

事業実施報告書

りんごのDNA品種識別の妥当性の検証

平成 31 年 3 月 12 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 分析によるりんごの品種識別マーカ－の 妥当性検証方法の決定	4
DNA 分析によるりんごの品種識別マーカ－の 妥当性検証検査	8

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－による長野県育成りんご品種の DNA 品種識別マニュアル
3. 長野県育成りんご品種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. 品種毎マーカ－毎のマーカ－サイズ的一致数と一致率
5. 長野県育成りんご品種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. 検体毎正解許容範囲毎の品種内多型検査結果
7. マーカ－毎正解許容範囲毎の品種内多型検査結果のマーカ－一致状況

1) DNA 品種識別マーカーの妥当性の検証実施の概要

1. 目的

H30 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、長野県農業試験場知的財産管理部が作成した「SSRマーカーによる長野県育成りんご品種の DNA 品種識別マニュアル」に記載された品種識別用マーカーについて、記載されたりんご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ーの妥当性検証方法等の決定

りんごの品種識別マニュアルに記載されているマーカーにつき、平成 20 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)：-SSR について-」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、マーカー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及び技術の妥当性の検証

りんご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、マーカー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 品種識別マーカーの妥当性の検証実施の概要
- 2) DNA 分析によるりんごの品種識別マーカーの妥当性検証方法の決定
- 3) DNA 分析によるりんごの品種識別マーカーの妥当性検証検査

2) DNA分析によるりんご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) りんごのDNA品種識別手法における妥当性検証方法の決定

(2) りんごの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、委員会を開催して検証結果を検討して、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
	久原 哲	九州大学 名誉教授
	辻本 敦美	日本ソフトウェアマネジメント検体株式会社 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	(国研)水産研究・教育機構 増養殖研究所 育種研究センター

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、品種識別検査及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 及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

品種識別及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 3 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検証機関に配布し、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予めメール添付で送付した後、妥当性委員会を開催して報告書原案を検討した。1名のメールによる意見参加を加えた全6名による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

りんご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。

(2) マーカー開発元の最終的な自己検証

依頼元である長野県農業試験場知的財産管理部によれば、品種識別検査の自己検証は以下のとおり行ったとのことであった。

- ① マニュアル記載の全品種を含む 56 品種について、最低 2 回の反復検査により 14 種類のマーカーによる遺伝子型の決定及び再現性の確認を行った。
- ② 遺伝子型決定の翌年に、今回供試の 12 品種について、解析結果を再検証した。
- ③ 下記 6 品種については、親子鑑定の結果確認も行った。
 - シナノゴールド（ゴールドデンドリシャス×千秋）

- シナノスイート（ふじ×つがる）
- シナノドルチェ（ゴールドデンデリシャス×千秋）
- 秋映（千秋×つがる）
- つがる（ゴールドデンデリシャス×紅玉）
- シナノリップ（千秋×シナノレッド）

(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、試験品種検体及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、長野県果樹試験場栽培部から、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、試験品種検体の識別検査、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、試験品種検体及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、長野県果樹試験場栽培部より提供されたものである。したがって、試験品種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検証機関を決定した。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：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3機関とした。

選定条件：ISO17025 を取得している機関。（認証項目は問わない）

② 選定した検証機関：機関名及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 検証機関一覧

項番	機関名	ISO 認定項目
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	検体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)
3	株式会社 LSI メディエンス 食品検査センター	ISO 17025 (サルモネラ属菌、リステリア・モノサイトゲネス)

(5) 検査の実施

提供された試験品種検体に、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

各検証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、事務局から全妥当性検討委員にメール添付で送付した後、妥当性検討委員会を開催して同報告書案の内容につき検討を行った。この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。

3) DNA 分析によるりんご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マーカーによる長野県育成りんご品種のDNA品種識別マニュアル
作成元：長野県農業試験場知的財産管理部

2) 検体収集

長野県農業試験場知的財産管理部より、長野県果樹試験場栽培部から提供されたりんごの基準品種1品種のDNA及び試験品種検体12品種各15検体、並びに品種内多型調査用検体1品種90検体の葉片が、いずれも凍結状態でDNA鑑定学会に送付された。(表3参照)従って今回の検体は、市販のりんごが収穫された樹木より採取されたものではなく、市販品種の試験結果が今回の結果と一致するか否かは不明である。

なお、表中の「試料の内訳」欄に記載したように、品種により葉片を採取した樹木の数が異なっている。当初、DNA鑑定学会事務局は、全ての検査検体が異なる樹木由来であることを希望した。しかし、長野県果樹試験場栽培部が提供可能であった品種の中に樹木数が15未満の品種があったため、DNA鑑定学会事務局が表3に示した採取法を取ることを決定し、表3に従った検体採取が行われた。

表3 検体一覧表

分類	品種名	試料形態	量	試料の内訳
基準品種	シナノゴールド	ゲノムDNA	500ng × 3	試験品種の樹木15本のうちの樹木1本から採取した1枚の葉から抽出
試験品種検体 (12品種)	シナノゴールド	凍結葉片	15	樹木15本から各1枚の葉を採取
	シナノスイート		15	樹木15本から各1枚の葉を採取
	シナノドルチェ		15	樹木5本から各3枚の葉を採取
	シナノリップ		15	樹木15本から各1枚の葉を採取
	秋映		15	樹木15本から各1枚の葉を採取
	王林		15	樹木5本から各3枚の葉を採取
	ぐんま名月		15	樹木3本から各5枚の葉を採取
	紅玉		15	樹木15本から各1枚の葉を採取
	ゴールデンデリシャス		15	樹木3本から各5枚の葉を採取
	千秋		15	樹木3本から各5枚の葉を採取
	つがる		15	樹木15本から各1枚の葉を採取
	ふじ		15	樹木15本から各1枚の葉を採取
品種内多型 調査検体	シナノゴールド		90	樹木90本より各1枚の葉を採取

2. 検証の形態

検証は、下記のように、基準品種 DNA 及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

3 検証機関の各々に、下記の検体を配布した。

- ① りんごの基準品種 DNA 溶液 1 種
(基準品種シナノゴールドの DNA 1 チューブ、500ng DNA / チューブ)
- ② 品種識別用のりんごの葉片 60 検体
(試験品種検体 12 品種の葉片)
- ③ 品種内多型検査用のりんごの葉片 30 検体
(基準品種シナノゴールドの葉片)

(2) 配布方法

① 基準品種 DNA

長野県農業試験場知的財産管理部から凍結状態で DNA 鑑定学会に送付された 1 品種 (シナノゴールド) の DNA 溶液を、3 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 1 チューブごとに異なり、それぞれ 6.6 ng/ μ L、7.1 ng/ μ L、及び 7.2 ng/ μ L であった。チューブごとの濃度が異なることから、各チューブの DNA はそれぞれ独立に抽出されたものと思われる。

② 品種識別試験用の検体

長野県農業試験場知的財産管理部から、12 品種各 15 検体ずつの試験品種の葉片が、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 1.5 ml のマイクロチューブに密封され、品種毎または由来する樹木毎にまとめて密封袋に入れられて、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、下記に示すように分けた。すなわち、

(i) DNA 鑑定学会事務局の決定により、1 検証機関が品種識別試験を行う検体数は、12 品種各 5 検体ずつの計 60 検体とされている。そこでまず、検体番号 1~60 を、これら 12 品種各 5 検体にランダムに割り当て、これをブラインド化検体番号とした (表 4 参照)。

(ii) 検証機関は 3 機関であり、それぞれがブラインド化検体番号 1~60 の 60 検体の試験を行う。このため、各ブラインド化検体番号に相当する検体は、

3 機関分の 3 検体ずつ必要となる。しかし、表 3 に示したように、品種により検体採取した樹木数が異なり、3 か所の検証機関に配布する検体の内容を全く同等にすることが不可能なため、可能な限り同等となるよう、以下の作業により検体を分けた。

- (iii) 検体採取した樹木数が 15、即ち該当品種の検体の由来する樹木がすべて異なる品種（シナノゴールド、シナノスイート、シナノリップ、秋映、紅玉、つがる、ふじの 7 品種、表 3 参照）については、同一品種の 15 検体をランダムに 3 検体ずつ 5 組に分け、各組にブラインド化検体番号を割り当てて、同一のブラインド化検体番号を付した 3 検体をそれぞれランダムに A、B、C の検体グループに振り分けた（表 4 参照）。従って、これらの品種については、同一のブラインド化検体番号を有する検体同士でも、品種は同一だが由来する樹木は異なる。
- (iv) 検体採取した樹木数が 5 の品種（シナノドルチェ、王林の 2 品種、表 3 参照）については、同一品種の 15 検体を、同一樹木に由来する 3 検体ずつ 5 組に分け、各組にブラインド化検体番号を割り当てて、同一のブラインド化検体番号を付した 3 検体をそれぞれランダムに A、B、C の検体グループに振り分けた（表 4 参照）。従って、これらの品種については、同一のブラインド化検体番号を有する検体同士は、品種も由来する樹木も同一である。
- (v) 検体採取した樹木数が 3 の品種（ぐんま名月、ゴールデンデリシャス、千秋の 3 品種、表 3 参照）については、同一品種の同一樹木に由来する 5 検体を、2 検体、2 検体、1 検体の 3 群に分けた。こうしてできた 3 樹木由来各 3 群の検体群を、全体数が均等になるように A、B、C の 3 グループに振り分けた（表 4 参照）。従って、これらの品種については、同一のブラインド化検体番号を有する検体同士で、品種も由来する樹木も同一のものと、品種は同一だが由来する樹木は異なるものが混在する。
- (vi) 上記のようにして、1～60 のブラインド化検体番号をもつ検体が 3 検体ずつ、検体毎にそれぞれ A、B、C の検体グループに割り当てられて分類された（表 4 参照）。これらの検体を A、B、C のグループ毎にまとめると、1～60 のブラインド化検体番号を持つ検体を 1 つずつ含む計 60 検体からなる A、B、C の 3 組の検体グループができる。
- (vii) 上記の A、B、C の 3 つの検体グループのそれぞれを、品種識別試験用検体として、凍結状態を維持して 3 か所の検証機関に送付した。

表4 品種識別試験用検体の内訳

品種	通し番号	樹木番号	ブライント比 検体番号	検体グループ 記号	品種	通し番号	樹木番号	ブライント比 検体番号	検体グループ 記号	品種	通し番号	樹木番号	ブライント比 検体番号	検体グループ 記号
シナノ ゴールド	1	1	12	A	秋映	1	1	13	A	ゴールデン デリシヤス	1	1	11	A
	2	2		B		2	2		B		2	1		B
	3	3		C		3	3		C		3	1		C
	4	4	17	A		4	4	22	A		4	1	14	A
	5	5		B		5	5		B		5	1		B
	6	6		C		6	6		C		6	2		C
	7	7	21	A		7	7	29	A		7	2	23	A
	8	8		B		8	8		B		8	2		B
	9	9		C		9	9		C		9	2		C
	10	10	36	A		10	10	34	A		10	2	35	A
	11	11		B		11	11		B		11	3		B
	12	12		C		12	12		C		12	3		C
	13	13	45	A		13	13	46	A		13	3	39	A
	14	14		B		14	14		B		14	3		B
	15	15		C		15	15		C		15	3		C
シナノ スイート	1	1	6	A	玉林	1	1	8	A	千秋	1	1	4	A
	2	2		B		2	1		B		2	1		B
	3	3		C		3	1		C		3	1		C
	4	4	7	A		4	2	24	A		4	1	18	A
	5	5		B		5	2		B		5	1		B
	6	6		C		6	2		C		6	2		C
	7	7	48	A		7	3	33	A		7	2	25	A
	8	8		B		8	3		B		8	2		B
	9	9		C		9	3		C		9	2		C
	10	10	55	A		10	4	49	A		10	2	47	A
	11	11		B		11	4		B		11	3		B
	12	12		C		12	4		C		12	3		C
	13	13	58	A		13	5	53	A		13	3	57	A
	14	14		B		14	5		B		14	3		B
	15	15		C		15	5		C		15	3		C
シナノ ドルチェ	1	1	10	A	ぐんま名月	1	1	3	A	つがる	1	1	1	A
	2	1		B		2	1		B		2	2		B
	3	1		C		3	1		C		3	3		C
	4	2	16	A		4	1	19	A		4	4	5	A
	5	2		B		5	1		B		5	5		B
	6	2		C		6	2		C		6	6		C
	7	3	26	A		7	2	27	A		7	7	38	A
	8	3		B		8	2		B		8	6		B
	9	3		C		9	2		C		9	9		C
	10	4	56	A		10	2	40	A		10	10	42	A
	11	4		B		11	3		B		11	11		B
	12	4		C		12	3		C		12	12		C
	13	5	60	A		13	3	41	A		13	13	59	A
	14	5		B		14	3		B		14	14		B
	15	5		C		15	3		C		15	15		C
シナノ リップ	1	1	2	A	紅玉	1	1	15	A	ふじ	1	1	9	A
	2	2		B		2	2		B		2	2		B
	3	3		C		3	3		C		3	3		C
	4	4	30	A		4	4	28	A		4	4	20	A
	5	5		B		5	5		B		5	5		B
	6	6		C		6	6		C		6	6		C
	7	7	32	A		7	7	31	A		7	7	37	A
	8	8		B		8	8		B		8	8		B
	9	9		C		9	9		C		9	9		C
	10	10	52	A		10	10	44	A		10	10	43	A
	11	11		B		11	11		B		11	11		B
	12	12		C		12	12		C		12	12		C
	13	13	54	A		13	13	51	A		13	13	50	A
	14	14		B		14	14		B		14	14		B
	15	15		C		15	15		C		15	15		C

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、長野県農業試験場知的財産管理部から、基準品種1種（シナノゴールド）の葉片90検体が、1検体ずつ1.5 ml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ランダムに3検体毎の組計30組に分け、1～30の組番号を付与した。次に、1～30の各組からランダムに1検体ずつを選択して、各組由来の検体を1つずつ含む30検体のグループを3組作成し、これら3組の各々を、凍結状態で3箇所の検証機関へ送付した。

2) 「SSRマーカーによる長野県育成りんご品種のDNA品種識別マニュアル」

(添付資料2)

提供元 : 長野県農業試験場 知的財産管理部

作成機関 : 長野県農業試験場 知的財産管理部

メール添付にて各検証機関に送付した。

3) りんごの検査項目

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。

配布した仕様書の検査項目を表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	
				繰返し数	総実験数
基準品種	シナノゴールド	DNA	500ng	長野県果樹試験場から提供	
試験品種検体		凍結葉片	60検体	2回(*1)	120
品種内多型調査検体	シナノゴールド	凍結葉片	30検体	1回	30
品種識別マーカー:14種類（マニュアルに配列情報記載）					
*1:凍結葉片から抽出したDNAを2分し、PCR増幅以降の工程を2回行う。					

4) りんご検査結果記入票

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及び5を参照のこと)

3. 検査及び結果

1) 検査内容

依頼元から提供された「SSRマーカーによる長野県育成りんご品種のDNA品種識別マニュアル」(添付資料2)中の「表5. りんご12品種、14SSRマーカーの増幅断片長(bp)による遺伝子型」を、DNA鑑定学会において、検査のための参照用に作成し直した(「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検証機関当たり)」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マーカーによる長野県育成りんご品種のDNA品種識別マニュアル」(添付資料2)は送付したものの、各検証機関が実際に使用する手法は問わないというDNA鑑定学会事務局の決定により、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、検証機関の実情に鑑みて適切と思われる手法で検査を行った場合が多々見られている。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

品種名	SSRマーカー																											
	CH02b12	CH01e01	CH02b03b	CH02b10	CH02d11	CH02f06	CH01d08	CH02b07	CH02g09	CH02h11a	CH04d02	CH05c07	CH05g03	CH04d10														
シナゴールド	144	148	119	119	84	84	130	134	121	135	146	151	246	256	115	117	124	143	134	136	127	139	147	157	142	173	157	193
シナスイート	148	148	115	119	84	84	134	142	121	135	146	157	256	260	115	117	116	124	134	136	125	127	143	157	142	169	171	211
シナバルチェ	148	148	115	119	84	84	134	142	121	135	146	151	256	256	115	117	112	124	134	136	139	154	120	147	142	173	167	193
シナリップ	148	148	119	127	84	84	142	142	121	135	151	157	246	256	115	117	112	124	128	134	127	127	120	147	167	169	157	171
秋映	134	144	115	119	84	101	130	134	121	135	151	166	246	246	115	117	112	124	134	136	127	154	120	157	169	173	157	193
王林	148	148	119	119	103	105	134	152	121	151	151	166	256	260	115	115	116	124	134	136	139	154	157	157	142	169	157	193
ぐんま名月	132	148	115	119	84	84	140	142	121	135	146	151	260	277	117	137	116	124	134	136	125	154	120	157	142	173	167	193
紅玉	132	134	115	117	101	103	134	142	123	135	157	166	246	277	117	137	116	141	110	126	127	154	149	157	169	200	171	211
ゴールデンシャス	148	148	115	119	84	105	130	134	121	135	151	166	256	277	115	123	124	143	134	136	127	139	147	157	142	173	193	193
千秋	144	148	119	119	84	84	130	142	121	135	146	151	246	256	115	117	112	124	134	136	127	154	120	157	142	169	157	167
つがる	134	148	115	117	84	101	134	134	121	135	157	166	246	256	115	117	116	124	110	136	127	154	157	157	169	173	171	193
ふじ	148	148	115	119	84	113	140	142	135	135	146	166	246	260	117	117	112	116	134	134	125	127	120	143	142	169	167	211

2) りんごの検査結果

検証機関によるりんごの検査結果を 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「長野県育成りんご品種の DNA 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 100%、正答率 100%であった。

表 7 品種名正答率

品種名	F社					L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	検体数	検査 反復数	検査 総数	正答数	正答率
シナゴールド	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	15	2	30	30	100%
シナスイト	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	15	2	30	30	100%
シナバルチェ	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	15	2	30	30	100%
シナリップ	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	15	2	30	30	100%
秋映	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	15	2	30	30	100%
王林	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	15	2	30	30	100%
ぐんま名月	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	15	2	30	30	100%
紅玉	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	15	2	30	30	100%
ゴールデンデリシャス	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	15	2	30	30	100%
千秋	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	15	2	30	30	100%
つがる	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	15	2	30	30	100%
ふじ	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	5	2	10	10	100%	15	2	30	30	100%
全 体	60	2	120	120	100%	60	2	120	120	100%	60	2	120	120	100%	180	2	360	360	100%

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 8 で算出したところ、検証機関毎に 3,360 本ずつ、全体で 10,080 本のフラグメントのサイズ検査が必要であった。

表 8 検証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	L社	V社	全体
マーカー数	14	14	14	14
マーカー毎の検査フラグメント数	2	2	2	2
検体数	60	60	60	180
検体毎検査回数	2	2	2	2
総検査マーカー数	3360	3360	3360	10080

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段階の正解許容範囲に分け、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 正解許容範囲別の品種毎のマーカーサイズ一致率」である。

表9を見ると、全体を平均してのマーカーサイズ一致率は、正解許容範囲を±0にとると14.8%、±1にとると31.5%、±2にとると61.0%、±3にとると78.0%と、正解許容範囲を広げても、一致率が100%となる品種はなかった。

また、検証機関相互のマーカーサイズ一致率の平均値の差の最大値は、正解許容範囲を±0にとると8.3%、±1にとると17.8%、±2にとると13.4%、±3にとると22.2%となり、正解許容範囲を広げても、いずれの検証機関においても、一致率が100%となる品種はなく、また検証機関毎のばらつきが比較的大きかった。しかし、検証機関相互間で正解許容範囲毎の一致率を比較すると、特定の検証機関がどの正解許容範囲でも常に最大値や最小値を示すことはなく、正解許容範囲に関わらず他の検証機関より一致率が高いまたは低い傾向は見られなかった。

また、これらの表に基づいて、品種毎に正解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明確に認められた。一方、同一の正解許容範囲においては、品種間のマーカーサイズ一致率にはあまり大きな違いは見られなかった。

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	L社	V社	平均	F社	L社	V社	平均
シナゴールド	280	±0	38	40	70	49.3	14%	14%	25%	17.6%
		±1	76	66	130	90.7	27%	24%	46%	32.4%
		±2	206	173	160	179.7	74%	62%	57%	64.2%
		±3	226	253	191	223.3	81%	90%	68%	79.8%
シナスweet	280	±0	32	47	61	46.7	11%	17%	22%	16.7%
		±1	72	86	112	90.0	26%	31%	40%	32.1%
		±2	192	180	152	174.7	69%	64%	54%	62.4%
		±3	216	255	190	220.3	77%	91%	68%	78.7%
シナドルチェ	280	±0	34	41	62	45.7	12%	15%	22%	16.3%
		±1	68	79	124	90.3	24%	28%	44%	32.3%
		±2	182	167	160	169.7	65%	60%	57%	60.6%
		±3	214	253	212	226.3	76%	90%	76%	80.8%
シナリップ	280	±0	42	45	62	49.7	15%	16%	22%	17.7%
		±1	82	75	135	97.3	29%	27%	48%	34.8%
		±2	176	153	161	163.3	63%	55%	58%	58.3%
		±3	218	246	195	219.7	78%	88%	70%	78.5%
秋映	280	±0	30	28	32	30.0	11%	10%	11%	10.7%
		±1	62	73	110	81.7	22%	26%	39%	29.2%
		±2	188	167	140	165.0	67%	60%	50%	58.9%
		±3	210	248	170	209.3	75%	89%	61%	74.8%
玉林	280	±0	56	61	73	63.3	20%	22%	26%	22.6%
		±1	90	115	129	111.3	32%	41%	46%	39.8%
		±2	216	194	175	195.0	77%	69%	63%	69.6%
		±3	228	254	197	226.3	81%	91%	70%	80.8%
ぐんま名月	280	±0	20	21	50	30.3	7%	8%	18%	10.8%
		±1	58	68	106	77.3	21%	24%	38%	27.6%
		±2	190	168	142	166.7	68%	60%	51%	59.5%
		±3	224	251	172	215.7	80%	90%	61%	77.0%
紅玉	280	±0	0	5	15	6.7	0%	2%	5%	2.4%
		±1	32	54	76	54.0	11%	19%	27%	19.3%
		±2	174	156	131	153.7	62%	56%	47%	54.9%
		±3	194	235	180	203.0	69%	84%	64%	72.5%
ゴールデンデリシャス	280	±0	30	41	45	38.7	11%	15%	16%	13.8%
		±1	64	81	104	83.0	23%	29%	37%	29.6%
		±2	174	165	134	157.7	62%	59%	48%	56.3%
		±3	198	252	169	206.3	71%	90%	60%	73.7%
千秋	280	±0	30	31	55	38.7	11%	11%	20%	13.8%
		±1	64	65	124	84.3	23%	23%	44%	30.1%
		±2	196	168	158	174.0	70%	60%	56%	62.1%
		±3	220	252	197	223.0	79%	90%	70%	79.6%
つがる	280	±0	20	27	47	31.3	7%	10%	17%	11.2%
		±1	66	77	119	87.3	24%	28%	43%	31.2%
		±2	200	173	162	178.3	71%	62%	58%	63.7%
		±3	214	255	200	223.0	76%	91%	71%	79.6%
ふじ	280	±0	54	49	93	65.3	19%	18%	33%	23.3%
		±1	86	97	149	110.7	31%	35%	53%	39.5%
		±2	194	159	164	172.3	69%	57%	59%	61.5%
		±3	224	256	192	224.0	80%	91%	69%	80.0%
平均	280	±0	32.2	36.3	55.4	41.3	11.5%	13.0%	19.8%	14.8%
		±1	68.3	78.0	118.2	88.2	24.4%	27.9%	42.2%	31.5%
		±2	190.7	168.6	153.3	170.8	68.1%	60.2%	54.7%	61.0%
		±3	215.5	250.8	188.8	218.4	77.0%	89.6%	67.4%	78.0%

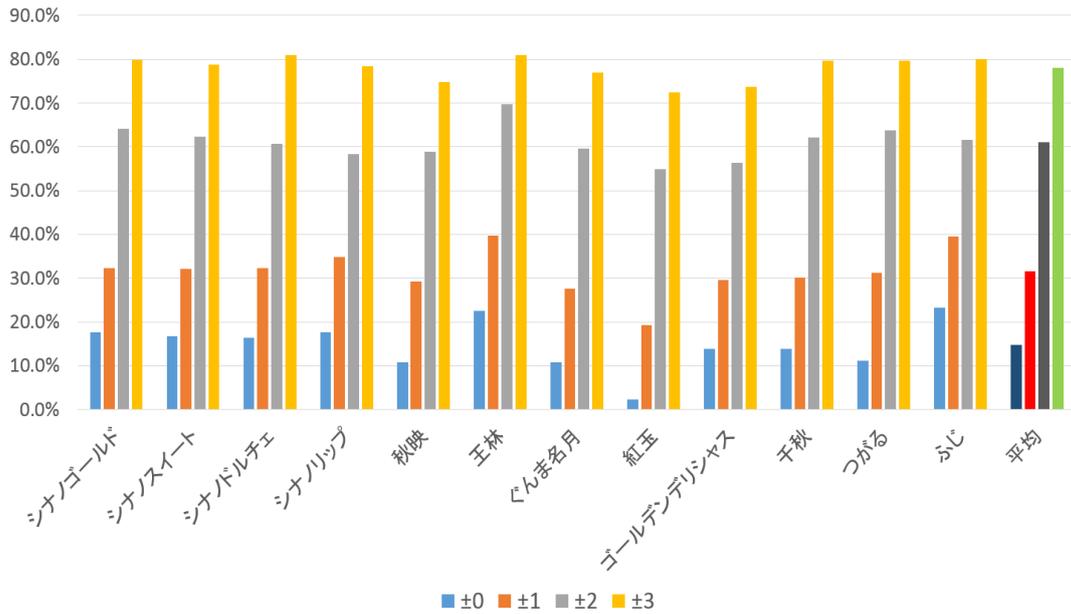


図1 正解の許容範囲と品種毎のマーカサイズ一致率の関係

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、特に正解の許容範囲の狭い場合に機関により一致率に差が見られるが、正解の許容範囲を設けるとマーカサイズ一致率が高くなる傾向は、検証機関相互の間で大きな相違は見られなかった。

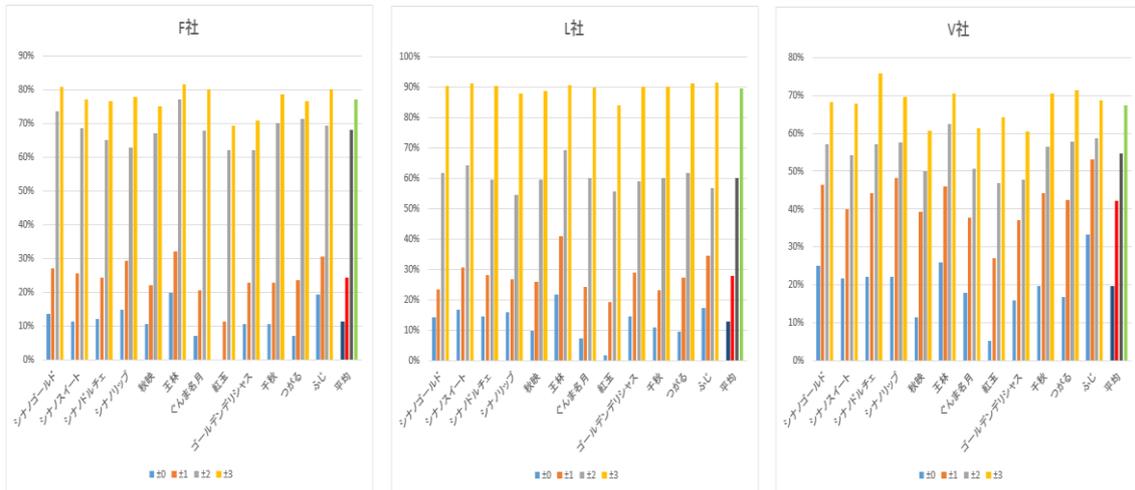


図2 検証機関毎の正解の許容範囲とマーカサイズ一致率の関係

次に、各検体と正解品種のマーカサイズの一致数と一致率を算出し、マーカサイズ毎に集計したものが下記の表10、グラフ化したものが図3である。(詳細なデータは、添付資料4「品種毎マーカサイズの一致数と一致率」参照のこと。)

表10 マーカー毎の一致状況

A. マーカーサイズ一致数

正解許容範囲		±0				±1				±2				±3			
検証機関		F社	L社	V社	全体	F社	L社	V社	全体	F社	L社	V社	全体	F社	L社	V社	全体
マーカー	CH02b12	0	0	22	22	0	25	22	47	62	89	24	175	70	116	34	220
		20	50	50	120	20	62	50	132	64	95	50	209	64	107	50	221
		0	1	59	60	80	80	59	219	80	80	78	238	120	120	79	319
	CH01e01	30	30	119	179	30	30	120	180	30	30	120	180	120	119	120	359
		0	0	0	0	0	13	0	13	20	20	9	49	20	93	30	143
	CH02b03b	60	60	60	180	60	60	60	180	60	61	60	181	60	100	62	222
		30	24	2	56	30	42	30	102	50	49	38	137	50	63	74	187
	CH02b10	20	20	20	60	20	20	20	60	30	23	20	73	30	67	35	132
		0	0	0	0	10	1	2	13	120	115	110	345	120	120	120	360
	CH02d11	20	10	10	40	26	19	12	57	120	105	22	247	120	120	119	359
		0	18	58	76	60	68	109	237	120	119	120	359	120	119	120	359
	CH02f06	0	20	0	20	60	120	103	283	120	120	120	360	120	120	120	360
		0	5	38	43	120	20	120	260	120	21	120	261	120	105	120	345
	CH01d08	20	20	45	85	92	20	104	216	120	35	119	274	120	108	120	348
		0	0	0	0	0	0	10	10	70	27	20	117	70	76	80	226
	CH02b07	20	20	20	60	20	20	20	60	20	20	20	60	28	20	30	78
		10	0	7	17	10	8	10	28	10	28	12	50	16	120	26	162
	CH02a09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	2	20	20	120	7	147
		78	80	0	158	80	82	120	282	120	116	120	356	120	120	120	360
	CH02h11a	10	10	10	30	12	10	120	142	120	118	120	358	120	120	120	360
		20	18	19	57	20	21	24	65	118	101	106	325	120	119	120	359
	CH04d02	10	10	10	30	28	27	18	73	120	118	117	355	120	120	120	360
		0	0	0	0	0	8	0	8	26	32	2	60	120	119	11	250
	CH05c07	20	20	20	60	20	38	20	78	90	94	24	208	120	120	32	272
		10	10	0	20	10	12	28	50	120	46	38	204	120	120	48	288
	CH05a03	0	0	0	0	4	10	0	14	120	111	10	241	120	120	110	350
		0	0	21	21	0	79	120	199	120	120	120	360	120	120	120	360
	CH04d10	8	10	75	93	8	41	117	166	118	112	118	348	118	119	118	355
	全体	386	436	665	1487	820	936	1418	3174	2288	2023	1839	6150	2586	3010	2265	7861

B. マーカーサイズ一致率

正解許容範囲		±0				±1				±2				±3			
検証機関		F社	L社	V社	全体	F社	L社	V社	全体	F社	L社	V社	全体	F社	L社	V社	全体
マーカー	CH02b12	0.0%	0.0%	18.3%	6.1%	0.0%	20.8%	18.3%	13.1%	51.7%	74.2%	20.0%	48.6%	58.3%	96.7%	28.3%	61.1%
		16.7%	41.7%	41.7%	33.3%	16.7%	51.7%	41.7%	36.7%	53.3%	79.2%	41.7%	58.1%	53.3%	89.2%	41.7%	61.4%
	CH01e01	0.0%	0.8%	49.2%	16.7%	66.7%	66.7%	49.2%	60.8%	66.7%	66.7%	65.0%	66.1%	100.0%	100.0%	65.8%	88.6%
		25.0%	25.0%	99.2%	49.7%	25.0%	25.0%	100.0%	50.0%	25.0%	25.0%	100.0%	50.0%	100.0%	99.2%	100.0%	99.7%
	CH02b03b	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	10.8%	0.0%	3.6%	16.7%	16.7%	7.5%	13.6%	16.7%	77.5%	25.0%	39.7%
		50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%	50.8%	50.0%	50.3%	50.0%	83.3%	51.7%	61.7%
	CH02b10	25.0%	20.0%	1.7%	15.6%	25.0%	35.0%	25.0%	28.3%	41.7%	40.8%	31.7%	38.1%	41.7%	52.5%	61.7%	51.9%
		16.7%	16.7%	16.7%	16.7%	16.7%	16.7%	16.7%	16.7%	25.0%	19.2%	16.7%	20.3%	25.0%	55.8%	29.2%	36.7%
	CH02d11	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	8.3%	0.8%	1.7%	3.6%	100.0%	95.8%	91.7%	95.8%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
		16.7%	8.3%	8.3%	11.1%	21.7%	15.8%	10.0%	15.8%	100.0%	87.5%	18.3%	68.6%	100.0%	100.0%	99.2%	99.7%
	CH02f06	0.0%	15.0%	48.3%	21.1%	50.0%	56.7%	90.8%	65.8%	100.0%	99.2%	100.0%	99.7%	100.0%	99.2%	100.0%	99.7%
		0.0%	16.7%	0.0%	5.6%	50.0%	100.0%	85.8%	78.6%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	CH01d08	0.0%	4.2%	31.7%	11.9%	100.0%	16.7%	100.0%	72.2%	100.0%	17.5%	100.0%	72.5%	100.0%	87.5%	100.0%	95.8%
		16.7%	16.7%	37.5%	23.6%	76.7%	16.7%	86.7%	60.0%	100.0%	29.2%	99.2%	76.1%	100.0%	90.0%	100.0%	96.7%
	CH02b07	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	8.3%	2.8%	58.3%	22.5%	16.7%	32.5%	58.3%	63.3%	66.7%	62.8%
		16.7%	16.7%	16.7%	16.7%	16.7%	16.7%	16.7%	16.7%	16.7%	16.7%	16.7%	16.7%	23.3%	16.7%	25.0%	21.7%
	CH02a09	8.3%	0.0%	5.8%	4.7%	8.3%	6.7%	8.3%	7.8%	8.3%	23.3%	10.0%	13.9%	13.3%	100.0%	21.7%	45.0%
		0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	15.0%	1.7%	5.6%	16.7%	100.0%	5.8%	40.8%
	CH02h11a	65.0%	66.7%	0.0%	43.9%	66.7%	68.3%	100.0%	78.3%	100.0%	96.7%	100.0%	98.9%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
		8.3%	8.3%	8.3%	8.3%	10.0%	8.3%	100.0%	39.4%	100.0%	98.3%	100.0%	99.4%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	CH04d02	16.7%	15.0%	15.8%	15.8%	16.7%	17.5%	20.0%	18.1%	98.3%	84.2%	88.3%	90.3%	100.0%	99.2%	100.0%	99.7%
		8.3%	8.3%	8.3%	8.3%	23.3%	22.5%	15.0%	20.3%	100.0%	98.3%	97.5%	98.6%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	CH05c07	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	6.7%	0.0%	2.2%	21.7%	26.7%	1.7%	16.7%	100.0%	99.2%	9.2%	69.4%
		16.7%	16.7%	16.7%	16.7%	16.7%	31.7%	16.7%	21.7%	75.0%	78.3%	20.0%	57.8%	100.0%	100.0%	26.7%	75.6%
	CH05a03	8.3%	8.3%	0.0%	5.6%	8.3%	10.0%	23.3%	13.9%	100.0%	38.3%	31.7%	56.7%	100.0%	100.0%	40.0%	80.0%
		0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3.3%	8.3%	0.0%	3.9%	100.0%	92.5%	8.3%	66.9%	100.0%	100.0%	91.7%	97.2%
	CH04d10	0.0%	0.0%	17.5%	5.8%	0.0%	65.8%	100.0%	55.3%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
		6.7%	8.3%	62.5%	25.8%	6.7%	34.2%	97.5%	46.1%	98.3%	93.3%	98.3%	96.7%	98.3%	99.2%	98.3%	98.6%
	全体	11.5%	13.0%	19.8%	14.8%	24.4%	27.9%	42.2%	31.5%	68.1%	60.2%	54.7%	61.0%	77.0%	89.6%	67.4%	78.0%

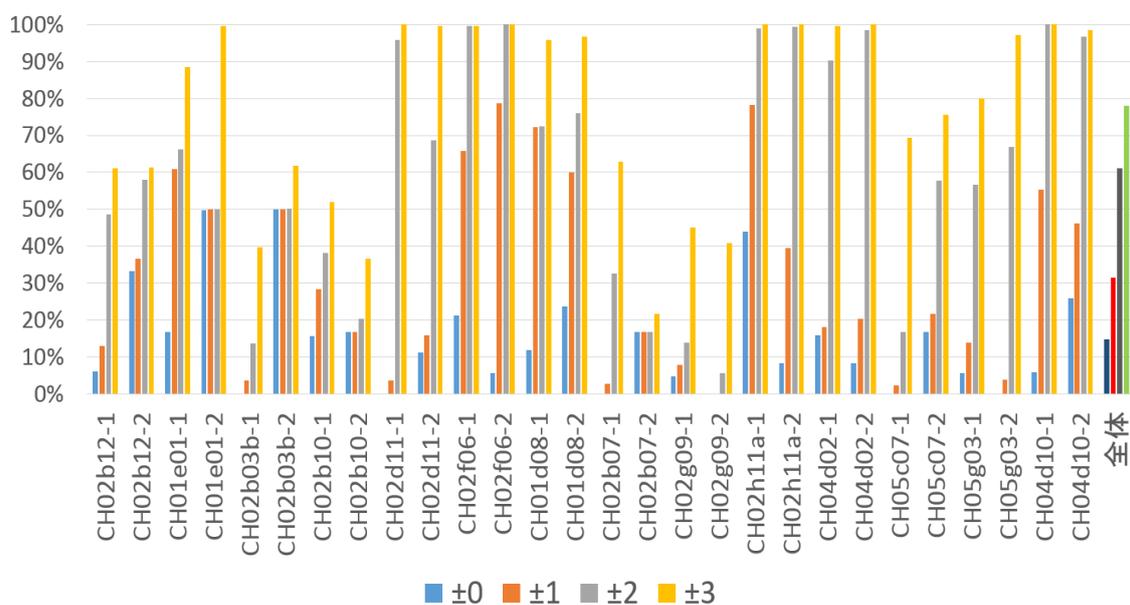


図3 マーカー毎のサイズ一致率

なお、各マーカーには2本のフラグメントが含まれるため、図3においては、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、60検体3組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。

全体としてのマーカーサイズ一致率は、品種毎に分析した上記の結果の通り、正解の許容範囲を±0にとると14.8%であり、許容範囲を拡げるにつれて高くなるものの、全体にかなり低かった。一致率100%となるマーカーフラグメントは、14マーカー28種のうち許容範囲±0及び±1では0%、±2で2種、±3で6種に過ぎなかった。

一致率はマーカー間で大きく異なり、さらに同一マーカー内の2種のマーカーフラグメント間でも異なっていた。2種のマーカーフラグメントの両方が一致率100%を示したマーカーは、許容範囲を±3まで拡げてようやく1種認められたのみであった。

CH02b07はマーカーフラグメントサイズの一貫率が2本とも50%以下、CH02b10も2本のうち1本の一貫率がわずかに50%を超えた程度の一貫率の低さであり、CH02b12、CH02b03b及びCH02b07の3マーカーも、1本或いは2本のマーカーフラグメントのサイズの一貫率がわずかに60%を超えた程度であった。

(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、シナノゴールドの1品種のみにつき、1検証機関当たり30検体、3検証機関全体で90検体を用いて行った。提供元の長野県農業試験場知的財産管理部によれば、これらの検体は全て、異なる樹木より採取されたものとのことである。長野県農業試験場知的財産管理部から、各2mLの検体チューブに密封されて1～30の番号を振られた30検体×3組のシナノゴールドの葉片検体が、冷凍状態でDNA鑑定学会宛てに配送された。DNA鑑定学会から、それぞれの組の検体を3箇所の検証機関に冷凍状態のまま配布し、検査を施行した。

詳細なデータは、「添付資料5 長野県育成りんご品種のDNA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 シナノゴールド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	マーカサイズ平均一致数				マーカサイズ平均一致率			
		F社	L社	V社	平均	F社	L社	V社	平均
±0	28	4.0	4.0	7.4	5.1	14%	14%	26%	18.3%
±1	28	7.4	6.2	13.2	8.9	26%	22%	47%	31.8%
±2	28	21.0	17.1	16.7	18.3	75%	61%	60%	65.2%
±3	28	23.4	25.3	20.8	23.2	84%	90%	74%	82.8%

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18.3%、±1をとると30.4%、±2をとると65.2%、±3をとると82.8%となり、品種識別検査における同品種の一致状況と類似の結果がえられ、一致率としては、やはりかなり低い値となった。この結果は、グラフ表示した下記の図4で明確に示される。

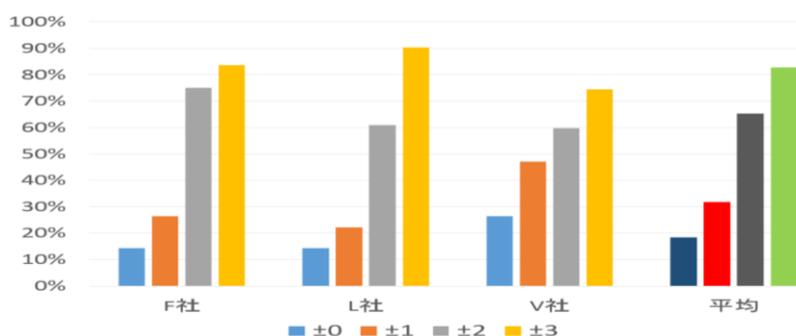


図4 検証機関毎のマーカサイズ一致率

なお、検体毎のマーカーサイズ的一致数及び一致率の詳細なデータは、「添付資料 6 検体毎正解許容範囲毎の品種内多型検査結果」参照のこと。

次に、マーカー毎のサイズ一致状況を表 1 2、更に図 5 に示した。なお、品種識別検査の結果で前述したように、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 2 本のフラグメントの検査結果を分けて表示してある。

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

マーカー	最大一致マーカー数	一致数				一致率			
		±0	±1	±2	±3	±0	±1	±2	±3
CH02b12	30	9	9	30	30	28.9%	28.9%	100.0%	100.0%
	30	0	0	21	21	0.0%	0.0%	71.1%	71.1%
CH01e01	30	10	10	10	30	33.3%	33.3%	33.3%	100.0%
	30	30	30	30	30	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
CH02b03b	30	0	0	0	4	0.0%	0.0%	0.0%	14.4%
	30	30	30	30	30	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
CH02b10	30	24	30	30	30	80.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	30	0	0	0	1	0.0%	0.0%	0.0%	4.4%
CH02d11	30	0	3	30	30	0.0%	11.1%	100.0%	100.0%
	30	0	1	20	30	0.0%	3.3%	66.7%	100.0%
CH02f06	30	9	10	30	30	28.9%	33.3%	100.0%	100.0%
	30	0	28	30	30	0.0%	94.4%	98.9%	98.9%
CH01d08	30	5	20	21	30	17.8%	66.7%	68.9%	100.0%
	30	7	20	20	30	23.3%	66.7%	66.7%	100.0%
CH02b07	30	0	1	11	30	0.0%	4.4%	37.8%	100.0%
	30	0	0	0	1	0.0%	0.0%	0.0%	4.4%
CH02g09	30	0	0	1	18	0.0%	0.0%	3.3%	60.0%
	30	0	0	0	12	0.0%	0.0%	0.0%	40.0%
CH02h11a	30	20	30	30	30	66.7%	100.0%	100.0%	100.0%
	30	0	10	30	30	0.0%	33.3%	100.0%	100.0%
CH04d02	30	0	0	26	30	0.0%	0.0%	87.8%	100.0%
	30	0	1	30	30	0.0%	4.4%	100.0%	100.0%
CH05c07	30	0	0	3	21	0.0%	0.0%	11.1%	71.1%
	30	0	1	21	25	0.0%	2.2%	71.1%	82.2%
CH05g03	30	0	0	12	21	0.0%	0.0%	38.9%	71.1%
	30	0	5	21	30	0.0%	15.6%	71.1%	100.0%
CH04d10	30	1	15	30	30	3.3%	48.9%	100.0%	100.0%
	30	9	13	30	30	31.1%	44.4%	100.0%	100.0%
平均	30	5.5	9.5	19.6	24.8	18.3%	31.8%	65.2%	82.8%

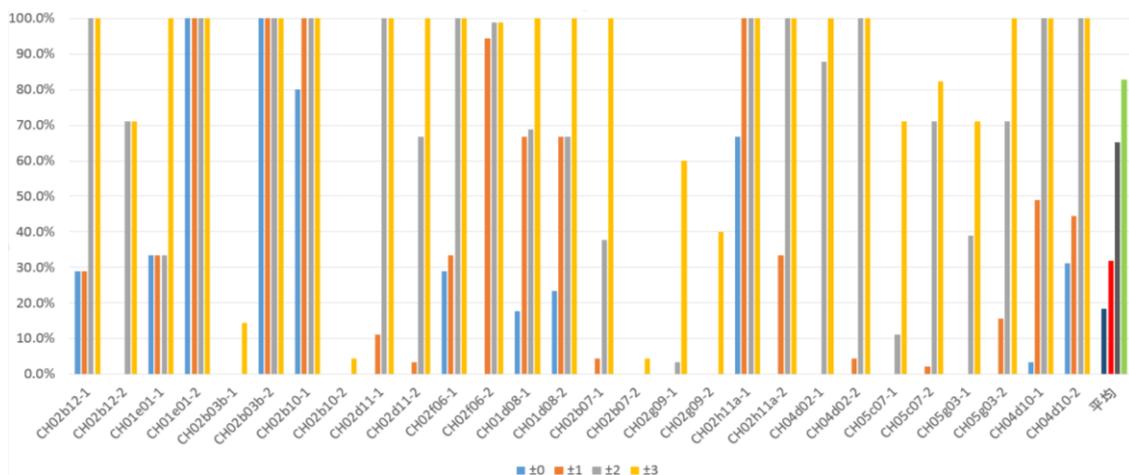


図5 品種内多型調査におけるマーカー毎のサイズ一致率

フラグメント毎のサイズ一致率は、正解許容範囲を広げるに従って高くなる傾向は認められるが、±0、±1、±2のいずれにとっても0%~100%、±3にとると4.4%~100%となった。また、いずれの場合にも、マーカーフラグメント毎に一致率が大きく異なる結果となった。

2本のマーカーフラグメントの両方のサイズ一致率が100%となるマーカーは、正解許容範囲を±または±1にとった場合は1つもなく、±2にとった場合は唯一CH04d10、±3にとった場合はCH01e01、CH02d11、CH01d08、CH02h11a、CH04d02及びCH04d10の6つであった。

マーカー毎のサイズの一貫数及び一致率の詳細なデータは、「添付資料7 マーカー毎正解許容範囲毎の品種内多型検査結果のマーカー一致状況」参照のこと。

4. 「SSRマーカーによる長野県育成りんご品種のDNA品種識別マニュアル Ver1.1」に記載された品種識別用マーカーの妥当性評価

りんご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、これらのマーカーを用いて、3か所の検証機関でそれぞれ下記2種の検査を行った。

- 1) 60検体のりんご凍結葉片のブラインドでの品種識別検査
- 2) 基準品種としてのシナノゴールド90検体を用いた品種内多型検査

1) の結果は以下のものであった。

- ① 60検体各2回ずつの検査における品種名の正答率は、全ての検証機関において100%であった。
- ② マーカーサイズの一致率は、全体として、正解の許容範囲のDNA鎖長を±0にとった場合は14.8%、±1にとると31.5%、±2にとると61.0%、±3にとると78.0%と低く、正解許容範囲を広げるに従って大きく上昇した。
- ③ 同一の正解許容範囲においては、品種間のマーカーサイズ一致率にはあまり大きな違いは見られなかった。
- ④ 検証機関相互のマーカーサイズ一致率の平均値の差の最大値は、許容範囲を±0にとると8.3%、±1にとると17.8%、±2にとると13.4%、±3にとると22.2%となり、検証機関毎のばらつきが比較的大きかった。
- ⑤ 一致率100%となるマーカーフラグメントは、14マーカー28種のうち許容範囲±0及び±1では0%、±2で2種、±3で6種に過ぎなかった。一致率はマーカー間で大きく異なり、さらに同一マーカー内の2種のマーカーフラグメント間でも異なっていた。2種のマーカーフラグメントの両方が一致率100%を示したマーカーは、許容範囲を±3まで広げてようやく1種認められたのみであった。
- ⑥ マーカーサイズ一致率はマーカー毎に大きく異なり、同一マーカーの2本のマーカーフラグメントのマーカーサイズ一致率がどちらも60%台以下しかないマーカーが、14種類のうち5種類認められた。

2) の結果は以下のものであった。

- ① シナノゴールド90検体のマーカーサイズの一致率は、全体として、正解の許容範囲として±0をとると18.3%、±1をとると30.4%、±2をとると65.2%、±3をとると82.8%であった。正解許容範囲を広げるに従って大きく上昇することも併せて、品種識別検査における同品種の一致状況と類似の結果が得られた。
- ② 検証機関毎のマーカーサイズ一致率も、いずれの検証機関においても、正解許容範囲を広げるに従って大きく上昇する傾向が見られた。
- ③ 検証機関毎のシナノゴールド30検体の検査結果測定値の標準偏差は、正解許容

範囲を±0にとると0%～5.7%、±1にとると2.1%～4.1%、±2にとると0%～8.3%、±3にとると1.5%～10.6%であり（添付資料6参照のこと）、どの正解許容範囲でも常に一致率が高い或いは低い検証機関は認められなかった。

- ④ マーカーサイズの一致率については、今回提示された14マーカーのうち4マーカーで、2本のマーカーフラグメントのうち少なくとも1本が60%程度以下の一致率しか示さなかった。また、これらのうち1つのマーカーは、2本のマーカーフラグメントの両方のマーカーサイズ一致率が、60%以下であった。

上記1) ①の結果からまず、「今回提供されたマーカーセットにより、今回検査を行った12品種の検体の品種識別は正確に行える。」ことが言える。ただし、シナノゴールド以外の品種については、今回検査対象とした品種は各5検体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。

次に、上記1) ②、1) ⑤、1) ⑥、2) ①、2) ④の結果を合わせて考慮すると、マーカーの精確さについては、かなり問題が大きいと考えざるを得ない。

この問題の主要な原因としては、使用機器の違いにより測定値に偏りが生じている可能性が考えられる。今回提供されたマニュアルのデータは、各フラグメントサイズの測定に、Beckman Coulter製のCEQ-8800 Genetic Analysis Systemを測定器としたGe-XPシステムを用いて構築されている。一方で、今回の検査を実施した検証機関は3か所とも、Applied Biosystems製の310或いは3730 Genetic Analyserを用いて測定結果を出している。これらの違いは機器のみではなく、それぞれのシステムにおいてフラグメントの検出に用いる蛍光色素やサイズスタンダードも異なっていることから、異なるシステムで得られた結果を直接比較することは、誤差要因が大きく困難とされている。実際に、その点を懸念した複数の検証機関から問合せがなされたが、これに対し、DNA鑑定学会事務局からは、問題なしと回答がなされたとのことであった。今回提供されたマニュアルでの使用機器と同じ機種を稼働させている検証機関が見つからなかったため、今回の検査に関しては、やむを得ず、マニュアルの記載とは異なる機器を使用した検査を行うこととなったものと考えられるが、この違いに起因する誤差が検査結果の測定値に偏りを生じ、マーカーフラグメントサイズの一致率を下げる原因となった可能性は高いと思われた。

このような使用システムの違いがデータの系統的なずれを生じるとすれば、今回提供された各マーカーフラグメントのサイズ情報と各検証機関の検査結果とは、すべて一定値のずれを生じている可能性がある。この可能性を確認するため、今回の品種内多型検査において各機関で得られたシナノゴールドのマーカーフラグメントのサイズとマニュアル記載の基準サイズとの間にどの程度の相違があるかを集計しグラフ化してみたところ、下記の図

6のような結果となった。

図6を見ると、F社とL社のデータは、-2にピークを有する一峰性の分布、V社のデータは、-4と0にやや不明瞭なピークを有する二峰性の分布を示しているように見えた。

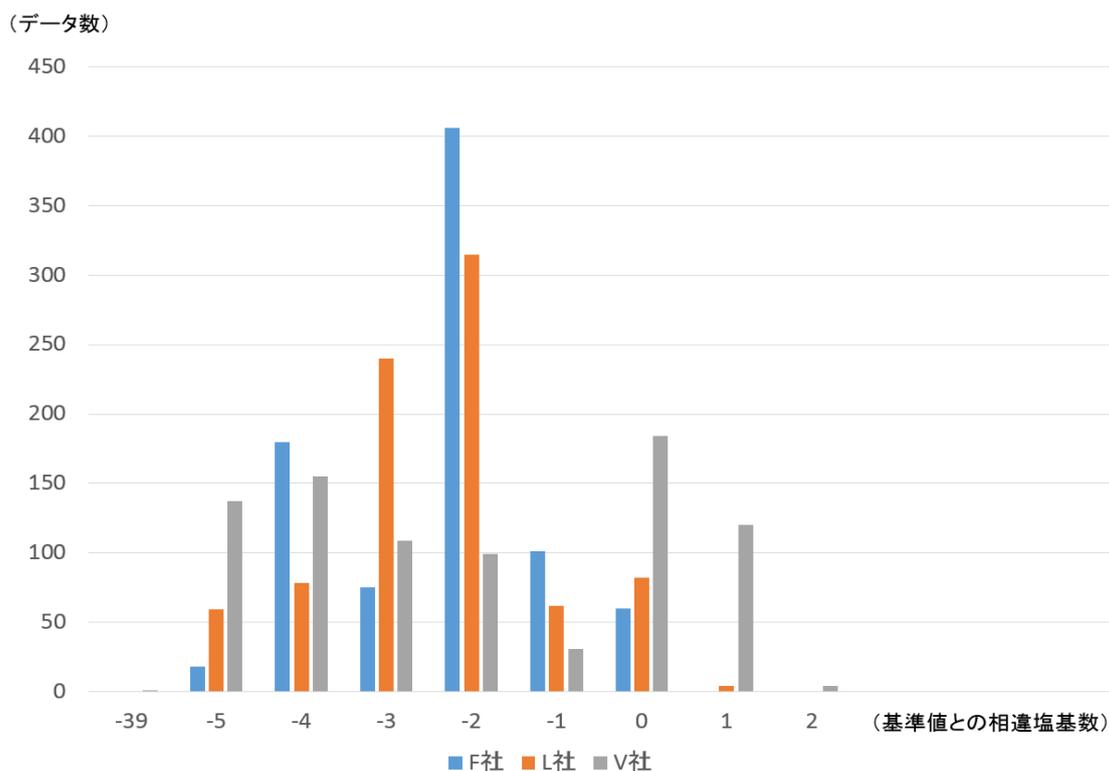


図6 シナノゴールドにおける基準値と検査結果のマーカサイズの相違

F社及びL社はそれぞれ1種、V社は2種のApplied Biosystems製のシステムを使用して今回の検査データを得ているとの情報を合わせて考えると、F社及びL社のデータは、マニュアルの基準値よりも2塩基短い値となっている可能性があり、V社のデータは使用機器により、マニュアルと同じ鎖長又は3塩基短い値が得られている可能性もあると考えられた。そうだとすれば、品種識別検査における検査結果についても、F社及びL社については2塩基、V社についてはデータにより3塩基のずれを考慮すれば、基準値と検査結果が一致する可能性もあると思われた。

そこで、品種識別検査結果について、マニュアルの基準値と検査結果のマーカフラグメントサイズとの差を、検証機関毎かつ品種毎に、個々の検体の個々のマーカフラグメントについて計算し集計してみたところ、図7のようなグラフとなった。基準値と検査結果の差の分布パターンは、それぞれの検証機関のデータ内では、品種毎に多少の差はあっても類似したパターンを示したが、差の値は幅広く分布し、マーカ毎に基準値と検査結果の差の

大きさに違いがあるものと考えられた。また、いずれの検証機関の結果も、基準値と検査結果の差の分布が一峰性のグラフにはならなかった。これらの結果から、たとえ検証機関毎であるにせよ、品種識別の検査結果を一律の値の加減で補正することはできないものと考えられた。

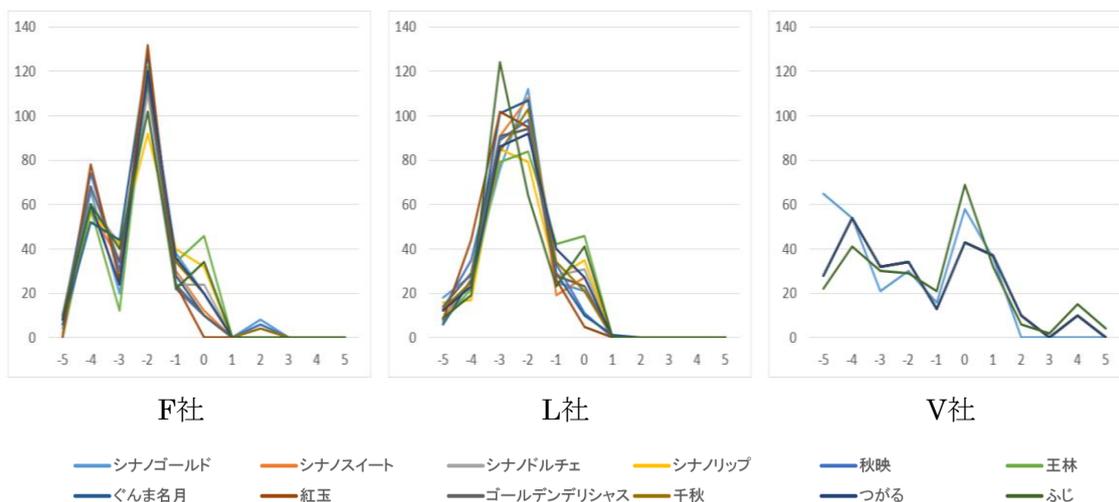


図7 検証機関毎のマーカーフラグメント検査結果と基準値の差

また、図7では、三か所の検証機関毎に基準値と検査結果の差は異なっており、この結果に上記の結果1)④及び2)③を合わせて考えると、Applied Biosystems製の同型機種種の測定器でも、測定値に個体差があるように思われた。この点からも、品種識別の検査結果を一律の値の加減で補正することはできないものと考えられた。

更に、補正という考え方については、別の問題も存在する。本マニュアルで選択されているマーカーは2塩基の繰返し配列が基本であるため、上述したような使用機器の相違により生じ得る誤差を考えれば、本来は、正解に許容範囲を設けて解釈を行うことはできない。例えば同一マーカーで100塩基鎖長の検体と102塩基鎖長の検体は、正解許容範囲を±1とすると、どちらも101塩基の鎖長となって識別不能となるリスクがあるためである。実際に今回使用したCH02d11、CH02b07、CH04d02の各マーカーでは、表6で見ると、マーカーサイズの差が2塩基という品種が複数存在する。この状況では、正解は±0の測定値で判断するしかない。

品種識別検査を行う機関が、同一内容の実験を行う複数の高価な機種を取り揃えるのは現実的ではない。このため、品種識別に用いるマーカーは、機種を問わず同定可能なものである必要がある。この観点に立つと、品種識別検査における今回の検査結果である14.8%というマーカーサイズ一致率は、極めて低いと言わざるを得ない。

このような事態を避けるため、DNA鑑定学会では、添付資料1.の2.3.1マーカー

の開発の(3)の記載にあるように、4塩基以上の繰返し配列をマーカーとすることを推奨している。(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。)

同様の理由から、品種内多型検査の結果についても、基準値と検査結果のマーカーサイズ一致率は、シナノゴールドという1品種のみについても18.3%に過ぎない。しかし、2)④に上述したように、個々の検証機関内の検査結果の標準偏差は0%~5.7%で、ばらつきは小さい。従って、基準値との一致を差し置いて検査結果のみから多型の有無を判断することも考えられる。そこで、検証機関毎に、多型検査の全30検体の検査結果のマーカーフラグメント毎の測定値と標準偏差を求めてみると、下記の表13に示す結果となった。

表13 検証機関毎の多型検査結果の測定値と標準偏差

マーカー	サイズ				標準偏差				マーカー 平均値
	マーカーフラグメント				マーカーフラグメント				
	F社	L社	V社	平均値	F社	L社	V社	平均値	
CH02b12	142	141	140	140.9	0.3	0.0	0.6	0.31	0.27
	146	146	144	145.4	0.0	0.0	0.7	0.23	
CH01e01	116	116	119	117.0	0.0	0.0	0.0	0.00	0.00
	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	
CH02b03b	79	80	80	79.8	0.5	0.5	0.7	0.56	0.28
	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	
CH02b10	126	126	126	125.9	0.0	0.2	0.7	0.30	0.27
	130	130	130	129.9	0.0	0.0	0.7	0.24	
CH02d11	119	119	119	119.1	0.4	0.0	0.3	0.25	0.31
	133	133	132	132.7	0.2	0.3	0.6	0.36	
CH02f06	144	144	146	144.7	0.0	0.0	0.3	0.12	1.28
	150	150	151	150.3	0.0	0.0	7.3	2.45	
CH01d08	245	243	246	244.6	0.0	0.3	0.6	0.29	0.22
	255	253	256	254.6	0.0	0.0	0.5	0.16	
CH02b07	111	110	110	110.4	0.0	0.0	0.7	0.24	0.23
	113	112	112	112.4	0.0	0.0	0.7	0.23	
CH02g09	120	121	121	120.6	0.5	0.0	0.7	0.39	0.35
	139	140	139	139.3	0.3	0.0	0.7	0.31	
CH02b11a	132	132	135	133.0	0.0	0.3	0.0	0.08	0.04
	134	134	137	135.0	0.0	0.0	0.0	0.00	
CH04d02	125	125	125	124.9	0.0	0.4	0.3	0.26	0.19
	137	137	137	137.0	0.0	0.0	0.3	0.12	
CH05e07	144	144	142	143.5	0.0	0.5	0.7	0.39	0.36
	155	155	154	154.6	0.0	0.3	0.7	0.33	
CH05g03	140	139	138	139.1	0.0	0.2	0.7	0.29	0.34
	171	171	170	170.9	0.3	0.5	0.3	0.39	
CH04d10	155	155	158	156.1	0.0	0.5	0.3	0.27	0.26
	191	191	193	191.8	0.0	0.5	0.3	0.24	
平均値					0.09	0.15	0.70	0.31	0.31

これを見ると、V社におけるCH02f06の2つ目のマーカースラグメントサイズの標準偏差だけが7.3と大きな値を示した以外は、全てのマーカースラグメントの標準偏差は1よりかなり小さかった。これら標準偏差が1よりかなり小さかったマーカースラグメント長の多型は検出されないと判断してよいと思われる。

また、F社とL社の標準偏差がV社より小さかったのは、V社がApplied Biosystems製の異なる2機種計2台を検体により使い分けて解析を行ったためと思われる。

次に、1つだけ標準偏差が大きい値を示したV社のCH02f06の2つ目のマーカースラグメントのデータを、元のデータである添付資料5の表で見ると、No.17の検体のサイズだけが他の29検体のサイズより約40塩基短く、これが標準偏差を極めて大きな値とする原因であった。この結果から、V社のNo.17検体のCH02f06の2つ目のマーカースラグメントは、他のシナノゴールドの検体とは異なるマーカースイズを有し、CH02f06のマーカースラグメントにおける多型が検出されたと考えてよいかもしれない。

しかし、このマーカースラグメント多型検査の検体は、3か所の検証機関に各30検体ずつが配布されたが、それら計90検体は、DNA鑑定学会事務局の指示により、すべて異なる樹木から採取されたものとのことである。このため、他の検証機関の検査結果を再現性について確認するための参考とすることはできない。また、品種内多型検査は各検体1回ずつのみの検査とされているため、同一の検証機関内での結果の再現性を確認することもできない。従って、V社No.17検体のCH02f06の2つ目のマーカースラグメントサイズが他の検体より短いこと、即ち、この検体のこのマーカースラグメントに多型性が存在することは、可能性はあるが確認はできない。

仮に上記の検査結果が正しければ、他の検証機関の検査結果も併せて、今回の検体では、計90検体中1検体、1.1%の確率で、シナノゴールドのCH02f06の2つ目のマーカースラグメントに、サイズの多型が存在するといえる。

なお、V社が品種識別検査を行った5検体のシナノゴールドのCH02f062つ目のマーカースラグメントは、各2回ずつ検査を行っているが、この多型検査で得られた他の29検体と同じ値を示した。

上記のように基準値と検査結果の差に基づいて考察を進めてくると、最初に記述した「今回提供されたマーカースラグメントセットにより、今回検査を行った12品種の検体の品種識別は正確に行える。」という結論が得られたことが、却って不可解に思えるが、この結論が得られた理由は、二つ考えられる。

一つは、品種間のマーカースラグメントサイズのパターンの違いが大きくまたマーカースラグメント数も多いため、正解値を外れるマーカースラグメントがあっても、全マーカースラグメントの検査結果を見渡して相対的にパターン比較を行うことにより、正しい品種名を確定できるようなマーカースラグメントセットになっている可能性である。実際に、「品種識別検査のマーカースラグメント「CH02b12」につきましては、品種内

でサイズに統一性がなく、マーカーテーブルの値とほぼ全て異なっておりましたので、それ以外のマーカーで品種を判定しております。」とのコメントを送ってきた検証機関もあった。しかしこの状態では、マーカーサイズに基づく精確な品種判定を行うことはできていない。精度の高い検査に基づく品種判定を行うためには、マーカー領域の塩基配列を決定して正確なマーカーサイズを解明し、これを基準として品種識別検査を行うことが必要と考えられる。

二つ目は、DNA 鑑定学会事務局が品種識別検査前に、検証機関に対して検査対象の品種名と個体数を予め通知しているため、類似した検査結果を判定する際に、その情報が有益に利用できることである。現実の場面でこのような情報は使用できないと思われるため、この点については、学会事務局の手順を、検査結果への影響の少ない、より現実に即したものに改良することが必要と思われる。

以上より、今回検討したりんごの品種識別マーカーについて得られる結論は、以下の通りである。

「今回提供されたマーカーセットを用いて今回対象とした 12 種類のりんご品種を相互に識別することは正確に行えるが、マーカー自体の精度は低い。今回のマーカーは 2 塩基の繰り返し配列を基本とするため、本来は許容範囲を設定できないことに鑑みると、繰り返し単位が 4 塩基以上のマーカーを選択し直すことも含め、塩基配列の決定に基づく正確なサイズが明らかなマーカーセットの作成が必要である。」

以上

