

シジミの無機元素組成による原産地判別の検討

渡邊 裕之*、上野 勝*、三浦 誠*、三浦 徹*、三枝 朋樹*

Determination of Place of Origin of Corbicula Clam by Using Its Inorganic Element Composition

Hiroyuki WATANABE*, Masaru UENO*, Makoto MIURA*, Toru MIURA* and Tomoki SAEGUSA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

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

The place of origin of corbicula clam was determined based on its inorganic element composition. For analytical samples, corbicula shells from Korea, Russia, China and North Korea were used. Sample solution was prepared by removing protein from each sample by a chlorine bleaching agent for household use, and decomposing it by acid in a microwave decomposer. Using inductive coupling plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES), eight inorganic elements, Ca, Na, Sr, Mn, Mg, Ba, Fe and B, were determined. Principal component analyses using the results of the quantitative determination of these elements did not show any analogy related to country of origin although similarity by lot was recognized. Correlation was not found geographically, either.

1. 緒 言

2006 年 10 月に核実験への制裁措置として、北朝鮮からの輸入が半年間禁止され、さらに 3 回の延長により 2008 年 4 月現在も輸入禁止が続いている。このような状況下で、2007 年、北朝鮮産アサリとウニの迂回輸入の事件が起きた。露見した事件は氷山の一角で、これら以外にも迂回輸入の事例があるかもしれない。このような不正輸入を発見、そして防止するには輸入品の科学的な識別が必要である。本研究では、北朝鮮からの対日主要輸出品目の一つであったシジミを試料に用いて原産地識別の検討を行った。

シジミの原産地識別は、アイソザイム¹⁾や DNA^{2),3)} で研究されている。鈴木ら^{1),2)} は、シジミの種が中国江蘇省南部付近を境に南北に分離することを報告している。この中国江蘇省南部以南の中国産シジミと以北の朝鮮半島、極東ロシア及び日本産シジミでは遺伝的背景がかなり異なることから、アイソザイムや DNA の識別が容易であり、1 個体ずつの産地識別が可能である。しかし、朝鮮半島、極東ロシア、日本間では遺伝的背景が似ているため、1 個体毎の産地の識別が困難であり、集団内の遺伝子型頻度の違いにより産地識別が行われる。

アイソザイム分析や DNA 分析は、遺伝的背景を調べる分析であり、人為的に生息地を変えられたものについては産地を特定できない。無機元素による産地識別は、生息環境により無機元素組成が異なることを利用した方法であることから、人為的に生息地を変えられた場合でも産地を特定できる。無機元素組成による産

地識別法は、ネギ^{4~6)}、黒大豆⁷⁾、タマネギ⁸⁾ 等で確立されている。本研究では、無機元素組成によるシジミの産地識別方法について検討した。

2. 実 験

2. 1 試薬

Milli-Q 水：Milli-Q 水製造システム（ミリポア製）を通した超純水

キッチンハイター：家庭用塩素系漂白剤（花王製）

硝酸：超微量分析用硝酸（1.42）（和光純薬工業製）

各元素標準液（和光純薬工業製）

2. 2 試料及び試料調製

試料は、韓国 Naktong 川産の 1 ロット（以下 1K とする）、韓国 Naktong 川及び Somjin 川の 2 箇所から採取された 1 ロット（以下 2K とする）、中国 Yalu 川産の 1 ロット（以下 3C とする）、中国 Hongze 湖産の 1 ロット（以下 11C とする）、ロシア Posyet 産の 2 ロット（以下 4R 及び 5R とする）及び北朝鮮 Wonsan 産 1 ロット（以下 NK とする）を用いた（Fig.1）。各ロットにつき 7 ～ 9 個体を用いて分析した。

本研究では、北朝鮮産のシジミが別の原産国のシジミに混入して輸入される可能性も考え、個体別に無機元素を定量し、その結果を多変量解析して産地識別の検討を行った。シジミ貝殻は約 2 倍希釈したキッチンハイターに一昼夜漬けて、貝殻表面のたんば

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

く質（殻皮）を取り除いた。そして、それを水道水で洗浄し、脱塩水、Milli-Q 水の順にすすいだ後、乾燥させたものを測定用試料とした。

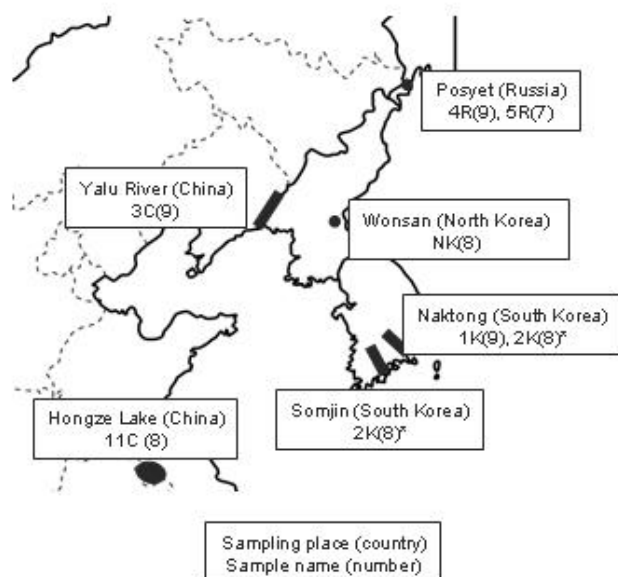


Fig.1 Places of sample collection and codes for samples

1K, 2K, 3C, 11C, 4R and 5R were imported through the Shimonoseki customs, by different declarations respectively. NK was received from the Oyster Research Institute.

* Eight is the total number of samples from Nantong and Somjin.

2. 3 実験器具

実験器具は無機元素の汚染がないように、ポリプロピレン製もしくはテフロン製のものを用い、それらは 15%硝酸に一晩以上浸漬した後、水道水で洗浄し、脱塩水、ミリ Q 水の順ですすいだものを使用した。

2. 4 試料溶液の調製

測定用試料（半殻あるいは、右殻左殻の両方）はテフロン製ビーカーに入れ、正確に秤量し、それに硝酸 10ml を加えて試料を溶解して均質化した。その試料約 0.4g に相当する溶解液を正確にマイクロ波分解用チューブに量り取り、さらに全体で硝酸約 10ml になるように硝酸を添加したものをマイクロ波分解装置（マイルストーン製 ETHOS PLUS）に取り付け、220℃まで昇温（25 分）、220℃を保持（15 分）の加熱プログラムにより、貝殻中の無機元素を完全に溶出した。分解液を 100 mL 容ポリプロピレン製メスフラスコへ移し入れ、Milli-Q 水で定容し、これを誘導結合プラズマ発光分光法（ICP-AES）による定量に用いた。

2. 5 ICP-AESによる無機元素の測定

ICP-AES による測定装置は、SPS3130（エスアイアイ・ナノテクノロジー製）を用いた。測定した元素と用いた波長は Ca (393.366 nm)、Na (588.995 nm)、Sr (407.771 nm)、Mn (257.610 nm)、Mg (279.553 nm)、Ba (455.403 nm)、Fe (238.204 nm) 及び B (249.773 nm) である。ガスコントロールは、プラズマガス 15.0 l/min、補

助ガス 0.5 l/min、キャリアーガス 0.18 MPa である。Na 測定時のみ、チャンバーガス 0.6 l/min を流した。

ICP-AES による定量は、発光強度と濃度で検量線を作成する検量線法により行った。定量限界未満ではあるが検出限界以上の分析値も定量値として統計処理に用いた。

2. 6 統計処理

統計解析ソフトウェアには、STATISTICA 06J（スタットソフトジャパン製）を用いた。

3. 結果及び考察

3. 1 無機元素の測定結果

シジミ貝殻の無機元素の測定結果と検出限界を Table 1 に示す。1K では他のロットと比較して相対的に Na, B 濃度が高く Fe 濃度が低かった。2K では Sr 濃度が低かった。3C では Mn 濃度が高く Sr, Fe 濃度が低かった。11C では Na, Sr, Mn, Mg 濃度が高く、Ba, Fe 濃度が低かった。4R では Na, B 濃度が高く Mn 濃度が低かった。5R では Mn, Ba, Fe 濃度が高く Na, B 濃度が低かった。NK では Ba 濃度が高かった。無機元素濃度の測定結果からは、原産国による特徴は見られなかった。

Table 1 Results of analysis of *corbicula* shells by ICP-AES after microwave decomposition with HNO₃, and detection limit (DL) of each element

	Ca (%)	Na (mg/g)	Sr (mg/g)	Mn (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Ba (mg/kg)	Fe (mg/kg)	B (mg/kg)
	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD
1K (n=9)	37.9 ± 0.3	8.0 ± 0.2	1.2 ± 0.0	15 ± 5	35 ± 3	10.7 ± 1.8	3.9 ± 2.0	1.8 ± 0.2
2K (n=8)	38.4 ± 0.2	7.1 ± 0.7	0.9 ± 0.1	21 ± 9	34 ± 5	17.9 ± 7.0	30.8 ± 26.1	0.5 ± 0.6
3C (n=9)	38.7 ± 0.2	7.0 ± 0.5	0.8 ± 0.0	31 ± 9	37 ± 5	11.4 ± 2.7	7.2 ± 2.6	0.8 ± 0.3
11C (n=8)	38.4 ± 0.2	8.3 ± 0.3	1.4 ± 0.0	29 ± 3	59 ± 9	4.6 ± 0.8	3.0 ± 2.8	1.5 ± 0.2
4R (n=9)	39.1 ± 0.3	8.0 ± 0.3	1.1 ± 0.0	11 ± 2	32 ± 2	14.1 ± 3.0	9.2 ± 4.1	2.1 ± 0.2
5R (n=7)	39.0 ± 0.2	5.9 ± 0.2	1.1 ± 0.0	31 ± 5	36 ± 7	25.6 ± 3.4	79.7 ± 26.5	0.1 ± 0.3
NK (n=8)	39.1 ± 0.1	6.8 ± 0.3	1.0 ± 0.0	21 ± 4	31 ± 4	26.3 ± 5.7	25.4 ± 14.4	1.0 ± 0.2
DL	0.2	0.1	0.009	1	2	0.07	0.8	0.7

3. 2 多変量解析

8 元素の測定結果を用いて主成分分析を行った。主成分の固有ベクトルと固有値を Table 2 に示した。第 1 主成分では、Na 及び Ba の固有ベクトルの絶対値が大きかった。Na は、本研究での前処理で用いたキッチンハイターに高濃度に入っているため、第 1 主成分がキッチンハイター処理の効き具合に関わっている可能性も考えられることから、Na の固有ベクトルの小さい、主成分 2 及び 3 のプロットにより、個体間の類似度を確認した (Fig.2)。1K、3C、11C、4R、5R 及び NK は概ねロット毎に分離した。2K は他のロットに比べ広範囲に分布した。4R と 5R は同じ採取地のものであると輸入者から説明されているものであったが分離した。多変量解析において原産国による特徴、そして採取地の地理的位置による相関は見られなかった。

Table 2 Eigenvectors, eigenvalues and proportions in principal component (PC) analyses with 8 elements

	PC1	PC2	PC3
Eigenvector			
Ca	-0.27	-0.18	-0.46
Na	0.48	-0.08	-0.03
Sr	0.28	0.24	-0.70
Mn	-0.12	0.66	0.19
Mg	0.28	0.56	-0.15
Ba	-0.44	-0.13	-0.26
Fe	-0.40	0.21	-0.33
B	0.41	-0.32	-0.24
Eigenvalue	3.89	1.69	1.05
proportion	0.49	0.21	0.13

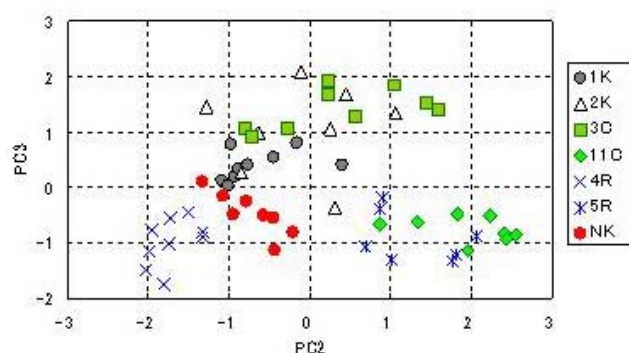


Fig.2 Results of PC analysis using 8 elements (Ca, Na, Sr, Mn, Mg, Ba, Fe and B).

3. 3 考察

シジミ貝殻中の無機元素組成は、その生息域及び上流域の地質条件のみならず、生息域の塩分濃度、川か湖か、泥地か砂地か、生息する水深といった複雑な環境条件に影響されることが予想される。そのため、主成分分析において、ロット毎のまとまりは見られるものの、採取地の地理的位置関係は反映されなかったものと推定される。4R と 5R は同じ採取地のものであることからプロットが近似するものと予想されたが、実際はそれらのプロットは分離した。これは、同一採取地のものではあるが、微妙な生息環境の違いによりプロットが分離した可能性が考えられる。2K は 2 箇所の地域から採取されたものであるためか、他のロットに比べ若干広範囲にプロットが分布した。より詳細な検討のためには、さらに検体数、ロット数を増やして主成分分析を行う必要がある。

本研究では、主成分分析によりロット毎にまとまる傾向が見られたことから、輸入品が単一のロットのものか、あるいは複数ロットが混在したものかを判別できる可能性はある。しかし、主成

分分析により採取地の地理的位置が反映しなかったことから、原産国の識別は難しいと考える。

本研究では、北朝鮮産のシジミが別の原産国のシジミに混入して輸入される可能性も考え、個体毎に無機元素を定量し、その結果を多変量解析した。貝殻を用いたアサリの原産地の判別⁹⁾の研究のように複数個体を粉碎して均質化し、個体間差を小さくすれば、個体別の識別は出来なくなるが、採取地を反映しやすくなるかもしれない。

今回の研究では、試料調製にキッチンハイターによる処理を行ったが、それにより、検出可能な極微量元素の種類が少なくなった可能性がある。極微量元素は産地を反映しやすと考えられるので、殻皮を含めた試料を用いれば、極微量元素を定量でき、産地識別の可能性が広がるものと推察される。

貝殻中の微量無機元素を定量する場合、Ca 濃度の濃い試料溶液を使用するため、プラズマガスが不安定化し、また、トーチ等を痛めやすいとの報告もある¹⁰⁾。実際、本研究においても、試料導入系が汚れたためにプラズマが不安定化し、無機元素の定量が困難になる場面に遭遇した。機器の損傷も少なく、精度の高い定量方法として、溶媒抽出による方法^{10,11)}がある。貝殻中の無機元素を測定するには、このような方法も検討すべきかもしれない。

4. 要 約

無機元素組成によるシジミの産地判別の検討を行った。分析試料には韓国、ロシア、中国及び北朝鮮産のシジミ貝殻を用いた。試料溶液の調製は、試料をキッチンハイター処理によりたんぱく質を除去後、マイクロ波試料分解装置を用いた酸分解により行った。無機元素の定量は誘導結合プラズマ発光分析法 (ICP-AES) により行い、Ca、Na、Sr、Mn、Mg、Ba、Fe 及び B の 8 元素を定量した。8 元素の定量結果を用いた主成分分析では、ロット毎には類似関係が見られるものの、原産国による類似関係は見られなかった。また、地理的位置による相関も見られなかった。

(謝 辞)

本研究を行うにあたり、シジミ産地判別方法の御助言のみならず貴重な試料も提供して頂いた東北大学農学研究課の木島明博教授並びに財団法人かき研究所の鈴木雅絵博士、貴重な試料を提供して頂いた三信商事の比嘉様、そして、試料収集に協力して頂いた門司税関の下関税関支署の通関部門並びに分析部門の皆様、本当にありがとうございました。

文 献

- 1) 鈴木雅絵, 大山実, 八木橋今朝雄, 木島昭博: 日本水産学会大会講演要旨集, 150 (2004).
- 2) 鈴木雅絵, 山下将幹, 木島昭博: 日本水産学会大会講演要旨集 86 (2005).
- 3) 福田裕, 渡部終五, 中村弘二 編: "水産物の原料・産地判別", p. 78 (2006), (恒星社厚生閣)
- 4) 有山薫, 堀田博, 安井明美: 分析化学, 52, 969 (2003).
- 5) 有山薫: 総説 食糧-その科学と技術-, 42, 37 (2004).

- 6) Kaoru ARIYAMA, Hiroshi HORITA, Akemi YASUI : ANALYTICAL SCIENCE, **20**, 871 (2004)
- 7) 法邑雄司, 鈴木忠直, 小阪英樹, 堀田博, 安井明美 : 日本食品科学工学会誌, **53**, 619 (2006).
- 8) KAORU ARIYAMA, TADASHI NISHIDA, TOMOAKI NODA, MASASHI KADOKURA, AKEMI YASUI : Journal of Agricultural and Food Chemistry, **54**, 3341 (2006)
- 9) 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**, 17 (2004)
- 10) 福井博章, 藤野治, 梅谷重夫 : 分析化学, **53**, 1329 (2004).
- 11) 藤野治, 北辻真宏, 吉田卓司, 梅谷重夫 : 分析化学, **56**, 47 (2007).