

受託事業実施報告書

エリンギDNA品種識別技術の妥当性の検証

平成28年3月24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分析によるエリンギの品種識別手法の 妥当性確認方法の決定	5
「DNA分析によるエリンギ品種の識別手法」の妥当性確認試験 . . .	9

添付資料

1. DNA 鑑定提供までのジョブフローと規則
2. SSR マーカーによるエリンギの DNA 品種識別マニュアル
3. エリンギ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. 品種毎のマーカーサイズ一致率の詳細
6. エリンギ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）
7. 許容範囲毎の品種内多型検査結果

「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、ホクト株式会社が作成した「SSRマーカーによるエリンギの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一部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

エリンギ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の一部につき、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

エリンギ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分析によるエリンギの品種識別手法の妥当性確認方法の決定
- 3) 「DNA分析によるエリンギ品種の識別手法」の妥当性確認試験

DNA分析によるエリンギの 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鑑定提供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) エリンギのDNA品種識別手法における妥当性確認方法の決定

(2) エリンギの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。依頼元であるホクト株式会社より提出された自己検証報告によれば、今回の妥当性検証に供された12品種について、多型のないことを確認したとのことであった。

(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

エリンギ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鑑定提供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、品種識別試験については、対象品種全てにおいて、3名の試験者による同一菌株各1回ずつの試験、および、多型の有無を確認するための試験3回(同一菌株について2回)を行ったとの報告を受けた。

(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、基準株サンプル、生産者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。基準株サンプルはマニュアル作成元がDNA抽出を行い、これを基準DNAとして生産者株サンプルについて識別検査を実施した。また、同じ基準DNA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 : ホクト株式会社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1 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

収集した生産者サンプルに、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 分析によるエリンギ品種の識別手法」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 マーカーによるエリンギの DNA 品種識別マニュアル
作成元 : ホクト株式会社

2) サンプル収集

ホクト株式会社研究農場より、エリンギの基準(株)品種 1 品種の DNA ならびに生産者株サンプル 12 品種各 5 株、および品種内多型調査用サンプル 1 品種 30 株の菌糸が、DNA 鑑定学会に送付された。(表 2 参照)

表 2 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
エリンギ	基準株	ホクトPLE-2号	DNA	500ng×3	ホクト株式会社
	生産者株 (12品種)	ホクトPLE-2号	凍結菌糸	5株×3	
		MH006380		5株×3	
		MH006381		5株×3	
		MH006164		5株×3	
		MH006198		5株×3	
		MH006200		5株×3	
		MH006201		5株×3	
		MH006202		5株×3	
		MH006203		5株×3	
		MH006322		5株×3	
		MH006324		5株×3	
		MH006325		5株×3	
	多型	ホクトPLE-2号	凍結菌糸	30株x3	
マーカー 配列情報	マーカー12種	配列情報	配列情報		

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 エリンギの基準株 DNA 溶液 1 種

(基準株ホクト PLE-2 号の DNA 1 チューブ、500ng / チューブ)

② 品種識別用のエリンギの菌糸 60 株

(生産者株サンプル 12 品種の菌糸 各 5 株)

- ③ 品種内多型調査用のエリンギの菌糸 30 株
(基準株のホクト PLE-2 号の菌糸)

(2) 配布方法

① 基準マーカーDNA

ホクト株式会社から DNA 鑑定学会に送付された 1 品種 (ホクト PLE-2 号) の DNA 溶液を、3 箇所の検証機関の全てに、各 1 チューブ (500ng / チューブ) ずつ送付した。

② 品種識別用の生産者株のサンプル

ホクト株式会社から、12 品種の生産者株の菌糸のサンプルが、DNA 鑑定学会に送付された。サンプルは 1 サンプルずつ 2ml のマイクロチューブに密封され、品種毎にまとめて袋に入れられており、計 12 袋のサンプルが DNA 鑑定学会に届けられた。

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、これらの菌糸サンプル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下記の「表 3 品種識別用サンプル番号対応表」の通りである。この結果、ホクト株式会社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 箇所の検証機関へ送付した。

表 3 品種識別用サンプル番号対応表

品種	サンプル数	番号	品種	サンプル数	番号	品種	サンプル数	番号
ホクトPLE-2号	5	57	MH006198	5	45	MH006203	5	33
		55			26			49
		13			36			30
		51			14			8
		39			59			44
MH006380	5	54	MH006200	5	38	MH006322	5	43
		58			19			9
		22			56			40
		32			12			41
		7			53			18
MH006381	5	52	MH006201	5	37	MH006324	5	28
		17			5			2
		6			15			16
		46			42			21
		24			4			29
MH006164	5	50	MH006202	5	35	MH006325	5	11
		47			23			31
		27			60			20
		3			25			1
		48			34			10

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、ホクト株式会社から、1 品種（ホクト PLE-2 号）の多型調査用株の菌糸のサンプル 90 個が、1 サンプルずつ 2ml のマイクロチューブに密封された状態で、DNA 鑑定学会に送付された。DNA 鑑定学会において、1 サンプル毎に 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送付した。

2) 「SSR マーカーによるエリンギの DNA 品種識別マニュアル」 (添付資料 2)

提供元 : ホクト株式会社

作成機関 : ホクト株式会社きのこ総合研究所

メール添付にて各検証機関に送付した。

3) エリンギの検査項目

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 4 に示した。

表 4 検査項目 (1 検証機関当たり)

種類別	品種名	形態	量	実験	実験数
				繰り返し数	
基準品種	ホクト PLE-2 号	DNA	500ng	依頼元で提供	
マーカーの塩基配列	マーカー数:6種	配列情報	配列情報		
生産者株	12品種	凍結菌糸	5株/品種	2回	120
品種内多型調査株	ホクト PLE-2 号	凍結菌糸	30株	1回	30

4) エリンギ検査結果票

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の参考データ 2. に記載されている各マーカーのタイプと、基準品種であるホクト PLE-2 号のマーカー毎のフラグメント長をもとに、DNA 鑑定学会において、数値で表したサイズ表を作成し直した（表 5 品種識別マーカーのサイズ表）。これをもとに、「表 4 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、キャピラリー電気泳動において、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、それらと品種毎のマーカータイプの比較を行って品種を識別するものである。

表 5 品種識別マーカーのサイズ表

品種名	SSRマーカー																																															
	MsPe-01	MsPe-02	MsPe-03	MsPe-04	MsPe-05	MsPe-06	MsPe-07	MsPe-08	MsPe-09	MsPe-10	MsPe-11	MsPe-12	MsPe-01	MsPe-02	MsPe-03	MsPe-04	MsPe-05	MsPe-06	MsPe-07	MsPe-08	MsPe-09	MsPe-10	MsPe-11	MsPe-12																								
ホクトPLE-2号	127	151	150	0	143	0	85	0	100	104	130	148	138	153	89	93	164	170	171	177	168	174	214	0	127	151	150	0	143	0	85	0	100	104	130	148	138	153	89	93	164	170	171	177	168	174	214	0
MH006376	121	127	146	0	137	0	85	89	100	104	130	148	138	153	89	93	164	0	177	0	168	0	208	0	121	127	146	0	137	0	85	89	100	104	130	148	138	153	89	93	164	0	177	0	168	0	208	0
MH006405	127	151	146	150	143	0	89	0	104	0	130	148	138	153	89	0	164	0	171	177	168	0	214	0	127	151	146	150	143	0	89	0	104	0	130	148	138	153	89	0	164	0	171	177	168	0	214	0
MH006157	127	151	150	0	143	0	85	0	104	0	130	148	138	153	93	0	164	0	171	177	168	174	214	0	127	151	150	0	143	0	85	0	104	0	130	148	138	153	93	0	164	0	171	177	168	174	214	0
MH006161	127	151	150	0	137	0	73	0	100	104	130	0	138	153	89	93	164	0	171	177	168	174	208	0	127	151	150	0	137	0	73	0	100	104	130	0	138	153	89	93	164	0	171	177	168	174	208	0
MH006165	127	0	150	0	143	0	73	0	104	0	130	0	153	0	89	93	164	170	177	0	168	174	214	0	127	0	150	0	143	0	73	0	104	0	130	0	153	0	89	93	164	170	177	0	168	174	214	0
MH006369	127	151	146	150	137	0	89	0	100	0	118	130	143	153	89	0	164	185	171	174	168	0	208	0	127	151	146	150	137	0	89	0	100	0	118	130	143	153	89	0	164	185	171	174	168	0	208	0
MH006377	127	0	150	154	143	0	89	0	104	0	148	0	138	153	89	0	164	0	177	0	168	0	214	0	127	0	150	154	143	0	89	0	104	0	148	0	138	153	89	0	164	0	177	0	168	0	214	0
MH006380	127	151	146	150	137	0	85	89	104	0	130	148	138	153	93	0	164	0	171	177	168	174	208	0	127	151	146	150	137	0	85	89	104	0	130	148	138	153	93	0	164	0	171	177	168	174	208	0
MH006381	127	151	146	150	143	0	85	89	104	0	148	0	138	0	89	0	164	0	171	177	168	0	214	0	127	151	146	150	143	0	85	89	104	0	148	0	138	0	89	0	164	0	171	177	168	0	214	0
MH006164	127	151	150	0	143	0	85	0	100	0	130	148	138	0	93	0	164	0	171	177	174	0	214	0	127	151	150	0	143	0	85	0	100	0	130	148	138	0	93	0	164	0	171	177	174	0	214	0
MH006198	115	0	146	150	137	0	85	0	100	104	130	0	138	0	89	93	164	176	168	0	168	174	208	0	115	0	146	150	137	0	85	0	100	104	130	0	138	0	89	93	164	176	168	0	168	174	208	0
MH006199	127	151	146	0	143	0	85	0	104	0	130	148	138	153	93	0	164	170	171	177	174	0	214	0	127	151	146	0	143	0	85	0	104	0	130	148	138	153	93	0	164	170	171	177	174	0	214	0
MH006200	127	0	150	0	143	0	85	0	100	104	130	148	138	153	89	0	164	170	171	177	168	0	214	0	127	0	150	0	143	0	85	0	100	104	130	148	138	153	89	0	164	170	171	177	168	0	214	0
MH006201	127	0	154	0	131	0	85	0	100	112	94	130	138	0	89	0	164	0	168	177	156	168	202	0	127	0	154	0	131	0	85	0	100	112	94	130	138	0	89	0	164	0	168	177	156	168	202	0
MH006202	127	151	150	0	137	0	73	0	100	104	130	142	138	0	93	0	164	176	171	177	168	174	208	0	127	151	150	0	137	0	73	0	100	104	130	142	138	0	93	0	164	176	171	177	168	174	208	0
MH006203	121	127	150	0	131	149	89	0	100	0	118	130	138	0	93	0	164	167	165	177	174	180	196	0	121	127	150	0	131	149	89	0	100	0	118	130	138	0	93	0	164	167	165	177	174	180	196	0
MH006322	127	139	150	0	131	0	85	0	100	104	130	0	138	153	89	93	164	170	168	177	168	0	214	0	127	139	150	0	131	0	85	0	100	104	130	0	138	153	89	93	164	170	168	177	168	0	214	0
MH006324	151	0	146	0	143	0	85	0	100	104	130	148	128	153	93	0	170	176	171	0	174	180	208	214	151	0	146	0	143	0	85	0	100	104	130	148	128	153	93	0	170	176	171	0	174	180	208	214
MH006325	127	151	146	150	137	0	85	0	104	136	130	148	153	0	89	0	164	0	168	171	174	0	208	214	127	151	146	150	137	0	85	0	104	136	130	148	153	0	89	0	164	0	168	171	174	0	208	214

2) エリンギの検査結果

検証機関によるエリンギの検査結果を 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 「エリンギ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。

検査全数に対する正答率を品種ごとに集計した結果を、下記の表 6 に示した。

表 6 品種別の品種名正答率

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	全体 検査数	正答数	誤答数	未答数	全体	正答率	誤答率	未答率	全体
ホク外PLE-2号	5	2	10	3	30	30	0	0	30	100%	0%	0%	100.0%
MH006380	5		10		30	29	0	1	30	97%	0%	3%	100.0%
MH006381	5		10		30	29	0	1	30	97%	0%	3%	100.0%
MH006164	5		10		30	28	2	0	30	93%	7%	0%	100.0%
MH006198	5		10		30	30	0	0	30	100%	0%	0%	100.0%
MH006200	5		10		30	28	2	0	30	93%	7%	0%	100.0%
MH006201	5		10		30	30	0	0	30	100%	0%	0%	100.0%
MH006202	5		10		30	30	0	0	30	100%	0%	0%	100.0%
MH006203	5		10		30	30	0	0	30	100%	0%	0%	100.0%
MH006322	5		10		30	26	3	1	30	87%	10%	3%	100.0%
MH006324	5		10		30	29	0	1	30	97%	0%	3%	100.0%
MH006325	5		10		30	27	2	1	30	90%	7%	3%	100.0%
全体	60		120		360	346	9	5	360	96.1%	2.5%	1.4%	100.0%

品種名の回答は、全体として、回答率 98.6%、未答率 1.4%であり、回答の正答
率 96.1%、誤答率 2.5%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、品種毎の正答率は 87%~100%というかなり高い数値であった。

次に、検証機関毎の品種別正答率を下記の表 7 でみると、正答率は機関によ
り若干異なり、全ての品種の正答率は、検証機関毎に 60%~100%の間でばらつい
たが、平均値としては 90~100%と高い値を示した。このことから、本マニュアル
に従って品種識別検査を行えばかなり高い精度で品種識別が可能であるが、検証
機関または担当者の習熟度や検査環境により、検査精度が影響を受ける場合のあ
ることが伺える。

表7 検証機関毎の品種別正答率

品種	正答率			
	B社	F社	L社	平均
ホクトPLE-2号	100%	100%	100%	100.0%
MH006380	100%	100%	90%	96.7%
MH006381	100%	100%	90%	96.7%
MH006164	100%	100%	80%	93.3%
MH006198	100%	100%	100%	100.0%
MH006200	100%	80%	100%	93.3%
MH006201	100%	100%	100%	100.0%
MH006202	100%	100%	100%	100.0%
MH006203	100%	100%	100%	100.0%
MH006322	100%	100%	60%	86.7%
MH006324	100%	100%	90%	96.7%
MH006325	100%	100%	70%	90.0%
平均	100.0%	98.3%	90.0%	96.1%

これらの結果より、本マニュアルに基づくこれら 12 品種のエリンギの品種識別は、かなり高い精度で行えるが、検証機関または担当者の習熟度や検査環境による検査精度の低下を防ぐための改良ができれば、望ましいと考えられる。

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、マーカー毎に 1~2 本のフラグメントを検出する計 12 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 8 で算出したところ、検証機関毎に 2,880 本ずつ、全体で 8,640 本のフラグメントの有無とサイズの検査が必要であった。

表8 機関毎のマーカーフラグメントの総検査数

検証機関	マーカー数	マーカー毎 検査フラグメント数	検体数	検体毎 検査回数	総検査 マーカー数
B社	12	2	60	2	2880
F社	12	2	60	2	2880
L社	12	2	60	2	2880
全体	36	6	180	6	8640

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サイズが一致したかを、品種毎に集計した。また、マーカーサイズは機器ごとのばらつき等により多少の誤差が生じることに鑑み、サイズの誤差が±0、

± 1 以内、± 2 以内、± 3 以内をそれぞれ正解の許容範囲とする 4 段階に分け、別々に集計を行った。この結果を示したのが、下記の「表 9 許容範囲別の品種毎のマーカサイズ一致率」である。

表 9 品種毎のマーカサイズ一致率

A. 許容範囲± 0

品種名	マーカ総数	マーカサイズ一致数				マーカサイズ一致率			
		B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均
ホクトPLE-2号	240	170	145	46	120	71%	60%	19%	50%
MH006380		182	166	53	134	76%	69%	22%	56%
MH006381		201	174	81	152	84%	73%	34%	63%
MH006164		197	169	90	152	82%	70%	38%	63%
MH006198		189	173	66	143	79%	72%	28%	59%
MH006200		192	152	74	139	80%	63%	31%	58%
MH006201		184	176	72	144	77%	73%	30%	60%
MH006202		164	153	53	123	68%	64%	22%	51%
MH006203		154	123	58	112	64%	51%	24%	47%
MH006322		189	130	60	126	79%	54%	25%	53%
MH006324		163	134	51	116	68%	56%	21%	48%
MH006325		180	155	48	128	75%	65%	20%	53%
平均マーカ一致数			180.4	154.2	62.7	132.4	75.2%	64.2%	26.1%

B. 許容範囲± 1

品種名	マーカ総数	マーカサイズ一致数				マーカサイズ一致率			
		B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均
ホクトPLE-2号	240	240	240	224	235	100%	100%	93%	98%
MH006380		240	238	230	236	100%	99%	96%	98%
MH006381		240	240	224	235	100%	100%	93%	98%
MH006164		240	240	220	233	100%	100%	92%	97%
MH006198		240	240	235	238	100%	100%	98%	99%
MH006200		240	240	205	228	100%	100%	85%	95%
MH006201		240	240	225	235	100%	100%	94%	98%
MH006202		240	240	234	238	100%	100%	98%	99%
MH006203		240	218	210	223	100%	91%	88%	93%
MH006322		240	230	195	222	100%	96%	81%	92%
MH006324		240	216	210	222	100%	90%	88%	93%
MH006325		240	229	215	228	100%	95%	90%	95%
平均マーカ一致数			240.0	234.3	218.9	231.1	100.0%	97.6%	91.2%

C. 許容範囲±2

品種名	マーカ―総数	マーカ―サイズ一致数				マーカ―サイズ一致率			
		B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均
ホクトPLE-2号	240	240	240	224	235	100%	100%	93%	98%
MH006380		240	238	230	236	100%	99%	96%	98%
MH006381		240	240	224	235	100%	100%	93%	98%
MH006164		240	240	220	233	100%	100%	92%	97%
MH006198		240	240	235	238	100%	100%	98%	99%
MH006200		240	240	205	228	100%	100%	85%	95%
MH006201		240	240	225	235	100%	100%	94%	98%
MH006202		240	240	234	238	100%	100%	98%	99%
MH006203		240	220	210	223	100%	92%	88%	93%
MH006322		240	230	195	222	100%	96%	81%	92%
MH006324		240	216	210	222	100%	90%	88%	93%
MH006325		240	230	223	231	100%	96%	93%	96%
平均マーカ―一致数		240.0	234.5	219.6	231.4	100.0%	97.7%	91.5%	96.4%

D. 許容範囲±3

品種名	マーカ―総数	マーカ―サイズ一致数				マーカ―サイズ一致率			
		B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均
ホクトPLE-2号	240	240	240	224	235	100%	100%	93%	98%
MH006380		240	238	230	236	100%	99%	96%	98%
MH006381		240	240	224	235	100%	100%	93%	98%
MH006164		240	240	220	233	100%	100%	92%	97%
MH006198		240	240	235	238	100%	100%	98%	99%
MH006200		240	240	205	228	100%	100%	85%	95%
MH006201		240	240	225	235	100%	100%	94%	98%
MH006202		240	240	234	238	100%	100%	98%	99%
MH006203		240	220	210	223	100%	92%	88%	93%
MH006322		240	230	195	222	100%	96%	81%	92%
MH006324		240	218	210	223	100%	91%	88%	93%
MH006325		240	230	223	231	100%	96%	93%	96%
平均マーカ―一致数		240.0	234.7	219.6	231.4	100.0%	97.8%	91.5%	96.4%

全体を平均してのマーカ―サイズ一致率は、正解の許容範囲を±0にとると55.2%、±1にとると96.3%、±2にとると96.4%、±3にとると96.4%となり、少しでも許容範囲を設けると、高い値となった。品種毎の正解率の違いは多少見られたものの、むしろ一致率の数値は、検証機関相互のばらつきに影響されるところが大きいに

思われた。

品種毎のマーカサイズ一致率は、正解の許容範囲正解の許容範囲を±0にとると47~63%、±1、±2または±3にとった場合には92~99%という高い値であり、上記のように、許容範囲を設けると、品種間のばらつきも小さかった。

また、検証機関毎のマーカサイズ一致率は、正解の許容範囲を±0にとると26.1~75.2%、±1にとると91.2~100.0%、正解の許容範囲を±2または±3にとると91.5~100.0%であり、許容範囲を設けると全ての機関の数値が高いものとなるが、ややばらつく傾向が認められた。この結果から、検証機関または担当者の習熟度や検査環境により、検査精度が大きく影響を受けること、それがマーカとしての精度に影響を与えていることが伺える。

これらの結果より、今回提供されたマニュアルに従い、今回提供されたマーカを用いて、今回対象とした12種類のエリンギ品種を相互に識別することは、得られた数値の正解値に正当な許容範囲を設けることで、高い精度で行えると言える。

結果の詳細は、添付資料5「品種毎のマーカサイズ一致率の詳細」を参照。

また、これらの表に基づいて、品種毎に正解の許容範囲の変化に伴うマーカ一致率の変化をグラフにしてみると、下記の図1のようになり、どの品種においても、正解の許容範囲を設けるとマーカ一致率が飛躍的に高くなる傾向が見られた。

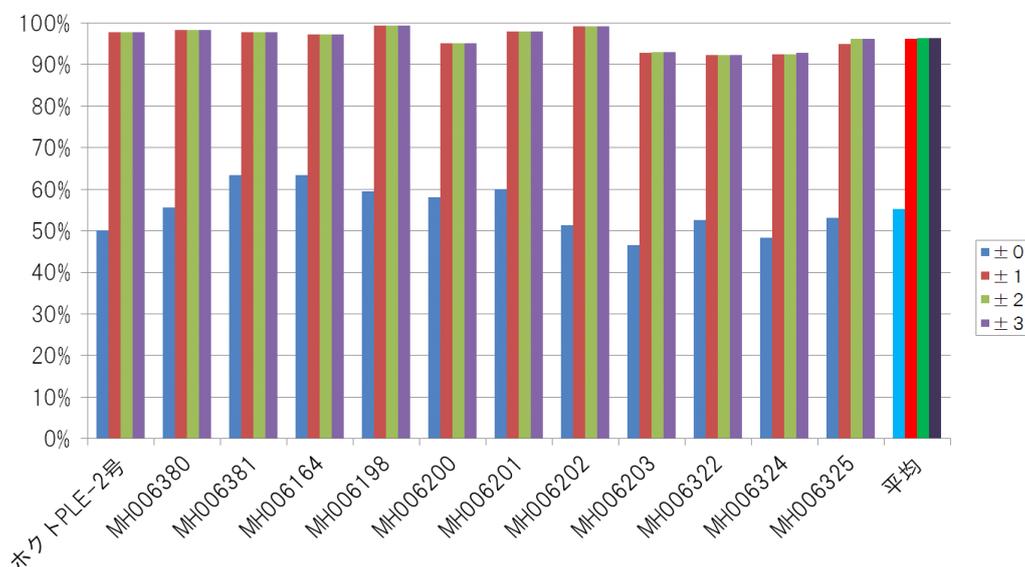
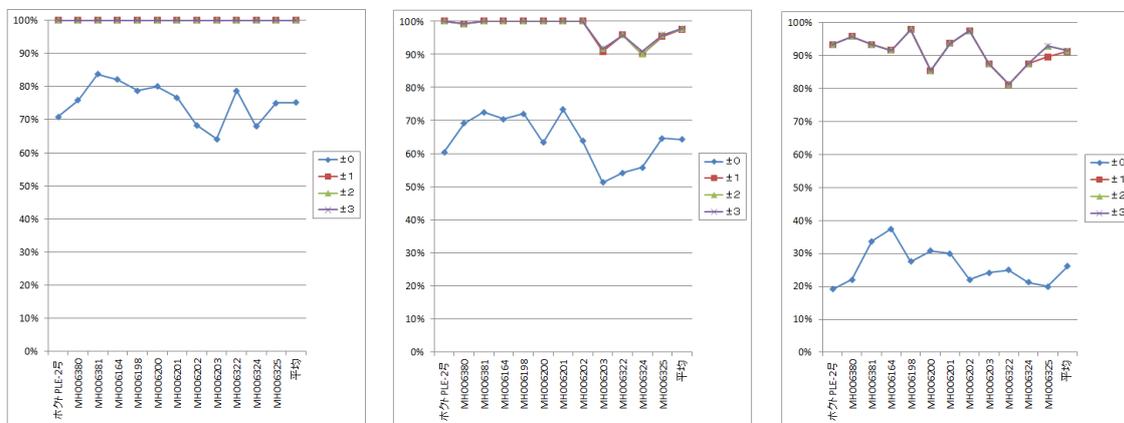


図1 正解の許容範囲と品種毎のマーカサイズ一致率の関係

さらに、検証機関毎に正解の許容範囲の相違に伴うマーカ一致率の相違をグラフにしてみると、下記の図2のようになり、ここでも、正解の許容範囲を設けるとマーカ一致率が高くなる傾向が明確に見られた。

また、MH006203、MH006322、MH066324、MH066325 の 4 つのマーカーは、検査機関及び品種によって、フラグメントサイズの一致率に多少の違いが見られた。



B 社

F 社

L 社

図 2 正解の許容範囲と検証機関毎のマーカーサイズ一致率の関係

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サイズ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 10 である。

表 10 マーカー毎の一致状況
A. マーカーサイズ一致数

許容範囲		± 0				± 1				± 2				± 3			
マーカー総数		240															
検証機関		B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均
マーカー	MsPe-01	92	90	20	67.3	120	120	68	102.7	120	120	107	115.7	120	120	111	117.0
		60	49	43	50.7	120	116	51	95.7	120	116	59	98.3	120	116	100	112.0
	MsPe-02	110	104	0	71.3	120	116	1	79.0	120	116	1	79.0	120	116	109	115.0
		120	117	79	105.3	120	117	79	105.3	120	117	79	105.3	120	117	114	117.0
	MsPe-03	82	88	0	56.7	88	88	1	59.0	88	88	85	87.0	88	88	85	87.0
		90	86	93	89.7	90	86	93	89.7	90	86	93	89.7	90	86	93	89.7
	MsPe-04	72	105	0	59.0	120	120	108	116.0	120	120	116	118.7	120	120	116	118.7
		120	120	100	113.3	120	120	114	118.0	120	120	118	119.3	120	120	118	119.3
	MsPe-05	117	89	0	68.7	120	120	1	80.3	120	120	115	118.3	120	120	115	118.3
		98	40	38	58.7	119	112	38	89.7	120	120	103	114.3	120	120	110	116.7
	MsPe-06	120	69	0	63.0	120	76	66	87.3	120	76	105	100.3	120	76	113	103.0
		119	87	28	78.0	120	87	42	83.0	120	87	58	88.3	120	87	110	105.7
	MsPe-07	120	118	0	79.3	120	119	54	97.7	120	119	104	114.3	120	119	111	116.7
		120	88	27	78.3	120	119	30	89.7	120	119	67	102.0	120	119	111	116.7
	MsPe-08	113	110	16	79.7	120	110	97	109.0	120	110	113	114.3	120	110	114	114.7
		119	110	91	106.7	120	110	106	112.0	120	110	112	114.0	120	110	112	114.0
	MsPe-09	0	0	0	0.0	120	118	0	79.3	120	118	0	79.3	120	118	20	86.0
		50	50	47	49.0	120	118	47	95.0	120	118	47	95.0	120	118	50	96.0
	MsPe-10	101	2	1	34.7	118	120	1	79.7	118	120	2	80.0	118	120	113	117.0
		40	20	20	26.7	120	120	20	86.7	120	120	22	87.3	120	120	110	116.7
	MsPe-11	28	80	0	36.0	120	119	0	79.7	120	119	98	112.3	120	119	109	116.0
		53	59	50	54.0	116	117	55	96.0	118	117	117	117.3	120	117	117	118.0
	MsPe-12	101	84	0	61.7	120	94	4	72.7	120	94	112	108.7	120	94	112	108.7
		120	85	99	101.3	120	85	99	101.3	120	85	115	106.7	120	85	115	106.7
平均		90.2	77.1	31.3	66.2	117.1	109.5	49.0	91.8	117.3	109.8	81.2	102.7	117.3	109.8	103.7	110.3

B. マーカーサイズ一致率

許容範囲		±0				±1				±2				±3			
マーカー総数		240															
検証機関		B社	F社	L社	平均												
マーカー	MsPe-01	77%	75%	17%	56.1%	100%	100%	57%	85.6%	100%	100%	89%	96.4%	100%	100%	93%	97.5%
		50%	41%	36%	42.2%	100%	97%	43%	79.7%	100%	97%	49%	81.9%	100%	97%	83%	93.3%
	MsPe-02	92%	87%	0%	59.4%	100%	97%	1%	65.8%	100%	97%	1%	65.8%	100%	97%	91%	95.8%
		100%	98%	66%	87.8%	100%	98%	66%	87.8%	100%	98%	66%	87.8%	100%	98%	95%	97.5%
	MsPe-03	68%	73%	0%	47.2%	73%	73%	1%	49.2%	73%	73%	71%	72.5%	73%	73%	71%	72.5%
		75%	72%	78%	74.7%	75%	72%	78%	74.7%	75%	72%	78%	74.7%	75%	72%	78%	74.7%
	MsPe-04	60%	88%	0%	49.2%	100%	100%	90%	96.7%	100%	100%	97%	98.9%	100%	100%	97%	98.9%
		100%	100%	83%	94.4%	100%	100%	95%	98.3%	100%	100%	98%	99.4%	100%	100%	98%	99.4%
	MsPe-05	98%	74%	0%	57.2%	100%	100%	1%	66.9%	100%	100%	96%	98.6%	100%	100%	96%	98.6%
		82%	33%	32%	48.9%	99%	93%	32%	74.7%	100%	100%	86%	95.3%	100%	100%	92%	97.2%
	MsPe-06	100%	58%	0%	52.5%	100%	63%	55%	72.8%	100%	63%	88%	83.6%	100%	63%	94%	85.8%
		99%	73%	23%	65.0%	100%	73%	35%	69.2%	100%	73%	48%	73.6%	100%	73%	92%	88.1%
	MsPe-07	100%	98%	0%	66.1%	100%	99%	45%	81.4%	100%	99%	87%	95.3%	100%	99%	93%	97.2%
		100%	73%	23%	65.3%	100%	99%	25%	74.7%	100%	99%	56%	85.0%	100%	99%	93%	97.2%
	MsPe-08	94%	92%	13%	66.4%	100%	92%	81%	90.8%	100%	92%	94%	95.3%	100%	92%	95%	95.6%
		99%	92%	76%	88.9%	100%	92%	88%	93.3%	100%	92%	93%	95.0%	100%	92%	93%	95.0%
	MsPe-09	0%	0%	0%	0.0%	100%	98%	0%	66.1%	100%	98%	0%	66.1%	100%	98%	17%	71.7%
		42%	42%	39%	40.8%	100%	98%	39%	79.2%	100%	98%	39%	79.2%	100%	98%	42%	80.0%
	MsPe-10	84%	2%	1%	28.9%	98%	100%	1%	66.4%	98%	100%	2%	66.7%	98%	100%	94%	97.5%
		33%	17%	17%	22.2%	100%	100%	17%	72.2%	100%	100%	18%	72.8%	100%	100%	92%	97.2%
	MsPe-11	23%	67%	0%	30.0%	100%	99%	0%	66.4%	100%	99%	82%	93.6%	100%	99%	91%	96.7%
		44%	49%	42%	45.0%	97%	98%	46%	80.0%	98%	98%	98%	97.8%	100%	98%	98%	98.3%
	MsPe-12	84%	70%	0%	51.4%	100%	78%	3%	60.6%	100%	78%	93%	90.6%	100%	78%	93%	90.6%
		100%	71%	83%	84.4%	100%	71%	83%	84.4%	100%	71%	96%	88.9%	100%	71%	96%	88.9%
平均		75.2%	64.2%	26.1%	55.2%	97.6%	91.2%	40.8%	76.5%	97.7%	91.5%	67.6%	85.6%	97.8%	91.5%	86.4%	91.9%

全体としてのマーカー一致率は、正解の許容範囲を±0にとると 55.2%、±1にとると 76.5%、±2にとると 85.6%、±3にとると 91.9%であり、必ずしも高いとは言えない。正解の許容範囲を±3まで広げると、一致率の最高値は 91.9%で、最低値は 71.0%であった。先に指摘したように、検査機関により一致率に相違がみられるのは、検証機関または担当者の習熟度や検査環境の相違によるものと考えられるため、検証機関の能力に依存することなく安定的に精度の高い識別結果を得るために、よりよいマニュアルへの改良がなされればなお望ましい。一方で、**MsPe-03**のように、全ての検証機関で一致率の低いマーカーも見られることから、マーカーにはなお改良の余地があると考えられる。

(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、ホクト PLE-2 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。ホクト株式会社から、90 個のホクト PLE-2 号の菌糸サンプルが、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 エリンギ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。

正解の許容範囲別に、各検証機関の検査結果のフラグメントサイズの一致数と一致率のまとめを下記の表 1 1 に示した。

表 1 1 ホクト PLE-2 号の品種内多型検査のマーカサイズ一致状況

許容範囲	マーカ 総数	マーカサイズ一致数				マーカサイズ一致率			
		B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均
±0	24	17.5	14.0	4.0	11.8	72.9%	58.5%	16.7%	49.4%
±1	24	23.6	21.7	6.8	17.4	98.3%	90.3%	28.5%	72.4%
±2	24	23.6	21.7	15.9	20.4	98.3%	90.3%	66.1%	84.9%
±3	24	23.6	21.7	20.6	21.9	98.3%	90.3%	85.7%	91.4%

全体としてのマーカ一致率は、正解の許容範囲として±0をとると 49.4%、±1をとると 72.4%、±2をとると 84.9%、±3をとると 91.4%と、許容範囲を拡げるにしたがって上がるものの、決して高い値とはいえなかった。

なお、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、実際その個体とそのマーカ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。このため、この結果をもって、特に許容範囲を狭くとした場合に一致率のばらつきが大きい原因を、一概に機関毎の検査環境や検査者個々の習熟度などの相違に起因すると判断することはできない。

しかし、基準品種とする 1 種の検査においてこれだけのばらつきや不完全な一致率がみとめられることは、鑑定自体の精度に直接、影響を及ぼすと考えられる。

サンプル毎のマーカ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 許容範囲毎の品種内多型調査結果」参照のこと。

次に、マーカーの一致率を図3に示した。各マーカーには1~2本のフラグメントが含まれるため、マーカー毎にそれらの一致率を平均した値でグラフを描いている。これを見ると、フラグメントサイズの違いの許容範囲を±3まで広げても、基準品種のマーカーサイズと100%一致するマーカーは3つしかなかった。本検査が品種識別検査の基準品種についての結果であることに鑑みると、全体的な一致率の低さはそのまま、検査基準の精度の低さにつながるため、上に述べてきたように、マニュアル、マーカーの双方につき、さらなる検討と改良が必要と思われる。

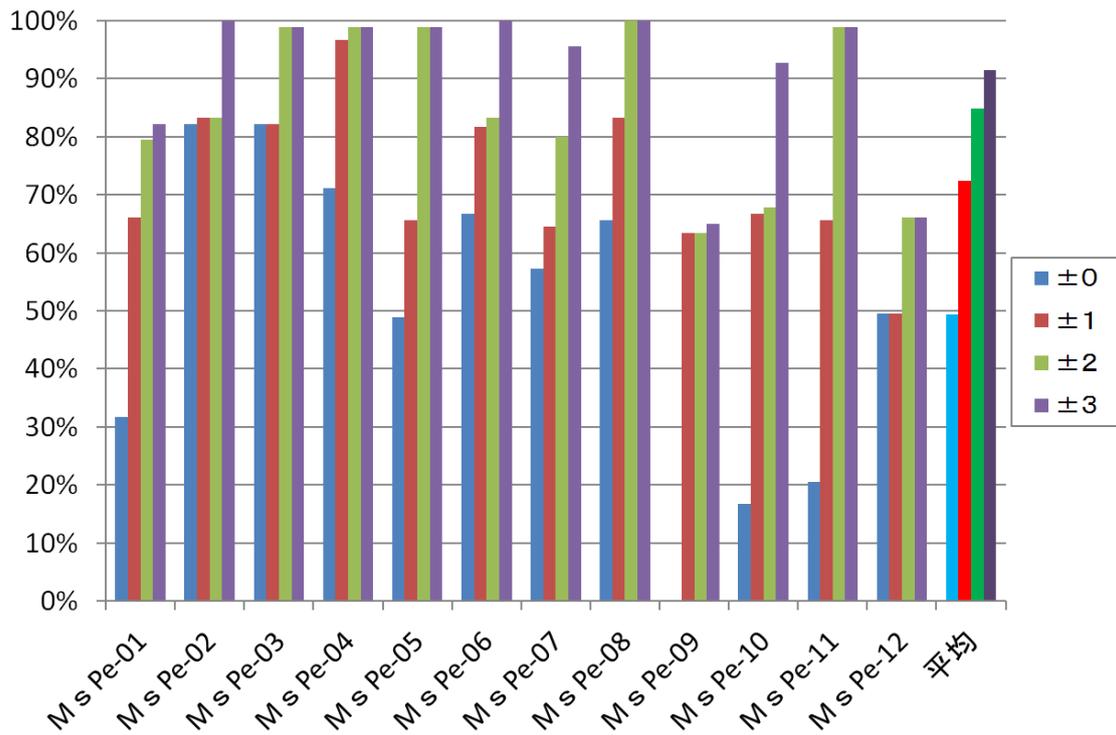


図3 品種内多型調査におけるマーカー毎の一致率

4. 「SSR マーカーによるエリンギの DNA 品種識別マニュアル」評価

上記の結果により、「SSR マーカーによるエリンギの DNA 品種識別マニュアル」の評価は、下記の表 1 2 の通りである。

表 1 2 「SSR マーカーによるエリンギの 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、ホクト PLE-2 号、MH006380、MH006381、MH006164、MH006198、MH006200、MH006201、MH006202、MH006203、MH006322、MH006324、および MH006325 の 12 品種類の商品識別においては、全体として、回答率 98.6%、未答率 1.4%であり、正答率 96.1%、誤答率 2.5%であった。また、品種毎の正答率は 87%~100%というかなり高い数値であった。</p> <p>したがって、提供されたマニュアルは、これら 12 品種の相互間での識別を、かなりの信頼性を持って行えるマニュアルであると言える。</p> <p>しかしながら、3 検証機関のデータを比較すると、検証機関毎にマーカー一致率は異なっていた。その原因は、後述するように、マーカーサイズ情報の精度が低いマーカーが複数存在することにあると考えられる。このため、正しい品種識別結果を導き出すためには、マーカーパターンを正確に検出・識別する能力や、マーカーサイズの一致率が低くても、全体の傾向などから品種を判定する経験値などの検査担当者個人の力量の高さや、厳密な精度管理などに基づく検査機器の精度の高さなど検証機関の検査環境の優良さが必要と思われる。したがって、初めての実験者でもどこの検査機関でも高いマーカー一致率が得られ、その結果として精度の高い安定的な品種識別を行えるよう、マニュアルの改良を検討することが望ましい。</p> <p>一方で、マーカーの正確なサイズは、使用する機器や実験技術者個人の力量によっても変わる可能性があるため、本システムのように、厳密なマーカーサイズ測定結果でなくても高い精度で品種識別ができるシステムは、判定の精度を高く保つ良い方法と思われる。</p>
マーカー	<p>提示されたマーカー毎の認証率は、検査値の正解とのずれを最大±3 ベースまで許容した場合でも、全体として 91.9%という必ずしも高いとは言えない数値であった。また、品種毎にみたマーカーの認証率は、やはり最大±3 ベースまでを許容範囲と考えた場合には、71.7~99.4%であり、マーカー間でばらつきが見られた。このため、認証率の低いマーカーの改良により、品種識別の精度を高める工夫をすることが望ましいと考えられる。</p>
妥当性 総合評価	<p>今回の検証に用いた 1 2 品種のエリンギの商品識別を行った場合の認証率は 96.1%で、品種識別結果の精度は高く、良いシステムと言える。さらに認証率の高くなかったマーカーの検査精度を高めるための改良が望まれる。</p>

