

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 : S S R 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	株式会社フジタ
		「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	
	多型	「トットリフジタ1号」		30株×3	株式会社フジタ

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

ー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 1 0 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 「品種毎のマーカーサイズ一致率の詳細」を参照。

なお、表 1 0 に基づいて、品種毎にマーカー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。

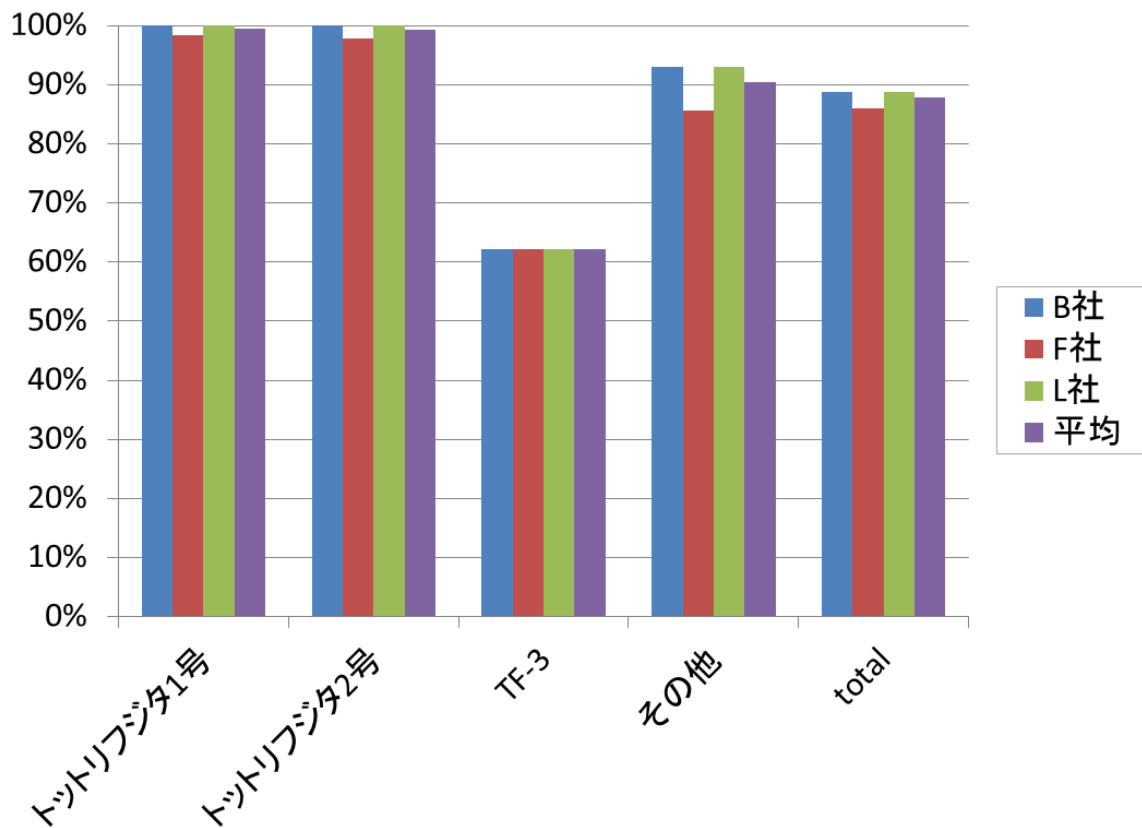


図1 品種毎のマーカータイプ一致率

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致率は、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。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。

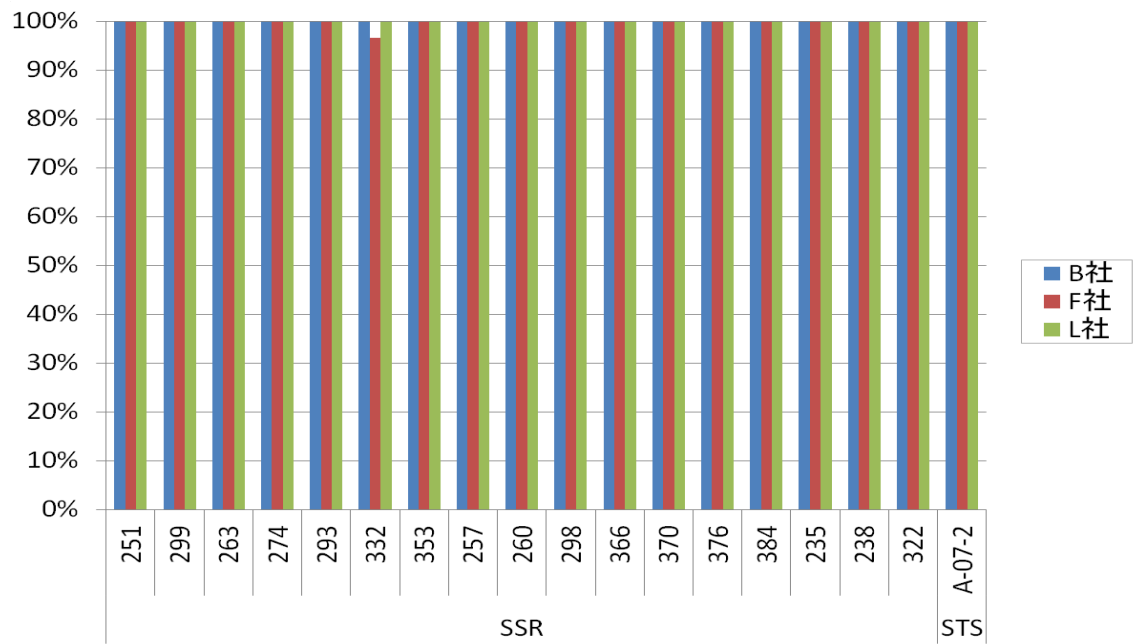


図3 トットリフジタ1号の品種内多型検査における品種毎のマーカータイプ一致率

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	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。 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。 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。 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。
-------	---

マーカー	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。
妥当性 総合評価	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。

以上