

受託事業実施報告書

キリンソウDNA品種識別技術の妥当性の検証

平成28年3月10日

特定非営利活動法人 DNA鑑定学会

目 次

「DNA品種識別技術の妥当性の検証」実施の概要	3
DNA分析によるキリンソウの品種識別手法の 妥当性確認方法の決定	5
「DNA分析によるキリンソウ品種の識別手法」の妥当性確認試験 . . .	9

添付資料

1. DNA 鑑定サービスまでのジョブフローと規則
2. SSRマーカー及びSTSマーカーによる常緑キリンソウ品種のDNA品種識別マニュアル
3. キリンソウの品種識別マニュアルの妥当性検査データ（品種識別検査）
4. 品種判定結果一覧
5. キリンソウの品種識別マニュアルの妥当性検査データ（品種内多型調査）
6. 品種内多型調査の検査結果の詳細

「DNA品種識別技術の妥当性の検証」実施の概要

1. 目的

H27年度の品種保護に向けたDNA品種識別技術確立事業におけるDNA品種識別技術の妥当性の検証事業（以下「本事業」という。）は、国立大学法人鳥取大学が作成した「SSRマーカー及びSTSマーカーによる常緑キリンソウ品種のDNA品種識別マニュアル」について、一部の品種に対するマーカーと識別手法の妥当性の検証を行うことを目的とする。

2. 事業内容

1) DNA品種識別手法における妥当性確認方法等の決定

キリンソウの品種識別マニュアルに記載されているマーカーと識別手法につき、平成19年度農業・食品産業競争力強化支援事業により独立行政法人種苗管理センターが作成した「DNA品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン」（<http://www.ncss.go.jp/main/DNA/DNAguideline.pdf>、以下「妥当性ガイドライン」という。）に基づいて一部の品種について妥当性の検討を行い、マーカーと識別手法の妥当性を検証する。

2) 妥当性検証試験・試験結果のとりまとめおよび技術の妥当性の検証

キリンソウの品種識別について、妥当性検証試験を実施してその結果のとりまとめを行い、技術の妥当性について検証する。

3. 報告書の内容

本事業の報告書においては、下記の3項目に分けて報告する。

- 1) 「DNA品種識別技術の妥当性の検証」実施の概要
- 2) DNA分析によるキリンソウの品種識別手法の妥当性確認方法の決定
- 3) 「DNA分析によるキリンソウ品種の識別手法」の妥当性確認試験

DNA分析によるキリンソウの 品種識別手法の妥当性確認方法の決定

1. 妥当性確認方法の概要

妥当性確認事業は、DNA鑑定学会の認証規則に基づいて実施した。すなわち、各工程における主な問題点を洗い出し、是正の参考となるように配慮して実施した。

1) 委員会の設置

本学会員で委員会を構成し、妥当性確認試験結果の検討・確認を行った。

2) 認証規則

平成21年度に当学会で設定し、その後漸次改訂した、「DNA鑑定サービスまでのジョブフローと規則」(添付資料1)を、認証のガイドラインとした。

3) 実施内容

(1) キリンソウのDNA品種識別手法における妥当性確認方法の決定

(2) キリンソウのDNA品種識別における識別マーカーの妥当性確認試験

2. 実施形態

妥当性確認試験の手順

妥当性確認試験は、品種識別マニュアルに記載されている内容について検査を行い、マーカーおよび識別手法の妥当性を検証するものである。検証は以下の手順で実施した。

(1) 品種識別マニュアルの受入れ

依頼元にマニュアルの提示を求め、内容について検討を行い、適宜修正を求めると共に、マニュアル完成時の自己検査をどの程度実施したかを確認し、これによりマニュアルの信頼度をチェックした。

(2) サンプル収集

依頼元より、一部の品種の品種識別検査および品種内多型検査を実施するために必要な量の、基準DNAサンプルおよび検査用サンプルの提供を受けた。

(3) 検証機関の選定と検査の実施

品種識別の検査を実施する機関を決定した。妥当性を考慮し、また、依頼元の課題提案書に従って、複数機関として3機関を選定した。依頼元より提供されたサンプルをこれらの機関に配布し、検証機関毎に妥当性確認のための検査を実施した。

(4) 実施報告書の作成

各検査機関で実施した検査結果を当学会で集計・解析し、報告書原案を作成した。

3. 実施内容

1) 妥当性確認試験の受入れ

妥当性確認試験を受け入れる際に、以下の条件を設けて受入を実施した。

(1) 品種識別手順のマニュアル化

キリンソウの品種識別マニュアルを提出してもらい、標準操作マニュアル (Standard Operation Procedure) として、妥当性確認試験の受入を実施した。目次や記載内容は、当学会の「DNA鑑定サービスまでのジョブフローと規則」(添付資料1)の「品種識別マニュアルの書き方」に準じた変更を要請した。

(2) マーカー開発元の最終的な自己検証

自己検証は、トットリフジタ1号の56株、トットリフジタ2号の1株、TF-3およびその他の株各1部につき、マニュアルに記載した18マーカーを用いての調査を行い、さらに、トットリフジタ1号36株、トットリフジタ2号4株については、251-IP1,IP3、299-IP1,IP3、263-IP1,IP3、274-IP1,IP3、293-IP1,IP3、332-IP1,IP3、353-IP1,IP3、A-07-2の8種のマーカーを用いて調査したとのことであった。

(3) サンプル収集

品種識別検査を実用的なものとするため、基準品種サンプル、基準以外の株サンプルおよび品種内多型調査用サンプルの三種類を収集した。基準品種サンプル3種はマニュアル作成元がDNA抽出を行い、これらを基準DNAとして、品種識別用の株サンプルについて識別検査を実施した。また、基準品種のうち1種のサンプルを用いて、同一品種内における多型頻度の調査を行った。

(4) 検証機関の選定

品種識別の検査を実施する機関を決定した。信頼性を考慮して3機関を選定した。

① 検証機関選定の手順

機関数：鳥取大学が農林水産省に提出した課題提案書に従い、3機関とした。

選定条件：ISO9001またはISO17025を取得している機関。

② 選定した検証機関：機関名および各機関の取得認証は、下記「表2 検証機関の一覧」の通りである。

表2 検証機関の一覧

項番	機関名	ISO 認証項目
1	株式会社 LSI メディエンス	● 食品検査センター：ISO9001 ● 臨床検査：ISO15189, ISO14001, CAP(米国臨床病理医協会) ● ドーピング検査：ISO17025, WADA(世界アンチドーピング機構)
2	ビジョンバイオ株式会社	ISO17025
3	株式会社ファスマック	ISO9001

(5) 検査の実施

収集した品種識別用サンプルに、検証機関にとってはブラインド・テストとなるように、DNA 鑑定学会にて新たにサンプル番号を付与した。それらのサンプルを各検証機関に送付して、検証実験を行った。同時に、品種内多型調査用サンプルも、各検証機関に送付して、検証実験を行った。

(6) 実施報告書

各機関で実施した検査結果のデータを DNA 鑑定学会に送付してもらい、それらを集計・解析して、報告書を作成した。

「DNA 分析によるキリンソウ品種の識別手法」の妥当性確認試験

1. 妥当性確認試験の受入れ

1) 検証依頼を受けた品種識別手順のマニュアル (添付資料 2)

題名 : SSRマーカーによるキリンソウのDNA品種識別マニュアル

作成元 : 鳥取大学乾燥地研究センター

2) サンプル収集

鳥取大学乾燥地研究センターより、キリンソウの基準品種 3 品種 (トットリフジタ 1 号、トットリフジタ 2 号および TF-3) の DNA ならびに品種識別用の株サンプル (3 品種各 5 株、およびその他の株 11 株) ならびに品種内多型調査用サンプル 1 品種 30 株のポット苗が、DNA 鑑定学会に送付された。(表 3 参照)

表 3 サンプル一覧表

植物種類	種類別	品種名	試料形態	量	入手先
キリンソウ	基準株	「トットリフジタ1号」	DNA	2,500ng×3	株式会社フジタ
		「トットリフジタ2号」		2,500ng×3	
		「TF-3」		2,500ng×3	
	生産者株	「トットリフジタ1号」	ポット苗	5株×3	鳥取大学 乾燥地研究センター
		「トットリフジタ2号」		5株×3	
		「TF-3」		5株×3	
		「トットリフジタ1号」, 「トットリフジタ2号」, 「TF-3」以外の タケシマキリンソウ8種類		8株×3	
		「トットリフジタ1号」, 「トットリフジタ2号」, 「TF-3」以外の キリンソウ野生系統3種類		3株×3	株式会社フジタ
	多型	「トットリフジタ1号」	30株×3		

また、検査標準とする基準品種 3 種の DNA は、各々 7,500ng が冷蔵で鳥取大学より DNA 鑑定学会に送付された。DNA 溶液は、品種ごとに 3 本ずつに分注されており。これらの DNA を基準として、品種識別用のサンプル 3 品種+11 株の品種識別パターンの検証、および、基準株 1 品種の品種内多型調査を行った。

2. 検証の形態

検証は、下記の物品を検証機関へ配布して実施した。

1) サンプル

(1) 配布内容

3 機関各々に、下記のサンプルを配布した。

- ① キリンソウの基準株 DNA 溶液 3 種
(基準マーカーDNA3 種 各 1 チューブ、 2,500ng / チューブ)
- ② 品種識別用のキリンソウのポット苗 26 株
- ③ 品種内多型調査用のキリンソウ (トットリフジタ 1 号) のポット苗 30 株

(2) 配布方法

① 基準マーカーDNA

鳥取大学から DNA 鑑定学会に送付された 3 品種 (トットリフジタ 1 号、トットリフジタ 2 号および TF-3) の DNA 溶液を、3 箇所の検証機関の全てに、各 1 チューブ (2,500ng / チューブ) ずつ冷蔵で送付した。

② 品種識別用の株のサンプル

鳥取大学から、3 品種の基準品種の株各 15 株、その他の株 11 種各 3 株の計 78 個のポット苗が、個別にビニル包装して常温で DNA 鑑定学会に届けられた。

表 4 品種識別用サンプル番号対応表

品種または株名	サンプル数	サンプル番号	品種または株名	サンプル数	サンプル番号
トットリフジタ1号	5	9	タケシマキリンソウ 1	1	4
トットリフジタ1号		15	タケシマキリンソウ 2	1	7
トットリフジタ1号		26	タケシマキリンソウ 3	1	13
トットリフジタ1号		3	タケシマキリンソウ 4	1	25
トットリフジタ1号		12	タケシマキリンソウ 5	1	21
トットリフジタ2号	5	1	タケシマキリンソウ 6	1	8
トットリフジタ2号		2	タケシマキリンソウ 7	1	14
トットリフジタ2号		6	タケシマキリンソウ 8	1	19
トットリフジタ2号		18	キリンソウ 野生系統(富山)	1	10
トットリフジタ2号		22	キリンソウ 野生系統(柏崎)	1	16
TF-3	5	5	キリンソウ 野生系統(佐渡)	1	23
TF-3		11			
TF-3		17			
TF-3		20			
TF-3		24			

品種識別検査をブラインドで行うため、DNA 鑑定学会において、これらのポット苗の種類ごとにランダムにサンプル番号をふり直した。学会で新たに付与したサンプル番号は上記の「表4 品種識別用サンプル番号対応表」の通りである。この結果、鳥取大学から送付された品種識別用サンプルは、DNA 鑑定学会で、新たなサンプル番号を持つこととなった。これら三組の各々を、3 箇所の検証機関へ冷蔵で送付した。

③ 品種内多型調査用のサンプル

多型調査用の株のサンプルについては、鳥取大学から、1 品種（サウザー）の多型調査用株のポット苗 90 株が、個別にビニル包装して、常温で DNA 鑑定学会に送付された。DNA 鑑定学会において、これら 90 株に 3 組の 1～30 の番号をふり、1～30 番を一組とした同一構成の検査用サンプル 3 組を作成して、各組を 3 箇所の検証機関の各々へ、常温で送付した。

2) 「SSR マーカー及び STS マーカーによる常緑キリンソウ品種の DNA 品種識別マニュアル」 (添付資料 2)

提供元 : 鳥取大学

作成機関 : 鳥取大学乾燥地研究センター

メール添付にて各検証機関に送付した。

3) キリンソウの検査項目

仕様書は DNA 鑑定学会で作成し、メール添付にて各検証機関に送付した。

各検証機関にメール添付で配布した検査項目表を表 5 に示した。

表 5 検査項目 (1 検証機関当り)

種類別	品種名	形態	量	実験 繰り返し数	実験数
基準品種	トットリフジタ1号	DNA	2,500ng	依頼元が提供	
マーカーの情報	マーカー数:18種	パターン情報	パターン写真		
品種識別用の株	3品種+11種	ポット苗	5株×3品種 11株	2回	52
品種内多型 調査株	トットリフジタ1号	ポット苗	30株	1回	30

4) キリンソウ検査結果票

検証機関が検査結果を記入する表として、DNA 鑑定学会で作成し、メール添付にて各検証機関に送付した。(解答解析済みの結果票は添付資料3および6を参照のこと)

3. 検査と結果

1) 検査内容

品種識別マニュアル添付用の図・表中の図2に記載されている各マーカーの電気泳動像、および、鑑定学会の要請により依頼元が作成したバンドパターン判別表(表6)をもとに、「表5 検査項目(1検証機関当り)」に従って検査を実施した。この検査手法は、アガロースゲル電気泳動において、基準品種のマーカーDNA断片とサンプルのDNA断片を比較し、サイズを判断してマーカータイプを決定し、それらとトットリフジタ1号、トットリフジタ2号およびTF-3の3品種とのマーカータイプの比較を行って、検査対象のサンプルがこれらの3品種のうちのいずれか、もしくはそれら以外の株であるかを識別するものである。

表7 バンドパターン判別表

マーカー	トットリフジタ 1号	トットリフジタ 2号	TF-3	タケシマ キリンソウ 1	タケシマ キリンソウ 2	タケシマ キリンソウ 3	タケシマ キリンソウ 4	タケシマ キリンソウ 5	タケシマ キリンソウ 6	タケシマ キリンソウ 7	タケシマ キリンソウ 8	キリンソウ 野生系統 (富山)	キリンソウ 野生系統 (柏崎)	キリンソウ 野生系統 (佐渡)
251	A	B	B	C	B	B	D	E	D	B	B	E	E	-
299	A	A	B	C	B	A	A	-	A	A	A	-	-	A
263	A	A	A	B	B	C	C	B	C	C	C	-	-	-
274	A	A	B	B	B	A	A	C	A	A	A	D	E	D
293	A	B	C	D	E	F	F	G	H	H	F	I	G	G
332	A	B	C	D	C	E	E	F	C	E	E	F	F	F
353	A	A	B	B	C	B	B	-	B	B	C	-	-	-
257	A	A	B	B	B	A	B	A	B	B	B	A	A	A
260	A	B	C	D	E	F	F	G	H	G	F	G	G	G
298	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	B	B	B
366	A	B	C	D	E	E	E	F	E	E	G	F	H	I
370	A	A	B	C	D	E	F	E	F	B	F	F	F	B
376	A	A	B	A	C	D	D	C	D	D	D	E	E	D
384	A	A	B	C	D	D	D	A	D	D	D	A	A	B
235	A	A	A	B	A	A	A	C	A	A	A	C	C	C
238	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	C	B	B	B
322	A	A	B	B	B	B	B	B	C	B	C	A	D	B
A-07-2	A	A	A	B	B	A	A	-	A	A	A	-	-	-

- ……バンドなしであり、評価の対象としないもの

2) キリンソウの検査結果

検証機関によるキリンソウの検査結果を DNA 鑑定学会が回収し、サンプルのブラインド化情報と突き合わせて、正答率を求めた。

(1) 品種識別結果

詳細なデータは、添付資料 3 「キリンソウの品種識別マニュアルの妥当性検査データ（品種識別検査）」参照のこと。

検査全数に対する品種名判定の正答率を、3つの品種およびそれ以外の株に分けて集計した結果を、下記の表 7 に示した。

表 7 品種別の品種名判定正答率

判定品種	検査数				回答数				回答率				
	機関毎 検体数	機関毎 検査回数	機関毎 検査数	検証 機関数	検査総数	正答数	誤答数	未答数	全体	正答率	誤答率	未答率	全体
トットリフジ1号	5	2	10	3	30	30	0	0	30	100%	0%	0%	100%
トットリフジ2号	5		10		30	30	0	0	30	100%	0%	0%	100%
TF-3	5		10		30	12	4	14	30	40%	13%	47%	100%
その他	11		22		66	66	0	0	66	100%	0%	0%	100%
全体	26	各2	52		156	136	6	14	156	87%	4%	9%	100%

品種名の回答は、全体として、回答率 91%、未答率 9%であり、回答のうち、正答率 87%、誤答率 4%であった。（詳細なデータは、添付資料 4 「品種判定結果一覧」参照のこと。

また、品種別の正答率は 40%~100%で、特に TF-3 の正答率のみがほぼ半分という低い値であった。

次に、検証機関毎の品種名判定の正答率を下記の表 8 でみると、3か所の検証機関の全てで、TF-3 を除く 2 品種およびその他の正答率が 100%という高い値であった。一方、TF-3 の正答率は 20%~60%と低かった。

このことから、本マニュアルに従って品種識別検査を行う場合、トットリフジ 1 号及びトットリフジ 2 号の 2 品種については品種名判定の正答率が高いが、TF-3 については、マーカータイプの識別精度が非常に低く、検証機関または担当者の主観や習熟度、検査環境などが検査精度に影響を与えていることも伺える。

表 8 検証機関毎の品種名判定正答率

判定品種	正答率			
	B社	F社	L社	平均
トットリフジタ1号	100%	100%	100%	100%
トットリフジタ2号	100%	100%	100%	100%
TF-3	60%	40%	20%	40%
その他	100%	100%	100%	100%
平均	90%	85%	80%	85%

これらの結果より、本マニュアルに基づくこれら 3 品種のキリンソウとそれ以外の株との識別は、高い精度で行える品種とそうでない品種があり、識別率が 5 割以下の品種については、精度を上げるための改良が必須と考えられる。

続いて、マーカー毎の集計を行った。

今回検証したマニュアルでは 18 種類の品種識別マーカーを用いている。

まず、総検査数を下記の表 9 で算出したところ、検証機関毎に 936 本ずつ、全体で 2,808 本のフラグメントの検査が必要であった。

表 9 機関毎のマーカーフラグメントの総検査数

検査機関	マーカー数	検体数	検体毎検査回数	総検査マーカー数
B社	18	26	2	936
F社	18	26	2	936
L社	18	26	2	936
全体	42	78		2,808

なお、本マニュアルは、トットリフジタ 1 号、トットリフジタ 2 号、TF-3 およびその他という 4 つの品種およびカテゴリーでの品種判定の妥当性を検証するものである。このため、上記の表 7 および表 8 では、「その他」の分類に含まれる株については、分類の中での株名やマーカータイプの判定が間違っている場合でも、「その他」のカテゴリーに判定されたという結果をもって正答とみなして集計している。

次に、これらの数にもとづき、各サンプルについて、マーカーのうちどれだけが、正解品種のマーカーとタイプが一致したかを集計した。この結果を示したのが、下記の「表 10 品種毎のマーカータイプ一致率」である。

なお、この表 10 以降の集計では、「その他」のカテゴリーには含まれるがマーカー

一タイプの判定が間違っているものについては、正解と不一致として集計している。

表 10 品種毎のマーカータイプ一致率

品種名	最大一致 マーカース数	マーカータイプ一致数				マーカータイプ一致率			
		B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均
トットリフジタ1号	180	180	177	180	179.0	100%	98%	100%	99%
トットリフジタ2号	180	180	176	180	178.7	100%	98%	100%	99%
TF-3	180	112	112	112	112.0	62%	62%	62%	62%
その他	396	368	339	368	358.3	93%	86%	93%	90%
total	936	840	804	840	828	89%	86%	89%	88%

全体を平均してのマーカータイプ一致率は、88%という高い値であり、検査機関相互の値のばらつきも比較的小さかった。しかしここでも、TF-3 におけるマーカータイプの一致率が全ての検証機関において 62%と低かった。トットリフジタ 1 号およびトットリフジタ 2 号のマーカータイプ一致率がほぼ 100%に近いことを考え合わせると、TF-3 に関しては、今回検証を行ったマニュアルの不備よりもむしろマーカースの選択に問題がある可能性が高いため、この点の改良が必要と考えられる。

しかしながら、本マニュアルは、マーカース鎖長の異同判定のように数値に基づく客観的な判定ではなく、電気泳動像のバンドの相対的な位置判断という主観的な手法であり、個々のデータに関する精度の議論が不可能な、曖昧な手法によるものである。

この点に関して、検証機関からは、下記のコメントに代表されるマニュアルの不備が指摘された。

「解析を行っていて、マニュアル記載の電気泳動写真で区別が判らないマーカースが多々あります。せめてフラグメントサイズの記載は必要と思います。」

なお、DNA 鑑定学会でも、提出されたマニュアルをチェックした際に同様の指摘が上がっていたが、時間的な制約にも鑑みて現状のパターンによる識別でよいとの学会事務局の判断により、今回の検証が行われたものである。

手法の開発者ではない第三者による検証結果を客観的な評価に耐えうるものとするために必要な最低限の基準について、再検討の必要性があると考えられる。

結果の詳細は、添付資料 5 「品種毎のマーカースサイズ一致率の詳細」を参照。

なお、表 10 に基づいて、品種毎にマーカースタイプの一致率をグラフにしてみると、下記の図 1 のようになり、TF-3 でのマーカースタイプの一致率がかなり低く、その他のカテゴリー内で 1~2 割程度の不一致がみられる様子が明確に見られる。

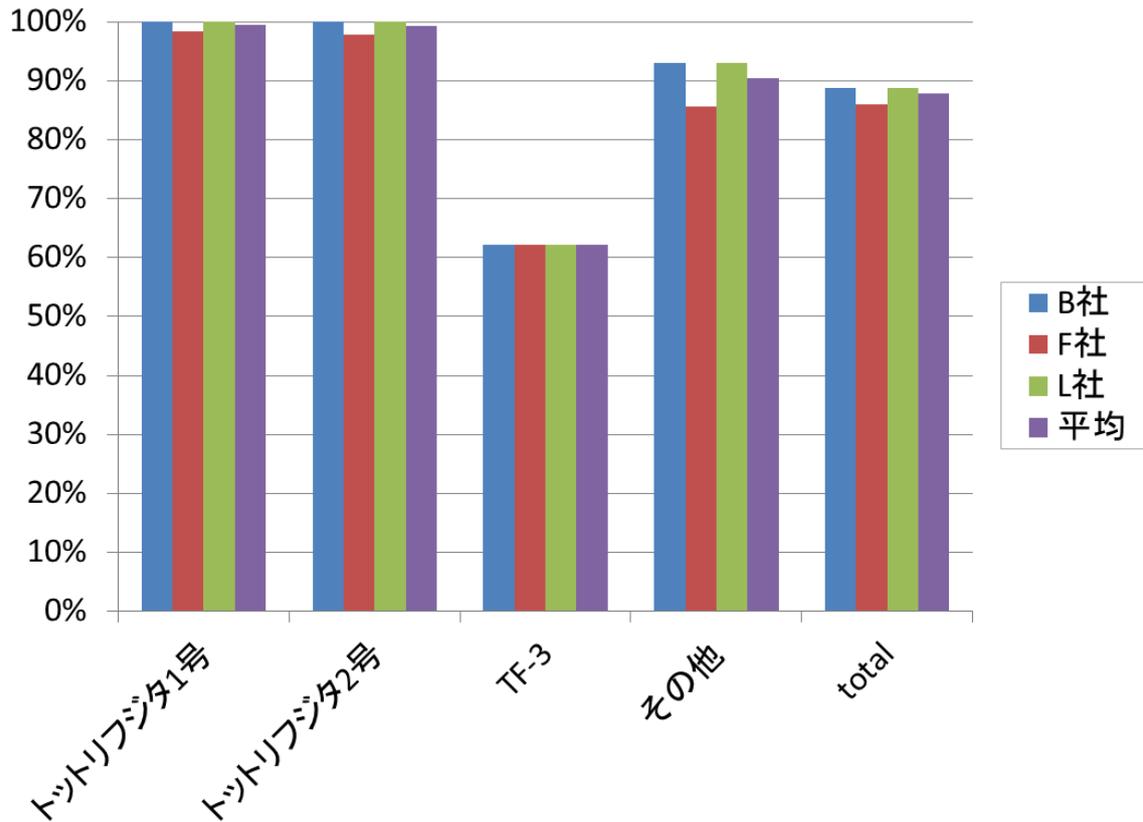


図1 品種毎のマーカータイプ一致率

次に、各サンプルのマーカーのうちどれだけが正解品種のマーカータイプと一致したかを一致数と一致率で算出し、マーカー毎に集計したのが、下記の表11である。

表11 マーカー毎の一致状況

A. マーカータイプ一致数

マーカー 総数	検査機関	SSR																STS	平均	
		251	299	263	274	293	332	353	257	260	298	366	370	376	384	235	238	322		A-07-2
52	B社	52	52	48	52	40	42	44	44	42	50	44	48	44	52	44	52	50	40	46.7
	F社	38	49	40	49	46	46	42	46	44	51	44	46	46	51	42	41	48	35	44.7
	L社	52	52	48	52	40	42	44	44	42	50	44	48	44	52	44	52	50	40	46.7
	平均	47.3	51.0	45.3	51.0	42.0	43.3	43.3	44.7	42.7	50.3	44.0	47.3	44.7	51.7	43.3	48.3	49.3	38.3	46.0

B. マーカータイプ一致率

検査機関	SSR																	STS	平均
	251	299	263	274	293	332	353	257	260	298	366	370	376	384	235	238	322	A-07-2	
E社	100%	100%	92%	100%	77%	81%	85%	85%	81%	96%	85%	92%	85%	100%	85%	100%	96%	77%	89.7%
F社	73%	94%	77%	94%	88%	88%	81%	88%	85%	98%	85%	88%	88%	98%	81%	79%	92%	67%	85.9%
L社	100%	100%	92%	100%	77%	81%	85%	85%	81%	96%	85%	92%	85%	100%	85%	100%	96%	77%	89.7%
平均	91.0%	98.1%	87.2%	98.1%	80.8%	83.3%	83.3%	85.9%	82.1%	96.8%	84.6%	91.0%	85.9%	99.4%	83.3%	92.9%	94.9%	73.7%	88.5%

マーカータイプの一貫率は、マーカーにより 73.7%～99.4%とばらつき、全体としてのマーカー一貫率は 88.5%で、割合高い値が得られた。しかし、全機関で一貫率が 100%となるマーカーは見られず、ここでも、マーカーの異同を数値ではなく主観で判断する検査手法の精度に問題があることが伺える。このような問題を排除するためには、主観ではなく客観的な判断が可能なマーカーやマニュアルの作成が必要である。

(2) 品種内多型調査の結果

品種内多型調査のための検査は、トットリフジタ 1 号の 1 品種のみにつき、1 機関当たり 30 株を用いて行った。鳥取大学から、90 株のトットリフジタ 1 号のポット苗が、DNA 鑑定学会宛てに配送された。DNA 鑑定学会でこれらを 1 番から 30 番までの続き番号を付した 3 組のサンプルに分け、それぞれの組のサンプルを、3 箇所の検証機関に配布し、検査を行った。

詳細なデータは、「添付資料 6 キリンソウの品種識別マニュアルの妥当性検査データ（品種内多型調査）」参照のこと。

各検証機関の検査結果におけるマーカータイプの一致数と一致率のまとめを下記の表 1 2 に示した。

表 1 2 トットリフジタ 1 号の品種内多型検査のマーカータイプ一致状況

マーカー数	機関毎の検体数	機関毎の合計マーカー数	検査機関	B社	F社	L社	平均
18	30	540	マーカータイプ一致数	540	539	540	539.7
			マーカータイプ一致率	100.0%	99.8%	100.0%	99.9%

マーカータイプ一致率は、検証機関毎の結果のばらつきも少なく、全体で 99% という高い値が得られた。

ただし、今回の検証実験においては、30 株ずつ 3 社に送られた合計 90 株の全てが異なる個体であり、3 社に同一株由来のサンプルが送られたわけではない。また、検査のための実験回数も、1 サンプル当たり 1 回のみである。したがって、正解と一致の見られなかった 1 つの検証機関の 1 個体の 1 種のマーカーについては、それが実験誤差に由来するものなのか、実際その個体はそのマーカーに多型を持つ個体であったのかを区別することができない。

サンプル毎のマーカーサイズの一致数および一致率の詳細なデータは、「添付資料 7 品種内多型調査の集計結果の詳細」参照のこと。

次に、マーカー毎のタイプの一致率を図 2 に示した。表 12 の結果について記したように、1 つの検証機関が 1 個体の 1 種のマーカー以外は、すべて正解と一致していることが明確に見て取れる。

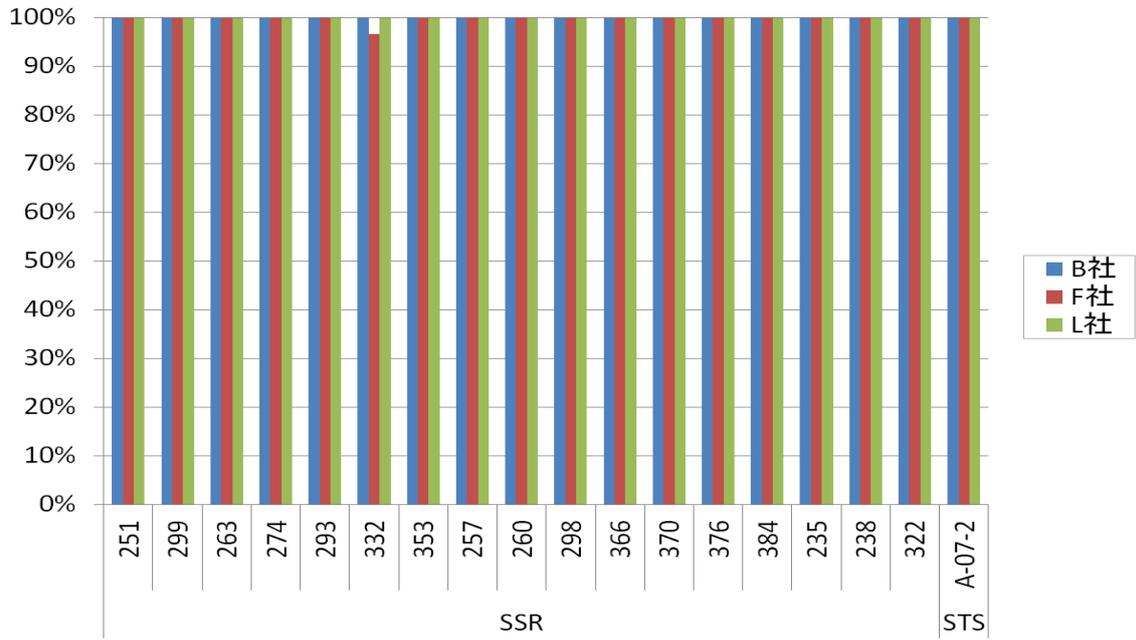


図3 トットリフジタ1号の品種内多型検査における品種毎のマーカータイプ一致率

4. 「SSR マーカーによるキリンソウの DNA 品種識別マニュアル」評価

上記の結果により、「SSR マーカーによるキリンソウの DNA 品種識別マニュアル」の評価は、下記の以下の表 1 3 の通りである。

表 1 3 「SSR マーカーによるキリンソウの DNA 品種識別マニュアル」の評価

マニュアル	<p>提供されたマニュアルによる品種名の認証率は、トットリフジタ 1 号、トットリフジタ 2 号、TF-3 およびそれ以外という 4 つのカテゴリの識別においては、全体として、回答率 91%、未答率 9% であり、回答のうち、正答率 87%、誤答率 4% であった。また、品種毎の正答率は、TF-3 で 40% という低い値であった他は、全てが 100% という高い数値であった。</p> <p>したがって、提供されたマニュアルは、今回の検証に用いられたサンプルを対象とする限り、検査対象がトットリフジタ 1 号またはトットリフジタ 2 号であるか否かは正確に識別可能なマニュアルであると言える一方、TF-3 であるか否かの識別能力は非常に低いと言わざるを得ない。</p> <p>しかしながら、本文中でも指摘したように、本マニュアルは、個々のマーカーの異同判定については、マーカー鎖長の異同判定のように数値に基づく客観的な判定ではなく、電気泳動像のバンドの相対的な位置判断という主観的な手法である。検証を行った機関からは、マニュアル記載の電気泳動写真では区別が判らないマーカーが多々あるのでせめてフラグメントサイズの記載は必要である、との苦情が寄せられた。個々のマーカーの判定精度が不明なものを寄せ集めて正しい判定ができる、というシステム自体の是非が問われるべきであろう。</p> <p>なお、本検証作業の最初に学会に提出されたマニュアルは、検査担当者が初見で実施するには不備が多々あり、学会から委託元に数回の改良を求めたが、マーカーサイズの記載が一切ないことを含め、未だに通常の品種識別マニュアルのレベルには至っていない。また、検証用サンプルの選定についても、3 か所の検証機関にすべて異なる個体を送付しており、実験結果が検証実験の不備によるものか、もともとの個体の情報を正確に検証した結果なのかを判断できないプロジェクトデザインとなっている。本検証作業の目的が自己検証を終えて確立されたマニュアルの検証を行うことであるとすれば、検証個体数を増してマーカーの信頼性をあげることは、本検証作業以前に自己検証の段階でなされるべきことである。そのような、より初歩のレベルにおける検証プロジェクトが用意されるべきか否かについての検討も必要となろう。</p>
-------	---

<p>マーカー</p>	<p>提示されたマーカー毎の認証率は、マーカーにより 73.7%～99.4%とばらつき、全体としてのマーカー一致率は 88.5%で、割合高い値が得られた。しかし、全機関で一致率が 100%となるマーカーは見られず、ここでも、マーカーの異同を数値ではなく主観で判断する検査手法の精度に問題があることが伺える。</p>
<p>妥当性 総合評価</p>	<p>今回の検証に用いた 3 品種およびその他の 11 種の個体のキリンソウの品種識別を行った場合の認証率は 91%で、品種識別結果は精度が高い。しかし、個々のマーカーの判定法に客観性を欠くため、このような識別法の価値、是非については、根本的な検討が必要である。</p>

以上

添付資料 1
DNA 鑑定提供までの
ジョブフローと規則

DNA鑑定提供までのジョブフローと規則

- DNA鑑定提供までのジョブフロー
- マーカー開発規則
- 認証規則
- DNA鑑定の検査規則
- ライセンス規則と責任
- DNA鑑定の品質確保
- 品種識別マニュアルの書き方

特定非営利法人 DNA鑑定学会

妥当性委員会



(H25.6.7)

更新経歴表

更新月日	内容
2009/6/16	添付資料1に「品種識別マニュアルの目次」を追加した。
2009/6/22	<p>「3. 1. 2 妥当性実施機関の条件」を追加した。</p> <p>それに伴い、「3. 1委員会」を「3. 1. 1」に変更し、3. 1には「3. 1妥当性の確保」を設けた。</p> <p>「図1 DNA鑑定サービスまでのジョブフロー」にstep5として「DNA鑑定の品質確保」を追加した。</p> <p>「6. DNA鑑定の品質確保」を追加した。</p>
2009/7/8	<p>「2. 2 権利関係」の文章表現を分かり易くした。内容に変更なし。</p> <p>「3. 認証規則」の序論に「同一内容の検証を複数機関へ依頼し、複数機関の検証データを総合的に分析して認証の妥当性を求める」を追加した。</p> <p>「2. 4 自己検証」 (1) 以下の株で品種判別を実施すること。 基準株：分譲元 生産者：分譲先生産者の産物 市販品：種苗会社などの流通品 を追加した。</p>
2010/11/2	<p>「4. 2. 4 2 検体の比較検査」を追加</p> <p>「4. 2. 5 基準値マーカーの扱い方」を追加</p> <p>添付資料1に「品種識別マニュアルの目次」を削除し、 「7. 品種識別マニュアルの書き方」を追加</p> <p>タイトルを「DNA鑑定サービスまでのジョブフローと規則」から 「DNA鑑定提供までのジョブフローと規則」</p>
2011/7/5	<p>「2. 3. 1 マーカーの開発」の「(3) 2bp 以上の SSR マーカー」と「(4) 誰でも活用できる検査技術」を追加</p>

目次

1.	DNA鑑定提供までのジョブフロー	2
2.	マーカー開発規則	3
3.	認証規則	5
4.	DNA鑑定の検査規則	10
5.	ライセンス規則と責任	13
6.	DNA鑑定の品質確保	18
7.	品種識別マニュアルの書き方	19

1. DNA鑑定提供までのジョブフロー

本ジョブフローは、研究開発の成果を産学官の協力で実社会に提供することを目的とし、提供までに必要な事柄とそのガイドラインをジョブフローとして図1に現します。

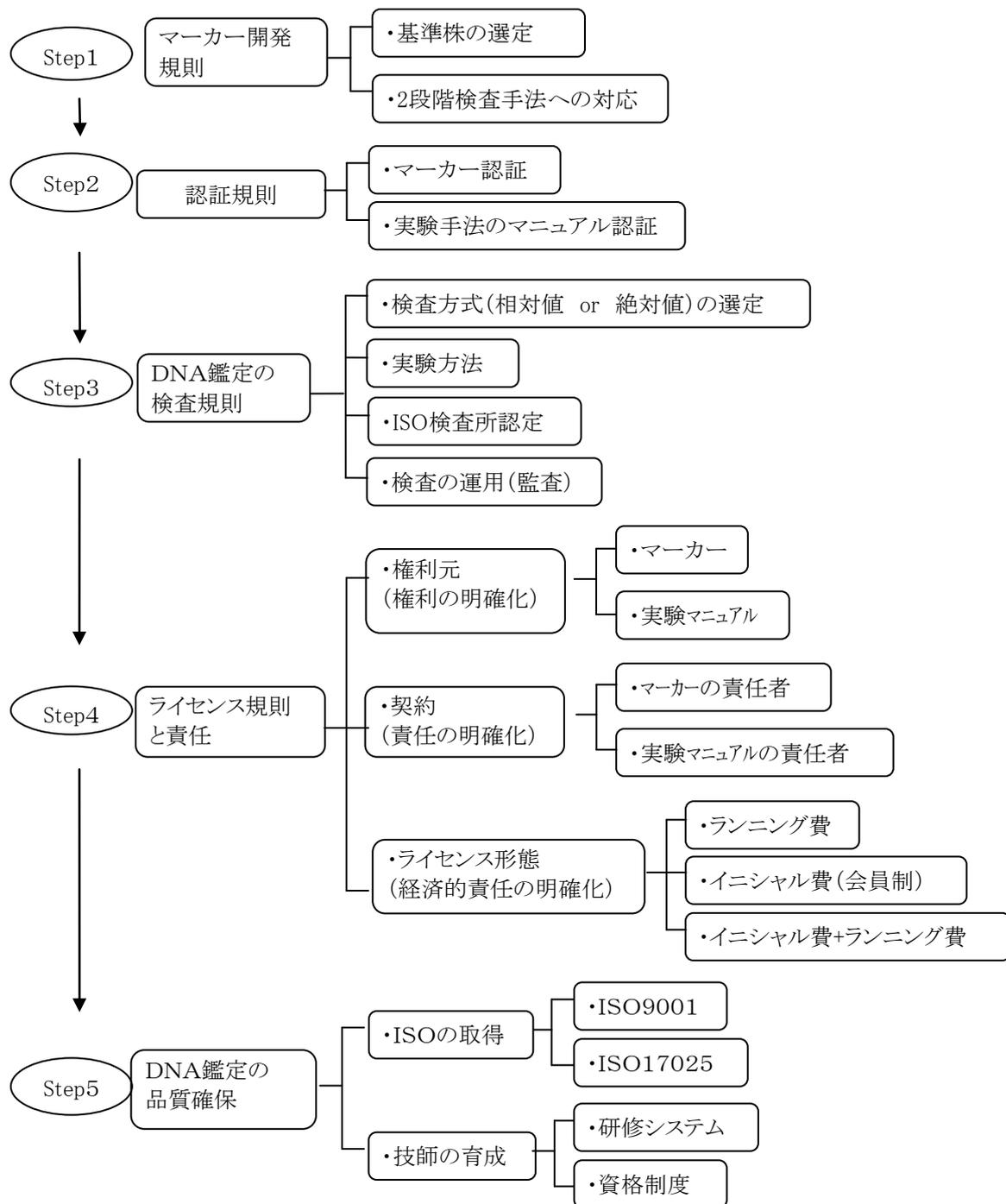


図1 DNA鑑定サービスまでのジョブフロー

2. マーカー開発の規則

2. 1 基本的な考え方

DNA鑑定に必要な要素を、識別するための「マーカー」と、マーカーを検出するための「実験方法」とに区別して定義する。また、権利も各々で異なり、規則も権利に従って設定する。

2. 2 権利関係

識別の開発で発生する知的所有権は、品種などを識別する「識別マーカー」と、識別マーカーを用いて判別する実験手段を記載した品種識別マニュアルとがある。

「品種識別マーカー」は、特許権としての権利となり、識別するための実験手段を書いた手順書の「識別マニュアル」は著作権としての権利となる。

2. 3 開発

2. 3. 1 マーカーの開発

品種識別などのマーカー開発をするにあたって、基本的に以下の事項を考慮して開発しなくてはならない。

(1) 基準株を明確に定めて開発

マーカーを開発するにあり、分譲している基準株を用いて開発をおこなうこと。

(2) 2段階検査に対応したマーカーの開発

簡易検査と精密検査との2段階で検査を可能としたマーカーであること。簡易検査とは断片長などの簡易的な手法で判別がおこなえること。精密検査とは現在の技術でベストと思われる判別手法の塩基配列で判別できること。

(3) 2bp以上のSSRマーカー

電気泳動の誤差が2bp程度生じるため、4bp以上のSSRマーカーが好ましい。

(4) 誰でも活用できる検査技術

エチプロなど健康面で問題とされている物を使用しない方式とする。

2. 3. 2 品種識別マニュアルの開発

品種識別マニュアルとは、識別マーカーを使って識別する実験方法を記載するもので、学会で指定する目次に従って記載すること。内容は、第三者が使用して品種識別が出来る内容でなくてはならない。ただし、新たな技術が開発され、マニュアルに記載されている内容で実験することが出来ないようなときは、新たに

マニュアルを作成し、定義して実施すること。このとき、マーカーの変更をしてはならない。

2. 4 自己検証

信頼性を確認するため、品種識別の開発終了時、以下の条件で最終確認をおこなうこと。

- (1) マーカー開発した人物と異なる人物で最終確認を実施することが好ましい。
- (2) 品種識別マニュアルで検証作業を実施すること。
- (3) 以下の株で品種判別を実施すること。
 - 基準株：分譲元
 - 生産者：分譲先生産者の産物
 - 市販品：種苗会社などの流通品
- (4) 実験の繰り返し回数を複数回おこなうこと。
- (5) 品種確認は同一品種別個体で5固体以上の個体検査をおこない、検証結果を提示できる状況にしておくこと。

3. 認証規則

認証業務とは、依頼元から提供されたマニュアルに記載している「DNAマーカーと検査手順」について、同一内容の検証を複数機関へ依頼し、複数機関の検証データを総合的に分析して認証の妥当性を求めるものである。

検証業務とは、マニュアルに従って検査を実施し、手順の再現性確認と識別の認証率を求めるものである。

認証率とは、サンプル採取した複数の生物検体を、マニュアルに従って検査をおこない、DNAマーカーによる判別の結果をデータ評価したもので、DNAマーカーでの品種一致率を求めたものである。

3. 1 妥当性の確保

妥当性を確保するために、委員会を設け、妥当性に相応しい機関で実施しなくてはならない。

3. 1. 1 妥当性委員会の設置

認証業務は複数人の第三者委員会（中立委員を委員長として、大学、独立法人研究機関、民間等の専門家から構成）で構成させ、検証機関の選定、サンプルの採取および認証率を合議の上で決定し、図2の認証業務フローに従って遂行すること。

3. 1. 2 妥当性実施機関の条件

妥当性とは、品種基準株の選定、品種識別マーカーの開発方法、マーカーの認証率およびDNA鑑定検査方法を検証して評価し、その妥当性を判別することである。そのため、妥当性には中立性と公平性が要求されるため、以下の業務に係わっている機関が妥当性業務を実施してはならない。

- (1) 品種識別マーカーの開発業務
- (2) DNA鑑定による検査業務
- (3) 種苗の管理業務

3. 2 認証基準

委託された認証業務において、帳票にて申請を受付け、以下の条件をクリアした申請のみを受け入れるものとする。検査手順のマニュアルがあること。

- (1) 検査手法の中にコントロールマーカーが定義されていること。
- (2) マーカー判別手法において、最終的に塩基配列を読み取ることで正確な判別できる方式であること。
- (3) マーカーの探索において、以下の条件を実施して決めること。
 - ・同一DNAで繰返し実験をし、再現性の確認をおこなう。

- ・同一品種の複数個体との比較を実施する。
- ・異なる品種に対しても、1品種複数個体で比較を実施する。

3. 3 検証機関の選定基準

検証機関の選定基準とは、検証業務を実施する機関を選定するための基準について定義したものである。(基本的にはISO17025の試験所認定機関のレベルに準拠した検証機関であることが望ましい)

1) 機関選定の手法

学会の法人会員に対して公募をおこない、応募機関の中から選定することを原則とする。ただし、応募の中に認証を取得している機関が無い、あるいは何らかの都合で公募がおこなえないときは、委員会で協議して検証先を決定する。

2) 検証機関の選定基準

認証資格として、ISO17025, ISO15189 または ISO9001 を取得している機関を優先することを原則とする。但し、何らかの事情により、認証を取得していない機関を選定対象とするときは、以下に述べるチェック項目に従い当該機関のチェックを委員会でこなう。

- (1) 検証機関に試験所品質管理マニュアル相当のマニュアルがあること。
- (2) 検証機関は検証業務に関する権限と責任を明確にした組織表が作成されていること。(機密保持体制、職員への内圧外圧の排除を含む)
- (3) 品質マニュアルには品質管理者、技術管理者の権限と責任が明確に記載されていること。
- (4) 検証機関の品質マニュアルには品質目標、品質方針の記載があること。
- (5) 検証機関は文書管理体制(品質マニュアル等の配布管理、文書ファイル、文書改定、文書保管管理、文書取扱責任者など)が整っていること。
- (6) 検証機関では依頼内容の確認、記録が取られていること。
- (7) 検証業務に使用する検査機器、試薬などの購買、受入検査の記録を保持していること。
- (8) 検証業務に関する不適合試験業務の管理(不適合処理、是正処置、予防処置)が行われていること。
- (9) 検証業務の見直しのための内部監査及びマネジメントレビューが行われていること。
- (10) 検証業務に関与する職員の教育訓練、資格認定を実施していること。
- (11) 検証業務に関する施設の適合性の記録(温度、湿度、環境制御など)を取っていること。
- (12) 検証業務に関する試験方法及び妥当性確認(検査手順書の適合性、検査

手順書の改定、対応規格の有無、対応試験方法の有無、不確かさレベルの確認など)

- (13) 検証業務に関する検査機器の保全計画及び実績、検査機器の設備管理台帳、ソフトウェアの管理記録を整備していること。
- (14) 検証業務、測定トレーサビリティの確保がおこなわれていること。(認証標準物質又は標準物質、検査機器、試薬など)
- (15) 検証業務に関する試験試料の識別管理、保管管理を行っていること。
- (16) 検証業務に関する品質の保証(精度管理:正確さ、再現精度の管理)を行っていること。
- (17) 検証業務に関する鑑定の報告実績があること。

以上のチェック項目に関して70%以上の適合性があることが望ましい。

認証機関の選定確認用のチェックリストは別添の「ISO17025試験所またはISO17025試験所相当レベルに該当するかどうかを確認するための監査チェックリスト」を使用する。

3.4 サンプルの採取基準

マニュアルに記載されているDNAマーカーで判別を実施するためのサンプル採取基準を定義する。サンプルは以下の観点で採取する。

1) 標準株

標準株を管理している機関から、同一株を複数個採取する。これは、DNAマーカーが標準株に対して、どの程度の妥当性があるか判別するためである。

2) 市販品

市販されている株を複数個所から購入し、DNAマーカーで判別する。これは、DNAマーカーと市販品株とにどの程度の差異が生じているか判別するためのものである。

3) 多品種との妥当性

上記、1), 2)は同一品種株に対する妥当性評価のためであるが、異なる品種に対しても同様の判別を実施すること。

3.5 認証率

妥当性を確保するために、検証機関を複数機関選定し、各機関に同一のサンプルを与えて検証業務を実施させる。認証率は、依頼されたDNAマーカーと標準株および市販品との一致率をまとめて求める。

3.6 是正処置及び予防処置

学会での認証活動において発生した問題点とその対策を記録し、是正処置を講じる

ことで、その後の予防処置をおこなう。

学会での認証活動は、認証委員会での討議内容を議事録として残し、是正処置が発生した場合は是正処置内容を対象の検証機関に報告して、1ヶ月以内に是正処置報告書を検証機関に提出してもらいその内容を再度認証委員会にて審議して最終的な検証機関の選定を行う。

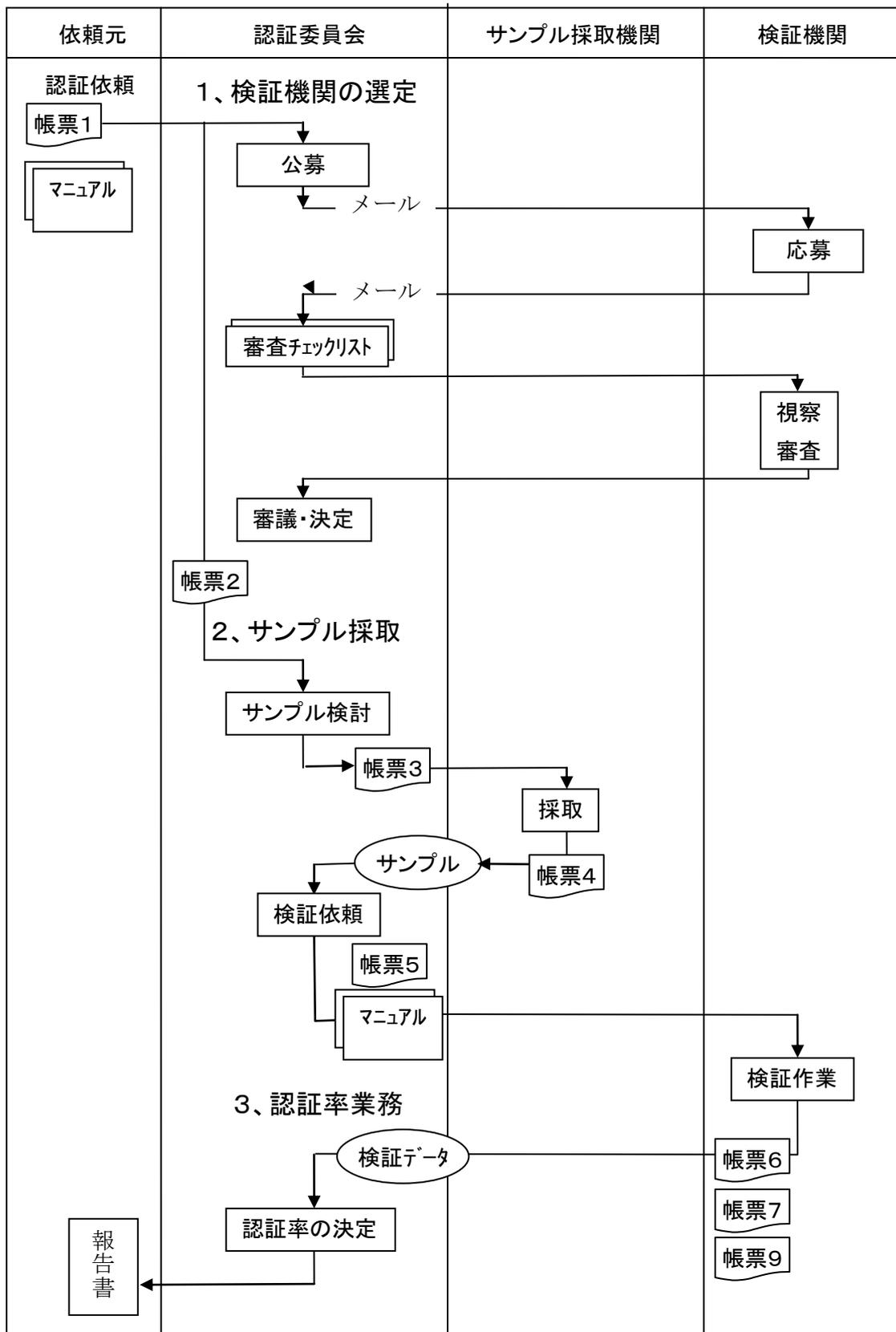


図2 認証の業務フロー

4. DNA鑑定の検査規則

4. 1 基本的な考え方

DNA鑑定において、品種識別マニュアルで識別の実験方法などを記載しているが、全機関がマニュアルに記載されている同一の環境で実験することは現実的でない。そのため、以下の指針を設けることで、DNA鑑定の品質を確保する。

(1) 検査の手法

基準品種と被検査物のマーカーを一緒に、あるいは平行に測定し、基準品種マーカーと被検体のマーカーを相対比較する。

(2) 基準品種の設定

検査の前に基準品種を設定して検査をおこなう。

(3) 2段階検査

簡易検査と精密検査の2段階検査方式とし、精密検査では塩基配列で判別する。

4. 2 DNA鑑定の検査

4. 2. 1 検査の手法

DNA鑑定の検査は大きく分けて、基準品種のマーカー値を基準値として定義して置き、被検体のマーカー測定値と基準値とを比較して判別する方法の絶対値方式と、基準品種のDNAと被検体のDNAとを一緒に、あるいは平行に測定する相対値方式とに区別することが出来る。絶対値方式では、検査に使用する機器など、各検査機関の環境が異なると、測定値にバラツキが生じる。そのため、判別の信頼性を確保するためには、各検査機関の環境が異なっても、同じ測定結果を得ることができる相対値方式を用いるものとする。

4. 2. 2 基準品種の設定

前記の相対値方式によるDNA鑑定方法は、基準品種のDNAを保存して置き、そのDNAを使用する方法と、基準品種の固体を保存して置き、検査に時にDNAを抽出して使用する方法がある。相対値方式ではどちらの手段を用いてもよい。基準品種のDNAを抽出して使用する方法は、品種の基準株を複数個体用意し、個々のマーカーを測定して同一の測定値が多く存在したDNAを基準DNAとして使用する。

4. 2. 3 2段階検査

現在のバイオテクノロジーにおいて、十分な証拠能力を有する検査結果を出すためには、最終的にマーカー部位の塩基配列で判別を行なうことが最善の手法である。しかし、常に塩基配列を読取って判別することはコスト面から現実的でない。そこで、まず簡易検査によって基準品種と異なる品種の疑いがあるかどうかのスクリーニングを行い、その結果、基準品種と異なる品種の疑いがあるものについては、精密検査としての塩基配列決定を行なうという2段階の検査システムを採用する。

この2段階検査の方式は、以下のような利点を持つ。

- (1) 簡易検査の結果により精密検査の必要性を判断できるため、手間と費用のかかる精密検査を行なう件数を減らすことができる。
- (2) 簡易検査のみでは証拠として不十分とされる危険性を、精密検査の結果によって払拭することが可能となり、十分な証拠能力を有する検査を行なうことができる。

従って、簡易検査は、後に精密検査を行なうことを考慮して、精密検査を行うに十分な量と質の検体または検体から抽出したDNAを保存できるような簡易検査でなくてはならない。

4. 2. 4 2検体の比較検査

2検体を電気泳動の分離で比較するときは、検体ごとに異なる蛍光色素を標識して、一緒に電気泳動させる。これは、検体を別々に電気泳動すると電気泳動の環境が毎回異なるため、誤差が生じることを防ぐためである。

4. 2. 5 基準値マーカーの扱い方

検体が多くて一緒に電気泳動できない様なときは、基準マーカー&サイズマーカーを用いてマーカーと一緒に検体と電気泳動させる。基準マーカー&サイズマーカーの測定値を基準として、検体の測定値を正規化し、比較する。このとき、電気泳動が異なると基準マーカーやサイズマーカーの測定値にも誤差が生じることを考慮する必要がある。

4. 3 検査機関の認定

検査機関の認定は、以下に示す検査方法に準じて作を実施できる機関を認定する方式とし、DNA鑑定の商品品質を定期的におこない品質を維持させることを目的とする。

- (1) 識別マーカーは学会で指定するものを使用すること。
- (2) 基準品種株は学会が指定したものを使用すること。
- (3) 測定は相対値方式でおこなうこと。
- (4) 自機関における実験用マニュアルの作成をおこない、当該マニュアルの更新経歴管理など品質を維持するためのシステムを向けていること。

- (5) マニュアルは学会で指定する目次に従って記載すること。
- (6) 実験マニュアルの妥当性として、一定量の品種識別を実施したデータを学会に提示すること。
- (7) 各実験過程において記録を取り、ドキュメント管理をおこなうこと。
- (8) 学会は、認定機関に対してのクレーム窓口を用意すること。

5. ライセンス規則と責任

5. 1 目的

DNA鑑定サービスをビジネス社会に組み入れるためには、トラブル発生時の対処ができるよう責任の所在や関連する知的財産などの権利を明確にしておかなくてはならない。そのためには、関係する機関との権利関係を明確にし、契約書を結んで鑑定サービスを実施しなくてはならない。

特許登録済のマーカ－：実施権のライセンス契約（ライセンス費）を結ぶ。

特許未登録のマーカ－：技術コンサル（技術指導費）という形で契約を結ぶ。

責任の所在や権利を明確にし、技術漏洩および無断使用の状況にならないようにする。特に営利企業へ技術供与する場合には特に注意する必要がある。

5. 2 権利内容

DNA鑑定の技術に関連して発生する権利には、識別をするための「識別マーカ－」と実験手法を記載した「検査マニュアル」の二種類の知的所有権があり、各々の権利は表1に表すように権利の種類が異なる。

識別マーカ－を権利化するためには特許を取得することによって権利を主張することができる。検査マニュアルについては刊行物と同様、著作物として権利化することができる。ただし、検査マニュアルに記載している内容を権利化するときは、新規性のある内容について特許を取得する必要がある。

表1 知的所有権

種類	知的所有権		実施権
識別マーカ－	特許権	発明者	出願人であるが、一般的に委託開発費で開発した場合は、全ての権利（研究成果）が委託開発の依頼元に所有する旨の契約条項が記載されている。
識別マニュアル	著作権	作成者	著作物であり、多方面へ配布するなどの場合には、作成者の了解が必要であるが、一般的に委託開発費で開発した場合は、委託契約書（または研究成果の納入）で依頼元に権利が帰属される。

5. 3 権利の帰属

権利の帰属先は開発の条件によって異なるが、一般的には図3に示すような構成に

なっている。権利は発明者が権利化し、出願人が実施権を持つために発明者との間で取り決めを交わす。例えば、特許ロイヤリティまたは製品化などで得た利益をどのように分配するかを決めておくなどの方法で、利益を発明者に還元するためである。

基本的には実施権は出願人に帰属するが、委託研究によって生まれた発明については、委託契約書で依頼元に帰属する契約となっていることが一般的である。ただし、国の委託研究などでは、依頼先が大学などの非営利団体のときは申請すれば依頼先へ帰属させることができる場合もある。そのため、権利を実施したい者は権利の帰属している機関を探して、そことライセンス契約を結ぶ必要がある。

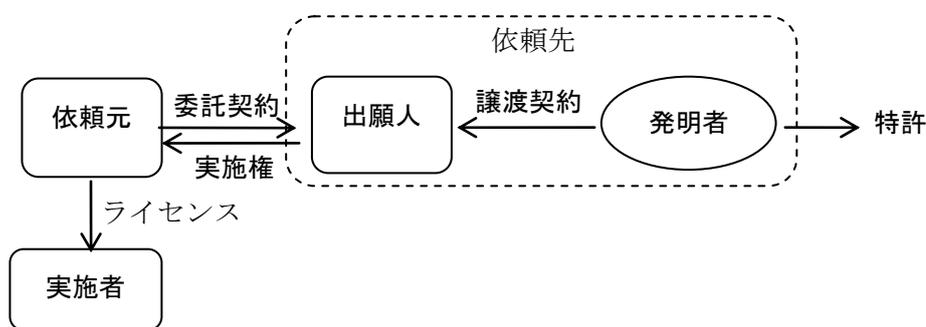


図3 権利関係

5. 4 実施時の責任関係

DNA鑑定の実施形態における責任の所在は、知的所有権を権利化した場合と権利化しなかった場合とで異なる。開発と権利関係を図4にDNA鑑定と責任の所在を表2に表して説明する。

5. 4. 1 開発と権利関係

DNA鑑定の開発に関係する機関としては下記の機関が存在し、その役割と権利関係を下記のように定義する。

開発依頼元：識別マーカ－の開発を依頼する。

開発機関：開発依頼元から依頼された識別マーカ－の開発をおこなう。

認証機関：開発された識別マーカ－の妥当性として、基準株や品種識別の認証率などの評価をおこなう。

検査機関：開発された識別マーカ－でDNA鑑定サービスをおこなう。

一般的に、識別マーカ－の開発をおこなう場合、全ての権利が開発依頼元に所属するよう委託契約書に記載されているため、ライセンスの契約は開発依頼元と契約することになる。しかし、国の委託研究では、開発機関が大学などの非営利のときは、権利の譲渡を申請することにより、開発機関に帰属させることができる。このようなと

きのライセンス契約は開発機関と結ぶことになる。

そのため、企業がDNA鑑定サービスを実施するときは、権利の帰属先を明確にして、ライセンス契約を結ぶ必要がある。

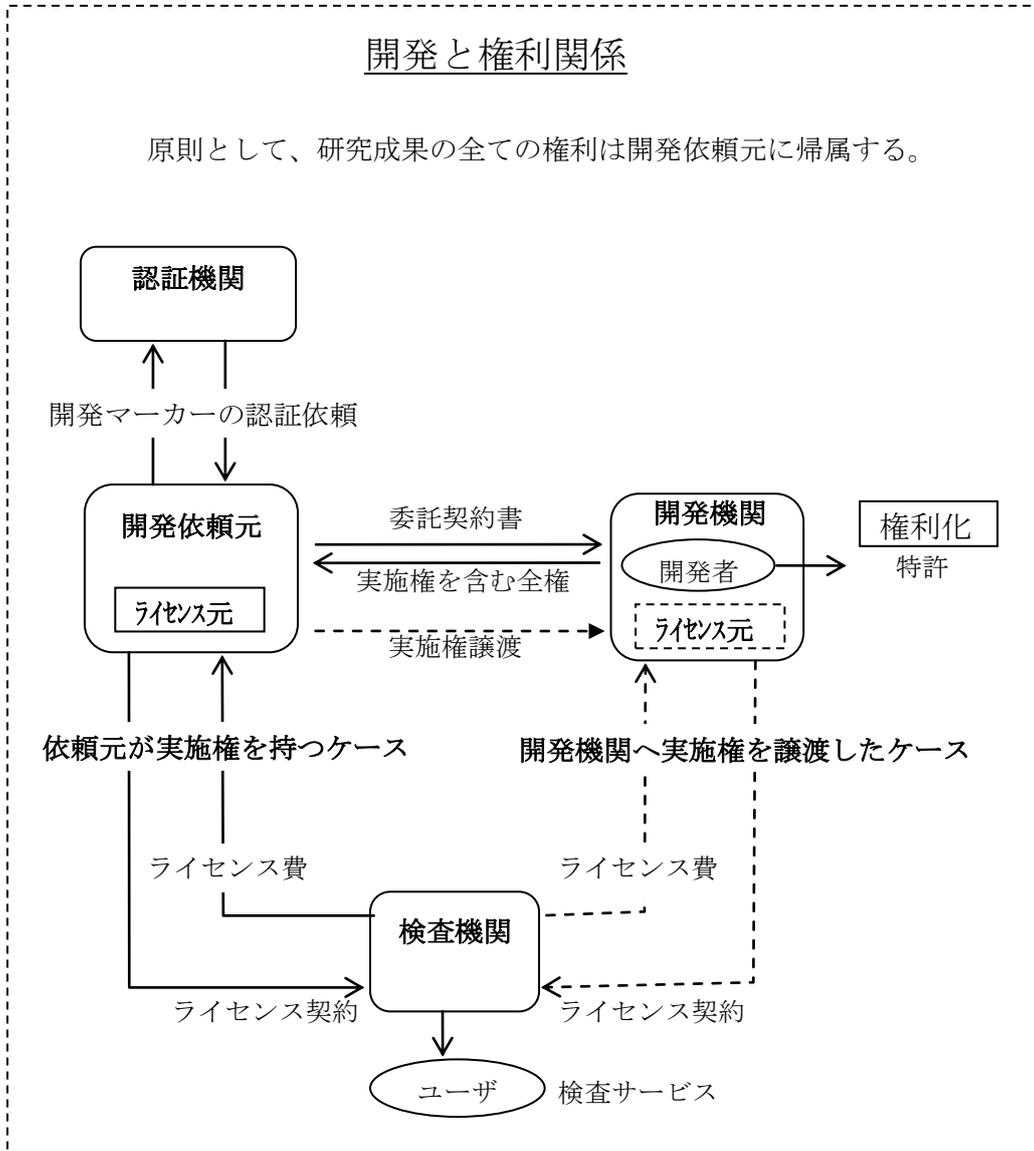


図4 権利化した場合

5. 4. 2 DNA鑑定と責任の所在

DNA鑑定における責任の所在として、ライセンス元、検査機関および認証機関の3機関が存在し、知的所有権を権利化した場合としなかった場合で責任の所在も異なる。

DNA鑑定結果で生じる問題としては以下の事象が予想され、そのときの責任の所在を表2に示す。

(1) 検査作業における瑕疵義務

検査時の作業ミスで結果が正確にでなかった。

検査機関の問題であり、権利関係の責任とは関係ない。

(2) 検査マニュアルの不備

検査マニュアル通りに実施したが検査結果が正確にでなかった。

一般的に検査機関では検査マニュアル採用時に不備を確認するため、通常では起こりえないが、起こった場合は契約条項に従う。

(3) 識別マーカの認証率

定義されている認識率の精度で識別できない。

認証における責任の所在は、権利化の形態に関係なく、妥当性評価を実施した場合、評価した認証機関の責任となる。妥当性評価を実施していない場合は、ライセンス契約の有無で異なり、契約しているときは、ライセンス元の責任となり、未契約のときは検査機関の責任となる。

表2 DNA鑑定と責任の所在

形態	ライセンス契約		妥当性の実施	検査結果の責任(検査の瑕疵は除く)		
				ライセンス元	検査機関	認証機関
知的所有権を権利化した場合	必要	有	実施			○
			未	○		
	無	無	実施			○
			未		○	
知的所有権を権利化しなかった場合	不要	有	実施			○
			未	○		
	無	無	実施			○
			未		○	

5. 5 ライセンス費

ライセンス契約を結んでDNA鑑定サービスを実施するときは、知的所有権者に対してロイヤリティの費用を支払う必要がある。一般的にロイヤリティの支払い方法には、「イニシャル費」、「ランニング費」および「イニシャル費+ランニング費」の3タイプがあり、契約時に明確にしておく必要がある。

イニシャル費： ライセンス費として、最初に一度だけロイヤリティ費を支払う。

ランニング費： 1回ごとの検査に対してロイヤリティを支払うもので、検査費用の%で支払う。

イニシャル費+ランニング費： 初期にロイヤリティを支払い、且つ、検査時にも1回ごとのロイヤリティを支払う。

6. DNA鑑定の品質確保

DNA鑑定の実施にあたってISOの取得、また、検査を実施する検査技術者の技術水準を維持するなど、品質を確保することが必要である。

6.1 ISOの取得

DNA鑑定を実施する機関は、国際水準の品質保証を確保するため、ISOを取得することが望ましい。

ISO9001：品質保証の認証

ISO17025：検査所の認定

6.2 技師の育成

DNA鑑定の検査を実施する技師の水準を確保するため、資格制度を設け、検査する技師の技術水準を基準化する。さらに、技術を維持するための仕掛けを設け、変化するDNA鑑定技術に対応できるようにする。

7. 品種識別マニュアルの書き方

【基本的な書き方】

- 1) 表現は大きいや暖かいなどの曖昧な表現ではなく、 $XXX \pm YY$ や $XX^{\circ}C \sim XX^{\circ}C$ の様に数値で表す。色が必要なときは、写真などで貼り付けることが望ましい。
- 2) マニュアル使用の対象者は、当該種を扱った経験の無い検査技師であることを前提に記載する。

【目次】

1. 適用範囲（具体的な適用の範囲や目的を述べる）

このマニュアルで検査できる対象範囲を記載する。

例：北海道立十勝農業試験場で保存している小豆が対象である。対象試料は粒であり、加工品は対象としていない。

2. 一般事項（識別に必要とされる一般的な規格、指針、ガイドなどがあれば記載する） 一般的に注意しておく事項について記載する。

例：

- ・ 本技術については、技術開発元の〇〇が特許出願中（出願番号 XXXX）であるため、業務利用については出願者の許諾が必要である。
- ・ 品種DNAと被検体DNAとの相対値での検査でおこなうこと。
- ・ JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 改訂第2版
(平成14年6月20日 (独)農林数遺産消費技術センター)を参照。

3. 測定の原理（測定の原理を簡潔に述べる。識別能力にも言及する）

DNAマーカー及び識別方法の原理について記載する。

例：

- ・ 〇〇を利用した品種特異的マーカーの測定法。××種類の品種識別が可能。
(以下、具体的な品種名を列挙)

4. 識別方法（具体的な識別方法名を記載する）

識別方法の手段について記載する。

例：

- ・ 本技術は、作物の進化過程において発生した、ゲノム上の品種特異的な short sequence repeat (SSR) マーカーの反復回数の違いを、SSRを含んだゲノム領域の増幅鎖長の違いにより識別する、SSR法である。

4. 1 方法の要旨

この方法を用いた趣旨を記載する。

例：

- ・ 近年増加しつつある海外からの〇〇の輸入に際し、国内生産者の育成者権保護のために、類似品種の識別の必要性が増大している。輸入品の場合、輸送・保存のための加工処理により DNA が断片化する場合が多い。SSR 法はゲノム DNA の非常に短い領域のみを検査対象とするため、断片化した DNA でも、高感度かつ高精度に品種識別が可能である。また、本法において利用する××種類の SSR マーカーは品種ごとの多型性が高く、多型間のマーカーサイズの違いも大きいいため、相互に明確な識別が可能である。

4. 2 検査試料

検査試料の種類および量や、入手先の選定理由について記載する。

例：

- ・ 〇〇の葉、子実、葉柄を検査試料対象とし、病害や虫害等の損傷のない健全な組織を用いる。1 サンプルは1 葉、1 子実、または1 本の葉柄（各××グラム程度）とし、複数の検査試料を複数回検査する。検査試料は、依頼元より提供された。基準とする〇〇は、△△研究所より、凍結葉を入手する。入手した検査試料は、-20℃以下に冷凍保存する。

4. 3 購入試薬

購入する試薬を記載する。

例：

- ・ エタノール（96-100%）（和光純薬、Cat No：057-00451）
- ・ マーカーA 特異的プライマーペア（受託会社に合成を発注）

A-F：GACTCGATAGTTACGATC

A-R：TCAGTTACGATCGAGCTA

4. 4 調製試薬

調整・保存方法を記載する。

例：

- ・ マーカー特異的プライマー

滅菌蒸留水を用いて各 10pmol/ μ l に調製。1.5ml チューブに 100 μ l ずつ分注し、-20℃以下で凍結保存。一度検査に用いたチューブに残った溶液は破棄。

4. 5 機器・プログラム

使用する機材を記載する。

例：

- ・ 粉砕器：本法では、水分含量の高い試料に適したものをを用いる。分解洗浄、滅菌が出来るものが望ましい。△△は DNA を分解するため使用してはならない。
- ・ DNA 溶液濃縮装置：（品名）遠心濃縮機 （メーカー・型番）TOMY CC-105

4. 6 実験操作

色々な方式があると思われるが、下記の趣旨に従って記載すること。また、各工程において、実験時の注意事項を記載すること。（例えば、泡を取り除いてから処理するなど）

4. 6. 1 操作準備作業

基準を設けて実施する。

例：

- ・ 安全確保：検査者は、白衣、防護用眼鏡、ゴム手袋を着用する。
- ・ 実験準備：恒温槽を〇〇℃に調整しておく。

4. 6. 2 操作場所

実験する場所を記載する。

例：

- ・ 有機溶媒の分注操作はドラフト内で行う。
- ・ DNA 抽出と PCR 増幅反応は別室で行う。

4. 6. 3 試薬及び器具

使用する試薬や機器の種類を記載する。検査の各過程に必要なものをすべて列挙する。

例：

購入試薬

- ・ DNA 合成酵素 品名：KOD FX メーカー・型番：TOYOBO KFX-101

調整試薬

- ・ 電気泳動溶液

1) 2000ml プラスチック体積計で超純水 1960ml を計量し、2000ml プラスチックびんに入れる。

2) 50ml ピペットで 50X TAE 40ml を計量し、超純水に加える。

3) 2000ml プラスチックびんの蓋をしっかりと閉め、20 回転倒混和し、電気泳動溶液とする。

(室温で 1 カ月保存可能)

4. 6. 4 試験材料の取り出し

マーカー開発に使用した株や自己検証に用いた株とその調達先を記載する。

4. 6. 5 DNAの抽出操作

操作手順を記載する。

「試料の 2~3 倍程度」、「〇〇の一部を別に取り」などの曖昧な表現を避け、「試料重量の 2.5 倍」、「〇〇の $\times \times \mu$ l を微量分注器で別の 1.5ml チューブに取り分け」など、全ての操作について、具体的な操作が迷いなくできる表現にする。

4. 6. 6 PCR増幅操作

DNAの増幅方法を記載する。(コントロールを入れて確認する)

コントロールは何をどれだけどのように用意するか、なども具体的に記載する。

4. 6. 7 DNAマーカーの検出方法について説明する。

電気泳動によるDNAの分離での検出や、塩基配列読み取りなどの方法の種類、コントロールには何をどれだけどのように用いるか、なども、数量的な表現で明確に記載する。

検出の有無を判断する場合には、たとえば、「〇〇機の $\times \times$ の条件における読み取り結果のピーク値が $\Delta \Delta$ 以上」など、その根拠を明確にする。

4. 6. 8 データ解析、判定

複数回の実験を実施してデータを解析する。

判定基準を明確に記載する。基準値との比較をする場合には、基準値の定義と不確かさおよび検査値とその不確かさを明確に記載する。基準値を複数設定する場合には、それらの利用法とその根拠を記載する。「実験によっては」のでは、正確な判定はできない。

複数の基準値を解析や判定に用いる場合には、その必要性の根拠、用い方などを具体的に明確に記載する。

4. 6. 9 実験操作フロー図

実験手順のジョブフローを記載する。

サンプルから DNA 抽出、識別用反応、識別操作、判定までの全体の流れを、方法の名称 (PCR、DNA シーケンサーによる鎖長解析など) とともに 1 枚の図にする。上から下へ、矢印で各作業をつなぐ。

5、トラブルシューティング

実験時のトラブル対策についての Q & A を、上記本文中の記載に対応して記述する。

例：

- DNA 濃度が $○○\text{ng}/\mu\text{l}$ に満たない場合

エタノール沈殿で濃縮を行う。

具体的には、 $××\mu\text{l}$ の $\Delta\Delta$ を加え、・・・

(本文の手順中では「DNA 濃度が $○○\text{ng}/\mu\text{l}$ 以上であることを確認後」などと記載があり、脚注などで、「DNA 濃度が $○○\text{ng}/\mu\text{l}$ に満たない場合についてはトラブルシューティング参照のこと」と書いておくことが前提)

6、是正処置

是正依頼票など是正が必要と思われる事項についての情報収集をおこなう仕組みを記載する。

例：

- ・ 実験操作内容改善、プロトコールの不明箇所改善、手法改善等に役立てるため、マニュアル使用者に「問題票（別紙 001）」を配布し、記入してもらって回収する。記載された事項について、是正処置担当者は、原因を究明し、適切な是正処置を選択して、是正依頼票を作成する。文書発行責任者の承認後、是正依頼票をマニュアル作成者へ渡し、マニュアル作成者はマニュアルの是正を行う。マニュアル作成者が是正処置を行った場合、審査、承認を経て本プロトコールの「変更改訂履歴」へ内容を記載し、マニュアル使用者へ報告する。是正処置担当者は、是正されたマニュアルの使用者に聞き取りを行い、是正処置が効果的に行われて問題が解決されたかどうかを監視する。問題が解決されない場合は再度、是正処置を行う。

実験操作については操作の順番に従った操作フロー図（作業ブロック図）を付けることが推奨される。

付属文書：（本文規定以外に参考になる文書や文献があればそれらを付属文書として番号をつけて記述する。）

参考文献：（本文での引用文献名、参考文献名とそれらの引用番号を本文に1）、2）のようにつけてその文献名称を順番にリストアップする）

添付資料 2

麒麟ソウの DNA 品種識別マニュアル

SSR マーカー及び STS マーカーによる
常緑キリンソウ品種の DNA 品種識別マニュアル

平成 27 年 10 月 23 日
鳥取大学乾燥地研究センター

キリンソウの DNA 品種識別マニュアルの目次

目次

1. 適用範囲
2. 一般事項
3. 測定の原理
4. 識別方法
 4. 1 方法の要旨
 4. 2 検査試料
 4. 3 購入試薬
 4. 4 機器・プログラム
 4. 5 実験操作
 4. 5. 1 実験操作における注意点
 4. 5. 2 試薬および器具
 4. 5. 3 試験材料の取り出し
 4. 5. 4 DNA 抽出操作
 4. 5. 5 DNA の定量
 4. 5. 6 PCR 増幅操作
 4. 5. 7 SSR マーカー及び STS マーカーの検出方法
 4. 5. 8 データ解析、判定
 4. 5. 9 実験操作フロー図
5. トラブルシューティング
6. 是正処理

付属文書：

表 1 SSR マーカーのプライマー配列

表 2 STS マーカーのプライマー配列

図 2 SSR マーカーの電気泳動写真

図 3 STS マーカーの電気泳動写真

1. 適用範囲

キリンソウ (*Phedimus aizoon*) は、日本、朝鮮、中国、樺太、カムチャッカに分布するベンケイソウ科の多年生の多肉植物である。キリンソウ野生種は日本の山地の岩場に自生し、冬期に落葉し地上部がなくなる性質がある。

常緑キリンソウ品種「トットリフジタ 1 号」はキリンソウの改良品種（品種登録第 15866 号）であり、屋上緑化、壁面緑化などの緑化用植物として広く利用されている。この品種は冬期に地上部に緑を残した状態で越冬するため、一年中緑色を保つことができる。また、温度や乾燥に強く、袋栽培（特許 4911418 号）では、灌漑をせずに屋上緑化することができる。兄弟品種として、「トットリフジタ 2 号」が開発されている（品種登録第 15867 号）。

キリンソウは挿し木による栄養繁殖で簡単に増やすことができる。更に、キリンソウと近縁な種であるタケシマキリンソウ (*Sedum takesimense*) と登録品種であるトットリフジタ 1 号を見た目で識別することが難しいため、品種の保護が難しい状態であった。実際に種苗法違反による侵害が発生し、刑事事件になっている。

そこで、乾燥地研究センターは、株式会社フジタとの共同研究で、キリンソウの品種識別に利用可能な DNA マーカーの開発を行った。SSR マーカー 17 個及び STS マーカー 1 個を用いた DNA 品種識別技術を開発した。

種苗法違反による侵害が発生し品種識別をする必要が生じた際、品種識別の目的は調査する植物が「登録品種なのか、それ以外の野生個体なのか」、「もし登録品種であるなら、どの品種なのか」を決定することである。よって、キリンソウの品種識別を行う際には登録品種と野生個体との比較を行うことになる。本マニュアルで比較対象として用いた野生種個体はタケシマキリンソウ 8 種類、キリンソウ 3 種類である。しかし実際には、野生種には本マニュアルで比較対象とする個体以外にも様々な遺伝子型の個体が存在していると考えられ、その遺伝子型のパターンはきわめて多くの組み合わせがある。偶然に、ある野生種の個体の遺伝子型が、登録品種である「トットリフジタ 1 号」、「トットリフジタ 2 号」または登録予定品種「TF-3」と一致する確率は、それぞれ 1.55×10^{-12} 、 7.77×10^{-12} 、 6.99×10^{-11} であり、これが起こることは考えられない。

本マニュアルでは、調査する植物が「登録品種 3 品種のうちのいずれなのか、野生個体 11 種類のうちのいずれなのか」「もし登録品種であるなら、3 品種のうちのどの品種なのか」を、18 マーカーを用いて決定する方法を記している。実際に常緑キリンソウ品種の品種識別を行う際には、トットリフジタ 1 号、トットリフジタ 2 号、TF-3 の 3 品種の電気泳動パターンとの比較を行うことで判別を行う。その際、本マニュアルで用いているタケシマキリンソウ及びキリンソウ野生個体を比較として用いる必要はない。

品種（種類）：全 14 種類

(1) 登録品種及び登録予定品種：3 品種

トットリフジタ 1 号 (登録品種)

トットリフジタ 2 号 (登録品種)

TF-3 (登録予定品種)

(2) タケシマキリンソウ：8 種類

タケシマキリンソウ 1

タケシマキリンソウ 2

タケシマキリンソウ 3

タケシマキリンソウ 4

タケシマキリンソウ 5

タケシマキリンソウ 6

タケシマキリンソウ 7

タケシマキリンソウ 8

(3) キリンソウ野生系統：3 種類

キリンソウ野生系統 (富山)

キリンソウ野生系統 (柏崎)

キリンソウ野生系統 (佐渡)

被検査物：展開直後の若い葉

キリンソウにおいて登録品種はトットリフジタ 1 号、トットリフジタ 2 号の 2 品種のみ、登録予定品種は TF-3 の 1 品種のみである。上記のタケシマキリンソウ 8 種類はタケシマキリンソウに属する別々の個体 8 種類、キリンソウ野生系統 3 種類は日本の自生地 3 か所から採取した別々の個体 3 種類である。

2. 一般事項

本 DNA 品種識別マニュアルは、鳥取大学乾燥地研究センターで維持・栽培されている品種及び個体の葉から抽出した DNA を用いて、解析・作成されたものである。

3. 測定の原理

SSR とは、Simple Sequence Repeat の略で、マイクロサテライト、STR や VNTR とほぼ同義である。SSR 分析は、2-数塩基の反復配列を利用して、反復配列を挟み込むように

プライマーを設計し、PCR 法で増幅した DNA 断片の長さの差異を検出する方法である。反復配列領域は、その反復回数に突然変異を起こしやすいとされており、DNA 断片の長さを高精度で分析することにより、近縁な品種同士でも判別が可能である。

STS とは、Sequence Tagged Site の略で、本マニュアルで用いた STS マーカーは RAPD-STS マーカーである。RAPD プライマーを用いた PCR の結果得られた品種に特異的なバンドを STS 化したものである。

SSR マーカー及び STS マーカーを用いた測定の手順は、以下のとおりである。

1. キリンソウのサンプルから、ゲノム DNA を抽出する。
2. 特異的な配列を挟み込むように設計したプライマーを用いて、キリンソウサンプルから抽出したゲノム DNA を鋳型にして PCR 増幅を行う。
3. PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動で分離する。
4. 品種ごとのバンドサイズを比較し、判定を行う。

4. 識別方法

DNA マーカーの一種である SSR マーカー17 種類、及び STS マーカー1 種類を用いた識別方法である。

4. 1 方法の要旨

SSR マーカーは、ゲノム中に豊富に散在している塩基の反復配列を挟み込むように設計したプライマーを用いて、PCR 増幅断片長の差異をアガロースゲル電気泳動で分析することで品種の識別を行う。反復配列領域は、その反復回数に突然変異を起こしやすいと言われている。塩基置換と比較して変異頻度が 1-2 ケタ大きいとされており、近縁な品種同士でも判別が可能である。

本マニュアルで利用する 17 種類の SSR マーカーは、常緑キリンソウ品種トットリフジタ 1 号から、(AC)/(TG) もしくは (AG)/(TC) のモチーフをターゲットとして作製したものである。

また、本マニュアルで利用する 1 種類の STS マーカーは、常緑キリンソウ品種トットリフジタ 1 号のゲノム DNA を鋳型に、RAPD プライマーを用いて得られた特異的なバンドを STS 化したものである。

本マニュアルで利用する 17 種類の SSR マーカー及び 1 種類の STS マーカーは、鳥取大学乾燥地研究センターと株式会社フジタの共同研究で開発したものである。表 1 に SSR マーカーのプライマー配列、表 2 に STS マーカーのプライマー配列を示している。

4. 2 検査試料

展開直後の若い葉を検査試料対象とし、病害、虫害、その他の被害を受けていない健全な組織を用いる。葉は、できるだけ展開直後の若く薄い葉が望ましい。古く厚い葉を用いた場合、経験的に純度や量が劣る DNA が抽出される。

4. 3 購入試薬

1. プライマーセット

プライマーの合成には、MBL ライフサイエンスの DNA 合成もしくはそれに準じるものを用いる。プライマーの精製度は脱塩とし、末端処理は特に行わない。

4. 4 機器・プログラム

1. 推奨機器：GeneAmp PCR SYSTEM 9700 (Applied Biosystems)

2. 高速冷却遠心機 (1.5-2 ml チューブが利用可能なもの)

3. 電気泳動装置 (Mupid など)

4. 紫外線照射装置

5. 写真撮影装置

6. 電子天秤

7. オートクレーブ

8. 熱風循環乾燥機

9. 超純水製造装置

10. ウォーターバス

11. ビーズ式細胞破碎装置 Micro Smash MS-100 (TOMY) もしくはこれに準じる破碎装置

12. ボルテックスミキサー

13. 分光光度計

4. 5 実験操作

4. 5. 1 実験操作における注意点

DNA 抽出から PCR 増幅、アガロースゲル電気泳動による分離までの一連の操作において、供試サンプル以外の DNA が混入しないように十分に注意する。実験台は操作を行う前にエタノールで消毒を行う。操作中は白衣、ゴム手袋、眼鏡、上履きを着用し、コンタミが起きないクリーンな環境で操作する。

4. 5. 2 試薬および器具

(1) 試薬

・ MagExtractor -Plant Genome- (東洋紡、NPK-501)

・ クロロホルム：イソアミルアルコール 1 l

クロロホルム (Wako、試薬特級、038-02601) とイソアミルアルコール (3-メチル-1-ブタノール、Wako、試薬特級、135-12015) を 24:1 に混合した液を 1 l 作製する。室温で保存する。

・ 70%エタノール 250 ml

エタノール (99.5) (Wako、試薬特級、057-00451) を 175 ml 加えた後、滅菌超純水で 250 ml にメスアップを行う。-20°Cで保存する。

・ 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 500 ml

1 M の 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール (Wako、試薬特級、207-06275) 溶液を 500 ml 作製する。6M に調整した塩酸 (Wako、精密分析用、083-03435) で pH 8.0 に調整した後滅菌超純水でメスアップを行い、オートクレーブ滅菌する。保存は 4°Cで行う。

・ 0.5 M EDTA (pH 8.0) 500 ml

0.5 M の 2NA(EDTA・2Na)、(DOJINDO、純度 99.5%以上、345-01865) 溶液を 500 ml 作製する。粒状の水酸化ナトリウム (Wako、試薬特級、198-13765) 及び 5 M に調整した水酸化ナトリウムで pH 8.0 に調整した後滅菌超純水でメスアップを行い、オートクレーブ滅菌する。保存は 4°Cで行う。

・ TE (pH8.0) 100 ml

1 M Tris-HCl (pH8.0)、0.5 M EDTA (pH8.0) を、それぞれ 10 mM、1 mM になるように超純水を用いて混合し、100 ml の溶液を作製する。オートクレーブ滅菌を行い、保存は 4°Cで行う。

・ 10×TBE 1 l

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール、ほう酸 (Wako、試薬特級、021-02195)、0.5 M EDTA を、それぞれ 0.89 M、0.89 M、0.02 M になるように超純水を用いて混合し、1 l の溶液を作製する。オートクレーブ滅菌後、室温で保存する。

・ 1×TBE 3 l

10×TBE を 300 ml 量り取り、超純水 2700 ml を加えて 3 l とする。攪拌後、室温で保存する。

- ・ 1-3%アガロースゲル

抽出後のゲノム DNA を泳動する際には 1%、SSR マーカーの PCR 産物を泳動する際には 3%、STS マーカーの PCR 産物を泳動する際には 2%のアガロースを作製し、使用する。Agarose S (ニッポンジーン、For Electrophoresis、312-01193)、1×TBE をフラスコに入れ、電子レンジで加熱し、完全に溶解させる。スターラーで攪拌しながら 60℃程度まで冷ました後、ゲルトレイにそそぐ。ゲルの厚さは 5 mm とする。使用するゲルメーカーセットは Mupid の EXU-HR とする。ゲルトレイは大を使用し、コームは 6mm 幅×13 ウェルのものを、ゲル 1 枚当たり 2 本使用する。流し込んだゲルは 25 分間室温で放置し固めた後 4℃で 30 分間放置し、完全に固める。

- ・ Marker 1 (λ/Hind III digest) (ニッポンジーン、316-00454)

- ・ ローディングダイ

ブロモフェノールブルー (Wako、試薬特級、129-02912)、キシレンシアノール FF (Wako、試薬特級、244-00461)、グリセリン (Wako、試薬特級、075-00616)、0.5 M EDTA (pH 8.0) をそれぞれ最終濃度 0.05% (w/v)、0.05% (w/v)、30% (v/v)、5 mM になるように滅菌超純水を用いて調整する。

- ・ エチジウムブロマイド溶液

1×TBE バッファーに 10 µg/ml の濃度で臭化エチジウム溶液(10mg/ml)(ナカライテスク、核酸電気泳動用、14631-94) を加える。溶液量は染色の際ゲルが十分に浸る程度とする。

- ・ KAPA Taq Extra Hot Start Ready Mix PCR Kit (with loading dye) (KAPA BIO SYSTEMS、KK3606)

- ・ 滅菌超純水

純水は電気伝導率 0.0056 mS/m (25 °C) 以下になるように脱イオン化されたものを用い、さらに精製された超純水を用いるのが望ましい。滅菌超純水は純水を 121℃、15 分以上オートクレーブで処理したものを用いる。

- ・ プライマー溶液

フォワードプライマーとリバースプライマーを各 10 pmol/µl 含む溶液を、滅菌超純水で希釈し調整する。

・ 100 bp DNA Ladder (Dye Plus) (TAKARA、3422A)

(2) 器具など

1.5 ml チューブ (滅菌済み)

2 ml チューブ (滅菌済み)

液体窒素

ビーズ式細胞破碎装置用サンプルチューブ TM-625S (滅菌済み) (TOMY)

破碎用ビーズ (ステンレス、5.0 mm)

磁気スタンド (磁性ビーズ分離用チューブスタンド)

96 穴 PCR プレート (ビーエム機器株式会社)

PCR シーリングテープ (ビーエム機器株式会社)

溶液類は熱に不安定なもの及びキット付属の滅菌不用のものを除いて、オートクレーブ滅菌を行う。

特別の指定がある試薬はそれに従い、その他については JIS 特級試薬 (あるいは同等のグレード) を用いること。

チップやチューブ類は、滅菌済みのものを用い、必ず使い捨てとする。マイクロピペットのチップ類及び 1.5 ml と 2.0 ml 等のチューブは、滅菌缶に入れオートクレーブ滅菌し、その後、乾燥器に入れ、完全に乾燥してから用いる。ガラス製ピペットは、乾熱滅菌を行う。あるいは、滅菌済みの市販品を用いる。

4. 5. 3 試験材料の取り出し

サンプルの取り出し・取り扱い時には、サンプル間で相互に混入しないように、サンプル毎に作業台や電子天秤等の清掃を十分に行うとともに、操作に細心の注意を払う。生の葉の取り出し・取り扱い時には、組織が乾燥しないように、迅速に操作を行う。

4. 5. 4 DNA 抽出操作

本マニュアルでは、MagExtractor -Plant Genome- (東洋紡) を用いて DNA 抽出を行う。DNA 抽出の基本操作は東洋紡のプロトコールに従っているが、TE バッファーの液量など一部を修正している。以下の抽出操作の中で、キット付属のプロトコールと異なる個所を下線で示した。

(1) サンプルの前処理

- ①展開直後の新鮮な葉を 0.1 g 採取する。消毒用エタノールで洗浄したピンセットを用いて葉をちぎり取る。採取した葉は破砕用ビーズ 1 個を入れておいた 2 ml チューブ (ビーズ式細胞破砕装置用サンプルチューブ) に入れる。
- ②2 ml チューブを液体窒素に入れ、チューブごと葉を凍結させる。その後、葉が凍結したままの状態、ビーズ式細胞破砕装置 Micro Smash MS-100 (TOMY) で 2500 rpm、30 秒間の破砕処理を 3 回、合計 90 秒間行う。1 回の破砕処理ごとにチューブを再度液体窒素に入れ冷却し直し、破砕中にサンプルが溶解しないように注意する。破砕後、葉がパウダー状に完全に粉砕されていることを確認する。破砕が不十分の場合は、追加で破砕処理を行う。
- ③溶解液 300 μ l を加え、溶解液とサンプルをよく混合する。(溶解液が析出していないことを確認してから添加する。) 溶解液を加えるまでの間にサンプルが溶解しないように注意する。
- ④ボルテックスミキサーを使用して 10 秒間激しく攪拌する。(サンプルが完全に溶解液に浸ってから攪拌する。)
- ⑤65°C、10 分間インキュベートする。(3~4 分おきに計 2 回、ボルテックスミキサーで 5 秒間激しく攪拌する。)
- ⑥クロロホルム：イソアミルアルコール 300 μ l を加える。
- ⑦3~5 秒間激しく混合する。(ボルテックスミキサーでは均一に混合されないことがあるので、激しく上下に振って混合する。)
- ⑧12,000rpm、1 分間遠心分離する。(サンプルによっては沈殿しにくいこともある。その場合、さらに 2~3 分間遠心分離する。)
- ⑨新たな 1.5ml チューブに上清 250 μ l を回収する。(上清が 250 μ l に満たないときは界面の吸い込みに注意しながら可能なだけ上清を回収する。)
- ⑩吸着液 600 μ l を加える。(上清が 100 μ l に満たないときは吸着液 750 μ l を加える。)

(2) マニュアル法による Plant DNA の抽出

- ①前項、(1) サンプルの前処理にしたがって調製したサンプルを用意する。
- ②磁性ビーズ 40 μ l を加える。(磁性ビーズは、あらかじめよく混合してから使用する。)
- ③チューブミキサーを使用して、1 分間、激しく混合する。・・・[DNA の吸着]
- ④チューブを磁気スタンドにセットして、30 秒間程度、放置することによって磁性ビーズを集める。(このとき数回転倒混和し、蓋についたビーズもできるだけ回収する。)
- ⑤上清を除去する。
- ⑥洗浄液 900 μ l を加える。
- ⑦ボルテックスミキサーを使用して、5 秒間程度、激しく混合する。(このとき、ビーズが分散・懸濁されていることを確認する。)

- ⑧チューブを磁気スタンドにセットして、30 秒間程度、放置することによって磁性ビーズを集める。(このとき数回転倒混和し、蓋についたビーズもできるだけ回収する。)
- ⑨上清を除去する。
- ⑩⑥～⑨のステップをもう一度行う。
- ⑪70%エタノール 900 μ l を加える。
- ⑫ボルテックスミキサーを使用して、5 秒間程度、激しく混合する。(このとき、ビーズが分散・懸濁されていることを確認する。)
- ⑬チューブを磁気スタンドにセットして、30 秒間程度、放置することによって磁性ビーズを集める。(このとき数回転倒混和し、蓋についたビーズもできるだけ回収する。)
- ⑭上清を除去する。
- ⑮⑪～⑭のステップをもう一度行う。(エタノールは蓋に付着しているものも含めてできるだけ除去する。)
- ⑯チューブのフタを開けた状態で、55°Cの熱風循環乾燥機に 10 分間入れることで、エタノールの除去を行う。
- ⑰TE バッファー 50 μ l を加える。
- ⑱チューブミキサーを使用して、1 分間、激しく混合する。・・・[DNA の溶出]
- ⑲チューブを磁気スタンドにセットして、30 秒間程度、放置することによって磁性ビーズを集める。
- ⑳DNA が含まれる上清を新しい 1.5ml マイクロチューブに回収する。

4. 5. 5 DNA の定量

抽出した DNA の定量方法には、アガロースなどの電気泳動による分析や分光光度計による分析がある。前者のアガロース電気泳動では、正確な DNA 量の値は算出されないが、抽出された DNA の量、抽出時の DNA 分解程度 (DNA の長さや移動度) や夾雑物の影響の有無を確認することができる。

本マニュアルでは、分光光度計を用いて DNA 量の測定を行い、さらにアガロースゲル電気泳動で DNA の状態を確認する。図 1 に抽出したゲノム DNA の電気泳動写真を示した。

(1) 分光光度計による測定

DNA の定量のために吸光度を測定する場合には、必ず回収液を遠心分離 (12,000 rpm、1 分間) し、その上清を原液のまま使用する。また、DNA 濃度の算出には、必ず A320 nm 値で補正する。このとき DNA の濃度が 40 ng/ μ l 以上あればよい。40 ng/ μ l 未満の場合は抽出作業をやり直す。

(2) アガロースゲル電気泳動による確認

1. 抽出したゲノム DNA 溶液 3 μ l と、ローディングダイ 1 μ l をよく混合し、1%アガロースゲルにアプライする。ゲノム DNA を電気泳動する際のサイズマーカーとしては Marker 1 (λ /Hind III digest) を用いる。
2. 電気泳動装置で、100 V30 分程度、電気泳動を行う。
3. 電気泳動済みのアガロースゲルを、エチジウムブロマイド溶液中で 10 分間静置して染色する。
5. 紫外線照射装置で紫外線を照射し、写真撮影装置で撮影する。図 1 に電気泳動図を示した。
6. Marker 1 (λ /Hind III digest) のバンドとの比較を行い、DNA の大部分が Marker 1 の最上位のバンド (23.13 kbp) 以上に存在することを確認する。
7. DNA 溶液は-20 $^{\circ}$ C以下で凍結保存する。



図 1 電気泳動図

左 : Marker 1 (λ /Hind III digest)

右 : 抽出した DNA

4. 5. 6 PCR 増幅操作

「4. 5. 1 実験操作における注意点」の項に記載したように、実験操作中のコンタミには十分に注意する。

PCR 増幅操作は以下の通りである。

(1) SSR マーカー

1. PCR 反応液の調製 (1 反応当たり)

①滅菌超純水	6.5 μ l
--------	-------------

②KAPA Taq Extra Hot Start Ready Mix PCR Kit (with loading dye, KAPA BIO SYSTEMS)	12.5 μ l
③SSR プライマー溶液 (フォワードプライマーIP1 とリバースプライマーIP3 を各 10 pmol/ μ l 含む溶液)	1.0 μ l
④ゲノム DNA (10 ng/ μ l になるように滅菌超純水で希釈したもの)	5.0 μ l
全量	25.0 μ l

①、②、③を混合し、マスター液を調整する。マスター液の液量は、サンプル数の 10%増量として調整を行う。マスター液を攪拌し均一にした後、1 反応ごとに分注する。最後に④を加え、最終的な反応液とする。陰性対照の反応液には④のゲノム DNA を加えずに TE バッファーを加える。陽性対照は、トットリフジタ 1 号のゲノム DNA とする。

2. GeneAmp PCR SYSTEM 9700 (Applied Biosystems) を用いて、以下のプログラムで PCR 反応を行う。

- ・ 94°C 9 分間熱変性
- ・ [94°C 30 秒間→55°C 30 秒間→72°C 30 秒間]の反応を、40 サイクル
- ・ 72°C 5 分間の反応後、4°C で ∞ 。

3. 反応終了後、-20°C で保存する。

(2) STS マーカー

1. PCR 反応液の調製 (1 反応当たり)

①滅菌超純水	7.0 μ l
②KAPA Taq Extra Hot Start Ready Mix PCR Kit (with loading dye, KAPA BIO SYSTEMS)	12.5 μ l
③STS プライマー溶液 (フォワードプライマーとリバースプライマーを各 10 pmol/ μ l 含む溶液)	0.5 μ l
④ゲノム DNA (10 ng/ μ l になるように滅菌超純水で希釈したもの)	5.0 μ l
全量	25.0 μ l

①、②、③を混合し、マスター液を調整する。マスター液の液量は、サンプル数の 10%増量として調整を行う。マスター液を攪拌し均一にした後、1 反応ごとに分注する。最後に④を加え、最終的な反応液とする。陰性対照の反応液には④のゲノム DNA を加えずに TE バッファーを加える。陽性対照は、トットリフジタ 1 号のゲノム DNA とする。

2. GeneAmp PCR SYSTEM 9700 (Applied Biosystems) を用いて、以下のプログラムで PCR 反応を行う。

- ・ 94°C 5 分間熱変性
- ・ [94°C 30 秒間→60°C 30 秒間→72°C 15 秒間]の反応を、35 サイクル
- ・ 72°C 7 分間の反応後、4°C で∞。

3. 反応終了後、-20°C で保存する。

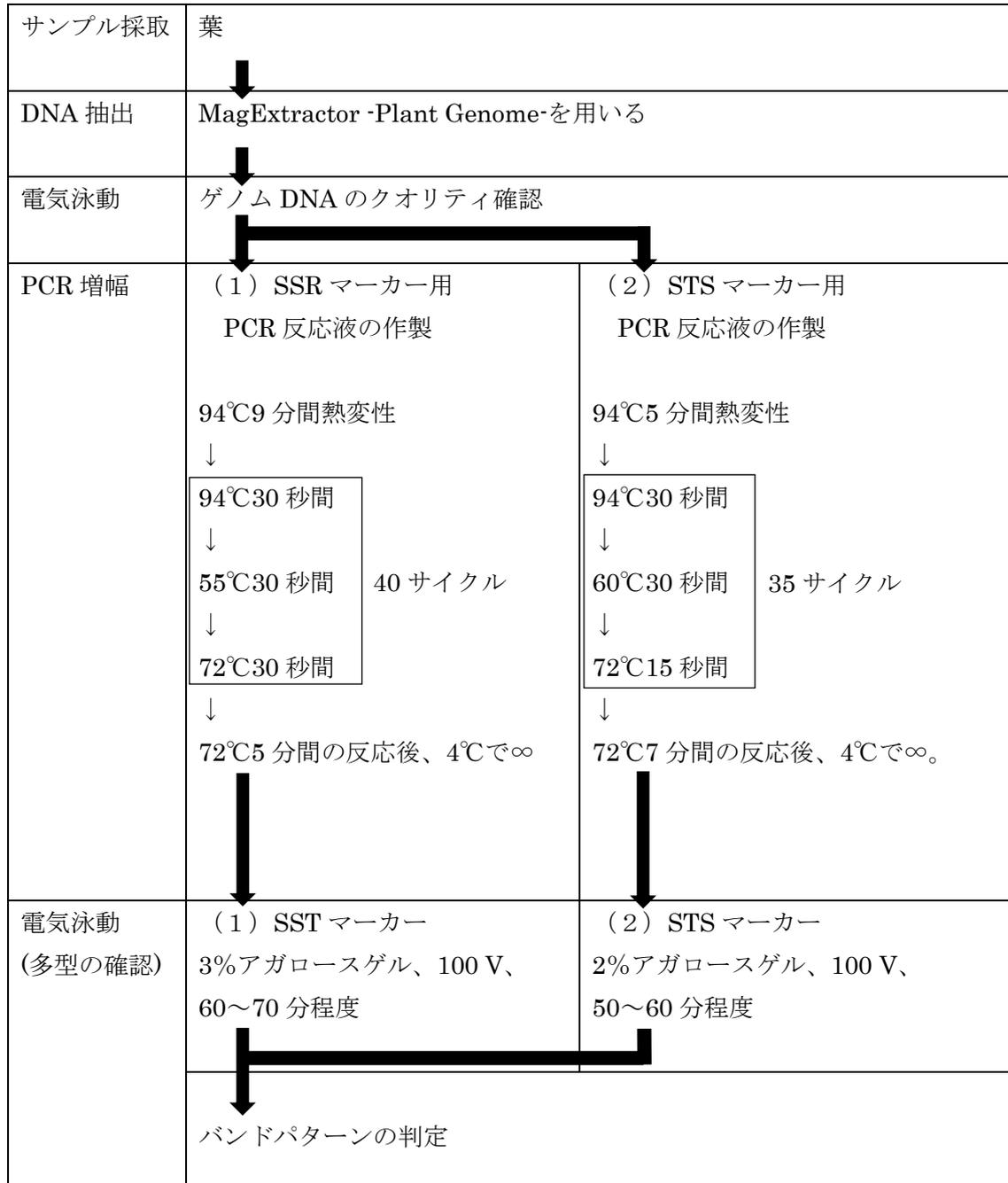
4. 5. 7 SSR マーカー及び STS マーカーの検出方法

バンドの比較のため、サイズマーカーとともに登録品種及び登録予定品種 3 品種を、サンプルと並べて同時に泳動する。SSR マーカーは 3% アガロースゲル、STS マーカーは 2% アガロースゲルで分離を行う。PCR 産物を電気泳動する際のサイズマーカーとしては 100 bp DNA Ladder を用いる。PCR 産物 6 µl、100 bp DNA Ladder 5 µl をウェルにアプライする。泳動は 100 V で行う。SSR マーカーは 60~70 分程度 (100 bp DNA Ladder 中のブロモフェノールブルーがゲルの最下流端から 5 mm の位置に来る程度)、STS マーカーは 50~60 分程度 (100 bp DNA Ladder 中のブロモフェノールブルーがゲルの最下流端から 1.5 cm の位置に来る程度) 泳動を行い、PCR 増幅産物の分離を行う。泳動終了後エチジウムブロマイド溶液に 10 分間浸漬し、染色を行う。染色終了後、紫外線照射下で観察し、写真撮影及び多型の判定を行う。

4. 5. 8 データ解析、判定

バンドのサイズや本数などのバンドパターンの比較を行い、調査する植物が「登録品種 3 品種のうちのいずれかなのか、野生個体 11 種類のうちのいずれかなのか」「もし登録品種であるなら、3 品種のうちどの品種なのか」の決定を行う。用いるマーカーや比較を行う個体によっては、個体間での多型を示さないものや、個体間でのバンドサイズが似ており判定が難しいものがある。全 18 マーカーを用いてバンドパターンの比較を行うことで、調査する植物が同一クローンであるか、異なる遺伝子型を有する別個体であるかの判断を確実に行うことができる。図 2 及び図 3 に、SSR マーカー及び STS マーカーを用いた判定結果の電気泳動写真を示した。バンドパターンの比較を行う際に、DNA 断片が増幅されない系統とマーカーの組み合わせの場合、その結果が PCR の不成功と区別できない。よって、この組み合わせの場合はマーカーとしては評価の対象としない。評価の対象としない組み合わせのものについては、図 2 及び図 3 中に記載した。

4. 5. 9 実験操作フロー図



5. トラブルシューティング

1. 使用組織・部位

完全展開葉はうまく DNA が抽出できない場合があるので、使用しない。

6. 是正処理

本マニュアルの使用者からの情報収集として、改善依頼票を設けて情報交換を行い、必要に応じてマニュアル等の是正措置を行う。

付属文書：

表 1 SSR マーカーのプライマー配列

表 2 STS マーカーのプライマー配列

図 2 SSR マーカーの電気泳動写真

図 3 STS マーカーの電気泳動写真

表1 SSRマーカーのプライマー配列

プライマー名	配列	塩基数
251-IP1	CGGGAGCAGCTTAGTCATCAATAT	24
251-IP3	TGTCAAATGCATTAACCATCCAAGT	25
263-IP1	GCGATTAAGCAATTGGATGTCCAAGA	26
263-IP3	CTGGTCCCTTCCACAAAACTTTA	24
274-IP1	TACCTTCGTCATTATCTAGTGTGCAT	26
274-IP3	TTCCACAACGAGTTCGAACATAGA	24
293-IP1	CTATTCCCTCTTTGTGCACGCTCAAC	25
293-IP3	CTCAAGGTCCGCACTCTCTTTT	22
299-IP1	GCAATTGTGCCATTTTCGTAGAGAA	24
299-IP3	ATGGTCGTTTCTCTGCTACTTCTT	24
332-IP1	GTTGCCGTAATTAATCAACAGCTCAT	26
332-IP3	TTGGAAAAATTAGGGATTTGGGGG	24
353-IP1	ACCTACTTACAAGTGACACTAGGTTT	26
353-IP3	AGTTGGAGGGTACATGCGATTTTT	24
257-IP1	AACAAACTGGAATGTTGTGGTGAA	24
257-IP3	GAATTCTTCTTTGCTGAATACCA	24
260-IP1	CAACTCCGAAACGAAAACAAAACG	24
260-IP3	CATTTTCGCAGCTTTTTTCGAG	20
298-IP1	CAAGTAGATAAAGAGTGAAAGGGTAAG	27
298-IP3	CAAATTTGGAGGCATTCTAGTGA	23
366-IP1	TTCAACGAAGAACTGTTCAACCG	24
366-IP3	GAGTGGAGATGGACTGAGTTGAC	23
370-IP1	AAAGAATAAAGAAGTGGCTTCACAG	25
370-IP3	GACTAGTCGTCGTTTCGTTAGTCCT	24
376-IP1	GGGGTTTGGTTCCAAAAATTGAATAC	26
376-IP3	CATTTTCAGGAAAGTGGATTGTC	23
384-IP1	AACGTTAGATACACACTAATCAACGG	26
384-IP3	ATTTTCTGCTGCTTCGACAGAC	22
235-IP1	CTTCAGAAAGCACTAGACTATGCTTG	26
235-IP3	ATGAAATGTTAGACGATGCACCT	23
238-IP1	TGGTAGAGCTCTAGAAGAGGGTAATA	26
238-IP3	CACAAACATATGCTTCCACAAAC	24
322-IP1	GATCCTTGTGATCCAGGCTTCAAA	24
322-IP3	TCTACAAGGGATGAGGAAGTATCC	24

IP1はフォワードプライマー、IP3はリバースプライマーである。

表2 STSマーカークのプライマー配列

マーカーク名	プライマー名 (F, R)	配列	塩基数	トットリフジタ1号を 鑄型DNAとした際の バンドサイズ
A-07	A-07-2,3F	GAAACGGGTGTCACTGACAT	20	449 bp
	A-07-2R	GAAACGGGTGACTTAAGTTA	20	

Fはフォワードプライマー、Rはリバースプライマーである。

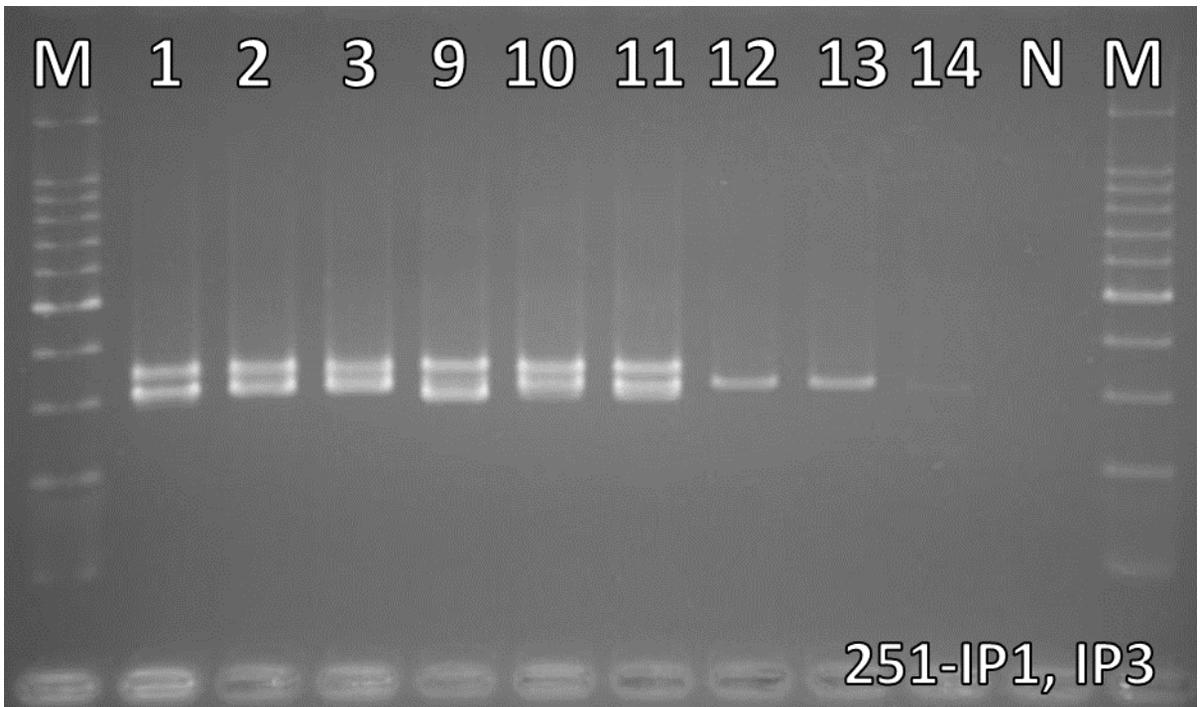
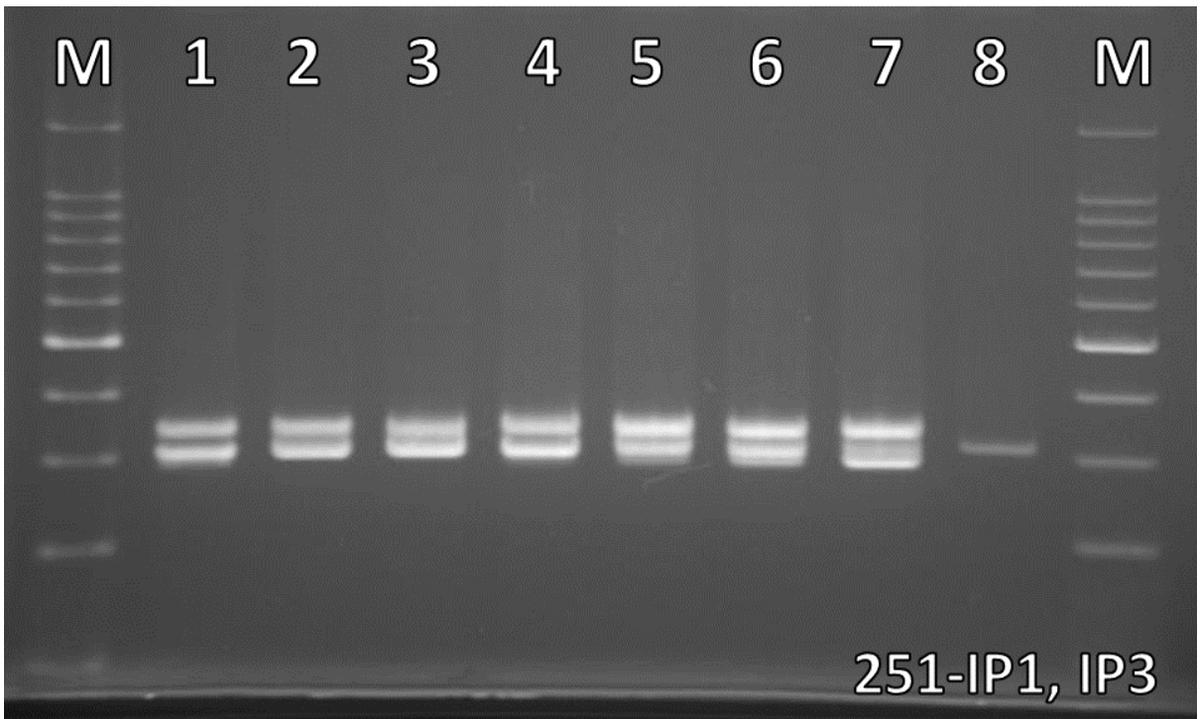


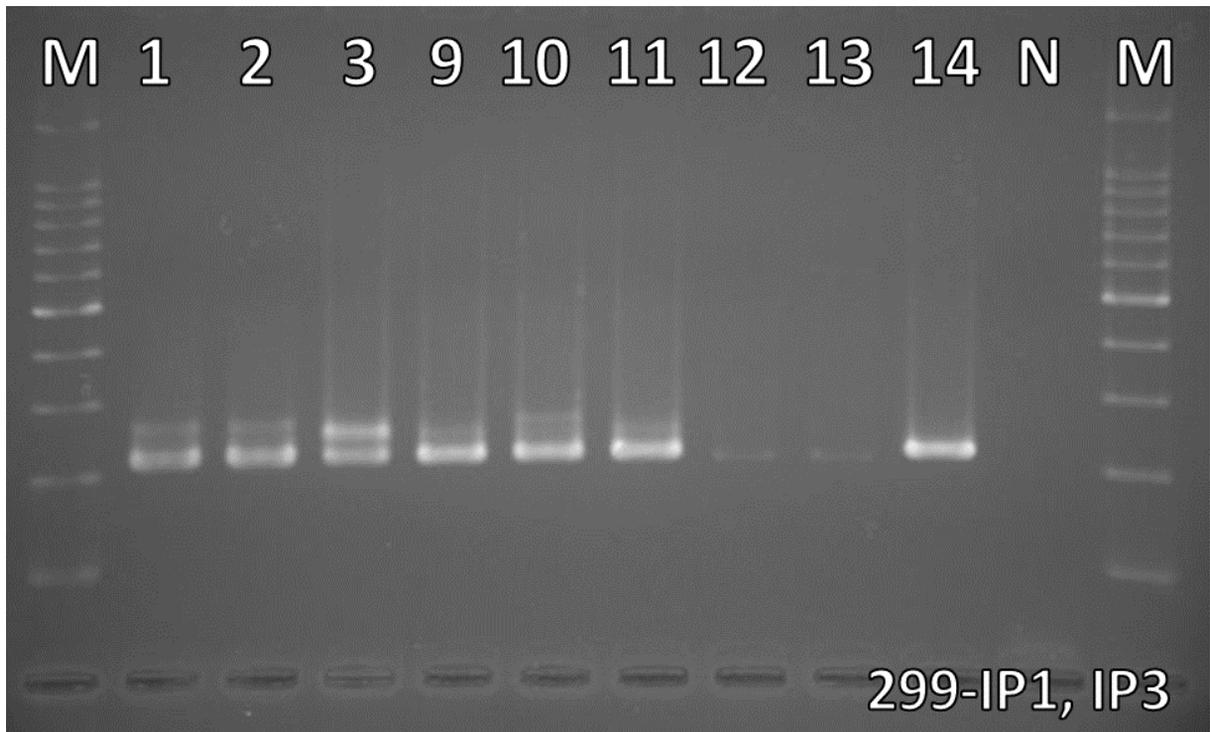
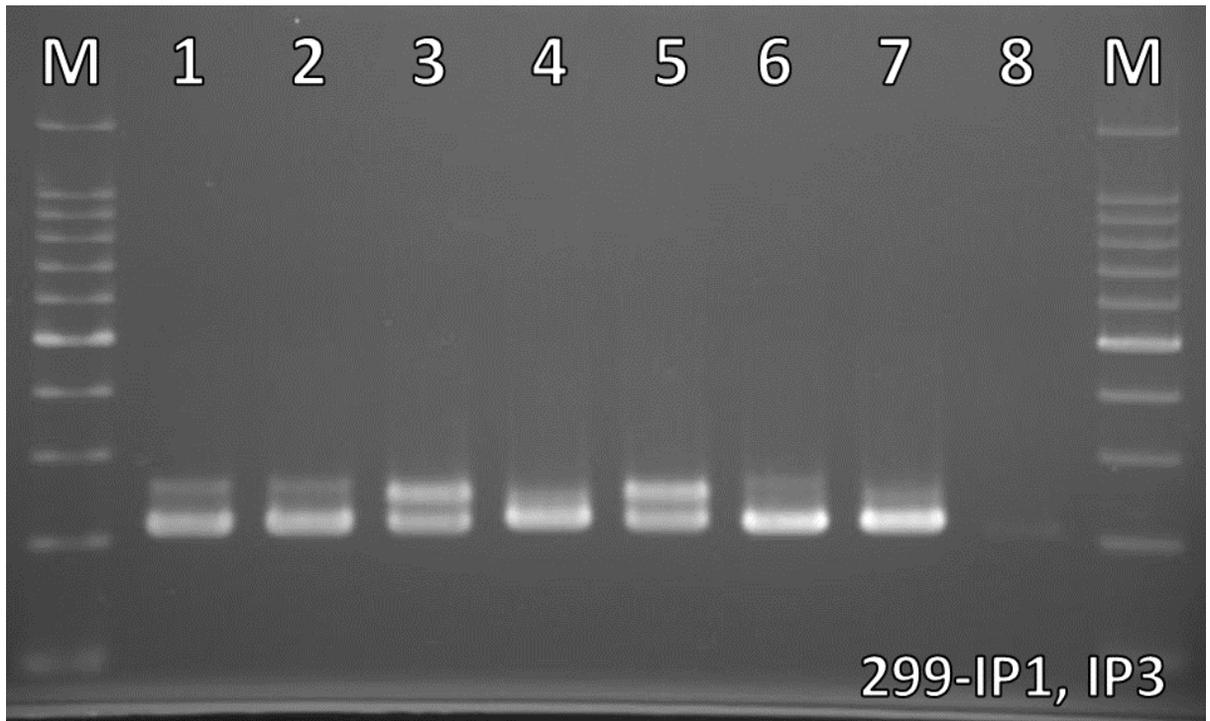
図2 SSRマーカーの電気泳動写真

M: サイズマーカー(100 bp DNA Ladder)、1: トットリフジタ1号、2: トットリフジタ2号、3: TF-3、4: タケシマキリンソウ1、5: タケシマキリンソウ2、6: タケシマキリンソウ3、7: タケシマキリンソウ4、8: タケシマキリンソウ5、9: タケシマキリンソウ6、10: タケシマキリンソウ7、11: タケシマキリンソウ8、12: キリンソウ野生系統(富山)、13: キリンソウ野生系統(柏崎)、14: キリンソウ野生系統(佐渡)、N: ネガティブコントロール

それぞれの電気泳動写真の下部にPCRで用いたプライマーを示した。

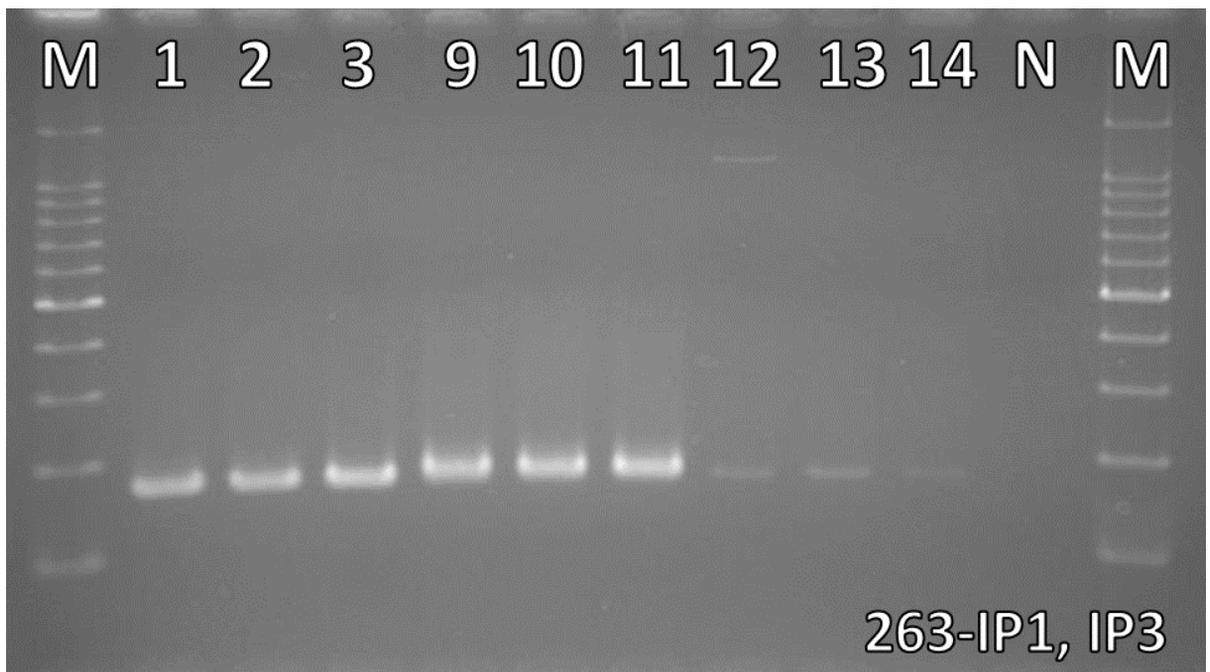
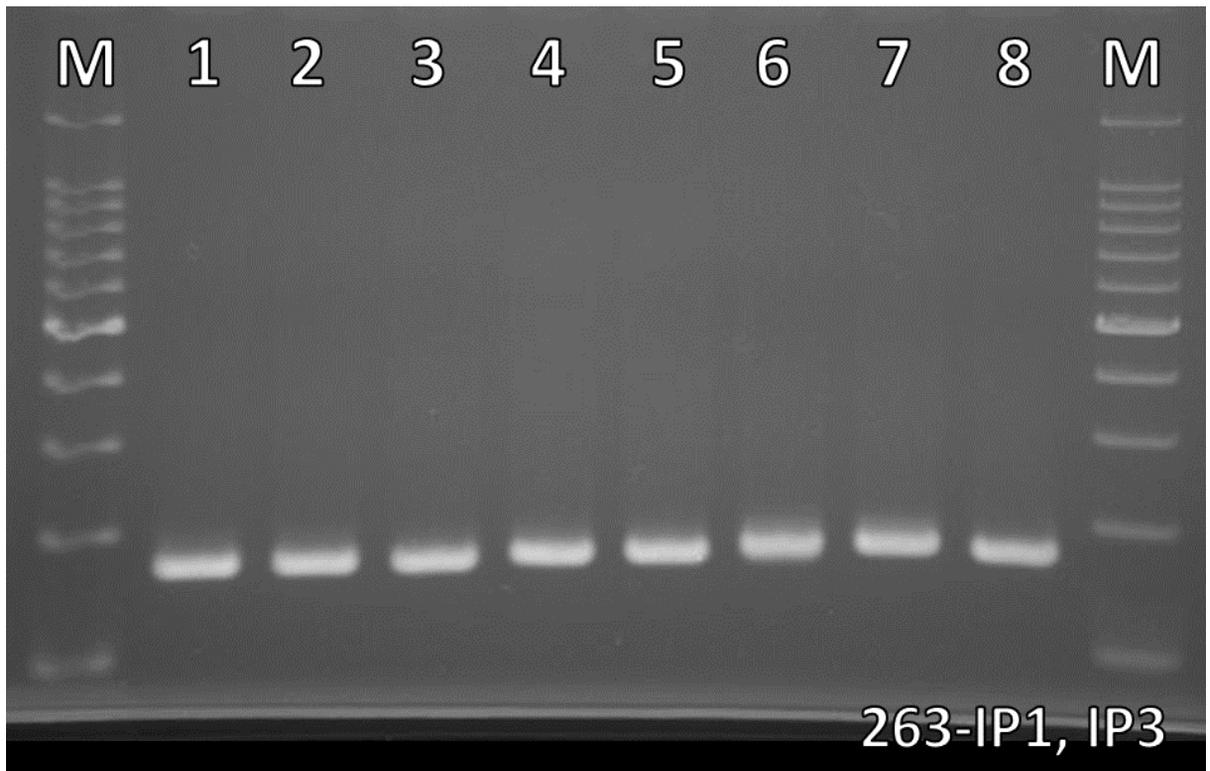
251-IP1, IP3と14の組み合わせの場合はバンドを増幅しないので、マーカーとしては評価の対象としない。

図2 続き



299-IP1, IP3と8, 12, 13の組み合わせの場合はバンドを増幅しないので、マーカーとしては評価の対象としない。

図2 続き



263-IP1, IP3と12, 13, 14の組み合わせの場合はバンドを増幅しないので、マーカーとしては評価の対象としない。

図2 続き

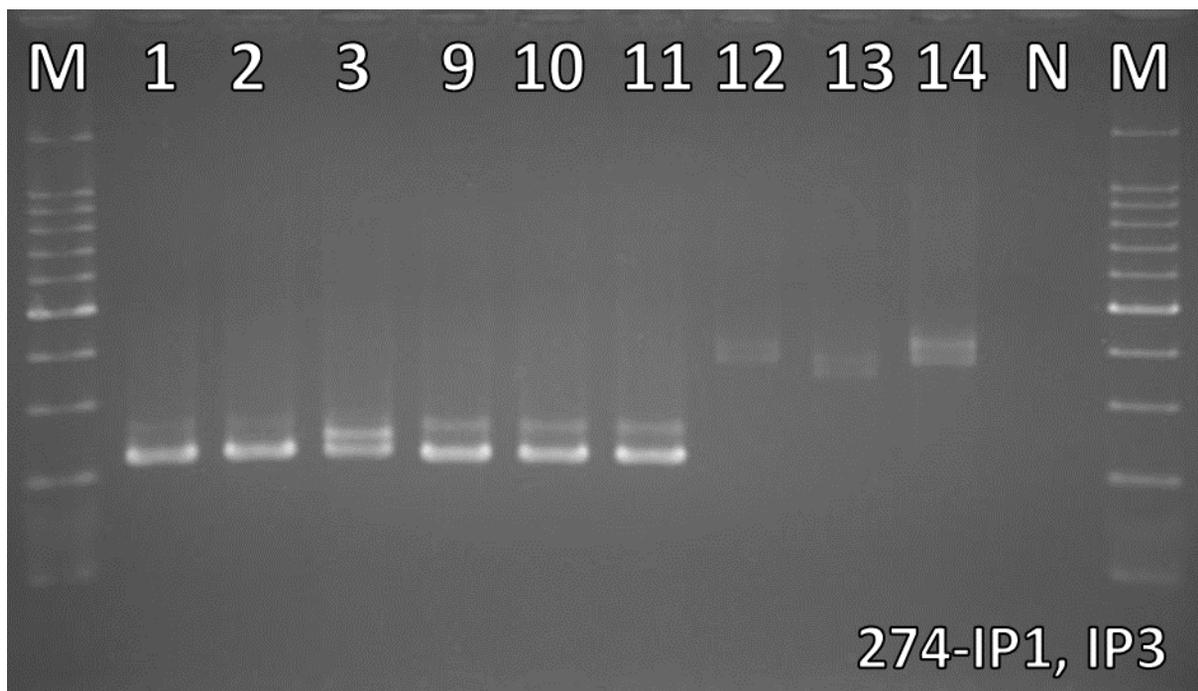
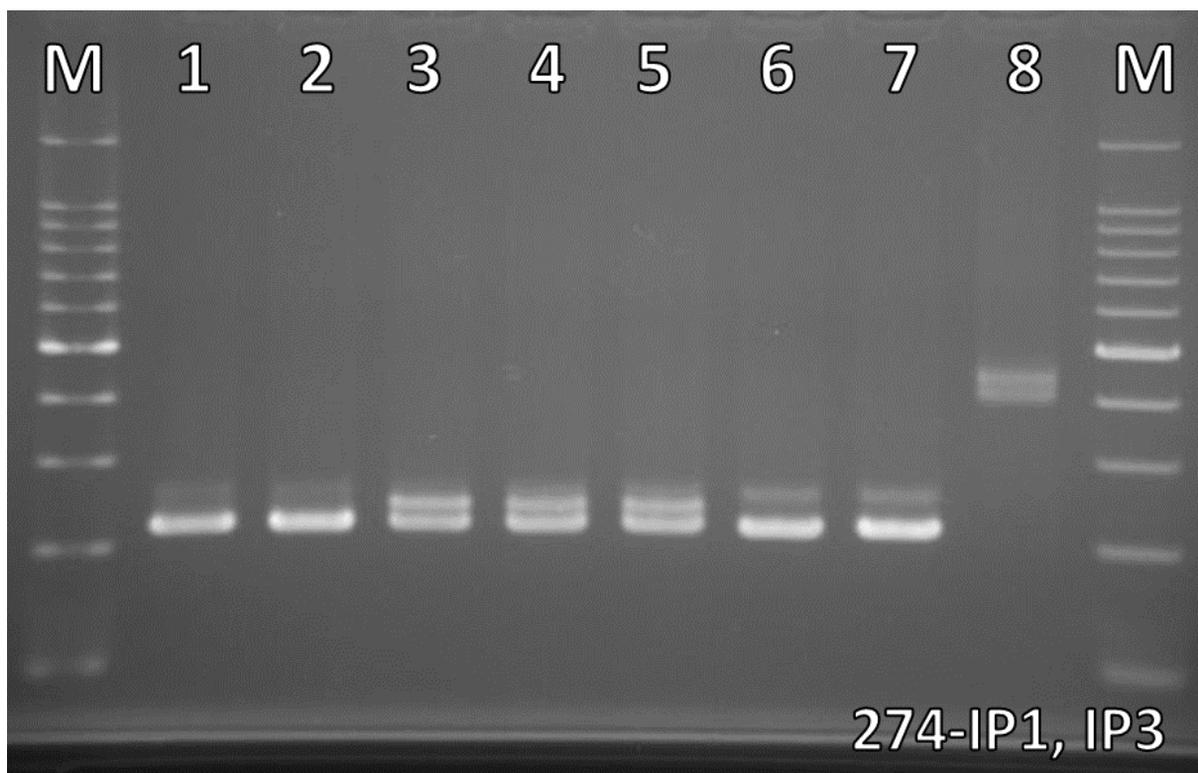


図2 続き

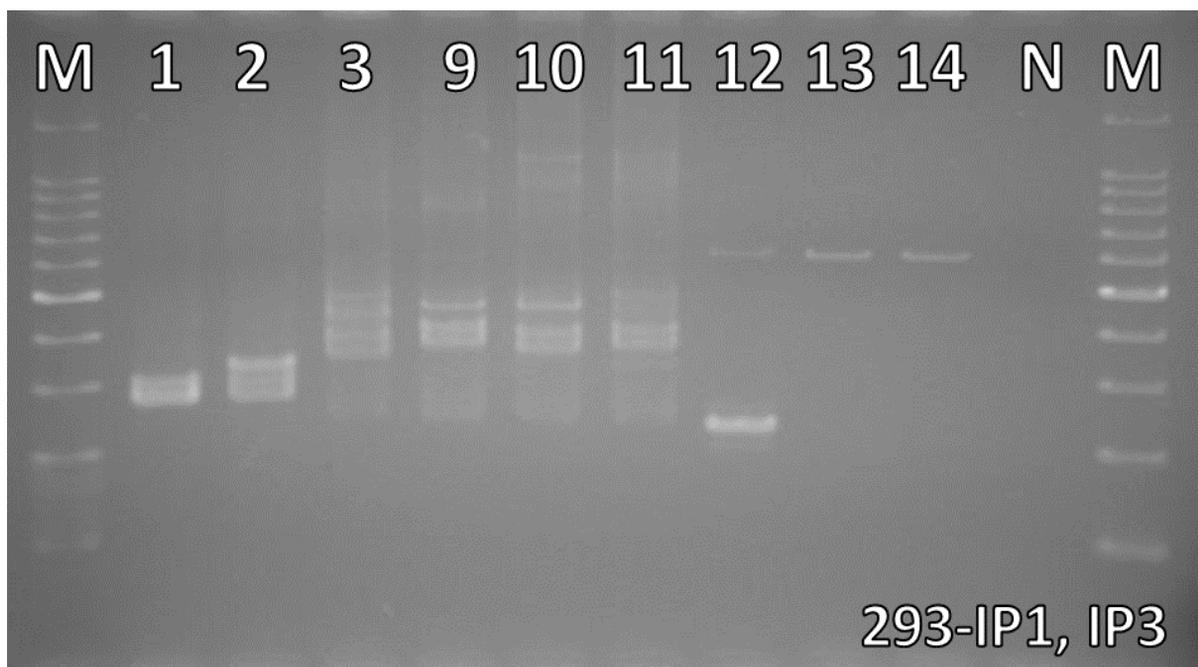
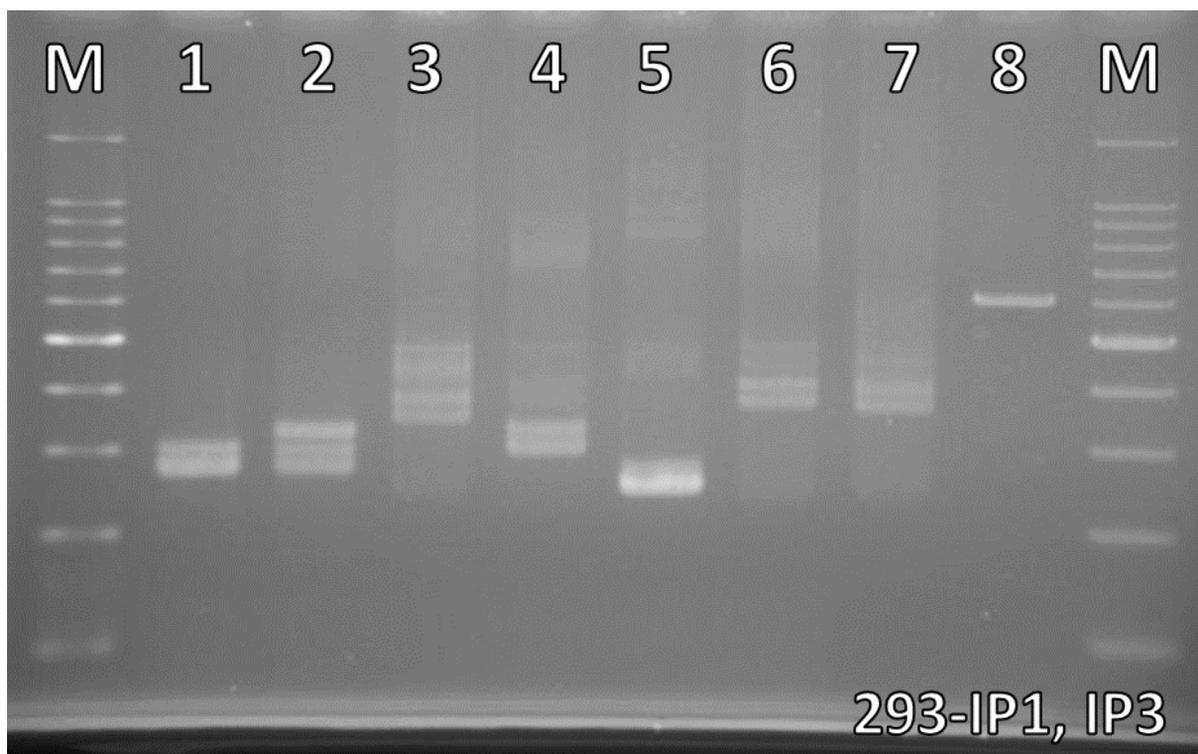


図2 続き

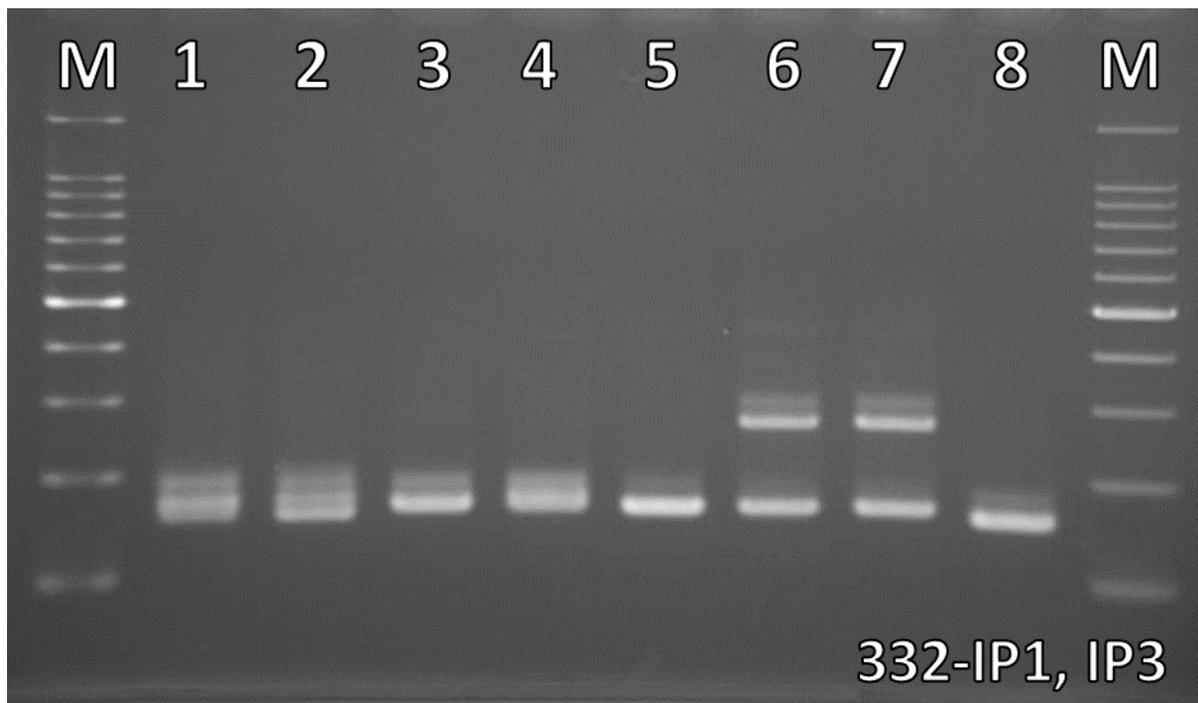
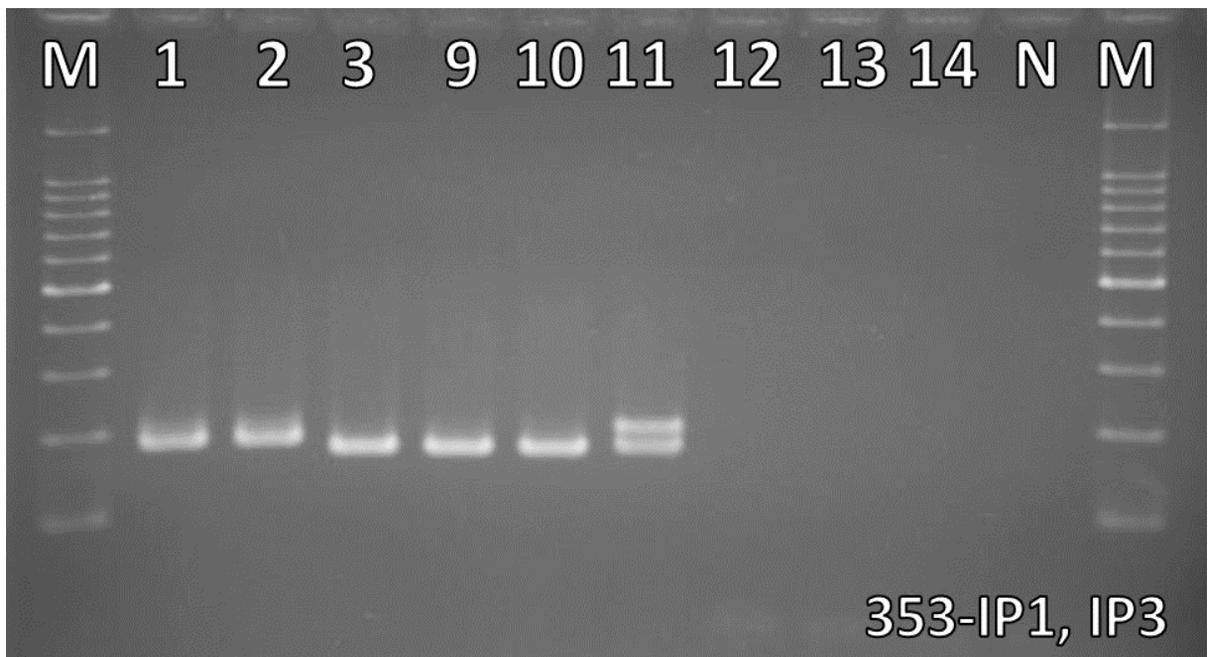
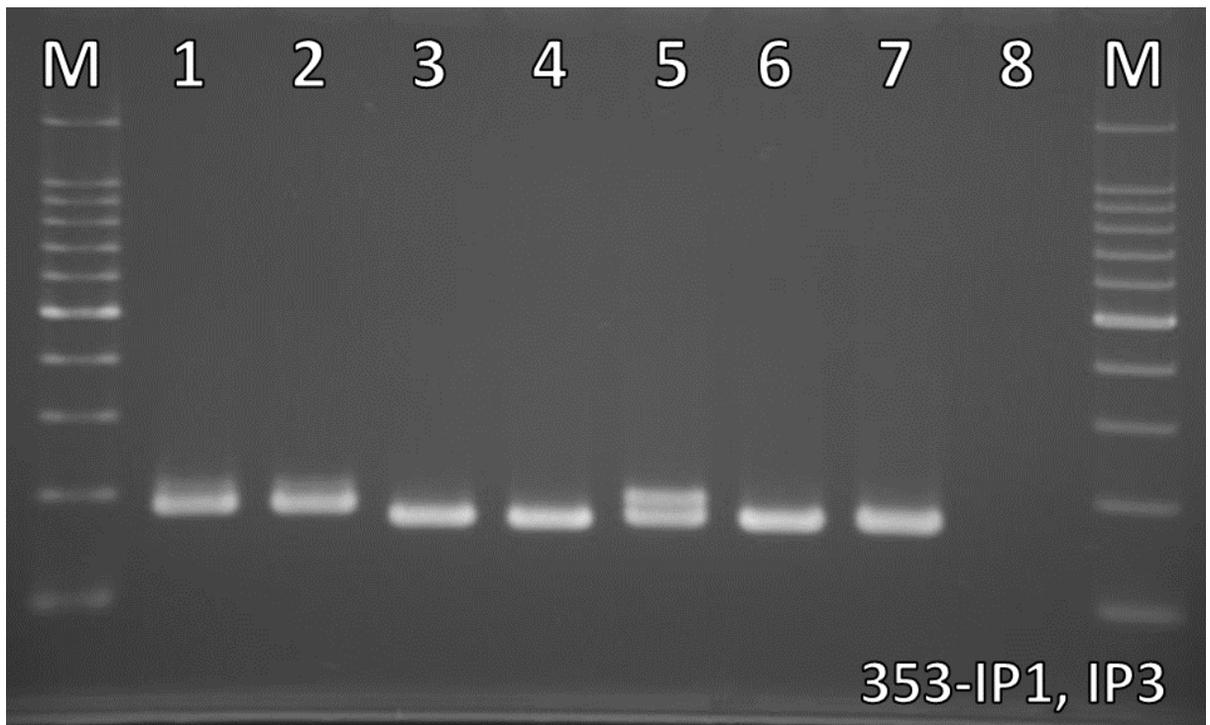


図2 続き



353-IP1, IP3と8, 12, 13, 14の組み合わせの場合はバンドを増幅しないので、マーカーとしては評価の対象としない。

図2 続き

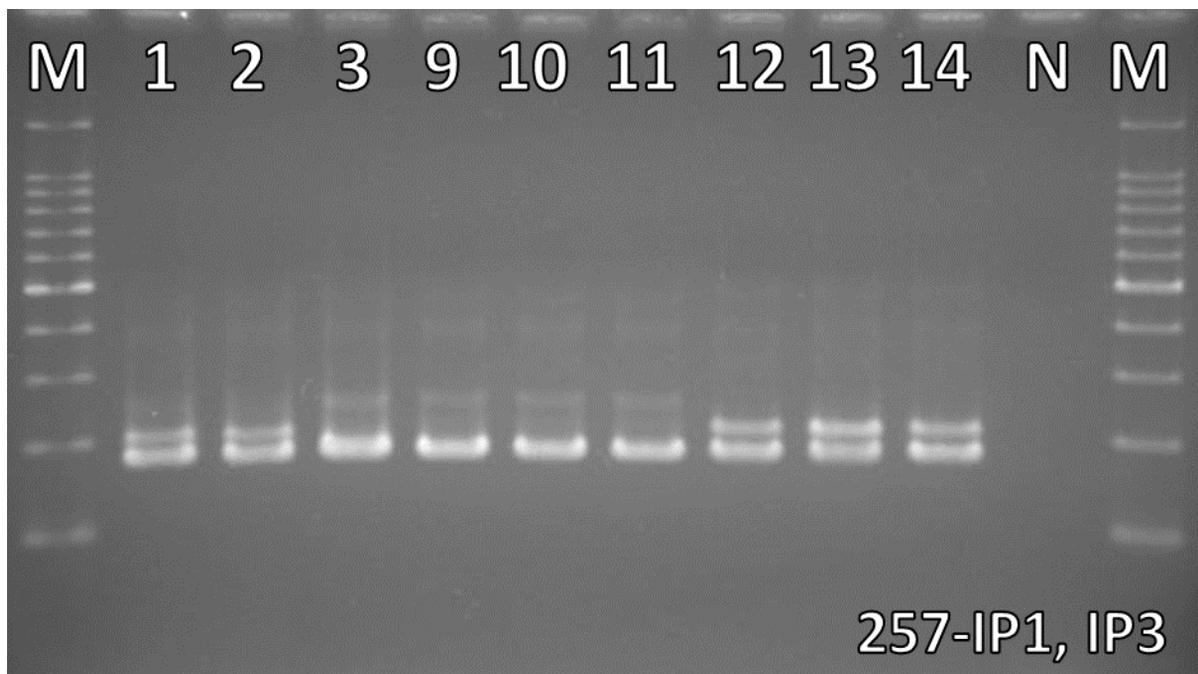
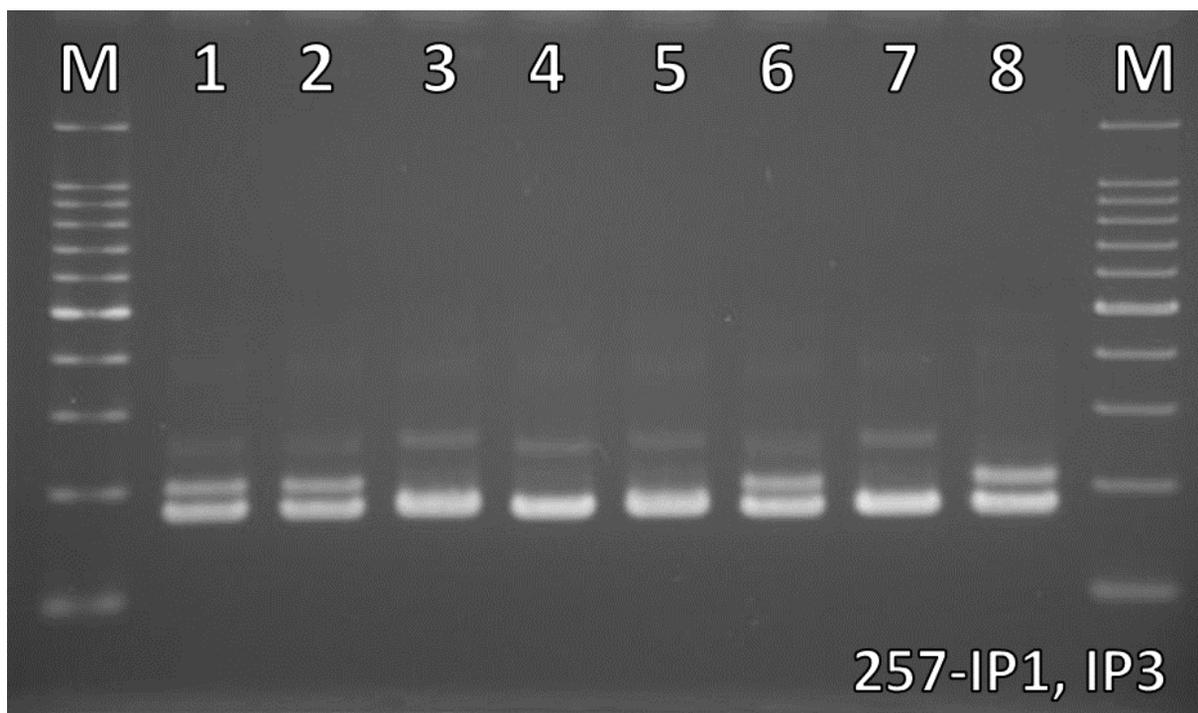


図2 続き

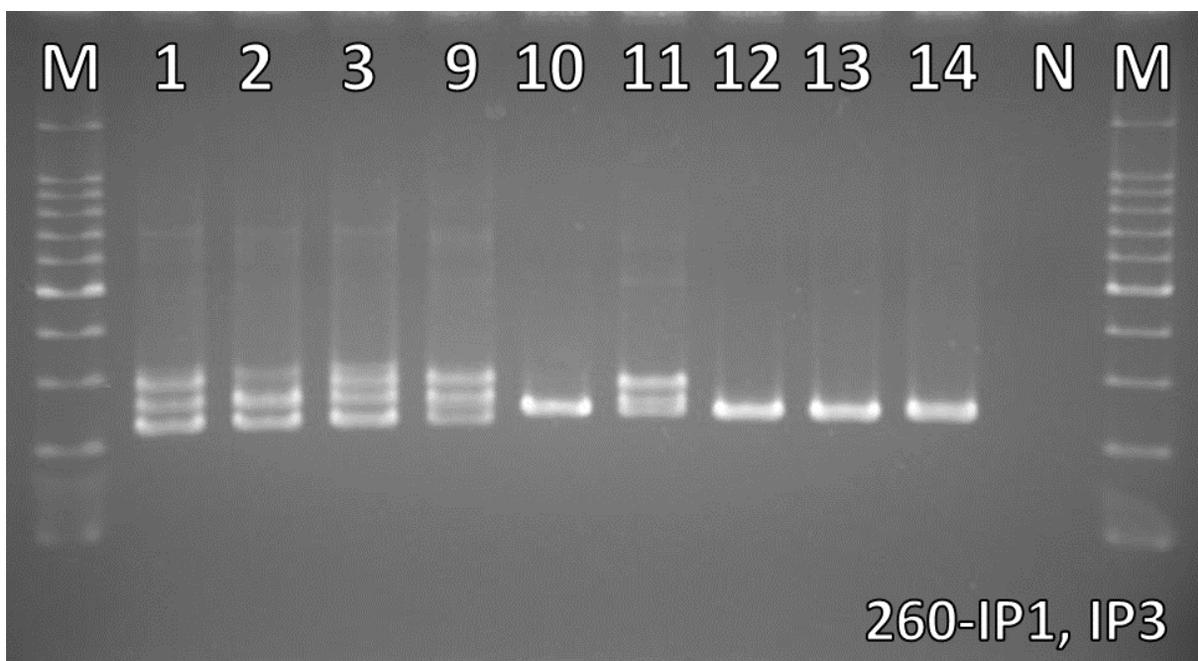
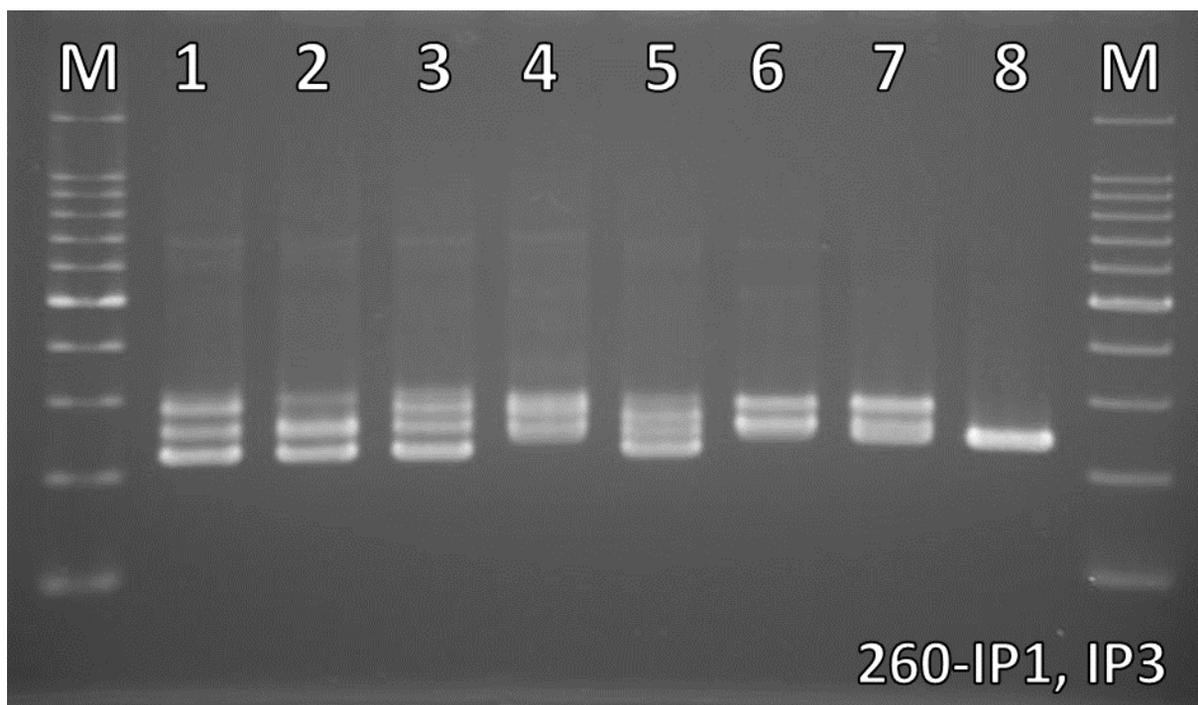


図2 続き

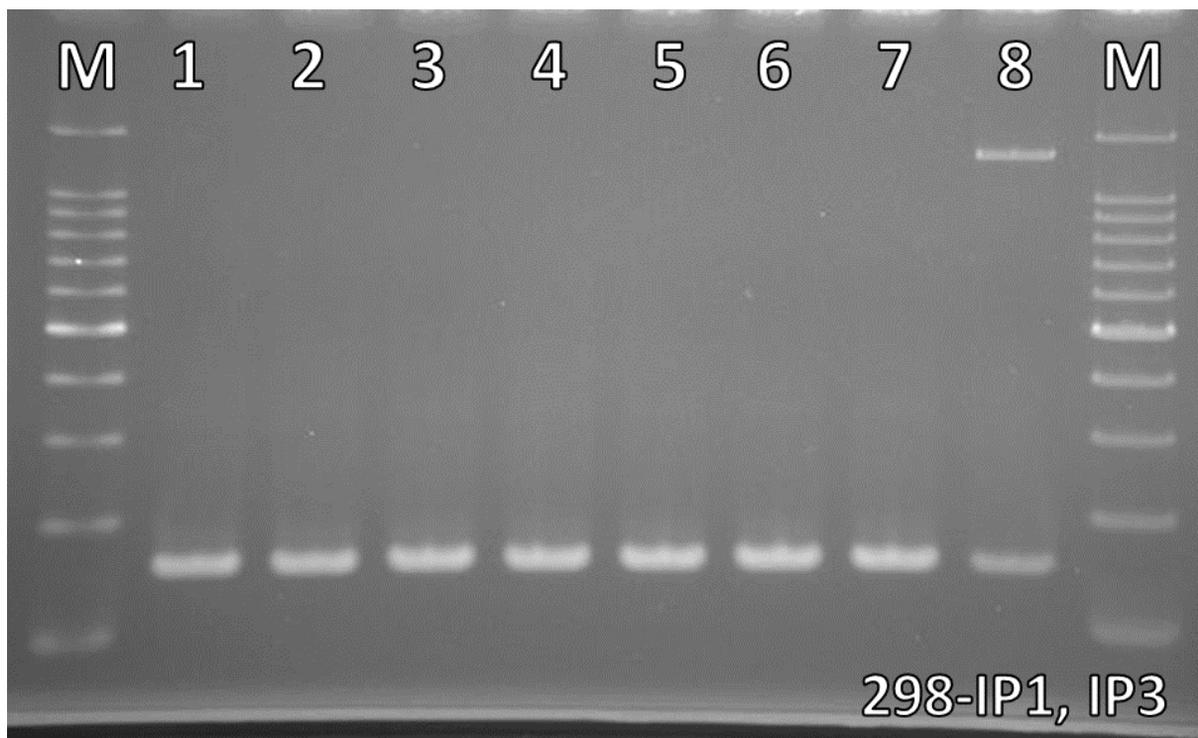


図2 続き

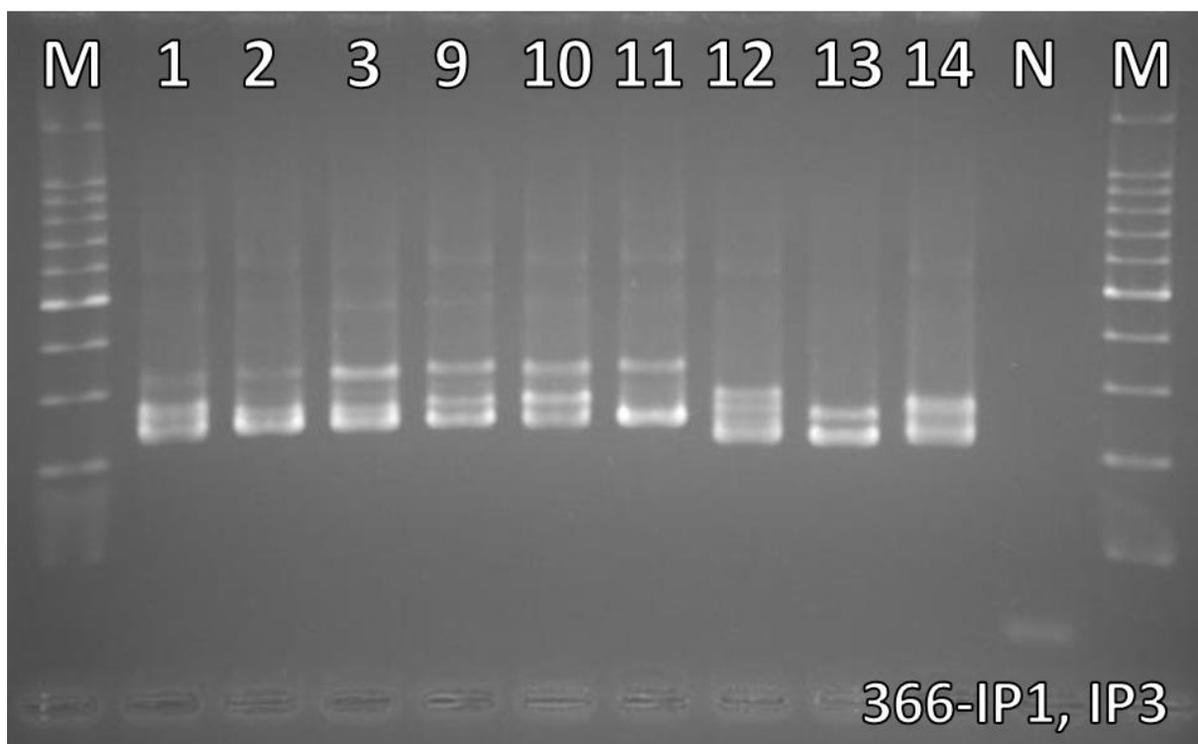
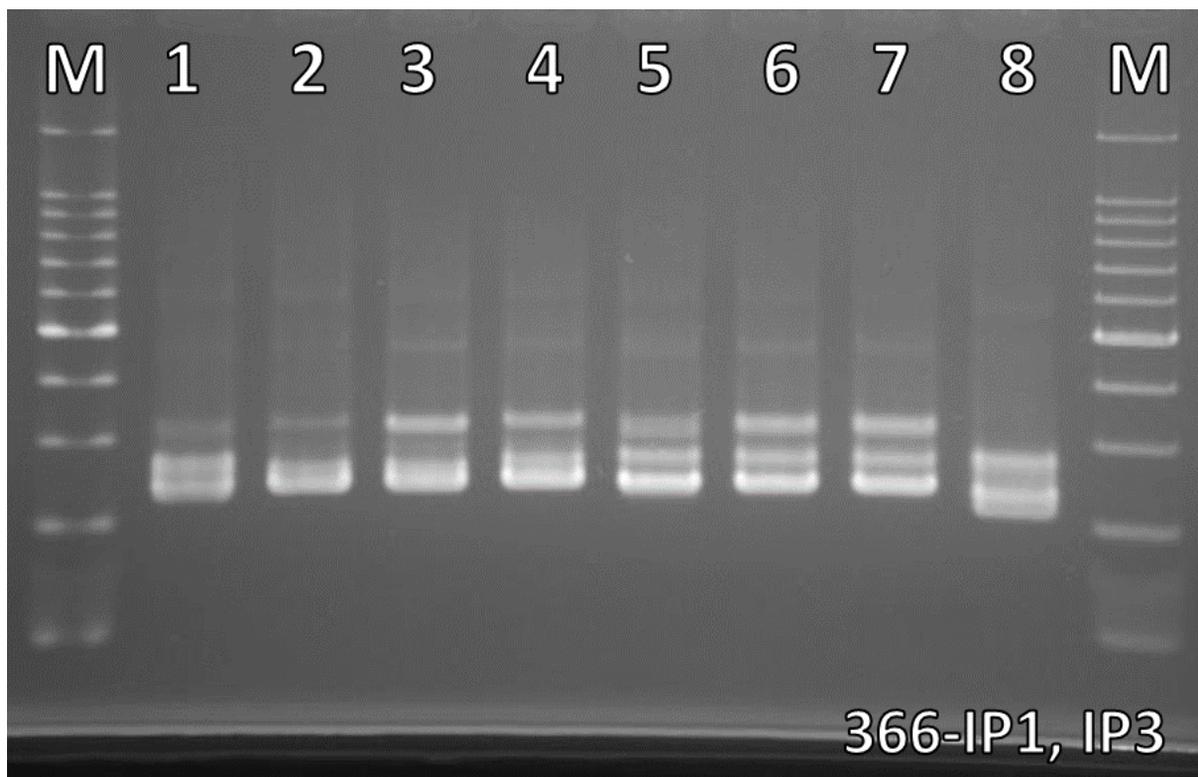


図2 続き

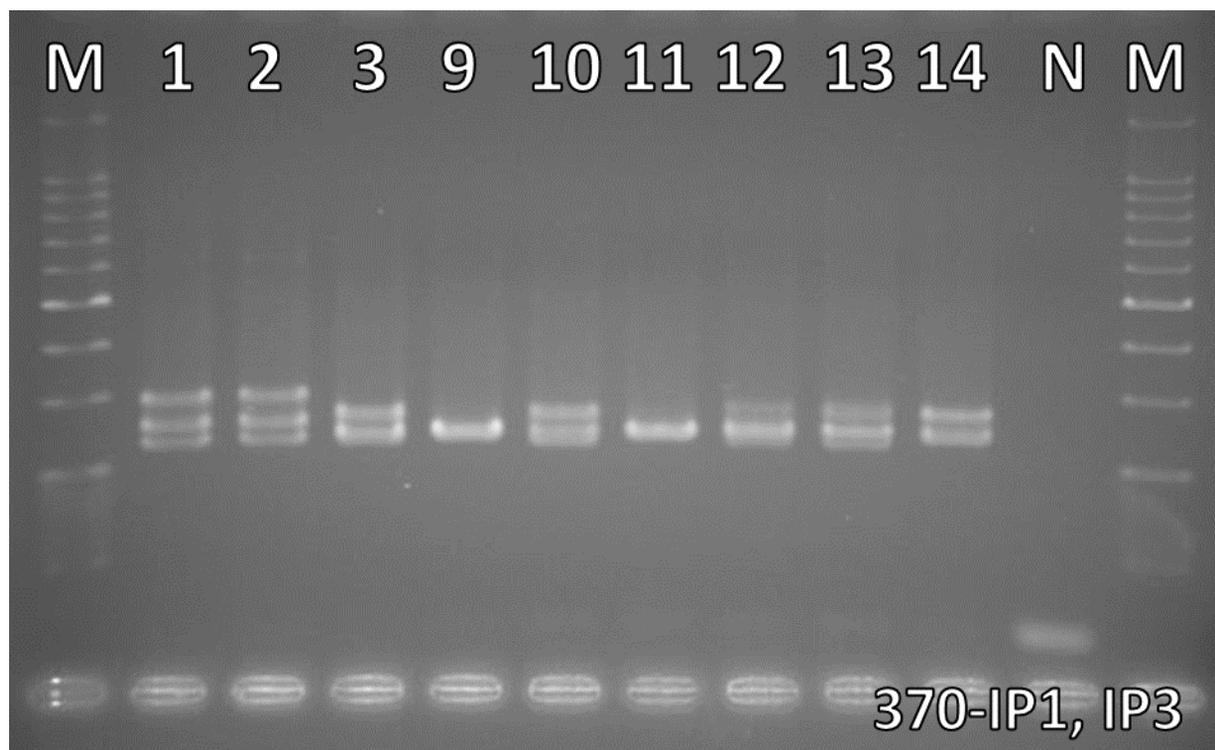
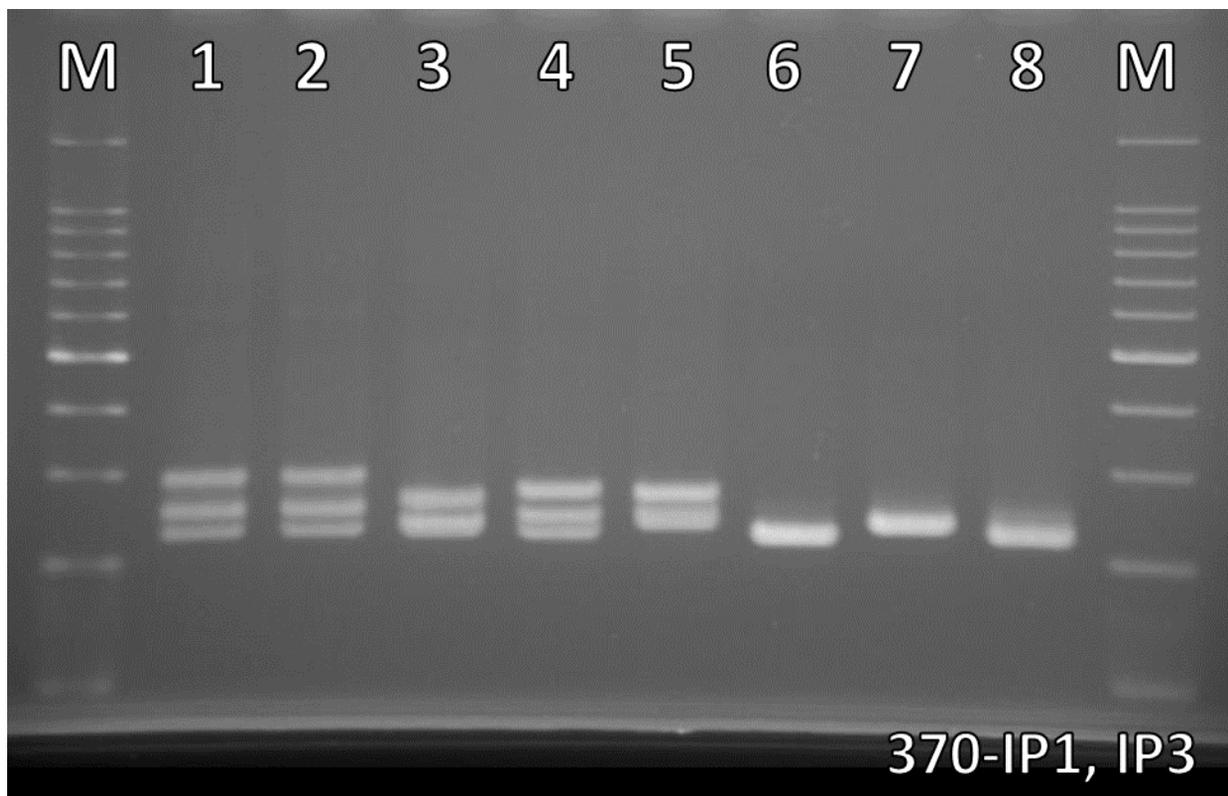


図2 続き

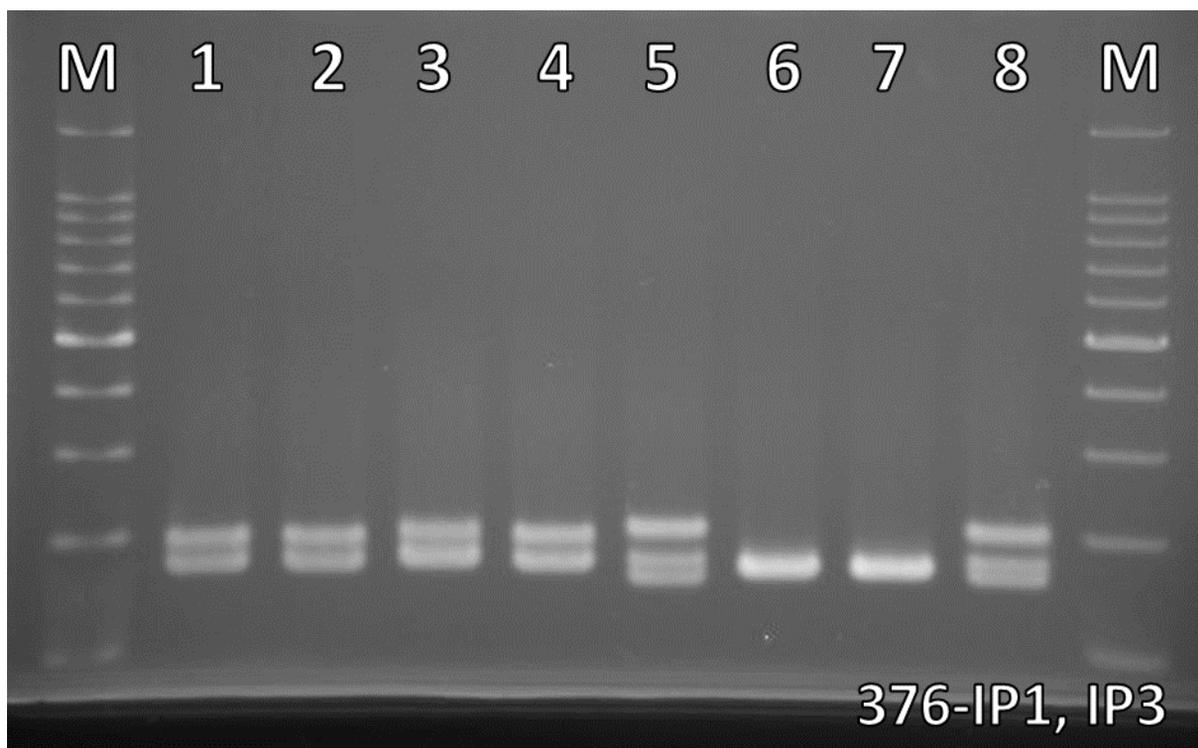


図2 続き

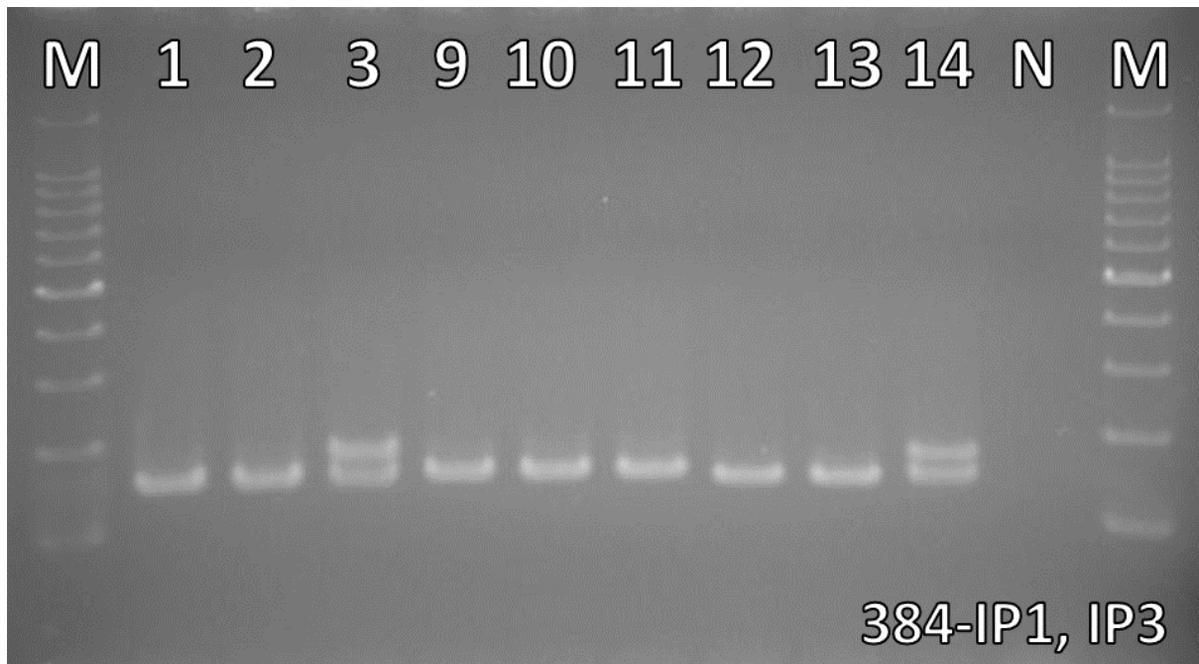
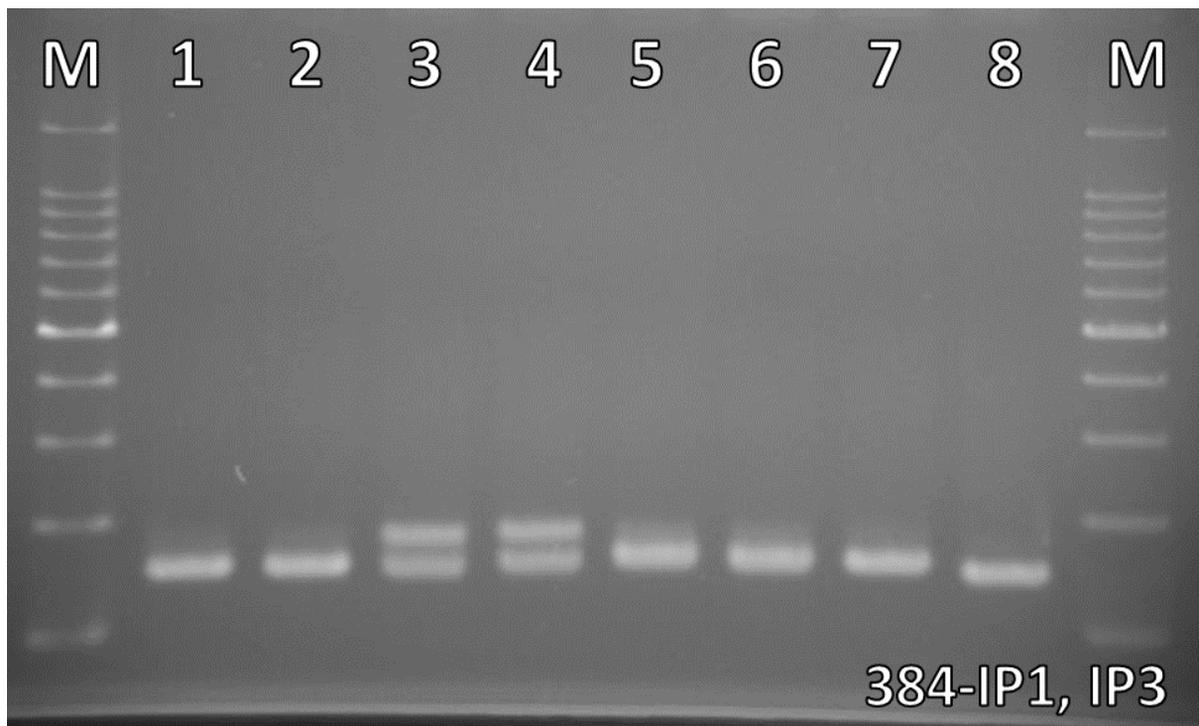


図2 続き

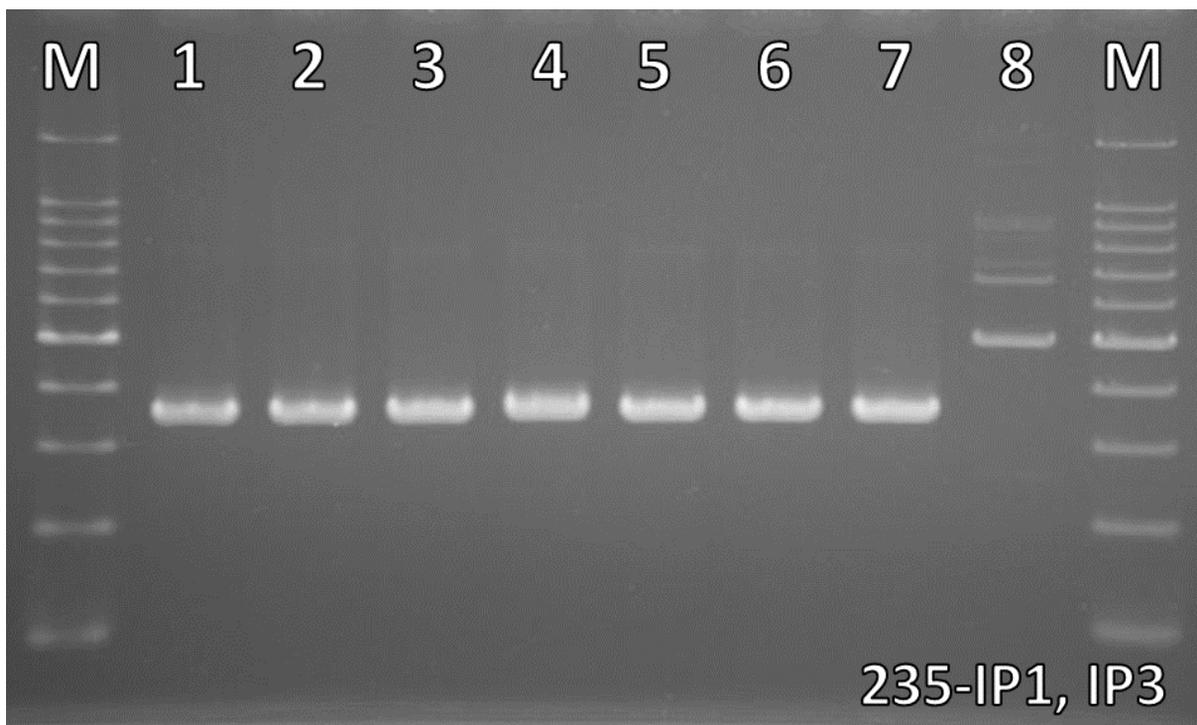


図2 続き

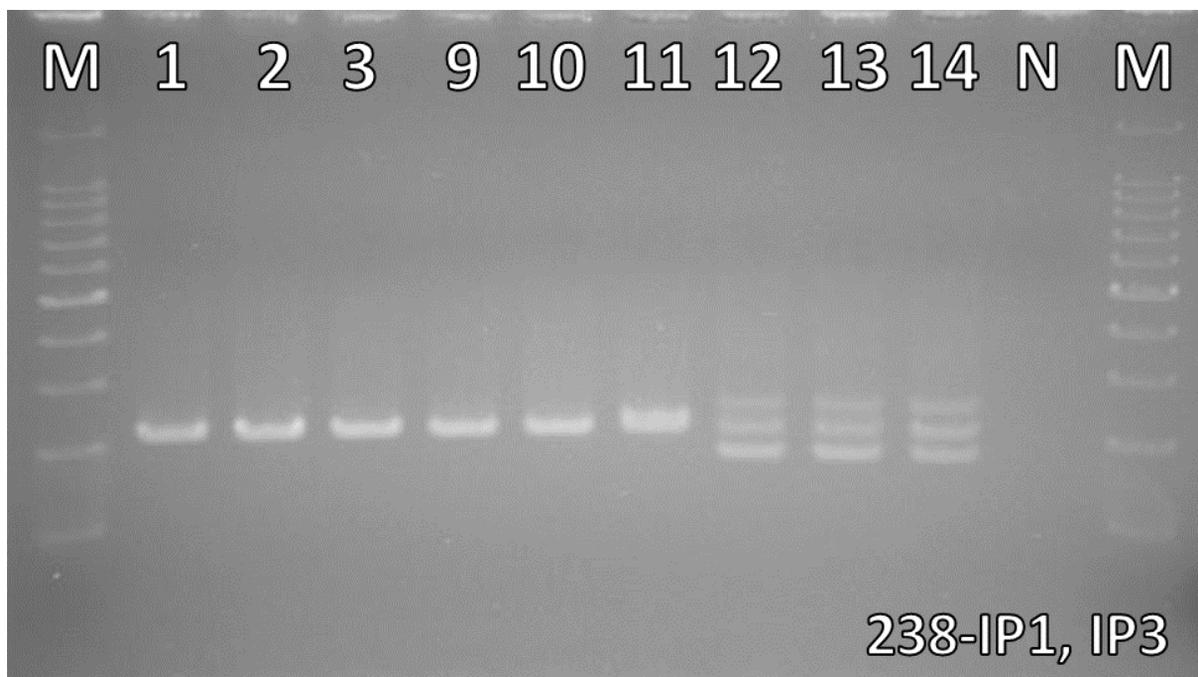
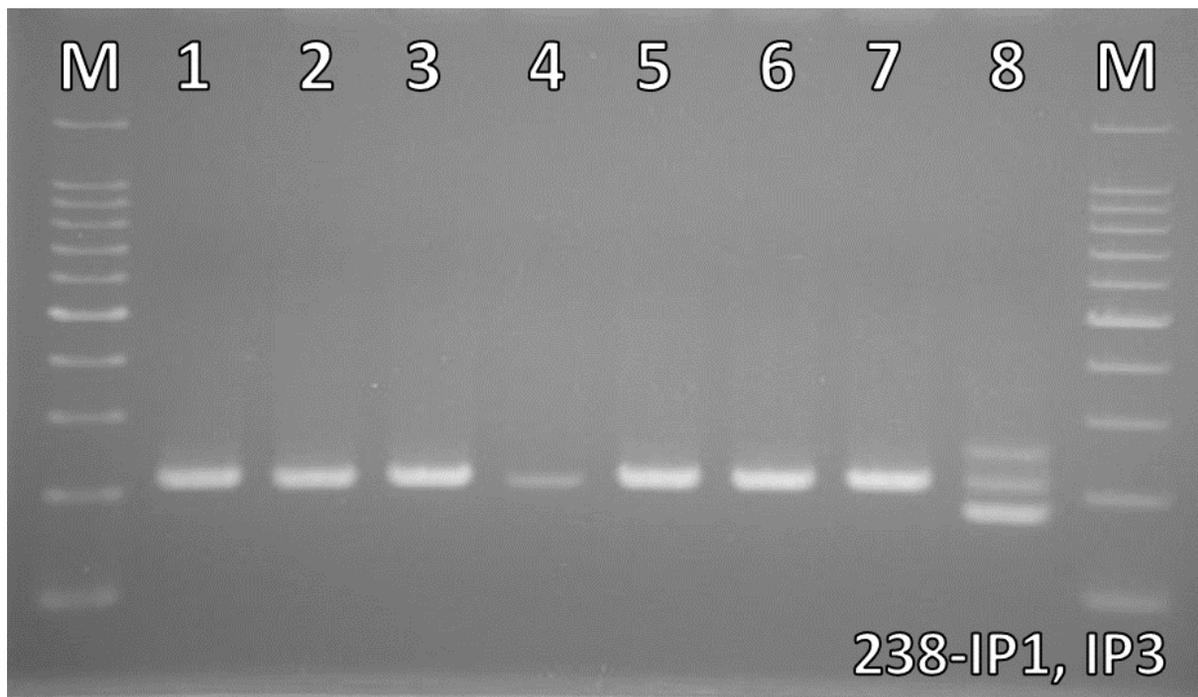
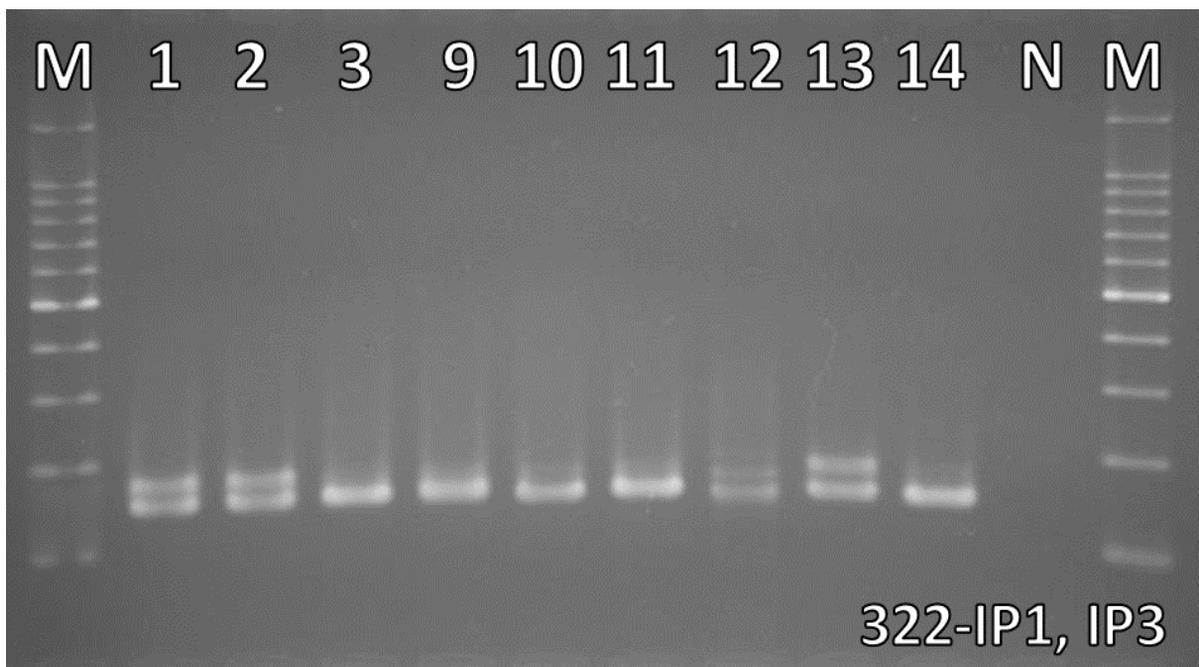
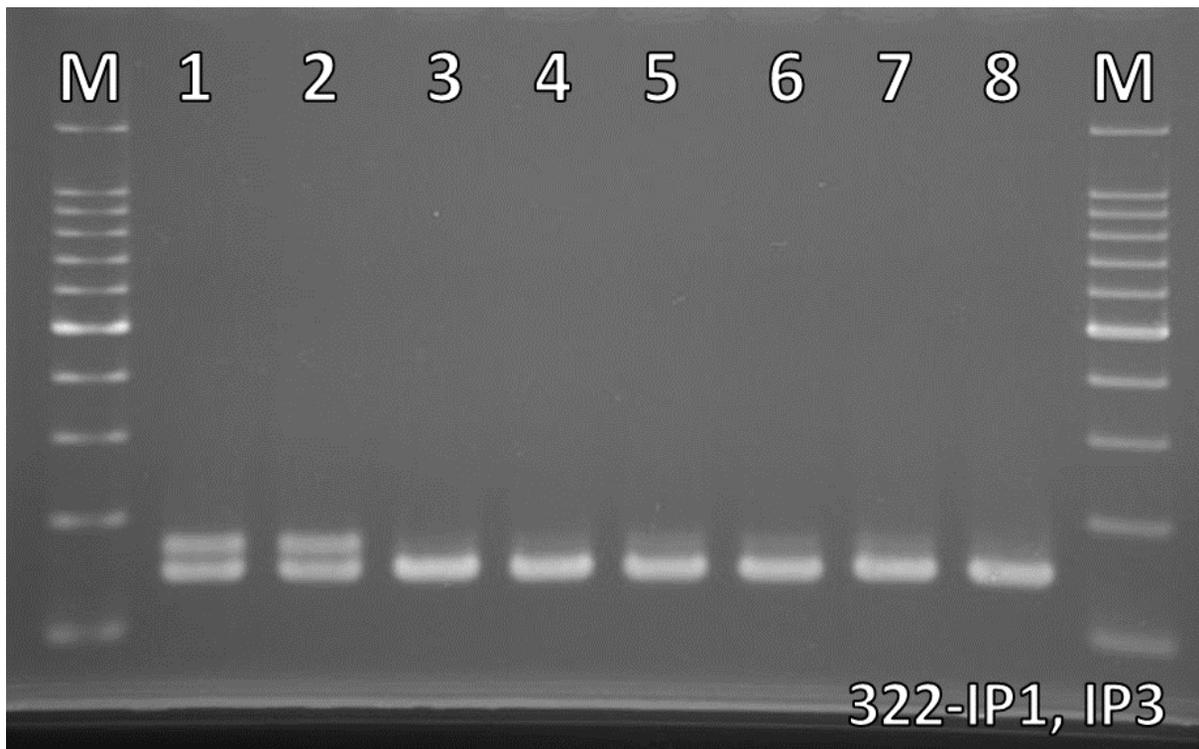


図2 続き



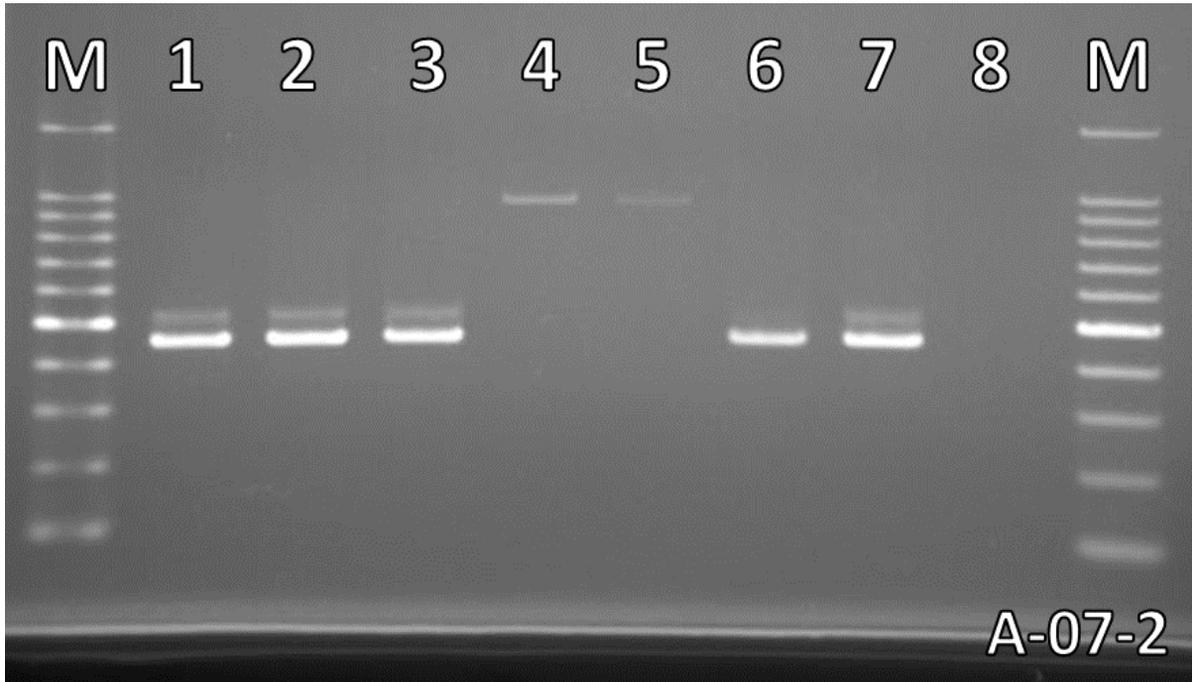


図3 STSマーカーの電気泳動写真

M: サイズマーカー(100 bp DNA Ladder)、1: トットリフジタ1号、2: トットリフジタ2号、3: TF-3、4: タケシマキリンソウ1、5: タケシマキリンソウ2、6: タケシマキリンソウ3、7: タケシマキリンソウ4、8: タケシマキリンソウ5、9: タケシマキリンソウ6、10: タケシマキリンソウ7、11: タケシマキリンソウ8、12: キリンソウ野生系統(富山)、13: キリンソウ野生系統(柏崎)、14: キリンソウ野生系統(佐渡)、N: ネガティブコントロール

それぞれの電気泳動写真の下部にPCRで用いたプライマーを示した。

A-07-2と8, 12, 13, 14の組み合わせの場合はバンドを増幅しないので、マーカーとしては評価の対象としない。

添付資料 3

麒麟ソウの品種識別マニュアルの
妥当性検査データ(品種識別検査)

(1) キリンソウ品種識別検査結果票 (B社)

サンプル番号	検査	SSR																	STS A-07-2	判定品種	正解品種名	品種名一致	一致 マーカ-数	全マーカ-数	一致率			
		251	299	263	274	293	332	353	257	260	298	366	370	376	384	235	238	322										
(1)-1	1回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1						
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A									
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				18	18	100.0%			
	2回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1						
(1)-2	1回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1							
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A									
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				18	18	100.0%			
	2回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1						
(1)-3	1回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1						
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A									
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				18	18	100.0%			
	2回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1						
(1)-4	1回目	測定結果	C	C	B	B	D	D	B	B	D	A	D	C	A	C	B	A	B	その他	その他	1						
			C	C	B	B	D	D	B	B	D	A	D	C	A	C	B	A	B									
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0				17	18	94.4%			
	2回目	測定結果	C	C	B	B	D	D	B	B	D	A	D	C	A	C	B	A	B	その他	その他	1						
(1)-5	1回目	測定結果	B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A	TF-3	TF-3	1					
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A								
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				18	18	100.0%		
	2回目	測定結果	B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A	TF-3	TF-3	1					
(1)-6	1回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1						
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A									
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				18	18	100.0%			
	2回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1						
(1)-7	1回目	測定結果	B	B	B	B	E	C	C	B	E	A	E	D	C	D	A	A	B	その他	その他	1						
			B	B	B	B	E	C	C	B	E	A	E	D	C	D	A	A	B									
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0				17	18	94.4%			
	2回目	測定結果	B	B	B	B	E	C	C	B	E	A	E	D	C	D	A	A	B	その他	その他	1						
(1)-8	1回目	測定結果	D	A	C	A	H	C	B	B	H	A	E	F	D	D	A	A	C	A	その他	その他	1					
			D	A	C	A	H	C	B	B	H	A	E	F	D	D	A	A	C	A								
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				18	18	100.0%		
	2回目	測定結果	D	A	C	A	H	C	B	B	H	A	E	F	D	D	A	A	C	A	その他	その他	1					
(1)-9	1回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1					
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A								
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				18	18	100.0%		
	2回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1					

(1)-10	1回目	測定結果	E	-	-	D	I	F	-	A	G	B	F	F	E	A	C	B	A	-	その他	その他	1				
			E	-	-	D	I	F	-	A	G	B	F	F	E	A	C	B	A	-				16	18	88.9%	
	2回目	測定結果	E	-	-	D	I	F	-	A	G	B	F	F	E	A	C	B	A	-	その他	その他	1				
(1)-11	1回目	測定結果	B	B	B	B	E	C	A	E	A	E	D	C	B	A	A	B	A	-	その他	TF-3	0				
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A				8	18	44.4%	
	2回目	測定結果	B	B	B	B	E	C	A	E	A	E	D	C	B	A	A	B	A	-	その他	TF-3	0				
(1)-12	1回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
	2回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
(1)-13	1回目	測定結果	B	A	C	A	F	E	B	A	F	A	E	E	D	D	A	A	B	A	-	その他	その他	1			
			B	A	C	A	F	E	B	A	F	A	E	E	D	D	A	A	B	A	-				18	18	100.0%
	2回目	測定結果	B	A	C	A	F	E	B	A	F	A	E	E	D	D	A	A	B	A	-	その他	その他	1			
(1)-14	1回目	測定結果	B	A	C	A	H	E	B	B	G	A	E	B	D	D	A	A	B	A	-	その他	その他	1			
			B	A	C	A	H	E	B	B	G	A	E	B	D	D	A	A	B	A	-				18	18	100.0%
	2回目	測定結果	B	A	C	A	H	E	B	B	G	A	E	B	D	D	A	A	B	A	-	その他	その他	1			
(1)-15	1回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
	2回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
(1)-16	1回目	測定結果	E	-	-	E	G	F	-	A	G	B	H	F	E	A	C	B	D	-	その他	その他	1				
			E	-	-	E	G	F	-	A	G	B	H	F	E	A	C	B	D	-				16	18	88.9%	
	2回目	測定結果	E	-	-	E	G	F	-	A	G	B	H	F	E	A	C	B	D	-	その他	その他	1				
(1)-17	1回目	測定結果	B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A	-	TF-3	TF-3	1			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A	-				11	18	61.1%
	2回目	測定結果	B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A	-	TF-3	TF-3	1			
(1)-18	1回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1			
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
	2回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1			
(1)-19	1回目	測定結果	B	A	C	A	F	E	C	B	F	A	G	F	D	D	A	C	C	A	-	その他	その他	1			
			B	A	C	A	F	E	C	B	F	A	G	F	D	D	A	C	C	A	-				18	18	100.0%
	2回目	測定結果	B	A	C	A	F	E	C	B	F	A	G	F	D	D	A	C	C	A	-	その他	その他	1			
(1)-20	1回目	測定結果	B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A	-	TF-3	TF-3	1			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A	-				11	18	61.1%
	2回目	測定結果	B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A	-	TF-3	TF-3	1			
			1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0				11	18	61.1%	

(1)-21	1回目	測定結果	E	-	B	C		F	-	A	G	B	F	E	C	A		B	B	-	その他	その他	1			
			E	-	B	C	G	F	-	A	G	B	F	E	C	A	C	B	B	-				16	18	88.9%
			1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1					
(1)-21	2回目	測定結果	E	-	B	C		F	-	A	G	B	F	E	C	A		B	B	-	その他	その他	1			
			E	-	B	C	G	F	-	A	G	B	F	E	C	A	C	B	B	-				16	18	88.9%
			1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1					
(1)-22	1回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1			
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1						
(1)-22	2回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1			
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1						
(1)-23	1回目	測定結果	-	A	-	D		F	-	A	G	B	I	B	D	B		B	B	-	その他	その他	1			
			-	A	-	D	G	F	-	A	G	B	I	B	D	B	C	B	B	-				16	18	88.9%
			1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1						
(1)-23	2回目	測定結果	-	A	-	D		F	-	A	G	B	I	B	D	B		B	B	-	その他	その他	1			
			-	A	-	D	G	F	-	A	G	B	I	B	D	B	C	B	B	-				16	18	88.9%
			1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1						
(1)-24	1回目	測定結果	B	B	B	B	E		C	A	E	A	E	D	C	B	A	A	B		その他	TF-3	0			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A				8	18	44.4%
			1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0					
(1)-24	2回目	測定結果	B	B	B	B	E		C	A	E	A	E	D	C	B	A	A	B		その他	TF-3	0			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A				8	18	44.4%
			1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0					
(1)-25	1回目	測定結果	D	A	C	A	H		B	B	H	A	E	F	D	D	A	A	C	A	その他	その他	1			
			D	A	C	A	F	E	B	B	F	A	E	F	D	D	A	A	B	A				14	18	77.8%
			1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1						
(1)-25	2回目	測定結果	D	A	C	A	H		B	B	H	A	E	F	D	D	A	A	C	A	その他	その他	1			
			D	A	C	A	F	E	B	B	F	A	E	F	D	D	A	A	B	A				14	18	77.8%
			1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1						
(1)-26	1回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1						
(1)-26	2回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1						

(1) キリンソウ品種識別検査結果票 (F社)

サンプル番号	検査	SSR																	STS A-07-2	判定品種	正解品種名	品種名一致	一致 マーカ-数	全マーカ-数	一致率		
		251	299	263	274	293	332	353	257	260	298	366	370	376	384	235	238	322									
(1)-1	1回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1					
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%		
	2回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1					
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A				17	18	94.4%		
(1)-2	1回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1						
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%		
	2回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1					
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A				17	18	94.4%		
(1)-3	1回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1					
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%		
	2回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1					
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				17	18	94.4%		
(1)-4	1回目	測定結果	A	C	A	B	D	D	B	B	D	A	D	C	A	C	B	B	その他	その他	1						
			C	C	B	B	D	D	B	B	D	A	D	C	A	C	B	A	B				14	18	77.8%		
	2回目	測定結果	A	C	A	B	D	D	B	B	D	A	D	C	A	C	B	B	その他	その他	1						
			C	C	B	B	D	D	B	B	D	A	D	C	A	C	B	A	B				14	18	77.8%		
(1)-5	1回目	測定結果	B	B	B	B	E	C	A	E	A	E	D	C	B	A	B	B	-	TF-3	0						
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B				7	18	38.9%		
	2回目	測定結果	B	B	B	B	E	C	A	E	A	E	D	C	B	A	B	B	-	TF-3	0						
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B				7	18	38.9%		
(1)-6	1回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1						
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%		
	2回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1					
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A				17	18	94.4%		
(1)-7	1回目	測定結果	B	B	A	B	E	C	C	B	E	A	E	D	C	D	A	B	その他	その他	1						
			B	B	B	B	E	C	C	B	E	A	E	D	C	D	A	A	B				16	18	88.9%		
	2回目	測定結果	B	B	A	B	E	C	C	B	E	A	E	D	C	D	A	A	B	その他	その他	1					
			B	B	B	B	E	C	C	B	E	A	E	D	C	D	A	A	B				15	18	83.3%		
(1)-8	1回目	測定結果	D	C	A	H	C	B	B	H	A	E	F	D	D	A	A	C	その他	その他	1						
			D	A	C	A	H	C	B	B	H	A	E	F	D	D	A	A	C				17	18	94.4%		
	2回目	測定結果	D	A	C	A	H	C	B	B	H	A	E	F	D	D	A	A	C	その他	その他	1					
			D	A	C	A	H	C	B	B	H	A	E	F	D	D	A	A	C				17	18	94.4%		
(1)-9	1回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1					
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				17	18	94.4%		
	2回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1					
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%		

(1)-10	1回目	測定結果	-	-	-	I	F	-	A	G	B	F	F	E	A	C	C	-	その他	その他	1					
			E	-	-	D	I	F	-	A	G	B	F	F	E	A	C	B	A	-			14	18	77.8%	
(1)-10	2回目	測定結果	-	-	-	I	F	-	A	G	B	F	F	E	A	C	B	A	-	その他	その他	1				
			E	-	-	D	I	F	-	A	G	B	F	F	E	A	C	B	A	-			14	18	77.8%	
(1)-11	1回目	測定結果	B	B	B	B	E	C	A	A	A	E	D	C	B	A	A	B	B	-	TF-3	0				
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A			6	18	33.3%	
(1)-11	2回目	測定結果	B	B	B	B	E	C	A	A	A	E	D	C	B	A	A	B	B	-	TF-3	0				
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A			7	18	38.9%	
(1)-12	1回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			17	18	94.4%	
(1)-12	2回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			18	18	100.0%	
(1)-13	1回目	測定結果	B	A	C	A	F	E	B	A	F	A	E	E	D	D	A	A	B	-	その他	その他	1			
			B	A	C	A	F	E	B	A	F	A	E	E	D	D	A	A	B	A			16	18	88.9%	
(1)-13	2回目	測定結果	B	A	C	A	F	E	B	A	F	A	E	E	D	D	A	A	B	A	その他	その他	1			
			B	A	C	A	F	E	B	A	F	A	E	E	D	D	A	A	B	A			17	18	94.4%	
(1)-14	1回目	測定結果	A	A	C	A	H	E	B	B	G	A	E	B	D	D	A	A	B	A	その他	その他	1			
			B	A	C	A	H	E	B	B	G	A	E	B	D	D	A	A	B	A			17	18	94.4%	
(1)-14	2回目	測定結果	A	A	C	A	H	E	B	B	G	A	E	B	D	D	A	A	B	A	その他	その他	1			
			B	A	C	A	H	E	B	B	G	A	E	B	D	D	A	A	B	A			17	18	94.4%	
(1)-15	1回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			18	18	100.0%	
(1)-15	2回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			18	18	100.0%	
(1)-16	1回目	測定結果	-	-	-	E	G	F	-	A	G	B	H	F	E	A	B	D	-	その他	その他	1				
			E	-	-	E	G	F	-	A	G	B	H	F	E	A	C	B	D	-			16	18	88.9%	
(1)-16	2回目	測定結果	-	-	-	G	F	-	A	G	B	H	F	E	A	B	D	-	その他	その他	1					
			E	-	-	E	G	F	-	A	G	B	H	F	E	A	C	B	D	-			15	18	83.3%	
(1)-17	1回目	測定結果	B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A	TF-3	TF-3	1			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A			18	18	100.0%	
(1)-17	2回目	測定結果	B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A	TF-3	TF-3	1			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A			18	18	100.0%	
(1)-18	1回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1			
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A			18	18	100.0%	
(1)-18	2回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1			
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A			18	18	100.0%	
(1)-19	1回目	測定結果	D	A	C	A	F	E	B	F	A	E	F	D	D	A	A	B	A	その他	その他	1				
			B	A	C	A	F	E	C	B	F	A	G	F	D	D	A	C	C	A			13	18	72.2%	
(1)-19	2回目	測定結果	D	A	C	A	F	E	B	F	A	E	F	D	D	A	A	B	A	その他	その他	1				
			B	A	C	A	F	E	C	B	F	A	G	F	D	D	A	C	C	A			13	18	72.2%	
(1)-20	1回目	測定結果	B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	-	TF-3	TF-3	1			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A			17	18	94.4%	
(1)-20	2回目	測定結果	B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A	TF-3	TF-3	1			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A			18	18	100.0%	

(1)-21	1回目	測定結果	—	—	A	C	G	F	B	A	G	B	F	E	C	A	—	B	B	—	その他	その他	1			
			E	—	B	C	G	F	—	A	G	B	F	E	C	A	C	B	B	—				14	18	77.8%
	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1						
(1)-22	1回目	測定結果	—	—	A	C	G	F	B	A	G	B	F	E	C	A	—	B	B	—	その他	その他	1			
			E	—	B	C	G	F	—	A	G	B	F	E	C	A	C	B	B	—				14	18	77.8%
	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1							
(1)-22	1回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	—	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1			
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A				17	18	94.4%
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0							
(1)-23	1回目	測定結果	—	C	—	D	G	F	—	A	—	B	I	B	D	B	—	B	B	—	その他	その他	1			
			—	A	—	D	G	F	—	A	G	B	I	B	D	B	C	B	B	—				15	18	83.3%
	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1							
(1)-23	2回目	測定結果	—	C	—	D	G	F	—	A	—	B	I	B	D	B	—	B	B	—	その他	その他	1			
			—	A	—	D	G	F	—	A	G	B	I	B	D	B	C	B	B	—				15	18	83.3%
	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1							
(1)-24	1回目	測定結果	B	B	B	B	E	C	A	—	A	E	D	C	B	A	—	B	B	—	—	TF-3	0			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A				7	18	38.9%
	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0							
(1)-24	2回目	測定結果	B	B	B	B	E	C	A	—	A	E	D	C	B	A	—	B	B	—	—	TF-3	0			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A				7	18	38.9%
	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0							
(1)-25	1回目	測定結果	D	A	C	A	F	E	B	B	F	A	E	F	D	D	A	A	B	A	その他	その他	1			
			D	A	C	A	F	E	B	B	F	A	E	F	D	D	A	A	B	A				18	18	100.0%
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1							
(1)-25	2回目	測定結果	D	A	C	A	F	E	B	B	F	A	E	F	D	D	A	A	B	A	その他	その他	1			
			D	A	C	A	F	E	B	B	F	A	E	F	D	D	A	A	B	A				18	18	100.0%
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1							
(1)-26	1回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1							
(1)-26	2回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1							

(1) キリンソウ品種識別検査結果票 (L社)

サンプル番号	検査	SSR																	STS A-07-2	判定品種	正解品種名	品種名一致	一致 マーカ-数	全マーカ-数	一致率			
		251	299	263	274	293	332	353	257	260	298	366	370	376	384	235	238	322										
(1)-1	1回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1						
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A									
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				18	18	100.0%			
	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1							
(1)-2	1回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1							
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A										
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				18	18	100.0%				
	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1							
(1)-3	1回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1							
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A									
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				18	18	100.0%				
	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1							
(1)-4	1回目	測定結果	A	C	A	B	D	D	B	B	D	A	D	C	A	C	B	A	その他	その他	1							
			C	C	B	B	D	D	B	B	D	A	D	C	A	C	B	A	B									
		0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				16	18	88.9%				
	測定結果	A	C	A	B	D	D	B	B	D	A	D	C	A	C	B	A	B	その他	その他	1							
(1)-5	1回目	測定結果	D	B	C	B			B	A	C	A	A	B		C	A	A	-	TF-3	0							
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B									
		0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1				10	18	55.6%				
	測定結果	D	B	C	B			B	A	C	A	A	B		C	A	A	B	-	TF-3	0							
(1)-6	1回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1							
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A										
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				18	18	100.0%				
	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1							
(1)-7	1回目	測定結果	B	B	A	B	E	C	C	B	E	A	E	D	C	A	A	B	その他	その他	1							
			B	B	B	B	E	C	C	B	E	A	E	D	C	D	A	A	B									
		1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1				16	18	88.9%				
	測定結果	B	B	A	B	E	C	C	B	E	A	E	D	C	A	A	A	B	その他	その他	1							
(1)-8	1回目	測定結果	D	C	C	A	F	C	B	B	H	A	B	F	D	A	A	B	その他	その他	1							
			D	A	C	A	H	C	B	B	H	A	E	F	D	D	A	A	C									
		1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0				13	18	72.2%				
	測定結果	D	C	C	A	F	C	B	B	H	A	B	F	D	A	A	A	B	その他	その他	1							
(1)-9	1回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1							
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A									
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				18	18	100.0%				
	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1							

(1)-10	1回目	測定結果	E	-	-	D	I	F	-	A	G	B	F	F	E	A	C	B	A	-	その他	その他	1			
			E	-	-	D	I	F	-	A	G	B	F	F	E	A	C	B	A	-				18	18	100.0%
(1)-10	2回目	測定結果	E	-	-	D	I	F	-	A	G	B	F	F	E	A	C	B	A	-	その他	その他	1			
			E	-	-	D	I	F	-	A	G	B	F	F	E	A	C	B	A	-				18	18	100.0%
(1)-11	1回目	測定結果	B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	B	B	B	B	A	A	B	A	TF-3	TF-3	1			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A				17	18	94.4%
(1)-11	2回目	測定結果	B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	B	B	B	B	A	A	B	A	TF-3	TF-3	1			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A				17	18	94.4%
(1)-12	1回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
(1)-12	2回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
(1)-13	1回目	測定結果	D	A	C	A	F	E	B	A	F	A	E	E	D	A	A	A	B	A	その他	その他	1			
			B	A	C	A	F	E	B	A	F	A	E	E	D	D	A	A	B	A				16	18	88.9%
(1)-13	2回目	測定結果	D	A	C	A	F	E	B	A	F	A	E	E	D	A	A	A	B	A	その他	その他	1			
			B	A	C	A	F	E	B	A	F	A	E	E	D	D	A	A	B	A				16	18	88.9%
(1)-14	1回目	測定結果	D	A	C	A	F	E	B	B	G	A	E	C	D	A	A	A	B	A	その他	その他	1			
			B	A	C	A	H	E	B	B	G	A	E	B	D	D	A	A	B	A				14	18	77.8%
(1)-14	2回目	測定結果	D	A	C	A	F	E	B	B	G	A	E	C	D	A	A	A	B	A	その他	その他	1			
			B	A	C	A	H	E	B	B	G	A	E	B	D	D	A	A	B	A				14	18	77.8%
(1)-15	1回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
(1)-15	2回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
(1)-16	1回目	測定結果	E	-	-	E	G	F	-	A	G	B	H	F	E	A	C	B	D	-	その他	その他	1			
			E	-	-	E	G	F	-	A	G	B	H	F	E	A	C	B	D	-				18	18	100.0%
(1)-16	2回目	測定結果	E	-	-	E	G	F	-	A	G	B	H	F	E	A	C	B	D	-	その他	その他	1			
			E	-	-	E	G	F	-	A	G	B	H	F	E	A	C	B	D	-				18	18	100.0%
(1)-17	1回目	測定結果	D	B	C	B			B	B	C	A	A	B		C	A	A	B	A	-	TF-3	0			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A				11	18	61.1%
(1)-17	2回目	測定結果	D	B	C	B			B	A	C	A	A	B		C	A	A	B	A	-	TF-3	0			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A				10	18	55.6%
(1)-18	1回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1			
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
(1)-18	2回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1			
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
(1)-19	1回目	測定結果	B	C	C	A	F	E	C	B	F	A	G	F	D	A	A	C	B	A	その他	その他	1			
			B	A	C	A	F	E	C	B	F	A	G	F	D	D	A	C	C	A				15	18	83.3%
(1)-19	2回目	測定結果	B	C	C	A	F	E	C	B	F	A	G	F	D	A	A	C	B	A	その他	その他	1			
			B	A	C	A	F	E	C	B	F	A	G	F	D	D	A	C	C	A				15	18	83.3%
(1)-20	1回目	測定結果	D	B	C	B			B	A	C	A	A	B		C	A	A	B	A	-	TF-3	0			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A				10	18	55.6%
(1)-20	2回目	測定結果	D	B	C	B			B	A	C	A	A	B		C	A	A	B	A	-	TF-3	0			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A				10	18	55.6%

(1)-21	1回目	測定結果	E	-	A	C	G	F	-	A	G	B	F	E	C	A	C	B	B	-	その他	その他	1			
			E	-	B	C	G	F	-	A	G	B	F	E	C	A	C	B	B	-				17	18	94.4%
			1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
(1)-21	2回目	測定結果	E	-	A	C	G	F	-	A	G	B	F	E	C	A	C	B	B	-	その他	その他	1			
			E	-	B	C	G	F	-	A	G	B	F	E	C	A	C	B	B	-				17	18	94.4%
			1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
(1)-22	1回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1			
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
(1)-22	2回目	測定結果	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ2号	トットリフジタ2号	1			
			B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
(1)-23	1回目	測定結果	E	A	-	D	G	F	-	A	G	B	I	B	D	B	C	B	B	-	その他	その他	1			
			-	A	-	D	G	F	-	A	G	B	I	B	D	B	C	B	B	-				17	18	94.4%
			0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
(1)-23	2回目	測定結果	E	A	-	D	G	F	-	A	G	B	I	B	D	B	C	B	B	-	その他	その他	1			
			-	A	-	D	G	F	-	A	G	B	I	B	D	B	C	B	B	-				17	18	94.4%
			0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
(1)-24	1回目	測定結果	D	B	C	B			B	A	C	A	A	B		C	A	A	B	A	-	TF-3	0			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A				10	18	55.6%
			0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1					
(1)-24	2回目	測定結果	D	B	C	B			B	A	C	A	A	B		C	A	A	B	A	-	TF-3	0			
			B	B	A	B	C	C	B	B	C	A	C	B	B	B	A	A	B	A				10	18	55.6%
			0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1					
(1)-25	1回目	測定結果	D	C	C	A	F	E	B	B	F	A	E	F	D	A	A	A	B	A	その他	その他	1			
			D	A	C	A	F	E	B	B	F	A	E	F	D	D	A	A	B	A				16	18	88.9%
			1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1					
(1)-25	2回目	測定結果	D	C	C	A	F	E	B	B	F	A	E	F	D	A	A	A	B	A	その他	その他	1			
			D	A	C	A	F	E	B	B	F	A	E	F	D	D	A	A	B	A				16	18	88.9%
			1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1					
(1)-26	1回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
(1)-26	2回目	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	トットリフジタ1号	トットリフジタ1号	1			
			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				18	18	100.0%
			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					

添付資料 4
品種判定結果一覽

添付資料 5

レタスの品種識別マニュアルの
妥当性検査データ
(品種内多型調査)

(2)-23	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-24	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-25	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-26	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-27	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-28	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-29	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-30	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%

(2)-23	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-24	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-25	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-26	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-27	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-28	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-29	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-30	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%

(2)-23	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-24	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-25	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-26	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-27	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-28	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-29	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%
(2)-30	測定結果	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
	正解値	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
	フラグ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	18	100.0%

添付資料 6
品種内多型調査の結果の
集計の詳細

添付資料6 品種内多型検査の集計結果の詳細

サンプル 番号	合計 マーカ―数	マーカ―タイプ一致数				マーカ―タイプ一致率			
		B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均
1	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
2	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
3	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
4	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
5	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
6	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
7	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
8	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
9	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
10	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
11	18	18	17	18	17.7	100%	94%	100%	98.1%
12	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
13	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
14	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
15	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
16	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
17	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
18	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
19	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
20	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
21	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
22	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
23	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
24	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
25	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
26	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
27	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
28	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
29	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%
30	18	18	18	18	18.0	100%	100%	100%	100.0%

