽出油の炭素安定同位体比の測定事例を増やすことで、国や県ごとの判別の可能性が期待される。

表9 トウモロコシ種子の2次元プロットと3次元プロットの比較

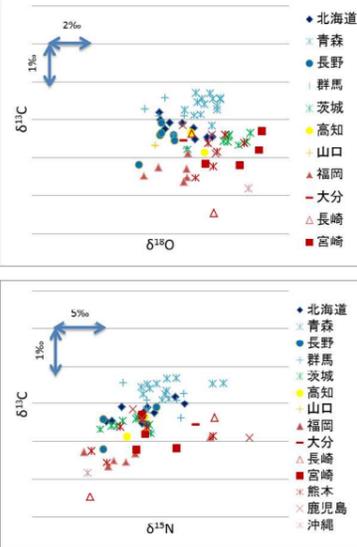
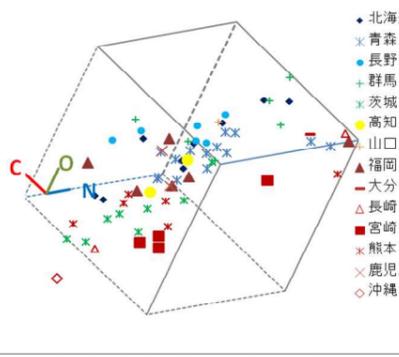
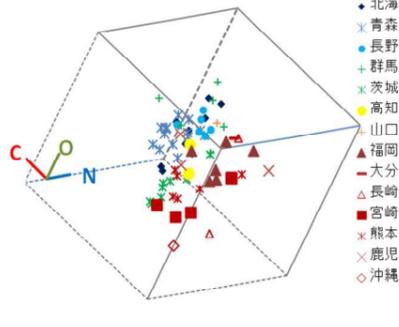
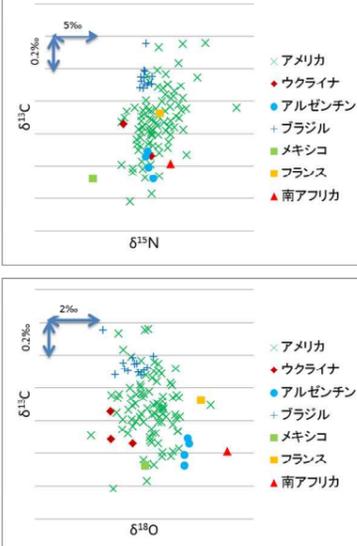
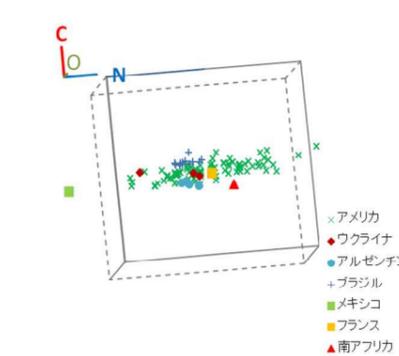
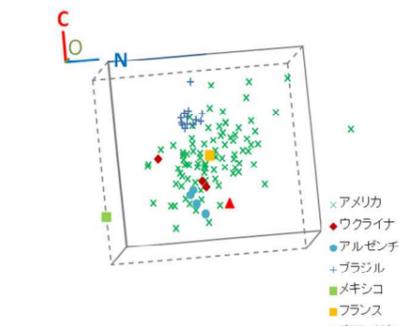
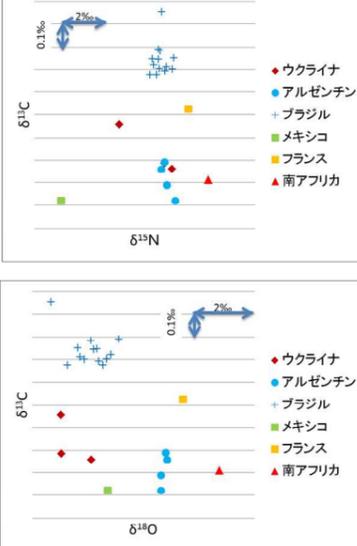
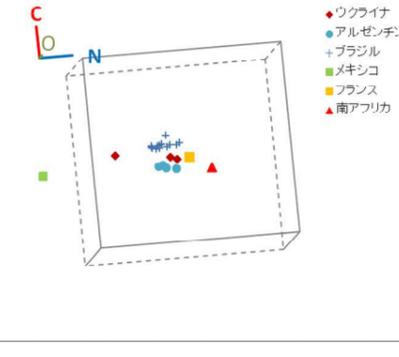
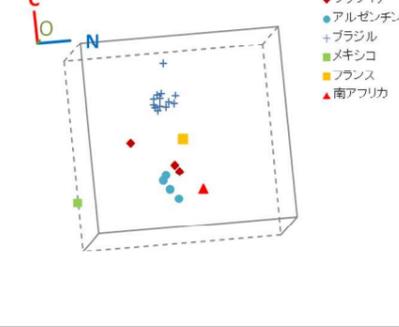
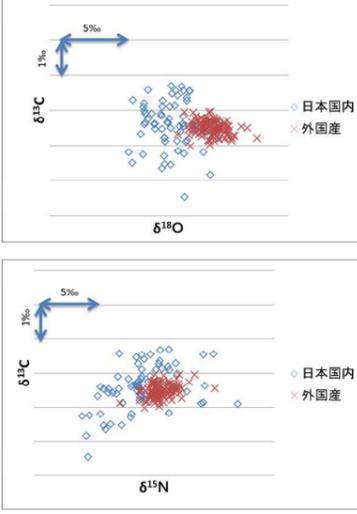
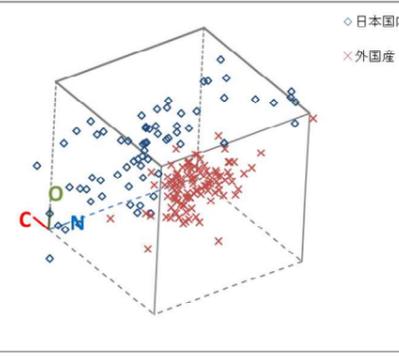
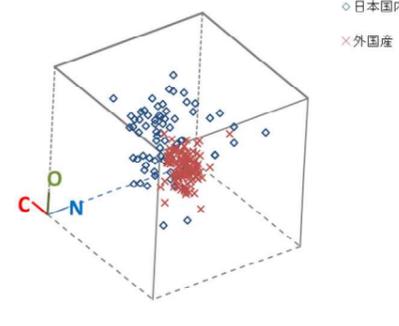
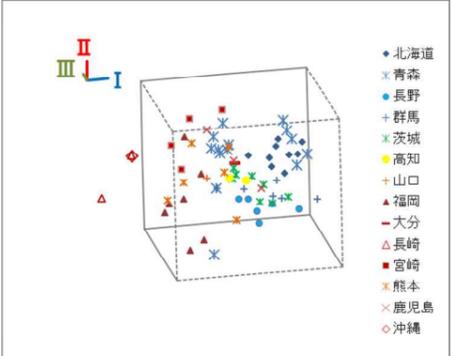
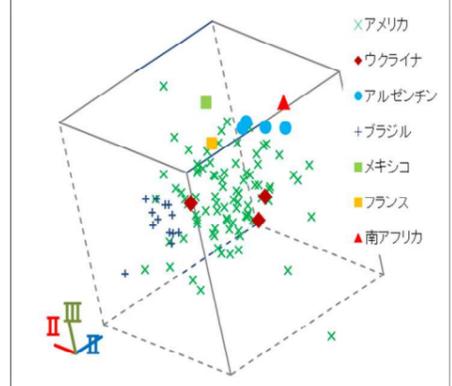
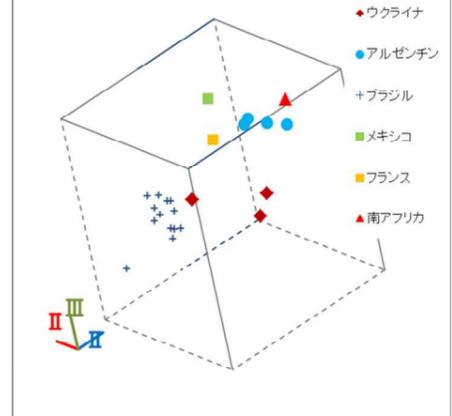
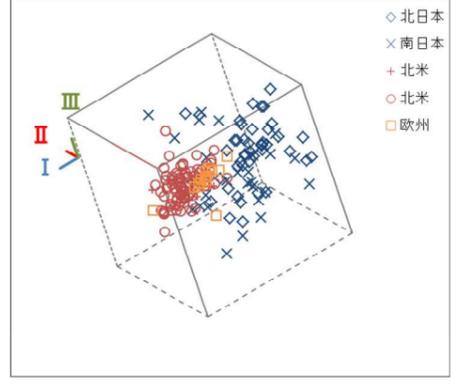
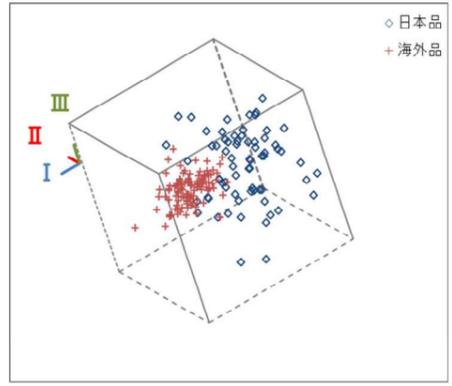
| 種類 | 2次元プロット | 実測値プロット 【測定値－平均値】 | 標準値プロット 【(測定値－平均値) / 標準偏差】 | まとめ |
|------------------|---|--|---|---|
| 国内産 |  |  |  | <p>実数値プロットでは、ばらつきが大きく、各産地の重心（中心点）が不明確である。 標準値プロットを行うことで、より変数が濃縮され、重心が明確になった。 しかし、プロット点が重なる各都道府県についての判別は難しい。</p> |
| 海外産 |  |  |  | <p>アメリカ変数が全体に広がっている。実測値プロットでは、変数に差が見られず全体に濃縮されたプロットになっている。 標準値プロットにすることで変数が分散され、より差異が確認できるようになったが、アメリカ変数が他国と重なっていることから判別は難しい。</p> |
| 海外産 (アメリカを除く) |  |  |  | <p>上図で全体に広がっていたアメリカ変数を除くと、各国を濃縮してプロットすることができた。 また、2次元プロットで偏在していた南アフリカも標準プロットにより濃縮され、判別の可能性が見いだされた。</p> |
| 国内産・海外産 |  |  |  | <p>国内及び海外のみの区分けであると、標準プロットでも重心が隣接するため、判別が難しい。</p> |

表 10 統計判別結果

| 判別グループ | | 判別分析結果 | | | | | | | | | | 判別関数プロット | | |
|--|--------------|--------|----|------------|--------|-------|---|---|--|---|-------|---|----|-------|
| 国内県別判別 | 観測値 (実産地) | 判別結果 | | 予測値 (予想産地) | | | | | | | 判別の中率 |  | | |
| | | | | 北海道 | 青森 | 群馬 | 長野 | 茨城 | 福岡 | 宮崎 | | | 熊本 | 鹿児島 |
| | | 北海道 | 3 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 1 | 33.3% |
| | | 青森 | 0 | 12 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 1 | 85.7% |
| | | 群馬 | 1 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 1 | 66.7% |
| | | 長野 | 1 | 0 | 1 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 50.0% |
| | | 茨城 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 1 | 87.5% |
| | | 福岡 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | | 1 | 83.3% |
| | | 宮崎 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | | 0 | 50.0% |
| | | 熊本 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | | 1 | 16.7% |
| 鹿児島 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 33.3% | | | |
| | | | | | | | | | | 全体 | 61.3% | | | |
| 諸外国判別 (アメリカ含む) | 観測値 (実産地) | 判別結果 | | 予測値 (予想産地) | | | | 判別の中率 |  | | | | | |
| | | | | アメリカ | アルゼンチン | ウクライナ | ブラジル | | | | | | | |
| | | アメリカ | 54 | 12 | 12 | 10 | 61.4% | | | | | | | |
| | | アルゼンチン | 0 | 4 | 0 | 0 | 100% | | | | | | | |
| | | ウクライナ | 0 | 0 | 3 | 0 | 100% | | | | | | | |
| ブラジル | 0 | 0 | 0 | 13 | 100% | | | | | | | | | |
| | | | | | | | 全体 | 68.5% | | | | | | |
| <p>アメリカのプロットが全体に広がっており、アメリカの判別の中率は低い (61.4%)。アメリカ以外の各国 (アルゼンチン/ウクライナ/ブラジル) については、判別の中率 100%であり、産地判別が可能である。</p> | | | | | | | | | | | | | | |
| 諸外国判別 (アメリカ除く) | 観測値 (実産地) | 判別結果 | | 予測値 (予想産地) | | | 判別の中率 |  | | | | | | |
| | | | | アルゼンチン | ウクライナ | ブラジル | | | | | | | | |
| | | アルゼンチン | 4 | 0 | 0 | 100% | | | | | | | | |
| | | ウクライナ | 0 | 3 | 0 | 100% | | | | | | | | |
| ブラジル | 0 | 0 | 13 | 100% | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | 全体 | 100% | | | | | | |
| <p>アメリカを除く諸外国は、判別の中率 100%である。判別プロットにおいても各国間で開きが見られ、重心 (中心点) が離れていることがわかる。</p> | | | | | | | | | | | | | | |
| 国内産・海外産判別 世界5地域判別 | 観測値 (実産地) | 判別結果 | | 予測値 (予想産地) | | | | | 判別の中率 |  | | | | |
| | | | | 北日本 | 南日本 | 南米 | 欧州 | 北米 | | | | | | |
| | | 北日本 | 31 | 4 | 0 | 0 | 0 | 88.6% | | | | | | |
| | | 南日本 | 3 | 20 | 5 | 5 | 1 | 58.8% | | | | | | |
| | | 南米 | 1 | 0 | 12 | 0 | 4 | 70.6% | | | | | | |
| | | 欧州 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 50.0% | | | | | | |
| 北米 | 0 | 2 | 16 | 19 | 5 | 58.4% | | | | | | | | |
| | | | | | | | 全体 | 65.4% | | | | | | |
| 国内産・海外産判別 世界5地域からの判別結果 | 観測値 (実産地) | 判別結果 | | 予測値 (予想産地) | | 判別の中率 | <p>国内/海外判別は、重心 (中心点) が近く、国内 (または海外) 変数から海外 (または国内) の重心までの距離が国内 (または海外) の重心よりも近くなることもあるため、十分な判別が出来なかった。しかし、各国で地域グループを作成し、そのグループによる判別からの国内及び海外判別を行うことで判別の中率は 91.6%にまで上げることができた。</p>  | | | | | | | |
| | | | | 国内品 | 海外品 | | | | | | | | | |
| | | 国内品 | 58 | 12 | 84.1% | | | | | | | | | |
| | | 海外品 | 3 | 107 | 96.4% | | | | | | | | | |
| | | | | | 全体 | 91.6% | | | | | | | | |

8. 総合所見

本年度の研究によって明らかとなった事項は以下の通りである。

【研究 A】統計手法を用いた農産物の産地判別

トウモロコシ種子による 3 次元産地判別分析は、県や国ごとなど細かい地域の判別は困難である。しかし、アメリカを除く諸外国の判別であれば、高い判別率を得ることができた。

トウモロコシ種子の 3 変数に、抽出油の炭素安定同位体比及び酸素安定同位体比の測定値を加えた 5 変数解析では、国内産と海外産の判別において、2 段階で判別することでより精度の高い判別関数を得ることができた。

また、5 変数判別手法では、抽出油の炭素安定同位体比が関数結果に大きく影響していることが確認された。

今後、水素安定同位体比を含めて測定して変数を増やすことや、あるいは抽出油の炭素安定同位体比測定数を増やすことで、判別分析の精度が高まるものと期待される。

9. 引用文献

- (1) Keiko Ishida-Fujii,他 Botanical and Geographical Origin Identification of Industrial Ethanol by Stable Isotope Analyses of C, H and O. Biosci. Biotechnol. Biochem, 69(11), 2193-2199, 2005
- (2) 鈴木彌生子他, 安定同位体比分析による国産米の産地及び有機栽培判別の可能性 分析化学 Vol58, No.12 pp1053-1058(2009)
- (3) 鈴木彌生子他, 安定同位体比によるウナギ加工品の産地判別の可能性
- (4) Logan JM, Lutcavage ME. A comparison of carbon and nitrogen stable isotope ratios of fish tissues following lipid extractions with non-polar and traditional chloroform/methanol solvent systems. Rapid Commun Mass Spectrom. Apr;22(7):1081-1086, 2008
- (5) 日本分析化学会 表示起源分析技術研究懇談会 編, 食品表示を裏付ける分析技術

卷末資料

表 1 2 安定同位体比の測定条件

表 1 2 安定同位体比の測定条件

| 分析装置 | 測定条件 | 詳細 |
|---|----------|---|
| 酸化還元元素分析計 (EA-IRMS 法) ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) | サンプル量 | Reference gas と同強度になるようにサンプル量を設定した。 |
| | 注入方法 | 錫カプセル (直径 5.0 mm / 高さ 9 mm) に封印し, 固体サンプル用オートサンプラーにて注入した。 |
| | 酸化炉の温度 | 750°C |
| | 還元炉の温度 | 1000°C |
| | 分離カラムの温度 | 40°C |
| | 標準物質 | USGS34, Potassium Nitrate IAEA-600, Caffrine IAEA-CH-7, Polyethylene IAEA-N-2, Ammonium Sulfate USGS41, L-glutamic acid USGS25, Ammonium Sulfate |
| 熱分解元素分析計 (TC/EA-IRMS 法) (δ^{D} , $\delta^{18}\text{O}$) | サンプル量 | Reference gas と同強度になるようにサンプル量を設定した。 |
| | 注入方法 | 銀カプセル (直径 3.3 mm / 高さ 5 mm) に封印し, 固体サンプル用オートサンプラーにて注入した。 |
| | 熱分解炉の温度 | 1400°C |
| | 分離カラムの温度 | 70°C |
| | 標準物質 | IAEA-601, Benzoic Acid IAEA-602, Benzoic Acid USGS34, Potassium Nitrate Coumarin (Indiana University) C-36 (Indiana University) |