

# 朝鮮半島およびその周辺から輸入されるシジミの原産地推定

赤崎 哲也\*, 榎本 康敬\*

## Determination of the origins of imported *Corbicula* (shijimi) clams from the Korean Peninsula and its surrounding areas

Tetsuya AKASAKI\* and Yasuyuki ENOMOTO\*

\*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

We conducted a preliminary examination to evaluate the possibility of chemically determining the origins of imported *Corbicula* (shijimi) clams from the Korean Peninsula and its surrounding areas. DNA-based analysis using a partial sequence (510 nucleotides) of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene suggested that all the imported samples analyzed in this study would be shijimi clam (*Corbicula japonica*). However, the analysis could not determine their origins because of no distinctive grouping. On the other hand, principal component analysis based on the composition of minor-to-ultratrace elements in the analyzed shijimi shells showed some differences among their countries of origin.

## 1. 緒 言

平成 18 年 10 月に発動し、現在も継続している北朝鮮からの物品に対する輸入禁止措置に伴い、関税中央分析所においては、北朝鮮産品の迂回輸入対策として、当該輸入禁止措置以前における北朝鮮の対日主要輸出品目をターゲットとし、様々な視点からそれらの原産地判別方法の検討を行っている<sup>1)~8)</sup>。

農水産品の原産地を判別する方法としては、(1) DNA 多型マーカーを利用したもの<sup>9)</sup>、(2) 無機元素組成を指標としたもの<sup>10), 11)</sup>、(3) 同位体比を利用したもの<sup>12)</sup>等が報告されている。このうち、(2)については、体内組織中に生活環境履歴として蓄積した無機元素の含有量に着目し産地を特定する方法であり、様々な農水産品の原産地判別のための分析法として広く取り入れられている<sup>13)~15)</sup>。

貝類の原産地の判別については、アサリのように人為的に種苗を移植することが可能なものは、例えば、日本産アサリを外国に持ち込み繁殖させると、DNA 情報からは日本産と判別されることが予想され、確実に原産地を判別できるとは言い難い。このため、宮下<sup>16)</sup>、および隅野ら<sup>6), 8)</sup>は、貝類の過去の生活環境履歴を保持していると考えられる貝殻に着目し、アサリの貝殻中の微量無機元素の組成を基に原産地の推定を試みている。

輸入シジミの原産地判別に関しては、渡邉ら<sup>3)</sup>は、貝殻中の微量無機元素の組成からそれらの原産地判別を試みているが、良好な結果が得られていない。しかしながら、その方法については技術的に改善する余地を残していると考えられる。また、朝鮮半島

及びその周辺国には、汽水性のヤマトシジミ (*Corbicula japonica*) の他、淡水性のタイワンシジミ (*Corbicula fluminea*) 等、数種のシジミが生息している<sup>18)</sup>が、それらの国々から輸入されるシジミが、どの種のシジミなのかを確認した報告は無く、仮に原産国毎に別種のシジミが日本に輸出されているのであれば、DNA 情報から原産地を特定することが可能である。

そこで、本研究では、予備的検討として、限られた数のサンプルを用いて、朝鮮半島及びその周辺国から輸入されるシジミの種類を DNA 分析により確認すると共に、シジミ貝殻中の微量無機元素の含有量を誘導結合型プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) 及び誘導結合型プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) で測定し、それらのデータがシジミの原産地の判別に利用可能かどうかを検討したので報告する。

## 2. 実 験

### 2.1 試 料

本実験に使用した分析試料を Table 1 に示す。また、それらの原産地の位置関係を Fig. 1 に示す。

\* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

Table 1 *Corbicula* (shijimi) samples used in this study

| Country of origin | Prefecture or District (shell fishery) | N | Date of import declaration or purchase | Abbreviation |
|-------------------|----------------------------------------|---|----------------------------------------|--------------|
| Korea             | Gangwon-do (Sonjiho lake)              | 3 | 24 Jan. 2008                           | KS           |
|                   | Jeollanam-do, Yeosu                    | 3 | 8 Feb. 2008                            | KY           |
|                   | Gyeongsangnam-do, Hadong-gun           | 3 | 6 Nov. 2010                            | KH           |
| Russia            | Vladivostok                            | 3 | 2 Feb 2008                             | RVa          |
|                   | Vladivostok                            | 3 | 6 Feb 2008                             | RVb          |
|                   | Vladivostok                            | 3 | 23 Oct. 2010                           | RVc          |
|                   | Nakhodka                               | 3 | 23 Oct. 2010                           | RN           |
|                   | Zarubino                               | 3 | 30 Oct. 2010                           | RZ           |
| China             | Dalian                                 | 3 | 5 Nov. 2010                            | CN           |
| Japan             | Aomori (Lake Jyusan)                   | 3 | 6 Oct. 2010                            | JA           |
|                   | Yamaguchi (Hushino river)              | 3 | Middle Sep. 2010                       | JY           |
|                   | Ibaraki (Hinuma)                       | 3 | 3 Nov. 2010                            | JH           |
|                   | Shimane (Lake Shinji)                  | 3 | 20 Dec. 2010                           | JS           |

N indicates the number of samples analyzed in this study. The information about the imported samples is based on the descriptions in their documents for import declaration.



Fig. 1 Geographic information about the production areas of the *Corbicula* (shijimi) samples analyzed in this study

## 2.2 試薬

### 2.2.1 DNA 分析用

DNA 抽出試薬 : DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)  
 PCR 反応用試薬 : TaKaRa Ex-Taq (TaKaRa Bio)  
 シーケンス反応用試薬 : BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem)

### 2.2.2 微量無機分析用

汎用混合標準溶液 (XSTC-13 : 31 元素) : SPEX  
 スカンジウム標準溶液 (発光分光分析用) : 和光純薬(株)  
 鉄標準溶液 (発光分光分析用) : 和光純薬(株)  
 ストロニウム標準溶液 (発光分光分析用) : 和光純薬(株)  
 硝酸 (超微量分析用) : 和光純薬(株)  
 過酸化水素水 (原子吸光分析用) : 和光純薬(株)  
 内部標準用 10 ppm 標準溶液 (Sc, Y, Ho) : ジーエルサイエンス(株)

## 2.3 分析装置

### 2.3.1 DNA 分析用

PCR 増幅装置 : Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem)  
 電気泳動装置 : MUPID ミニゲル泳動槽 (ADVANTEC)  
 画像解析装置 : BIO-PROFILE System 2 (VILBER LOURMAT)  
 塩基配列解析装置 : 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem)

### 2.3.2 微量無機分析用

超純水製造装置 : Milli-Q Advantage A10 (MILLIPORE)  
 粉碎機及びアルミナ製ミル<sup>\*)</sup> : 振動式ミニカップミル卓上型 (伊藤製作所(株))  
 マイクロウェーブ試料分解装置<sup>\*)</sup> : ETHOS 1 (MILESTONE)  
 誘導結合型プラズマ発光分光装置 (ICP-AES) : SPS3500 (SII NanoTechnology)  
 誘導結合型プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) : 7500CE (Agilent Technologies)  
 ディスポーサブルチューブ<sup>\*)</sup> : Digi TUBE (65 ml 用) (ジーエルサイエンス(株))  
 多変量解析ソフト : STATISTICA Pro 06J (stattsoft(株))

<sup>\*)</sup> アルミナ製カップ及びミルは、毎回、1%クエン酸水溶液を内部に満たし、一晩放置した後、丁寧に洗浄し、イオン交換水、超純水の順序ですすぎ洗い後、乾燥させて使用した。テフロン製分解管及び Digi TUBE は、15~20%の硝酸溶液に一晩以上浸漬した後、超純水ですすぎ洗いを行い、乾燥させて使用した。

## 2.4 実験方法

### 2.4.1 試料調製

コンタミネーションを生じないように注意深くシジミ貝を軟組織と貝殻に分離した後、軟組織部分は 95%エタノール中に保存した。貝殻部分については、渡辺ら<sup>3)</sup>は、2 倍希釈したキッチンハイターに一昼夜漬けて、貝殻表面のたんぱく質(殻皮)を除去しているが、殻皮は、その役割の一つとして殻を溶解から保護しており<sup>19)</sup>、殻皮を除去すると貝殻の洗浄過程でサンプル本来の無機元素組成が変化する恐れがある。このため、隅野ら<sup>6), 8)</sup>及び宮下ら<sup>16)</sup>と同様に特別な処理は行わず、貝殻表面をイオン交換水で念入りに洗浄した後、更に超純水で洗浄し、乾燥させたものを検体とした。

### 2.4.2 DNA 抽出、PCR、シーケンス反応

DNA 抽出は、エタノール中に保存したシジミ貝の軟組織のうち、その足部から小片(約 10 mg)を切り出し、市販の DNA 抽出試薬(キット)を用いて、その取扱説明書のとおりに行った。得られた DNA 溶液は、実験に使用されるまで 4°C で保存した。

本実験に最適化されたプライマーを作成するために、GeneBank に登録されているシジミ類の cytochrome c oxidase subunit I 遺伝子(以下、「COI」という。)の塩基配列情報を参照し、それらの保存された領域に 1 組のプライマー・セット(pCOI-F :

5'-GATCTGGTTTAATAGGAACTGC-3' 及び pCO1-R : 5'-AACATAGTAAGAGCCCCAGC-3') を作成した。PCR 反応は、上記の DNA 溶液 1 µl、プライマー各 10 pmol、dNTP mixture (25 mM each) 2.4 µl、Ex Taq 0.75 unit、Ex Taq バッファー 3 µl 及び滅菌水で合計 30 µl に調製した溶液を、95°C で 3 分過熱後、95°C 50 秒、50°C 40 秒、72°C 50 秒のサイクルを 35 回繰り返した。反応終了後、PCR 産物を 3% アガロースゲル (TaKaRa L03, 1×TAE) で電気泳動し、エチジウムブロマイド溶液 (0.1 mg/ml) で染色後、画像解析装置により単一の遺伝子座が増幅されたことを確認した。

上記の PCR 産物と共存する残存プライマーは、イソプロパノール沈殿により除去した。この精製した PCR 産物を鋳型とし、PCR 反応と同じプライマーを用いて、BigDye Cycle Sequencing Kit Ver3.1 に添付の反応条件に従いシーケンス反応を行った。その後、エタノール沈殿により溶液中の未反応の色素を除去し、塩基配列解析装置で両端から PCR 産物の塩基配列を決定した。

#### 2.4.3 微量無機元素の定量分析

軟組織部分は、比較的容易に外部環境変化の影響を受ける<sup>20)</sup>ため、本実験では、分析試料の貝殻の部分のみを微量無機元素分析用の検体として使用した。

乾燥した貝殻を粉砕機で 10~15 分間粉砕し均質化した後、テフロン製分解チューブにその微粉末約 0.1 g を精秤し、隅野ら<sup>8)</sup>と同様の方法で貝殻中の無機元素を完全に溶出させた。

固相抽出は回収率に問題があるように見受けられる<sup>9)</sup>ことから実施せず、得られた分解溶液をプラスチック製のディスポーザブルチューブ (Digi TUBE) に注意深く移し、超純水で 50 ml に定容した。この溶液 5 ml を別の Digi TUBE 2 本にそれぞれ分注し、そのうちの 1 本には、スカンジウム、イットリウム、ホルミウムを各 1 ppm になるように調整した内部標準溶液を 1 ml 加え、更に硝酸 1.2 ml を加えた後、超純水で 25 ml に定容して ICP-MS 用の検液とした。別に分注した Digi TUBE には、内部標準物質としてスカンジウム (2.5 ppm) を 5 ml 加え、超純水で 25 ml に定容して ICP-AES 用の検液とした。

ICP-MS のデータの積分時間は、測定元素ごとにそのピーク強度 (感度) を考慮し、0.05 ~ 0.6 秒の範囲で最適化した。また、ICP-MS では、鉄 (質量数 56 及び 57) はカルシウムの分子イオン干渉 (CaO 及び CaOH) を強く受けるため、比較的含有量の多いストロンチウムと共に ICP-AES で定量分析を行った。

なお、ICP-MS を用いた定量分析では、検液中の硝酸濃度が低下すると、鉛以上の質量数の元素については、特に超低濃度 (ppt オーダー) において、それらのピーク強度が不安定になる現象が観測されたため、検量線作成用の標準溶液を含め、全ての測定溶液中の硝酸濃度が 5% になるように調整した。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 分子系統解析

実験により得られた各サンプルの COI 遺伝子についての塩基配列データを、GeneBank に登録されているシジミ類のデータ (*Corbicula japonica* (Accession No: AF196271), *Corbicula fluminalis*

(Accession No: AF457996), *Corbicula fluminea* (Accession No: AF196270), *Corbicula leana* (Accession No: AF196268), *Corbicula sandai* (Accession No: AF196272), *Corbicula moltkiana* (Accession No: AY275657), *Corbicula possoensis* (Accession No: AY275662), *Corbicula australis* (Accession No: AF196274), *Corbicula matannensis* (Accession No: AY275663), *Corbicula loehensis* (Accession No: AY275667) 及び外群として *Geloina expansa* (Accession No: AB498812)) と共に Mega ver 3<sup>20)</sup> で解析し、それらの近縁関係を確認した。解析の結果、得られた分子系統樹を Fig.2 に示す。



Fig. 2 Neighbor-joining tree based on a partial sequence (510 nt) of the mitochondrial cytochrome oxidase I subunit gene from several *Corbicula* (shijimi) samples

The numbers at the nodes indicate the bootstrap probabilities (>50%) calculated by 1,000 replications. *Geloina expansa* (accession no. AB498812) was used as an outgroup. Identification numbers were attached after the abbreviations which represented the geographical information about the samples.

得られた分子系統樹は、Park らのもの<sup>17)</sup>と同様にヤマトシジミ (*C. japonica*) とタイリクシジミ (*C. fluminalis*) の近縁関係を示した。当初は、国内河川への侵入が問題となっているタイワンシジミ (*C. fluminea*)<sup>22)</sup>が輸入シジミであろうと想定していたが、今回の研究に使用した全てのサンプルは、高い確率 (ブートストラップ確率: 77%) でヤマトシジミを含むクレードを形成したことから、淡水性のタイワンシジミではなく、汽水性のヤマトシジミであることが示唆された。これは、少なくとも韓国 (江原道) のシジミについては、松池湖 (潟湖) 産とされていることから分析結果と矛盾しない。

#### 3.2 貝殻中の無機元素についての定性分析

定量分析に先立ち、シジミ貝殻に含まれる微量無機元素の定性分析を行った。韓国産シジミの貝殻について、上記 2.4.3 の実験方法と同様の操作で酸分解を行い、超純水で 50 ml に定容した分解

溶液を、更に超純水で2倍に希釈したものを検液として ICP-MS で定性分析を行った。検出されたイオンの質量数 (m/z) と強度を既知の元素の同位体比と比較することにより 15 種類 (Na, Sr, Fe, Mg, K, V, Mn, Cu, Zn, As, Rb, Cd, Ba, Pb, U) の元素を同定した (Data not shown)。

### 3.3 マトリックス効果

シジミの貝殻中には、カルシウムが 38~39%含まれており<sup>3)</sup>、炭酸カルシウムに換算すると貝殻のほとんど (約 97%) を占めることになる。このために本研究では、極めて多量のカルシウム存在下において他の無機元素を定量することになるが、一般に試料溶液中のマトリックス濃度 (本研究におけるカルシウム濃度) が 100 ppm を超えるとマトリックス効果が顕著に現れると報告されている<sup>23)</sup>。マトリックス効果を軽減するためには、検液を希釈してマトリックス濃度を減らすか、または内部標準法を採用することが効果的<sup>23)</sup>なので、本研究では、内部標準法を採用すると共に、測定対象となる各元素の検出限界を考慮しながら、できる限り分解溶液を希釈することにした。

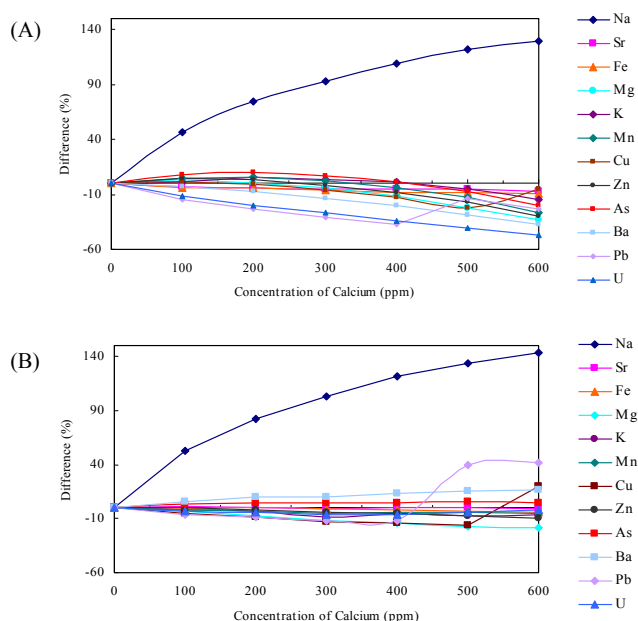


Fig. 3 Matrix effect of calcium (Ca) to various elements

(A) Matrix effect of Ca to various elements under no internal standard condition. The Y axis represents the difference of the count per second (CPS) values of the measured elements between with matrix and without matrix (Ca = 0 ppm). (B) Matrix effect to various elements with the internal standards method. The Y axis represents the difference of the CPS ratios of “element/internal standard” between with matrix (Ca concentrations: 100, 200, 300, 400, 500 and 600 ppm) and without matrix (Ca = 0 ppm). The values of sodium and strontium were determined by ICP-AES, while the values of other elements were determined by ICP-MS. Scandium (<sup>45</sup>Sc), yttrium (<sup>89</sup>Y) and holmium (<sup>165</sup>Ho) were used as internal standards for determining the values of “sodium (Na), strontium (Sr), magnesium (Mg), potassium (K), iron (Fe), vanadium (V), copper (Cu)”, “zinc (Zn), arsenic (As), rubidium (Rb), cadmium (Cd)” and “barium (Ba), lead (Pb), uranium (U)”, respectively.

実際に今回の施策がどの程度、マトリックス効果を軽減できるのか検証したところ、内部標準法を用いない場合 (Fig.3A) では、マトリックス濃度が増加するのに従い、多くの無機元素の測定値が実際の濃度よりも低くなる傾向があるのに対し、内部標準法を用いるとそれらの問題はほぼ解消されることが分かった (Fig.3B)。ただし、ナトリウムについては、本実験条件におけるマトリックス濃度 (約 150 ppm (理論値)) において、内部標準法でも実際の濃度の約 1.6 倍の値に測定されることが判明したため、今回の測定元素から除外した。

### 3.4 繰り返し精度と添加回収実験

本研究対象であるシジミの貝殻に類似した認証標準物質が見当たらないため、分析条件の妥当性確認の手段として、韓国産のシジミ試料を用いて 14 種類 (Sr, Fe, Mg, K, V, Mn, Cu, Zn, As, Rb, Cd, Ba, Pb, U) の測定元素についての再現性の確認及び添加回収実験のみを行った (Table 2)。

Table 2 Multielements determination results of minor-to-ultratrace elements in a Korean *Corbicular* shell

| Element          | Wavelength <sup>b)</sup><br>or m/z | Concentration <sup>c)</sup> | RSD, % | Detection limit <sup>d)</sup> | % Recovery |
|------------------|------------------------------------|-----------------------------|--------|-------------------------------|------------|
| Sr               | 407.7 nm                           | 1368 ±29.8                  | 2.2    | 0.9                           | 112        |
| Fe               | 238.2 nm                           | 171 ±3.1                    | 1.8    | 15                            | 92         |
| Mg               | 24                                 | 74.0 ±1.4                   | 2.0    | 0.07                          | 78         |
| K                | 39                                 | 42.1 ±2.3                   | 5.6    | 2.4                           | 99         |
| Sc <sup>a)</sup> | 45                                 | -                           | -      | -                             | -          |
| V                | 51                                 | 0.083 ±0.007                | 9.1    | 0.02                          | 88         |
| Mn               | 55                                 | 61.7 ±1.3                   | 1.9    | 0.02                          | 87         |
| Cu               | 63                                 | 1.5 ±0.03                   | 2.1    | 0.02                          | 89         |
| Zn               | 66                                 | 3.0 ±0.13                   | 4.0    | 0.06                          | 96         |
| As               | 75                                 | 0.45 ±0.01                  | 2.6    | 0.02                          | 103        |
| Rb               | 85                                 | 0.040 ±0.002                | 4.2    | 0.003                         | 98         |
| Y <sup>a)</sup>  | 89                                 | -                           | -      | -                             | -          |
| Cd               | 111                                | 0.015 ±0.001                | 8.2    | 0.002                         | 82         |
| Ba               | 137                                | 31.8 ±0.82                  | 4.0    | 0.02                          | 125        |
| Ho <sup>a)</sup> | 165                                | -                           | -      | -                             | -          |
| Pb               | 208                                | 0.17 ±0.009                 | 5.8    | 0.005                         | 86         |
| U                | 238                                | 0.011 ±0.0007               | 7.1    | 0.001                         | 88         |

a) The elements “<sup>45</sup>Sc”, “<sup>89</sup>Y” and “<sup>165</sup>Ho” are internal standards for determining the concentrations of the elements “Mg, K, V, Co, Cu”, “Zn, As, Rb, Cd” and “Ba, Pb, U” by ICP-MS, respectively. ; b) The wavelengths were respectively used for determining the concentrations of the elements “Sr” and “Fe” by ICP-AES with internal standard method using the element “Sc”. ; c) Mean ± Standard Deviation (μg/g) (n=7); d) Analytical detection limit (μg/g)

Sr のように % レベルで存在する元素から、V, As, Rb, Cd, Pb, U のように ppt レベルで存在するものまで測定された元素の濃度範囲が幅広いことが分かる。微量無機元素分析においては、一般に独立した繰り返し分析の相対標準偏差 (Relative Standard Deviation, RSD) が 10% 以下、添加回収率が 80% ~ 120% の範囲だと結果が良好とされている<sup>24)</sup>。バリウムの回収率は 120% を上回るが、本実験条件では、Fig. 3 に示されているように、バリウムの測定値が理論値よりも若干高くなることが分かっているため、

測定元素全てにおいて概ね良好な結果が得られていると言えるであろう。

### 3.5 多元素同時定量結果

シジミ貝殻の微量無機元素について ICP-AES 及び ICP-MS で定量し、サンプルの原産地ごとに各元素含有量の平均値と標準偏差をまとめたものを Table 3 に示す。表中には平均値のばらつきの目安として変動係数 (coefficient of variance, CV) も合わせて示した。

同一原産地の試料であっても、亜鉛や鉄のように一部の元素濃度には大きな変動が見られ、個体差が大きいことが分かった。Mg, Cu については、平均値の CV が 20% 以下と小さく、それらの元素濃度には原産地による違いがあまり表れていないと言える。一

方、他の元素については、いずれも CV が 30% 以上となった。特に Mn, As, Cd, Pb, U については CV が 78% 以上と、原産地ごとの違いが大きいので、更に検体数を増やして検討することにより、産地同定に応用できるかもしれない。

Mn, Mg, Fe の定量値は、渡辺ら<sup>3)</sup>のものと大きく異なるが、試料調製方法や測定方法が異なるために単純に比較することはできない。

原産地ごとに測定データをまとめてみた場合 (Fig. 4)、平均値を比較すると Mn, Ba, Zn, As, V, Pb, Cd のデータが、原産地ごとの違いをよく表しているが、各々の元素濃度の幅が広範囲に及ぶため、特定の元素の定量値から原産地を推定するのは不可能であった。

Table 3 Analytical results for minor-to-ultratrace elements in the Corbicula (shijimi) shell samples from various production areas

| Element | Concentration <sup>a)</sup> (μg/g) |                    |                     |                     |                     |                      |                  |                    |               |                 |                     |       | Mean <sup>b)</sup><br>(μg/g) | CV <sup>c)</sup><br>(%) |
|---------|------------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|------------------|--------------------|---------------|-----------------|---------------------|-------|------------------------------|-------------------------|
|         | Japan                              |                    |                     |                     | Korea               |                      |                  | China              |               | Russia          |                     |       |                              |                         |
|         | Lake-Jusan                         | Hushino-river      | Hinuma              | Lake-Shinji         | Gangwon-do          | Jeollanam-do         | Gyeongsangnam-do | Dalian             | Vladivostok   | Nakhodka        | Zarubino            |       |                              |                         |
| Mg      | 47.0 ±11.7                         | 59.6 ±1.9          | 73.9 ±20.5          | 52.2 ±3.3           | 74.5 ±12.3          | 73.1 ±16.8           | 83.3 ±5.2        | 75.7 ±4.4          | 71.6 ±12.3    | <b>80.9 ±11</b> | 72.2 ±6.0           | 69.5  | 16.6                         |                         |
| K       | <b>74.8 ±7.3</b>                   | 38.5 ±1.5          | 18.9 ±5.4           | 51.9 ±7.6           | 71.8 ±12.5          | 54.7 ±12.7           | 44 ±2.2          | 39 ±0.32           | 57.9 ±13.6    | 51.3 ±4.1       | 43.8 ±11.1          | 49.7  | 31.7                         |                         |
| V       | 0.047 ±0.032                       | 0.072 ±0.013       | <b>0.19 ±0.13</b>   | 0.074 ±0.05         | 0.12 ±0.049         | <i>0.042 ±0.011</i>  | 0.12 ±0.026      | 0.18 ±0.063        | 0.075 ±0.049  | 0.11 ±0.04      | 0.068 ±0.011        | 0.10  | 49.8                         |                         |
| Mn      | 62.6 ±20.8                         | 37.2 ±3.2          | <b>357 ±251</b>     | 82.2 ±15            | 56.8 ±16.7          | 59.8 ±19.2           | 72.4 ±25.9       | 123 ±29.4          | 40.4 ±23.5    | 58.8 ±13.9      | 62.5 ±29.2          | 92.1  | 98.6                         |                         |
| Fe      | 51.9 ±26.1                         | 36.1 ±8.4          | 255 ±220            | <b>272 ±119</b>     | 163 ±88             | 78.6 ±24.5           | 263 ±106         | 202 ±92            | 127 ±86       | 163 ±51         | 79 ±50.5            | 154   | 56.3                         |                         |
| Cu      | 2.0 ±0.31                          | <b>2.4 ±0.33</b>   | 1.4 ±0.074          | <i>1.2 ±0.18</i>    | 1.9 ±0.32           | 1.6 ±0.34            | 1.5 ±0.25        | 1.5 ±0.14          | 1.6 ±0.32     | 1.8 ±0.24       | 1.5 ±0.032          | 1.7   | 19.8                         |                         |
| Zn      | 1.3 ±0.45                          | 2.5 ±0.74          | 1.0 ±0.53           | 0.66 ±0.23          | <b>6.2 ±8.5</b>     | 0.79 ±0.34           | 3.5 ±1.9         | <i>0.43 ±0.039</i> | 0.81 ±0.60    | 0.53 ±0.06      | 0.52 ±0.065         | 1.7   | 108                          |                         |
| As      | 0.07 ±0.025                        | <i>0.05 ±0.017</i> | 0.23 ±0.2           | 0.31 ±0.08          | <b>2.0 ±0.98</b>    | 0.30 ±0.24           | 0.48 ±0.16       | 1.9 ±0.91          | 1.5 ±1.4      | 1.6 ±0.67       | 0.47 ±0.50          | 0.81  | 94.8                         |                         |
| Rb      | 0.030 ±0.006                       | 0.034 ±0.009       | <i>0.017 ±0.013</i> | 0.023 ±0.012        | <b>0.079 ±0.019</b> | 0.036 ±0.007         | 0.030 ±0.001     | 0.052 ±0.004       | 0.042 ±0.017  | 0.071 ±0.019    | 0.049 ±0.010        | 0.042 | 45.9                         |                         |
| Sr      | 1023 ±141                          | 1031 ±61           | 1548 ±88            | <b>1617 ±31</b>     | 854 ±56             | 1152 ±488            | 1370 ±64         | 1452 ±85           | 715 ±202      | 1300 ±58        | 1215 ±246           | 1207  | 23.6                         |                         |
| Cd      | 0.021 ±0.007                       | 0.004 ±0.0005      | 0.004 ±0.003        | 0.003 ±0.0002       | <b>0.15 ±0.25</b>   | 0.004 ±0.005         | 0.016 ±0.004     | 0.003 ±0.0001      | 0.008 ±0.009  | 0.003 ±0.001    | <i>0.002 ±0.002</i> | 0.020 | 220                          |                         |
| Ba      | 29.3 ±7.1                          | 15.6 ±1.7          | 22.1 ±7.7           | 19.3 ±4.0           | 34.4 ±3.8           | <b>40.0 ±28.1</b>    | 37.5 ±4.5        | 8.1 ±1.9           | 18.1 ±12.4    | 6.7 ±0.40       | 17.3 ±7.0           | 22.6  | 50.1                         |                         |
| Pb      | <i>0.025 ±0.002</i>                | 0.083 ±0.009       | 0.067 ±0.051        | 0.038 ±0.015        | <b>0.46 ±0.066</b>  | 0.11 ±0.041          | 0.23 ±0.061      | 0.18 ±0.041        | 0.28 ±0.17    | 0.11 ±0.032     | 0.21 ±0.065         | 0.16  | 78.8                         |                         |
| U       | 0.0090 ±0.013                      | 0.0063 ±0.0008     | 0.024 ±0.009        | <b>0.026 ±0.016</b> | 0.015 ±0.008        | <i>0.0040 ±0.001</i> | 0.016 ±0.007     | 0.013 ±0.001       | 0.0070 ±0.004 | 0.0080 ±0.0007  | 0.0060 ±0.003       | 0.012 | 60.6                         |                         |

a) Mean ± Standard deviation (n=3); The highest and lowest concentrations in the analyzed samples were indicated in bold and in *italic*, respectively. b) The mean value was calculated from 11 geographically different *Corbicula* (shijimi) shell samples. c) CV = coefficient of variance, which was estimated for the mean value of 11 geographically different *Corbicula* (shijimi) shell samples.

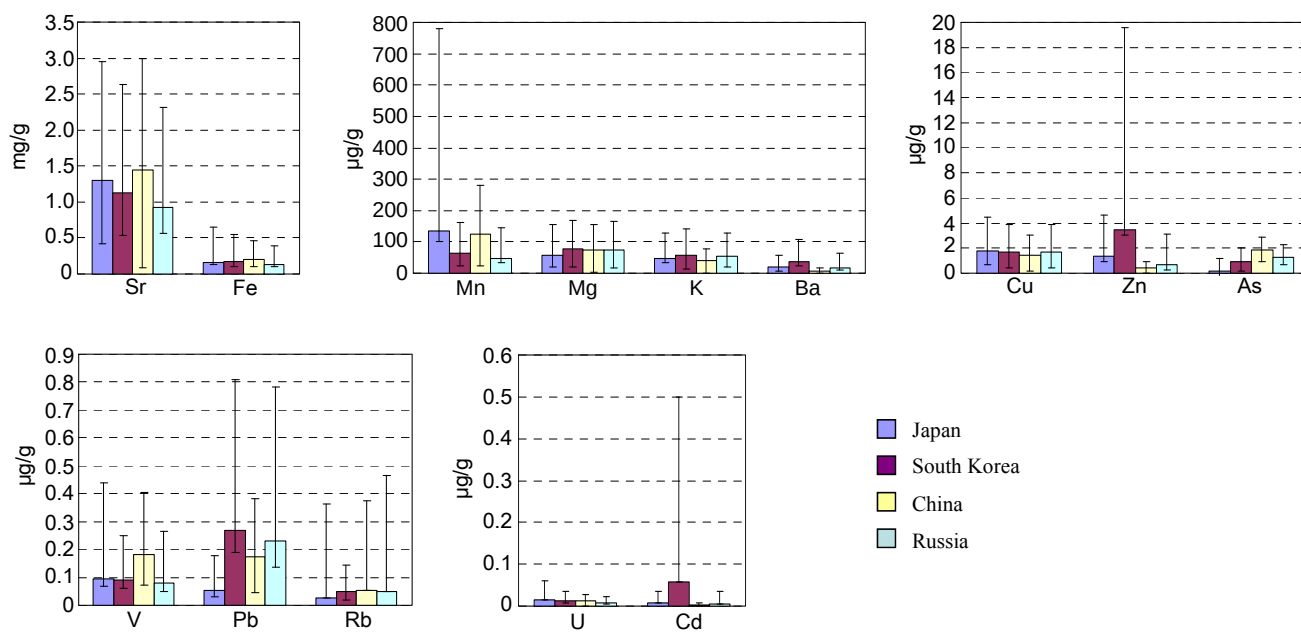


Fig.4 Concentrations of 14 minor-to-ultratrace elements in the analyzed *Corbicula* (shijimi) shells whose data were grouped according to their countries of origin. The upper and lower values of the narrow bar attached to each colored bar represent the maximum and minimum values of each element concentration.

### 3.6 原産地判別分析

今回測定した 14 元素各々を単独で比較してもシジミの原産国を判別することは困難であるため、測定元素全てを用いて主成分分析を行った。第 1 主成分及び第 2 主成分の得点を基にプロットした結果を Fig.5 に、更に第 3 主成分の得点も加えてプロットした結果を Fig.6 に示す。第 1 主成分の寄与率は 27.6%、第 2 主成分の寄与率は 23.9%、第 3 主成分の寄与率は 12.6%であり、第 2 主成分までの累積寄与率は 51.6%、第 3 主成分までの累積寄与率は 64.2%であった（小数点第 2 位で四捨五入）。主成分分析の因子付加量を Table 4 に示す。

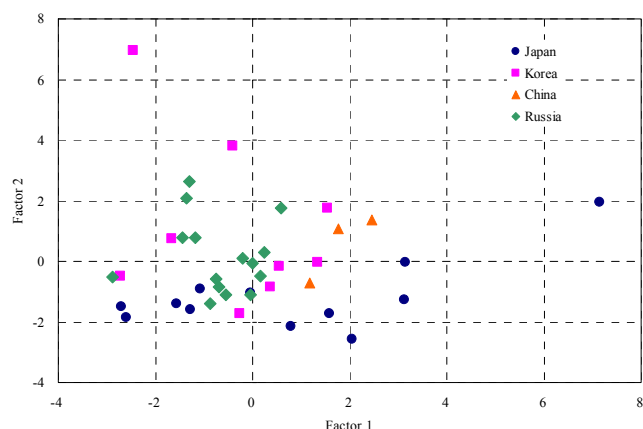


Fig. 5 Scatter diagram of *Corbicula* (shijimi) shell samples based on the first and second principal component scores

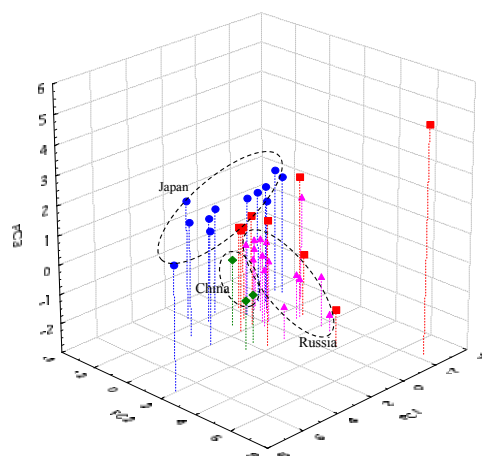


Fig. 6 Three-dimensional plots of *Corbicula* (shijimi) shell samples based on the first, second and third principal component scores  
PC 1, 2 and 3 mean the first, second and third principal components, respectively. Blue, red, green and pink dots indicate the scores of Japanese, South Korean, Chinese and Russian *Corbicula* (Shijimi) shell samples, respectively.

Table 4 Factor loadings of the first, second and third principal components

|    | Factor 1  | Factor 2  | Factor 3  |
|----|-----------|-----------|-----------|
| Mg | 0.353356  | 0.330499  | -0.236119 |
| K  | -0.628306 | 0.245994  | -0.097566 |
| Mn | 0.800571  | 0.103162  | 0.173169  |
| Cu | -0.629353 | 0.107717  | 0.269655  |
| Zn | -0.174032 | 0.631024  | 0.675012  |
| As | -0.082629 | 0.734200  | -0.524406 |
| Ba | -0.236909 | 0.186449  | 0.506484  |
| Pb | -0.222654 | 0.741314  | -0.364111 |
| U  | 0.729082  | 0.210555  | 0.203248  |
| Sr | 0.732256  | -0.286351 | 0.145116  |
| Fe | 0.694448  | 0.543426  | 0.025890  |
| V  | 0.724361  | 0.525685  | -0.045474 |
| Rb | -0.222552 | 0.731711  | -0.247599 |
| Cd | -0.214821 | 0.635230  | 0.597343  |

因子負荷量 (Table 4) は、主成分と変数 (元素) との相関関係を表すことから、第 1 主成分は K、Mn、Cu、U、Sr、V、Fe 濃度を、第 2 主成分は As、Sr、Rb、Pb 濃度を、第 3 主成分は Zn、Cd、As 濃度を主要な因子としていることが分かる。

第 1 主成分及び第 2 主成分の得点に基づくプロット (Fig.5) では、渡辺ら<sup>3)</sup>の 8 元素を用いた解析に比べて、ロシア産及び中国産はそれぞれある程度のまとまりとして表され、日本産も概ね外国産から分離しているが、韓国産のシジミは幅広い範囲にプロットされ、他の外国産のものに重なることから、結果として分析したシジミを原産国ごとに分離することはできなかった。

一方、上記のデータに第 3 主成分の得点を加えてプロットすると、日本産、ロシア産及び中国産は各々がある程度のまとまりとして表され、韓国産のものともほぼ分離した (Fig.6)。

今回の研究では限定的な数のサンプルしか使用しておらず、また第 1 主成分及び第 2 主成分の得点に基づくプロットでは各々のサンプルを原産国ごとに分離することができなかったため、判別関数の構築は見送った。今回の結果が朝鮮半島及びその周辺地域産のしじみの一般的な傾向を表しているかどうかを検証するためには、漁獲地域の異なるサンプルのデータを拡充し、かつ各漁獲地の測定データを増やす必要がある。また、その過程で測定データについての異常値の検定も同時に行うとより正確な原産地ごとの傾向を把握することができると思われる。

## 4. 要 約

朝鮮半島及びその周辺地域から輸入されたシジミ貝について科学的な手法による原産地判別の可能性を検討した。ミトコンドリア DNA にコードされている COI 遺伝子の部分配列に基づく解析は、今回の研究に用いた輸入シジミの全てがヤマトシジミであることを示唆したが、それらの原産地を特定する情報を示さなかった。他方、ICP-AES 及び ICP-MS を用いてシジミ貝殻中の 14 種類 (Sr、Fe、Mg、K、V、Mn、Cu、Zn、As、Rb、Cd、Ba、Pb、U) の微量無機元素含有量を測定したところ、一部の元素の平均値に

は原産国特有の傾向が見られた。また、測定した全元素のデータを用いた多変量解析により、ある程度 of 原産国ごとのまとまりが

得られた。しかしながら、個体差の幅が大きいため、一般的な傾向を把握するにはデータ数を追加し、更に検討する必要がある。

## 文 献

- 1) 竹元賢治, 渡邊裕之, 三枝朋樹: 関税中央分析所報, **47**, 5 (2007).
- 2) 上野勝, 三浦誠, 三浦徹, 渡邊裕之, 三枝朋樹: 関税中央分析所報, **48**, 5 (2008).
- 3) 渡邊裕之, 三浦誠, 三浦徹, 三枝朋樹: 関税中央分析所報, **48**, 13 (2008).
- 4) 山崎幸彦, 緋田敬士, 隅野隆永: 関税中央分析所報, **48**, 61 (2008).
- 5) 三浦徹, 片山貴之, 三枝朋樹: 関税中央分析所報, **49**, 29 (2009).
- 6) 隅野隆永, 山崎幸彦: 関税中央分析所報, **49**, 65 (2009).
- 7) 山崎幸彦, 行本剛, 隅野隆永: 関税中央分析所報, **49**, 77 (2009).
- 8) 隅野隆永, 榎本康敬: 関税中央分析所報, **50**, 109 (2010).
- 9) 農林水産省ホームページ: [http://www.maff.go.jp/j/pr/aff/0904/mf\\_labo.html](http://www.maff.go.jp/j/pr/aff/0904/mf_labo.html)
- 10) K.Ariyama, A.Yasui: JARQ, **40(4)**, 333 (2006).
- 11) 門倉雅史, 臼井裕一, 有山薫: 日本食品科学工学会誌, **53(9)**, 489 (2006).
- 12) S.Kelly, K.Heaton, J.Hoogewerff: Trends Food Sci.Technol., **16**, 555 (2005).
- 13) (独)農林水産消費技術センター: ネギの原産地判別マニュアル (2005.2.3).
- 14) (独)農林水産消費技術センター: ニンニクネギの原産地判別マニュアル (2007.9.3).
- 15) (独)農林水産消費技術センター: コンブの原産地判別マニュアル (2008.11.4).
- 16) 宮下昌則, 龍口久子, 佐藤恵, 堀江尚生, 寺田昌市, 森田正晶, 中西正和: 農林水産消費技術センター調査研究報告, **28**, 2803 (2004).
- 17) J.Park, W.Kim: Mol.Phylogenet.Evol., **29**, 529 (2003).
- 18) S.Tynan, S.Eggins, L.Kinsley, S.A.Welch, D.Kirste: Reolith 2005 – Ten Years of CRC LEME, p.314
- 19) “貝の博物誌 東京大学コレクション XV” (WEB版: [http://www.um.u-tokyo.ac.jp/publish\\_db/2002Shell/](http://www.um.u-tokyo.ac.jp/publish_db/2002Shell/))
- 20) D.D.E.Dick, M.K.A.Abele: Aquat Toxicol, **84**, 450 (2007).
- 21) S.Kumar, K.Tamura, M. Nei: Brief Bioinform, **5**, 150 (2004).
- 22) 園原哲司: Actinia, **16**, 11 (2005).
- 23) Agilent Technologies, Inc.: Agilent 7500 Series ICP-MS チューニング&アプリケーションハンドブック (2006).
- 24) 上本道久: “ICP 発光分析・ICP 質量分析の基礎と実際ー装置を使いこなすために” (2008).