

## 事業実施報告書

### 霜降りひらたけのDNA品種識別の妥当性の検証

平成 30 年 3 月 23 日

特定非営利活動法人 DNA 鑑定学会



## 目 次

DNA 品種識別マーカ－の妥当性の検証実施の概要	3
DNA 分析による霜降りひらたけの品種識別マーカ－の 妥当性検証方法の決定	5
DNA 分析による霜降りひらたけの品種識別マーカ－の 妥当性検証検査	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－による HOX1 (霜降りひらたけ) の DNA 品種識別マニュアル
3. 霜降りひらたけ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. 品種毎マーカ－毎のマーカ－サイズの一致数と一致率
6. 霜降りひらたけ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. 正解許容範囲毎の品種内多型検査結果



## DNA品種識別マーカ－の妥当性の検証実施の概要

### 1. 目的

H29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－によるHOX1号（霜降りひらたけ）のDNA品種識別マニュアル Ver1.8」に記載された品種識別用マーカ－について、記載された霜降りひらたけ品種の識別に用いる場合の妥当性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マーカ－の妥当性検証方法等の決定

霜降りひらたけの品種識別マニュアルに記載されているマーカ－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（案）」（[http://www.hinsyu.maff.go.jp/pvr/dna\\_meeting/H20\\_2nd/guideline.pdf](http://www.hinsyu.maff.go.jp/pvr/dna_meeting/H20_2nd/guideline.pdf)、以下「妥当性ガイドライン」と略す。）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－の妥当性を検証する。

#### 2) 妥当性検証検査・検査結果のとりまとめおよび技術の妥当性の検証

霜降りひらたけの品種識別について、妥当性検証検査を実施してその結果のとりまとめを行い、マーカ－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品種識別マーカ－の妥当性の検証実施の概要
- 2) DNA分析による霜降りひらたけの品種識別マーカ－の妥当性検証方法の決定
- 3) DNA分析による霜降りひらたけの品種識別マーカ－の妥当性検証検査



## DNA分析による霜降りひらたけの 品種識別マーカーの妥当性検証方法の決定

### 1. 妥当性検証方法の概要

妥当性検証事業は、DNA鑑定学会が定めた「DNA鑑定提供までのジョブフローと規則」（添付資料1）に基づいて実施した。

#### 1) 委員会の設置

DNA鑑定学会員で委員会を構成し、妥当性検証検査結果の検討・確認を行った。

#### 2) 実施内容

- (1) 霜降りひらたけのDNA品種識別手法における妥当性検証方法の決定
- (2) 霜降りひらたけのDNA品種識別における識別マーカーの妥当性検証検査

### 2. 実施形態

#### 1) 委員会の設置

妥当性検証事業を当学会の認証規則に従って推進するにあたり、下記「表1 妥当性検討委員会の委員」に記載した委員からなる妥当性検討委員会を設置して、各委員に報告書原案をメール添付で送付し、メール会議による検討を行って報告書を完成した。

**表1 妥当性検討委員会の委員**

役職	氏名	所属
委員長	矢野 博	農林水産省産学連携支援コーディネーター 中四国アグリテック 生物工学副部長
	久原 哲	九州大学大学院農学研究院 生命機能科学部門
	辻本 敦美	日本ソフトウェアマネジメント株式会社 事業推進部
	萩原 久	日本電気株式会社 第二官公ソリューション事業部
	橋谷田 真樹	関西医科大学 医学部 法医学講座
	正岡 哲治	(国)水産研究・教育機構 増養殖研究所

#### 2) 妥当性検証検査の手順

妥当性検証検査は、提供された品種識別マニュアルに記載されている品種識別マーカーを用いて記載品種の一部について検査を行い、品種識別マーカー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、適宜修正を求めた。

これと共に、マニュアル完成時の自己検証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) 検体収集

依頼元より、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、基準品種のDNAおよび検証用検体の提供を受けた。

#### (3) 検証機関の選定と検査の実施

品種識別および品種内多型の検査を実施する検証機関を決定した。DNA鑑定学会が定めた「DNA鑑定提供までのジョブフローと規則」（添付資料1）に従って、複数機関として2機関を選定した。依頼元より提供された検証用検体をこれらの機関に配布し、検証機関毎に品種識別マーカーの妥当性検証のための検査を実施した。

#### (4) 実施報告書の作成

各検証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。これを各妥当性検討委員にメール添付で送付し、メール会議による検討を依頼した。欠席者1名を除く計5名の検討結果を受けて報告書原案を改良し、正式な報告書を作成した。

### 3. 実施内容

#### 1) 妥当性検証検査の受入れ

妥当性検証検査を受け入れる際に、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

霜降りひらたけ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として、妥当性検証検査の受入を実施した。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。

なお、ホクト株式会社より提出された品種識別マニュアルは、同一のDNA検体につき3回の反復検査を行い、1検体の品種を判定することとなっている。しかし今回の検証にあたっては、時間と予算の制限から、同一のDNA検体については、品種識別用の検体は各2回ずつ、多型検査用の検体は各1回ずつ検査を行うこととした。このため、今回の検証は、その部分のみが本来の品種識別マニュアル(ver.1.5)と異なる、反復のない記載のマニュアルVer.1.8（添付資料2）に基づいて行った。

##### (2) マーカー開発元の最終的な自己検証

依頼元であるホクト株式会社によれば、品種識別検査の自己検証としては、マニュアル記載の全品種について、

① DNA抽出後3回の（PCR→フラグメント解析→判定）の反復検査

② 3名独立での（DNA抽出→PCR→フラグメント解析→判定）の検査を各1回ずつ行ったとのことであった。

### (3) 検体収集

品種識別検査を実用的なものとするため、基準品種 DNA、生産者株検体および品種内多型調査用検体の三種類を収集した。基準品種 DNA は、マニュアル作成者である依頼元から、基準品種より抽出した DNA が提供された。これを基準として、生産者株検体の識別検査、及び品種内多型調査用検体を用いた基準品種の同一品種内における多型頻度の調査を行った。

なお、生産者株検体および品種内多型検査用検体のすべては、各々の品種名情報と共に、マニュアル作成元かつ本検証の依頼元であるホクト株式会社より提供されたものである。したがって、生産者株検体も生産者や市場から直接当学会に提供されたものではなく、実際に市場に出回っているものと同一である保証はない。

### (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2機関を選定した。

#### ① 検証機関選定の手順

機関数 : 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3.5 認証率の項の規定に従い、複数2機関とした。

選定条件: ISO9001 または遺伝子検査関連の 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定は、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	ビジョンバイオ株式会社	ISO 17025 (遺伝子組換え大豆検査)
2	株式会社ファスマック	ISO 17025 (遺伝子組換えトウモロコシ検査)

### (5) 検査の実施

提供された生産者株検体に、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検体番号を付与した。それらの検体を各検証機関に送付して、検証検査を行った。同時に、品種内多型調査用検体も各検証機関に送付して、検証検査を行った。

### (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、報告書案を作成した。これを、事務局の手違いによる1名を除く全妥当性検討委員にメール添付で送付し、メール会議による検討を依頼した。各

委員からのメール返信による検討結果を受けて報告書案の修正を行い、これを正式報告書とした。

## DNA 分析による霜降りひらたけの 品種識別マーカーの妥当性検証検査

### 1. 妥当性検証検査の受入れ

#### 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 HOX1 号（霜降りひらたけ）のDNA品種識別マニュアル ver1.8

作成元 : ホクト株式会社

#### 2) 検体収集

ホクト株式会社より、霜降りひらたけの基準品種 1 品種の DNA ならびに生産者株検体 10 品種各 5 株、および品種内多型調査用検体 1 品種 30 株の菌糸を各 2 組ずつに分けた凍結状態で、DNA 鑑定学会に送付された。（表 3 参照）すなわち、生産者株検体および品種内多型調査用検体はすべて、同一株由来の菌糸の 2 組のセットが提供された。

表 3 検体一覧表

種別	分類	品種名	試料形態	量	入手先
霜降り ひらたけ	基準品種	HOX 1号	DNA	500ng(x2)	ホクト株式会社
	生産者株 (10品種)	HOX 1号	凍結菌糸	5株(x2)	
		MH006408		5株(x2)	
		MH006008		5株(x2)	
		ホクトPLE-2号		5株(x2)	
		PLE-3号		5株(x2)	
		PLE-5号		5株(x2)	
		菌興PE1号		5株(x2)	
		ホクトY-3		5株(x2)	
		ホクトY-5		5株(x2)	
		ふくひら1号		5株(x2)	
	品種内 多型	HOX 1号	30株(x2)		

## 2. 検証の形態

検証は、下記のように、基準品種 DNA および検体を検証機関へ配布して実施した。

### 1) 検体

#### (1) 配布内容

2 検証機関の各々に、下記の検体を配布した。

- ① 霜降りひらたけの基準品種 DNA 溶液 1 種  
(基準株 HOX1 号菌の DNA 1 チューブ、500ng DNA/ チューブ)
- ② 品種識別用の霜降りひらたけの菌糸 50 株  
(生産者株検体 10 品種の菌糸 各 5 株)
- ③ 品種内多型検査用の霜降りひらたけの菌糸 30 株  
(基準品種 HOX1 号菌の菌糸)

#### (2) 配布方法

##### ① 基準品種 DNA

ホクト株式会社から凍結状態で DNA 鑑定学会に送付された 1 品種 (HOX1 号) の DNA 溶液を、2 箇所の検証機関の全てに各 1 チューブずつ、凍結状態のまま送付した。DNA 溶液の濃度はチューブにより異なり、26.6ng/mL 及び 25.9ng/mL であった。

##### ② 品種識別用の生産者株の検体

ホクト株式会社から、10 品種各 5 株の生産者株の菌糸の検体が、凍結状態で DNA 鑑定学会に送付された。検体は DNA 鑑定学会からの指定通り、1 検体ずつ 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、凍結状態で 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、凍結状態を保ったままで、これらの菌糸検体ごとにランダムに検体番号をふり直した。学会で新たに付与した検体番号は下記の「表 4 品種識別用検体番号対応表」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検体は、DNA 鑑定学会で、新たな検体番号を持つこととなった。これら二組の各々を、凍結状態で 2 箇所の検証機関へ送付した。

表 4 品種識別用検体番号対応表

記号	品種名	株	検体番号	記号	品種名	株	検体番号
A	HOX 1号	1	6	H	PLE-5号	1	1
		2	11			2	16
		3	21			3	23
		4	25			4	31
		5	47			5	41
D	MH006408	1	8	I	菌興PE1号	1	5
		2	9			2	14
		3	10			3	24
		4	15			4	34
		5	29			5	49
E	MH006008	1	2	J	ホクトY-3	1	4
		2	20			2	18
		3	28			3	27
		4	32			4	38
		5	33			5	43
F	ホクトPLE-2号	1	3	K	ホクトY-5	1	13
		2	12			2	19
		3	17			3	35
		4	26			4	42
		5	39			5	44
G	PLE-3号	1	22	L	ふくひら1号	1	7
		2	37			2	30
		3	40			3	36
		4	46			4	45
		5	48			5	50

③ 品種内多型検査用の検体

多型検査用の検体については、ホクト株式会社から、基準品種 1 種 (HOX1 号菌) の菌糸状態の検体 2 組各 30 個が、1 検体ずつ 2ml のマイクロチューブに密封され、凍結状態で DNA 鑑定学会に送付された。DNA 鑑定学会において、凍結状態を保持して 2 組各 30 検体に 1~30 の番号をふり、同一構成の検査用検体 2 組を作成して、各組を凍結状態で 2 箇所の検証機関の各々へ送付した。

2) 「SSR マーカーによる HOX1 号 (霜降りひらたけ) の DNA 品種識別マニュアル Ver1.8」 (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) 霜降りひらたけの検査項目

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)

霜降りひらたけの検査項目(1機関分)					
種類別	品種名	形態	量	実験	
				繰り返し数	総実験数
基準品種	HOX 1号 (基準株)	DNA	500ng	依頼元から提供	
生産者株		凍結菌糸	50サンプル	2回(*1)	100
品種内多型調査株	HOX 1号 (基準株)	凍結菌糸	30株	1回	30

品種識別マーカー:8種類(マニュアルに配列情報記載)  
\*1:凍結菌糸から抽出したDNAを2分割し、PCR増幅以降の工程を2回行う。

4) 霜降りひらたけ検査結果記入票

検証機関が検査結果を記入する結果記入票を 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

依頼元から提供された「SSR マーカーによる HOX1 号(霜降りひらたけ)の DNA 品種識別マニュアル Ver1.8」(添付資料 2)中の「表 4. 12 品種、8 SSR マーカーのフラグメント値」を、DNA 鑑定学会において、検査のための参照用にフラグメントごとの数値表に作成し直した(「表 6 品種識別マーカーのサイズ表」)。各マーカーにはそれぞれ 2 本ずつのフラグメントが含まれることが、マニュアル作成元により確認されているため、一つのマーカーの同一サイズのフラグメントについても、2つの数字を記載している。

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。

なお、検査手法については、各検証機関に「SSR マーカーによる HOX1 号(霜降り

ひらたけ)の品種識別マニュアル」(添付資料 DNA 2)は送付したものの、各検証機関が実際に使用した手法は尋ねないという DNA 鑑定学会事務局員の決定により、本検査で使用された検査手法は不明である。過去の例に鑑みると、検証機関毎に、提供されたマニュアルの手法ではなく、より適切と思われる手法で検査を行った場合が多々見られたとのことであった。実用に供された手法が不明である以上、提供された個々のマーカーの評価は可能であるが、提供されたマニュアルの評価はできない。このため、本報告書は、マーカーの評価のみに関するものとならざるを得ない。

表 6 品種識別マーカーのサイズ表

No.	品種名	SSRマーカー															
		F4		F5		F6M1RC		H6		Sca0903		Sca0707		Sca0101		Sca0502	
1	HOX 1号	125	131	145	145	142	154	133	151	168	168	143	149	193	193	100	108
2	MH006393	125	131	145	175	142	142	133	139	168	168	143	149	193	199	104	108
3	MH006407	125	131	127	145	142	154	133	133	168	168	143	143	193	193	100	108
4	MH006408	125	131	145	175	142	154	133	151	162	168	143	149	193	193	100	108
5	MH006008	125	125	175	175	154	154	139	151	162	162	149	149	193	193	100	100
6	ホクトPLE-2号	131	131	127	145	142	142	133	133	168	168	143	143	193	199	108	108
7	PLE-3号	131	131	145	145	142	142	133	133	168	168	143	143	193	199	108	120
8	PLE-5号	131	131	127	145	142	142	133	133	168	168	143	143	193	199	108	120
9	菌興PE1号	131	131	127	145	142	142	133	133	168	168	143	143	193	193	108	108
10	ホクトY-3	125	125	175	205	148	154	139	151	162	162	149	149	193	193	96	100
11	ホクトY-5	125	125	181	193	142	154	133	139	162	162	149	155	193	193	100	100
12	ふくひら1号	125	131	187	205	142	142	145	145	162	168	149	149	193	193	100	100

## 2) 霜降りひらたけの検査結果

検証機関による霜降りひらたけの検査結果を DNA 鑑定学会が回収し、検体のブラインド化情報と突き合わせて、正答率その他の解析を行った。

### (1) 品種識別結果

詳細なデータは、添付資料 3「霜降りひらたけ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。

まず品種名について、検査全数に対する正答率の集計結果を下記表 7 に示した。

品種名の回答は、全体として、回答率 98%、未答率 2%であり、回答中の正答率は 100%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%というかなり高い数値であった。

この結果からみると、提供されたマニュアルに記載されたマーカーセットは、今回提供された 10 品種の霜降りひらたけについて、かなり正確に品種を識別可能であ

ると考えられるが、検証機関の検査環境や検査の機器・手法、担当者の習熟度等により、検査精度が影響を受ける場合のあることが伺える。

表7 品種名正答率

品種名	F社					V社					Total				
	検体数	検査 反復数	検査 総数	正答数	正答率	検体数	検査 反復数	検査 総数	正答数	正答率	検体数	検査 反復数	検査 総数	正答数	正答率
HOX 1号	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	4	20	20	100%
MH006408	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	4	20	20	100%
MH006008	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	4	20	20	100%
ホクT-2号	5	2	10	10	100%	5	2	10	8	80%	5	4	20	18	90%
PLE-3号	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	4	20	20	100%
PLE-5号	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	4	20	20	100%
菌興PE1号	5	2	10	10	100%	5	2	10	8	80%	5	4	20	18	90%
ホクY-3	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	4	20	20	100%
ホクY-5	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	4	20	20	100%
ふくひら1号	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	4	20	20	100%
全体	50	2	100	100	100.0%	50	2	100	96	96.0%	50	4	200	196	98.0%

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2本のフラグメントを検出する計8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1,600本ずつ、全体で3,200本のフラグメントのサイズ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	F社	V社	全体
マーカー数	8	8	8
マーカー毎検査フラグメント数	2	2	2
検体数	50	50	100
検体毎検査回数	2	2	2
総検査マーカー数	1600	1600	3200

これらの数にもとづき、各検体について、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以内をそれぞれサイズ一致と見做す4段階に分け、別々にサイズ一致に関する集計を行った。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 許容範囲別の品種毎のマーカサイズ一致率

品種名	マーカ総数	許容範囲	マーカサイズ一致数			マーカサイズ一致率		
			F社	V社	平均	F社	V社	平均
HOX 1号	160	±0	150	135	142.5	94%	84%	89%
		±1	159	160	159.5	99%	100%	100%
		±2	159	160	159.5	99%	100%	100%
		±3	159	160	159.5	99%	100%	100%
MH006408	160	±0	140	119	129.5	88%	74%	81%
		±1	160	160	160	100%	100%	100%
		±2	160	160	160	100%	100%	100%
		±3	160	160	160	100%	100%	100%
MH006008	160	±0	130	126	128	81%	79%	80%
		±1	149	149	149	93%	93%	93%
		±2	149	149	149	93%	93%	93%
		±3	149	149	149	93%	93%	93%
ホクト PLE-2号	160	±0	130	118	124	81%	74%	78%
		±1	160	154	157	100%	96%	98%
		±2	160	154	157	100%	96%	98%
		±3	160	154	157	100%	96%	98%
PLE-3号	160	±0	130	118	124	81%	74%	78%
		±1	160	141	150.5	100%	88%	94%
		±2	160	141	150.5	100%	88%	94%
		±3	160	141	150.5	100%	88%	94%
PLE-5号	160	±0	121	111	116	76%	69%	73%
		±1	160	160	160	100%	100%	100%
		±2	160	160	160	100%	100%	100%
		±3	160	160	160	100%	100%	100%
菌興PE1号	160	±0	136	130	133	85%	81%	83%
		±1	156	150	153	98%	94%	96%
		±2	156	150	153	98%	94%	96%
		±3	156	150	153	98%	94%	96%
ホクト Y-3	160	±0	136	133	134.5	85%	83%	84%
		±1	160	160	160	100%	100%	100%
		±2	160	160	160	100%	100%	100%
		±3	160	160	160	100%	100%	100%
ホクト Y-5	160	±0	111	122	116.5	69%	76%	73%
		±1	160	160	160	100%	100%	100%
		±2	160	160	160	100%	100%	100%
		±3	160	160	160	100%	100%	100%
ふくひら1号	160	±0	134	138	136	84%	86%	85%
		±1	160	160	160	100%	100%	100%
		±2	160	160	160	100%	100%	100%
		±3	160	160	160	100%	100%	100%
平均	160	±0	131.8	125	128.4	82.4%	78.1%	80.3%
		±1	158.4	155.4	156.9	99.0%	97.1%	98.1%
		±2	158.4	155.4	156.9	99.0%	97.1%	98.1%
		±3	158.4	155.4	156.9	99.0%	97.1%	98.1%

全体を平均して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80.3%、±1、±2、±3にとるといずれも98.1%となり、許容範囲がなくても比較的高い値ではあるが、少しでも許容範囲を設けると、さらに高い値となった。品種毎に正解率の違いが多少見られ、±3まで許容範囲を広げても一致率が100%には至らない品種は、MH006008、ホクトPLE-2号、PLE-3号、菌興PE1号であったが、いずれの場合も、許容範囲を±1以上取った場合には、9割以上の一致率を示した。また、許容範囲を±1以上取った場合に検証機関相互の一致率に大きな相違が認められたのは、PLE-3号のみ(12%)であった。

この結果から、品種名の回答結果の傾向と同様に、検証機関の検査環境や検査の機器・手法、担当者の習熟度等により検査精度が影響を受け、そのことがマーカー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記載されたマーカーセットを用いて、今回対象とした10種類の霜降りひらたけ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。

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サイズ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ーサイズ一致率が一挙に高くなる傾向が見られた。

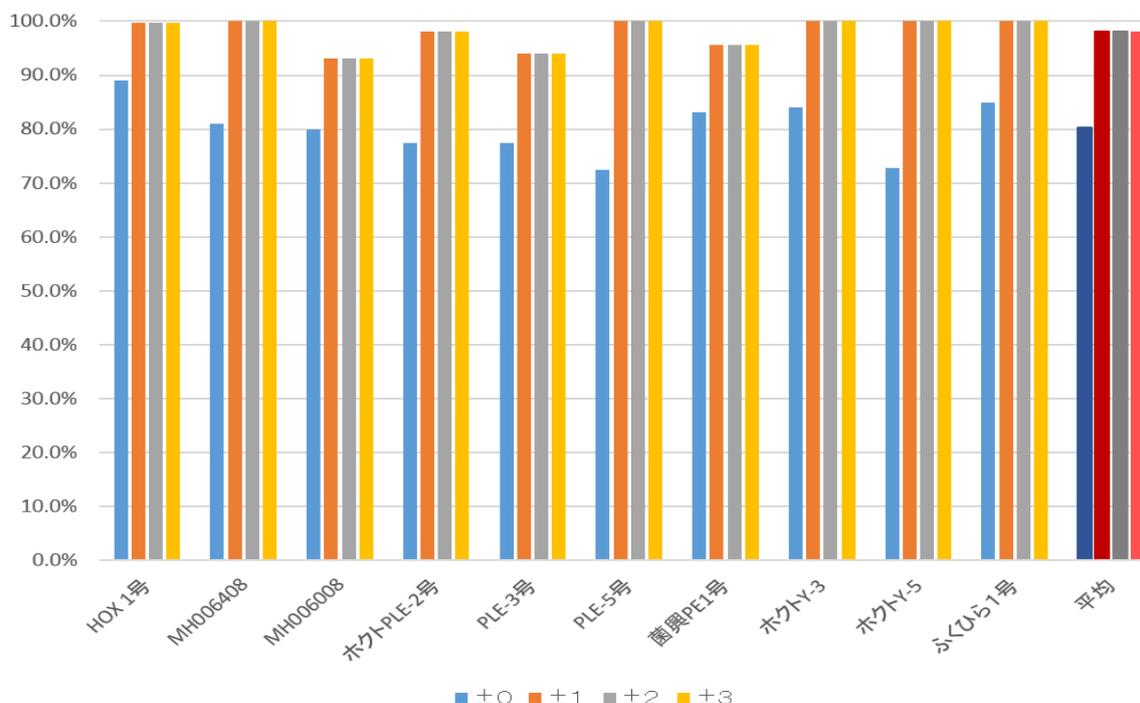


図1 正解の許容範囲と品種毎のマーカーサイズ一致率の関係

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ー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、ここでも、正解の許容範囲を設けるとマーカーサイズ一致率が高くなる傾向が明確に見られた。

各品種におけるマーカーサイズの一致率のパターンには、検証機関相互の間に大きな相違は見られなかった。



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、各検体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。(詳細なデータは、添付資料5「品種毎マーカー毎のサイズ的一致数と一致率」参照のこと。)

全体として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80.3%とあまり高くないが、±1、±2、±3にとるといずれも98.1%であり、かなり高かった。検証機関相互のマーカーサイズ一致率の平均値の違いは、許容範囲を±0にとると4.3%、±1、±2、±3のいずれにとった場合も1.9%と比較的小さかった。

また、F6M1RCの短い方、Sca0707の長い方、Sca0101の短い方、Sca0502の短い方の4種のマーカーのサイズは、正解の許容範囲を±3まで広げても、両方の検証機関で一致率が100%にはならなかった。

この結果からみると、先に指摘したように、提供されたマニュアルに記載されたマーカーセットは、今回提供された10品種の霜降りひらたけについて、かなり正確に品種を識別可能であると考えられる。一方で、完璧な検査精度が得られないマーカーもあることから、検証機関の検査環境や検査の機器・手法、担当者の習熟度等が検査結果に影響を及ぼさないような改良の余地があるかもしれない。

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	検証機関	マーカー																
		F4		F5		F6M1RC		H6		Sca0903		Sca0707		Sca0101		Sca0502		全体
±0	F社	100	100	30	68	98	100	100	100	100	100	91	80	0	70	98	83	1318
	V社	100	100	16	57	84	98	100	87	97	100	97	82	0	70	91	71	1250
	全体	200	200	46	125	182	198	200	187	197	200	188	162	0	140	189	154	2568
±1	F社	100	100	100	100	98	100	100	100	100	100	90	98	100	98	100	1584	
	V社	100	100	100	100	84	100	100	100	97	100	90	92	94	99	98	1554	
	全体	200	200	200	200	182	200	200	200	197	200	200	180	190	194	197	198	3138
±2	F社	100	100	100	100	98	100	100	100	100	100	90	98	100	98	100	1584	
	V社	100	100	100	100	84	100	100	100	97	100	90	92	94	99	98	1554	
	全体	200	200	200	200	182	200	200	200	197	200	200	180	190	194	197	198	3138
±3	F社	100	100	100	100	98	100	100	100	100	100	90	98	100	98	100	1584	
	V社	100	100	100	100	84	100	100	100	97	100	90	92	94	99	98	1554	
	全体	200	200	200	200	182	200	200	200	197	200	200	180	190	194	197	198	3138

B. マーカーサイズ一致率

許容範囲	検証機関	マーカー																
		F4		F5		F6M1RC		H6		Sca0903		Sca0707		Sca0101		Sca0502		全体
±0	F社	100%	100%	30%	68%	98%	100%	100%	100%	100%	100%	91%	80%	0%	70%	98%	83%	82.4%
	V社	100%	100%	16%	57%	84%	98%	100%	87%	97%	100%	97%	82%	0%	70%	91%	71%	78.1%
	平均	100%	100%	23%	63%	91%	99%	100%	94%	99%	100%	94%	81%	0%	70%	95%	77%	80.3%
±1	F社	100%	100%	100%	100%	98%	100%	100%	100%	100%	100%	90%	98%	100%	98%	100%	100%	99.0%
	V社	100%	100%	100%	100%	84%	100%	100%	100%	97%	100%	90%	92%	94%	99%	98%	98%	97.1%
	平均	100%	100%	100%	100%	91%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	90%	95%	97%	99%	99%	98.1%
±2	F社	100%	100%	100%	100%	98%	100%	100%	100%	100%	100%	90%	98%	100%	98%	100%	100%	99.0%
	V社	100%	100%	100%	100%	84%	100%	100%	100%	97%	100%	90%	92%	94%	99%	98%	98%	97.1%
	平均	100%	100%	100%	100%	91%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	90%	95%	97%	99%	99%	98.1%
±3	F社	100%	100%	100%	100%	98%	100%	100%	100%	100%	100%	90%	98%	100%	98%	100%	100%	99.0%
	V社	100%	100%	100%	100%	84%	100%	100%	100%	97%	100%	90%	92%	94%	99%	98%	98%	97.1%
	平均	100%	100%	100%	100%	91%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	90%	95%	97%	99%	99%	98.1%

## (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、HOX1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、同一の株由来の菌糸が二分されて各2mLの検体チューブに密封された計30組のHOX1号の菌糸検体が、冷凍状態でDNA鑑定学会宛てに配送された。DNA鑑定学会で各組の検体毎に1番から30番までの続き番号を付し、それぞれの組の検体を2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 霜降りひらたけ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11に示した。

表11 HOX1号の品種内多型検査のマーカサイズ一致状況

正解 許容範囲	最大一致 マーカ数	平均マーカサイズ一致数			平均マーカサイズ一致率		
		B社	F社	平均	B社	F社	平均
±0	16	14.2	15	14.6	88.8%	93.8%	91.3%
±1	16	16	16	16	100.0%	100.0%	100.0%
±2	16	16	16	16	100.0%	100.0%	100.0%
±3	16	16	16	16	100.0%	100.0%	100.0%

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91.3%、±1、±2、±3をとると100%と、かなり高い値となった。

この結果から、今回検査対象となった30検体の中では提供されたマーカセットのサイズにばらつきはなく、塩基鎖長の多型は見られなかったと言える。したがって、今回提供されたマーカセットは、HOX1号の同定を精度よく行えるものと考えられる。

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 正解許容範囲毎の品種内多型検査結果」参照のこと。

次に、マーカ毎のサイズ一致状況を表12に示した。

マーカサイズの一致率は、正解の許容範囲を±0に取った場合に、2つの検証機関の両方で、Sca0101の短い方のサイズがまったく一致しなかったが、許容範囲を±1、±2、±3と広げると、すべてのマーカについて完全に正解と一致し、表11の結果をよく裏付けていた。

表 1 2 品種内多型検査におけるマーカー毎のサイズ一致状況

A. マーカーサイズ一致数

許容範囲	検証機関	マーカー																
		F4		F5		F6M1RC		H6		Sca0903		Sca0707		Sca0101		Sca0502		全体
±0	Ｂ社	30	30	18	30	30	28	30	24	30	30	30	30	0	30	30	26	426
	Ｆ社	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	0	30	30	30	450
	合計	60	60	48	60	60	58	60	54	60	60	60	60	0	60	60	56	876
±1	Ｂ社	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	480
	Ｆ社	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	480
	合計	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	960
±2	Ｂ社	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	480
	Ｆ社	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	480
	合計	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	960
±3	Ｂ社	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	480
	Ｆ社	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	480
	合計	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	960

B. マーカーサイズ一致率

許容範囲	検証機関	マーカー																
		F4		F5		F6M1RC		H6		Sca0903		Sca0707		Sca0101		Sca0502		平均
±0	Ｂ社	100%	100%	60%	100%	100%	93%	100%	80%	100%	100%	100%	100%	0%	100%	100%	87%	88.8%
	Ｆ社	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	100%	100%	100%	93.8%
	全体	100.0%	100.0%	80.0%	100.0%	100.0%	96.7%	100.0%	90.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	0.0%	100.0%	100.0%	93.3%	91.3%
±1	Ｂ社	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100.0%
	Ｆ社	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100.0%
	全体	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
±2	Ｂ社	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100.0%
	Ｆ社	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100.0%
	全体	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
±3	Ｂ社	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100.0%
	Ｆ社	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100.0%
	全体	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

次に、マーカーの一致率を図 3 に示した。各マーカーには 2 本のフラグメントが含まれるため、マーカー毎に短い方のフラグメントを 1、長い方のフラグメントを 2 として、2 つの検証機関それぞれ 30 検体分のマーカーフラグメントごとの一致率の平均値をグラフに描いた。これを見ても、フラグメントサイズの正解の許容範囲が ±0 の場合は、フラグメントにより正解値が 100%にならないものもあるが、許

容範囲を±1より大きく取った場合は、すべてのマーカーフラグメントでサイズが一致していることがわかる。このグラフからも、表11の結果を確認でき、今回提供されたマーカーセットは、HOX1号の同定を精度よく行えるものと考えられる。

正解の許容範囲を±0とした場合に、必ずしもすべての検体でマーカーサイズが正解値と一致しなかった原因は、検証機関毎の検査環境や検査の機器・手法、検査者個々の習熟度等の相違に起因するものと思われ、このような検査において、それらの要因を考慮して適切な正解範囲を設定することの必要性が再確認された結果となった。

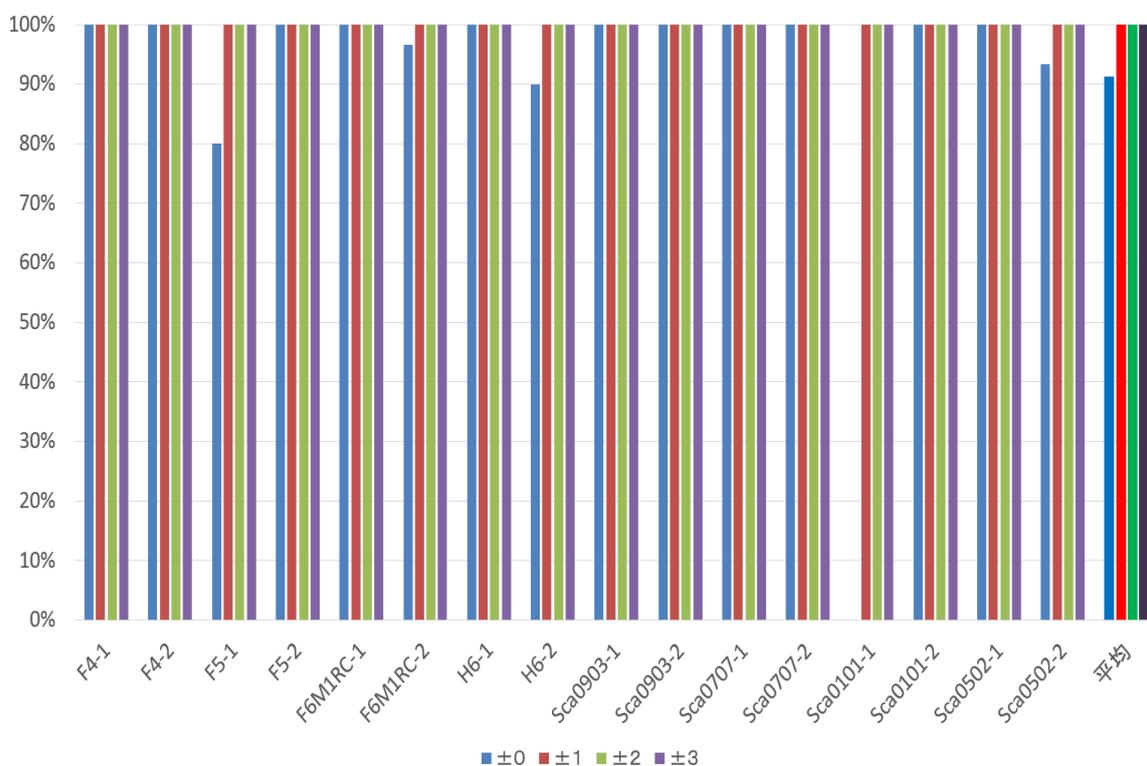


図3 品種内多型調査におけるマーカー毎のサイズ一致率

#### 4. 「SSRマーカーによる HOX1 号（霜降りひらたけ）のDNA品種識別マニュアル Ver1.8」に記載された品種識別用マーカーの妥当性評価

霜降りひらたけの品種識別検査用に提供されたマーカーの評価を行うため、このマーカーを用いて、2か所の検証機関で下記2種の検査を行った。

- 1) 50検体の霜降りひらたけ菌糸のブラインドの品種識別検査
- 2) 基準品種としてのHOX1号30検体を用いた品種内多型検査

1) の結果は以下のようであった。

- ① 50検体の品種名の正答率は98%であり、2%は未回答であった。
- ② 50検体の品種名の正答率は、品種に関わらず90%以上と高かった。
- ③ マーカーサイズの一致率は、正解の許容範囲のDNA鎖長を±0にとった場合は80.3%、±1、±2、±3にとった場合はいずれも98.1%と高かった。
- ④ 品種毎のマーカーサイズの一致率は、正解の許容範囲のDNA鎖長を±0にとった場合は73%~89%、±1、±2、±3にとった場合はいずれも93%~100%とややばらついたが、±1、±2、±3にとった場合は高かった。
- ⑤ マーカー毎のサイズの一致率は、正解の許容範囲のDNA鎖長を±0にとった場合は0%~100%と大きくばらついたが、±1、±2、±3にとった場合はいずれも90%~100%と高かった。

2) の結果は以下のようであった。

- ① 30検体の検体毎のマーカーサイズの一致率は、正解の許容範囲のDNA鎖長を±0にとった場合は84.4%~93.8%とややばらついたが、±1、±2、±3にとった場合はすべて100%であった。
- ② マーカー毎のサイズの一致率は、正解の許容範囲のDNA鎖長を±0にとった場合は0%~100%と大きくばらついたが、±1、±2、±3にとった場合はすべて100%であった。

2種の検査のいずれにおいても、2か所の検証機関の間で検査結果に大きな差は見られなかった。

以上のことから、本検証試験に提示されたマーカーは、30検体の検査範囲では品種内多型も見られず安定したマーカーであり、今回品種識別を行った10品種各5株の霜降りひらたけの識別には極めて有用であると言える。ただし、HOX1号以外の品種については、今回検査対象とした品種は各5株を検査したに過ぎない。このため、今回の検査対象となっていない品種も含め、今回提示されたマーカーの各品種内の多型頻度は不明である。今回提示され

たマーカーによる実用検査に当たっては、その点に留意すべきである。

また、前述のように、正解の許容範囲を±0とした場合に、必ずしもすべての検体でマーカーサイズが正解値と一致しなかった原因は、検証機関毎の検査環境や検査の機器・手法、検査者個々の習熟度等の相違に起因するものと思われることから、このような検査において、それらの要因を考慮して適切な正解範囲を設定する必要性が再確認された。

以上

