

受託事業実施報告書

レタス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分析によるレタスの品種識別手法の 妥当性確認方法の決定	5
「DNA分析によるレタス品種の識別手法」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 マーカーによるレタスの DNA 品種識別マニュアル
3. レタス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. 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）
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、タキイ種苗株式会社が作成した「SSRマーカーによるレタスの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

レタス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

レタス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分析によるレタスの品種識別手法の妥当性確認方法の決定
- 3) 「DNA分析によるレタス品種の識別手法」の妥当性確認試験

DNA分析によるレタスの 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) レタスの DNA 品種識別手法における妥当性確認方法の決定

(2) レタスの 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。依頼元であるタキイ種苗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品種について各24個体ずつ、マニュアルに従って実験検証を行ったところ、どの品種においても、バンドサイズの異なるマーカーは全く認められず、多型は認められなかっ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

レタス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) 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。

(3) 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 : タキイ種苗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1 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 分析によるレタス品種の識別手法」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 マーカーによるレタスの DNA 品種識別マニュアル

作成元 : タキイ種苗株式会社

2) サンプル収集

タキイ種苗株式会社研究農場より、レタスの基準(株)品種 1 品種および補足基準品種 11 品種の各 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 株の種子またはペレット種子が、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
レタス	基準株	サウザー	DNA	500ng×3	タキイ種苗株式会社 研究農場
	対照試料品種/ 補足基準品種	シナノグリーン	DNA	500ng×3	
		晩抽レッドファイヤー		500ng×3	
		ダンシング		500ng×3	
		サマーサージ		500ng×3	
		ランサー		500ng×3	
		シナノスター		500ng×3	
		タフオラ0566		500ng×3	
		タフオラ0567		500ng×3	
		TLE-452		500ng×3	
		TLE-487		500ng×3	
		TLE-496		500ng×3	
	生産者株 (12品種)	サウザー	種子	5株×3	
		シナノグリーン	ペレット種子	5株×3	
		晩抽レッドファイヤー	種子	5株×3	
		ダンシング	ペレット種子	5株×3	
		サマーサージ	ペレット種子	5株×3	
		ランサー	種子	5株×3	
		シナノスター	ペレット種子	5株×3	
		タフオラ0566	ペレット種子	5株×3	
		タフオラ0567	種子	5株×3	
		TLE-452	種子	5株×3	
		TLE-487	ペレット種子	5株×3	
		TLE-496	ペレット種子	5株×3	
	多型	サウザー	ペレット種子	30株×3	
	マーカー 配列情報	マーカー14種	配列情報	配列情報	

また、検査標準とする基準品種の DNA は、補助基準品種の 11 品種を併せた計 12

品種の DNA と共に、各々7500ng 以上が冷蔵でタキイ種苗株式会社より DNA 鑑定学会に送付された。DNA 溶液は、品種ごとに 6 本ずつに分注されており、内容については、表 3 の通りであった。これらの DNA を基準として、生産者株サンプル 12 品種の品種識別マーカーの検証、および、基準株 1 品種の品種内多型調査を行った。

表 3 基準および補足基準品種の DNA 量

チューブ通番 (チューブ側面に記入)	品種通番	品種名	濃度 (ng/ μ l)	分量 (μ l/チューブ)	チューブあたり総量 (ng)
1	1	サウザー	18.0	100	1795
2			14.1		1411
3			19.3		1925
4			21.2		2118
5			20.3		2032
6	2	シナノグリーン	17.8		1781
7			27.6		2764
8			27.7		2773
9			27.7		2768
10			26.9		2685
11	3	晩抽レッドファイヤー	22.1		2214
12			30.3		3029
13			33.2		3325
14			32.6		3258
15			28.8		2882
16	4	ダンシング	21.0		2096
17			33.5		3345
18			28.8		2880
19			41.0		4099
20			21.4		2142
21	5	サマーサージ	25.8		2577
22			24.1		2411
23			21.6		2163
24			23.0		2300
25			20.9		2092
26	6	ランサー	25.8		2577
27			23.4		2340
28			16.4		1640
29			17.0		1701
30			20.9		2085
31	7	シナノスター	24.4		2437
32			25.9		2588
33			26.2		2622
34			22.4		2238
35			30.2		3015
36	8	タフオラ0566	23.8		2378
37			19.2		1918
38			22.1		2214
39			25.5		2554
40			21.5		2150
41	9	タフオラ0567	23.8		2377
42			22.1		2206
43			29.4		2940
44			32.4		3243
45			26.9		2689
46	10	TLE-452	26.3		2626
47			18.3		1834
48			27.7		2773
49			17.2		1722
50			21.2		2118
51	11	TLE-487	17.0		1697
52			19.1		1907
53			18.7		1869
54			21.2		2116
55			20.9		2087
56	12	TLE-496	16.3		1633
57			18.5		1851
58			18.3		1834
59			20.0		2001
60			23.7		2372
61			40.2		4022
62			28.4		2837
63			31.2		3118
64			24.0		2402
65			34.3		3425
66			26.6		2663
67			22.5		2253
68			22.1		2207
69			21.8		2182
70			23.9		2387
71			24.9		2485
72			26.7		2667

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 レタスの基準株 DNA 溶液 1 種
(基準マーカ DNA 各 2 チューブ、
14.1~21.2ng/ μ L x 100 μ L / チューブ)
- ② レタスの補足基準株 DNA 溶液 11 種
(補足基準マーカ DNA 各 2 チューブ、
16.3~40.2 ng/ μ L x 100 μ L / チューブ)
- ③ 品種識別用のレタスの種子またはペレット種子 60 株
(生産者株サンプル 12 品種の種子またはペレット種子 各 5 株)
- ④ 品種内多型調査用のレタスのペレット種子 30 株
(基準株のサウザーのペレット種子)

(2) 配布方法

① 基準マーカ DNA

タキイ種苗株式会社から DNA 鑑定学会に送付された 1 品種 (サウザー) の DNA 溶液を、3 箇所の検証機関の全てに、各 2 チューブ (14.1~21.2ng/ μ L x 100 μ L / チューブ) ずつ冷蔵で送付した。チューブごとの DNA 濃度は、表 3 を参照のこと。

② 補足基準マーカ DNA

タキイ種苗株式会社から DNA 鑑定学会に送付された 11 品種 (シナノグリーン、晩抽レッドファイヤー、ダンシング、サマーサージ、ランサー、シナノスター、タフオラ 0566、タフオラ 0567、TLE-452、TLE-487、TLE-496) の DNA 溶液を、3 箇所の検証機関の全てに、全品種各 2 チューブ (16.3~40.2ng/ μ L x 100 μ L / チューブ) ずつ冷蔵で送付した。

③ 品種識別用の生産者株のサンプル

タキイ種苗株式会社から、12 品種の生産者株の種子またはペレット種子のサンプルが、冷蔵で DNA 鑑定学会に送付された。サンプルは品種ごとに 20 粒ずつ 1 袋の種子袋に入れられており、計 12 袋のサンプルが、冷蔵状態で 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、これらの冷

蔵の種子またはペレット種子の株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、タキイ種苗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 箇所の検証機関へ冷蔵で送付した。

表4 品種識別用サンプル番号対応表

品種	サンプル数	サンプル番号	品種	サンプル数	サンプル番号
サマーサージ	5	15	サウザー	5	18
		22			10
		17			48
		8			52
		13			35
タフオラ0566	5	51	タフオラ0567	5	12
		21			1
		55			49
		23			43
		27			4
シナノスター	5	47	シナノグリーン	5	60
		19			37
		39			33
		53			7
		6			30
TLE-452	5	57	TLE-487	5	59
		34			46
		25			2
		11			29
		58			20
TLE-496	5	45	ダンシング	5	31
		42			32
		9			14
		28			44
		56			26
晩抽レッドファイヤー	5	5	ランサー	5	36
		54			40
		41			50
		38			16
		24			3

④ 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、タキイ種苗株式会社から、1 品種（サウザー）の多型調査用株のペレット種子のサンプル 100 粒が、1 つの種子袋に入れた状態で、冷蔵で DNA 鑑定学会に送付された。DNA 鑑定学会において、

1粒ずつ90粒に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、冷蔵で送付した。

2) 「SSR マーカーによるレタスの DNA 品種識別マニュアル」 (添付資料2)

提供元 : タキイ種苗株式会社

作成機関 : タキイ種苗株式会社研究農場

メール添付にて各検証機関に送付した。

3) レタスの検査項目

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	サウザー	DNA	2,500ng	依頼元が提供	
マーカーの 塩基配列	マーカー数:14種	配列情報	配列情報		
生産者株	12品種	種子	5株／品種	2回	120
品種内多型 調査株	サウザー	種子	30株	1回	30

4) レタス検査結果票

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中の表3に記載されている各マーカーのタイプと、基準品種であるサウザー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6 品種識別マーカーのサイズ表）。これをもとに、「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、アクリルアミドゲル電気泳動もしく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6 品種識別マーカーのサイズ表

マーカー	マルチプレックスPCR		5Plex					2Plex		3Plex			2Plex		2Plex	
	マーカー名		SML15	SML26	SML22	SML42	SML45	SML60	SML3	LS_WGS_10	TK_39	LS_WGS_15	TK_37	TK_11	TK_42	TK_20
品種 番号	登録番号	多型数	2	3	4	2	4	2	2	2	2	2	2	2	3	2
		品種名														
1	10884	サウザー	247	182	130	116	86	171	120	188	145	108	142	120	139	90
2	635	シナグリーン	257	182	145	116	86	171	120	173	155	108	142	120	139	105
3	1560	晩抽レッドファイヤー	247	197	145	112	89	171	116	188	145	88	157	120	127	90
4	6147	ダンシング	247	173	130	116	89	171	120	173	145	88	142	126	136	90
5	9122	サマーサージ	247	197	145	112	89	171	116	188	145	88	157	126	127	90
6	12976	ランサー	257	182	154	112	86	171	120	188	155	108	142	126	127	105
7	17203	シナノスター	257	182	145	112	92	171	120	173	155	108	142	126	139	105
8	18060	タフオラ0566	247	182	130	112	86	171	120	188	145	108	142	120	127	105
9	18061	タフオラ0567	247	182	130	112	92	171	120	188	145	108	142	120	127	105
10	21502	TLE-452	247	182	130	116	83	179	120	173	145	108	142	120	139	105
11	23484	TLE-487	247	197	148	112	89	171	116	188	145	88	157	120	139	90
12	24335	TLE-496	257	197	145	112	83	171	120	188	155	88	157	126	127	90

2) レタスの検査結果

検証機関によるレタスの検査結果を 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「レタス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7に示した。

表7 品種別の品種名正答率

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	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
サウザー	5	2	10	3	30	28	2	0	30	93%	7%	0%	100%
シナノグリーン	5		10		30	27	3	0	30	90%	10%	0%	100%
晩抽レッドファイヤー	5		10		30	25	1	4	30	83%	3%	13%	100%
ダンシング	5		10		30	28	0	2	30	93%	0%	7%	100%
サマーサージ	5		10		30	26	2	2	30	87%	7%	7%	100%
ランサー	5		10		30	27	1	2	30	90%	3%	7%	100%
シナノスター	5		10		30	26	0	4	30	87%	0%	13%	100%
タフオラ0566	5		10		30	28	2	0	30	93%	7%	0%	100%
タフオラ0567	5		10		30	30	0	0	30	100%	0%	0%	100%
TLE-452	5		10		30	24	2	4	30	80%	7%	13%	100%
TLE-487	5		10		30	28	2	0	30	93%	7%	0%	100%
TLE-496	5		10		30	27	3	0	30	90%	10%	0%	100%
全体	60	各2	120		360	324	18	18	360	90%	5%	5%	100%

品種名の回答は、全体として、回答率 95%、未答率 5%であり、回答の正答率 90%、誤答率 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 80%~100%という比較的高い数値であった。

次に、検証機関毎の品種別正答率を下記の表8でみると、3か所の検証機関のうち2か所は、全ての品種の正答率が 100%である一方、残り1か所の機関で、正答率が 40%~100%とばらついていることがわかる。

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、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が伺える。

表 8 検証機関毎の品種別正答率

判定品種	正答率			
	B社	F社	L社	平均
サウザー	100%	80%	100%	93%
シナノグリーン	100%	70%	100%	90%
晩抽レッドファイヤー	100%	50%	100%	83%
ダンシング	100%	80%	100%	93%
サマーサージ	100%	60%	100%	87%
ランサー	100%	70%	100%	90%
シナノスター	100%	60%	100%	87%
タフオラ0566	100%	80%	100%	93%
タフオラ0567	100%	100%	100%	100%
TLE-452	100%	40%	100%	80%
TLE-487	100%	80%	100%	93%
TLE-496	100%	70%	100%	90%
平均	100%	70%	100%	90%

これらの結果より、本マニュアルに基づくこれら 12 品種のレタスの品種識別は、比較的高い精度で行えるが、検査者側の状態による精度の低下を防ぐための改良が必要と考えられる。

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 14 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 1,680 本ずつ、全体で 5,040 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	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 フラグメント数
B社	14	1	60	2	1680
F社	14	1	60	2	1680
L社	14	1	60	2	1680
全体	42		180		5040

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 1 0 許容範囲別の品種毎のマーカサイズ一致率」である。

表 1 0 品種毎のマーカサイズ一致率

A. 許容範囲± 0

品種名	最大一致 マーカ数	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
サウザー	140	48	56	139	81	34%	40%	99%	58%
シナノグリーン		26	40	140	69	19%	29%	100%	49%
晩抽レッドファイヤー		35	27	140	67	25%	19%	100%	48%
ダンシング		33	31	139	68	24%	22%	99%	48%
サマーサージ		37	37	140	71	26%	26%	100%	51%
ランサー		23	36	140	66	16%	26%	100%	47%
シナノスター		38	19	140	66	27%	14%	100%	47%
タフオラ0566		45	48	140	78	32%	34%	100%	55%
タフオラ0567		36	44	140	73	26%	31%	100%	52%
TLE-452		27	26	139	64	19%	19%	99%	46%
TLE-487		30	47	140	72	21%	34%	100%	52%
TLE-496		39	34	140	71	28%	24%	100%	51%
平 均		35	37	140	71	25%	26%	100%	50%

B. 許容範囲± 1

品種名	最大一致 マーカ数	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
サウザー	140	103	87	139	110	74%	62%	99%	78%
シナノグリーン		92	84	140	105	66%	60%	100%	75%
晩抽レッドファイヤー		85	46	140	90	61%	33%	100%	65%
ダンシング		78	66	139	94	56%	47%	99%	67%
サマーサージ		80	71	140	97	57%	51%	100%	69%
ランサー		75	72	140	96	54%	51%	100%	68%
シナノスター		98	48	140	95	70%	34%	100%	68%
タフオラ0566		104	82	140	109	74%	59%	100%	78%
タフオラ0567		93	91	140	108	66%	65%	100%	77%
TLE-452		91	61	139	97	65%	44%	99%	69%
TLE-487		87	74	140	100	62%	53%	100%	72%
TLE-496		90	72	140	101	64%	51%	100%	72%
平 均		90	71	140	100	64%	51%	100%	72%

C. 許容範囲±2

品種名	最大一致 マーカー数	マーカーサイズ一致数				マーカーサイズ一致率			
		B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均
サウザー	140	117	106	139	121	84%	76%	99%	86%
シナノグリーン		113	106	140	120	81%	76%	100%	85%
晩抽レッドファイヤー		115	64	140	106	82%	46%	100%	76%
ダンシング		107	89	139	112	76%	64%	99%	80%
サマーサージ		109	92	140	114	78%	66%	100%	81%
ランサー		111	82	140	111	79%	59%	100%	79%
シナノスター		117	60	140	106	84%	43%	100%	75%
タフオラ0566		114	105	140	120	81%	75%	100%	85%
タフオラ0567		123	108	140	124	88%	77%	100%	88%
TLE-452		114	78	139	110	81%	56%	99%	79%
TLE-487		111	91	140	114	79%	65%	100%	81%
TLE-496		114	93	140	116	81%	66%	100%	83%
平 均		114	90	140	114	81%	64%	100%	82%

D. 許容範囲±3

品種名	最大一致 マーカー数	マーカーサイズ一致数				マーカーサイズ一致率			
		B	F	L	平均	B	F	L	平均
サウザー	140	131	120	139	130	94%	86%	99%	93%
シナノグリーン		136	115	140	130	97%	82%	100%	93%
晩抽レッドファイヤー		132	79	140	117	94%	56%	100%	84%
ダンシング		117	99	140	119	84%	71%	100%	85%
サマーサージ		123	100	140	121	88%	71%	100%	86%
ランサー		129	94	140	121	92%	67%	100%	86%
シナノスター		129	70	140	113	92%	50%	100%	81%
タフオラ0566		124	110	140	125	89%	79%	100%	89%
タフオラ0567		129	122	140	130	92%	87%	100%	93%
TLE-452		138	85	140	121	99%	61%	100%	86%
TLE-487		125	109	140	125	89%	78%	100%	89%
TLE-496		129	107	140	125	92%	76%	100%	90%
平 均		129	101	140	123	92%	72%	100%	88%

全体を平均してのマーカーサイズ一致率は、許容正解の許容範囲を±0にとると50%、±1にとると72%、±2にとると82%、±3にとると88%となり、許容範囲

を広く取るにしたがって高い値になるが、品種毎・検証機関毎にばらつきが見られた。

品種毎のマーカーサイズ一致率は、正解の許容範囲正解の許容範囲を±0にとると46～58%、±1にとると65～78%、±2にとると75～86%で、±3にとると81～93%であり、品種間で正解率のばらつきは比較的少なかったが、正解率自体はあまり高くなかった。

また、検証機関毎のマーカーサイズ一致率は、正解の許容範囲を±0にとると25～100%、±1にとると51～100%、正解の許容範囲を±2にとると64～100%、正解の許容範囲を±3にとると72～100%であり、検証機関相互間のばらつきが非常に大きかった。この結果からも、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が伺える。

当然のことながら、正解の許容範囲を狭く設定するほど、品種別にも検証機関別にもマーカーサイズの一致率は低くなるが、電気泳動の誤差である±2bpを考慮すると、±2の許容範囲が妥当な評価値となろう。

なお、マーカーサイズ一致率が高くななくても、品種名による識別結果が検証機関別で70～100%、平均値で90%であったこととを考えあわせると、今回検証に供された14種類のマーカーによる品種識別は、個々のマーカーサイズの精度ではなく、検査結果全体をパターンとして捉えて品種間の比較を重視することで、より高い品種識別結果を得られる仕組みになっていると考えられる。このような検査法で精度の高い結果を得るためには、検査者側の習熟度が高いことや検査環境の良いことなどが必要と考えられるため、検査者を問わず精度の高い結果を得るために、マニュアルの改良が望まれる。

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。

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ー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、どの品種に置いても、正解の許容範囲を広げるとマーカー一致率が高くなる傾向が明確に見られた。

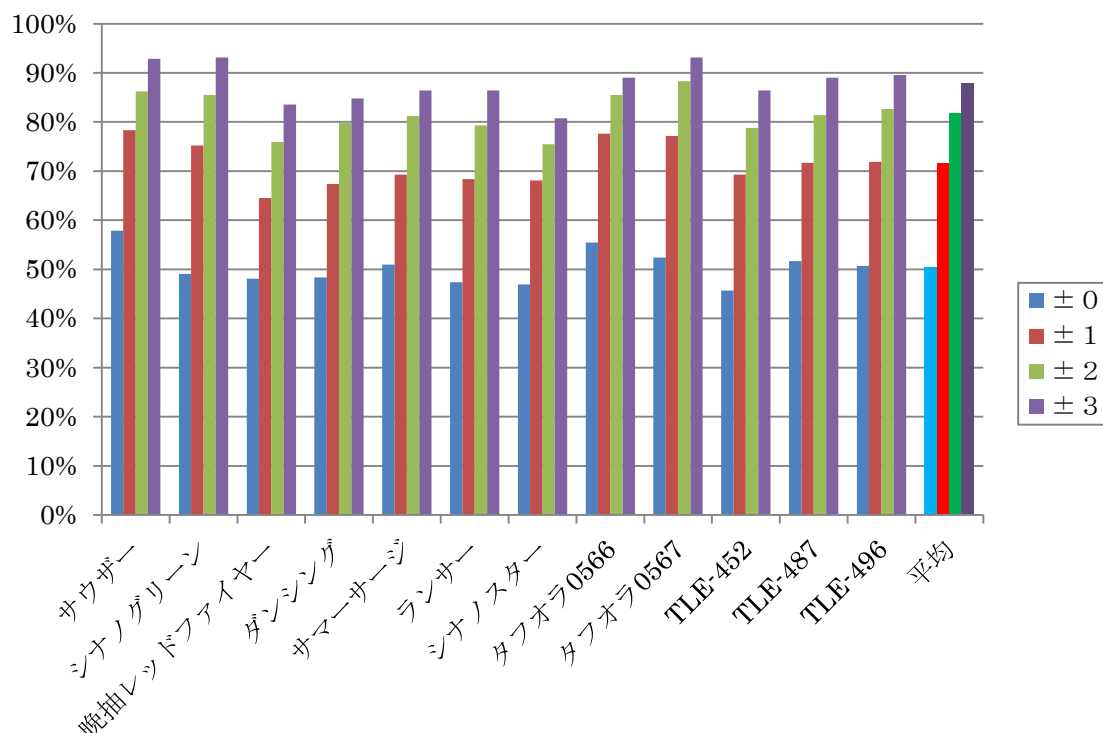
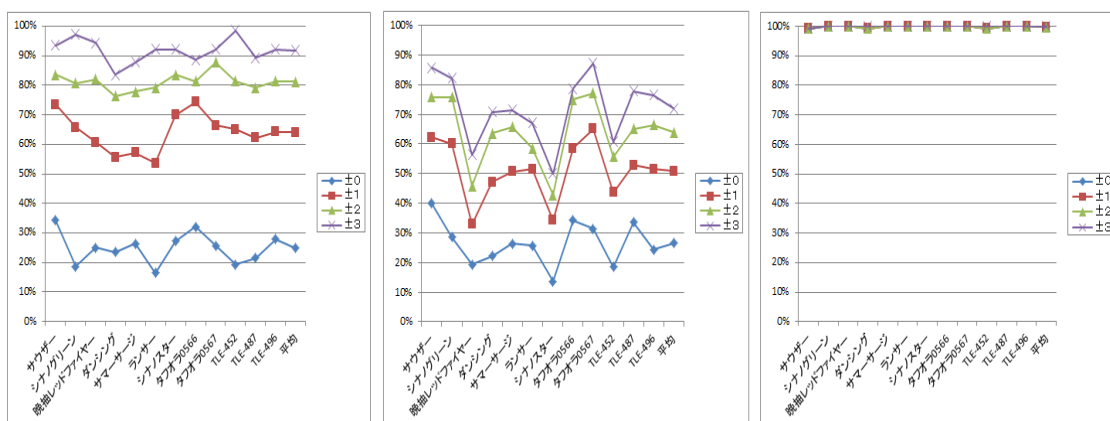


図1 正解の許容範囲と品種毎のマーカサイズ一致率の関係

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サイズ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、特に正解率の低かった2機関で、正解の許容範囲を広げるとマーカサイズ一致率が高くなる傾向が明確に見られた。

また、品種によってフラグメントサイズの一致率に違いが見られたが、検証機関毎に一致率の低い品種は異なり、一定の傾向は見られなかった。



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 1 1 である。

表 1 1 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	マーカ- 総数	検査 機関	5Plex					2Plex		3Plex			2Plex		2Plex		平均
			SML15	SML26	SML22	SML42	SML45	SML60	SML3	LS_WGS_10	TK_39	LS_WGS_15	TK_37	TK_11	TK_42	TK_20	
±0	140	日社	27	20	48	52	51	26	31	13	16	29	20	22	38	24	30
		F社	18	16	21	61	70	35	53	13	48	33	15	53	5	4	32
		L社	120	120	120	120	120	120	119	120	120	120	120	120	118	120	120
		平均	55	52	63	78	80	60	68	49	61	61	52	65	54	49	60
±1		日社	71	57	102	106	116	60	100	42	46	82	68	84	63	79	77
		F社	51	25	35	91	89	89	93	55	93	58	43	90	34	8	61
		L社	120	120	120	120	120	120	119	120	120	120	120	120	118	120	120
		平均	81	67	86	106	108	90	104	72	86	87	77	98	72	69	86
±2		日社	91	93	114	118	119	77	117	70	59	110	89	118	83	107	98
		F社	74	36	58	91	94	109	100	79	106	89	80	90	58	10	77
		L社	120	120	120	120	120	120	119	120	120	120	120	120	118	120	120
		平均	95	83	97	110	111	102	112	90	95	106	96	109	86	79	98
±3		日社	112	110	118	119	120	107	119	86	82	120	118	120	95	116	110
		F社	91	39	82	82	95	110	102	98	107	104	98	90	64	38	86
		L社	120	120	120	120	120	120	119	120	120	120	120	120	120	120	120
		平均	108	90	107	110	112	112	113	101	108	115	112	110	93	91	106

B. マーカーサイズ一致率

	検査		5Plex					2Plex		3Plex			2Plex		2Plex		平均
			SML15	SML26	SML22	SML42	SML45	SML60	SML3	LS_WGS_10	TK_39	LS_WGS_15	TK_37	TK_11	TK_42	TK_20	
±0	140	B社	23%	17%	40%	43%	43%	22%	26%	11%	13%	24%	17%	18%	32%	20%	25%
		F社	15%	13%	18%	51%	58%	29%	44%	11%	40%	28%	13%	44%	4%	3%	26%
		L社	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	100%	98%	100%	100%
		平均	46%	43%	53%	65%	67%	50%	56%	41%	51%	51%	43%	54%	45%	41%	50%
B社		58%	48%	85%	88%	97%	50%	83%	35%	38%	68%	57%	70%	53%	66%	64%	
F社		43%	21%	29%	76%	74%	74%	78%	46%	78%	48%	36%	75%	28%	7%	51%	
L社		100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	100%	98%	100%	100%	
平均		67%	56%	71%	88%	90%	75%	87%	60%	72%	72%	64%	82%	60%	58%	72%	
B社		76%	76%	95%	98%	99%	64%	98%	58%	49%	92%	74%	98%	69%	89%	81%	
F社		62%	30%	48%	76%	78%	91%	83%	66%	88%	74%	67%	75%	48%	8%	64%	
L社		100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	100%	98%	100%	100%	
平均		79%	69%	81%	91%	93%	85%	93%	75%	79%	89%	80%	91%	72%	66%	82%	
±3		B社	93%	92%	98%	99%	100%	89%	99%	72%	68%	100%	96%	100%	79%	97%	92%
		F社	76%	33%	68%	77%	79%	92%	85%	82%	89%	87%	82%	75%	53%	32%	72%
		L社	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		平均	90%	75%	89%	92%	93%	94%	94%	84%	86%	96%	93%	92%	78%	76%	88%

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 50%、 ± 1 にとると 72%、 ± 2 にとると 82%、 ± 3 にとると 88%である。また、正解の許容範囲を ± 3 まで広げても、全機関で一致率が 100%となるマーカーは見られなかった。本マニュアルの品種間のマーカーサイズの差は最小で 3 塩基であることから、許容範囲を ± 2 から ± 3 に拡大して初めて正解と認められるような検査結果は、有効とは言えない。検査結果に疑問が生じる危険性を避けるためには、マーカーの差を 4～5 塩基以上にして判別を容易にすることや、検査技師の能力に左右されないマニュアルに改良の余地があると考えられる。

三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が大きく異なっているが、その原因は、品種ごとの正解率の分析で前述したように、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の違いによるものと思われる。常に正確な検査結果を得るためには、検証機関の能力に依存することなく正解を得られるマニュアルやマーカーへと改良を行う必要がある。

(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、サウザー1品種のみにつき、1機関当たり30株を用いて行った。タキイ種苗株式会社から、100粒のサウザーのペレット種子が、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 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）」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の一致数と一致率のまとめを下記の表12に示した。

表12 サウザーの品種内多型検査のマーカーサイズ一致状況

許容範囲	合計 マーカー数	一致数				一致率			
		B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均
±0	14	4	4	14	7	28%	29%	100%	52%
±1	14	8	8	14	10	58%	57%	100%	72%
±2	14	11	9	14	11	77%	65%	100%	81%
±3	14	12	10	14	12	89%	72%	100%	87%

全体としてのマーカー一致率は、正解の許容範囲として±0をとると52%、±1をとると72%、±2をとると81%、±3をとると87%と、許容範囲を広げるにしたがって上がるものの、あまり高い値とはいえなかった。検証機関毎に結果を見ると、一致率の高い1機関と低い2機関に分かれ、機関毎の検査環境や検査者個々の習熟度などの相違が、検査結果に大きく影響することが伺われる。

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 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。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1つもなかった。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、マニュアル、マーカーの双方につき、十分な検討と改良が必要と思われる。

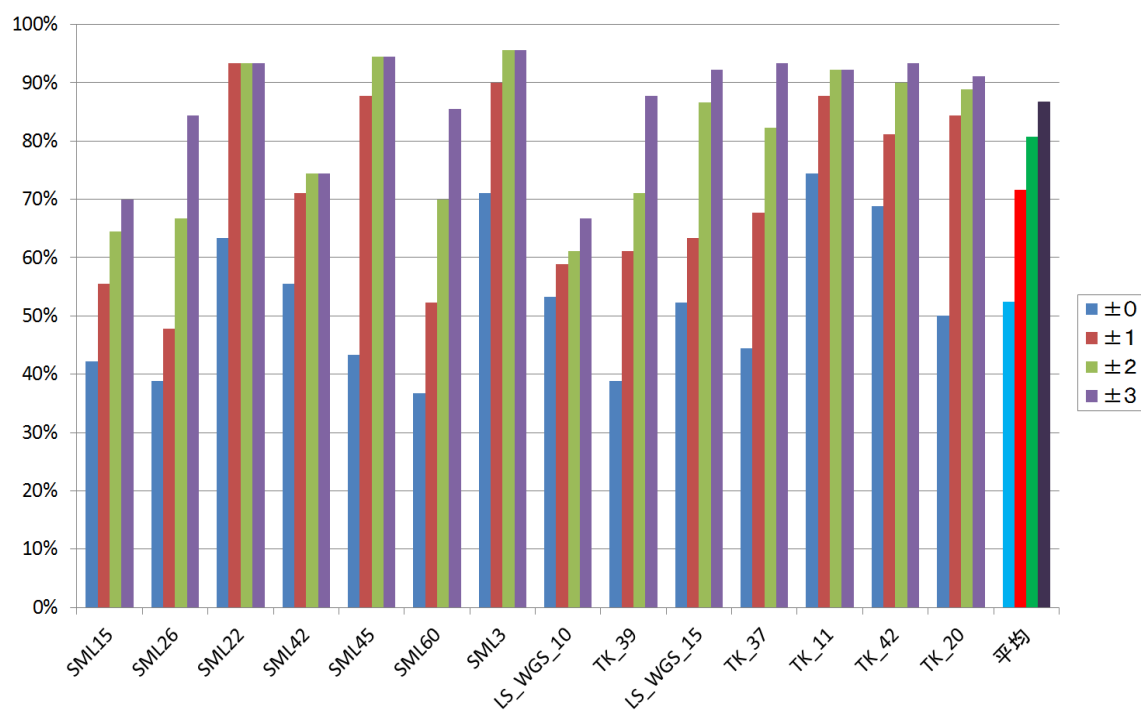


図3 品種内多型調査におけるマーカー毎の一致率

4. 「SSR マーカーによるレタスの DNA 品種識別マニュアル」評価

上記の結果により、「SSR マーカーによるレタスの 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 マーカーによるレタスの 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、サウザー、シナノグリーン、晩抽レッドファイヤー、ダンシング、サマーサージ、ランサー、シナノスター、タフオラ 0566、タフオラ 0567、TLE-452、TLE-487、TLE-496 の 12 品種の品種識別においては、全体として、回答率 95%、未答率 5% であり、回答の正答率 90%、誤答率 5%であった。(また、品種毎の正答率は 80%~100%という比較的高い数値であった。 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、ある程度信頼性を持って行えるマニュアルであると言える。 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が大きく異なっていた。その原因は、後述するように、個々のマーカーサイズ情報の精度が低いことに考えられる。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。このため、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。 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比較的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。
マーカー	提示されたマーカー毎の認証率は、マーカーサイズの相違の最小値が 3 であるため、検査値の正解とのずれを最大±2 ベースまで許容した場合、全体として 82%というあまり高くない数値であった。また、品種毎にみたマーカーの認証率は、やはり最大±2 ベースまでを許容範囲と考えた場合には、75~88%であり、やはりあまり高くない数値であった。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が必要と考えられる。 一方で、マーカー一致率は品種間でやや相違がみられた。検査対象とする全ての品種に対して同程度の有効性を持つマーカーの組み合わせと考えら

	れるため、マーカーセットとしての選択は割合にバランスが取れていると思われる。 したがって、マーカーセットとしての組み合わせを保持したまま、個々のマーカーの精度を高めることが必要であろう。
妥当性 総合評価	今回の検証に用いた 12 品種のレタスの品種識別を行った場合の認証率は 90% で、品種識別結果は比較的精度が高い。 マーカーセットのバランスはよいが、個々の精度を高めるための改良が必要である。

以上